

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana D. Šaganović

**Morfološka varijabilnost i razvojne anomalije
vrste *Lepidurus couesii* Packard, 1875
(Branchiopoda, Notostraca) iz Srbije**

Doktorska disertacija

Beograd, 2022

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Ivana D. Šaganović

Morphological variation and developmental anomalies in *Lepidurus couesii* Packard, 1875 (Branchiopoda, Notostraca) from Serbia

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2022

MENTORI:

dr Vladimir Tomić, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Dragana Miličić, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE ZA ODBRANU DOKTORSKE DISERTACIJE:

dr Aleksandra Korać, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Ana Ivanović, redovni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Aleksandar Ostojić, redovni profesor

Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Kragujevcu

Institut za biologiju i ekologiju

dr Boris Dudić, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za dinamiku razvića životinja Univerziteta u Beogradu – Biološkog fakulteta, uz finansijsku podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: Projekat „Ontogenetska karakterizacija filogenije bioraznovrsnosti”, evidencioni broj 173038.

Veliku zahvalnost dugujem mentorki, doc. dr Dragani Miličić, na angažovanju i podršci tokom doktorskih studija i pisanja disertacije. Takođe, hvala mentoru prof. dr Vladimiru Tomiću.

Hvala prof. dr Aleksandri Korać i prof. dr Ani Ivanović na konstruktivnim savetima i kolegijalnosti tokom doktorskih studija i izrade disertacije.

Hvala prof. dr Aleksandru Ostojiću na sugestijama koje su značajno doprinele kvalitetu disertacije.

Hvala dr Mariji Aleksić na korisnim sugestijama i pomoći tokom rada u laboratoriji.

*Hvala mojim prijateljima, porodici i **Milanu**.*

Ova disertacija je posvećena mojim roditeljima

Morfološka varijabilnost i razvojne anomalije vrste *Lepidurus couesii* Packard, 1875 (Branchiopoda, Notostraca) iz Srbije

Sažetak

U disertaciji je ispitano nekoliko aspekata biologije vrste *Lepidurus couesii* iz Srbije. Prvobitno je vrsta identifikovana analizom morfoloških karaktera koji su u dosadašnjoj literaturi definisani kao važni taksonomski karakteri. Zatim je ispitana histološka građa gonada kako bi se jedinke kategorisale kao ženke, mužjaci ili hermafroditi, kao i radi ispitivanja mogućih načina reprodukcije populacija iz Srbije. Morfološka varijabilnost vrste je dodatno opisana analizom variranja oblika dve morfološke celine – telzona sa kaudalnom laminom i karapaksa. Na kraju, ispitane su i definisane anomalije koje su nastale tokom razvića jedinki, kao i prisutne kvalitativne promene morfoloških struktura.

Istraživanjem su obuhvaćene populacije račića koje nastanjuju efemerna vodena staništa. Populacije roda *Lepidurus* su uzorkovane sa dva lokaliteta na području Srema, u okolini reke Save. U prvom delu studije izvršena je morfometrijska analiza kontinuiranih karaktera i kvantifikacija merističkih dijagnostičkih karaktera. Kvalitativni karakteri su predstavljeni odnosima određenih morfometrijskih karaktera. Dodatni kvalitativni morfološki karakteri su analizirani opisno. Rezultati su upoređeni sa relevantnim literaturnim podacima o morfološkim karakteristikama grupe Notostraca. Pol jedinki i osnovne odlike gametogeneze su ispitane primenom metoda svetlosne i elektronske mikroskopije. Morfološko variranje telzona sa kaudalnom laminom i karapaksa je ispitano i primenom metoda geometrijske morfometrije. Ovakav pristup je omogućio geometrijsku analizu oblika navedenih struktura, koncept koji do sada nije primenjen u okviru roda *Lepidurus*. Takođe, ispitani su obrasci alometrijske i nealometrijske komponente variranja oblika dve morfološke strukture. Kako bi se definisali i analizirali atipični fenotipovi, jedinke su detaljno pregledane pomoću binokularnog stereomikroskopa. Sve uočene morfološke promene su zabeležene.

Rezultati su pokazali da se morfološke odlike jedinki iz analiziranih populacija najviše podudaraju sa karakteristikama vrste *Lepidurus couesii*. Histološke analize gonada nisu pokazale prisustvo tkiva koje odgovara ovotestisima hermafroditnih jedinki. U skladu sa dobijenim rezultatima, jedinke su determinisane kao ženke ili mužjaci u zavisnosti od prisustva, odnosno odsustva, jajnih kesa na jedanaestom paru torakopoda. Ženke su daleko brojnije od mužjaka – od 219 prikupljenih jedinki, pronađeno je samo devet mužjaka. Analize metodama geometrijske morfometrije na uzorku ženki su pokazale da je veliki deo variranja oblika telzona sa kaudalnom laminom opisan alometrijskim promenama oblika (više od 70%). Alometrija objašnjava znatno manji deo variranja oblika karapaksa (oko 5%). Preliminarni rezultati ukazuju da je prisutan polni dimorfizam u obliku navedenih morfoloških struktura. Ženke u proseku imaju širi telzon i kraću kaudalnu laminu u odnosu na mužjake, kao i duži i suženiji karapaks. Ustanovljene razvojne anomalije prisutne u populacijama su klasifikovane na malformacije i disrupcije. Malformacije uključuju nepotpuno razvijene i spiralno raspoređene segmente. Takođe su registrovane i asimetrično oblikovane kaudalne lamine. Disrupcije uglavnom obuhvataju ozlede ekstremiteta, karapaksa, telzona sa kaudalnom laminom, kao i kvalitativne promene koje ukazuju na parazitsku infekciju.

Na osnovu dobijenih rezultata, smatra se da se populacije vrste *L. couesii* iz Srbije razmnožavaju prvenstveno partenogenezom. Polna reprodukcija je moguća s obzirom na histološke karakteristike gonada mužjaka, ali zahteva genetičku potvrdu. Telzon sa kaudalnom laminom je procenjen kao pouzdaniji morfološki karakter u taksonomskoj identifikaciji u odnosu na karapaks, naročito ukoliko se razmatra oblik kaudalne lamine.

Uočene razvojne anomalije verovatno nastaju kao posledica ubrzanog rasta i brzog dostizanja polne zrelosti jedinki koje nastanjuju efemerna vodena staništa. Disrupcije u razviću se javljaju pod uticajem sredinskih faktora, kao što su prisustvo predatora i parazita ovih račića u prirodnim populacijama.

Ključne reči: *Lepidurus couesii*, Notostraca, Branchiopoda, histološke analize, reprodukcija, geometrijska morfometrija, morfološka varijabilnost, alometrija, razvojne anomalije

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija razvića životinja

Morphological variation and developmental anomalies in *Lepidurus couesii* Packard, 1875 (Branchiopoda, Notostraca) from Serbia

Abstract

Within this dissertation, several aspects of the biology of *Lepidurus couesii*, species inhabiting Serbia, were investigated. Initially, an analysis of morphological characters, defined as having taxonomic importance in the previous literature, was performed to identify the species. Then, the histological structure of the gonads was examined to categorize the individuals as females, males, or hermaphrodites, as well as to investigate possible ways of reproduction of populations from Serbia. Morphological variability in the species was also studied by analyzing shape variation in two morphological structures – the telson with a caudal lamina and the carapace. Finally, the anomalies that occurred during the development of individuals were examined and defined, along with the qualitative changes in the morphological structures present.

The research included populations of small crustaceans inhabiting temporary aquatic habitats. Populations of *Lepidurus* were sampled from two localities in the area of Srem, in the vicinity of the Sava river. At the beginning of the study, morphometric measurements and meristic counts of diagnostic characters were performed. Qualitative characters were represented by ratios of certain morphometric characters. Additional qualitative morphological characters were analyzed descriptively. The results were compared with relevant literature data on the morphological characteristics of notostracans. The sex of specimens and general features of gametogenesis were characterized using light and electron microscopy. Morphological variation in the telson with the caudal lamina and the carapace was examined using geometric morphometrics methods. This approach enabled geometric shape analysis, a concept that has not been applied so far within the genus *Lepidurus*. The patterns of allometric and allometry-free shape variation in two morphological structures were examined. Individuals were also thoroughly investigated with a binocular stereomicroscope to define and analyze atypical phenotypes. Observed morphological changes were recorded.

The results showed that the morphological features of the individuals from the analyzed populations most closely coincide with the characteristics of the *Lepidurus couesii* species. Histological analyses of the gonads did not show the presence of tissue found in the ovotestes of hermaphrodite individuals. Accordingly, the individuals were determined as females or males depending on the presence or absence of egg sacs on the eleventh pair of thoracopods. Females are far more numerous than males – out of 219 collected individuals, only nine males were found. Geometric morphometric analyses conducted on females showed that a large proportion of telson with the caudal lamina shape variation is described by size (more than 70%). Allometry explains a much smaller proportion of carapace shape variation (about 5%). Preliminary results indicate the occurrence of sexual shape dimorphism in the mentioned morphological structures. Females typically have a wider telson and a shorter caudal lamina than males, along with a longer and narrower carapace. Developmental anomalies present in populations are classified as malformations and disruptions. Among identified malformations were incompletely developed and spirally arranged body rings. Asymmetrically shaped caudal lamina was also noted. Disruption events included injuries to the phyllopodous limbs, carapace, and telson with caudal lamina, along with qualitative changes indicating parasite infections.

Based on the obtained results, it is suggested that the populations of *L. couesii* from Serbia reproduce primarily by parthenogenesis. Sexual reproduction is possible considering the histological characteristics of the male gonads but requires genetic confirmation. The telson with the caudal lamina was evaluated as a more reliable morphological character in taxonomic identification than the carapace, especially the caudal lamina shape. The observed developmental anomalies probably occur because of the fast growth and early sexual maturity of individuals inhabiting temporary water pools. Disruptions in development occur under the influence of environmental factors, such as the presence of predators and parasites of these crustaceans in natural populations.

Keywords: *Lepidurus couesii*, Notostraca, Branchiopoda, histological analyses, reproduction, geometric morphometrics, morphological variation, allometry, developmental anomalies

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biology of Animal Development

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Osnovne odlike subfiluma Crustacea.....	3
1.2. Opšte odlike klase Branchiopoda.....	4
1.3. Opšte odlike reda Notostraca i roda <i>Lepidurus</i>	6
1.3.1. Opšte odlike vrste <i>Lepidurus couesii</i>	8
1.4. Morfološke i histološke karakteristike gonada Notostraca	9
1.4.1. Morfološka građa ženskih gonada Notostraca.....	9
1.4.2. Razviće i sazrevanje oocite	10
1.4.3. Poreklo i formiranje omotača jajne ćelije	12
1.4.4. Dijapauzirajuća jaja (ciste) i kriptobioza	13
1.4.5. Morfološka građa muških gonada Notostraca	15
1.4.6. Osnovne odlike spermatogeneze	16
1.5. Seksualni sistem i reprodukcija Notostraca.....	18
1.5.1. Partenogeneza i hermafroditizam/androdioecija u grupi Notostraca	19
1.6. Fenomen alometrije	21
1.7. Polni dimorfizam	22
1.8. Razvojne anomalije.....	23
2. Ciljevi	24
3. Materijal i Metode	26
3.1. Prikupljanje uzoraka.....	27
3.1.1. Opis lokaliteta Galovica.....	27
3.1.2. Opis lokaliteta Crni Lug.....	28
3.2. Preliminarna analiza uzorka radi taksonomske identifikacije vrste.....	29
3.3. Histološke analize gonada.....	31
3.3.1. Određivanje pola jedinki prema spoljašnoj morfologiji	31
3.3.2. Disekcija i preparacija gonada za histološke analize.....	31
3.4. Analize metodama geometrijske morfometrije.....	32
3.4.1. Morfološke strukture analizirane metodama geometrijske morfometrije.....	32
3.4.2. Geometrijska morfometrija	33
3.4.3. Prokrustova analiza oblika bilateralno simetričnih morfoloških struktura	34
3.5. Prikupljanje podataka za analize metodama geometrijske morfometrije	34
3.5.1. Telzon sa kaudalnom laminom	34
3.5.2. Karapaks	36
3.5.3. Veličina (dimenzije) jedinki	37

3.6. Priprema podataka, statističke analize i dizajn linearnih modela	38
3.7. Definisanje i analiza razvojnih anomalija	40
4. Rezultati	41
4.1. Taksonomska identifikacija vrste	42
4.2. Razlike između polova.....	44
4.3. Polno dimorfne odlike jedanaestog para ekstremiteta	45
4.4. Histološki aspekt određivanja pola	46
4.4.1. Morfo-anatomska i histološka građa gonada ženki vrste <i>L. couesii</i>	46
4.4.2. Ultrastrukturne odlike ćelija folikularnih kanala	53
4.4.3. Formiranje omotača jajne ćelije.....	58
4.4.4. Morfo-anatomska i histološka građa gonada mužjaka vrste <i>L. couesii</i>	59
4.5. Analize metodama geometrijske morfometrije.....	62
4.5.1. Variranje veličine i oblika telzona sa kaudalnom laminom	62
4.5.2. Ontogenetska alometrija ženki i alometrijski obrasci promena oblika telzona sa kaudalnom laminom	65
4.5.3. Variranje veličine i oblika karapaksa.....	68
4.5.4. Ontogenetska alometrija ženki i alometrijski obrasci promena oblika karapaksa ...	71
4.6. Uočene telesne anomalije i njihova klasifikacija	73
5. Diskusija.....	79
5.1. Procena taksonomskog značaja morfoloških karaktera vrste <i>L. couesii</i>	80
5.2. Morfološke i histološke karakteristike gonada ženki.....	81
5.3. Poreklo, formiranje i struktura omotača jajne ćelije	82
5.3.1. Poreklo omotača jajne ćelije.....	82
5.3.2. Formiranje i struktura omotača jajne ćelije.....	83
5.4. Morfološke i histološke karakteristike gonada mužjaka	84
5.5. Reprodukcijska Notostraca – različite metode za procenu načina reprodukcije	85
5.6. Način reprodukcije populacija vrste <i>L. couesii</i> iz Srbije	88
5.7. Samo-kompatibilni načini reprodukcije u grupi Notostraca.....	89
5.8. Uloga mužjaka u populacijama Notostraca	91
5.9. Buduća genetička istraživanja.....	93
5.10. Procena taksonomskog značaja morfoloških karaktera vrste <i>L. couesii</i> analiziranih primenom metoda geometrijske morfometrije	94
5.11. Uzroci koji dovode do pojave razvojnih anomalija.....	97
6. Zaključci	100
7. Literatura	103
8. Prilozi	125

Biografija autora139

1. Uvod

Filum Arthropoda (zglavkari) predstavlja ubedljivo najbrojniji i najraznovrsniji filum životinjskog sveta, sa širokim geografskim rasprostranjenjem (Martin & Davis, 2001; Thorp, 2009; Thorp & Rogers, 2015). Prema podacima o biodiverzitetu životinja iz 2013. godine, opisano je 1.302.809 vrsta Arthropoda, što je 78.5% ukupnog broja do tada opisanih životinja (Zhang, 2013). S obzirom da mogu da nastanjuju sve moguće tipove staništa, i da veliki broj staništa još uvek nije istražen, procenjuje se da ukupan broj vrsta iznosi i do šest miliona (Thorp, 2009). Veliki uspeh zglavkara je posledica nekoliko važnih karakteristika koje je ova grupa stekla tokom evolucije: i) zglobljeni ekstremiteti, ii) telo izdeljeno na segmente koji se na različite načine grupišu u dva ili tri telesna regiona (tagmata), iii) egzoskelet u obliku čvrstog oklopa koji pruža zaštitu i kod terestričnih grupa smanjuje gubitak vode (Thorp & Rogers, 2015). Telesni regioni i ekstremiteti su se specijalizovali za obavljanje različitih funkcija, što je zglavkarima omogućilo da se prilagode u svim životnim sredinama i ostvare ogroman diverzitet (Giribet & Edgecombe, 2012).

Filogenija Arthropoda je vekovima atraktivna tema za naučnike. Brojna morfološka, paleontološka i molekulska istraživanja, naročito ona koja uključuju primenu tehnika „nove generacije”, dovela su do postavke novih hipoteza, i rasvetlila mnoge filogenetske odnose u grupi (Richter, 2002; Regier et al., 2005, 2010; Ertas et al, 2009; Strausfeld & Andrew, 2011; Oakley et al., 2012; pregledno u Giribet & Edgecombe, 2012; 2019).

Recentne Arthropoda predstavljaju monofiletsku grupu, podeljenu na dve velike monofiletske linije: Chelicerata i Mandibulata (Giribet & Edgecombe, 2019). Mandibulata su sada dobro podržana grupa koja obuhvata taksoni Myriapoda, Hexapoda i Crustacea. Veliki broj morfoloških i molekulskih dokaza podržava grupisanje Hexapoda (Insecta i Entognatha) i Crustacea, tj. postojanje klade Tetraconata (ili Pancrustacea), odnosno podelu Mandibulata na dve klade: Myriapoda i Pancrustacea. Prema nekim autorima, naziv Tetraconata je prikladniji za ovu raznovrsnu grupu zglavkara (Richter et al., 2009; Thorp & Rogers, 2015) i označava zajedničko prisustvo četiri ćelije u staklastom telu omatidija složenih očiju (Richter, 2002). Pored ultrastrukturne građe omatidija, i drugi morfološki podaci, kao što su anatomija mozga i obrasci neurogeneze, podržavaju kladu Tetraconata tj. ideju da su terestrični insekti srodniji sa akvatičnim rakovima, nego sa stonogama (Fanenbruck et al., 2004; Strausfeld & Andrew, 2011). Iako je u početku delovalo neobično, sada je skoro sasvim prihvaćeno da tradicionalne „Crustacea” predstavljaju parafiletsku grupu i da se zapravo sastoje od nekoliko klada, među kojima je i monofiletska klada Hexapoda (Giribet et al., 2001; Regier et al., 2010; Thorp et al., 2015; Brusca et al., 2016). Monofilija Hexapoda je podržana analizom neuromorfoloških karaktera i nukleusnih DNK sekvenci (Timmermans et al., 2008; Regier et al. 2010; Strausfeld & Andrew, 2011), iako je pre toga studija zasnovana na analizi mitohondrijskih gena pokazala parafiliju ove grupe (Carapelli et al., 2007).

S obzirom da su „Crustacea” parafiletska grupa, pojedini autori smatraju da bi ovaj naziv trebalo potpuno da se izbegne u klasifikaciji i da se upotrebljava u neformalnom smislu (Richter et al., 2009; Giribet & Edgecombe, 2019). Međutim, prema Richter et al. (2009), jednostavno uključivanje taksona Hexapoda u „Crustacea” nije preporučljivo jer bi se tako ignorisao dugotrajan istraživački rad na ovoj grupi životinja. Takođe, Rogers (2019) smatra da korišćenje novog naziva u klasifikaciji, kao Pancrustacea ili Tetraconata, može da stvori konfuziju. Slično, i u okviru ove disertacije koristiće se naziv „Crustacea” i odnosiće se na linije koje tradicionalno spadaju u ovu grupu.

1.1. Osnovne odlike subfiluma Crustacea

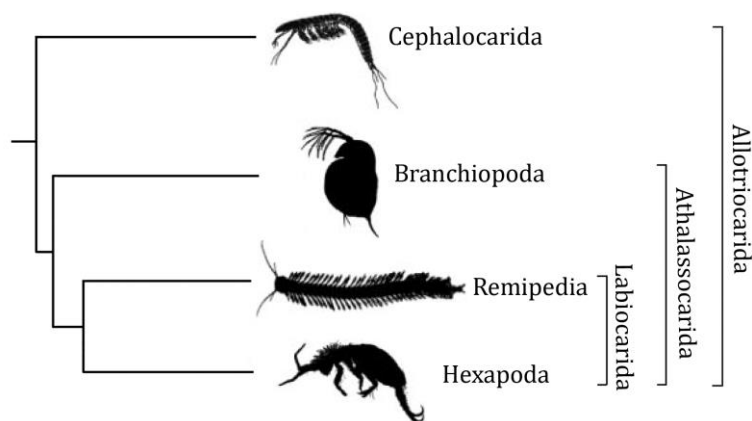
Rakovi predstavljaju široko rasprostranjenu i morfološki najraznovrsniju grupu zglavkara, sa mnoštvom telesnih formi nastalih različitim načinima fuzionisanja segmenata, kao i specijalizacijom ekstremiteta (Martin & Davis, 2001; Thorp & Rogers, 2011). Do sada je opisano oko 70.000 vrsta rakova i procenjuje se da je broj vrsta 5–10 veći (Brusca et al., 2016). Ime „Crustacea” potiče od latinske reči „crusta” – ljuštura, i odnosi se na prisustvo egzoskeleta izgrađenog od hitina koji je često prožet kalcijum karbonatom. Telo je podeljeno na tri regiona (tagmata): glavu (*cephalon*), grudi (*thorax*) i trbuh (*abdomen*). Nekada su prva dva regiona spojeni u cefalotoraks. Za sve rakove je karakteristično da imaju dva para antena (barem u jednoj fazi života), prema čemu se razlikuju od insekata, a usne ekstremitete čine par mandibula i dva para maksila. Na glavenom regionu većine rakova nalazi se par složenih očiju, dok se kod nekih nalazi prosto oko u vidu ocnog pehara (ocela; naupliusovo oko). Ekstremiteti su dvograni, ali su kod različitih taksona modifikovani i imaju različite uloge: lokomotorna uloga (hodanje, plivanje), uloga u respiraciji, u ishrani, čulna uloga, pri napadu i odbrani, u reprodukciji (Thorp & Rogers, 2011; Thorp et al., 2015). Prema izgledu, ekstremiteti adultnih rakova se dele na filopodije i stenopodije. Lamelarne filopodije nemaju čvrst spoljašnji skelet, nisu segmentisane, i imaju ulogu u plivanju, respiraciji i filtriranju hrane. Stenopodije imaju člankovit, cilindričan izgled i poseduju čvrst egzoskelet (Thorp & Rogers, 2011; Thorp et al., 2015).

Filogenetski odnosi unutar subfiluma Crustacea, kao i veze između klasa i redova, nisu u potpunosti razjašnjeni. Određivanje broja klasa predstavlja „veoma kontroverznu temu” (Martin & Davis, 2001), ali uglavnom je prihvaćena podela na šest klasa (Thorp, 2009). Tradicionalne „Crustacea” se dele na klase Branchiopoda, Cephalocarida, Remipedia, Maxillopoda, Ostracoda i Malacostraca (Martin & Davis, 2001; Thorp et al., 2015). Monofilija prve tri klase je dobro podržana (Olesen, 2007, 2009; Richter et al., 2009), dok su monofilija i taksonomski status raznovrsne grupe Maxillopoda dovedeni u pitanje (pregledno u Martin & Davis, 2001) i moguće je da ova „klasa” predstavlja poli- ili parafiletsku grupu (Regier et al., 2005; Thorp et al., 2015). Filogenetski status Ostracoda takođe nije sasvim razjašnjen, mada su skorašnje analize morfoloških i više molekulskih podataka ukazale na monofiliju Ostracoda (Oakley et al., 2012). Malacostraca su izgleda monofiletska grupa, ali odnosi unutar ove grupe nisu jasni (Richter et al., 2009; Thorp et al., 2015). Buduće filogenetske studije bi trebalo da ukažu da li navedeni „problematični” taksoni zaista imaju status klase, niži taksonomski rang ili predstavljaju parafiletsku grupu. Prema viđenju koje se zasniva na prvobitnim idejama o klasifikaciji rakova, postoji 11 klasa u okviru subfiluma Crustacea (pregledno u Brusca et al., 2016).

Cilj brojnih studija bio je i otkrivanje taksona Crustacea koji predstavlja sestrinsku grupu kladi Hexapoda (pregledno u Jenner, 2010). Na osnovu molekulskih podataka, kao i npr. na osnovu nekoliko morfoloških sličnosti u strukturi i organizaciji ovarijuma, kao moguća sestrinska grupa kladi Hexapoda određene su „Xenocarida”, koje obuhvataju Cephalocarida i Remipedia (Regier et al., 2010; Jaglarz et al., 2014). Često su kao sestrinska grupa određeni račići Branchiopoda (Regier et al., 2005; Timmermans et al., 2008; Andrew, 2011; Lozano-Fernandez et al., 2016), ali su ove studije nekad osporavane jer nisu uključivale neke od važnih kandidata za sestrinsku grupu (kao Cephalocarida ili Remipedia), ili nisu uključivale dovoljan broj predstavnika ovih taksona. Analize neuromorfoloških karaktera su podržale Hexapoda i Malacostraca kao sestrinske grupe, i Branchiopoda kao njima sestrinsku grupu (Strausfeld & Andrew, 2011). U novijoj studiji u kojoj je korišćen kombinovan pristup (morfološke analize, koje uključuju i fosilne podatke, i analize različitih gena), dobijeni su dvojaki rezultati. Ukazana je srodnost Branchiopoda + Cephalocarida i Hexapoda, ili Remipedia i Hexapoda (Oakley et al., 2012). Isti autori predložili su kladu Allotriocarida (u

prevodu „čudni račići”), koja obuhvata Remipedia, Cephalocarida, Branchiopoda i Hexapoda. Analizom EST sekvenci dobijeni su rezultati koji takođe podržavaju sestrinski odnos Remipedia i Hexapoda, kao i kladu Allotriocarida (von Reumont et al., 2012).

Blizak odnos Remipedia i Hexapoda nagovešten je i ranije, u nekoliko morfoloških i anatomskih studija (Moura & Christoffersen, 1996; Fanenbruck et al., 2004), kao i analizom genskih i proteinskih sekvenci hemocijanina, kada je otkriveno da hemocijanin Remipedia i Hexapoda ima mnogo sličnosti (Ertas et al., 2009). Dve skorašnje opsežne studije, sa povećanim brojem predstavnika taksona Remipedia, odbacile su hipotezu sestrinske veze Branchiopoda i Hexapoda, i odredile Remipedia kao jedinu sestrinsku liniju kladi Hexapoda (Schwentner et al., 2017; Lozano-Fernandez et al., 2019). Predložen je i nov takson, Labiocarida (od latinske reči „labium” – usna i grčke reči „carida” – račić, i odnosi se na zajedničku funkcionalnost donje usne), koji obuhvata Hexapoda i Remipedia, dok su Branchiopoda verovatno sestrinska grupa Labiocarida. Branchiopoda i Labiocarida su obuhvaćene u kladu za koju je predložen naziv Athalassocarida (odnosno „nemarinski račići”), a kao njena sestrinska grupa određene su Cephalocarida (Slika 1). Detaljan pregled do sada predloženih klada u okviru Tetraconata, kao i informacije o njihovoj podržanosti, predstavljen je u Lozano-Fernandez et al. (2019).



Slika 1. Šematski prikaz dela filogenetskog stabla Arthropoda (prema Schwentner et al., 2017; Lozano-Fernandez et al., 2019, izmenjeno).

1.2. Opšte odlike klase Branchiopoda

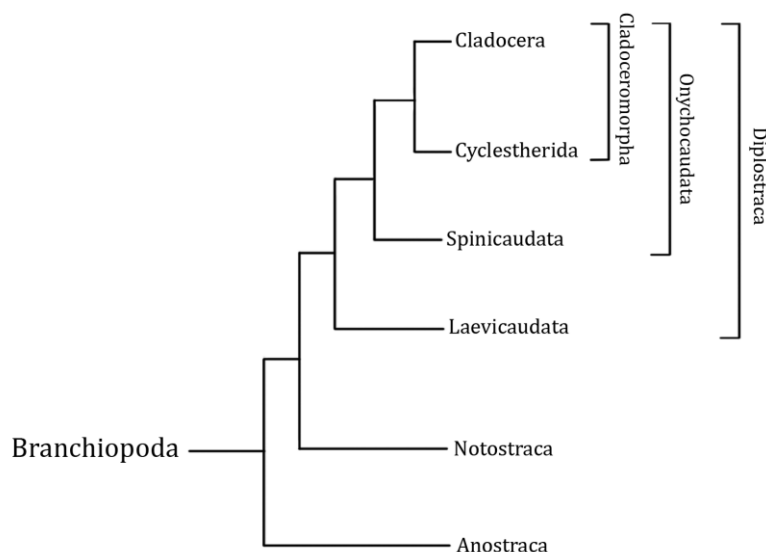
Branchiopoda sačinjavaju oko četvrtinu svih slatkovodnih rakova i skoro jedine račiće koji mogu da se nađu u slanim jezerima (Thorp, 2009). Ime Branchiopoda (od grčke reči „branchia” – škrge i „podia” – stopala, dakle „škržne nožice”) potiče od uloge ekstremiteta u respiraciji, mada se sada zna da verovatno cela površina tela funkcioniše kao respiratorna površina (Rogers, 2009). Mogu da se pronađu na svim kontinentima, uključujući i Arktik, subarktički region i Antarktiku (Rogers, 2009; Thorp & Rogers, 2015; Cáceres & Rogers, 2015). Veoma su morfološki raznovrsni, veličine uglavnom od 0.5 do 20 mm, ali i do 17 cm, i imaju nekoliko zajedničkih odlika: 1) larve imaju iste osnovne morfološke odlike, 2) ekstremiteti su listoliki, pljosnati i mekani, oivičeni dlačicama i označavaju se kao filopodije, 3) mandibule su jednostavne i nesegmentisane, sa reljefnom mastikatornom površinom koja služi u ishrani (Martin, 1992; Rogers, 2009; Thorp & Rogers, 2011).

Brojne studije zasnovane na morfološkim, anatomskim i molekulskim analizama, kao i na kombinovanim analizama morfoloških i molekulskih podataka, pružile su informacije o filogenetskim i taksonomskim odnosima u grupi, te je predloženo nekoliko hipoteza (Wingstrand, 1978; Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1992; Negrea et al., 1999; Richter, 2004;

Olesen, 2000, 2007, 2009; Richter et al., 2007; von Reumont et al., 2012; pregledno u Cáceres & Rogers, 2015). U morfološkim analizama ispitivani su listoliki ekstremiteti (filopodije), usni ekstremiteti, antene, pozicija i struktura karapaksa, morfološke karakteristike larvi, pozicija i ultrastruktura složenih očiju, region telzona, morfologija spermatozoida, oblik i pozicija ovarijuma itd. Veliki broj dokaza iz navedenih studija snažno podržava zaključak da su Branchiopoda monofiletska grupa. Zajedno sa Cephalocarida i Remipedia, Branchiopoda su označavane kao „najprimitivniji” rakovi (Martin & Davis 2001; Rogers, 2009), ali filogenetske analize su pokazale da su ove linije izvedene, bez obzira da li imaju neke „primitivne” morfološke odlike (Regier et al., 2005, 2010; Moura & Christoffersen, 1996; Fanenbruck et al., 2004).

U taksonomiji Branchiopoda je dolazilo do izmena, ali sve veći broj studija nas približava razumevanju taksonomskih odnosa. Prvobitno je klasa bila podeljena na četiri reda: Cladocera, Notostraca, Anostraca i Conchostraca. Fryer (1987) je smatrao da je pogrešno da se formiraju taksonomske kategorije koje bi grupisale previše različite račiče, kao Cladocera i Conchostraca, i predložio novu klasifikaciju prema kojoj je klasa podeljena na čak 10 redova (osam recentnih i dva izumrla reda). Ovakva podela je kritikovana (Martin & Davis 2001), a parafilija „Conchostraca” je kasnije pokazana u više studija i ovaj naziv se u taksonomiji više ne upotrebljava (Braband et al., 2002; Stenderup et al., 2006; Olesen, 2007).

Novija taksonomska rešenja su išla u suprotnom smeru u odnosu na Fryer-a (1987). Neke od viših taksonomskih kategorija su vraćene (kao npr. Diplostraca), a otkrivanjem novih sestrinskih odnosa predloženi su dodatni viši taksoni, kao Cladoceromorpha i Onychocaudata (Braband et al., 2002; Richter et al., 2007; Olesen, 2009; Olesen & Richter, 2013). Postojao je i usaglašen stav o prvobitnom odvajanju reda Anostraca, koji je svrstavan u potklasu Sarsostraca i određen kao sestrinska grupa potklasi Phyllopoda koja je obuhvatala redove Notostraca i Diplostraca (Martin & Davis 2001; Olesen, 2007, 2009; Olesen & Richter, 2013). Međutim, prema novoj reviziji, termini Phyllopoda i Sarsostraca nisu više u upotrebi (Brusca et al., 2016). Monofilija Anostraca i Notostraca je dobro podržana (Richter et al., 2007; Olesen, 2007, 2009; Olesen & Richter, 2013), ali postoje nesuglasice u vezi sa odvajanjem, i potencijalnom sestrinskom vezom, linija Notostraca i Laevicaudata, odnosno monofilijom reda Diplostraca. Red Diplostraca obuhvata tri monofiletska taksona, Spinicaudata, Cyclestherida i Cladocera, dok su Laevicaudata nekad predstavljene kao zaseban red, a nekad kao podred u okviru Diplostraca.



Slika 2. Šematski prikaz filogenetskih odnosa u klasi Branchiopoda (prema Olesen & Richter (2013) i Brusca et al. (2016), izmenjeno). Red Diplostraca je predstavljen kao monofiletski.

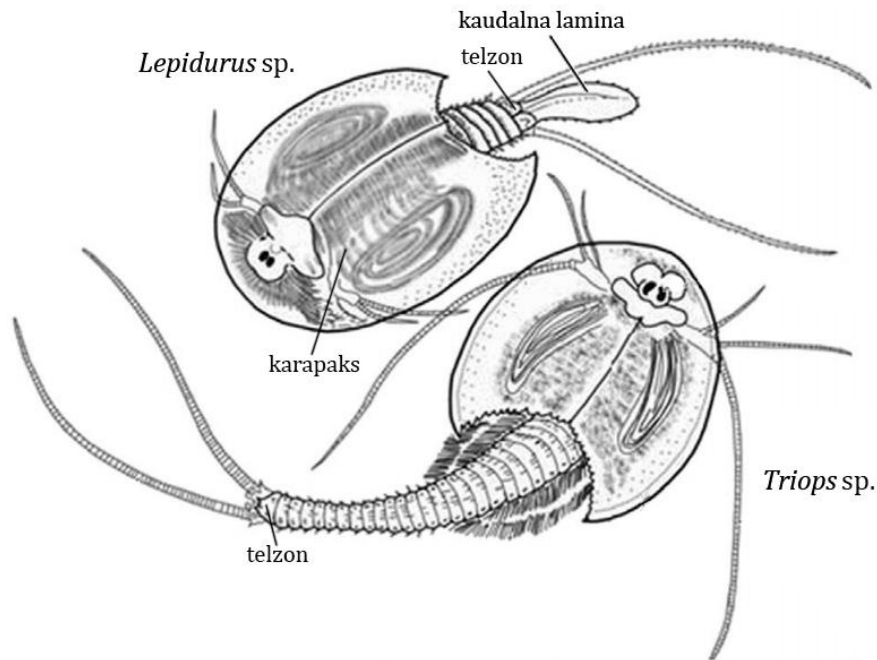
Morfološke analize uglavnom pokazuju da su Notostraca grana koja se prva odvaja posle Anostraca (Negrea et al., 1999; Olesen, 2000, 2007, 2009; Olesen & Richter, 2013), mada je upoređivanjem mastikatornih ivica mandibula u grupi Branchiopoda pokazano da Notostraca i Laevicaudata imaju veoma slične ivice, i različite u odnosu na ostale Branchiopoda (Richter, 2004). Ovaj podatak se ne podudara sa mnogim morfološkim podacima koji podržavaju monofiliju Diplostraca. Predložena je hipoteza sestrinske veze Laevicaudata i Notostraca, kao i alternativna hipoteza sestrinskog odnosa Laevicaudata i ostatka „Phyllopoda”, koje su delimično podržane molekulskim i kombinovanim analizama (Braband et al., 2002; Stenderup et al., 2006; Richter et al., 2007). Notostraca su dakle nekad smeštene unutar reda Diplostraca, kao sestrinska grupa Spinicaudata i Cladoceromorpha, ili samo Cladoceromorpha, a Diplostraca su određene kao parafiletska grupa. Prema Olesen & Richter (2013), i kasnije prihvaćeno od strane Brusca et al. (2016), monofilija Diplostraca je snažnije podržana od alternativnih hipoteza i najbolje rešenje je da se Laevicaudata zadrže unutar Diplostraca, kao sestrinski takson ostalim grupama Diplostraca (tj. kladi (podredu) Onychocaudata, prema ovim autorima) (Slika 2).

Branchiopoda mogu da se podele i u dve grupe koje ne predstavljaju taksonomske kategorije, već ekološke termine: „vodene buve” tj. račiće iz grupe Cladocera i „velike branhiopode”, kojima pripadaju Anostraca, Notostraca, Laevicaudata, Spinicaudata i Cyclestherida (Rogers, 2009; Thorp & Rogers, 2011). Rakovi iz grupe „velikih” Branchiopoda su morfološki raznovrsni, ali se razlikuju od Cladocera, npr. prema jasnoj segmentaciji tela i većem broju ekstremiteta, kao i prema veličini tela. Međutim, iako se nazivaju „velike” Branchiopoda, u nekim slučajevima su manjih dimenzija od gigantskih primeraka Cladocera. Do sada je opisano oko 500 vrsta „velikih” Branchiopoda (Brendonck et al., 2008).

Račići iz grupe Branchiopoda nastanjuju najraznovrsnija staništa, od slanih jezera do privremenih ili delimično trajnih vodenih staništa (ponekad i staništa koja se nikad potpuno ne isušuju), gde često mogu da budu veoma brojne i tako čine značajnu komponentu ekosistema i važnu kariku u lancu ishrane (Rogers, 2009; Thorp & Rogers, 2011). Mogu da ulaze u sastav planktona, bentosa, ili da nastanjuju priobalne delove, i često se koriste kao bioindikator kvaliteta vodenih ekosistema koje nastanjuju (Rogers, 2009; Rogers et al., 2019). Iako uglavnom naseljavaju slatkovodna staništa, smatra se da verovatno imaju marinsko poreklo i da je određen broj Branchiopoda (uglavnom Cladocera) sekundarno naselio mora (Olesen, 2007; Harvey et al., 2012).

1.3. Opšte odlike reda Notostraca i roda *Lepidurus*

Rakovi iz reda Notostraca su široko rasprostranjeni i današnji predstavnici se mogu pronaći na svim kontinentima, osim na Antarktiku (Brtek & Thiéry, 1995; Brendonck et al., 2008). Izučavanjem recentnih predstavnika, kao i fosilnih nalaza, uočava se značajna morfološka stabilnost ove grupe (Wallossek, 1993; Mathers et al., 2013). Najstariji fosili, velike morfološke sličnosti sa današnjim vrstama, potiču iz perioda devona zbog čega se Notostraca prema nekim autorima svrstavaju među „žive fosile” (Darwin, 1859; Olesen, 2007). Međutim, molekulski podaci ukazuju na to da su savremene vrste ovih rakova evoluirale u skorije vreme i da ne predstavljaju žive fosile. Sličnost sa fosilnim grupama verovatno je rezultat veoma očuvane opše morfologije i homoplazija, a ne evolucione staze (Vanschoenwinkel et al., 2012). Jedina familija ovog reda, Triopsidae, obuhvata dva recentna roda: *Triops* Schrank, 1803 i *Lepidurus* Leach, 1816. Ova dva roda se jasno razlikuju na osnovu morfološke strukture kaudalne lamine (supra-analna ploča, prema Linder, 1952), prisutne jedino kod roda *Lepidurus* (Slika 3).



Slika 3. Opšte morfološke karakteristike dva recentna roda porodice Triopsidae (prema Rogers et al., 2019, izmenjeno).

Rod *Lepidurus* Leach, 1819 pripada krupnim slatkovodnim branhiopodama. Kao predstavnik reda Notostraca, karakteriše ga dorzalno postavljen karapaks u obliku štita (Martin & Boyce, 2004) (Slika 3). U prednjem delu karapaksa nalazi se par složenih očiju bez drški, kao i ovalni nukalni organ smešten između složenih očiju. Sredinom karapaksa se prostire uzdužni hitinizirani nabor koji se završava hitinizovanom vršnom bodljom (Martin & Boyce, 2004). Karapaks prekriva veći deo tela, pruža zaštitu, omogućava hidrodinamičnost i pomaže ukopavanje u podlogu (Olesen, 2013). Oblik, veličina i raspored bodlji na zadnjoj ivici karapaksa je specifičan za svaku vrstu (Lynch, 1972; Rogers, 2001). Toraks se sastoji od 11 hitinizovanih prstenova, na kojima se nalaze parni listoliki ekstremiteti za plivanje (filopodije) (Brusca et al., 2016). S obzirom da nije uočena precizna veza između hitinizovanih prstenova oko tela i stvarne segmentacije, Linder (1952) je predložio upotrebu termina „prstenasti segment” umesto „telesni segment”. Broj abdominalnih ekstremiteta nije stalan i, prema pravilu, veći je od broja segmenata. Ovo pravilo je karakteristično za grupu Notostraca. Idući ka kraju abdomena, ekstremiteti su sve manji, tako da je nekoliko poslednjih segmenata bez ekstremiteta. Između torakalnih i abdominalnih segmenata nema jasno uočljive granice. Egzopoditi jedanaestog para torakalnih ekstremiteta ženki modifikovani su u jajne kese (Fryer, 1988). Kao što je navedeno, rod *Lepidurus* se takođe raspoznaje i prema stukturi koja se pruža od telzona (kaudalna lamina, supra-analna ploča) i ima karakterističan raspored bodlji na svojoj dorzalnoj površini (Slika 3).

Lepidurus uglavnom naseljava male, kratkoživeće vodene basene (efemerne vode) sa značajnim promenama ekoloških uslova u toku sezone, pa čak i u toku jednog dana. Jedinke poseduju niz prilagođenosti koje im omogućavaju opstanak u ovako nepovoljnim uslovima. Vrste ovog roda su bentosni rakovi koji se hrane detritusom, biljkama, algama i bakterijama (Tasch, 1969; Miller, 1980). Takođe, mogu da se hrane drugim beskičmenjacima, kao i povređenim pripadnicima svoje vrste (Lakka, 2013). Sa druge strane, efemerni vodeni baseni nisu bezopasna staništa (Brendonck et al., 2002) i naseljava ih nekoliko potencijanih predatora ovih rakova. Stresni sredinski uslovi, kao i zagađenje staništa i izloženost predatorima, mogu da dovedu do pojave različitih telesnih deformiteta (Linder, 1952; Longhurst, 1958; Lakka, 2013).

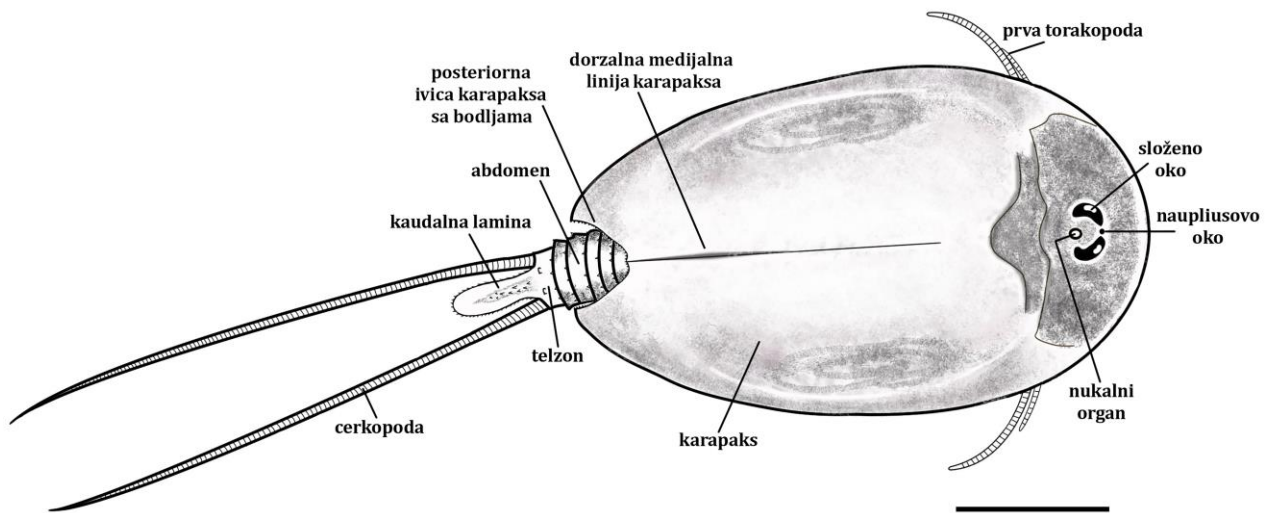
U okviru roda *Lepidurus*, najrasprostranjenija je vrsta *L. apus* L. sa staništem u Evropi, Aziji, Africi, Americi, Novom Zelandu i Australiji (Longhurst, 1955a; Brtek & Thiéry, 1995). Endemiti Severne Amerike su vrste *L. bilobatus* Packard, 1877, *L. lemmoni* Holmes, 1894 i *L. packardi* Simon, 1886 (King & Hanner, 1998) kao i relativno skoro opisane vrste *L. lynchi* Linder, 1952 i *L. cryptus* D. C. Rogers, 2001, pronađene u Nevadi i Kaliforniji (Linder, 1952; Rogers, 2001), respektivno. Predloženo je i da podvrsta *L. apus lubbocki* Brauer, 1873, rasprostranjena na Mediteranu, dobije status vrste pod nazivom *L. lubbocki* Brauer, 1873 (Mantovani et al., 2009). Isti autori su takođe ukazali na sestrinsku vezu holarktičke vrste *L. couesii* Packard, 1875 i cirkumpolarnog glacijalnog relikta, vrste *L. arcticus* (Pallas, 1793) (Mantovani et al., 2009).

Ranije je u Srbiji registrovana jedino vrsta *L. apus* (Petrov & Cvetković, 1997). Ova vrsta se pojavljuje uglavnom na proleće, u različitim efemernim vodenim staništima, i ima sposobnost da toleriše privremena isušivanja ovih vodenih basena. Takođe, još jedna prilagođenost ovakvim uslovima života je i kratak životni ciklus od oko dve nedelje (Cvetković-Miličić & Petrov, 1999). Međutim, tokom perioda 2008–2016, potvrđeno je još nekoliko nalazišta velikih branhiopoda (Lukić et al., 2012), među njima i *Lepidurus* sp.

1.3.1. Opšte odlike vrste *Lepidurus couesii*

Vrsta *Lepidurus couesii* prvi put je opisana kao vrsta iz Severne Amerike (Packard, 1875). Međutim, smatra se da je široko rasprostranjena (prema Mathers et al., 2013) sa prijavljenim staništem u Mongoliji (Brtek et al., 1984), Siriji (Thiery, 1996), Apeninskom poluostrvu (Scanabissi et al., 2006a), Rumuniji (Demeter & Stoicescu, 2008) i evropskom delu Rusije (Sidorovsky et al., 2014). Prema Brtek & Thiéry (1995), može se reći da je *L. couesii* tipična severnoamerička vrsta, i azijska vrsta koja je proširila svoje stanište prema zapadu, do Istočne Rumunije. Smatra se da ova vrsta obično naseljava ravnice, doline okružene planinama, ali i pustinjske regione (Hossack et al., 2010). Kao i većina vrsta reda Notostraca, *L. couesii* uglavnom nastanjuje efemerna vodena staništa i plavne zone reka (npr. Scanabissi et al., 2006a; Demeter & Stoicescu, 2008).

Tradicionalno je taksonomska identifikacija vrsta u okviru reda Notostraca, pa i vrste *L. couesii*, vršena na osnovu karakteristika karapaksa, telzona i kaudalne lamine, ekstremiteta, nukalnog organa, armature egzoskeleta i slično (Longhurst 1955a; Linder, 1952; Lynch, 1972) (Slika 4). Analize su se uglavnom zasnivale na prebrojavanju (bodlji, parova ekstremiteta, segmenata itd.), kao i dužinskim premeravanjem morfoloških karaktera i računanjem njihovih odnosa. Prema Linder (1952), kaudalna lamina vrste *L. couesii* je „neobično dugačka” u odnosu na jedinke ostalih vrsta, ali je kao pouzdaniji karakter odredio mediodorzalni greben kaudalne lamine. Takođe, prema istom autoru, ovu vrstu karakteriše veoma kratak telzon. Linder je prvi uveo broj parova ekstremiteta kao važan taksonomski karakter, dok je Lynch (1972) istakao važnost broja i oblika bodlji posteriorne ivice karapaksa. Brtek et al. (1984) i Thiéry (1996) smatraju da izgled egzopodita prvog torakalnog ekstremiteta može da se koristi za diferencijaciju nekih vrsta roda *Lepidurus*. U relativno novijoj reviziji, Rogers (2001) je za determinaciju severnoameričkih vrsta roda *Lepidurus* koristio broj parova ekstremiteta, ukupan broj segmenata, poziciju nukalnog organa u odnosu na složene oči, odnos dužine kaudalne lamine i dužine karapaksa, i oblik i veličinu bodlji na posteriornoj ivici karapaksa. Ukupna dužina tela, kao i broj segmenata koji nisu prekriveni karapaksom, mogu da se navedu prilikom opisa vrste, ali je u literaturnim podacima više puta istaknuto da ove informacije mogu da budu nepouzdanе zbog promena koje mogu da nastanu tokom čuvanja uzoraka u alkoholu (Linder, 1952; Longhurst 1955a; Lynch, 1972; Korn et al., 2010).

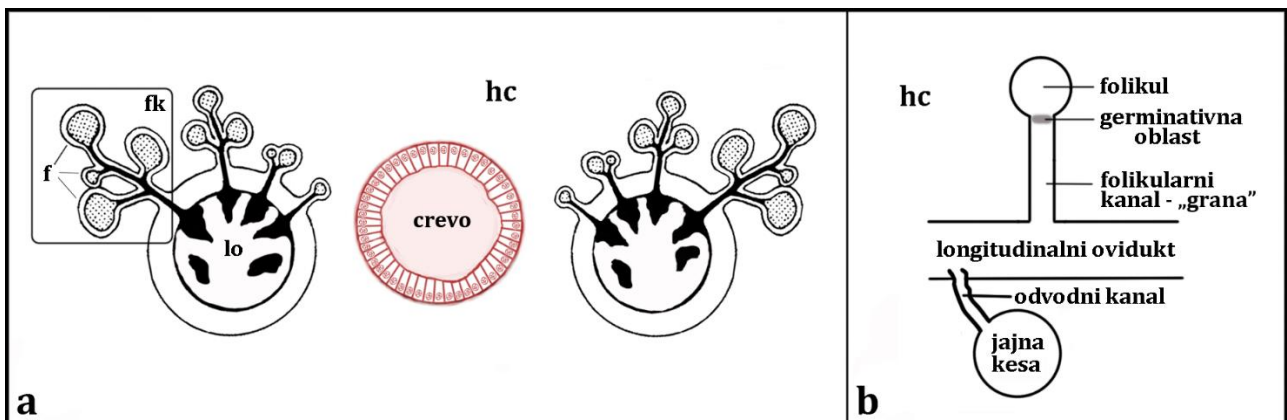


Slika 4. Dijagram habitusa analizirane vrste (dorzalni prikaz). Na crtežu su obeležene opšte morfološke karakteristike vrsta reda Notostraca, koje se uglavnom koriste u taksonomskoj identifikaciji vrsta. Skala = 5 mm. Crtež: I. Šaganović.

1.4. Morfološke i histološke karakteristike gonada Notostraca

1.4.1. Morfološka građa ženskih gonada Notostraca

Građa ženskih gonada je proučavana kod oba roda u okviru Notostraca. Parni jajnici su smešteni u oblasti hemocela, lateralno u odnosu na crevo (Slika 5a), i pružaju se od distalnog dela toraksa sve do segmenata bez ekstremiteta (Longhurst, 1955b; Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1992). Svaki jajnik se sastoji od glavnog uzdužnog ovidukta (uterusa), od kog se prema hemocelu pružaju folikularni kanali tako da gonada ima razgranat i tubularan izgled. Na vrhovima folikularnih kanala se formiraju jajni folikuli u kojima se odvija sazrevanje oocita. Ovidukti su putem dva kratka eferentna (odvodna) kanala povezani sa jajnim kesama smeštenim na jedanaestom paru modifikovanih torakalnih ekstremiteta (Slika 5a, b) (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979; Scanabissi & Mondini 2002a).

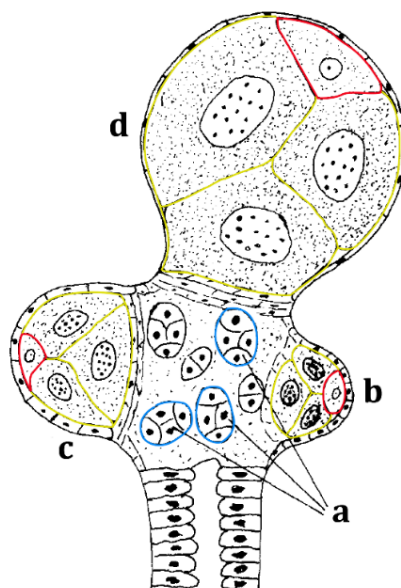


Slika 5. Šematski prikaz građe ženskih gonada Notostraca. a) parne gonade na poprečnom preseku, u nivou creva (prema Tommasini & Scanabissi Sabelli (1992), izmenjeno); b) dijagram dela gonade na uzdužnom preseku. Elementi šema nisu potpuno srazmerni. Skraćenice: fk – folikularni kanali – „grane” gonade; f – folikuli; lo – longitudinalni ovidukt (uterus); hc – hemocel.

Somatski deo gonade čine ćelije folikularnih kanala i zida uterusa, dok se germinativna oblast zadržava u vršnim delovima, gde ispunjava čitav lumen folikularnih kanala (Slika 5b) (Longhurst, 1955b; Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1992).

1.4.2. Razviće i sazrevanje oocite

U germinativnoj oblasti se nalaze nasumično raspoređene okruglaste ćelije, oogonije, koje prolaze kroz dve uzastopne mitotičke deobe. Kao rezultat, nastaju grupacije od po četiri ćelije (tetrade) koje predstavljaju začetke folikula i mogu da se definišu kao zasebne „morfofunkcionalne jedinice” (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978). Svaka tetrada se sastoji od oocite i tri pomoćne ćelije (Slika 6a). Prema Longhurst (1955b), oogonije se teško uočavaju pod svetlosnim mikroskopom jer se primenom ove metode mogu uočiti tek strukture koje su diferencirane na četiri ćelije. Poreklo i način obrazovanja ćelija folikula kasnije su rasvetljeni primenom transmisiona elektronske mikroskopije (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979; Engelmann et al., 1997).



Slika 6. Šematski prikaz različitih faza rane oogeneze vrste *Triops cancriformis*. a) diferenciranje na četiri ćelije; b) folikul u ranoj fazi rasta; c) faza obrazovanja globula žumanceta; d) faza maksimalne veličine pomoćnih ćelija. Tetrade (začeci folikula) su zaokružene plavom bojom, oocite crvenom, a pomoćne ćelije žutom bojom (prema Trentini & Scanabissi Sabelli (1978), izmenjeno).

Ispitivanjem ultrastrukturnih odlika rane oogeneze vrste *Triops cancriformis*, otkriveno je da se deobe oogonija odvijaju uz nepotpunu citokinezu, tako da se nakon deoba zadržavaju citoplazmini međućelijski mostovi (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979). U početnoj fazi razvića ćelija folikula, citoplazma pomoćnih ćelija je tamnije obojena zbog prisustva velikog broja ribozoma, a prisutne su i koncentrične membrane glatkog endoplazminog retikuluma, kao i nekoliko izduženih mitohondrija. Nukleus pomoćnih ćelija karakteriše razućen hromatin i više nukleolusa, čiji broj može da se uvećava u narednim fazama, dok jedro oocite sadrži jedno ili dva nukleolusa. Ovakav odnos broja nukleolusa pomoćnih ćelija i oocite se održava tokom narednih faza ranog razvića ćelija folikula. Jedino oocita ulazi u mejozu, što je potvrđeno prisustvom sinaptonemalnih kompleksa u nukleusu oocite, čime je obeležen početak mejotičke deobe. Nukleus oocite zauzima veliki deo zapremine ćelije i, slično kao kod pomoćnih ćelija, u citoplazmi se nalaze izdužene mitohondrije, retke cisterne endoplazminog retikuluma, kao i mnogobrojni slobodni

i združeni ribozomi koji citoplazmi daju taman izgled (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979; Engelmann et al., 1997). Dakle u početnoj fazi razvića ćelija folikula, citoplazma oocite se ne razlikuje mnogo od citoplazme pomoćnih ćelija (Slika 6a).

U narednoj fazi, svaka pomoćna ćelija se uvećava tri do četiri puta, dok oocita raste sporije. Nukleolus oocite se uvećava oko četiri puta, ali nukleus ostaje iste veličine. U citoplazmi oocite se javljaju koncentrične membrane endoplazminog retikuluma, slične uočenim u pomoćnim ćelijama. Prema tome, folikul se u početnim fazama uvećava zbog ubrzanog rasta pomoćnih ćelija, obrazuje ispupčenje u germinativnoj oblasti i na taj način započinje formiranje folikularnog kanala (Slika 6b). Površinu rastućeg folikula obavijaju male somatske ćelije koje formiraju jednoslojni epitel. Ćelije epitela folikula se u toku rasta folikula dodatno izdužuju i zaravnjuju (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979).

Sledeće faze odlikuje dodatno uvećanje pomoćnih ćelija čija citoplazma je sada svetlija, ali i dalje sa dosta ribozoma, sa mitohondrijama, i koncentričnim membranama endoplazminog retikuluma koje postaju još razvijenije. Matriks nukleusa pomoćnih ćelija postaje svetliji, sa karakterističnim velikim brojem nukleolusa. U citoplazmi ovih ćelija je pokazano prisustvo globula žumanceta koje nastaju od glatkog endoplazminog retikuluma. Tokom ovog perioda oocita se značajno uvećava, ali je i dalje manja od pomoćnih ćelija (Slika 6c, d). Nukleus oocite se takođe uvećava, dok nukleolus ostaje iste veličine. Na nukleusnom ovoju se javljaju kompleksi pora, a nukleoplazma zadobija granulisan izgled, sa razuđenim malim skupinama hromatina. Takođe, i u citoplazmi oocite se javljaju globule žumanceta, koje okružuje jedna ili više membrana endoplazminog retikuluma. Pojavom globula žumanceta označen je početak vitelogeneze koja je dakle u početnim fazama endogena. Žumance oocite je morfološki slično žumancetu u pomoćnim ćelijama. U citoplazmi oocite se takođe javljaju grupe prstenastih lamela, uočene i u citoplazmi pomoćnih ćelija (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979).

Nakon što pomoćne ćelije dostignu svoju maksimalnu veličinu (Slika 6d), oocita nastavlja da se uvećava i počinje da potiskuje pomoćne ćelije ka osnovi folikula. Izduživanjem folikularnog kanala, kada je folikul najviše izložen prema hemocelu, na površini oocite se formiraju mikrovili i na taj način započinje egzogena vitelogeneza (Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1992; Engelmann et al., 1997). Nakon sazrevanja, oocita se oslobađa iz folikula, spušta u folikularni kanal i potom diferencira u jajnu ćeliju. Jaja se sakupljaju prvo u centralnom uterusu, a nakon toga u jajnim kesama na modifikovanom jedanaestom paru torakopoda. Oslobađanje jaja u spoljašnju sredinu se odigrava pred presvlačenje jedinki (Longhurst 1955b).

Na osnovu karakteristika uočenih svetlosnim mikroskopom (Longhurst, 1955b), proces rasta folikula može da se podeli na nekoliko faza (Tabela 1).

Tabela 1. Faze rasta folikula (prema Longhurst, 1955b)

Faza rasta	Izgled folikula
1	Folikul „pupi” iz germinativne oblasti
2	Počinje formiranje folikularnog kanala („grane” gonade)
3	Oocita se uvećava i postaje veća od tri pomoćne ćelije zajedno
4	Uočavaju se granule žumanceta. Oocita potiskuje pomoćne ćelije
5	Na obodu oocite se uočava prostor bez žumanceta
6	Oocita je zrela. Pomoćne ćelije su skoro potpuno potisnute

Ultrastrukturalne odlike pomoćnih ćelija i oocite su slične u ranim fazama razvića, verovatno zbog postojanja međućelijskih veza (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979). Ove veze ili omogućavaju sinhrono sazrevanje pomoćnih ćelija, ili predstavljaju trofičke veze putem kojih globule žumanceta dospevaju u oocitu. Međutim, kasnije je otkriveno da veze između ćelija folikula nisu uvek prisutne. Kod vrste *Lepidurus apus lubbocki* iz Italije, međućelijski mostovi se ne formiraju i deluje da su sve četiri ćelije aktivne i tokom egzogene vitelogeneze, definisane od strane autora kao „oocite u razvijanju” (Scanabissi & Mondini 2002a). Na kraju se jedna ćelija diferencira u pravu oocitu, moguće ona koja je najbliža hemocelu. Uočena ujednačenost (slične koncentrične membrane endoplazminog retikuluma u citoplazmi, morfološki slično žumance, grupe prstenastih lamela), zajedničko poreklo ćelija folikula, kao i produžena aktivnost uočena kod *L. apus lubbocki*, ukazuju na to da su pomoćne ćelije u stvari abortivne oocite, što se smatra „primitivnom” odlikom. Značajno je napomenuti i da je prvi put kod Arthropoda pokazano prisustvo globula žumanceta u citoplazmi pomoćnih ćelija (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979; Engelmann et al., 1997).

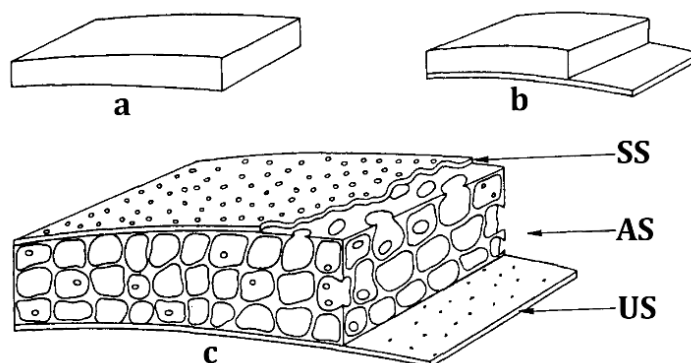
1.4.3. Poreklo i formiranje omotača jajne ćelije

Kao što je spomenuto, predstavnici Branchiopoda uglavnom naseljavaju efemerna vodena staništa. Preživljavanje na ovakvom tipu staništa omogućeno je formiranjem jaja sa zaštitnim omotačem (ciste, prema Dumont & Negrea, 2002; Brendonck et al., 2008). Ciste predstavljaju glavnu adaptaciju koja, pored preživljavanja, omogućava i disperziju (Longhurst, 1955c; Fryer, 1996). Unutar omotača se nalazi embrion u razvojnoj dijapauzi, zaustavljen na određenom stupnju razvića. Da bi izbegli nepovoljne, i često ekstremne, uslove na staništu, mirujući embrioni ulaze u kriptobiozu koja može da traje godinama ili čak decenijama (Fryer, 1996; Clegg, 2001; Straka, 2004; Morotomi et al., 2004; Mitsumoto & Yahata, 2006; Brendonck et al., 2008). Eksperimentalna ispitivanja su pokazala da embrion može da uđe u kriptobiozu na stupnju gastrule, naupliusa ili metanaupliusa (Tommasini et al., 1989; Fryer, 1996).

Omotači jajnih ćelija (engl. *eggshell*) mogu da budu različite strukture – jednoslojni ili sastavljeni od dva ili više slojeva. Nekada su sa izraženom ornamentacijom na površini koja može da posluži kao taksonomski karakter, ali se kod nekih vrsta javljaju intraspecijske razlike u zavisnosti od geografskog regiona (Thiéry & Gasc, 1991; Dobrynina, 2011; Czyż et al., 2016). Nije poznato koji faktori utiču na oblikovanje spoljašnjeg sloja omotača, mada neki podaci ukazuju da ornamentacija možda ima ulogu u odbrani jaja od predatora (Dumont et al., 2002) i da pomaže da se jaja zakače jedna za druge, kao i za supstrat (Dobrynina, 2011). Većina omotača jajnih ćelija ima sloj ispunjen alveolama koji može biti različite debljine i ima više uloga: omogućava aeraciju embriona, pruža zaštitu od mehaničkih, fizičkih i hemijskih stresora, i omogućava lakše plutanje jaja u vodi (Anderson et al., 1970; Dobrynina, 2011; Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1989; Scanabissi & Mondini, 2000a). Prema načinu nastanka, omotači jajnih ćelija se dele na primarne, sekundarne i tercijarne. Primarni omotač formira sama oocita po završetku sazrevanja, procesom egzocitoze. Sekundarne omotače formiraju folikularne ćelije koje okružuju oocitu, dok tercijarne omotači nastaju tokom prolaska zrele oocite kroz reproduktivni sistem ženke (Mazzini et al., 1984). Omotač jajne ćelije većine filopodnih rakova je tercijaran, debeo i višeslojan, sa izraženim alveolarnim slojem.

Poreklo, struktura i način formiranja omotača jajnih ćelija proučeni su kod više predstavnika Branchiopoda, uključujući i vrste oba roda Notostraca, i to na nivou svetlosne mikroskopije, kao i transmisione i skening elektronske mikroskopije (Anderson et al., 1970; Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982; Mazzini et al., 1984; Tommasini et al., 1989; Tommasini &

Scanabissi Sabelli, 1989; Scanabissi & Mondini, 2000a; Scanabissi & Mondini 2002a; Mitsumoto & Yahata, 2006). Detaljan opis formiranja omotača jajnih ćelija Notostraca opisan je na primeru vrste *Triops cancriformis* (Tommasini et al., 1989). Naveden omotač predstavlja tercijarni omotač jer nastaje od materijala koji luče ćelije folikularnih kanala gonade. Spuštajući se niz reproduktivne kanale, zrele oocite se potpuno obavijaju ovim materijalom (Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982). Omotač je u početku kompaktan, glatke površine (Slika 7a), a već u sledećoj fazi se uočavaju dva sloja, spoljašni deblji i unutrašnji tanji sloj (Slika 7b).



Slika 7. Formiranje tercijarnog omotača jajne ćelije vrste *Triops cancriformis*. a) jednoslojni omotač; b) formiranje unutrašnjeg sloja; c) troslojni omotač. Skraćenice: SS – spoljašnji sloj; AS – alveolarni sloj; US – unutrašnji sloj (prema Tommasini et al., 1989).

Dalje strukturne promene obuhvataju formiranje brojnih dubokih kratera koji se otvaraju na površini omotača, kao i istovremeno formiranje velikog broja alveola u spoljašnjem sloju. Alveole se formiraju od površine prema unutrašnjosti i kao rezultat ovog procesa dolazi do znatnog uvećanja debljine omotača. Formiranjem alveolarnog sloja, krateri se potiskuju i otvori se zadržavaju samo na površini, u sada već novom spoljašnjem perforiranom sloju. Na opisan način se uspostavlja troslojna strukturna organizacija omotača jajne ćelije. Omotač se dakle sastoji od tankog spoljašnjeg sloja sa porama, alveolarnog sloja, i unutrašnjeg kompaktnog sloja na koji nisu uticale prethodno opisane promene (Slika 7c). Smatra se da vazduh ulazi kroz otvore kratera koji se pojavljuju na početku formiranja alveolarnog sloja, prolazi u kompaktni sloj, a kasnije se kreće kroz pore koje se zadržavaju na površini i kroz otvore između komora alveolarnog sloja (Tommasini et al., 1989). Prema ovim autorima, ispod unutrašnjeg sloja omotača se jasno uočava kutikularna membrana embriona.

1.4.4. Dijapauzirajuća jaja (ciste) i kriptobioza

Keilin (1959) je klasifikovao dijapuzu kao hipometaboličko stanje, odnosno stanje u kom je metabolička aktivnost smanjena u odnosu na normalnu vrednost. Isti autor je predložio termin kriptobioza, tj. „latentni život”, kako bi definisao stanje u kom metabolička aktivnost postaje teško merljiva ili se reverzibilno zaustavlja (ametabolizam). Oba stanja mogu da se grupišu pod zajednički naziv – hipobioza, suprotno od „aktivnog života” (Keilin, 1959). Različiti oblici hipobioze mogu da nastupe kao posledica dehidratacije (anhidrobioza), niske temperature (kriobioza), visoke koncentracije soli (osmobioza), niske koncentracije kiseonika (anoksibioza), ili kombinacijom navedenih nepovoljnih uslova (klasifikacija prema Keilin, 1959).

Dijapauza se u grupi Branchiopoda uvek javlja na stadijumu jajeta i smatra se da ima veliki ekološki i evolucioni značaj (Fryer, 1996). Postepenim smanjivanjem stope metabolizma do nivoa koji se teško detektuje, mirujući embrioni u jajetu (incistirani

embrioni) mogu da uđu u kriptobiozu i postanu otporni na ekstremno nepovoljne uslove, kao što su dugotrajna anoksija (Clegg, 1994, 1997; Clegg et al., 1994, 1999), visoke i niske temperature (Carlisle, 1968; Fryer, 1996; Hann & Lonsberry, 1991; Clegg & Jackson, 1992; Dobrynina, 2011; Ito et al., 2013), dehidratacija (Hann & Lonsberry, 1991; Clegg, 2005), delovanje digestivnih enzima (Horne, 1966), kontaminiranje životne sredine toksikantima (Dobrynina, 2011) i slično. Generalno, kapacitet za preživljavanje nepovoljnih uslova na staništu je blisko povezan sa tipom omotača koji okružuje jaje, kao i njegovom posebnom arhitekturom (pregledno u Mazzini et al., 1984), ali važnu ulogu imaju i biohemijski mehanizmi uključeni u sticanje otpornosti dijapauzirajućih jaja. Zaštitna uloga omotača jajnih ćelija Branchiopoda, kao i biohemijska osnova kriptobioze, najviše su proučavani u grupi Anostraca, zbog izuzetno lakog gajenja ovih račića u laboratoriji i karakteristika koje ih svrstavaju u grupu ekstremofila (Browne, 1992; Clegg, 2005). Predmet istraživanja su bile i neke odlike kriptobioze u grupi Notostraca (Hann & Lonsberry, 1991; Morotomi et al., 2004; Hengherr et al., 2011; Ito et al., 2013).

Debeli omotač oko jajeta predstavlja biofizičku adaptaciju koja omogućava zaštitu incistiranih embriona od mehaničkih povreda (Clegg, 2005), UV zračenja (Tanguay et al., 2004), kao i od isušivanja (Hann & Lonsberry, 1991; Clegg, 2005). Smatra se da celokupni omotač ima kritičnu ulogu u toleranciji isušivanja, dok zaštitu od UV zračenja omogućava spoljašnji sloj omotača. Pored biofizičkih adaptacija, jaja Branchiopoda poseduju i niz biohemijskih adaptacija. U grupi Anostraca, disaharid trehaloza predstavlja važan supstrat za dobijanje metaboličke energije i organskog ugljenika tokom razvića incistiranih embriona. Međutim, pokazano je da u slučaju aerobnog toplotnog stresa, kao i tokom anhidrobioze, dolazi do sinteze velikih koncentracija trehaloze koja ima i zaštitnu ulogu (Clegg & Jackson, 1992; Clegg, 2005). Trehaloza pripada grupi polihidroksilnih jedinjenja, označenih kao kompatibilni osmoliti ili osmoprotektanti, koji smanjuju osmotski potencijal ćelija i imaju sličnu ulogu kao molekularni šaperoni (Clegg, 2001). Za ovakva jedinjenja neproteinske prirode predložen je naziv hemijski šaperoni (Welch & Brown, 1996). Trehaloza i slična jedinjenja mogu da učestvuju u ponovnom pravilnom savijanju proteina posle termalne inaktivacije, kao i da stabilizuju membrane i proteine u stanju dehidratacije. Prema hipotezi zamene vode, disaharidi tokom dehidratacije formiraju vodonične veze sa polarnim grupama makromolekula (direktna interakcija) i na taj način održavaju slično fizičko stanje proteina i membrana, kao i u prisustvu vode (Crowe et al., 1998b). Prema alternativnom viđenju, tokom anhidrobioze se formiraju staklaste formacije unutar ćelija koje mogu u potpunosti da stabilizuju membrane i proteine (Crowe, 1998a). Ova pojava je poznata kao vitifikacija, odnosno „ostakljivanje” ćelija. Nastala biološka „šećerna” stakla imaju sposobnost da omogućе hemijsku stabilnost, odnosno da usporavaju ili čak zaustave hemijske reakcije, čime se izbegavaju štetne interakcije unutar ćelija. Verovatno je da su oba dešavanja neophodna za preživljavanje dugotrajne anhidrobioze.

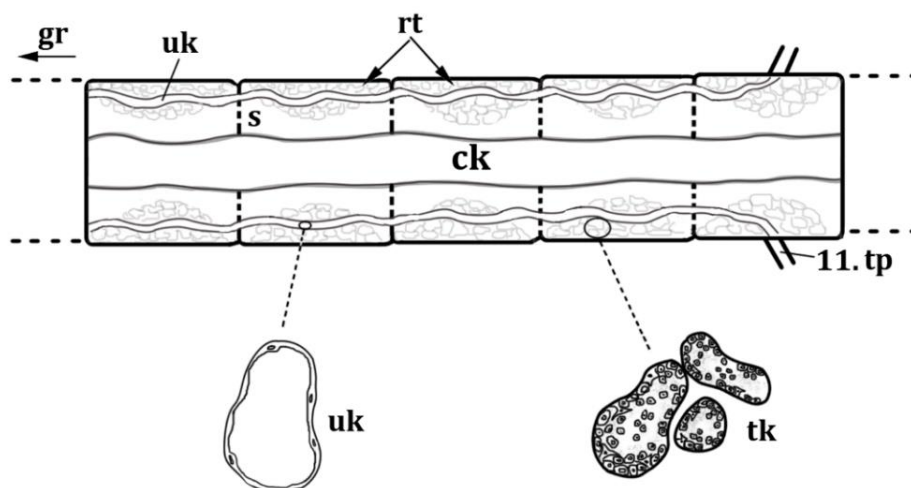
Druga grupa jedinjenja koja ima važnu ulogu tokom trajanja kriptobioze su proteini. Kod roda *Artemia* (Anostraca) su identifikovani protein p26, artemin, kao i dva proteina toplotnog stresa (engl. *heat shock protein*) – hsp70 i hsp90. Protein p26 čini oko 15% ukupnih proteina incistiranih embriona (ne računajući proteine žumanceta) i u toj fazi je prisutan u najvećoj količini. Pokazano je da funkcioniše kao molekularni šaperon tokom anoksije i toplotnog stresa, odnosno da štiti ćelije tako što ograničava denaturaciju i agregaciju proteina izazvanu stresom i pomaže njihovo ponovno savijanje u nativnu konformaciju, tj. u biološki aktivan oblik (Clegg et al., 1994; Liang et al., 1997a, b; Tanguay et al., 2004). Protein p26 pripada grupi malih proteina toplotnog stresa, iz alfa-kristalin familije (Liang 1997 et al., a, b). Sintaza ovog proteina nije uzrokovana stresom, već je programirana u razviće embriona koji ulaze u dijapauzu, dok se većina trehaloze sintetiše nakon oslobađanja dijapauzirajućih jaja

(Clegg et al., 1999). Pokazano je da trehaloza i p26 protein mogu da deluju sinergistički u toku i nakon toplotnog stresa (Viner & Clegg, 2001).

U grupi Notostraca za sada nisu pronađeni navedeni proteini prisutni kod Anostraca (Morotomi et al., 2004), kao ni naročito visoka koncentracija trehaloze, ali je kod tri vrste *Triops* utvrđeno da su isušene ciste u staklastom stanju, odnosno da se formiraju biološka stakla (Hengherr et al., 2011). Uspešna anhidrobioza je moguća čak i bez prisustva trehaloze, kako je pokazano kod rotifera (Lapinski & Tunnacliffe, 2003; Tunnacliffe et al., 2005). Sasvim je moguće da postoji više različitih strategija za ostvarivanje otpornosti na dehidrataciju, mada potencijalno učešće trehaloze i hipoteza zamene vode nisu sasvim isključeni kod Notostraca. Ulogu tokom anhidrobioze možda imaju obilni proteini kasne faze embriogeneze, poznati kao LEA proteini (engl. *late embryogenesis abundant proteins*). Ovi proteini su prvi put otkriveni u semenima, a javljaju se i kod biljaka i kod životinja. Struktura i moguće uloge LEA proteina utvrđene su primenom bioinformatičkih alatki (Wise, 2002, 2003). LEA proteini predstavljaju veoma hidrofилne i nativno neuvijene proteine, odnosno pripadaju grupi „suštinski neuređenih” proteina (Wise & Tunnacliffe, 2004). Struktuiranost LEA proteina se povećava u uslovima dehidratacije, kada i ostvaruju svoje višestruke funkcije. Imaju ulogu u sticanju tolerancije i otpornosti na dehidrataciju, smrzavanje i osmotski stres, zatim štite proteine pri smrzavanju i isušivanju, a moguće je i da se ponašaju kao „molekulski štitovi” (engl. *molecular shields*), odnosno da, stvarajući efekat „gužve”, smanjuju interakcije u ćeliji tokom dehidratacije (Goyal et al., 2005a; Tunnacliffe & Wise, 2007; Tunnacliffe et al., 2010). Takođe, pokazano je da mogu da stabilizuju biološka stakla (Shimizu et al., 2010). Prisustvo LEA proteina je zabeleženo kod Anostraca (Hand et al., 2007, Moore et al., 2016), a u malim količinama se javljaju i npr. kod tardigrada, kod kojih se takođe formiraju biološka stakla i trehaloza je prisutna samo u niskim koncentracijama (Hengherr et al., 2009; Förster et al., 2009). Moguće je da se kod Notostraca javljaju slični mehanizmi odbrane od dehidratacije, ali ovu ideju je potrebno dalje istražiti. Nakon što uspešno uđu u anhidrobiozu, jaja Notostraca postaju mnogo otpornija na visoke temperature (Carlisle, 1968; Hengherr et al., 2011; Ito et al., 2013).

1.4.5. Morfološka građa muških gonada Notostraca

Parne gonade mužjaka Notostraca (testisi) nalaze se u oblasti hemocela, pričvršćene za mišiće telesnog zida i postavljene sa obe strane crevnog kanala (Wingstrand, 1978; Dumont & Negrea, 2002). Testisi su izduženi i pružaju se od početnog dela toraksa do abdominalnih segmenata. Svaki testis ima tubularnu, režnjevitu i veoma razgranatu građu. Izuvijani režnjevi testisa se pružaju dorzolateralno i zauzimaju veliku zapreminu u toraksu (Slika 8).



Slika 8. Šematski prikaz građe testisa Notostraca na frontalnom preseku toraksa. Skraćenice: uk – uzdužni kanal testisa; rt – režnjevi testisa; ck – crevni kanal; s – segment toraksa; tk – testikularni kanalići; 11. tp – osnova 11. torakopode; gr – glaveni region. Crtež: I. Šaganović.

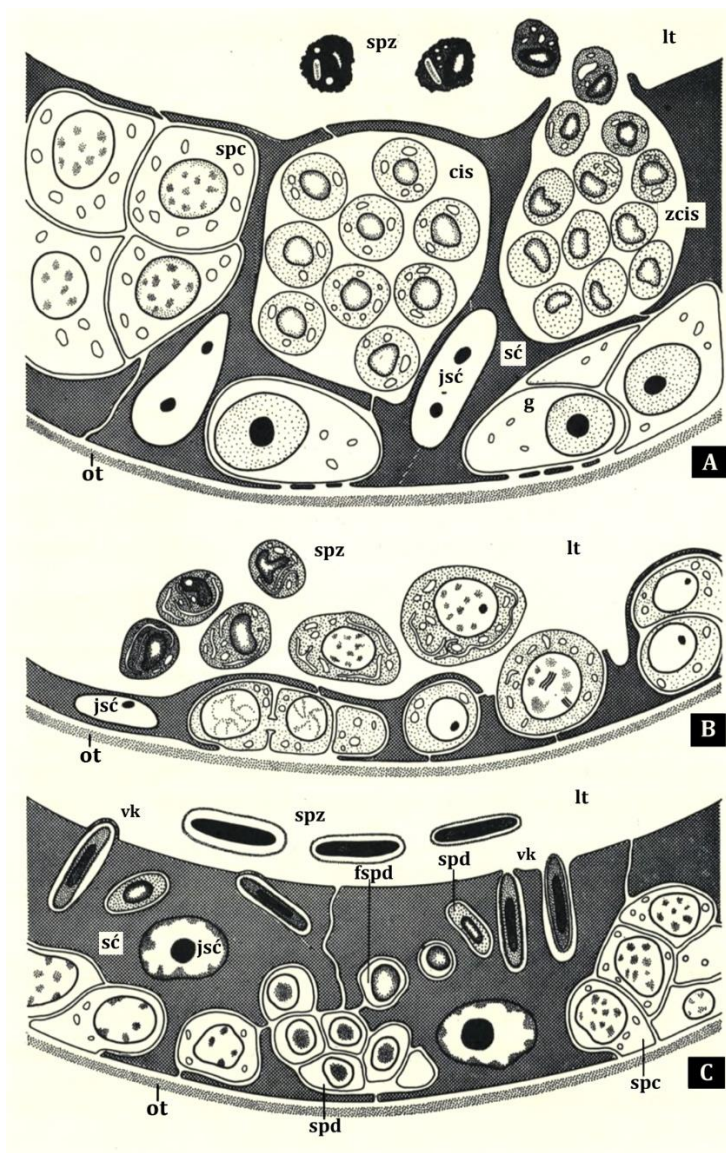
Duž svakog testisa se pruža glavni kanal kojim se spermatozoidi izbacuju u spoljašnju sredinu, putem gonopora koje se nalaze u osnovama jedanaestog para torakalnih ekstremiteta (Longhurst, 1955b; Wingstrand, 1978). Kanalići (tubule) testisa su obavijeni omotačem i sastoje se od zida i lumena koji se uglavnom jasno uočava. U zidu kanalića se nalaze somatske ćelije nepravilnog oblika, i germinativne ćelije u različitim fazama deobe. Krupne somatske ćelije se pružaju od omotača testikularnog kanalića do apikalne površine zida, gde obrazuju ivice lumena kanala.

1.4.6. Osnovne odlike spermatogeneze

Nakon opsežne uporedne studije u okviru koje su izučavane odlike spermatogeneze i ultrastrukturalna građa spermatozoida račića iz klase Branchiopoda (Wingstrand, 1978), analizirane su različite odlike muškog reproduktivnog sistema Notostraca i Spinicaudata (Engelmann et al., 1996, 1997; Scanabissi Sabelli & Tommasini, 1994; Scanabissi & Mondini 2000b; Scanabissi & Mondini 2002b; Scanabissi et al., 2005, 2006b).

U grupi Branchiopoda se javljaju tri različita tipa spermatogeneze u zavisnosti od mesta sazrevanja spermatida (Wingstrand, 1978). Prvi tip podrazumeva sazrevanje germinativnih ćelija u cistama. Spermotide koje su u procesu sazrevanja formiraju multicelularna gnezda unutar zida testisa, u proširenjima međućelijskog prostora nalik na ciste. Spermotide unutar ciste testisa sinhronizovano sazrevaju i verovatno sve potiču od jedne germinativne ćelije. Po sazrevanju, ciste se otvaraju u lumen testisa i spermatozoidi se oslobađaju (Slika 9A). Nekada se u lumenu mogu naći i nezreli germinativni elementi, kao spermocite i spermotide. Ovaj tip spermatogeneze je tipičan za grupu Anostraca, neke Cladocera, kao i za grupu Notostraca. Kod sledećeg tipa spermatogeneze, sazrevanje se odigrava u lumenu testisa. Zid testisa je prilično nerazvijen, često spljošten u nekim delovima. Ne formiraju se ciste, pa se spermotide, i delimično spermocite, oslobađaju u lumen gde sazrevaju (Slika 9B). Ovaj tip spermatogeneze se javlja kod „Conchostraca” (Laevicaudata, Spinicaudata i Cyclestherida) i nekih Cladocera. Treći tip spermatogeneze podrazumeva sazrevanje unutar vakuola. Tokom spermatogeneze, ogromne somatske ćelije obuhvataju spermotide, u procesu sličnom fagocitozi, i spermotide zatim sazrevaju unutar „privatnih” vakuola u citoplazmi somatskih ćelija. Zreli spermatozoidi se procesom egzocitoze oslobađaju u lumen testisa (Slika 9C). Ovaj tip spermatogeneze se javlja jedino kod (većine) Anomopoda

iz grupe Cladocera. Smatra se da su prva dva navedena tipa spermatogeneze blisko povezani i, s obzirom da se javljaju u većini grupa, „primitivni” za Branchiopoda. Sazrevanje spermatida unutar intracelularnih vakuola je retkost u životinjskom svetu.



Slika 9. Osnovni tipovi spermatogeneze Branchiopoda. A) sazrevanje u cistama; B) sazrevanje u lumenu; C) sazrevanje u vakuolama. Skraćenice: ot – omotač testisa; lt – lumen testisa; cis – ekstracelularna cista; zcis – zrela cista koja se otvara u lumen testisa; g – gonija; spc – spermatocite; spd – spermatide; spz – spermatozoidi; sc – somatska ćelija; jsc – jedro somatske ćelije; vk – intracelularna vakuola sa zrelim spermatozoidom; fspd – fagocitirana spermatida (prema Wingstrand, 1978).

Spermatozoidi Branchiopoda pokazuju neke specifične odlike u odnosu na uobičajeno shvatanje muških polnih ćelija (Wingstrand, 1978). Branchiopoda imaju okruglaste ili izdužene spermatozoide, bez flagela i akrozoma, i sa jasno uočljivim nukleusom koji je uglavnom obavijen nukleusnim ovojem. U citoplazmi spermatozoida se nalaze mitohondrije, mada kod nekih vrsta mitohondrije mogu da budu male ili izmenjene, pa i da izostaju. Dve centriole su uvek prisutne u spermatidama i očuvane u spermatozoidama nekih grupa (Anostraca, Notostraca i „Conchostraca”). Iako flagele nisu prisutne, verovatno je većina spermatozoida sposobna za neku vrstu ameboidnih pokreta, ali ne bi mogli da se okarakterišu kao pokretljive ćelije. Dok su još u kanalima gonada, mnogi spermatozoidi obrazuju pružajuće

nastavke nalik na pseudopodije (Wingstrand, 1978; Scanabissi & Mondini 2002a; Scanabissi et al., 2005).

U grupi Notostraca, somatske ćelije zida kanalića se jasno raspoznaju jer pokazuju veću elektronsku gustinu. U citoplazmi somatskih ćelija se nalazi granulisan endoplazmin retikulum, veliki broj slobodnih ribozoma, i elektronski gusto izduženo jedro sa velikim nukleolusom (Scanabissi & Mondini 2002b; Scanabissi et al., 2005). U bazalnom delu zida testikularnih kanalića raspoređene su krupne spermatogonije. Citoplazmu ovih ćelija karakteriše veliki broj ribozoma, granulisani endoplazmin retikulum i veliki nukleus sa razuđenim hromatinom (Engelmann et al., 1997). Spermatocite su raspoređene bliže lumenu i imaju svetliju, finije granulisanu citoplazmu, i jedro sa naznakama mejotičke deobe (Engelmann et al., 1997; Scanabissi et al., 2005). Rastom spermatocita nastaju spermatide čije sazrevanje se odvija unutar cisti, smeštenih u intercelularnom prostoru u zidu testisa. Citoplazma ranih spermatida sadrži slobodne ribozome i granulisani endoplazmin retikulum. Ove organele se tokom sazrevanja spermatida izgube (Wingstrand, 1978; Scanabissi & Mondini 2002b), mada je pokazano da se nekad zadržavaju tokom svih faza sazrevanja (Engelmann et al., 1997). Zreli spermatozoidi se oslobađaju u lumen testikularnih kanalića i predstavljaju okruglaste ćelije jednostavne građe, dijametra 4–6 μm . Jedro spermatozoida je smanjeno u odnosu na dijametar jedra ostalih germinativnih ćelija i uglavnom poseduje nukleusni ovoj (Wingstrand, 1978; Scanabissi et al., 2005), ali ponekad može biti i bez ovoja (Engelmann et al., 1997). U citoplazmi spermatozoida se nalazi nekoliko izduženih mitohondrija, kao i par centriola u blizini nukleusa (Wingstrand, 1978; Engelmann et al., 1997). Spermatozoidi roda *Lepidurus* su pravilnijeg oblika u odnosu na spermatozoide roda *Triops*. Takođe, citoplazma je finije granulisana i bez endoplazminog retikuluma, dok se u „zrnastoj” citoplazmi spermatozoida račića roda *Triops* javlja i mali broj cisterni glatkog endoplazminog retikuluma.

1.5. Seksualni sistem i reprodukcija Notostraca

Mužjaci Notostraca mogu da se identifikuju prema odsustvu jajnih kesa na jedanaestom paru torakopoda, kao i npr. na osnovu morfoloških odlika karapaksa i, u slučaju roda *Lepidurus*, odlika kaudalne lamine (Linder, 1952; Longhurst, 1955a; Stephan, 2008; Šaganović et al., 2017). Proučavanjem ponašanja jedinki, uočeno je da su mužjaci aktivniji od ženki i da pokazuju specifično ponašanje prilikom parenja (Engelmann et al., 1996; Stephan, 2008; Lakka, 2015). Međutim, ženke i hermafroditne jedinke ne mogu da se razlikuju prema spoljašnjoj morfologiji i ponašanju, iako histološke analize gonada hermafrodita pokazuju prisustvo testikularnih vezikula, tj. prisustvo ovotestisa. Takođe, hermafroditne jedinke mogu da produkuju vijabilna jaja prilikom gajenja u izolaciji (Bernard, 1891; Longhurst, 1954, 1955b; Sassaman, 1991).

Longhurst (1955a) je opisao reprodukciju vrste *Triops cancriformis* kao „kompleksnu situaciju”. Izvesno je da slično može da se kaže za reprodukciju u okviru čitavog reda Notostraca. Izuzetna morfološka stabilnost koja karakteriše predstavnike ove grupe nije u skladu sa mnoštvom prisutnih načina reprodukcije, sa razlikama koje se javljaju na intraspecijskom i interspecijskom nivou (Mathers et al., 2013). Populacije Notostraca mogu da se sastoje od gonohorista, sa varijabilnim udelom polova koji može da bude skoro jednak ili značajno pomeren u korist jednog pola (Zaffagnini & Trentini, 1980; Sassaman, 1991; Engelmann et al., 1996; Sassaman et al., 1997). Javljaju se hermafroditizam (Bernard, 1891, 1896; Longhurst, 1955b; Wingstrand 1978) i partenogeneza (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979; Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982; Scanabissi &

Mondini 2002a), a u grupi je poznata i androdioecija (AD) – retka pojava koja podrazumeva prisustvo hermafroditnih jedinki i mužjaka u populaciji (Pannell, 2000, 2002; Weeks et al., 2006a). Smatra se da AD predstavlja fazu pri prelasku iz gonohorizma (dioecije) u hermafroditizam, i obrnuto, i da je evoluirala u svrhu osiguravanja reprodukcije kod vrsta koje karakteriše fluktuirajuća gustina populacija (Weeks et al., 2006a). S obzirom da se mužjaci u AD populacijama nekad javljaju sa izuzetno niskom učestalošću, definisanje populacije kao hermafroditne zahteva ispitivanje velikih uzoraka populacije (Sassaman, 1991; Zierold et al., 2007; Mathers et al., 2013). Postoje podaci npr. da je pronađeno samo osam mužjaka vrste *L. apus* na svakih hiljadu ženki (Heidecke & Neumann, 1987, strana 117). Slično, Linder (1952) je naveo podatke o nemačkim populacijama vrste *T. cancriformis*, uzorkovanim u periodu između 1857. i 1869, u kojima nije pronađen nijedan mužjak među približno 9000 pregledanih ženki (strana 13). Niska učestalost mužjaka je prijavljena i za populacije drugih vrsta Notostraca (Engelmann & Hahn, 2005; Golzari et al., 2009; Wojtasik & Bryłka-Wołk, 2010). Udeo mužjaka u androdioecijskim populacijama Notostraca može da se kreće od oko 28% do 0% (Sassaman, 1991, Sassaman et al., 1997). Očekivan udeo reproduktivno zrelih mužjaka u AD populaciji u ravnoteži zavisi od faktora kao što su relativan fekunditet mužjaka u odnosu na hermafrodite, stopa samooplodnje, nivo inbriding depresije, kao i relativna verovatnoća preživljavanja do reproduktivne zrelosti hermafroditnih jedinki u odnosu na mužjake (Pannell, 2002).

1.5.1. Partenogeneza i hermafroditizam/androdioecija u grupi Notostraca

Smatra se da je gonohorizam predački način reprodukcije Notostaca (Zierold et al., 2007; Mathers et al., 2013), sa približno jednakim udelom polova i ukrštanjem koje je neophodno za polaganje vijabilnih jaja (Korn et al., 2006). Seksualni sistem Notostraca može da se okarakterise kao veoma nestabilan, sa ponavljajućim prelascima u toku evolucije iz gonohorizma u hermafroditizam/androdioeciju i obrnuto. Ova nestabilnost je održavana najmanje 250 miliona godina, kada se procenjuje nastanak dva recentna roda – *Triops* i *Lepidurus* (Mathers et al., 2013). Složena ispitivanja genetičkih odlika evropskih populacija roda *Triops* su ukazala na vezu između pojavljivanja samo-kompatibilnih načina reprodukcije i kolonizacije u postglacijalnom periodu (Korn et al., 2006; Zierold et al., 2007).

Dugo su bila podeljena mišljenja o načinu reprodukcije uniseksualnih evropskih populacija *T. cancriformis* (Bernard, 1891). Nakon perioda tokom kog je dominantno mišljenje bilo da se razmnožavaju partenogenetski, histološkim analizama gonada „ženki” iz severnih delova distribucije je pokazano prisustvo testikularnih lobusa, odnosno postojanje ovotestisa (Bernard, 1891, 1896; Longhurst, 1955b; Wingstrand 1978; Zaffagnini & Trentini, 1980). Ovim radovima je započela „renesansa teorije hermafroditizma” (Engelmann & Hahn, 2005). Prisustvo ovotestisa, tj. samo-kompatibilnih hermafrodita, je otkriveno i kod drugih vrsta Notostraca. Međutim, Zaffagnini & Trentini (1980) su smatrali da se kod *T. cancriformis* javlja rudimentni hermafroditizam. Ovi autori su raspored evropskih populacija date vrste označili kao primer geografske partenogeneze: populacije koje naseljavaju južne delove imaju približno jednak broj mužjaka i ženki, dok se idući ka severu broj mužjaka smanjuje i u severnim delovima distribucije, populacije su bez mužjaka i jedinke sa ovotestisima se razmnožavaju automiktičnom partenogenezom. Slično, i Trentini & Sabelli Scanabissi (1982) su sumnjali u mogućnost funkcionalnog hermafroditizma, iako su uočili testikularne lobuse u gonadama ženki, ali ne i spermatozoide. Wingstrand (1978) je izučavajući ultrastrukturne odlike gonada hermafroditnih jedinki određenih vrsta prijavio veliki stepen degeneracije spermatozoida, dovodeći u pitanje biološki značaj uočenih testikularnih lobusa. Takođe, otkrivene biseksualne populacije *T. cancriformis* na severu Nemačke, sa ženkama bez

ovotestisa i retkim mužjacima, ukazale su na moguću partenogenetsku reprodukciju (Engelmann et al., 1996, 1997). Nakon ovih otkrića, hipoteza partenogeneze u grupi Notostraca je ponovo dobila na značaju.

Androdioecija (AD) je osim kod Notostraca utvrđena i kod Spinicaudata. Jedan od najpoznatijih i najviše proučavanih primera kod ove grupe je androdioecija vrste *Eulimnadia texana*, a kasnije je utvrđeno da je AD široko zastupljena u rodu *Eulimnadia* (Sassaman & Weeks, 1993; Pannell, 2002; Weeks et al., 2005; Weeks et al., 2006a; Weeks et al., 2010). U grupi Notostraca, AD je prisutna i kod vrsta roda *Triops* i kod vrsta roda *Lepidurus* (npr. Longhurst 1954, 1955b; Sassaman, 1991; Murugan et al., 2009; Macdonald et al. 2011). Androdioecijske populacije se sastoje od mužjaka i dva tipa genetički različitih samo-kompatibilnih hermafrodita. Pol je i kod *Eulimnadia* i kod Notostraca genetički određen, sa ZW hromozomskim sistemom (Sassaman, 1991; Sassaman & Weeks, 1993; Weeks et al., 2010, Mathers et al., 2015). U AD populaciji, amfigenični hermafroditi imaju ZW genotip, monogenični hermafroditi WW genotip, dok su mužjaci recesivni u odnosu na hermafrodite i imaju ZZ genotip. U populaciji se javlja mešoviti način reprodukcije, odnosno samo-kompatibilni hermafroditi vrše samooplodnju i ukrštaju se sa mužjacima iz populacije (Pannell 2000, 2002, Weeks et al., 2006a). Prema teorijskim modelima, evolucija androdioecije je malo verovatna u jedinstvenoj i stabilnoj populaciji. Međutim, u izdvojenoj metapopulaciji, sa ponavljajućim lokalnim ekstinkcijama i rekolonizacijom, androdioecija može da se javi pod posebnim uslovima. Samo-kompatibilni hermafroditi sa pretežno ženskom funkcijom se selektuju radi osiguravanja reprodukcije i ukoliko stopa samooplodnje opada sa rastom populacije, odnosno kada se povećavaju prilike za ukrštanje, mužjaci mogu da nastane lokalnu populaciju i da se prošire u metapopulaciji hermafrodita (Pannell, 2000, 2002). Ukoliko AD evoluirala od dioecijskih prekursora, hermafroditni mutanti se verovatno češće formiraju od ženki, kod kojih se javlja mutacija za proizvodnju male količine spermatozoida, nego od mužjaka, koji bi u tom slučaju trebalo da razviju ženske funkcije kao što su krupne jajne ćelije sa omotačem i često i pomoćne strukture, kao npr. jajne kese ili ležajne komore (Weeks et al., 2006a). Morfološki dimorfizam koji postoji između hermafrodita i mužjaka *E. texana* onemogućava da se hermafroditi međusobno ukrštaju, već se ukrštanje odigrava jedino putem mužjaka (Weeks et al., 2006a; Pannell, 2002). Kod Notostraca se navodi i mogućnost međusobnog ukrštanja hermafrodita, ali potrebna su dodatna istraživanja koja bi ovo potvrdila (Horn et al., 2014). S obzirom na retko pojavljivanje u prirodi, smatra se da androdioecija nije stabilna i da predstavlja prelazni seksualni sistem. Međutim, podaci za *Eulimnadia* ukazuju da se u ovom rodu AD održava 24–180 miliona godina (Weeks et al., 2006c). Stabilna AD *Eulimnadia* je u suprotnosti sa nestabilnim seksualnim sistemom Notostraca. Ove razlike su iznenađujuće s obzirom da obe grupe branhiopodnih račića naseljavaju barice sa sličnim ekološkim osobinama, često i koegzistiraju, i imaju slične osobine životne istorije (Mathers et al., 2013). Pretpostavlja se da kod *Eulimnadia* postoje razvojna ograničenja za evoluciju iz AD u populaciju samo-kompatibilnih hermafrodita koji bi imali razvijene sve specijalizovane odlike mužjaka, kao npr. hvataljke kojima se mužjaci tokom parenja kače za karapaks hermafrodita (Weeks et al., 2006a). Takođe, postavljen je model prema kom inbriding depresija, koja potiče od genetičkog opterećenja vezanog za W polni hromozom, može da objasni dugotrajno održavanje AD kod *Eulimnadia* (Pannell, 2008).

Nema mnogo podataka o načinu reprodukcije vrste *L. couesii*. Prema prvobitnim podacima, populacije se sastoje od približno jednakog broja mužjaka i ženki (Packard, 1875). Navodno gonohorna populacija *L. couesii* je pronađena na Siciliji (Margraf & Maass, 1982; Mathers et al., 2013).

1.6. Fenomen alometrije

Izuzetnu važnost u studijama evolucione i razvojne biologije ima koncept alometrije (Klingenberg, 2016). U širem smislu, alometrija opisuje promene osobina koje su uslovljene promenom veličine (Gould, 1966; Shingleton, 2010; Klingenberg, 2016). Pojam alometrija može da se odnosi na vezu „biološkog skaliranja” i morfoloških, fizioloških, ekoloških osobina, kao i osobina ponašanja (Klingenberg, 1998; Shingleton, 2010). U slučaju kada se razmatra neka morfološka celina, alometrija može da se definiše kao zavisnost (odnos) njene veličine i oblika (Gould, 1966; Shingleton et al., 2007; Klingenberg, 1998; Ivanović & Kalezić, 2013; Mitteroecker et al., 2013). Ukoliko se morfološka celina uvećava proporcionalno sa rastom tela, njen oblik se ne menja i odnos veličine i oblika se označava kao izometrija (Shingleton, 2010; Ivanović & Kalezić, 2013).

Koncept alometrije se menjao i proširivao u odnosu na početnu postavku, paralelno sa razvijanjem različitih načina za procenu morfološke varijabilnosti (Klingenberg, 1998, 2016; Gayon, 2000; Ivanović & Kalezić, 2013). Kao rezultat, nastajale su i nove metode za analizu alometrijskih odnosa. U zavisnosti od izvora variranja veličine i oblika, odnosno od nivoa na kom se analiziraju alometrijski odnosi, alometrija može da se klasifikuje na statičku, ontogenetsku i evolucionu (Cock, 1966; Klingenberg, 1996, 1998; Shingleton et al., 2007; Ivanović & Kalezić, 2013). Statička alometrija opisuje alometrijske odnose između jedinki koje su na istom razvojnom stupnju i pripadaju istoj vrsti (npr. na nivou populacije). Ontogenetska alometrija, odnosno alometrija rasta, predstavlja promene u obliku i veličini koje se javljaju tokom rasta jedinki. Evolucionarna alometrija (filogenetska alometrija) prati alometrijske odnose između jedinki na istom razvojnom stupnju koje pripadaju različitim vrstama, odnosno alometriju tokom evolucije grupa. Empirijski podaci ukazuju da navedeni tipovi alometrije često, ali ne obavezno, pokazuju slične obrasce (Klingenberg, 1998; Shingleton et al., 2007; Shingleton, 2010). Ova povezanost postoji jer statička i evolucionarna alometrija nastaju kao posledica promena alometrijskih odnosa karakterističnih za određenu fazu ontogenetskog razvića, odnosno zbog postojanja varijabilne stope rasta tokom individualnog razvića (Shingleton et al., 2007; Ivanović & Kalezić, 2013).

Alometrija je često jedan od glavnih faktora koji doprinosi morfološkoj varijabilnosti, oslikavajući variranje veličine morfoloških celina (Klingenberg, 1996, 2010, 2016). Na ovaj način, alometrija može da utiče na morfološku evoluciju, odnosno da predstavlja važan evolucionarni faktor (Ivanović & Kalezić, 2013). S obzirom da se promene u veličini odigravaju na nivou svih delova organizma, alometrija može da se identifikuje kao potencijalno snažan ograničavajuć faktor u evoluciji oblika morfoloških celina (Klingenberg, 2010; Ivanović & Kalezić, 2013).

Koncept alometrije je takođe važan u studijama polnog dimorfizma. Smatra se da alometrija značajno doprinosi dimorfizmu u obliku, tj. da je polni dimorfizam u obliku uglavnom posledica zavisnosti veličine i oblika (Klingenberg, 1996; Gidaszewski et al., 2009; Ivanović & Kalezić, 2013; Berns, 2013). Ukoliko polovi pokazuju iste obrasce alometrijskih promena, korisno je da se razdvoje alometrijska komponenta promene oblika morfoloških celina između polova, koja je u vezi sa variranjem veličine, i nealometrijska komponenta polnog dimorfizma u obliku koja nastaje usled delovanja nekih drugih faktora (Gidaszewski et al., 2009). Međutim, iako složena i značajna, uloga alometrije u promenama oblika nije često ispitivana, najviše zbog toga što nije uvek jednostavno opisati i kvantifikovati razlike u obliku (Gidaszewski et al., 2009; Ivanović & Kalezić, 2013).

1.7. Polni dimorfizam

Polni dimorfizam predstavlja upadljiv obrazac prisutan kod većine gonohornih vrsta biljaka i životinja (Hedrick & Temeles, 1989; Andersson, 1994). Definiše se kao različitost u ponašanju, razviću, fiziološkim, ekološkim i morfološkim odlikama mužjaka i ženki iste vrste (Punzalan & Hosken, 2010). U skladu sa tim, polni dimorfizam predstavlja značajan izvor fenotipskog, odnosno morfološkog, variranja (Benítez, 2013; Ivanović & Kalezić, 2013). Prema spoljašnjoj morfologiji, polovi mogu da se razlikuju u veličini ili obliku tela, kao i prema obojenosti ili prisustvu ornamentacije kao što su npr. rogovi jelena i rep pauna (Hedrick & Temeles, 1989; pregledno u Berns, 2013).

Smatra se da postoji više mehanizama koji dovode do evolucije polnog dimorfizma. Hipoteza seksualne selekcije, koju je postavio Darwin (1871), i dalje predstavlja jedno od prihvaćenijih objašnjenja nastanka razlika između polova (Berns, 2013). Prema Darwinovoj hipotezi, seksualna selekcija deluje na oba pola (naročito muški) na način da favorizuje odlike koje jedinkama omogućavaju reproduktivnu prednost u odnosu na ostale jedinke istog pola. Polni dimorfizam nastaje jer se selektuju odlike zbog kojih jedinke postaju bolje u kompeticiji sa pripadnicima istog pola, ili odlike zbog kojih jedinke postaju privlačnije suprotnom polu. Sada su ovi mehanizmi seksualne selekcije uglavnom kategorisani kao intraseksualna selekcija, koja označava selektovanje odlika koje mužjacima donose uspeh u kompeticiji sa drugim mužjacima za osvajanje ženki (npr. veće dimenzije tela mužjaka), i interseksualna selekcija koja se odnosi na selektovanje osobina koje mužjacima povećavaju šansu da budu izabrani od strane ženki (Tucić, 2003). Međutim, polni dimorfizam može da se objasni i delovanjem brojnih drugih faktora, pre svega prirodne selekcije, koja može da deluje i zajedno sa seksualnom selekcijom (Lande, 1980; Hedrick & Temeles, 1989). Ekološki mehanizmi, koji podrazumevaju npr. borbu za resurse, mogu da dovedu do razdvajanja ekoloških niša među polovima i pojave polnog dimorfizma (Hedrick & Temeles, 1989; Shine, 1989). Dodatno, selekcija vezana za fekunditet favorizuje osobine koje direktno utiču na poboljšanje reprodukcije, a ne kroz interakcije između jedinki (Bonnet et al., 2000). Smatra se da ovaj vid selekcije uglavnom deluje na ženke i favorizuje fenotipske osobine koje omogućavaju proizvodnju većeg broja jaja ili potomaka, npr. veće dimenzije tela ili trupa (Olsson et al., 2002; Fairbairn et al., 2007). Prema generalizovanoj definiciji, selekcija vezana za fekunditet predstavlja selektovanje bilo koje osobine koja utiče na povećanje, ali i smanjenje fekunditeta, posmatrano kod oba pola (pregledno u Pincheira-Donoso & Hunt, 2015).

Pored navedenih mehanizama, koji mogu da se svrstaju u adaptivne, i neadaptivni mehanizmi mogu da utiču na pojavu polnog dimorfizma. Kao što je spomenuto, razlike između polova se javljaju i zbog uticaja alometrije (npr. Gidaszewski et al., 2009). S obzirom na složenost polnog dimorfizma, često je teško da se utvrdi koji faktori utiču na stvaranje razlika između polova, kao i na koji način su kombinovani (Ivanović & Kalezić, 2013).

Predmet istraživanja velikog broja studija polnog dimorfizma bio je fenomen razlike u veličini tela i morfoloških celina mužjaka i ženki (Lande, 1980; Hedrick & Temeles, 1989; Fairbairn et al., 2007). Zanimljivo je da je dimorfizam u obliku daleko manje istraživan, iako oblik može značajno da doprinosi različitim funkcijama organizma (Gidaszewski et al., 2009; Benítez, 2013; Berns, 2013; Ivanović & Kalezić, 2013). Relativno novije metode geometrijske morfometrije, koje kao početne podatke koriste konfiguracije 2D ili 3D specifičnih tačaka, omogućile su veliki napredak u analizama oblika morfoloških celina (Adams et al., 2013; Ivanović & Kalezić, 2013; Berns, 2013; Klingenberg, 2016).

Morfometrijske analize na predstavnicima Notostraca do sada su uglavnom vršene u svrhu opisa i identifikacije vrsta, procene taksomonske divergencije ili radi opisivanja polnog dimorfizma (Longhurst, 1955a; Korn et al., 2010; Lakka, 2015; Wagner et al., 2019). U ovim

studijama su za proučavanje veličine i oblika morfoloških struktura korišćene dužinske mere, odnosi i površine. Geometrijska morfometrija nije doživela veliku primenu u grupi. Poznate su samo dve studije u kojima je primenom metoda geometrijske morfometrije analizirano morfološko variranje karapaksa i telzona vrsta roda *Triops* (Suno-Uchi, 1997; Meusel & Schwentner, 2016).

1.8. Razvojne anomalije

Atipična morfologija životinja obično nastaje kao rezultat razvojne nestabilnosti, na koju utiču sredinski i genetički stresori (Graham et al., 1993). Gilbert (2000) je definisao abnormalnosti (deformitete) koje nastaju zbog genetičkih uzroka kao malformacije, dok je abnormalnosti uzrokovane egzogenim faktorima nazvao disrupcijama. Abnormalnosti mogu da se jave kao vidljive morfološke promene (fenodevijansa) ili u obliku suptilnih nasumičnih odstupanja od savršene bilateralne simetrije (ukoliko pretpostavimo da je simetrija idealno stanje morfoloških struktura sa dve strane ravni koja deli telo na levu i desnu polovinu) (Tomkins & Kotiaho, 2001). Fenodevijantnost predstavlja neuobičajeno pojavljivanje osobine koja se suštinski razlikuje od tipičnog fenotipa i obično se pojavljuje u manje od 4% slučajeva u populaciji (prema Møller & Swaddle, 1997). Potpuni ili delimični gubitak nekog dela tela može da predstavlja značajnu promenu i da utiče na oblik i simetriju. Takođe, neke abnormalnosti kod zglavkara mogu da se jave ukoliko dođe do poremećaja procesa presvlačenja, ili nesrazmerne ili nepotpune regeneracije tkiva nakon povrede (Jagadeesan & Jyothibabu, 2016). Česte su i promene koje se javljaju zbog fiksiranja ili čuvanja uzoraka u alkoholu. Neki delovi tela tada mogu da zadobiju čudan izgled (Beladjal & Mertens, 1999; Järvinen et al., 2014), dok prirodna boja određenih delova tela može da izbledi ili da se promeni u odnosu na normalno stanje.

Postoje mnoge studije na zglavkarima usmerene ka proučavanju i definisanju različitih malformacija, kao i ka razmatranju mogućih uzroka njihovog pojavljivanja. U ovim studijama su izučavani anomalirani uzorci iz prirode ili su anomalije izazivane u laboratorijskim uslovima, različitim izmenama genetičkih i sredinskih faktora. Studije su rađene na insektima (pregledno u Yi et al., 2017), paukovima (Napiórkowska et al., 2015a, b; Tomić et al., 2016), škorpijama (Šarić & Tomić, 2016), pseudoskorpijama (Lučić, 1995; Makarov, 1995), centipedama (Minelli & Pasqual, 1986), milipedama (Janssen, 2013) i rakovima (Dias, 1999; Luppi & Spivak, 2007; Miličić et al., 2013; Melo et al., 2014).

2. Ciljevi

Predmet ove doktorske disertacije predstavlja proučavanje određenih karakteristika razvojne biologije vrste *Lepidurus couesii*, identifikovane u Srbiji. Analize obuhvataju izučavanje morfoloških odlika vrste, procenu polnog dimorfizma i kvantifikovanje alometrijskih promena oblika na nivou populacije i ontogenetske serije. Takođe, predmet istraživanja predstavljaju i reproduktivne odlike vrste, kao i razvojne anomalije prisutne u prirodnim populacijama.

Osnovni naučni ciljevi istraživanja ove doktorske disertacije su:

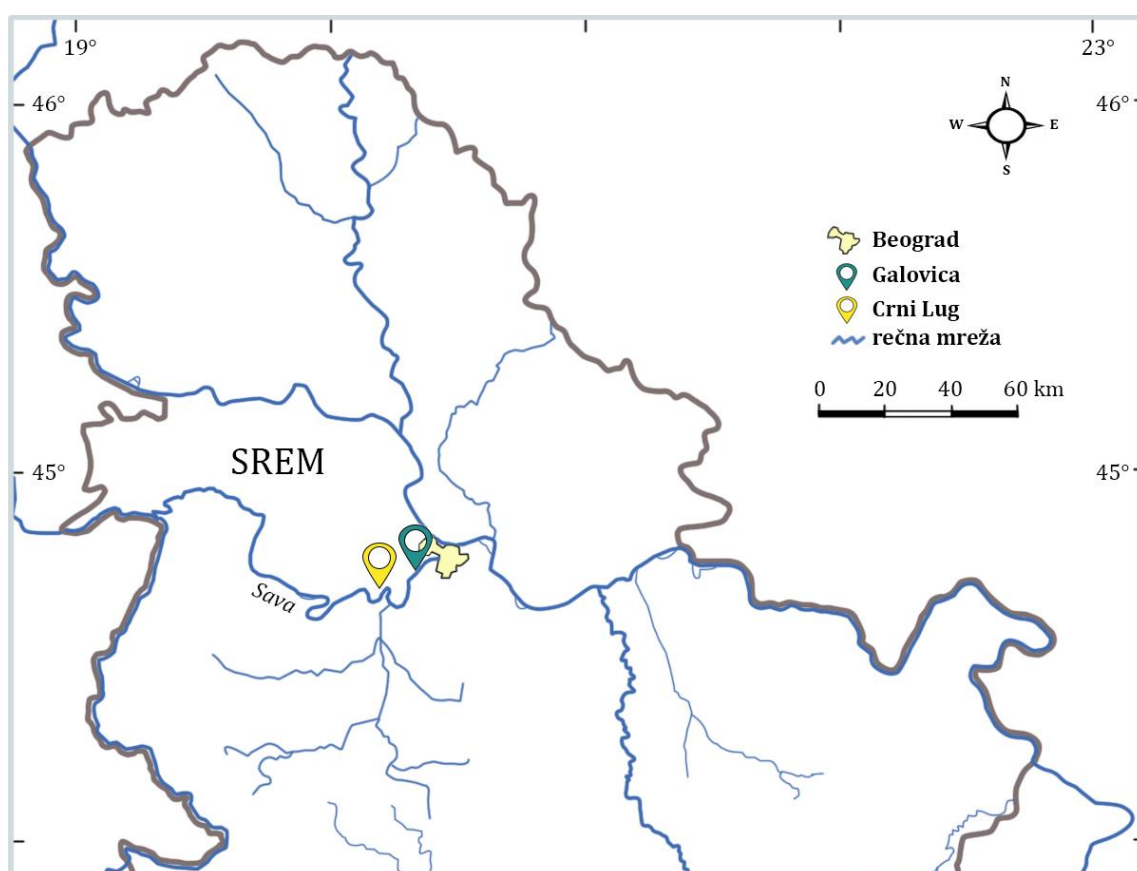
- Analiza važnih taksonomskih morfoloških karaktera, definisanih prema dosadašnjim literaturnim podacima, i utvrđivanje taksonomske pripadnosti;
- U potpunijanje znanja o granicama rasprostranjenja vrsta roda *Lepidurus* u Evropi;
- Razmatranje histoloških odlika reproduktivnog sistema jedinki sa jajnim kesama, tj. procenjivanje da li su u populacijama prisutne hermafroditne jedinke;
- Utvrđivanje osnovnih odlika oogeneze i spermatogeneze i procena mogućih načina reprodukcije populacija iz Srbije;
- Analiziranje potencijalnih uloga mužjaka u populacijama;
- Procena morfološke varijabilnosti primenom metoda geometrijske morfometrije, tj. analiza obrazaca variranja veličine i oblika:
 - i) telzona sa kaudalnom laminom
 - ii) karapaksa;
- Procena udela alometrije u ukupnom variranju oblika analiziranih morfoloških struktura;
- Ispitivanje mogućnosti primene navedenih morfoloških struktura u taksonomskoj identifikaciji račića;
- Definisavanje, klasifikovanje i analiziranje poremećaja i abnormalnosti koji se javljaju tokom razvića, kao i kvalitativnih promena morfoloških struktura.

3. Materijal i Metode

3.1. Prikupljanje uzoraka

3.1.1. Opis lokaliteta Galovica

Pretraživanjem potencijalnih staništa, prisustvo velikih branhiopoda je utvrđeno na nekoliko lokaliteta. Jedan od lokaliteta je utvrđen u blizini Beograda, na 132 m nadmorske visine, u plavnoj zoni reke Save (N 44.770445; E 20.350340) (Slike 10, 11). Koordinate i nadmorska visina lokaliteta dobijeni su pomoću ručnog GPS uređaja. Ovo područje predstavlja deo veštačkog drenažnog sistema izgrađenog u svrhu kontrolisanja nivoa podzemnih voda, kao i sprečavanja plavljenja vodom iz severnih nizijskih oblasti. Količina vode koja se zadrži na staništu zavisi od količine padavina i od hidroloških karakteristika reke Save. U vreme uzorkovanja materijala, srednja temperatura vazduha iznosila je od 12°C do 22°C. Prikupljanje podataka sa lokaliteta Galovica izvršeno je u maju 2008. godine.



Slika 10. Geografski prikaz lokaliteta sa kojih su uzorkovane *Lepidurus* populacije.



Slika 11. Izgled efemernog staništa na lokalitetu Galovica (Fotografija: D. Miličić).

Lokalitet Galovica se nalazi u močvarnom delu, u samoj blizini kanala. Uglavnom je bio prekriven travnatom vegetacijom, kao i retkom šumom uz plavnu zonu reke. Dubina vode iznosila je od 10 cm do 50 cm. Uzorci su prikupljeni iz zone dubine 0.3–0.5 m. Dno vodenog basena bilo je prekriveno trulim lišćem, muljem i zemljom. Fizičke odlike vode merene su na terenu, pomoću terenskog seta „WTW Multi 340i/SET” (Tabela 2).

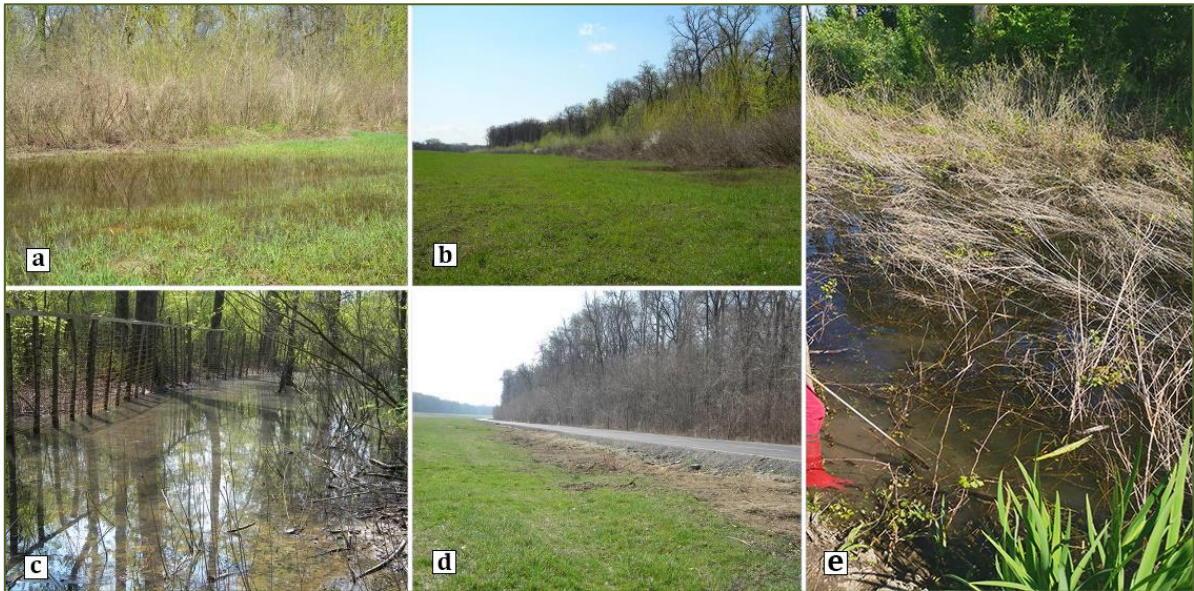
Tabela 2. Fizičke karakteristike vodenog staništa

Temperatura	19°C
Konduktivitet	0.04 S m ⁻¹
Salinitet	0.02 mg/L
pH vrednost	7–8
Koncentracija kiseonika	6.8 mg/L

Ukupan broj uzorkovanih jedinki sa ovog staništa iznosi 127 (122 jedinke sa jajnim kesama i pet mužjaka). Sve jedinke pripadaju približno istoj uzrasnoj kategoriji.

3.1.2. Opis lokaliteta Crni Lug

Drugi analizirani lokalitet predstavljen je grupacijom blisko raspoređenih barica koje se javljaju na području šume i lovišta Crni Lug (N 44.421453, E 20.121288; N 44.415374, E 20.120327; N 44.423810, E 20.123580; N 44.423431, E 20.124275). Ovaj lokalitet se nalazi u Sremu, u blizini doline reke Save, i na karti je udaljen oko 14 km od lokaliteta Galovica (Slika 10). Jedinke sa lokaliteta Crni Lug su prikupljane tokom nekoliko godina, tako da je označeno šest datuma uzorkovanja – april 2010, maj 2010, april 2011, mart 2013, maj 2013. i maj 2021. godine. Tokom navedenih godina stanište je izmenjeno, najviše kao rezultat antropogenog uticaja (Slika 12). Sve do 2010. postojalo je nekoliko plavnih zona, sa efemernim barama razdvojenim žbunastim rastinjem (Slika 12a) (Miličić et al., 2014). Promene su nastupile 2011. godine, kada je započeta izgradnja lokalnog puta koji je dovršen naredne godine (Slika 12 b, c, d, e). Kao posledica, mnoga staništa su trajno iščezla.



Slika 12. Lovište Crni Lug (prema Miličić et al., 2014, izmenjeno). a) prvobitna plavna zona (2010); b) promene nastale nanošenjem šljunka i raskrčivanjem rastinja (2011); c) primer preostalog efemernog staništa; d) regionalni put, izgrađen 2012; e) izgled efemerne bare iz 2021. godine (Fotografija: D. Miličić).

Zabeležene temperature vode iznosile su između 19.5 °C i 27 °C, dok je pH vrednost vode bila neutralna i blago kisela (pH vrednost 5–7). Vodenu vegetaciju je sačinjavala visoka trava, mlada trska i irisi. U vodi su uočene larve vodozemaca, žabe i larve insekata, koji predstavljaju potencijalne predatore za analizirane račiće. Barica u blizini novoizgrađenog puta, iz koje su uzorkovani račići u martu 2013, formirana je nakon što se udubljenje koje su ostavili točkovi vozila ispunilo vodom. Ukupan broj račića prikupljen sa lokaliteta Crni Lug iznosi 92 jedinke (88 jedinki sa jajnim kesama i četiri mužjaka). Uzorkovane jedinke pripadaju adultima manjih i većih dimenzija, tj. pripadaju različitim uzrasnim kategorijama.

3.2. Preliminarna analiza uzorka radi taksonomske identifikacije vrste

Uzorkovanje je izvršeno ručnim mrežama (promer okca 150 µm za plankton i 1 mm za epibentos) i materijal je odmah fiksiran *in situ* u etanolu. Kod jedinki koje nisu dostigle kompletno razviće, mužjaci mogu biti slični ženkaama iste veličine. S obzirom na to, za morfološke analize su razmatrane jedinke dužine karapaksa 15 mm ili više (Lynch, 1972; Rogers, 2001). Pol je određen na osnovu prisustva jajnih kesama na jedanaestom paru torakopoda, odlike koja nedvosmisleno odvaja ženke (i hermafrodite) od mužjaka (Obregón-Barboza et al., 2007; Mathers et al., 2013). Jedinke su determinisane prema ključu koji su predložili Longhurst (1955a), Linder (1952), Lynch (1972) i Rogers (2001). Celokupan materijal nalazi se na Institutu za zoologiju, Biološkog fakulteta u Beogradu.

Za taksonomsku analizu je razmatrano pet mužjaka i 32 jedinke sa jajnim kesama sa lokaliteta Galovica. Sve jedinke pripadaju istoj grupi prema veličini tela. S obzirom da je pronađen mali broj mužjaka, i pošto se odlike mužjaka navode u literaturi prilikom opisa vrste, analizirane su morfološke karakteristike oba pola. Dobijeni podaci o mužjacima imaju pretežno opisnu ulogu i pružaju određeni uvid u odnos polova i polni dimorfizam proučavane populacije. Važni taksonomski karakteri proučeni kod oba pola, njihove oznake, tip karaktera i način kvantifikacije odabranih morfoloških odlika, prikazani su u Tabeli 3.

Tabela 3. Dijagnostički karakteri analizirani kod oba pola. Skraćenice: K – kontinuirani morfološki karakter (izmeren u mm); M – meristički morfološki karakter; O – odnos dva kontinuirana morfološka karaktera.

Oznake	Tip karaktera i način kvantifikacije
^{tot}L	Ukupna dužina tela, izmerena od prednje ivice karapaksa do kraja kaudalne lamine (bez cercopoda) – K
CL	Dužina karapaksa, izmerena od prednje do zadnje ivice karapaksa, duž središnje linije karapaksa – K
CW	Širina karapaksa, rastojanje između leve i desne ivice karapaksa, merena na najširem delu karapaksa – K
AL	Dužina abdomena, merena dorzalno, sredinom dela abdomena koji nije prekriven karapaksom, do kraja telzona (bez kaudalne lamine) – K
^{cl}L	Dužina kaudalne lamine, izmerena duž središnje linije, sa dorzalne strane – K
$^{cl}L/CL$	Odnos dužine kaudalne lamine i dužine karapaksa – O
AL/CL	Odnos dužine abdomena i dužine karapaksa – O
CL/CW	Odnos dužine i širine karapaksa – O
CL/ ^{tot}L	Odnos dužine karapaksa i ukupne dužine tela – O
PL	Ukupan broj parova ekstremiteta (filopodija) – M
PS	Broj prstenastih segmenata koji nisu prekriveni karapaksom – M
L_{lessS}	Broj prstenastih segmenata bez ekstremiteta – M

Boks dijagrami (engl. *boxplot*) ispitanih karaktera, grupisanih prema tipu karaktera, dobijeni su pomoću *boxplot* funkcije iz *base* R programskog paketa (verzija 4.1.0; R Core Team, 2021). Koeficijentni varijacije (CV), koji opisuju varijabilnost karaktera, su izračunati kao odnos standardne devijacije i srednje vrednosti svakog karaktera (odnosi su pomnoženi sa 100 kako bi se dobila vrednost u procentima). Takođe, proučeno je još nekoliko morfoloških karaktera vrste: ukupan broj prstenastih segmenata, broj, raspored i oblik bodlji na zadnjoj ivici karapaksa (žlebu (engl. *sulcus*), prema Rogers, 2001), i prisustvo ili odsustvo bodlji na dorzalnoj središnjoj liniji karapaksa (aramatura dorzalnog nabora karapaksa). Smatra se da oblik egzopodita prvog torakalnog ekstremiteta predstavlja važnu odliku za taksonomiju roda *Lepidurus* i da predstavlja jednu od odlika koja odvaja vrstu *L. couesii* od vrste *L. apus* (prema Brtek et al., 1984), ranije zabeležene na teritoriji Srbije (Petrov & Cvetković, 1997; Cvetković-Miličić & Petrov 1999; Lukić et al., 2012). U skladu sa tim, ispitan je oblik egzopodita prvog para torakopoda. Dodatno, određen je položaj nukalnog organa u odnosu na složene oči (Linder, 1952; Rogers, 2001).

Cele jedinice su fotografisane Sony DSC F828 fotoaparatom (rezolucija 8.0 MP; Sony Corp., Tokio, Japan). Linearne mere su dobijene pomoću digitalnih fotografija, u programu AxioVision SE64 Rel. 4.9.1 (ver. 4.2 za Windows, Carl Zeiss, Minhen, Nemačka). Za detaljnu morfološku analizu i prebrojavanje merističkih karaktera, korišćen je Nikon SMZ 1270 binokularni stereomikroskop za koji je prikačena Nikon DS-Fi2 kamera sa Nikon DS-L3 kontrolorom, kao i Carl Zeiss Stemi 2000 binokularni stereomikroskop, za koji je prikačena AxioCam MRc digitalna kamera. Deskriptivne statističke analize izvršene su u IBM SPSS programu.

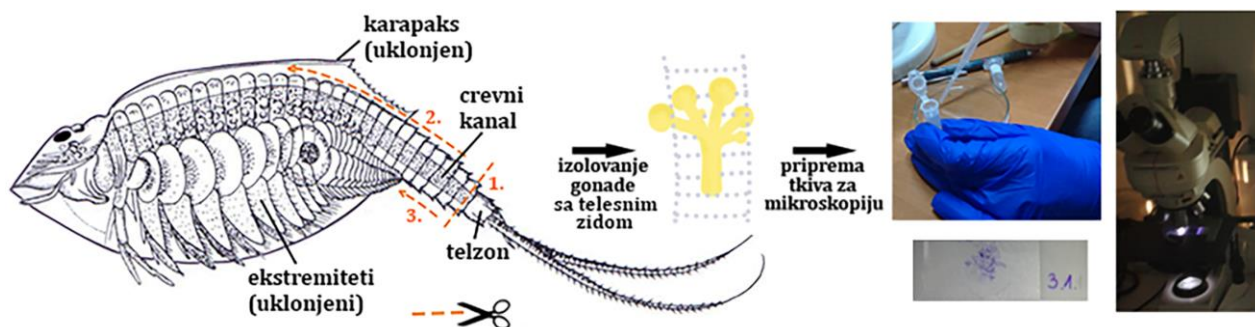
3.3. Histološke analize gonada

3.3.1. Određivanje pola jedinki prema spoljašnoj morfologiji

Kao što je navedeno, kao pogodan morfološki karakter za određivanje pola koristi se izgled jedanaestog para torakalnih ekstremiteta, tako da je utvrđeno prisustvo ili odsustvo jajne kese na ovim torakopodama (Engelmann et al., 1996). Nakon inspekcije jedinki (očuvanih u 70% alkoholu) pomoću binokularne lupe Nikon SMZ 745T, ukoliko je utvrđeno odsustvo jajne kese, pretpostavljeno je da je jedinka mužjak, dok je za jedinke koje imaju jajnu kesu pretpostavljeno da su ženke.

3.3.2. Disekcija i preparacija gonada za histološke analize

Kako bi se odredio pol jedinki, sprovedene su i histološke analize gonada. Disekcije su izvršene pomoću Carl Zeiss Stemi 2000 binokularnog stereomikroskopa, na jedinkama koje su odmah nakon uzorkovanja fiksirane u formalinu u trajanju od 24 časa. Nakon fiksacije, uzorci su isprani u česmenskoj vodi, a zatim dehidratirani u seriji etanola rastuće koncentracije, nakon čega su disekovani. U prvom koraku uklonjeni su karapaks i ekstremiteti, kako bi se lakše manipuliralo trupom jedinki. Zatim, prvim rezom je telzon odvojen od abdomena, čime je omogućeno da se napravi uzdužni rez duž dorzalne strane trupa, u prostoru između creva i telesnog zida jedinki (Slika 13). Crevni sadržaj je ispran kako bi se izbegla kontaminacija histološkog materijala. U sledećem koraku je napravljen uzdužni rez i duž ventralne strane trupa, što je omogućilo izolovanje lateralnog dela telesnog zida sa gonadom (Slika 13).



Slika 13. Šematski prikaz izolovanja gonade i pripreme tkiva za mikroskopiju, na primeru jedinke sa jajnim kesama. Crtež račića prema Sars (1896), izmenjeno.

Uzorci gonada su odmah po disekciji fiksirani u 2.5% glutaraldehidu, u 0.1 M fosfatnom puferu (pH = 7.2). Potom su usledila tri ispiranja u 0.05 M fosfatnom puferu, u trajanju od po 15 minuta. Gonade su zatim postfiksirane u 0.1% OsO₄. Nakon dva ispiranja u trajanju od po 15 minuta, usledila je dehidracija sprovođenjem tkiva kroz seriju etanola rastuće koncentracije (30%, 50% i 70%, po 20 minuta). Uzorci su do kalupljenja čuvani u frižideru.

Nakon opisanog postupka, uzorci su prvo dodatno dehidratirani u etanolu (96%, zatim 100% etanol, po 15 minuta) i zatim su rutinski ukalupljeni u Aralditu. Polutanki preseki gonada (2 μ m) sečeni su na Leica UC6 ultramikrotomu (Leica Microsystems) i obojeni toluidinom (rastvor 1% toluidin u 1% Na-tetraboratu), u trajanju od 30 sekundi na sobnoj temperaturi, a zatim su isprani česmenskom vodom. Nakon sušenja i dehidracije u seriji alkohola rastuće koncentracije i ksilola, preparati su montirani u DPX (DPX mountant for histology, Sigma). Fotografije su snimljene na svetlosnom mikroskopu Leica DMLB, opremljenim DFC295 kamerom (Leica Microsystems).

Ultratanki preseki (80–100 nm) dobijeni su korišćenjem Leica UC6 ultramikrotoma (Leica Microsystems). Montirani su na bakarne mrežice, a potom su analizirani i snimljeni na Philips CM12 transmissionom elektronskom mikroskopu (Philips/FEI, Eindhoven, The Netherlands), pri Centru za elektronsku mikroskopiju, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu.

Nakon fotografisanja, za morfometrijske analize, odnosno za merenja struktura na nivou tkiva i merenja ćelijskih kompartmenata na nivou ultrastrukture, korišćen je program ImageJ (1.53e) (Moreno, 2006).

3.4. Analize metodama geometrijske morfometrije

3.4.1. Morfološke strukture analizirane metodama geometrijske morfometrije

U ovoj disertaciji je korišćena geometrijska morfometrija kako bi se ispitaio obrazac variranja veličine i oblika dve morfološke celine – telzona sa kaudalnom laminom i karapaksa (Slike 3, 4). Smatra se da navedene strukture predstavljaju taksonomski važne i polno dimorfne morfološke karaktere (Linder, 1952; Longhurst, 1955a; Fryer, 1988; Šaganović et al., 2017).

Telzon je okarakterisan kao post-segmentna struktura i, kao što je ranije istaknuto, na njega se nastavlja kaudalna lamina koja je karakteristična samo za rod *Lepidurus* (Linder, 1952; Longhurst, 1955a). Ove dve strukture su snažno hitinizovane i samim tim nisu podložne značajnim promenama koje mogu da nastanu tokom stajanja u fiksativu (Linder, 1952). Na telzonu se nalaze raspoređene bodlje („armatura telzona“) koje u nekim slučajevima mogu da se koriste za razlikovanje vrsta (npr. Zierold, 2006; Meusel & Schwentner, 2016). Takođe, na dorzalnoj strani telzona su prisutna dva otvora, okružena sitnim bodljama, kroz koje se pružaju senzorne sete (Longhurst, 1955a). Slično, raspored, veličina i broj bodlji na dorzalnoj strani kaudalne lamine mogu da se koriste za opisivanje vrsta (Linder, 1952). Kaudalna lamina je oduvek bila predmet detaljnog proučavanja, pogotovo kao važan morfološki karakter za klasifikaciju vrsta roda *Lepidurus* (pregledno u Rogers, 2001). Međutim, kako je Linder (1952) naveo, pouzdanost ovog karaktera je ograničena karakteristikama oblika, s obzirom na uočeno intraspecijsko variranje oblika. Morfometrijske analize se tradicionalno zasnivaju na podacima o dužini kaudalne lamine, dok je oblik razmatran jedino opisno (npr. Rogers, 2001). Funkcija kaudalne lamine nije potpuno ispitana. Fryer (1988) je naveo da je zaštitna uloga malo verovatna i da, kao struktura na posteriornom delu tela („repu“), kaudalna lamina verovatno ima ulogu u efikasnoj pokretljivosti i hidrodinamičnom kretanju.

Karapaks *Notostraca* prekriva veći deo tela račića i u literaturi je opisan kao „karapaks u obliku štita“ (Longhurst, 1955a, c) i „karapaks kupolastog oblika“ ili „tanjirast karapaks“ (Fryer, 1988). Smatra se da su funkcije karapaksa višestruke, pre svega pružanje zaštite čitavom telu i listolikim ekstremitetima (Olesen, 2013). Takođe, zaravnjen karapaks, koji formira kontinuitet sa kutikulom glavenog regiona, omogućava hidrodinamično plivanje (Fryer, 1988; Lakka, 2013; 2015; Olesen, 2013). Ovakav oblik donosi pogodnosti i zaštitu i tokom bentosnog načina života i pomaže pri zakopavanju jedinki u podlogu vodenog basena (Fryer, 1988; Olesen, 2013). Iako su oblik i veličina karapaksa oduvek korišćeni kao taksonomski karakteri, kvantifikacija oblika se uglavnom zasniva na merenju dužine i širine karapaksa, kao i površine izračunate pomoću određene formule (Longhurst, 1955a; Lakka, 2015; Rogers, 2001). Smatra se da oblik i veličina karapaksa zavise od pola jedinki i od broja segmenata karakterističnog za populaciju, odnosno od toga da li se razmatraju populacije jedinki sa kraćim ili dužim telom (Longhurst, 1955a).

3.4.2. Geometrijska morfometrija

Analize oblika morfoloških struktura mogu da doprinesu razumevanju različitih bioloških procesa koji dovode do morfološkog variranja (Zelditch et al., 2012). Morfometrija je suštinski grana statistike i bavi se matematičkom analizom oblika. Međutim, morfometrija može uspešno da se primenjuje i u morfologiji, kako bi se promene oblika i veličine morfoloških celina kvantitativno opisale (Klingenberg, 2002; Zelditch et al., 2012). U tradicionalnim morfometrijskim analizama se koriste linearna rastojanja između diskretnih, jasno definisanih anatomskih tačaka – specifičnih tačaka, odnosno dužina, širina, visina, kao i odnosi ovih mera ili uglovi i površine (Zelditch et al., 2012; Ivanović & Kalezić, 2013). Međutim, primenom tradicionalne morfometrije oblik ne može uvek jasno da se opiše – npr. dve morfološke strukture različitog oblika mogu da imaju iste vrednosti dužine i širine (Ivanović & Kalezić, 2013; Berns, 2013). Geometrijskom analizom oblika moguće je preciznije sagledavanje finih razlika u obliku (Klingenberg, 2002). Na ovaj način, često mogu da se otkriju do tada neuočeni aspekti morfološkog variranja (Gidaszewski et al., 2009; Minton & Wang, 2011; Kelly, 2015; Fernández-Montraveta & Marugán-Lobón, 2017).

Geometrijska morfometrija (GM) se primenjuje u različitim biološkim disciplinama i predstavlja skup nekoliko pristupa koji se zasnivaju na očuvanju geometrijske informacije (Mitteroecker & Gunz, 2009). Najčešće korišćen pristup se bazira na upotrebi konfiguracija specifičnih tačaka, gde je informacija o obliku sadržana u koordinatama i rasporedu svih specifičnih tačaka. Oblik se definiše kao geometrijska informacija objekta koja ostaje nakon što se uklone efekti položaja, veličine i orijentacije (Kendall, 1977). Iz navedene precizne definicije proizilazi da je primenom geometrijskog pristupa izučavanju oblika moguće zasebno izučavanje veličine i oblika određene morfološke strukture. Međutim, i dalje je moguće utvrđivanje veze između veličine i oblika, odnosno određivanje alometrijske i nealometrijske komponente promene oblika. Kako bi se geometrijska veličina kvantifikovala, koristi se veličina centroida (engl. *centroid size*, CS). Matematički se veličina centroida izračunava kao kvadratni koren sume kvadriranih distanci svake specifične tačke od centroida, tj. središta konfiguracije (Bookstein, 1991; Mitteroecker & Gunz, 2009; Zelditch et al., 2012; Mitteroecker et al., 2013). Varijable oblika jedinki se dobijaju nakon što se na konfiguracije specifičnih tačaka primeni generalizovana Prokrustova superimpozicija (engl. *Generalized Procrustes Analysis*, GPA). Ova procedura predstavlja najčešće primenjivan metod eliminisanja svih osobina iz uzorka koje nisu u vezi sa oblikom. Prokrustovom analizom se translacijom, skaliranjem i rotacijom uklanjaju razlike u poziciji, veličini i orijentaciji konfiguracija (Rohlf & Slice, 1990; Goodall, 1991; Dryden & Mardia, 1998; Adams et al., 2004; Mitteroecker & Gunz, 2009; Zelditch et al., 2012). Koraci GPA se ponavljaju u nekoliko ciklusa, dok se ne postigne superimpozicija konfiguracija koja ostvaruje najmanje variranje konfiguracija oko ocenjene srednje vrednosti konfiguracija. Dobijene Prokrustove koordinate specifičnih tačaka predstavljaju polazne podatke koji mogu da se koriste u multivarijantnim statističkim analizama variranja oblika (Dryden & Mardia, 1998; Klingenberg, 2002; Ivanović & Kalezić, 2013). Kao osnovna mera razlika u obliku koristi se Prokrustova distanca, koja približno predstavlja Euklidove distance između dve konfiguracije tačaka, tj. između odgovarajućih Prokrustovih koordinata tačaka (Gunz & Mitteroecker, 2013; Ivanović & Kalezić, 2013; Mitteroecker et al., 2013). Razlike u obliku mogu da se kvantifikuju i izračunavanjem energije potrebne za deformaciju idealno tanke metalne ploče (engl. *thin plate spline*, TPS), koja takođe omogućava vizualizaciju promena oblika (Bookstein, 1991; Zelditch et al., 2012; Ivanović & Kalezić, 2013).

Metode geometrijske morfometrije su naročito korisne s obzirom na mogućnost da se promene oblika vizuelno prikažu i na taj način intuitivno približe istraživaču i pomognu u otkrivanju i razumevanju faktora koji utiču na morfološko variranje (Adams et al., 2004;

Klingenberg, 2013). Obrasci promena oblika, tj. otkrivanje u kom pravcu se određene specifične tačke pomeraju, kao i u kojim delovima morfološke strukture su promene izraženije, predstavljaju korisne informacije o mehanizmima koji stoje u osnovi tih promena (Klingenberg, 2002).

3.4.3. Prokrustova analiza oblika bilateralno simetričnih morfoloških struktura

Ukoliko je objekat istraživanja bilateralno simetričan, možemo da govorimo o dva osnovna tipa simetrije – preklapajuća simetrija (engl. *matching symmetry*) i simetrija objekta (engl. *object symmetry*) (Mardia et al., 2000; Klingenberg et al., 2002; Zelditch et al., 2012). Preklapajuća simetrija se odnosi na postojanje dve zasebne strukture, sa leve i desne strane dela tela (npr. trupa), koje su orijentisane tako da je jedna struktura kao odraz u ogledalu druge strukture. Simetriju objekta karakteriše osa simetrije koja prolazi kroz samu strukturu, tako da je jedna polovina strukture kao odraz u ogledalu druge polovine.

Ukupno variranje oblika bilateralno simetričnih morfoloških struktura može da se razdvoji na simetričnu i asimetričnu komponentu, sa određenim razlikama u procesu identifikovanja ovih komponenti u zavisnosti od tipa simetrije (Klingenberg et al., 2002; Zelditch et al., 2012). Generalno, simetrična komponenta se odnosi na variranje između jedinki, tj. na međuindividualno variranje srednjih vrednosti osobina sa leve i desne strane, dok se asimetrija odnosi na razlike leve i desne strane svake jedinke (Klingenberg et al., 2002). U slučaju preklapajuće simetrije, pre superimpozicije je potrebno reflektovati sve konfiguracije sa jedne strane tela na konfiguracije na suprotnoj strani. Nakon toga, simetrična komponenta se kvantifikuje kao variranje između jedinki u srednjim vrednostima konfiguracija sa leve i desne strane, dok asimetrična komponenta razmatra variranje između levih i desnih konfiguracija svake jedinke. Kada morfološku strukturu odlikuje simetrija objekta, za svaku jedinku postoji samo jedna konfiguracija koja se razmatra. Prvobitno se od originalnih konfiguracija generišu reflektovane konfiguracije i one se takođe uključuju u proces superimpozicije (Mardia et al., 2000; Klingenberg et al., 2002). Simetrična komponenta se određuje kao variranje prosečnih simetričnih konfiguracija između jedinki, koje se dobijaju kao konsenzus konfiguracije originalnih i reflektovanih konfiguracija za svaku jedinku. Asimetrična komponenta variranja kvantifikuje razlike između originalnih i prosečnih konfiguracija jedinki. Ukoliko je predmet studije razmatranje međuindividualnog variranja u obliku, u analizama se koristi simetrična komponenta variranja.

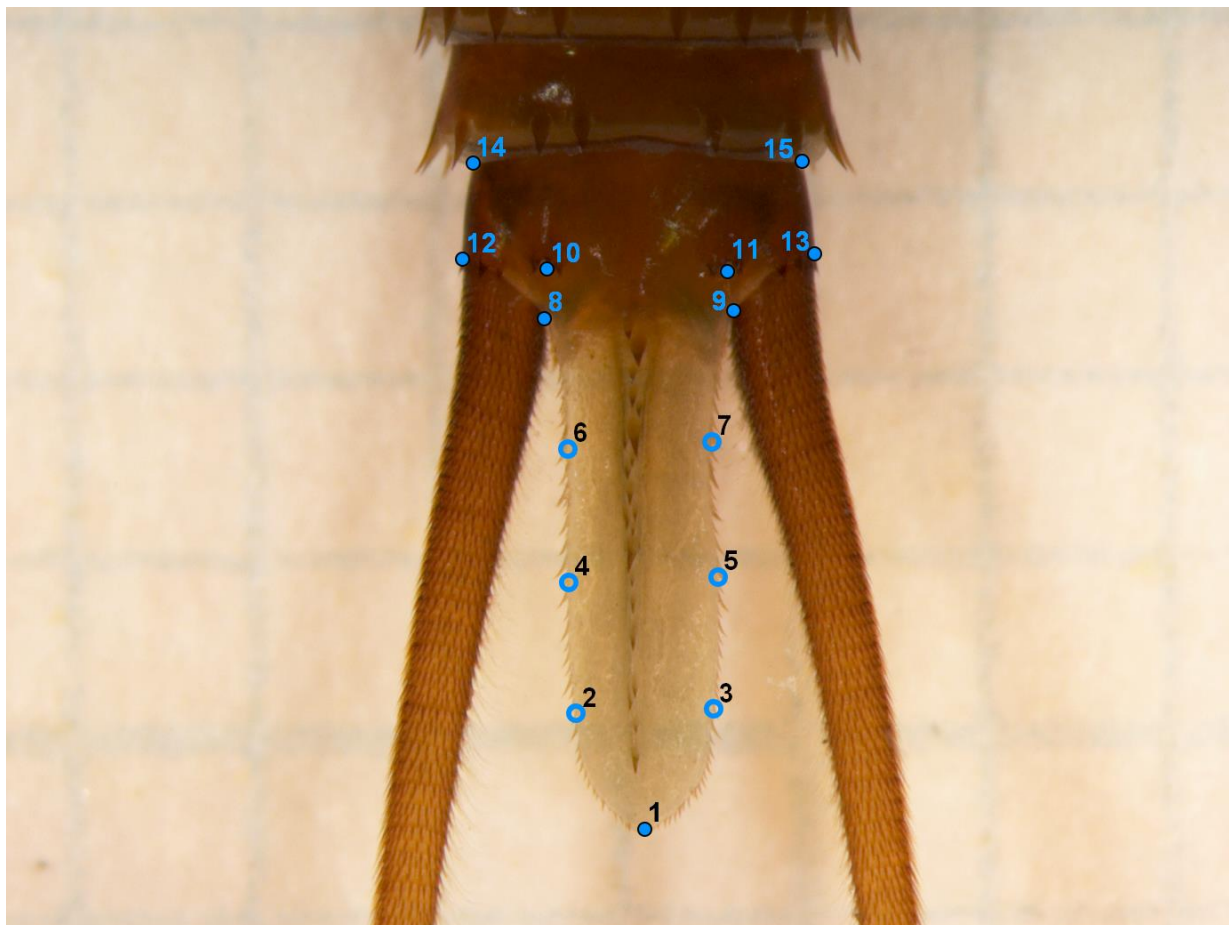
3.5. Prikupljanje podataka za analize metodama geometrijske morfometrije

3.5.1. Telzon sa kaudalnom laminom

Telzon i kaudalna lamina su fotografisani pomoću Carl Zeiss Stemi 2000 binokularnog stereomikroskopa, za koji je prikačena AxioCam MRc digitalna kamera. Jedinke su položene u Petrijevu posudu ispunjenu 70% etanolom. Kako bi se analizirane strukture optimalno postavile, posteriorni deo abdomena je izdignut i pozicioniran na parče plastelina koji je prekriven milimetarskim papirom. S obzirom da su telzon i kaudalna lamina snažno hitinizovani, strukture su dobro očuvane i iz analiza su isključene jedino jedinke sa vidljivim anomalijama, jedinke kod kojih karapaks prekriva deo telzona ili ukoliko su strukture slučajno oštećene tokom rada. Svim jedinkama je određen pol i adekvatno obeležen lokalitet sa kog su uzorkovane, kao i datum uzorkovanja (Prilog Tabela 1). Kao što je već navedeno,

pretpostavljeno je da su jedinke koje imaju jajne kese na jedanaestom paru torakopoda ženke, dok su jedinke bez jajnih kesa označene kao mužjaci.

Za potrebe analize morfološkog variranja i alometrijskih odnosa, odabran je uzorak od ukupno 131 jedinke (122 ženke i devet mužjaka). Kako bi se procenio efekat ontogenetske alometrije na promene oblika, uključene su jedinke različitih dimenzija (uzrasnih kategorija). Oblik telzona i kaudalne lamine je opisan pomoću devet specifičnih tačaka i šest polutačaka (Slika 14).



Slika 14. Konfiguracija specifičnih tačaka i polutačaka koje opisuju oblik telzona i kaudalne lamine. Specifične tačke su predstavljene punim simbolom, dok polutačke opisuju konture kaudalne lamine i obeležene su praznim simbolom.

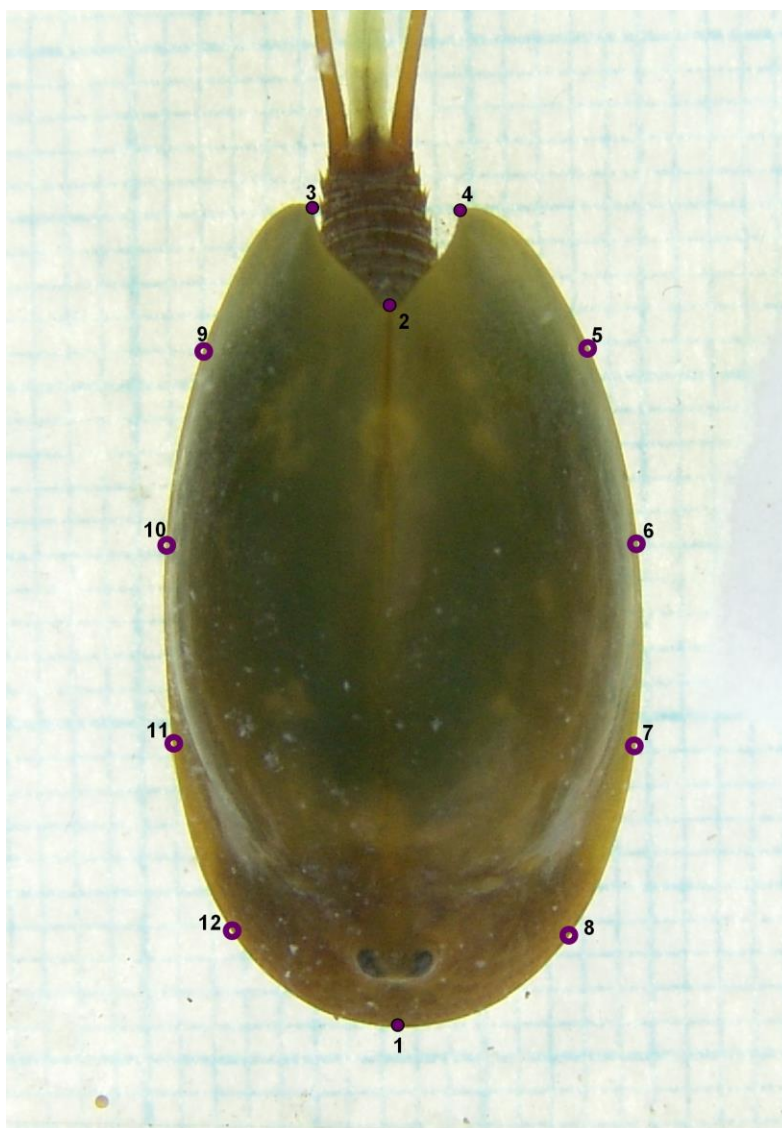
Specifične tačke (engl. *landmarks*) odgovaraju jasno definisanim, idealno homologim, anatomskim tačkama objekta (Bookstein, 1991; Zelditch et al., 2012). Međutim, često je neophodno da se koriste i polutačke (engl. *semilandmarks*) koje opisuju geometrijske karakteristike kao što su krive, konture i površine (Bookstein, 1991, 1997). Polutačke ne predstavljaju jasno definisane ni homologe tačke, već opisuju homologe krive (Zelditch et al., 2012; Gunz & Mitteroecker, 2013). Sam položaj polutačaka je arbitraran i ne pruža informacije o obliku, tako da je prema definiciji informacije o položaju potrebno eliminisati (Zelditch et al., 2012). Na svaku krivu (ili površinu) se raspoređuje isti broj polutačaka, na približno jednake udaljenosti, i tokom GPA specifične tačke ostaju „fiksirane“ (engl. „*fixed landmarks*“), dok polutačke mogu da se pomeraju duž tangenti na krivu (engl. „*sliding semilandmarks*“) (detaljno u Gunz & Mitteroecker, 2013). Na opisan način, polutačke zauzimaju optimalan raspored i po završetku GPA postaju ravnopravne sa specifičnim tačkama i zajedno opisuju oblik morfoloških struktura (Zelditch et al., 2012; Gunz & Mitteroecker, 2013).

Na fotografije je postavljeno devet dvodimenzionalnih specifičnih tačaka pomoću tpsDig2 softvera (Rohlf, 2006). Specifične tačke su odabrane kao jasno definisane pozicije na analiziranoj strukturi, koje mogu precizno da se identifikuju kod svih jedinki u uzorku. Specifična tačka 1 je postavljena na vrh kaudalne lamine, dok su tačke 8–15 postavljene na telzon i opisuju: 8 i 9 – mesta spajanja početka kaudalne lamine i kaudalne furke; 10 i 11 – otvore kroz koje prolaze senzorne sete; 12 i 13 – mesto spajanja najlateralnije tačke posteriorne ivice telzona i kaudalne furke (postavljene u osnovi bodlje); 14 i 15 – najlateralnije tačke anteriorne ivice telzona (Slika 14). Polutačke 2–7 su pozicionirane korišćenjem programa IMP serije – MakeFan8 (Sheets, 2014), pomoću kog su polutačke raspoređene na spoljašnje ivice kaudalne lamine, na približno jednaka rastojanja. Za svaku fotografiju je podešen faktor skaliranja (engl. *scale factor*) u tpsDig2 softveru, čime je omogućeno da se konfiguracije u narednim koracima reskaliraju (množenjem koordinata tačaka faktorom skaliranja) i izračuna veličina centroida (CS) (Adams et al., 2021a).

3.5.2. Karapaks

Kako bi se fotografisali karapaksi, jedinke su položene u dublju staklenu posudu koja je ispunjena 70% etanolom i postavljena na milimetarski papir. Digitalne fotografije su dobijene pomoću Sony DSC F828 fotoaparata (rezolucija 8.0 MP; Sony Corp., Tokio, Japan), koji je postavljen na metalni nosač i upravljen iznad staklene posude sa analiziranim objektom. Iako fiksativ nije uticao na samu dužinu karapaksa, spoljašnje ivice karapaksa, kao slabije hitinizovane, su bile delimično deformisane kod mnogih jedinki. Samim tim, uveliko je smanjen raspoloživ uzorak za analize. Ukupno je odabrano 82 jedinke (75 ženki i sedam mužjaka). U analize su takođe uključene jedinke različitih uzrasnih kategorija (dimenzija), uzorkovanih sa lokaliteta Crni Lug, kako bi se procenio uticaj ontogenetske alometrije na promene oblika (procenjen na uzorku ženki). Detaljan pregled uzorka korišćenog za analize morfološkog variranja karapaksa dat je u Prilog Tabeli 2.

Koristeći digitalne fotografije karapaksa, pomoću tpsDig2 softvera (Rohlf, 2006) je pozicionirano četiri jasno definisane dvodimenzionalne specifične tačke, kao i osam polutačaka (Slika 15). Specifična tačka 1 je pozicionirana na sredinu anteriornog dela glavenog regiona, dok su tačke 2–4 postavljene na završnim tačkama posterionog dela karapaksa: 2 – posteriorni kraj dorzalne medijalne linije karapaksa; 3 i 4 – simetrične tačke posteriorne ivice karapaksa (Slika 15). Da bi se tačka 1 što preciznije postavila, sredinom karapaksa je povučena pomoćna linija koja ide od mesta na kom je postavljena tačka 2, kroz središte nukalnog organa i između složenih očiju. Na mestu preseka linije sa anteriornom ivicom glavenog regiona postavljena je prva specifična tačka. Za precizniju karakterizaciju oblika, postavljeno je po četiri polutačke na lateralnim ivicama karapaksa (polutačke 5–12). Položaj polutačaka je takođe određen u softveru tpsDig2, primenom alatke koja služi sa ocrtavanje krivih („žuta olovka” na traci sa alatkama). Polutačke su raspoređene na aproksimativno jednake udaljenosti i zajedno sa četiri specifične tačke opisuju oblik karapaksa (Slika 15). Kako bi se geometrijska veličina karapaksa kvantifikovala kao veličina centroida (CS), svim fotografijama je određen faktor skaliranja.



Slika 15. Konfiguracija specifičnih tačaka i polutačaka koje opisuju oblik karapaksa. Specifične tačke su predstavljene punim simbolom, dok polutačke opisuju konture karapaksa i obeležene su praznim simbolom.

3.5.3. Veličina (dimenzije) jedinki

Tokom adultnog perioda života, račići iz grupe Notostraca rastu i prolaze kroz nekoliko presvlačenja (Fryer, 1988; Obregon-Barboza et al., 2001). Nakon pribavljanja uzoraka, često se dešava da su jedinke različite veličine. Kako je Longhurst (1955a) naveo, utvrđivanje tipične veličine adultnih jedinki nije jednostavno. Rogers (2001) je prijavio da adulti vrste *L. couesii* mogu da budu dugački 10–70 mm, mereno od anteriorne ivice karapaksa do vrha kaudalne lamine. Međutim, druga poteškoća na koju nailaze istraživači je optimalno utvrđivanje veličine jedinki. Iako se ukupna dužina tela koristi kao deskriptivna mera veličine (Rogers, 2001; Zierold, 2006; Lakka, 2015; Šaganović et al., 2017), ovaj morfološki karakter je nepouzdan zbog varijabilne dužine dela trupa koji nije prekriven karapaksom. Tokom čuvanja jedinki u fiksativu, segmenti se skupljaju i opuštaju, ili ponekad savijaju i deformišu (Longhurst, 1955a; Lynch, 1972; lična zapažanja). Kao pouzdanija mera veličine jedinki navodi se dužina karapaksa (Longhurst, 1955a; Takahashi, 1977; Zierold, 2006) ili minimalna širina telzona (Korn et al., 2010). Tokom rasta jedinki, karapaks se izdužuje (Hamer & Appleton, 1991; Obregon-Barboza et al., 2001; Harings, 2008) i smatra se da je rast karapaksa

izometrijski (ispitano na rodu *Triops*), odnosno da se odnos dužine karapaksa i dužine tela ne menja tokom rasta jedinki (Longhurst, 1955a). Korn et al. (2010) su predložili alternativni način predstavljanja veličine jedinki. Na primeru vrste *Triops mauritanicus* utvrđen je izometrijski rast širine anteriorne ivice telzona (minimalna širina telzona) i dužine karapaksa. Preliminarna analiza na delu uzorka ženki prikupljenih sa lokaliteta Crni Lug je takođe ukazala na izometrijski rast ova dva morfološka karaktera (koeficijent alometrije, $k = 1.047$). Grafik zavisnosti (prirodno) logaritmovanih vrednosti širine telzona i dužine karapaksa ukazuje na snažnu linearnu vezu (Prilog Slika 1). Međutim, ne postoji način da se klasifikuju adultne jedinke prikupljene sa ovog lokaliteta, npr. prema određenom stadijumu razvića. Svaka podela bi bila arbitrarna i verovatno bi bila otežana čak i u uslovima gajenja, koje je obično teško održivo (npr. Harings, 2008). Dužina karapaksa, ali i širina telzona, su snažno pozitivno korelisani sa dužinom telzona sa kaudalnom laminom (mereno od vrha kaudalne lamine, sredinom strukture, do anteriorne ivice telzona) (Prilog Tabela 3). To znači da se tokom rasta jedinki, koristeći dužinu karapaksa ili širinu telzona kao meru veličine, telzon sa kaudalnom laminom kod ispitivane vrste izdužuje. S obzirom da je veličina centroida (CS) karapaksa i telzona sa kaudalnom laminom prirodno snažno korelisana sa dužinom ovih struktura, opravdano je da govorimo o jedinkama koje imaju manje vrednosti CS analiziranih struktura kao o manjim jedinkama u uzorku, i obratno, odnosno o mlađim i starijim uzrasnim kategorijama. Pretpostavlja se da su slični obrasci rasta prisutni i kod mužjaka.

3.6. Priprema podataka, statističke analize i dizajn linearnih modela

Pripremni koraci, multivarijantne statističke analize i grafičko predstavljanje rezultata izvršeni su korišćenjem R programskog jezika, verzija 4.1.0 (R Core Team, 2021). Softverski paket u kom je izvedena većina procedura je *geomorph*, verzija 4.0.0 (Baken et al., 2021; Adams et al., 2021b). Ovaj paket je opremljen funkcijama koje omogućavaju izvršenje svih koraka u GM analizama oblika, počev od digitalizacije 2D/3D tačaka i polutačaka, učitavanja podataka, izdvajanja varijabli oblika, statističkih analiza i grafičkog predstavljanja rezultata (Adams et al., 2021a). Takođe, od *geomorph* verzije 3.1.0, određene funkcije su „omotač” (engl. „wrapper”) za funkcije iz softverskog paketa *RRPP* (engl. *Randomization of Residuals in a Permutation Procedure*) (Collyer & Adams, 2018, 2021), koji je takođe korišćen u analizama (*RRPP*, verzija 1.0.0). Pored *geomorph* paketa, za generisanje grafika je korišćen i *ggplot2* softverski paket, verzija 3.3.5 (Wickham, 2016).

Kao što je ranije navedno, prvi korak bilo koje analize predstavlja generalizovana Prokrustova superimpozicija. S obzirom da su za opisivanje oblika obe strukture korišćene i polutačke, upotrebljena je interaktivna funkcija *define.sliders* iz *geomorph* paketa, pomoću koje je definisano koje tačke mogu da „klize” tokom superimpozicije, kao i između koje dve (polu)tačke se svaka polutačka nalazi. U zavisnosti od načina kvantifikovanja razlika u obliku, superimpozicija može da se odvija na dva različita načina kada su u postupak uključene i polutačke (Gunz & Mitteroecker, 2013). Pronalaženje optimalnog položaja polutačaka može da se zasniva na minimiziranju energija deformacija između svih konfiguracija i ocenjene srednje vrednosti konfiguracija ili na minimiziranju Prokrustovih distanci (detaljno u Gunz & Mitteroecker, 2013). U slučaju analiziranih struktura, kao kriterijum je odabrana energija deformacija i GPA je izvršena pomoću *gpagen* funkcije iz *geomorph* paketa. Jedna od vrednosti koja se dobija primenom ove funkcije je vektor veličine centroida za sve jedinke. Kao mera veličine, u svim analizama je korišćen prirodni logaritam veličine centroida ($\log CS$). S obzirom da su obe analizirane morfološke strukture bilateralno simetrične, simetrična komponenta oblika je kvantifikovana primenom *bilat.symmetry* funkcije iz *geomorph* paketa i korišćena je u svim analizama.

Variranje u veličini analiziranih struktura za ženke i mužjake sa dva lokaliteta predstavljeno je pomoću boks dijagrama (engl. *boxplot*), primenom *ggplot* funkcije iz *ggplot2* paketa. Kako bi se procenio koeficijent alometrije (k – nagib alometrijske prave) odnosa širine telzona i dužine karapaksa na delu uzorka ženki, konstruisan je linearni model pomoću *lm* funkcije iz *base R* paketa. Dužina karapaksa i minimalna širina telzona su pribavljene primenom *interlmdist* funkcije iz *geomorph* paketa. Funkcija je izračunala rastojanje između specifičnih tačaka 1 i 2 karapaksa, i specifičnih tačaka 14 i 15 telzona. Koeficijenti korelacija su procenjeni pomoću *cor.test* funkcije iz *base R* paketa.

S obzirom na spomenute razlike u veličini u celokupnom uzorku, potrebno je da se efekat veličine ukloni iz analiza. Međutim, procena kovariranja veličine i oblika, odnosno procena efekta alometrije, je veoma važan aspekt svake analize. Zbog malog broja prikupljenih mužjaka, sve statističke analize su izvršene jedino na ženkama. Polni dimorfizam u obliku, kao i alometrijski obrasci promena oblika karakteristični za mužjake, procenjeni su jedino na osnovu grafičkih prikaza i trebalo bi ih smatrati preliminarnim rezultatima. Kao početna analiza, kako bi se ispitalo ukupno variranje u kompletnom uzorku, izvršena je analiza glavnih komponenti varijabli oblika (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) pomoću *gm.prcomp* funkcije iz *geomorph* paketa. Grafički prikaz rasporeda jedinki u morfološkom prostoru određenom prvom i drugom PC osom generisan je primenom *ggplot* funkcije. Kovariranje veličine i simetrične komponente oblika za sve četiri grupe (Galovica ženke, Galovica mužjaci, Crni Lug ženke i Crni Lug mužjaci) procenjena je definisanjem linearnog modela pomoću *procD.lm* funkcije iz *geomorph* paketa. Ova funkcija je primenjena samo kako bi se vizualizovala zavisnost logaritmovane veličine centroida, kao mere veličine, i PC1 ose predviđenih (fitovanih) vrednosti varijabli oblika. Grafik je generisan pomoću *plot* funkcije iz *base R* paketa. Takođe, na uzorku ženki, analiza glavnih komponenti je primenjena i na rezidualne linearnog modela koji opisuje promene oblika zavisne od promene veličine analiziranih struktura (bez uključenih faktora), odnosno na podatke koji su korigovani za alometriju. Grafik ove PCA analize je dobijen pomoću *ggplot* funkcije i prikazuje raspored dve grupe ženki u morfološkom prostoru definisanom sa prve dve glavne komponente.

Za statističku procenu analiziranih obrazaca variranja i kovariranja oblika u uzorku ženki, upotrebljena je *procD.lm* funkcija. Ova funkcija vrši Prokrustovu analizu varijanse (Prokrustova ANOVA), koja prema načinu na koji se izvodi predstavlja neparametrijsku multivarijantnu analizu varijanse (np-MANOVA) (Collyer et al., 2015; Adams et al., 2021a). Definisanjem linearnih modela (LM) pomoću *procD.lm* funkcije, ocenjuju se parametri LM i vrši np-MANOVA sa randomizacijom reziduala u permutacionom procesu (RRPP) za procenu statističke značajnosti (Collyer et al., 2015). Funkcija vrši randomizaciju rezidualnih vrednosti varijabli oblika redukovano (engl. *reduced*) LM (koji predstavlja nulti LM) kako bi se generisala empirijska distribucija verovatnoće na osnovu koje se određuje statistička značajnost dela variranja koje se objašnjava faktorom (ili faktorima) iz punog (engl. *full*) modela (detaljno u Collyer et al., 2015). Pokazano je da ovakav pristup ima veću statističku moć u proceni značajnosti kada je u linearni model uključeno dva ili više faktora (Anderson & terBraak, 2003; Adams et al., 2021a). S obzirom da su jedinice sa lokaliteta Crni Lug uzorkovane u više navrata, definisanjem linearnog modela u kom je datum uzorkovanja modelovan kao slučajni faktor, ispitan je efekat ovog faktora na variranje oblika obe analizirane strukture. Pošto ovi preliminarni modeli nisu pokazali statistički ili biološki značajan rezultat (videti odeljak 4.5.1. i odeljak 4.5.3, Rezultati), sve jedinice uzorkovane različitih godina su spojene u jedinstven uzorak Crni Lug.

Kako bi se ispitali alometrijski obrasci promena oblika u uzorku ženki, i efekat lokaliteta (populacije) na ove promene, definisano je više linearnih modela za izvođenje np-MANOVA, koristeći RRPP sa 999 ponavljanja (Adams et al., 2021a). Prvobitno se definiše

model prema formuli **Oblik ~ log CS * faktor**, koji može da se razloži na: $\text{Oblik} \sim \log \text{CS} + \text{faktor} + \log \text{CS}:\text{faktor}$, kako bi se prvo ispitala statistička značajnost interakcije ($\log \text{CS}:\text{faktor}$), odnosno da li postoji razlika u kovariranju oblika i veličine između nivoa faktora. Ovakav model može da se uporedi sa redukovanim modelom tipa **Oblik ~ log CS**, koji ne uključuje faktor. Ukoliko je interakcija statistički značajna, prvi LM se poredi sa redukovanim modelom tipa **Oblik ~ log CS + faktor**, koji ne uključuje član interakcije. Na ovaj način se testira homogenost alometrijskih prava, odnosno da li se prave razlikuju u nagibima (engl. *slope*). Poređenje bilo kod broja modela, kao i izračunavanje ANOVA (analiza varijanse) tabela za svaki model, omogućeno je primenom *anova.lm.rppp* funkcije *RRPP* paketa. Nakon odabira adekvatnog LM, alometrijski obrasci promena oblika za ženke su grafički prikazani pomoću *plotAllometry* funkcije iz *geomorph* R paketa. Ova funkcija računa zajedničku alometrijsku komponentu grupa (engl. *common allometric component, CAC*), tj. ocenjuje zajednički unutargrupni trend alometrije (Mitteroecker et al., 2004; Adams et al., 2013). Kako bi se zatim odredile razlike u obliku između ženki iz dve populacije (sa dva lokaliteta), primenjena je *pairwise* funkcija iz *RRPP* paketa. Ova funkcija računa Prokrustove distance između ocenjenih srednjih vrednosti oblika grupa jedinki (engl. *least squares (LS) means*), odnosno koriguje za efekat alometrije, ili pak određuje karakteristike alometrijskih vektora (korelisanost, razlike u dužini i udaljenost). Primenom *summary.pairwise* funkcije dobijaju se informacije o odabranoj *pairwise* statistici (distanci – videti rezultate) i statističkoj značajnosti. Za sve statističke testove vrednost α je podešena na 0.05, dok je biološki značaj efekta u modelu procenjen razmatrajući veličine efekta (R^2 i Z vrednosti). Efekat je označen kao biološki značajan ukoliko opisuje dovoljno velik deo ukupnog variranja oblika ($R^2 > 0.05$).

Vizualizacija promena oblika između konsenzus konfiguracije i oblika koji odgovaraju ekstremnim vrednostima na PC osama, alometrijskih promena oblika, i promena oblika između polova, izvršena je pomoću *geomorph* funkcija *mshape*, *shape.predictor* i *plotRefToTarget*. Deformacije mreže (TPS) su generisane pomoću *plotRefToTarget* funkcije. Kako bi se optimalnije prikazale promene oblika, definisane su i konture oblika (engl. *wireframe*) pomoću *geomorph* funkcije *define.links*.

3.7. Definisane i analiza razvojnih anomalija

Proučene su sve morfološke i strukturne promene, kao i deformiteti karakteristika koje su zajedničke za oba pola, kao i polno dimorfni odlika (Šaganović et al., 2017). Takođe, sa ventralne strane abdomena, pregledani su i prebrojani prstenasti segmenti bez ekstremiteta (nomenklatura prema Longhurst, 1955a). Procenjen je i istražen i spiralan rast prstenastih segmenata (prema Linder, 1952). Karakteristični primeri odstupanja od građe i anomalije, uključujući i spiralan rast, fotografisani su ili ilustrovani crtežom. Primeri anomalija koje nastaju tokom razvića abdomena, predstavljeni su formulom (F) koju je predložio Linder (1952): broj torakalnih ekstremiteta (uvek iznosi 11) + broj abdominalnih prstenastih segmenata sa ekstremitetima + broj prstenastih segmenata bez ekstremiteta + nepotpuni abdominalni prstenasti segmenti (i) ili spiralan rast (sp), predstavljen brojem krugova koje opisuju prstenasti segmenti (r). Takođe, određena je i orijentacija spiralnog rasta abdominalnih prstenastih segmenata oko longitudinalne (uzdužne) ose tela (desnogiri – R/levogiri – L).

Jedinke iz uzorka su analizirane i sa aspekta kvalitativnih promena različitih delova tela (fizičke deformacije, ozlede, lezije, promene boje tela itd.) i drugih anomalija različitog porekla i uzroka. Pregledan je karapaks, dorzalna središnja linija karapaksa, telzon sa kaudalnom laminom (prema Rogers, 2001/supra-analna ploča, prema Linder, 1952), kao i cercopodije na distalnom delu tela.

4. Rezultati

4.1. Taksonomska identifikacija vrste

Podaci o vrsti *L. couesii* iz Srbije dobijeni su analizom nekoliko važnih taksonomskih karaktera. Analiza je izvršena na delu uzorka poreklom sa lokaliteta Galovica. Broj ženki (jedinki sa jajnim kesama) u Galovica populaciji bio je daleko veći od broja mužjaka. Srednji odnos broja mužjaka i ženki iznosi oko 1:25, tj. mužjaci čine 3.94% populacije. Na staništu su pronađeni i drugi beskičmenjaci – kladocere, kopepode, ostrakode, puževi, larve insekata i slatkovodne hidre.

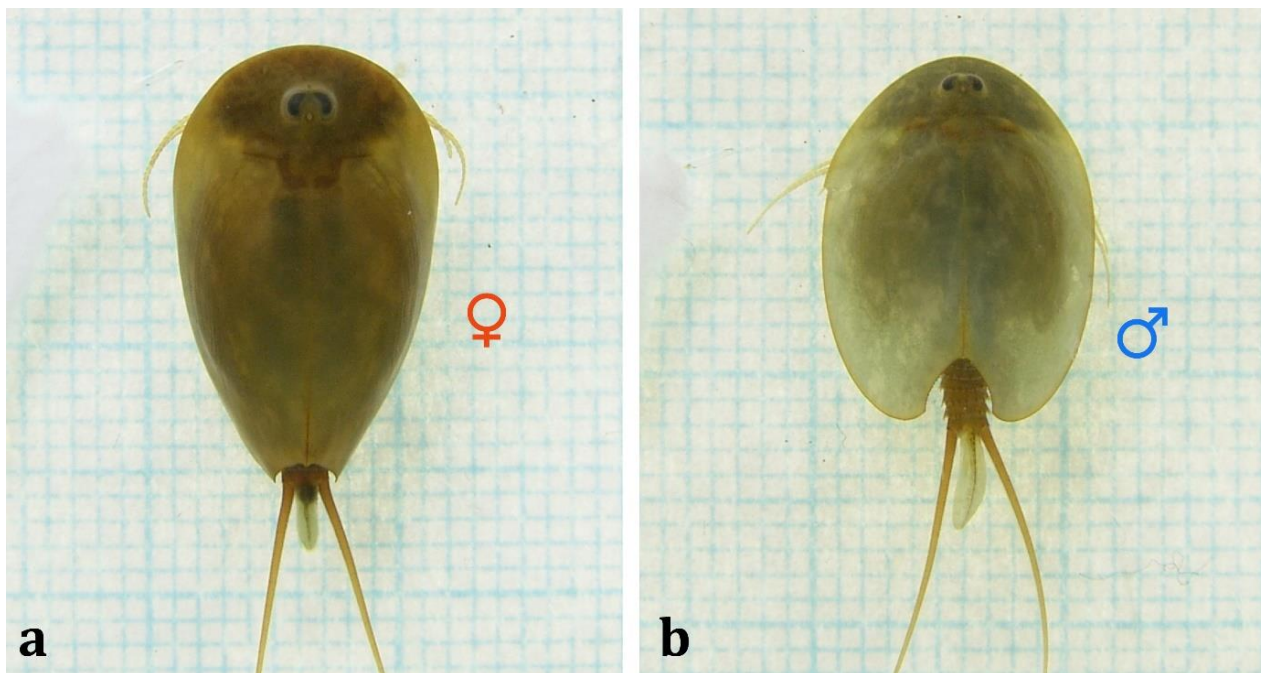
Izračunat je i upoređen opseg vrednosti osnovnih morfometrijskih karaktera ženki i mužjaka. Srednja vrednost, minimum, maksimum i standardna devijacija izračunati na uzorku ženki prikazani su u Tebeli 4 (Prilog Tabela 4). Boks dijagrami analiziranih morfoloških varijabli na uzorku ženki prikazani su u okviru Prilog Slike 2.

Tabela 4. Deskriptivna statistika vrste *L. couesii* iz Srbije (podaci dobijeni analizom uzorka ženki). Oznake i skraćenice: CL – dužina karapaksa, CW – širina karapaksa, AL – dužina abdomena od posteriorne ivice karapaksa do kraja telzona (bez kaudalne lamine), ^cL – dužina kaudalne lamine, ^{tot}L – ukupna dužina tela, PS – broj prstenastih segmenata koji nisu prekriveni karapaksom, ^Lless^S – broj prstenastih segmenata bez ekstremiteta, PL – broj parova ekstremiteta, Min – najmanja vrednost u uzorku, Max – najveća vrednost u uzorku, \bar{x} – srednja vrednost, SD – standardna devijacija. Dužinske mere su izražene u milimetrima (mm). Veličina analiziranog uzorka: $N_{\varphi} = 32$.

	CL	CW	AL	^c L	^{tot} L	PS	^L less ^S	PL	^c L/CL	CL/CW	AL/CL	CL/ ^{tot} L
\bar{x}	18.43	11.06	1.85	3.04	23.33	3.19	4.31	37.31	0.16	1.67	0.10	0.79
Min	15.86	9.85	0.21	2.32	19.14	0	4	34	0.14	1.46	0.01	0.70
Max	21.06	12.51	4.05	3.66	27.36	7	5	39	0.20	1.79	0.23	0.85
SD	1.49	0.74	1.08	0.39	1.94	2.07	0.47	1.23	0.01	0.08	0.06	0.04

Opseg variranja i koeficijent varijacije (CV) za analizirane morfološke karaktere prikazani su u Prilog Tabeli 5. Odnos dužine kaudalne lamine i dužine karapaksa ženki (^cL/CL) bio je u opsegu 0.14–0.20. Ovaj odnos predstavlja veoma važan taksonomski karakter, barem kada su u pitanju ženke (Prilog Tabela 5; $N_{\varphi} = 32$). Ukupna dužina tela, dužina abdomena i broj posteriornih prstenastih segmenata koji nisu prekriveni karapaksom su pokazali velik opseg variranja dužine, odnosno broja (Prilog Tabela 5, Prilog Slika 2). Kada se dužina karapaksa razmatra u odnosu na ukupnu dužinu tela jedinki (CL/^{tot}L), što je prirodan način procene, ovaj karakter pokazuje malu varijabilnost (Prilog Tabela 5).

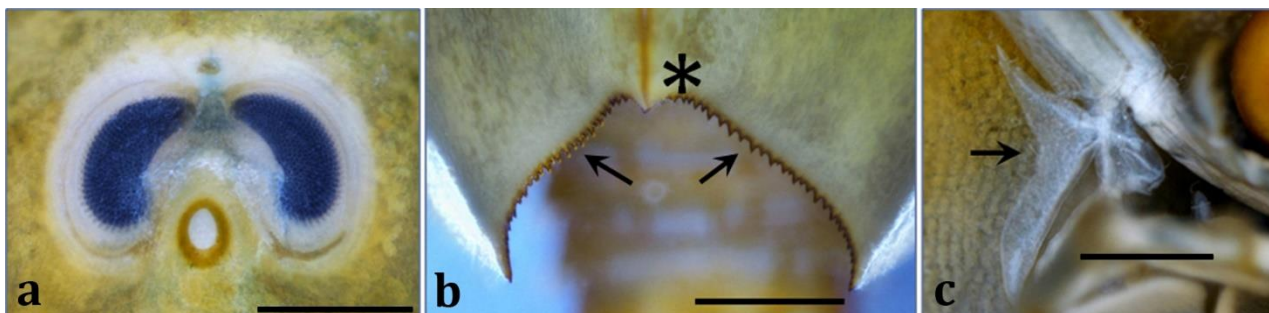
Generalne morfološke karakteristike ženki (jedinki sa jajnim kesama) i mužjaka analizirane vrste prikazane su na Slici 16a i 16b. Sve analizirane jedinice imaju izduženu kaudalnu laminu (supra-analnu ploču), koja se neznatno proširuje u središnjem delu i opet sužava prema vrhu. Sredinom kaudalne lamine se pruža ispupčenje u obliku grebena, sa brojnim bodljama različite veličine (Slika 17a, b). Ostali morfološki karakteri koji su važni za utvrđivanje taksonomske pripadnosti, prikazani su na Slici 18. Ovalni nukalni organ je pozicioniran delimično između složenih očiju (Slika 18a). Dorzalna središnja linija karapaksa je bez bodlji, dok je terminalna bodlja središnje linije prisutna kod oba pola. Zadnja ivica karapaksa prekrivena je većim bodljama, blago zaobljenim pri vrhu, između kojih se nalaze raspoređene manje bodlje (Slika 18b). Egzopodit prvog torakalnog ekstremiteta je izdužen proksimalno i distalno, dok je u središnjem delu sužen (Slika 18c, označeno strelicom).



Slika 16. Opšte morfološke karakteristike adultnih jedinki (dorzalni prikaz na milimetarskom papiru). a) spoljašnji izgled ženke (jedinke sa jajnim kesama); b) spoljašnji izgled mužjaka (Iz: Šaganović et al., 2017).



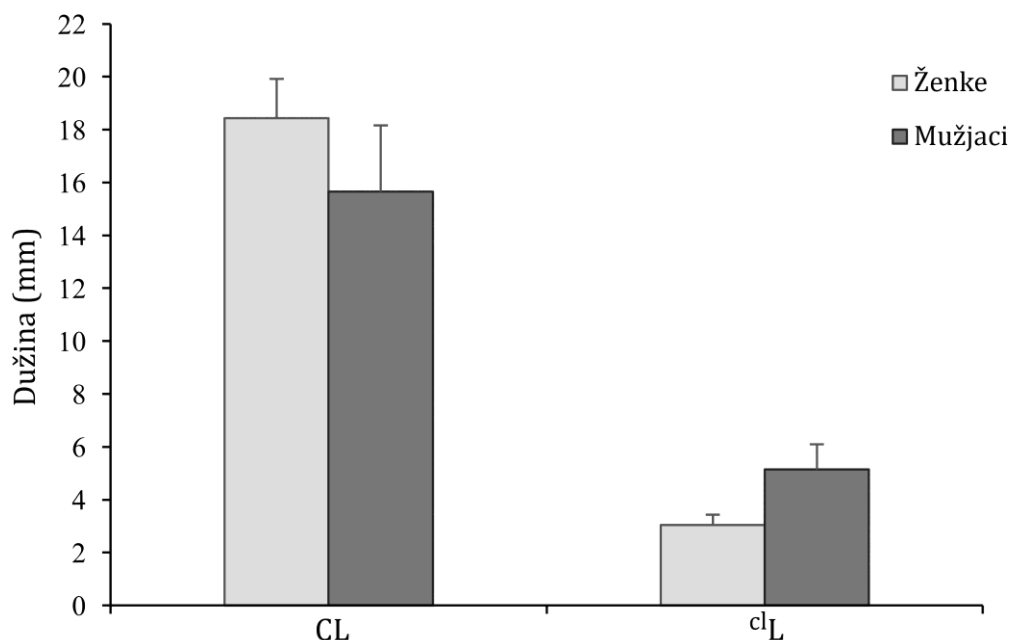
Slika 17. Stepen razvijenosti kaudalne lamine. a) ženka (jedinke sa jajnim kesama); b) mužjak. Skale = 1 mm (Iz: Šaganović et al., 2017).



Slika 18. Važni morfološki karakteri za utvrđivanje taksonomske pripadnosti *L. couesii*. a) oblik i položaj nukalnog organa; b) dorzalna medijalna linija karapaksa bez bodlji i sa terminalnom bodljom (obeleženo zvezdicom), i zadnja ivica karapaksa sa bodljama (označeno strelicama); c) egzopodit prvog torakalnog ekstremiteta (strelica). Skale = 1 mm (Iz: Šaganović et al., 2017).

4.2. Razlike između polova

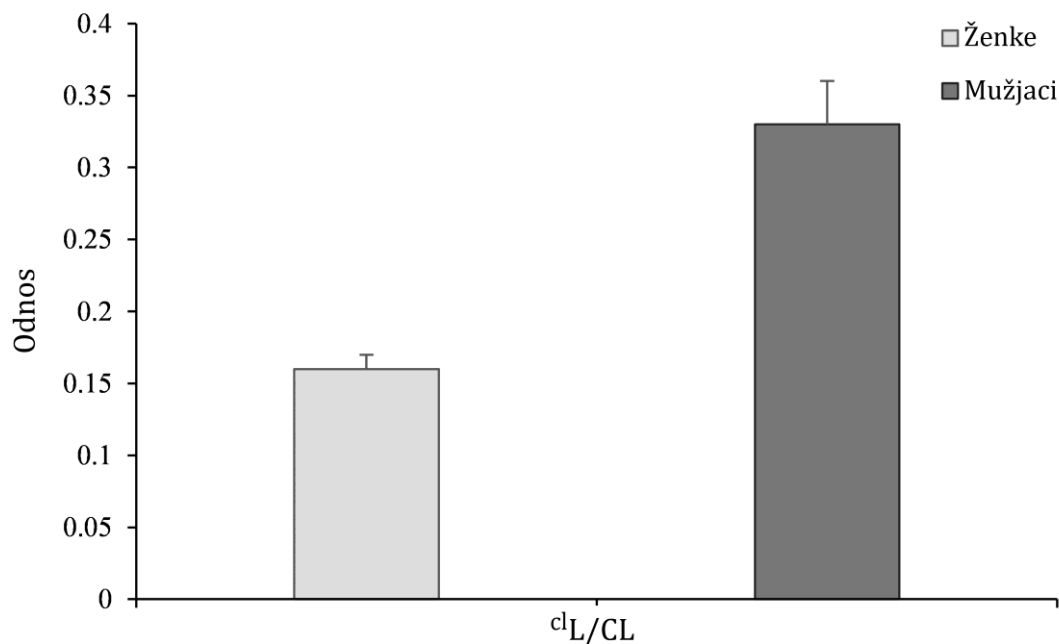
Ukupna dužina tela ženki, izmerena od prednje ivice karapaksa do kraja kaudalne lamine (bez cercopoda), iznosila je od 19.14 do 27.36 mm. Telo se sastoji 25–27 prstenastih segmenata (telesnih segmenata). Polno zrele ženke imaju 34–39 parova ekstremiteta (trupni ekstremiteti) i 4–5 prstenastih segmenata bez ekstremiteta. Karapaks je izdužen i prekriva skoro čitav trup. Savija se ventralno i potpuno prekriva bočne strane tela. Zadnja ivica karapaksa ženki ima 45–69 bodlji. Broj posteriornih prstenastih segmenata koji nisu prekriveni karapaksom iznosi 0–7.



Slika 19. Srednja vrednost dužine karapaksa (CL) i srednja vrednost dužine kaudalne lamine (clL) ženki i mužjaka, sa jednom standardnom devijacijom. Vrednosti su izražene u milimetrima.

Slično kao kod ženki, ukupna dužina tela mužjaka iznosila je 19.26–24.53 mm, sa 25–26 prstenastih segmenata. Broj parova ekstremiteta iznosio je 33–38, dok je broj prstenastih segmenata bez ekstremiteta bio 4 ili 5. Međutim, karapaks mužjaka je kraći, okruglastiji i više zaravnjen, i prekriva manji deo tela u odnosu na karapaks ženki. Na zadnjoj ivici karapaksa

izbrojano je 41–62 bodlji. Mužjaci imaju uži telzon, ali dužu kaudalnu laminu u odnosu na ženke (Slika 19). Takođe, odnos dužine kaudalne lamine i dužine karapaksa ($^{cL}/CL$) iz navedenih razloga ima više vrednosti kod mužjaka, nego kod ženki (Slika 20).

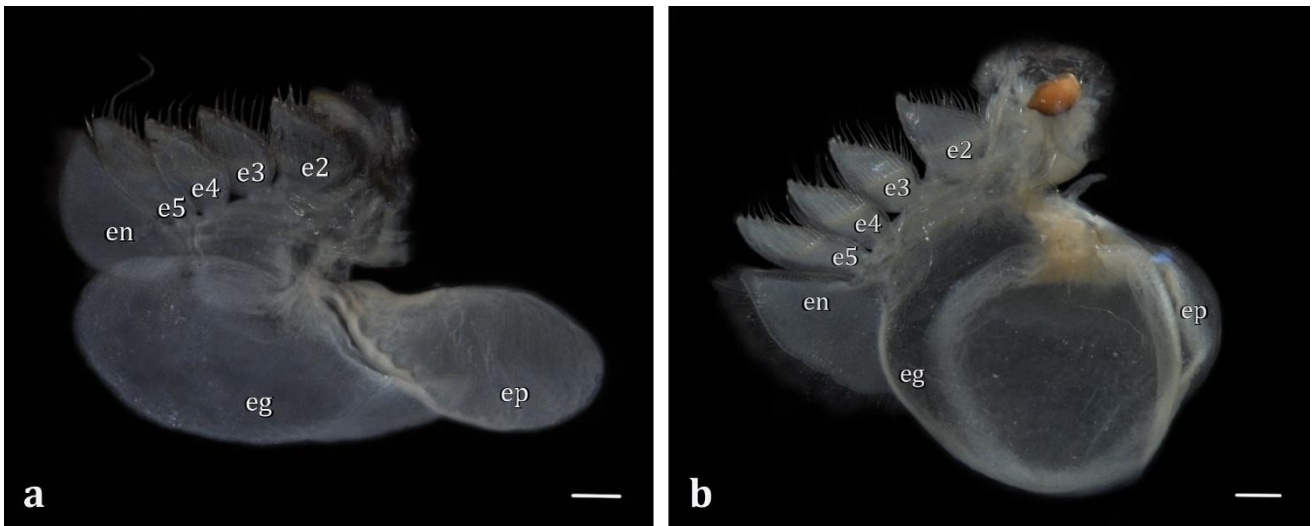


Slika 20. Srednja vrednost odnosa dužine kaudalne lamine i dužine karapaksa ($^{cL}/CL$) ženki i mužjaka, sa jednom standardnom devijacijom.

S obzirom da je analizirano samo pet mužjaka, morfološki karakteri koji ukazuju na polni dimorfizam imaju uglavnom deskriptivnu ulogu.

4.3. Polno dimorfne odlike jedanaestog para ekstremiteta

Ispitivanjem izgleda jedanaestog para torakalnih ekstremiteta, jedinke su determinisane kao mužjaci ili kao ženke. Jedanaesti par torakalnih ekstremiteta jedinki determinisanih kao mužjaci sličan je ostalim torakopodama i sastoji se od egzopodita (eg), epipodita (ep) koji ima pretežno respiratornu i osmoregulatornu ulogu, i šest nastavaka, endita (e), od kojih je poslednji označen kao endopodit (en) (Slika 21a). Jedanaesti par torakopoda jedinki označenih kao ženke pokazuje izmenjen izgled. Epipodit i egzopodit se modifikuju tako da formiraju jajnu kesu u kojoj se čuvaju zrela jaja obavijena omotačem. Egzopodit formira okruglasto dno jajne kese, dok poklopac jajne kese čini okruglasti epipodit, nešto manjeg obima (Slika 21b).

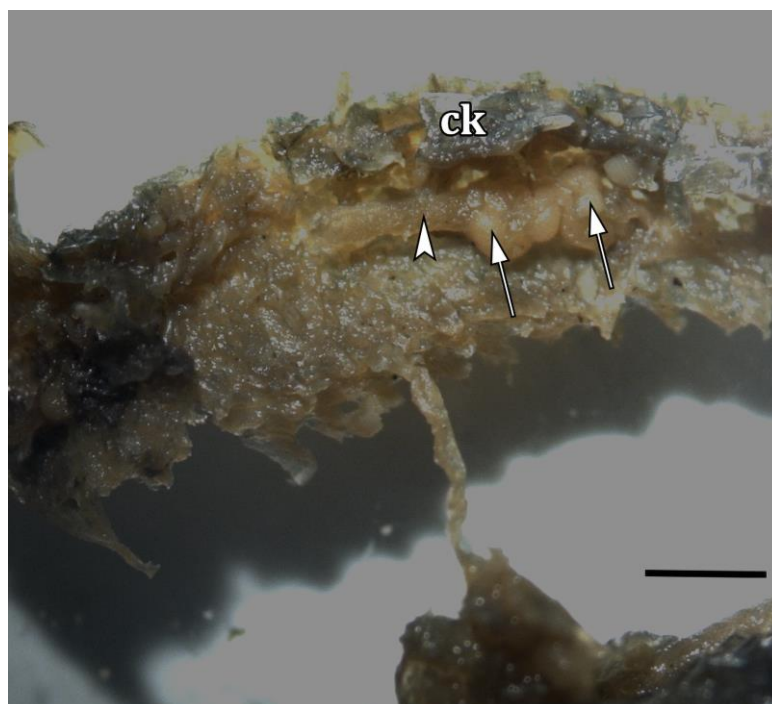


Slika 21. Izgled jedanaeste torakopode vrste *L. couesii*. a) mužjak; b) ženka. Skraćenice: eg – egzopodit; ep – epipodit; od e2 do e5 – enditi 2–5; en – endopodit. Enditi 1 nisu vidljivi na datim fotografijama. Skale = 0.5 mm.

4.4. Histološki aspekt određivanja pola

4.4.1. Morfo-anatomska i histološka građa gonada ženki vrste *L. couesii*

Parne gonade ženki se pružaju bočno u odnosu na crevo, počev od devetog torakalnog segmenta, sve do abdominalnih segmenata bez ekstremiteta (Slika 22). Pokazuju karakterističan „grozdast“ izgled zbog prisustva folikula na vrhovima folikularnih kanala. Gonade su beličasto-žute boje, prekrivene tankim i providnim vezivnim tkivom. Uzdužni ovidukt (uterus) se uočava kao glavni kanal i predstavlja mesto gde se jaja sakupljaju pre nego što se putem odvodnog kanala spuste u jajne kese (Slike 22, 24F).



Slika 22. Morfološki izgled izolovane gonade ženke *L. couesii*. Oznake: glava strelice – uterus; strelice – folikuli na vrhovima folikularnih kanala; ck – crevni kanal. Skala = 1 mm.

Ženke u periodu između presvlačenja obično imaju po desetak sferičnih jaja u jajnim kesama, narandžasto-braon boje. Krupnije ženke mogu da imaju i tridesetak jaja u jajnoj kesi (Slika 23). Prosečan dijametar jaja iznosi oko 520 μm i karakteriše ih lepljiva površina.

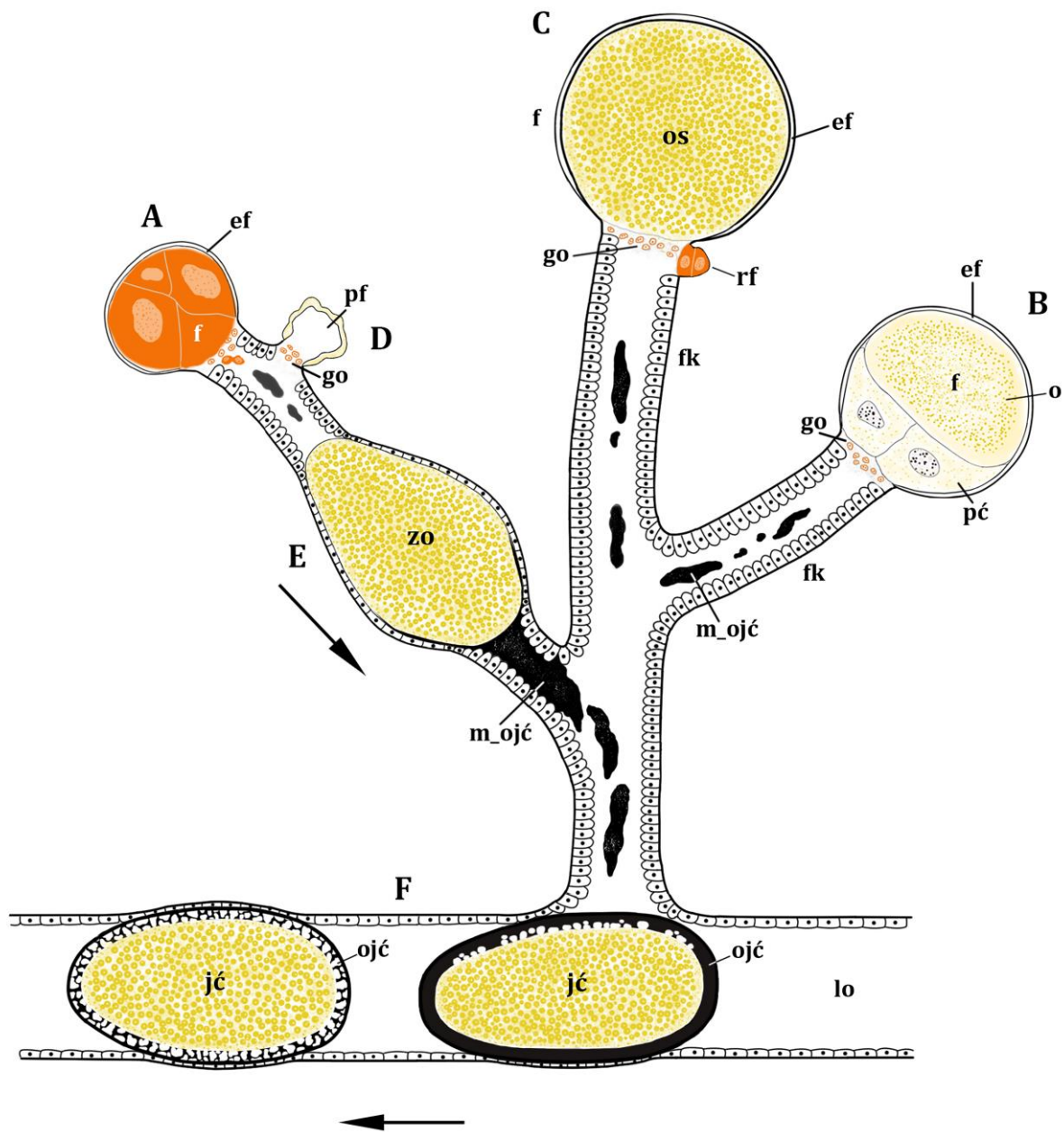


Slika 23. Jaja vrste *L. couesii* (izolovana iz jajne kese). Skala = 500 μm .

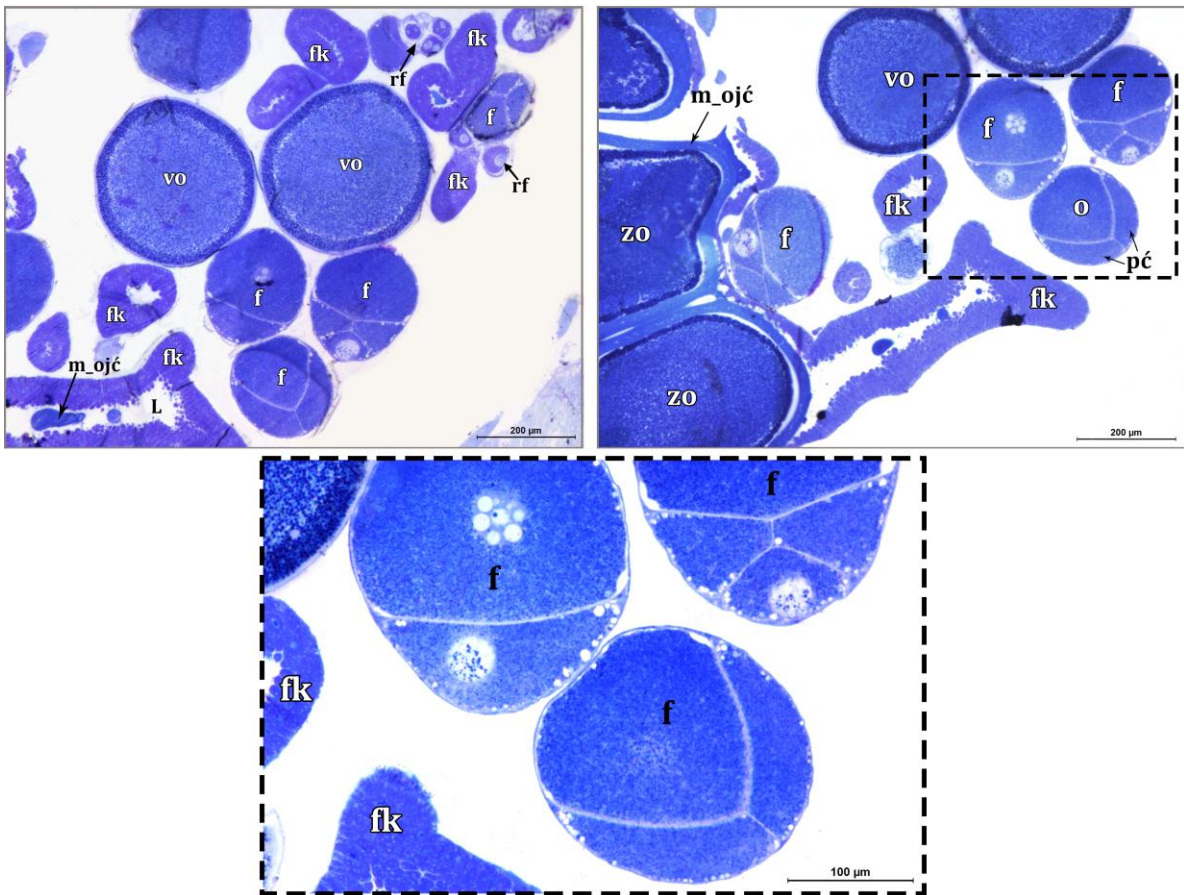
Oblik gonade može da se opiše kao razgranat i tubularan. Folikularni kanali polaze sa centralno pozicioniranog uzdužnog kanala (uterusa) i pružaju se lateralno. Izgrađeni su od jednog sloja somatskih ćelija, koje oblažu lumen kanala, i okruglastih germinativnih ćelija grupisanih u vršnim delovima kanala, gde ispunjavaju njegov lumen (Slike 24, 26a, 28b, 31a). Na vrhu bočnih kanala se nalaze folikuli koji se izduživanjem kanala pomeraju prema hemocelu (Slika 27).

Začeci folikula se formiraju od ćelija raspoređenih u germinativnoj oblasti. Većina ovih ćelija se nalazi u deobi i začeci četvoroćelijskih folikula u najranijoj fazi formiranja se jasno uočavaju (Slika 26a). Ove ćelije karakteriše izrazito krupan nukleus, kao i intezivno obojena citoplazma (Slika 26a, označeno zvezdicom). Rastom folikula, prvobitno se formira bočno ispupčenje u blizini vrha folikularnog kanala na kome se nalazi folikul u kasnijoj fazi rasta (Slike 24C, 26a, b). Površinu rastućeg folikula obavijaju ćelije koje se tokom rasta folikula izdužuju, postaju spljoštene, i formiraju epitel folikula (Slike 26a, b, 30a). Unutar svakog folikula se razvijaju četiri ćelije – oocita i tri pomoćne ćelije, koje zajedno formiraju germinativnu cistu (Slike 25, 26a, b). U početnoj fazi sazrevanja oocite, koja može da se označi kao previtelogeneza, ćelije folikula odlikuje intezivno obojena citoplazma sa krupnim nukleusima (Slike 24A, 26a, b). U ovoj fazi nije sasvim jasno koja od četiri ćelije predstavlja oocitu, a koje ćelije su pomoćne ćelije. Sledeća faza može da se označi kao vitelogeneza i karakteriše je pojavljivanje malih granula žumanceta u citoplazmi. Pretpostavlja se da oocita u početku vrši endogenu vitelogenezu i da pomoćne ćelije imaju trofičku ulogu tokom sazrevanja oocite. Ova pretpostavka je u saglasnosti sa uočenim granulama žumanceta u citoplazmi sve četiri ćelije folikula (Slike 27, 28a). Takođe, u ovoj fazi nisu uočeni mikrovili na površini ćelija folikula. Oocita se dalje uvećava, postaje veća od pomoćnih ćelija i postepeno počinje da ih potiskuje ka osnovi folikula (Slike 24B, 25, 30a). Može se pretpostaviti da u ovoj fazi ćelije folikula mogu da se razlikuju prema rasporedu unutar folikula, odnosno prema tome koji deo zapremine folikula zauzimaju (Slika 25, označeno simbolom f). Nakon završetka endogene faze vitelogeneze, na površini oocite se uočavaju brojni mikrovili čime je označen početak egzogene vitelogeneze i unosa žumancetnog materijala putem endocitoze (Slike 28a, 29a). U ovoj fazi je moguća pouzdana identifikacija oocite u folikulu. Oocita akumulira velike količine žumanceta i po završetku rasta zauzima čitavu zapreminu folikula, dok se pomoćne

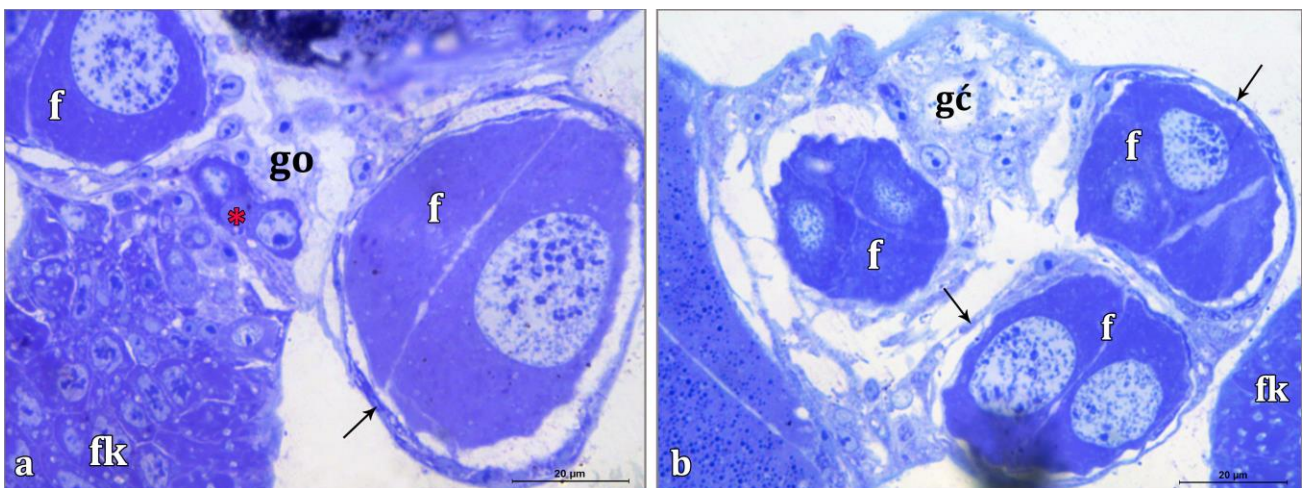
ćelije više ne uočavaju (Slike 24C, 25). Ultrastrukturalna analiza zrele oocite pokazuje prisustvo brojnih žumancetnih granula različite veličine, kao i lipidnih tela (Slika 29b).



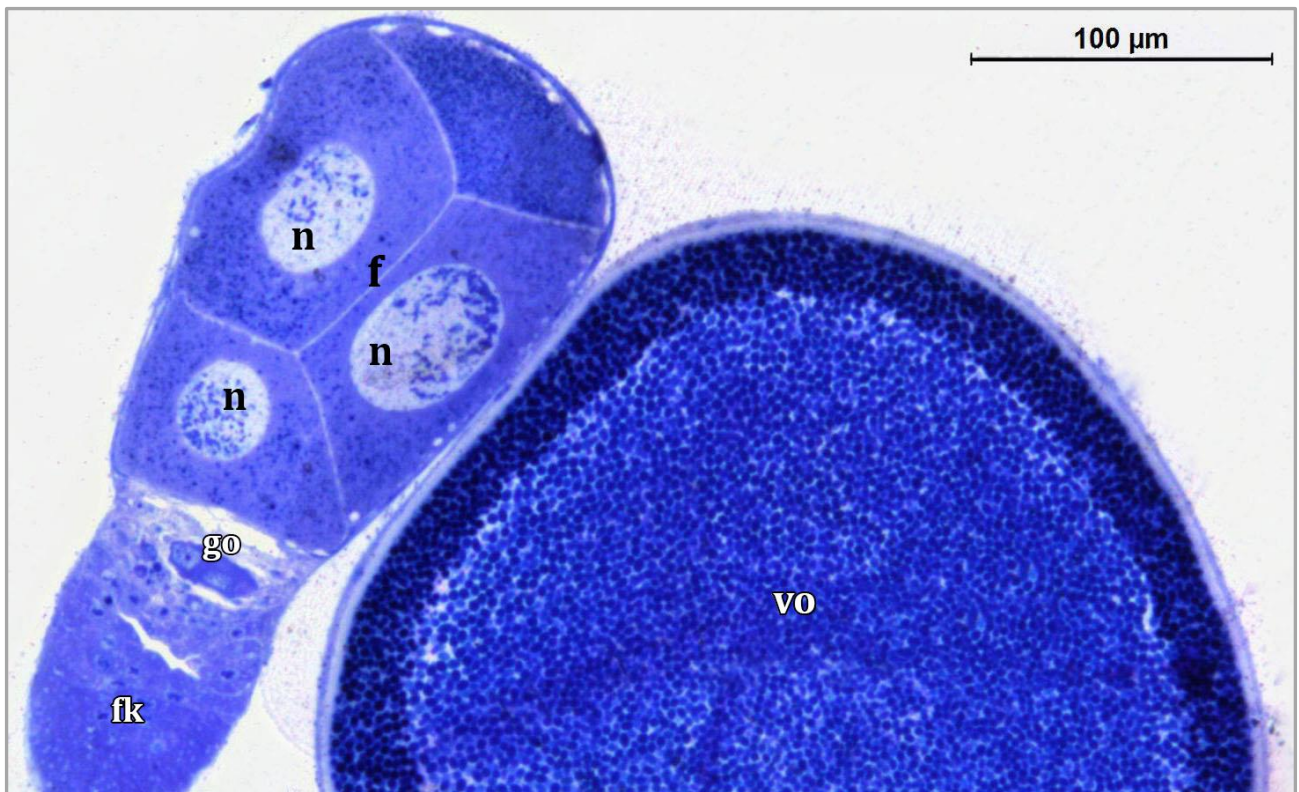
Slika 24. Šematski prikaz građe gonade (sa četiri folikula) ženki *L. couesii*. A) četvoroćelijski folikul u početnoj fazi rasta (faza 2 prema Longhurst, 1955b); B) oocita i pomoćne ćelije u folikulu – na crtežu su vidljive samo dve pomoćne ćelije (faza 4–5 prema Longhurst, 1955b); C) oocita u kasnoj fazi sazrevanja, pred spuštanje u folikularni kanal (faza 6 prema Longhurst, 1955b), i folikul u ranoj fazi rasta (faza 1 prema Longhurst, 1955b); D) prazan folikul; E) oocita u folikularnom kanalu ispunjenom materijalom za izgradnju omotača jajne ćelije; F) jajne ćelije u longitudinalnom kanalu (uterusu), u različitim fazama formiranja omotača. Skraćenice: f – folikul; ef – epitel folikula; rf – folikul u ranoj fazi rasta; o – oocita; os – oocita u kasnoj fazi sazrevanja; zo – zrela oocita; pc – pomoćna ćelija; go – germinativna oblast; fk – folikularni kanal; pf – prazan folikul; m_ojć – materijal za izgradnju omotača jajne ćelije; lo – longitudinalni ovidukt; jc – jajna ćelija; ojć – omotač jajne ćelije. Strelice prikazuju putanju oocite kroz kanale gonade. Prolaskom oocita kroz kanale gonade, i formiranjem omotača jajne ćelije, odvija se diferencijacija oocita u zrele jajne ćelije (jaja), koje se sakupljaju u oviduktu. Elementi šeme nisu potpuno srazmerni. Crtež: I. Šaganović.



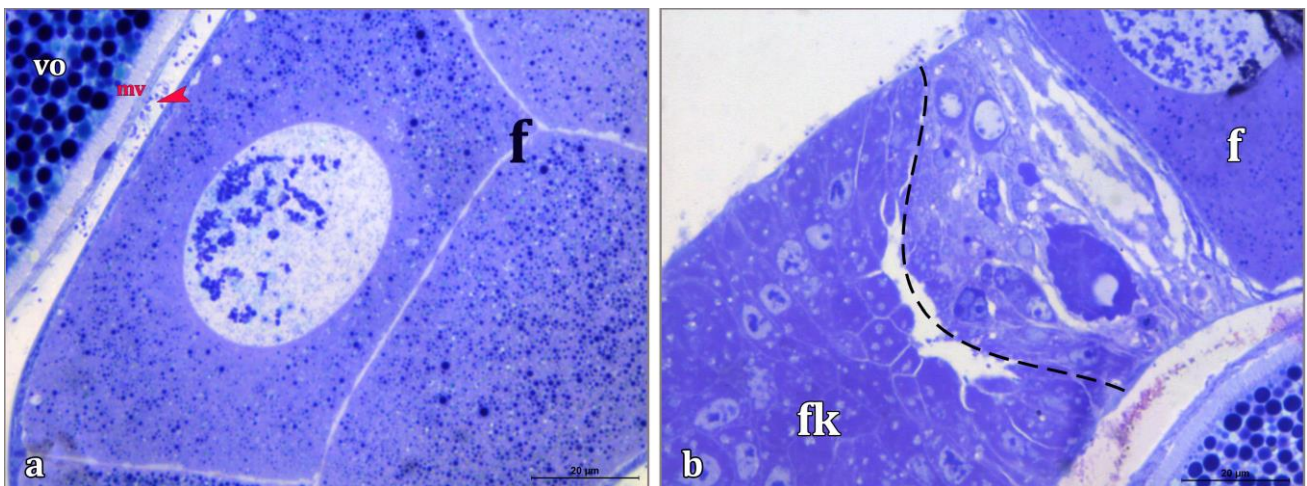
Slika 25. Polutanki preseci gonade ženke. Skraćenice: o – oocita; vo – oocita u egzogenoj fazi vitelogeneze; pč – pomoćna ćelija; f – folikuli u kasnijoj fazi rasta (pretpostavljena faza 5–6 prema Longhurst, 1955b); rf – folikul u ranoj fazi rasta; fk – folikularni kanal; L – lumen folikularnog kanala; m_ojč – materijal za izgradnju omotača jajne ćelije; zo – zrela oocita u folikularnom kanalu. Skale = 200 µm; Detalj: Skala = 100 µm.



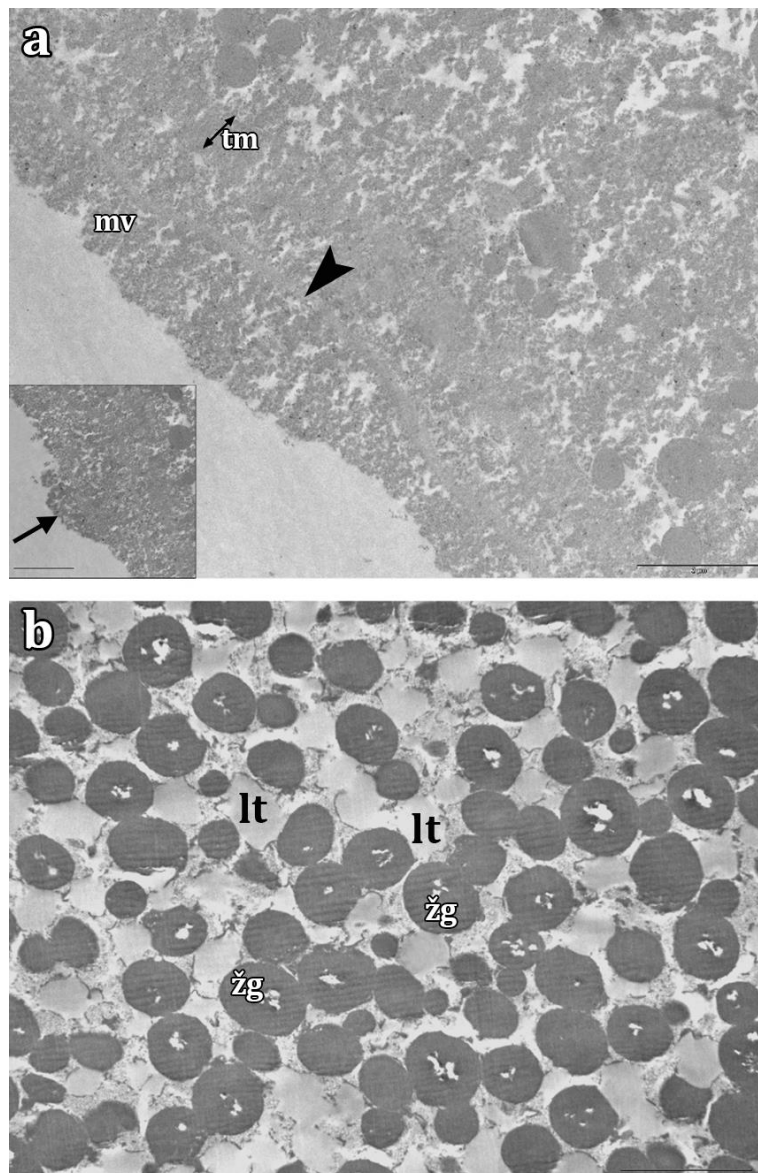
Slika 26. Polutanki preseci gonade ženke. a) folikularni kanal sa kog rastu („pupe”) folikuli i započinju formiranje novog folikularnog kanala (pretpostavljena faza 1–2 prema prema Longhurst, 1955b). U apikalnom delu kanala se uočavaju ćelije germinativne oblasti, kao i začetak folikula (zvezdica); b) polutanki presek gonade u nivou folikula u ranoj fazi rasta (pretpostavljena faza 1 prema Longhurst, 1955b). Skraćenice: fk – folikularni kanal; f – folikul; go – germinativna oblast; gč – germinativne ćelije. Strelice prikazuju epitel folikula koji se formira kada folikul rastući povlači ćelije koje se zatim izdužuju i spljoštavaju. Skale = 20 µm.



Slika 27. Polutanki presek gonade ženke na kom se uočava folikularni kanal sa četvoroćelijskim folikulom na vrhu (pretpostavljena faza 4-5 prema prema Longhurst, 1955b). Takođe, uočava se još jedan folikul u kom se nalazi oocita u egzogenoj fazi vitelogeneze. Skraćenice: fk – folikularni kanal; go – germinativna oblast folikularnog kanala; n – nukleus ćelije folikula; vo – oocita u vitelogenoj fazi oogeneze. Skala = 100 µm.



Slika 28. Detaljan prikaz histoloških struktura vidljivih na Slici 27. a) polutanki presek na kom se uočava oocita u egzogenoj fazi vitelogeneze, sa mikrovilima oocite i granulama (glava strelice). Citoplazma sve četiri ćelije susednog folikula ispunjena je granulama žumanceta; b) folikularni kanal sa germinativnom oblasti (iznad isprekidane linije) koja ispunjava lumen vrha kanala. U germinativnoj oblasti se uočavaju germinativne ćelije u deobi. Skraćenice: fk – folikularni kanal; f – folikul; vo – oocita u egzogenoj fazi vitelogeneze; mv – mikrovili. Skale = 20 µm.

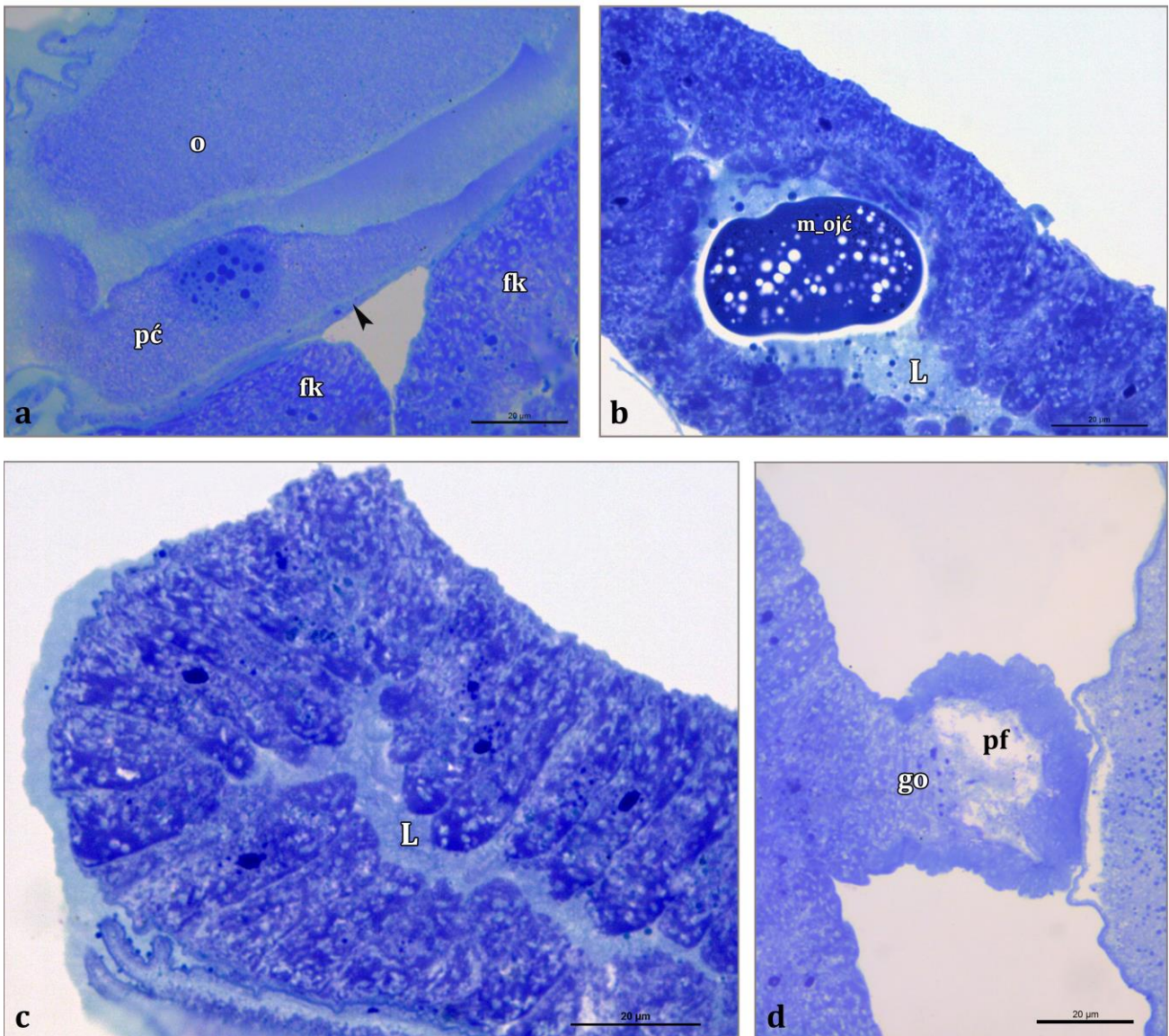


Slika 29. Ultratanki preseci oocite ispunjene granulama žumanceta. a) oocita tokom egzogene faze vitelogeneze, sa vidljivim mikrovilima (mv) koji polaze na membrani oocite (glava strelice) i terminalnom mrežom filamenata. Epitel folikula nije jasno vidljiv. Skala = 2 μm . Detalj: granule u okolini mikrovila (strelica). Skala = 2 μm ; b) žumancetne granule i lipidna tela oocite. Skala = 5 μm . Skraćenice: mv – mikrovili; tm – terminalna mreža; žc – žumancetne granule; lt – lipidna tela.

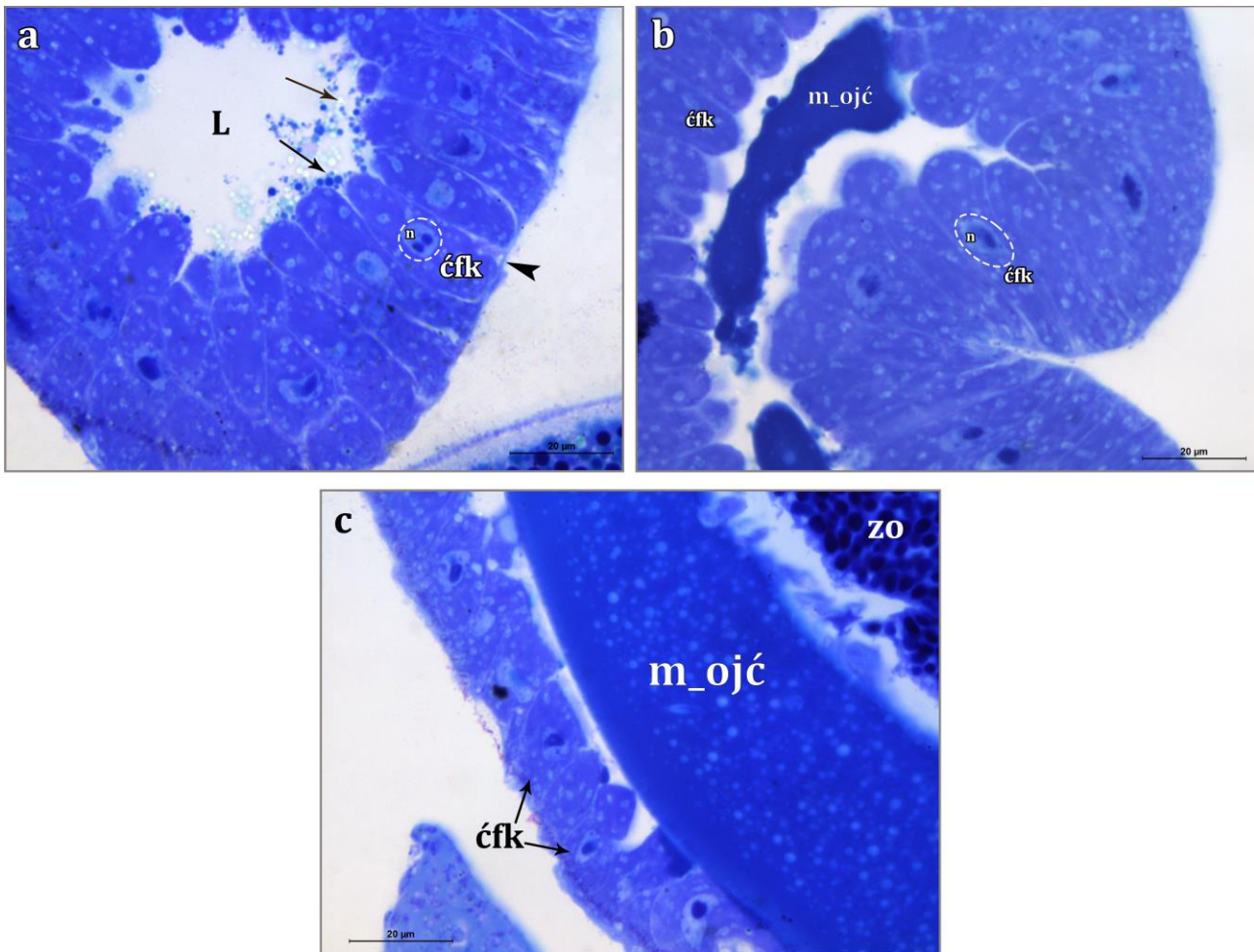
Po završetku oogeneze, zrela oocita izlazi iz folikula, prolazi kroz germinativnu oblast i spušta se u folikularni kanal (Slika 24E). Ispražnjen folikul se urušava i uočava se kao isavijana vrećica, dok germinativna oblast deluje očuvana (Slike 24D, 30d). Visina ćelija folikularnog kanala se tokom prolaska oocite smanjuje (Slika 31c). Zrela oocita započinje svoj put prema centralnom kanalu, a jedan od folikula, koji se u početnoj fazi rasta uočava kao bočni „pupoljak” na folikularnom kanalu, sada zauzima vršnu poziciju (Slika 24A).

Površinu folikularnih kanala pokriva jednoslojni cilindrični epitel. Ćelije epitela su izdužene, gusto pakovane i svojim bazalnim delom naležu na podepitelsku laminu, dok je apikalna površina upravljena prema lumenu kanala (Slike 24, 30b, c, 31a). Prosečna dužina folikularnih ćelija iznosi oko 30 μm , a širina oko 7.3 μm . Na polutankim presecima se uočava „sunderast” izgled citoplazme, kao i očigledna sekretorna aktivnost ćelija (Slike 30c, 31a). Ćelije kanala sintetišu velike količine materijala koji se fuzioniše u gustu masu u lumenu i

predstavlja materijal za izgradnju omotača jajne ćelije (Slike 30b, 31b). Još u lumenu kanala, materijal pokazuje osobine „vakuolizacije”, tj. centralna masa nije sasvim kompaktna (Slika 30b). Na poprečnom preseku, dijametar lumena folikularnog kanala iznosi oko 28 μm i često je potpuno ispunjen ovim materijalom.



Slika 30. Polutanki preseki gonade ženke. a) oocita i vidljiva potisnuta pomoćna ćelija u folikulu (pretpostavljena faza 5–6 prema prema Longhurst, 1955b). Glava strelice: epitel folikula; b) uzdužni presek folikularnog kanala sa velikom centralnom masom materijala za izgradnju omotača jajne ćelije koja ispunjava lumen; c) uzdužni presek folikularnog kanala na kom se uočava jedan sloj izduženih ćelija (primetiti „sunderast” izgled ćelija); d) prazan folikul u čijoj osnovi se nalaze ćelije germinativne oblasti. Skraćenice: o – oocita; pc – pomoćna ćelija; fk – folikularni kanal; m_ojč – materijal za izgradnju omotača jajne ćelije; L – lumen folikularnog kanala; pf – prazan folikul; go – germinativna oblast. Skale = 20 μm .



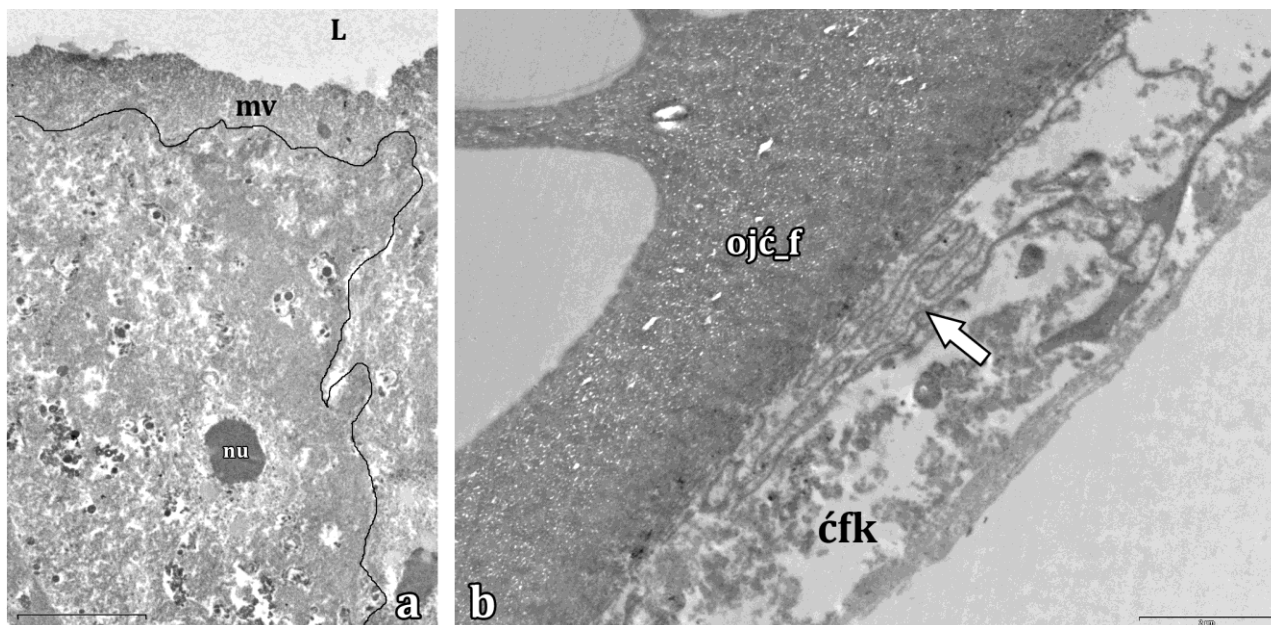
Slika 31. Polutanki preseci u nivou folikularnih kanala. a) izdužene ćelije folikularnog kanala, karakterističnog „sunderastog” izgleda. Na apikalnom delu ćelija se uočava odvijanje sinteze materijala za izgradnju omotača jajne ćelije (strelice). Glava strelice obeležava podepitelsku laminu na koju naležu ćelije folikularnog kanala; b) polutanki presek folikularnog kanala sa lumenom ispunjenim velikom količinom materijala za izgradnju omotača jajne ćelije; c) skraćivanje ćelija folikularnog kanala pri prolasku zrele oocite kroz folikularni kanal (uporediti sa fotografijama pod a i b). Skraćenice: L – lumen folikularnog kanala; ćfk – ćelije folikularnog kanala; n – nukleus ćelije folikularnog kanala (zaokružen isprekidanom linijom); m_ojć – materijal za izgradnju omotača jajne ćelije; zo – zrela oocita. Skale = 20 µm.

Histološkim analizama nije otkriveno prisustvo testikularnog tkiva u ženskim gonadama.

4.4.2. Ultrastrukturalne odlike ćelija folikularnih kanala

Analizom ultratankih preseka tkiva gonada uočava se da je apikalna površina ćelija folikularnih kanala prekrivena kratkim mikrovilima (Slika 32a). Nukleusi se uglavnom nalaze u blizini centra ćelija, izduženi su i nekad sa dubokom invaginacijom na jednom kraju (Slike 32a, 36c). Prosečne dimenzije nukleusa iznose oko 9.1 x 3.6 µm. U nukleusu se uočava gust nukleolus, elipsoidnog oblika, kao i skupine hromatina (Slike 32a, 36c, d). „Sunderast” izgled citoplazme ćelija potiče od prisustva brojnih vakuola, kao i cisterni kompleksa Goldži i granulisanog endoplazminog retikuluma (Slike 32a, 36a, b, d, e).

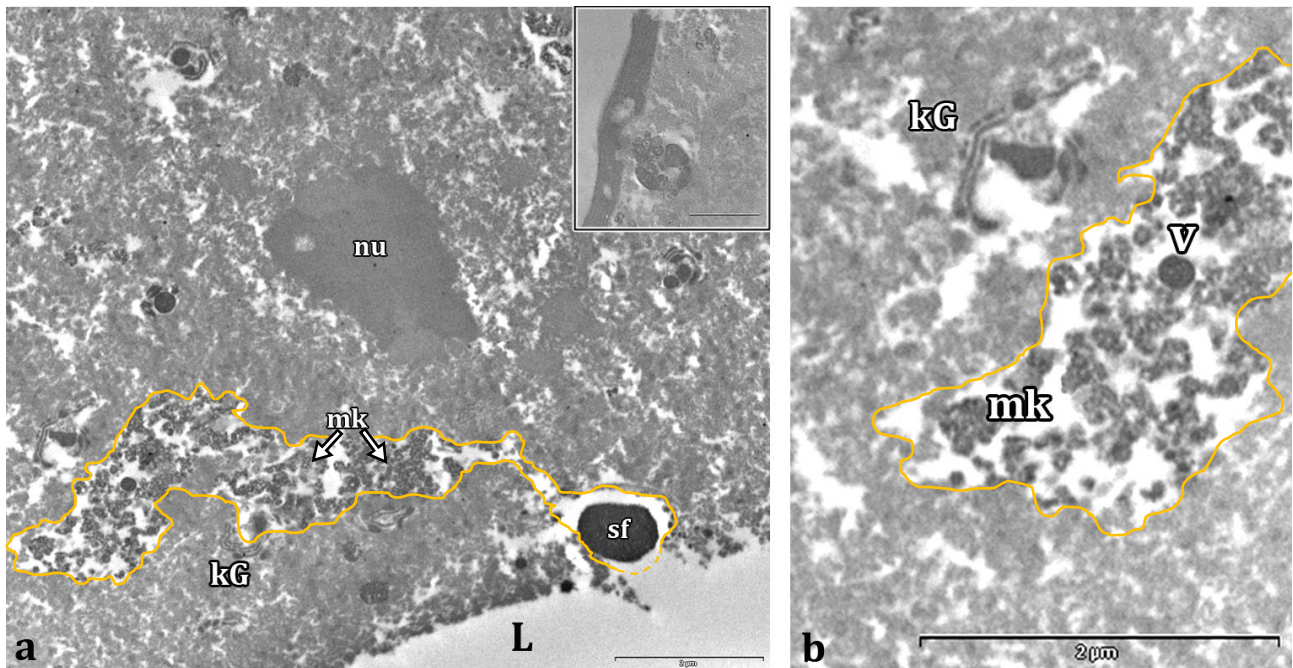
Spuštanjem oocite u folikularni kanal, promene se ispoljavaju prvo u distalnim delovima kanala. Lumen se proširuje, mikrovili se više ne uočavaju, a ćelije epitela kanala se skraćuju i njihova visina sada iznosi oko 3.3 μm . Deluje da se prolaskom oocite kroz kanal istiskuje dodatna količina materijala iz ćelija folikularnog kanala (Slika 32b). Membrane ćelija formiraju uvrate unutar koji se odigrava proces sekrecije materijala za izgradnju omotača jajne ćelije.



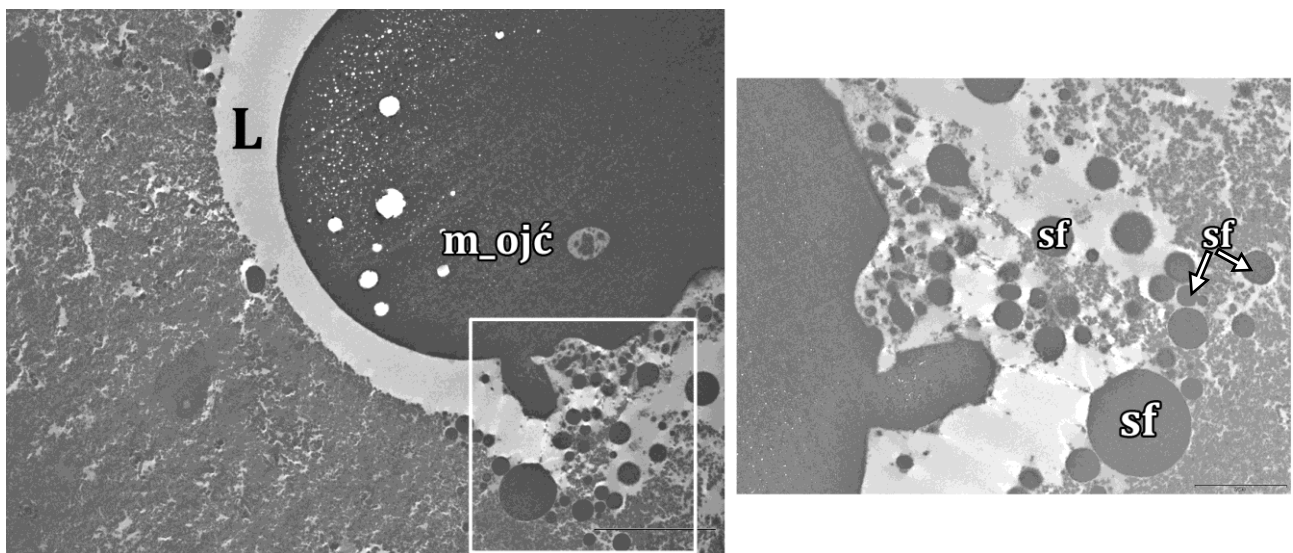
Slika 32. Ultratanki preseći ćelija folikularnog kanala. a) izdužena ćelija sa vidljivim mikrovilima u apikalnom regionu. Membrana ćelije je istaknuta crnom linijom. Skala = 5 μm ; b) ćelija folikularnog kanala na mestu prolaska oocite, sa vidljivim uvratima membrane putem kojih se izlučuje sekret (strelica). Skala = 2 μm . Skraćenice: L – lumen kanala; mv – mikrovili; nu – nukleolus; ćfk – ćelija folikularnog kanala; ojć_f – omotač jajne ćelije u formiranju.

U citoplazmi se uočavaju brojni kompleksi Goldži i izrazito razvijene membrane granulisanog endoplazminog retikuluma (Slika 36a, d, e), koje su često parakristalno uređene (Slika 36b), a uočavaju se i koncentrične membrane endoplazminog retikuluma (Slika 35a). Takođe, u citoplazmi ćelija folikularnog kanala su prisutne prstenaste lamele (Slika 35b, c, d).

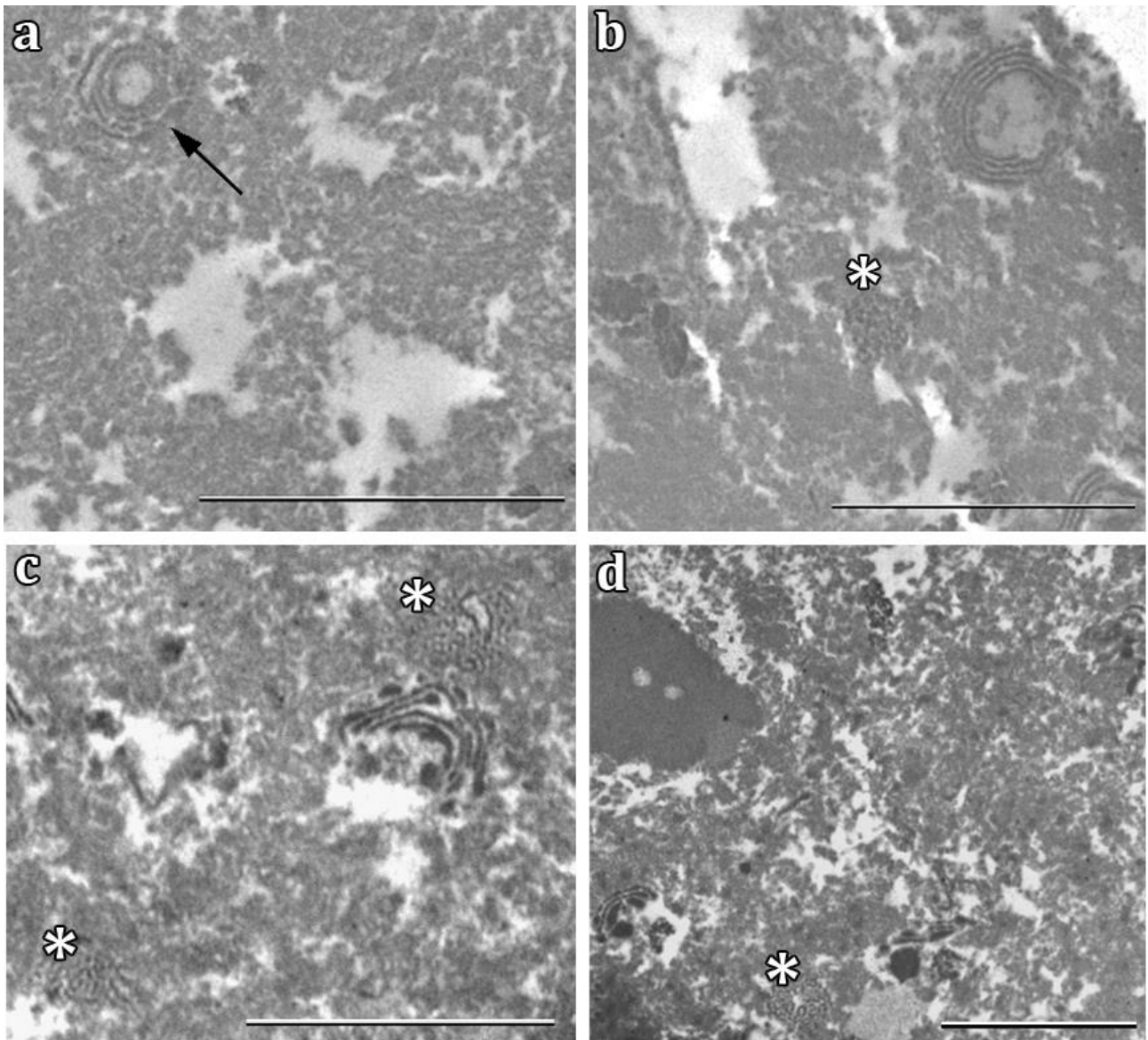
Cisterne kompleksa Goldži su ispunjene gustim materijalom koji se postepeno kondenzuje. U početku, sekretorne granule materijala se kondenzuju u veće skupine nepravilnog oblika, ponekad u vidu rozete (Slika 33a, b). Materijal u kondenzovanju se sakuplja u vakuolama i dalje kondenzuje u sferične vezikule koje se pomoću vakuola transportuju do lumena kanala (Slike 33a, 34). Izgleda da u sintezi materijala za izgradnju omotača jajne ćelije učestvuju kompleksi Goldži i granulisan endoplazmin retikulum koji često okružuje kompleks Goldži, ili se nalazi uz nukleusni ovoj (Slika 36d, e). Materijal koji ove organele sintetišu u potpunosti ispunjava lumen kanala i vidi se kao veoma gusta centralna masa (Slika 34). Deluje da se kontinuirano proizvodi čitavom dužinom folikularnih kanala. Prolazak oocite kroz kanale izgleda potpomažu i mišići koji se nalaze uz zidove gonada (Slika 36f).



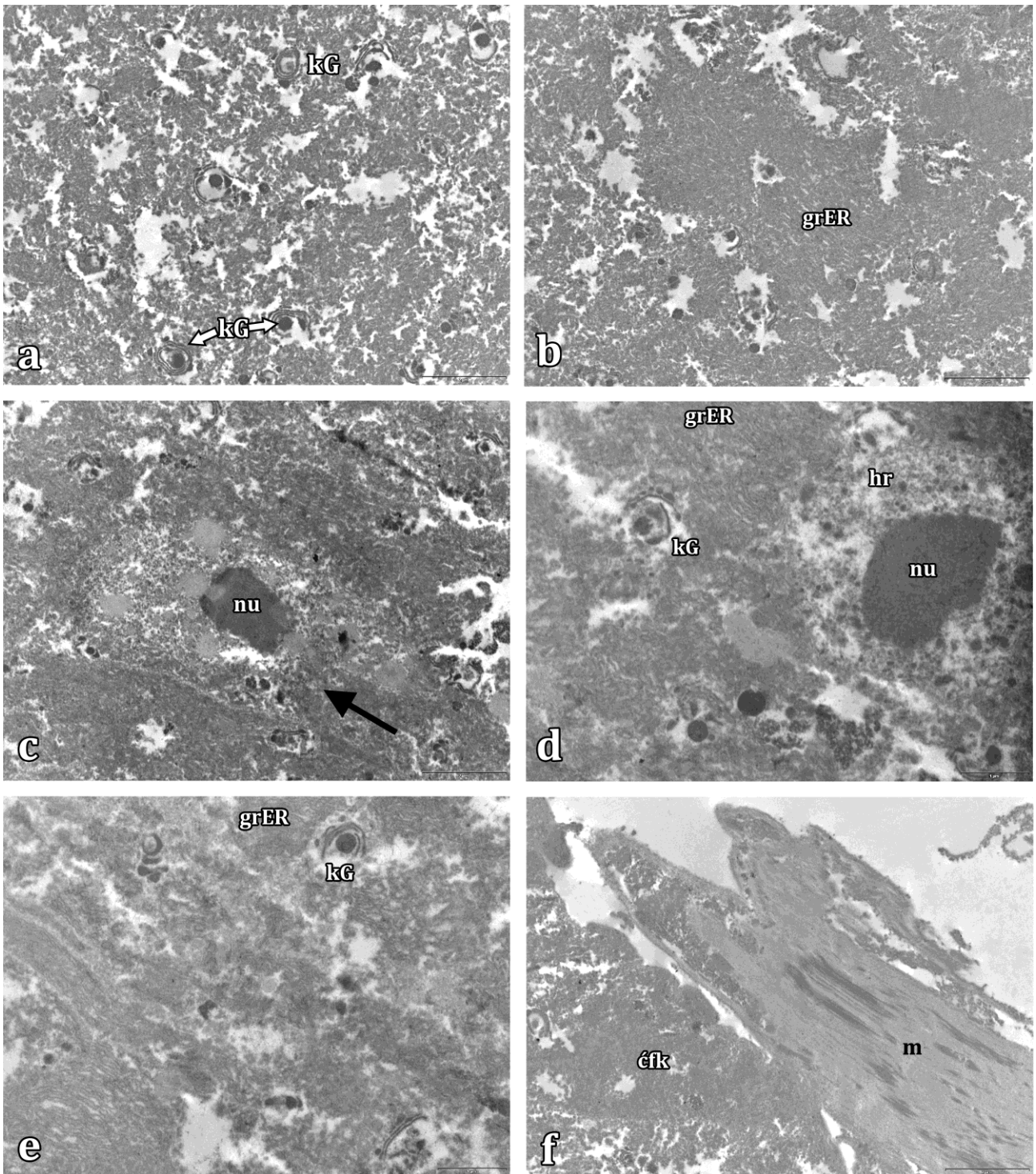
Slika 33. Ultratanki preseći ćelija folikularnog kanala. a) nukleus sa nukleolusom u blizini apikalnog dela ćelije. Uočava se materijal za izgradnju omotača jajne ćelije koji se kondenzuje u skupine nepravilnog oblika, sakuplja u vakuolama (istaknute bojom) i dalje kondenzuje u sferične vezikule koje se oslobađaju u lumen i fuzionišu sa centralnom masom. Skala = 2 μm . Detalj: skupina materijala za izgradnju omotača jajne ćelije rozetastog oblika. Skala = 1 μm ; b) materijal za izgradnju omotača jajne ćelije koji se kondenzuje u vakuoli u skupine nepravilnog oblika. Skala = 2 μm . Skraćenice: nu – nukleolus; kG – kompleks Goldži; L – lumen kanala; mk – materijal za izgradnju omotača jajne ćelije u kondenzovanju; v – vakuola, sf – sfera materijala za izgradnju omotača jajne ćelije.



Slika 34. Poprečni presek kroz folikularni kanal, sa gustim materijalom u lumenu koji predstavlja materijal za izgradnju omotača jajne ćelije. Skala = 5 μm . Detalj: Ulivanje brojnih sfera u centralnu masu. Skala = 2 μm . Skraćenice: L – lumen kanala; m_ojć – materijal za izgradnju omotača jajne ćelije; sf – sfere materijala.



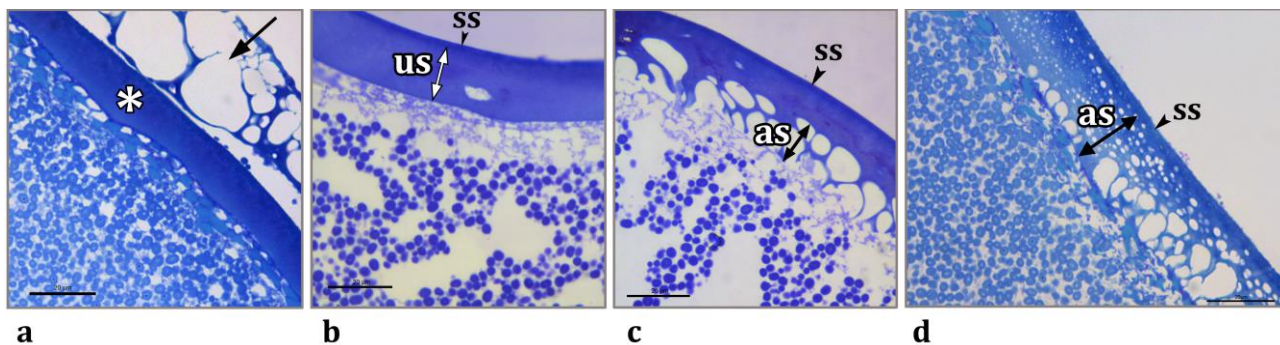
Slika 35. Ultratanki preseći ćelija folikularnog kanala. a) koncentrične membrane endoplazminog retikuluma (strelica); b), c) i d) prstenaste lamele u citoplazmi ćelija (zvezdice). Skale = 2 μm .



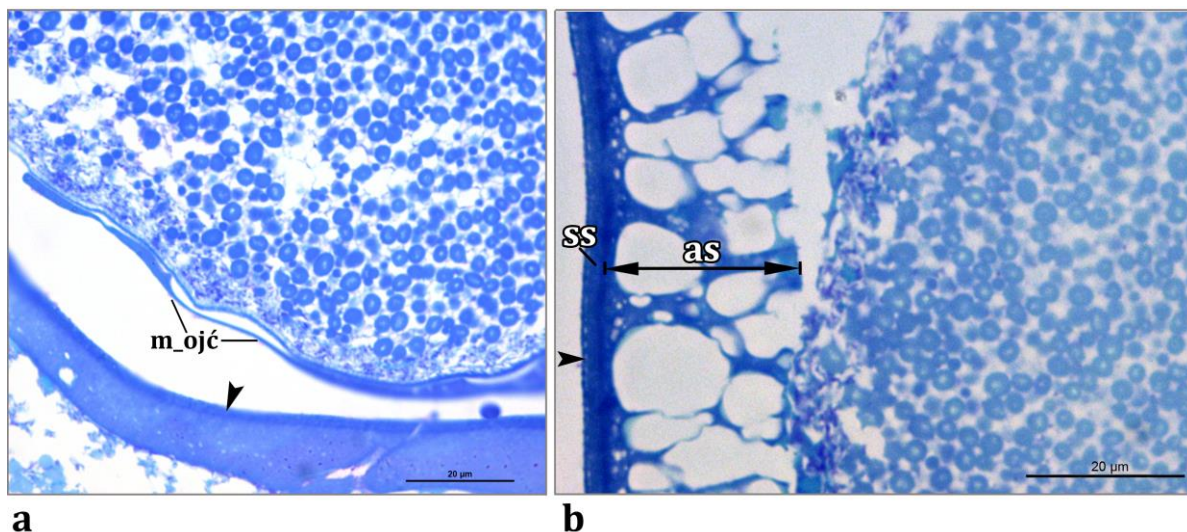
Slika 36. Ultratanki preseki ćelija folikularnog kanala. a) gusta citoplazma u kojoj se nalazi veliki broj kompleksa Goldži koji učestvuju u sintezi materijala za izgradnju omotača jajne ćelije; b) parakristalno uređene membrane granulisanog endoplazminog retikuluma; c) nukleus sa invaginacijom na jednom kraju (strelica) i krupnim nukleolusom; d) vidljiv hromatin u nukleusu i endoplazmin retikulum uz nukleusni ovoj; e) kompleksi Goldži i granulisan endoplazmin retikulum; f) mišić uz kanal gonade. Skraćenice: kG – kompleks Goldži; nu – nukleolus; grER – granulisan endoplazmin retikulum; hr – hromatin; ćfk – ćelija folikularnog kanala; m – mišić. Skale: a–c i f = 2 μm , d, e = 1 μm .

4.4.3. Formiranje omotača jajne ćelije

Tokom prolaska oocite kroz folikularni kanal, ona se polako obavija materijalom za izgradnju omotača jajne ćelije i to prvo u svom prednjem delu, gurajući materijal ispred sebe, a zatim i preko cele površine (Slika 38a). Sloj kojim se jaje obavija postaje sve deblji, do formiranja kompaktnog i amornog omotača oko oocite. Omotač može da bude različite debljine, od oko 13 μm do 19 μm (Slika 37a). U sledećoj fazi, omotač se diferencira na dva sloja, spoljašnji tanji, debljine 1–2 μm , i unutrašnji deblji sloj (Slike 37b; Slika 38a).



Slika 37. Faze formiranja omotača jajne ćelije. a) jednoslojni omotač jajne ćelije (označen zvezdicom). „Vakuolizacija” materijala od kog nastaje omotač jajne ćelije (strelica); b) dvoslojni omotač jajne ćelije; c) početak formiranja alveolarnog sloja formiranjem uvrata u donjem delu unutrašnjeg sloja; d) nastavak formiranja alveolarnog sloja prema površini omotača. Skraćenice: ss – spoljašnji sloj; us – unutrašnji sloj; as – alveolarni sloj. Skale = 20 μm .



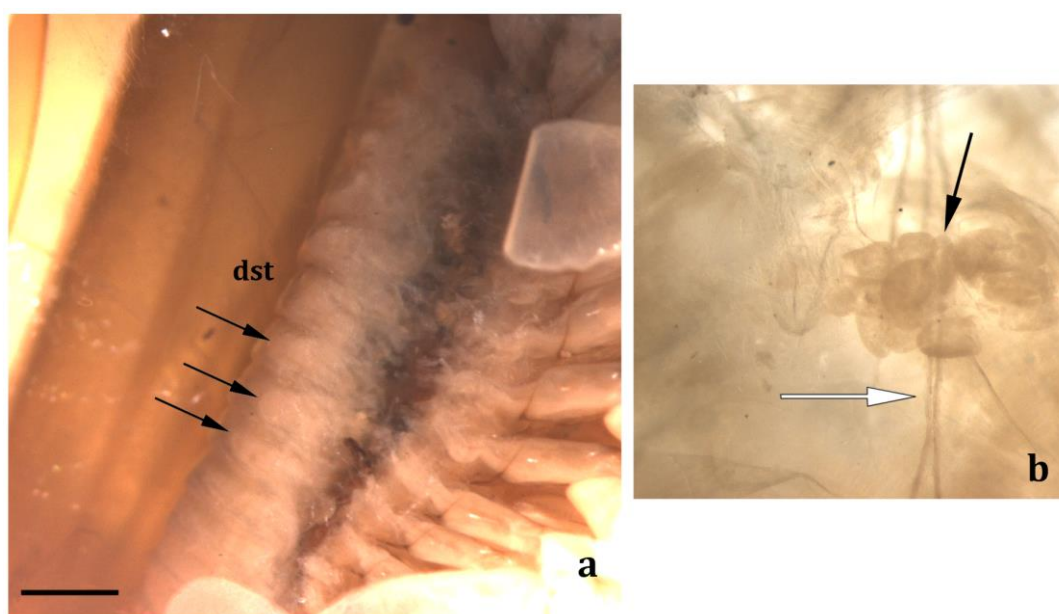
Slika 38. Formiranje i struktura omotača jajne ćelije. a) zrela oocita u folikularnom kanalu pri susretu sa materijalom za izgradnju omotača. U donjem delu slike se uočava dvoslojni omotač oko susedne oocite, sa tanjim spoljašnjim slojem (glava strelice); b) formiran omotač jajne ćelije. Na mestu odvajanja se uočava dvoslojna građa omotača. Omotač jajne ćelije se sastoji od spoljašnjeg sloja, perforiranog na površini (glava strelice), i unutrašnjeg alveolarnog sloja. Skraćenice: m_ojć – materijal za izgradnju omotača jajne ćelije; ss – spoljašnji sloj omotača; as – alveolarni sloj. Skale = 20 μm .

Dalje promene obuhvataju formiranje uvrata u unutrašnjem sloju omotača jajne ćelije, često potkovičastog oblika, i to prvo u delu do membrane oocite (Slika 37c, d). Na ovaj način započinje formiranje alveolarnog sloja. Alveole se formiraju od unutrašnjeg dela omotača prema površini tako da se na kraju formira debeli alveolarni sloj, prosečne debljine oko 23.7 μm . Nakon opisanih strukturnih promena, tercijarni omotač jajeta se sastoji od dva sloja –

spoljašnjeg sloja perforiranog na površini, debljine oko 2.5 μm , i unutrašnjeg alveolarnog sloja (Slika 38b). Nakon formiranja alveolarnog sloja, prosečna ukupna debljina omotača jajne ćelije se uvećava i iznosi oko 26.5 μm . Važno je napomenuti da zbog osobine materijala za izgradnju omotača jajne ćelije da pokazuje osobine alveolizacije još u samom lumenu kanala, primećeno je da je omotač u nekim delovima ispunjen sitnim okruglastim šupljinama i pre početka formiranja konačnog omotača jajne ćelije. Omotač je potpuno formiran do perioda kada se jajne ćelije spuštaju u jajne kese.

4.4.4. Morfo-anatomska i histološka građa gonada mužjaka vrste *L. couesii*

Izduženi testisi se pružaju od početnog dela toraksa, odmah iza glavenog regiona, do jedanaestog torakalnog segmenta. Beličasti su i poluprovidni, i pokazuju razgranat i režnjeviti izgled, sa režnjevima koji se pružaju dorzolateralno u toraksu (Slika 39a). Vrećaste režnjeve testisa karakteriše veoma nežna, gotovo rastresita građa (Slika 39b).

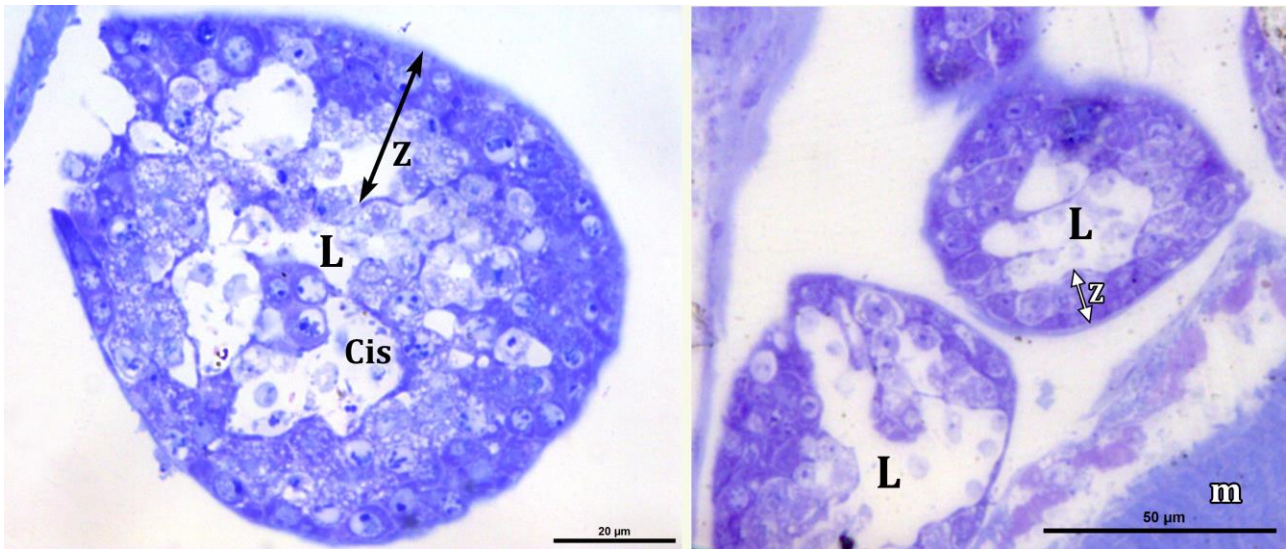


Slika 39. Morfološki izgled gonade mužjaka *L. couesii*. a) lateralni prikaz toraksa mužjaka sa strelicama koje prikazuju pravac pružanja testisa. Skraćenice: dst – dorzalna strana toraksa. Skala = 1 mm; b) izolovani režnjevi testisa (strelica) i uzdužni kanal testisa (bela strelica), ispresavijan više puta. Slika nije skalirana.

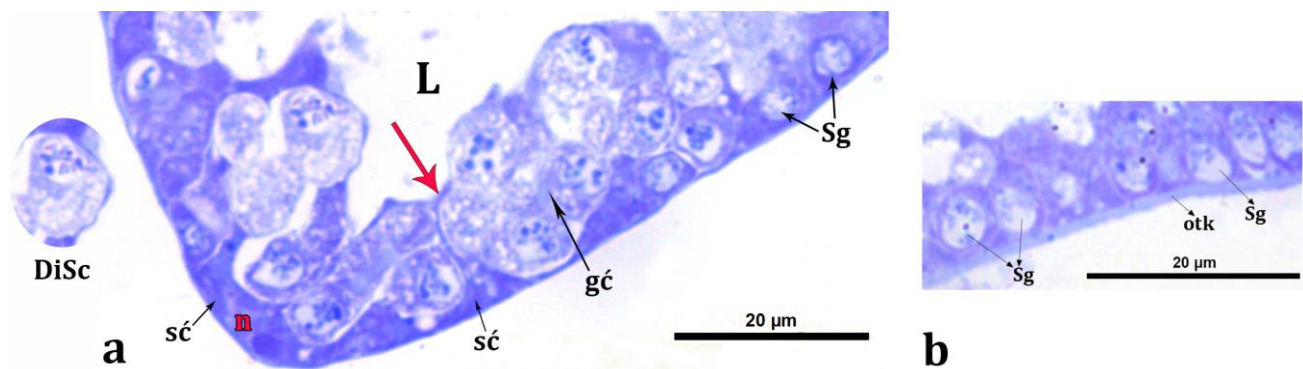
Testisi zauzimaju veliki deo zapremine toraksa gde se nalaze pričvršćeni za telesni zid. Duž testisa se pruža uzdužni kanal kojim se spermatozoidi sprovode i izbacuju u spoljašnju sredinu, verovatno radom telesnih mišića (Slika 40b). Kanal takođe karakteriše veoma nežna građa.

Histološkim analizama gonada mužjaka dobijeni su podaci o građi testikularnih kanalića. Svaki kanalić se sastoji od zida i centralnog lumena (Slika 40a, b). U zavisnosti od histološkog preseka, lumen nije uvek jasno uočljiv. Testikularne kanaliće obavlja definisan omotač, debljine oko 0.6 μm (Slika 41b). Zid kanalića je građen od somatskih ćelija i nekoliko slojeva germinativnih ćelija. Somatske ćelije se uočavaju kao snažno obojene, izuvijane ćelije nepravilnog oblika, koje se u vidu citoplazmatskih nastavaka pružaju od bazalnog dela kanalića do samog lumena (Slika 41a). Karakteriše ih krupan nukleus u kom se uočava okruglasti nukleolus. Između somatskih ćelija se uočavaju raspoređene brojne germinativne ćelije u različitim fazama deobe (Slika 42). Ove ćelije se razlikuju prema veličini nukleusa i

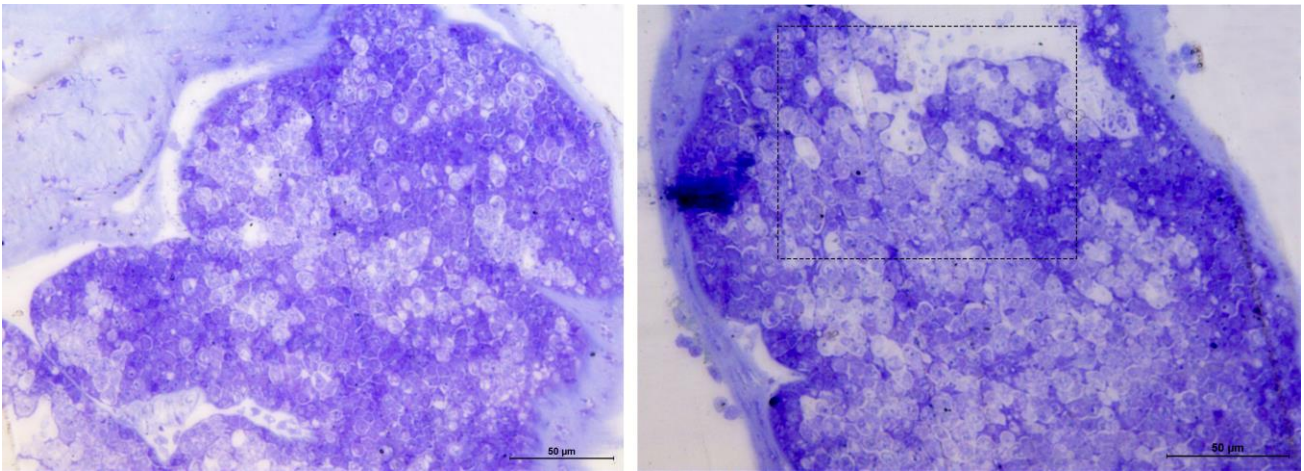
intezitetu obojenosti. U perifernom delu kanalića, u kontaktu sa omotačem testikulanog kanalića, nalaze se raspoređene krupne spermatogonije. Karakteriše ih izrazito velik nukleus sa razuđenim hromatinom, kao i relativno tamna citoplazma (Slika 41a, b). Deobom ovih ćelija nastaju spermatocite koje su uglavnom raspoređene bliže unutrašnjem delu kanalića. Spermatocite imaju nešto svetliju citoplazmu, sa nukleusom koji pokazuje organizaciju hromozomskog materijala karakterističnu za mejotičku deobu (Slike 41a, 44a, b). Pretpostavlja se da se deobom spermatocita formiraju spermatide. Sazrevanje spermatida do spermatozoida se očigledno odvija prema cističnom tipu, tipičnom za grupu Notostraca (Wingstrand, 1978). Ciste se formiraju između susednih somatskih ćelija i unutar njih se grupiše 8–12 spermatida (Slike 40a, 43). Po sazrevanju, ciste se otvaraju u lumen kanalića u koji se oslobađaju zreli spermatozoidi (Slike 40b, 43). Spermatozoidi predstavljaju jednostavne ćelije ovalnog ili elipsoidnog oblika, dimenzija 3.7–5 μm (Slika 43). Okruglasti nukleus spermatozoida se jasno uočava i pozicioniran je centralno ili češće bliže jednom kraju ćelije.



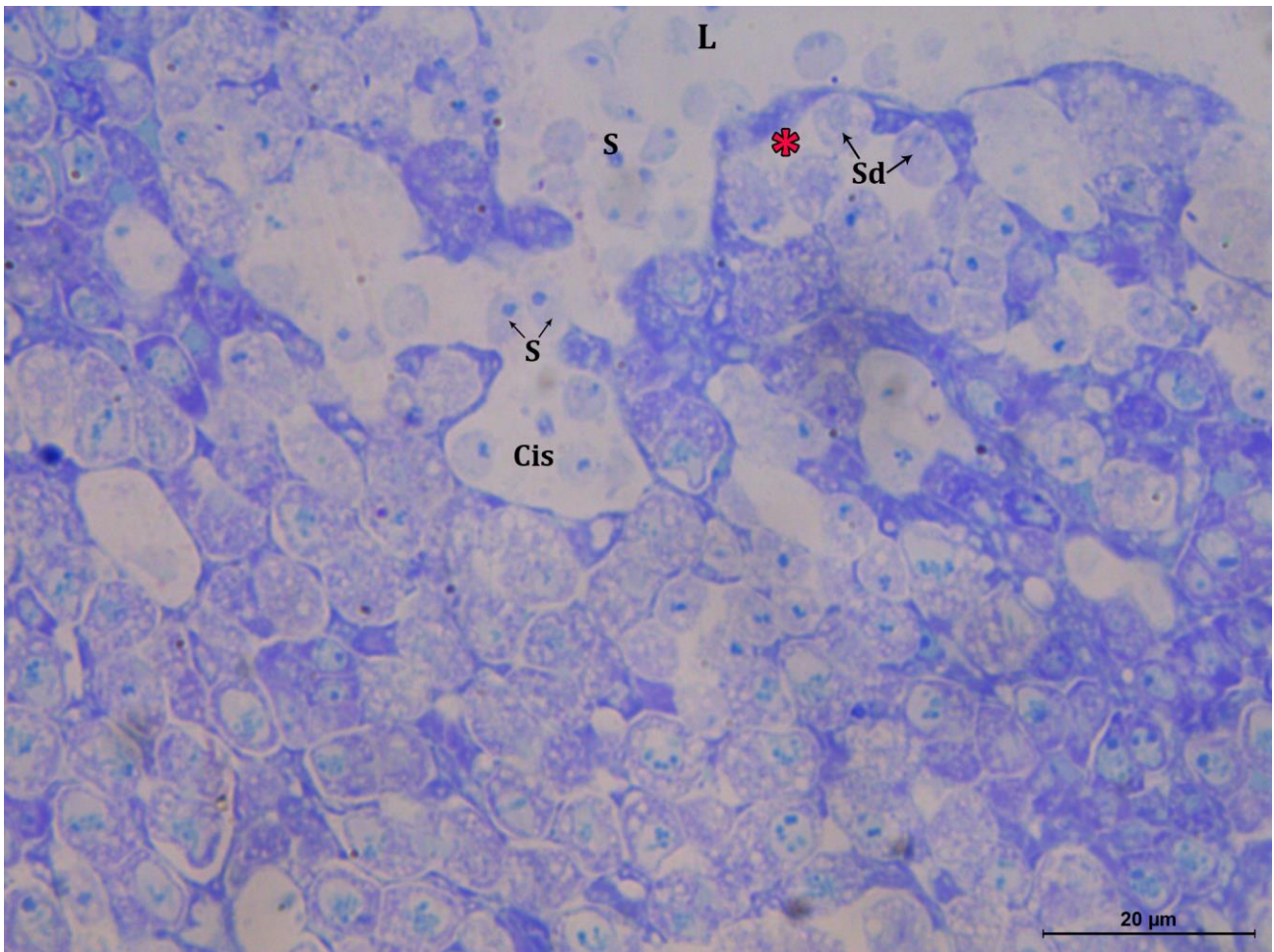
Slika 40. Poprečni presek u nivou testikularnih kanalića. Oznake: Z – zid testikularnog kanalića; L – lumen testikularnog kanalića sa vidljivim spermatozoidima; Cis – cista; m – mišić. Skale: a) 20 μm , b) 50 μm .



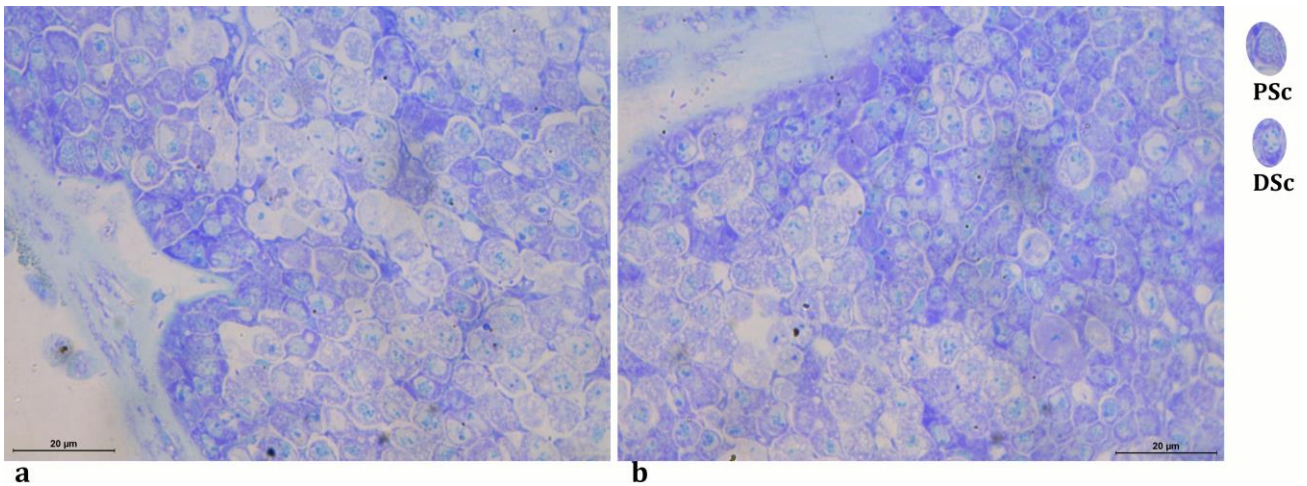
Slika 41. Histološka građa testikularnih kanalića. a) polutanki presek testikularnog kanalića; b) periferni deo testikularnog kanalića. Oznake: L – lumen testikularnog kanalića; sć – somatska ćelija (crvenom strelicom je označen citoplazmin nastavak somatske ćelije); n – nukleus somatske ćelije; gć – germinativne ćelije; Sg – spermatogonija; DiSc – spermatocita u pretpostavljenom stupnju dijakinezis; otk – omotač testikularnog kanalića. Skale = 20 μm .



Slika 42. Polutanki presek kroz testikularni kanalić u nivou germinativnih ćelija u različitim fazama deobe. Skale = 50 µm.



Slika 43. Polutanki presek testikularnog kanalića koji predstavlja zumirani deo Slike 42. Oznake: L – lumen testikularnog kanalića ispunjen spermatozoidima; Cis – cista koja se otvorila u lumen kanalića; Sd – spermotide; S – spermatozoidi. Zvezdicom je obeležena cista ispunjena spermamidama u procesu sazrevanja, pre otvaranja u lumen kanalića. Skala = 20 µm.



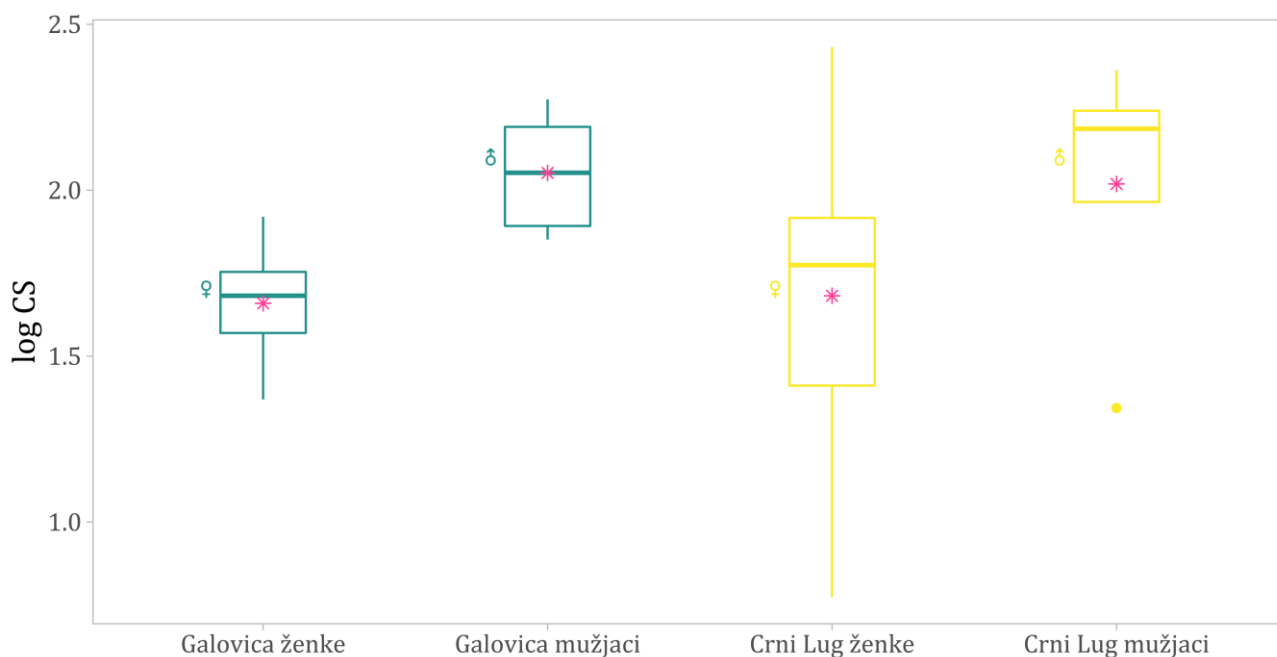
Slika 44. Testikularni kanalići sa brojnim germinativnim ćelijama u različitim fazama deobe. Desno su izdvojene spermatocite u pretpostavljenim stupnjevima mejotičke deobe. Oznake: PSc – spermatocita u pretpostavljenom stupnju pahiten; DSc – spermatocita u pretpostavljenom stupnju diploten. Skale = 20 µm.

4.5. Analize metodama geometrijske morfometrije

4.5.1. Variranje veličine i oblika telzona sa kaudalnom laminom

Efekat datuma uzorkovanja jedinki sa lokaliteta Crni Lug je procenjen na uzorku ženki. Datum uzorkovanja, modelovan unutar log CS, je pokazao statističku značajnost ($P = 0.002$), ali je opisao mali deo variranja oblika ($R^2 = 0.0299$), tako da se smatra da nije biološki značajan. Jedinke uzorkovane različitih godina su grupisane u jedinstven uzorak Crni Lug.

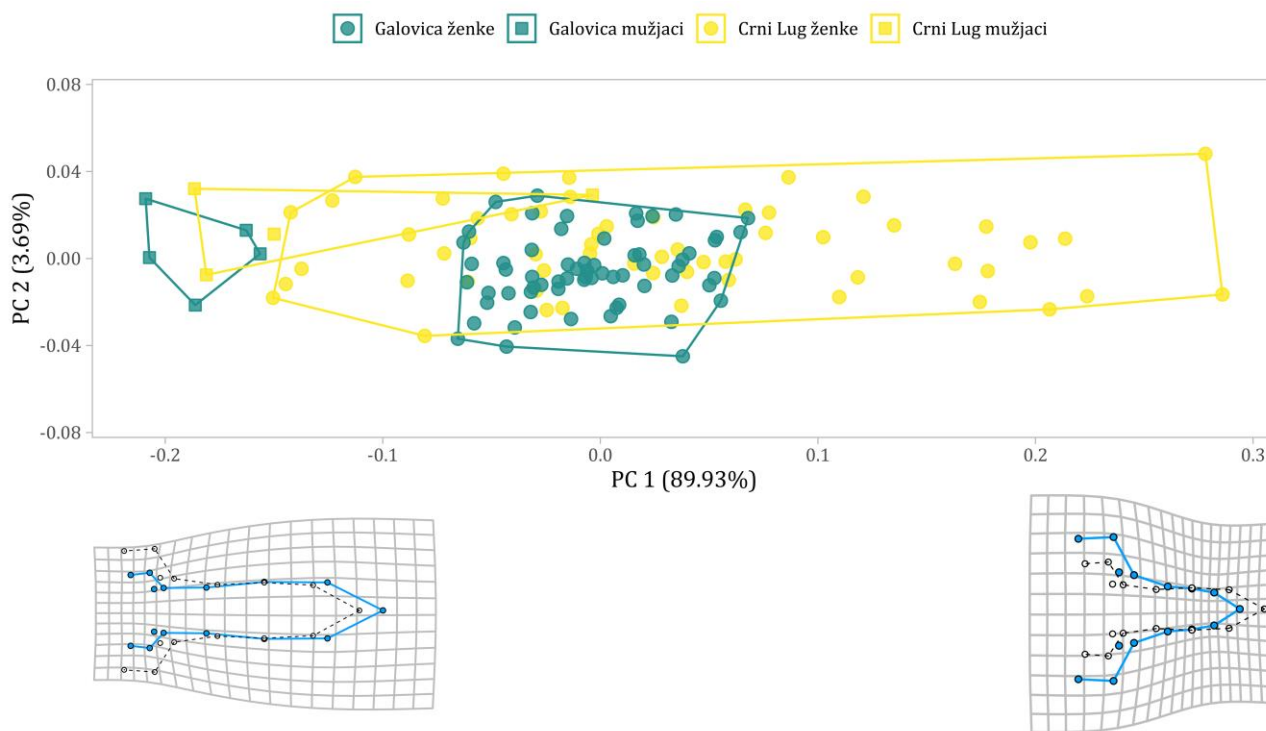
Grafički prikaz srednje vrednosti i variranja veličine telzona sa kaudalnom laminom (log CS) u uzorku koji obuhvata četiri grupe jedinki (Galovica ženke, Galovica mužjaci, Crni Lug ženke i Crni Lug mužjaci) predstavljen je na Slici 45.



Slika 45. Boks dijagram veličine telzona sa kaudalnom laminom za četiri grupe jedinki. Horizontalne unutrašnje linije predstavljaju medijane. Donja i gornja ivica pravougaonika (boksova) definišu prvi (Q1) i treći (Q3) kvartil i obuhvataju interkvartilni raspon (IQR). Vertikalne linije se pružaju do minimalnih ($Q1 - 1.5 * IQR$) i maksimalnih ($Q3 + 1.5 * IQR$) vrednosti. Zvezdicom je predstavljena srednja vrednost log CS za svaku grupu. Autlajer (engl. *outlier*) je obeležen ispunjenim kružićem i nalazi se na rastojanju većem od 1.5 vrednosti visine boksa ($> 1.5 * IQR$).

Ženke sa lokaliteta Crni Lug pokazuju najveći opseg variranja veličine telzona sa kaudalnom laminom i ovoj grupi pripadaju jedinke sa najvećim i najmanjim veličinama analizirane strukture u celokupnom uzorku. Ženke sa dva lokaliteta imaju približno iste srednje vrednosti veličine (srednja vrednost log CS), dok mužjaci prosečno imaju veći telzon sa kaudalnom laminom. Zbog velikih razlika u karakteristikama uzorka ženki sa dva lokaliteta – ženke sa lokaliteta Galovica pripadaju približno istoj uzrasnoj kategoriji, dok ženke iz Crnog Luga pripadaju različitim uzrasnim kategorijama, statističke razlike u veličini nisu razmatrane, dok su razlike u obliku kvantifikovane tek nakon uklanjanja efekta veličine iz uzorka.

Analiza glavnih komponenti (PCA) je pokazala da je čak 89.93% ukupnog variranja oblika u uzorku opisano prvom PC osom. Druga PC osa opisuje 3.69% variranja, dok je $\approx 99\%$ ukupnog variranja opisano sa prvih šest PC osa (Prilog Tabela 6). Posmatranjem PCA grafika, može da se uoči da se ženke sa lokaliteta Galovica nalaze unutar morfološkog prostora koji zauzimaju ženke iz Crnog Luga (Slika 46). Mužjaci i ženke sa lokaliteta Galovica su potpuno razdvojeni, dok su mužjaci iz Crnog Luga takođe odvojeni od ženki, osim mužjaka manjih dimenzija (autlajer, Slika 45), koji se nalazi u morfološkom prostoru koji zauzimaju ženke. Morfološki prostori mužjaka sa dva analizirana lokaliteta se delimično preklapaju, ali uzorak nije dovoljno velik da bi se doneli jasni zaključci. Ono što još može da se primeti je da se mužjaci sa oba lokaliteta nalaze bliže ženkama koje pripadaju starijim uzrasnim kategorijama.

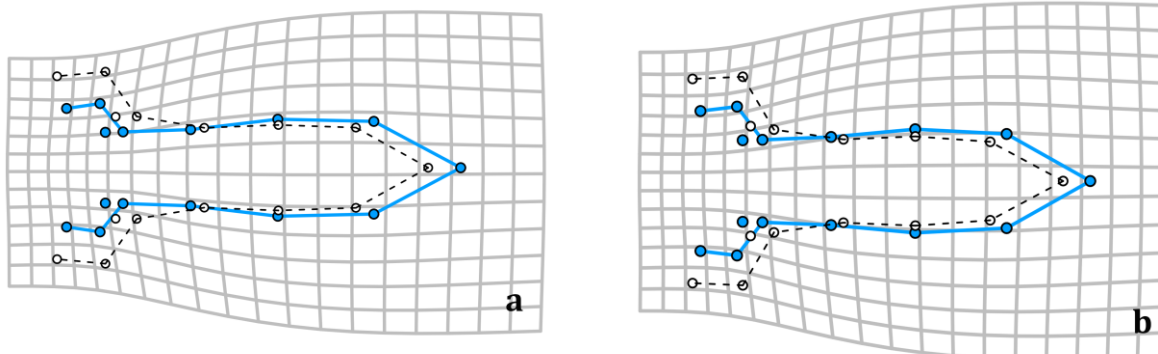


Slika 46. Grafički prikaz rasporeda jedinke (uzorak od 131 jedinke) u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugom glavnom komponentom. Jedinke su grupisane prema polovima i lokalitetu i oivičene poligonima (enlg. *convex hulls*). Promene oblika duž PC 1 ose su vizualizovane TPS metodom i predstavljene pomoću kontura oblika (engl. *wireframe*). Srednji oblik za celokupni uzorak je predstavljen isprekidanom linijom, dok su plavim linijama predstavljene konture oblika koji odgovaraju ekstremnim vrednostima na PC 1 osi. Radi lakšeg razumevanja promena oblika, prikazane su i tačke i polutačke (srednji oblik – prazni krugovi; oblici na krajevima PC 1 ose – plavi krugovi).

Oblik koji odgovara maksimalnoj negativnoj vrednosti na PC 1 osi pokazuje suženiji telzon u odnosu na srednji oblik celokupnog uzorka, kao i izduženiju kaudalnu laminu, dok se širina kaudalne lamine ne menja mnogo (Slika 46). Kada posmatramo oblik na drugom kraju PC 1 ose (maksimalna vrednost PC 1), jedinke imaju širi telzon u odnosu na srednji oblik i kraću kaudalnu laminu. Širina kaudalne lamine i u ovom slučaju nije mnogo izmenjena.

Galovica

Crni Lug



Slika 47. Polni dimorfizam u obliku telzona sa kaudalnom laminom prisutan u populacijama *L. couesii* sa dva lokaliteta. a) razlike između srednjih vrednosti oblika ženki i mužjaka sa lokaliteta Galovica; b) razlike između srednjih vrednosti oblika ženki i mužjaka sa lokaliteta Crni Lug. Srednji oblik ženki je predstavljen isprekidanom linijom, dok su plavim linijama predstavljene konture srednjeg oblika mužjaka.

Poredeći prosečni polni dimorfizam jedinki sa dva lokaliteta, uočava se da su u obe populacije prisutni slični obrasci razlika u obliku. Na osnovu raspoloživog uzorka, primećuje se da mužjaci imaju uži telzon u odnosu na ženke, kao i dužu i blago širu kaudalnu laminu (Slika 47a, b).

4.5.2. Ontogenetska alometrija ženki i alometrijski obrasci promena oblika telzona sa kaudalnom laminom

Kao što je već navedeno, statističke analize su urađene jedino na uzorku ženki sa dva lokaliteta. Rezultati Prokrustove ANOVA za testiranje efekta veličine, odnosno prisustva alometrije, kao i efekta lokaliteta (populacije), prikazani su u Tabeli 5.

Tabela 5. ANOVA tabela za linearni model koji ispituje efekat veličine (log CS), populacije (lokaliteta) i njihove interakcije na oblik telzona sa kaudalnom laminom (simetrična komponenta oblika).

	Df	SS	MS	R ²	F	Z	P
log CS	1	0.6947	0.6947	0.7661	503.2981	6.2246	0.001
Populacija	1	0.0596	0.0596	0.0657	43.1683	5.7899	0.001
log CS x Populacija	1	0.0024	0.0024	0.0026	1.7388	1.1404	0.129
Reziduali	118	0.1629	0.0014	0.1796			
Ukupno	121	0.9068					

Oznake: Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – sredina kvadrata; R² – koeficijent determinacije; F – F vrednost; Z – veličina efekta (broj standardnih devijacija F distribucije); P – nivo statističke značajnosti. Statistički značajne vrednosti su boldovane.

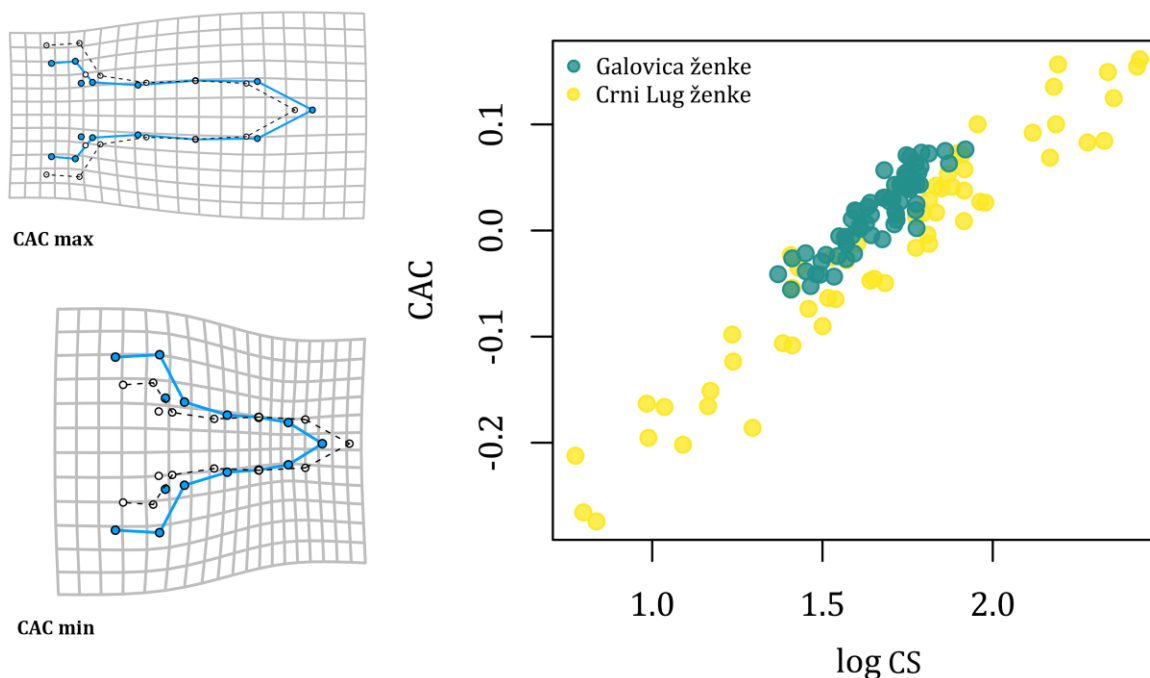
Efekat veličine je statistički značajan i opisuje veliki deo variranja oblika (R² = 0.7661, P = 0.001), dok je faktor lokaliteta (populacije) takođe statistički značajan (P = 0.001) i opisuje manji deo variranja (R² = 0.0657). Interakcija veličine i populacije nije statistički značajna (P = 0.129) i opisuje neznatan deo variranja (R² = 0.0026; Z = 1.1404), što ukazuje na prisustvo istih obrazaca alometrije za dve grupe ženki. Kao finalni model izabran je LM koji uključuje veličinu kao kovarijablu (log CS) i faktor populacije (bez interakcije). Post hoc poređenja srednjih oblika (engl. *LS means* – srednji oblik za srednju veličinu) ženki sa dva lokaliteta (koji su korigovani za alometriju), potvrđuju statistički značajnu razliku u obliku dve grupe ženki (Tabela 6), što je u skladu sa grafikom glavnih komponenti (Slika 50).

Tabela 6. Prokrustova distanca između srednjih vrednosti oblika ženki sa dva lokaliteta (ukoliko se uzmu u obzir isti obrasci alometrije za dve populacije ženki).

	d	UCL	Z	P
Crni Lug:Galovica	0.0443	0.0124	5.4484	0.001

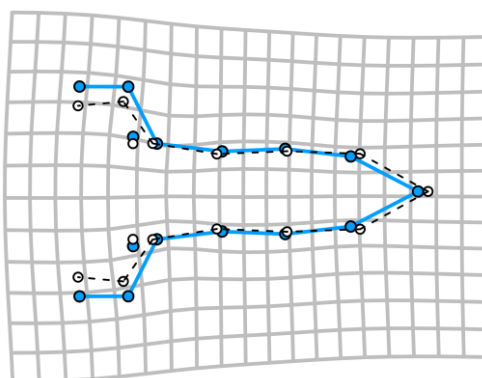
Oznake: d – Prokrustova distanca; UCL – (95%) gornja granica intervala poverenja za d; Z – veličina efekta; P – vrednost dobijena pomoću RRPP (999 ponavljanja).

Alometrijski obrasci promena oblika za ženke predstavljeni su na Slici 48. Ontogenetske promene oblika telzona sa kaudalnom laminom ženki se ogledaju u smanjivanju širine telzona i izduživanju kaudalne lamine tokom rasta jedinki, dok širina kaudalne lamine ostaje približno ista (Slika 48).



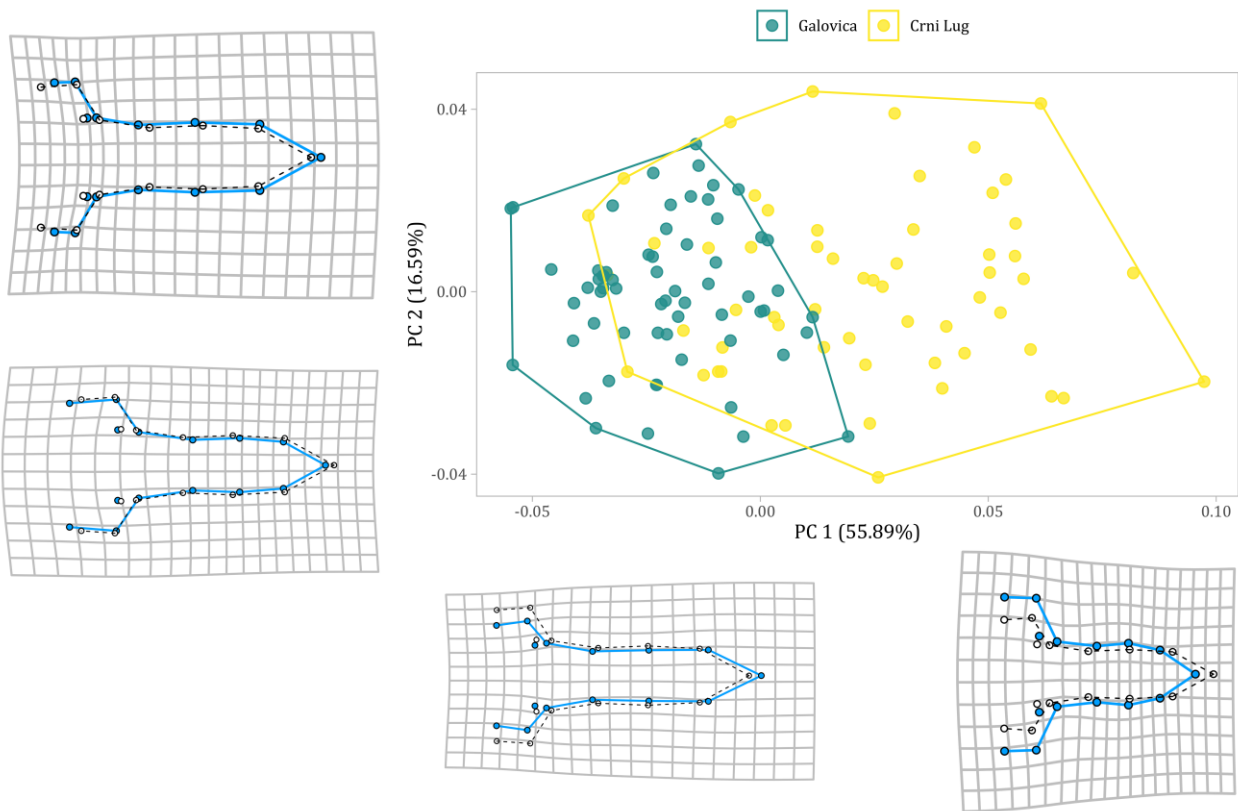
Slika 48. Grafik kovariranja veličine ($\log CS$) i oblika (simetrične komponente) za uzorak ženki. Jedinke su projektovane na ocenjen zajednički vektor alometrije za dve grupe ženki (engl. *common allometric component, CAC*). Promene oblika za minimalnu i maksimalnu CAC vrednost su prezentovane TPS metodom i pomoću kontura oblika. Isprekidanom linijom je predstavljen srednji oblik za uzorak ženki, dok su plavim linijama predstavljene konture min/max CAC vrednosti.

Poredeći srednje vrednosti oblika (engl. *LS means*) ženki sa dva lokaliteta, može da se uoči da se razlike uglavnom ogledaju u razlikama u obliku telzona. Ženke sa lokaliteta Crni Lug imaju širi telzon u odnosu na ženke sa lokaliteta Galovica, kao i blago kraću kaudalnu laminu (Slika 49).



Slika 49. Razlike u srednjem obliku telzona sa kaudalnom laminom između ženki sa dva lokaliteta, nakon uklanjanja efekta veličine. Srednji oblik ženki sa lokaliteta Galovica je predstavljen isprekidanom linijom, dok plave linije opisuju konture srednjeg oblika ženki sa lokaliteta Crni Lug. Promene oblika su uvećane dva puta radi bolje vizuelne prezentacije.

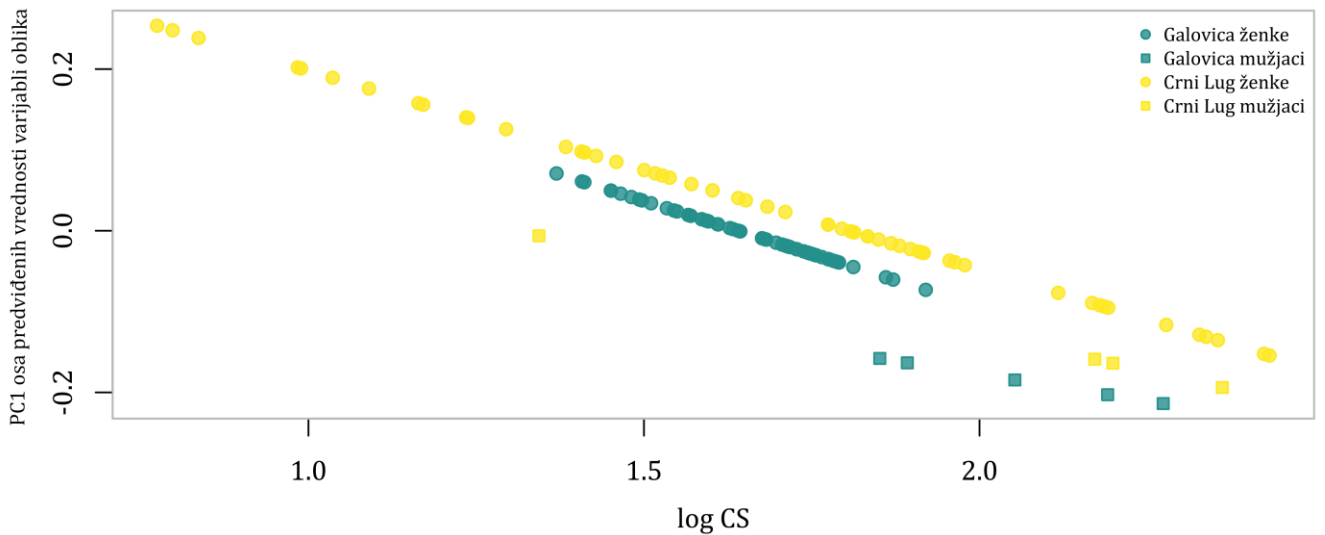
S obzirom na veliki uticaj alometrije na oblik telzona sa kaudalnom laminom, i uzevši u obzir da ženke sa dva lokaliteta imaju iste obrazce alometrije, moguće je uklanjanje efekta alometrije i sprovođenje analize glavnih komponenti reziduala poreklom od lineranog modela koji je definisan samo veličinom kao kovarijablom. Iako se morfološki prostori koje zauzimaju dve grupe ženki delimično preklapaju, PCA analiza potvrđuje postojanje razlika u obliku analizirane strukture čak i nakon uklanjanja efekta veličine iz uzorka ženki.



Slika 50. Grafički prikaz rasporeda ženki (uzorak od 122 jedinke) u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugim glavnom komponentom. Ženke su grupisane prema lokalitetu i oivičene poligonima (enlg. *convex hulls*). Promene oblika duž PC 1 ose su vizualizovane TPS metodom i predstavljene pomoću kontura oblika (engl. *wireframe*). Srednji oblik ženki je predstavljen isprekidanom linijom, dok su plavim linijama predstavljene konture oblika koji odgovaraju ekstremnim vrednostima na PC 1 i PC 2 osi. Radi lakšeg razumevanja promena oblika, prikazane su i tačke i polutačke (srednji oblik – prazni krugovi; oblici na krajevima PC osa – plavi krugovi). Promene oblika su uvećane dva puta radi bolje vizuelne prezentacije.

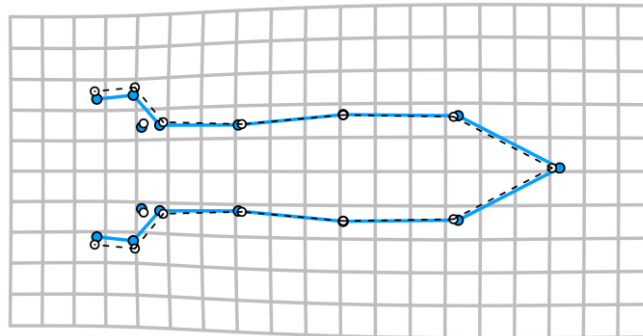
Prva glavna komponenta opisuje 55.89% ukupnog variranja oblika koje nije uslovljeno variranjem veličine, dok je dodatnih 16.59% opisano drugim glavnom komponentom (Prilog Tabela 7). Posmatrajući promene oblika duž dve PC ose, uočava se da su razlike u obliku kaudalne lamine manje izražene i da se jedinke raspoređuju prema obliku telzona (Slika 50). Duž PC 1 ose se razdvajaju jedinke koje imaju užu telzon u odnosu na srednji oblik ženki i malo dužu kaudalnu laminu (negativni deo PC 1 ose) i jedinke koje imaju širi telzon u odnosu na srednji oblik, kao i nešto kraću kaudalnu laminu (pozitivni deo PC 1 ose). Razlike u obliku duž PC 2 ose se ogledaju u malo dužem telzonu u odnosu na srednji oblik (ivice telzona koje opisuje specifične tačke 12, 14 i 13, 15) i blago suženoj kaudalnoj lamini (jedinke u negativnom delu PC 2 ose). Jedinke na drugom kraju PC 2 ose imaju malo kraći telzon i blago širu kaudalnu laminu u odnosu na srednji oblik ženki.

Iako statističko utvrđivanje razlika u alometrijskim promenama oblika telzona sa kaudalnom laminom ženki i mužjaka nije moguće, grafičko predstavljanje alometrijskih prava za četiri grupe jedinki može da pruži uvid u moguće obrasce alometrijskih promena (Slika 51, Prilog Slika 3).



Slika 51. Vizualizacija alometrijskih promena oblika telzona sa kaudalnom laminom za četiri grupe jedinki. Grafik prikazuje zavisnost veličine (log CS) i prve glavne komponente predviđenih oblika za ženke i mužjake sa dva lokaliteta.

Pored paralelnih alometrijskih prava karakterističnih za ženke poreklom sa dva lokaliteta, grafik ukazuje na to da alometrijske prave mužjaka imaju manji nagib u odnosu na ženke, odnosno da su promene oblika potencijalno manje izražene tokom rasta mužjaka. Ovo bi značilo da ženke odlikuje veća morfološka varijabilnost u poređenju sa mužjacima sličnih dimenzija. Takođe, deluje da alometrijske prave mužjaka i ženki konvergiraju, tj. da, posmatrajući ženke i mužjake većih dimenzija (starije uzrasne kategorije), oblik telzona sa kaudalnom laminom postaje sličniji između polova. Ova pretpostavka se poklapa i sa uočenim obrascima razlika oblika – starije ženke imaju relativno uzan telzon i izduženu kaudalnu laminu, slično kao mužjaci (Slike 51, 52).



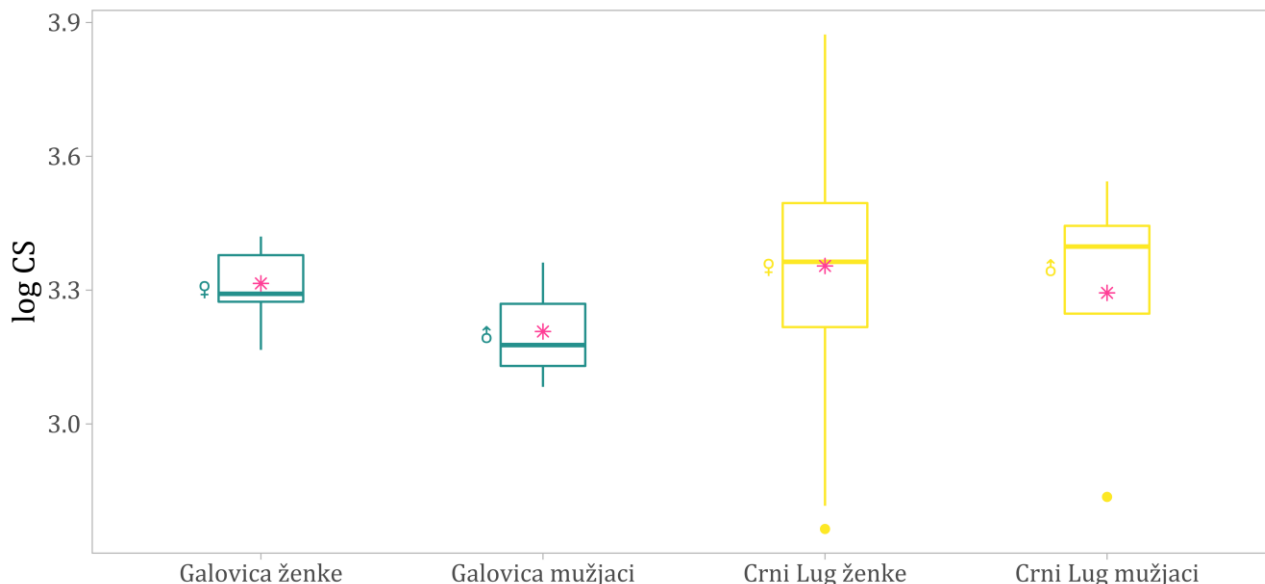
Slika 52. Razlike u obliku telzona sa kaudalnom laminom između ženke sa najvećom vrednosti log CS i mužjaka sa najvećom vrednosti log CS u celokupnom uzorku. Oblik za ženu je predstavljen isprekidanom linijom, dok su konture oblika za mužjaka predstavljene plavim linijama.

4.5.3. Variranje veličine i oblika karapaksa

Ispitivanjem efekta datuma uzorkovanja na uzorku ženki sa lokaliteta Crni Lug, pokazano je da model u kom je datum uzorkovanja definisan kao slučajni faktor, pa čak i kao fiksni faktor, ne objašnjava morfološko variranje karapaksa bolje od linearnog modela koji uključuje samo veličinu karapaksa kao kovarijablu. Model jednostavne alometrije (Oblik \sim log CS) objašnjava oko 9% variranja oblika, dok uključivanje datuma uzorkovanja u LM povećava

udeo opisanog variranja, ali efekat ovog faktora nije statistički značajan. Jedinke uzorkovane različitih godina su razmatrane kao jedinstven uzorak Crni Lug.

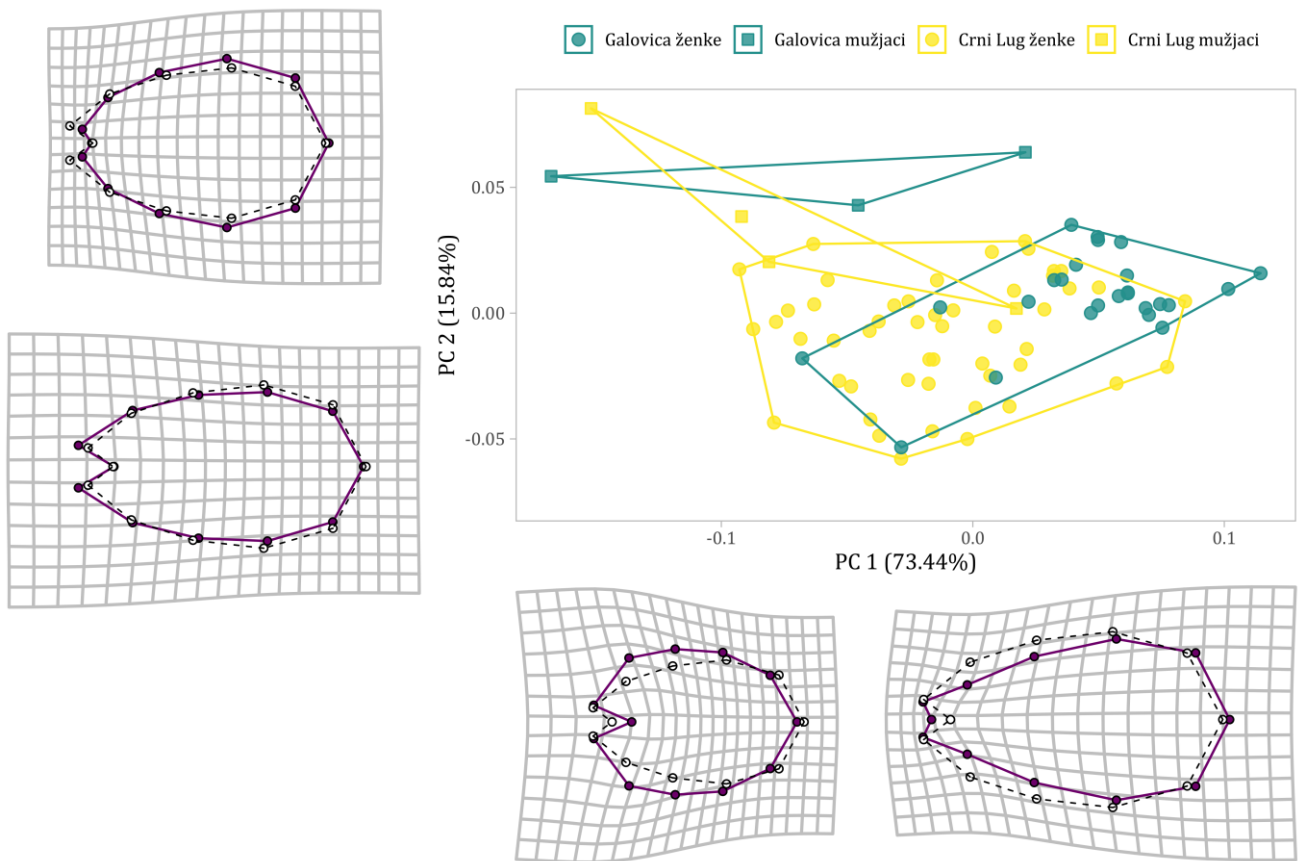
Grafički prikaz srednje vrednosti i variranja veličine karapaksa u celokupnom uzorku (grupe: Galovica ženke, Galovica mužjaci, Crni Lug ženke i Crni Lug mužjaci) predstavljen je na Slici 53.



Slika 53. Boks dijagram veličine karapaksa (log CS) za četiri grupe jedinki. Horizontalne unutrašnje linije predstavljaju medijane. Donja i gornja ivica pravougaonika (boksova) definišu prvi (Q1) i treći (Q3) kvartil i obuhvataju interkvartilni raspon (IQR). Vertikalne linije se pružaju do minimalnih ($Q1 - 1.5 * IQR$) i maksimalnih ($Q3 + 1.5 * IQR$) vrednosti. Zvezdicom je predstavljena srednja vrednost log CS za svaku grupu. Autlajeri (engl. *outliers*) su obeleženi ispunjenim kružićem i nalaze se na rastojanju većem od 1.5 vrednosti visine boksa ($> 1.5 * IQR$).

Ženke sa lokaliteta Crni Lug pokazuju najveći opseg variranja veličine karapaksa. Na osnovu raspoloživog uzorka mužjaka može da se pretpostavi da je moguće prisustvo trenda manje srednje vrednosti veličine karapaksa mužjaka u odnosu na ženke. Precizniji zaključci mogu da se donesu jedino ukoliko bi se povećao broj analiziranih mužjaka. Slično kao pri razmatranju morfoloških karakteristika telzona sa kaudalnom laminom, zbog velikog variranja u uzorcima ženki sa dva lokaliteta, statističke razlike u veličini nisu razmatrane i razlike u obliku su kvantifikovane tek nakon uklanjanja efekta veličine iz uzorka.

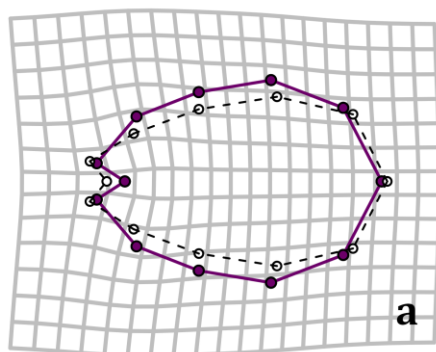
Analiza glavnih komponenti (PCA) je pokazala da je 73.44% morfološkog variranja oblika karapaksa u celokupnom uzorku opisano prvom glavnom komponentom, dok druga PC osa opisuje 15.84% prisutnog variranja (Slika 54, Prilog Tabela 8). Poredeći ženke, morfološko variranje je veće u grupi ženki sa lokaliteta Galovica. Morfološki prostori ženki se preklapaju, ali je veći broj ženki sa Galovice koncentrisan na pozitivnom delu PC 1 ose. Mužjaci zauzimaju drugi deo morfološkog prostora – naročito ukoliko se posmatraju ženke i mužjaci sa lokaliteta Galovica. Na negativnom delu PC 1 ose su jedinke koje karakteriše širi i kraći karapaks, dok se u pozitivnom delu PC 1 ose nalaze jedinke dužeg i suženog karapaksa. Promene oblika su koncentrisane i na anteriornom i posteriornom delu karapaksa. Posmatrajući drugu glavnu osu (PC 2), jedinke se razdvajaju prema konturama oblika kao i prema obliku posteriornog dela karapaksa. Jedinke u negativnom delu PC 2 ose imaju nešto užji karapaks u odnosu na srednji oblik i produžene posteriorne ivice karapaksa (opisane specifičnim tačkama 2–3 i 2–4), dok su na drugom kraju PC 2 ose jedinke sa blago širim karapaksom, kao i kraćim posteriornim ivicama karapaksa.



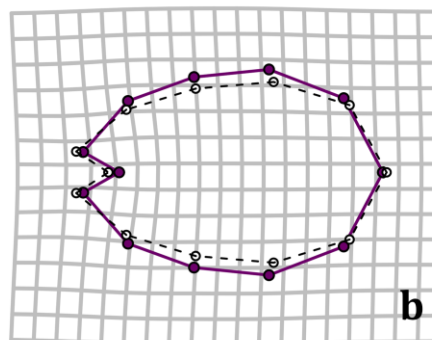
Slika 54. Grafički prikaz rasporeda jedinke (uzorak od 82 jedinke) u morfološkom prostoru definisanom prvom i drugim glavnom komponentom. Jedinke su grupisane prema polovima i lokalitetu i oivičene poligonima (enlg. *convex hulls*). Promene oblika duž PC 1 ose su vizualizovane TPS metodom i predstavljene pomoću kontura oblika (engl. *wireframe*). Srednji oblik je predstavljen isprekidanom linijom, dok su ljubičastim linijama predstavljene konture oblika koji odgovaraju ekstremnim vrednostima na PC 1 i PC 2 osi. Radi lakšeg razumevanja promena oblika, prikazane su i tačke i polutačke (srednji oblik – prazni krugovi; oblici na krajevima PC osa – ljubičasti krugovi).

Razlike u obliku između ženki i mužjaka iz obe populacije je moguće razmatrati jedino putem vizualizacije promena oblika. S obzirom na mali broj prikupljenih mužjaka, prikazan je samo očigledni (prisutni) polni dimorfizam u uzorku, ne obavezno i obrazac razlika u obliku prisutan u prirodnim populacijama.

Galovica



Crni Lug



Slika 55. Polni dimorfizam u obliku karapaksa prisutan u populacijama *L. couesii* sa dva lokaliteta. a) razlike između srednjih vrednosti oblika ženki i mužjaka sa lokaliteta Galovica; b) razlike između srednjih vrednosti oblika ženki i mužjaka sa lokaliteta Crni Lug. Srednji oblik karapaksa ženki je predstavljen isprekidanom linijom, dok su ljubičastim linijama predstavljene konture srednjeg oblika karapaksa mužjaka.

Deformacije mreže (TPS) ukazuju da su u obe populacije prisutni slični obrasci razlika u obliku karapaksa između polova (Slika 55 a, b). Mužjaci u proseku imaju širi i kraći karapaks u odnosu na srednji oblik karapaksa ženki.

4.5.4. Ontogenetska alometrija ženki i alometrijski obrasci promena oblika karapaksa

Rezultati Prokrustove ANOVA za testiranje efekta veličine na uzorku ženki sa dva lokaliteta, odnosno rezultati testiranja prisustva alometrije, kao i efekta lokaliteta (populacije), prikazani su u Tabeli 7.

Tabela 7. ANOVA tabela za linearni model koji ispituje efekat veličine (log CS), populacije (lokaliteta) i njihove interakcije na oblik karapaksa (simetrična komponenta oblika).

	Df	SS	MS	R ²	F	Z	P
log CS	1	0.0137	0.0137	0.0550	5.6944	2.4488	0.007
Populacija	1	0.0656	0.0656	0.2632	27.2550	3.9423	0.001
log CS x Populacija	1	0.0014	0.0014	0.0058	0.5970	-0.1369	0.553
Reziduali	71	0.1708	0.0024	0.6857			
Ukupno	74	0.2492					

Oznake: Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – sredina kvadrata; R² – koeficijent determinacije; F – F vrednost; Z – veličina efekta (broj standardnih devijacija F distribucije); P – nivo statističke značajnosti. Statistički značajne vrednosti su boldovane.

Suprotno od ontogenetskih promena oblika karakterističnih za telzon sa kaudalnom laminom, veličina opisuje znatno manji deo variranja oblika karapaksa (R² = 0.0550; F = 5.6944). Iako se nalazi na granici biološke značajnosti, efekat veličine pokazuje statističku značajnost (P = 0.007). S obzirom da je takođe utvrđeno da u uzorku ženki sa lokaliteta Crni Lug veličina opisuje 9.44% variranja (R² = 0.0944; P = 0.008), rast karapaksa može da se, na osnovu raspoloživih uzoraka, označi kao alometrijski.

Razlike između lokaliteta (populacija) opisuju mnogo veći deo variranja oblika (R² = 0.2632; F = 27.2550) i pokazuju statističku značajnost (P = 0.001). S obzirom da je pokazano

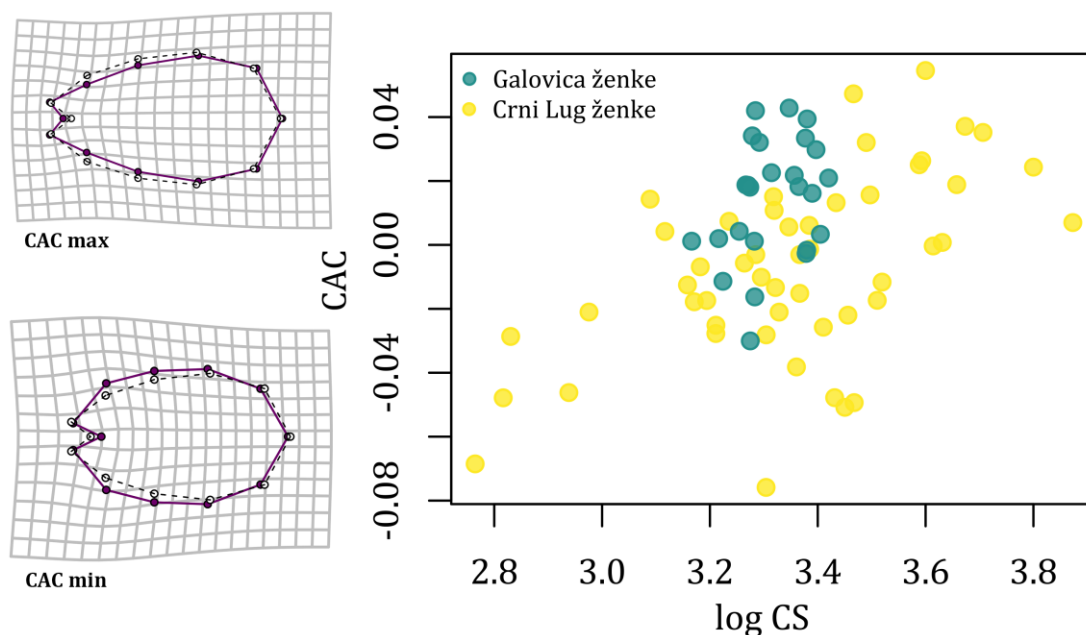
da interakcija između veličine i populacije nije statistički značajna ($P = 0.553$) i da opisuje neznatan deo variranja ($R^2 = 0.0058$), zaključeno je da se alometrijski obrasci promena oblika karapaksa ne razlikuju između populacija. Nakon definisanja adekvatnog linearnog modela (veličina kao kovarijabla i faktor populacije, bez interakcije), poređenje srednjih oblika karapaksa ženki sa dva lokaliteta, korigovanih za efekat alometrije, pokazalo je da postoje statistički značajne razlike u obliku između dve grupe ženki (Tabela 8), što se poklapa sa predviđanjima PC grafika (Slika 54).

Tabela 8. Prokrustova distanca između srednjih vrednosti oblika karapaksa ženki sa dva lokaliteta (kada se uzmu u obzir isti obrasci alometrije za dve populacije ženki).

	d	UCL	Z	P
Crni Lug:Galovica	0.0630	0.0262	3.7399	0.001

Oznake: d – Prokrustova distanca; UCL – (95%) gornja granica intervala poverenja za d; Z – veličina efekta; P – vrednost dobijena pomoću RRPP (999 ponavljanja).

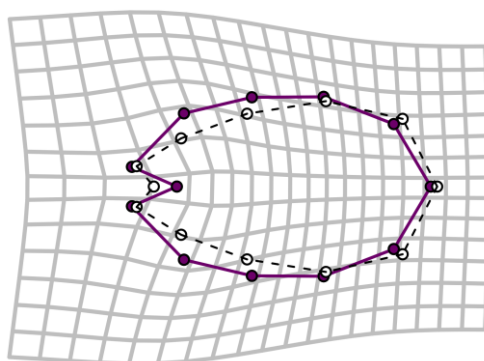
Alometrijske promene oblika karapaksa tokom ontogenije su predstavljene pomoću grafika koji prikazuje „zajedničku alometrijsku komponentu” centriranih srednjih vrednosti dve grupe ženki (Slika 56). Deformacije mreže (TPS) pokazuju da se tokom rasta jedinki oblik karapaksa sužava i blago izdužuje u odnosu na srednji oblik ženki. Promene su više orijentisane prema posteriornom delu karapaksa, na mestu gde su postavljene polutačke 5, 6, 9 i 10, dok je anteriorni deo karapaksa manje varijabilan u obliku.



Slika 56. Grafik kovariranja veličine ($\log CS$) i oblika (simetrične komponente) za uzorak ženki. Jedinke su projektovane na ocenjen zajednički vektor alometrije za dve grupe ženki (engl. *common allometric component, CAC*). Promene oblika za minimalnu i maksimalnu CAC vrednost su prezentovane TPS metodom i pomoću kontura oblika. Isprekidanom linijom je predstavljen srednji oblik za uzorak ženki, dok su ljubičastim linijama predstavljene konture jedinki sa min/max CAC vrednostima. Promene oblika su uvećane dva puta radi bolje vizuelne prezentacije.

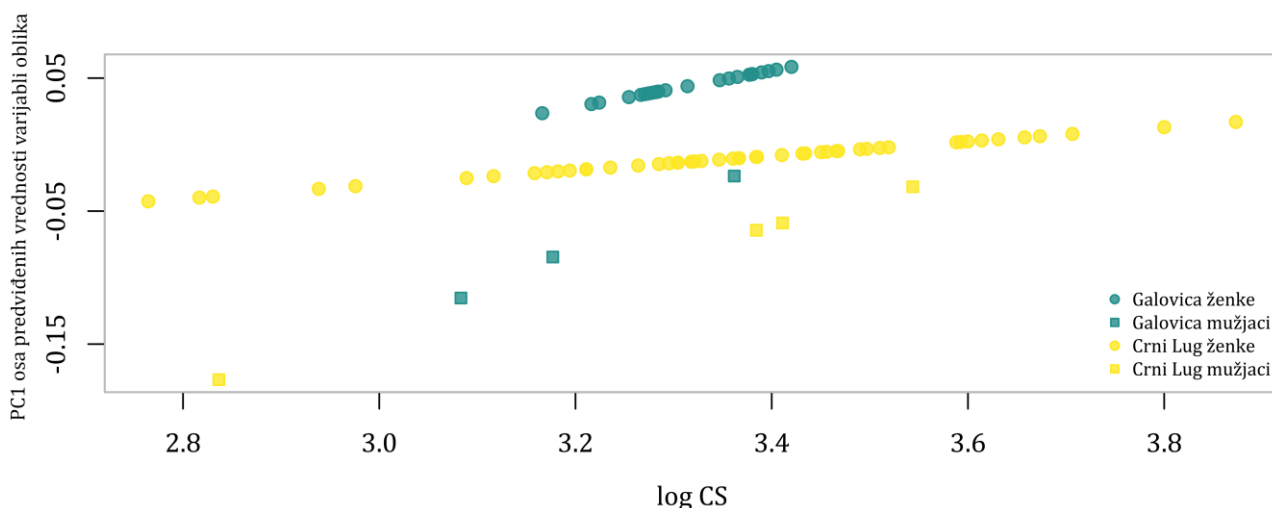
Opisane razlike u obliku između ženki sa dva lokaliteta mogu da se sumiraju predstavljanjem razlika u srednjem obliku (engl. *LS means*) dve grupe jedinki (Slika 57).

Navedeni oblici su korigovani za efekat (zajedničke) alometrije i predstavljaju srednji oblik za srednju veličinu date grupe jedinki. Jedinke sa lokaliteta Crni Lug imaju širi i kraći karapaks u odnosu na prosečni oblik karapaksa ženki sa lokaliteta Galovica.



Slika 57. Razlike između srednjih vrednosti oblika karapaksa ženki sa dva lokaliteta (nakon uklanjanja efekta alometrije). Isprekidanom linijom je predstavljen srednji oblik ženki sa lokaliteta Galovica, dok su ljubičastim linijama predstavljene konture srednjeg oblika ženki sa lokaliteta Crni Lug. Promene oblika su uvećane dva puta radi bolje vizuelne prezentacije.

Razmatranjem grafika koji prikazuje alometrijske promene oblika karakteristične za sve četiri grupe jedinki (Galovica ženke, Galovica mužjaci, Crni Lug ženke i Crni Lug mužjaci), deluje da mužjaci i ženke imaju različite alometrijske prave koje se potpuno ukrštaju (Slika 58). Mužjaci pokazuju veći nagib alometrijskih prava, što bi značilo da su alometrijske promene karapaksa mužjaka potencijalno izraženije. S obzirom na mali uzorak mužjaka, moguće je da je nagib alometrijskih prava mužjaka nešto drugačiji u odnosu na dobijene prave (Prilog Slika 4). Kao što je već navedeno, alometrijski obrasci promena oblika za mužjake su preliminarni rezultati.



Slika 58. Vizualizacija alometrijskih promena oblika za četiri grupe jedinki. Grafik prikazuje zavisnost veličine (log CS) karapaksa i prve glavne komponente predviđenih oblika karapaksa za ženke i mužjake sa dva lokaliteta.

4.6. Uočene telesne anomalije i njihova klasifikacija

U proučavanoj grupi jedinki uočene su telesne anomalije na karapaksu, abdomenu, ekstremitetima, telzonu sa kaudalnom laminom i cerkopodama (Tabela 9).

Tabela 9. Uočene anomalije u analiziranoj grupi jedinki. N_A – broj jedinki kod kojih je uočena određena abnormalnost.

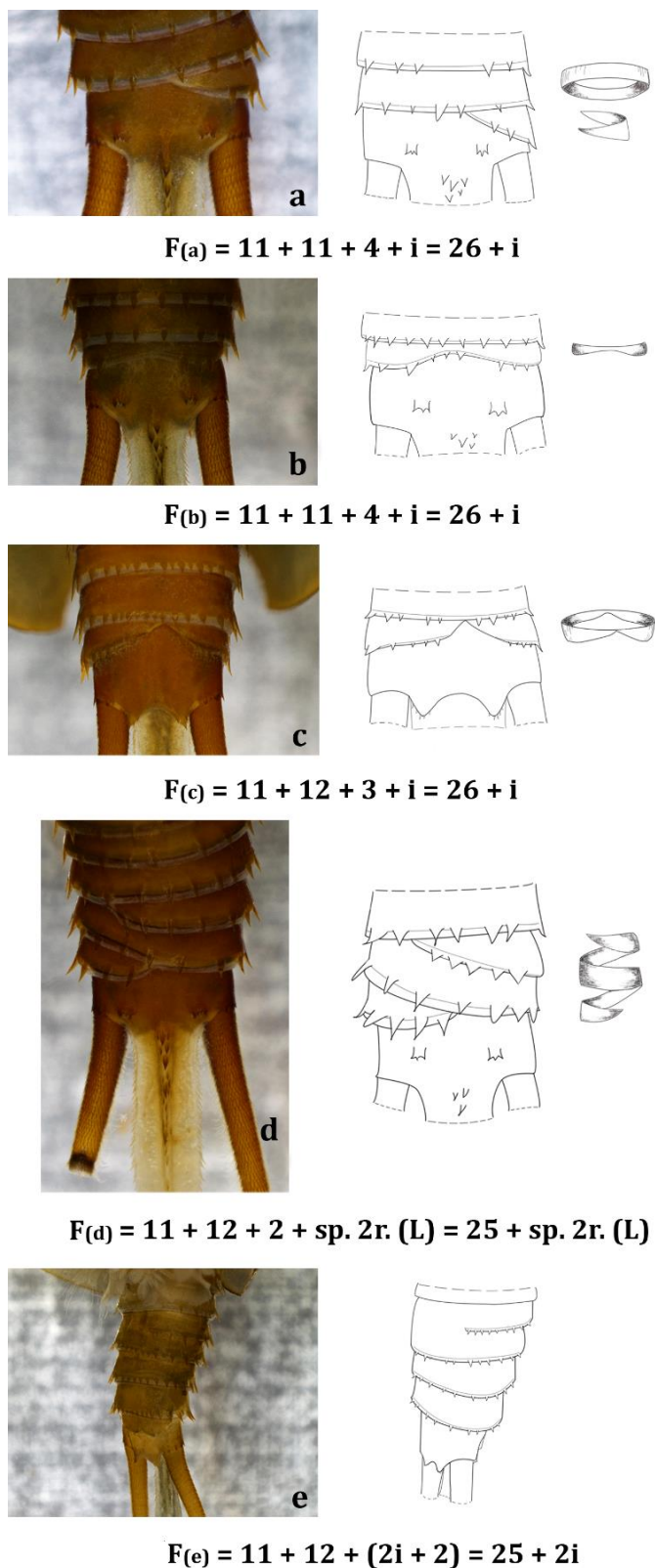
Anomalije	N _A	Udeo jedinki sa anomalijom u razmatranom uzorku (%)
MALFORMACIJE		
Nepotpuni prstenasti segmenti	26	12.15
Spiralan rast abdominalnih prstenastih segmenata	2	0.93
Asimetrična kaudalna lamina	15	7.04
Nepotpuno razvijeni cercopodi	3	1.60
DISRUPCIJE		
Ozlede karapaksa	31	16.85
Ozlede ekstremiteta	41	23.70
Ozlede telzona i kaudalne lamine	11	5.16
Ozlede cercopoda	9	4.81
Granule u ventralnoj glavenoj oblasti	28	15.47

Kod više od trećine pregledanih karapaksa jedinki (36.58%) pronađene su bodlje u malom broju, ili nekoliko malih okruglastih kvržica koje leže duž središnjeg nabora karapaksa (Slika 59). Kod određenog broja jedinki primećen je nepravilan raspored bodlji na zadnjoj ivici karapaksa (u predelu žleba), pogotovo u blizini terminalne bodlje.



Slika 59. Male bodlje i okruglaste kvržice na dorzalnoj središnjoj liniji karapaksa (označeno zvezdicom) (Iz: Šaganović et al., 2019).

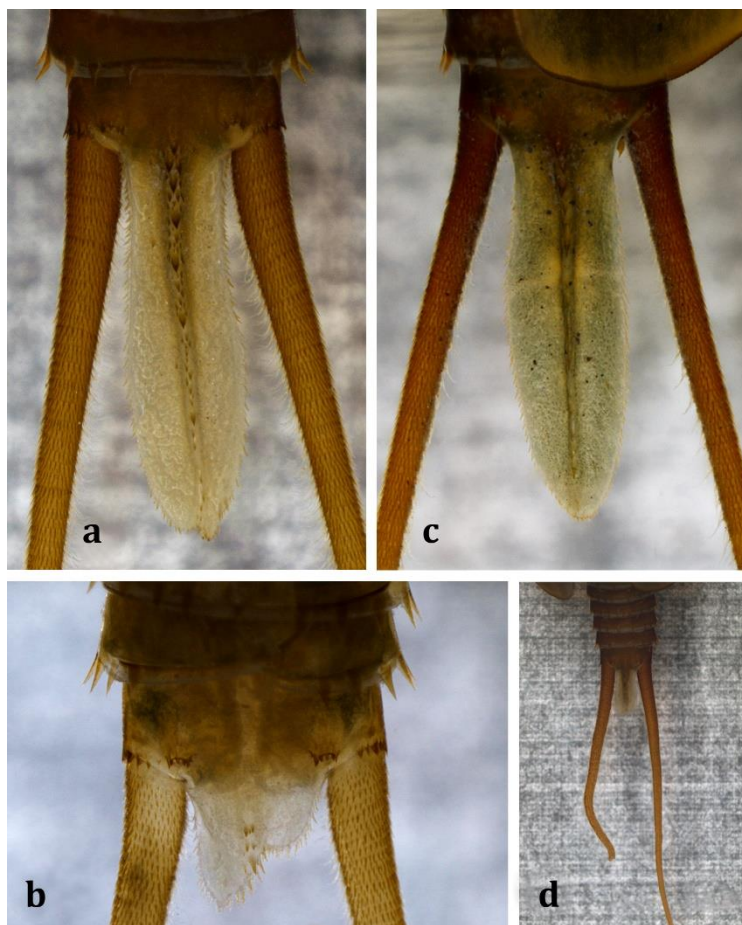
Takođe, uočeni su i nepravilno razvijeni regioni abdomena. Ove nepravilnosti uglavnom predstavljaju neusklađen obrazac segmentacije, čak i u okviru dorzalne i ventralne strane iste jedinke. Na istom staništu pronađene su jedinke normalnog rasta i jedinke sa skraćenim ili nepotpunim (asimetričnim) prstenastim segmentima. U nekim slučajevima redukcija je zahvatila polovinu prstenastog segmenta (Slika 60a, c, e). Kod nekih jedinki je došlo do delimične atrofije prstenastog segmenta, koji u obliku pločice („krljušti”) prekriva osnovu telzona (Slika 60b). Međutim, spiralni rast prstenastih segmenata nije često uočen (samo kod dve jedinke). Desnogira (R) spirala, koja opisuje malo više od dva kruga, pronađena je kod jedne jedinke. U drugom slučaju, uočena je levogira spirala (L) koja opisuje dva puna kruga (Slika 60d).



Slika 60. Primeri strukturnih promena, spiralnog rasta i nepotpunih abdominalnih prstenastih segmenata, predstavljenih Linderovom formulom (F). Skraćenice: i – nepotpuni abdominalni prstenasti segmenti; sp – spiralan rast; r – broj krugova koji opisuju prstenasti segmenti; L – levogira spirala prstenastih segmenata. Originalni crteži: I. Šaganović (Iz: Šaganović et al., 2019).

Kvalitativne analize distalnih delova tela pokazale su neslaganja između rasporeda bodlji desne i leve strane telzona iste jedinke. Razlike u broju bodlji uočene su i na dorzalnoj i

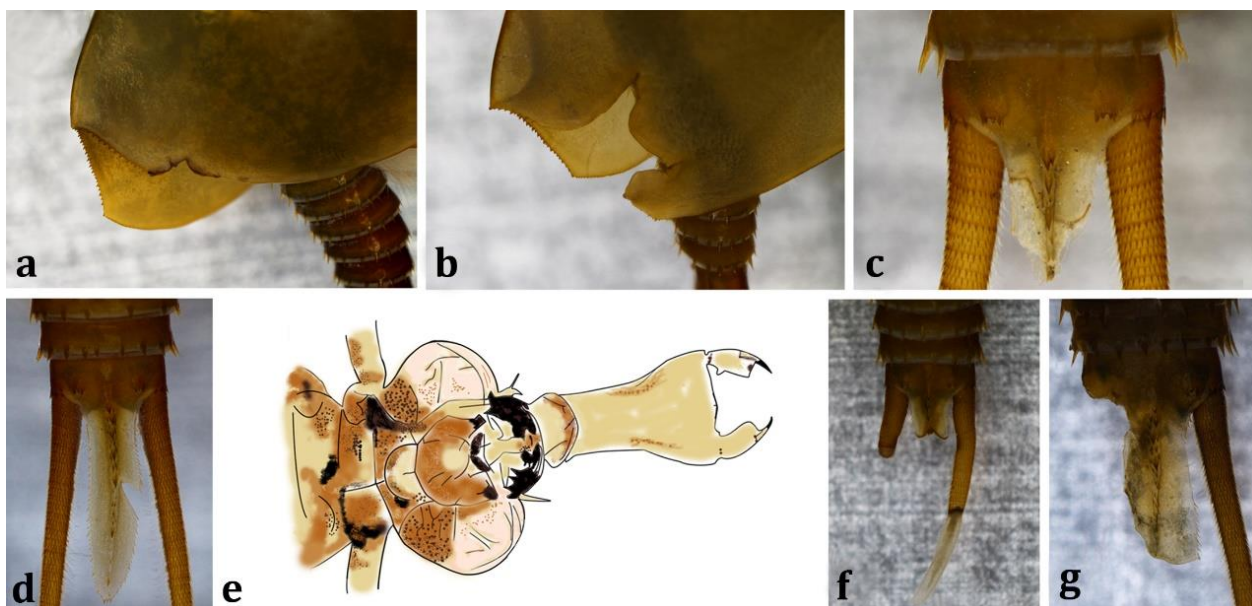
na ventralnoj strani telzona skoro kod svih jedinki. Takođe, kod nekih jedinki je uočena kaudalna lamina asimetričnog oblika (jasno vidljiva kod 7.04% razmatranih jedinki, Slika 61a, b), kao i nepotpuno razvijena (skraćena) cercopoda neuobičajenog izgleda (Slika 61d).



Slika 61. Neuobičajen izgled kaudalne lamine i cercopoda. a) asimetrična kaudalna lamina; b) nepotpuno razvijena kaudalna lamina; c) pigmentacija na kaudalnoj lamini; d) nepotpuno razvijena cercopoda (Iz: Šaganović et al., 2019).

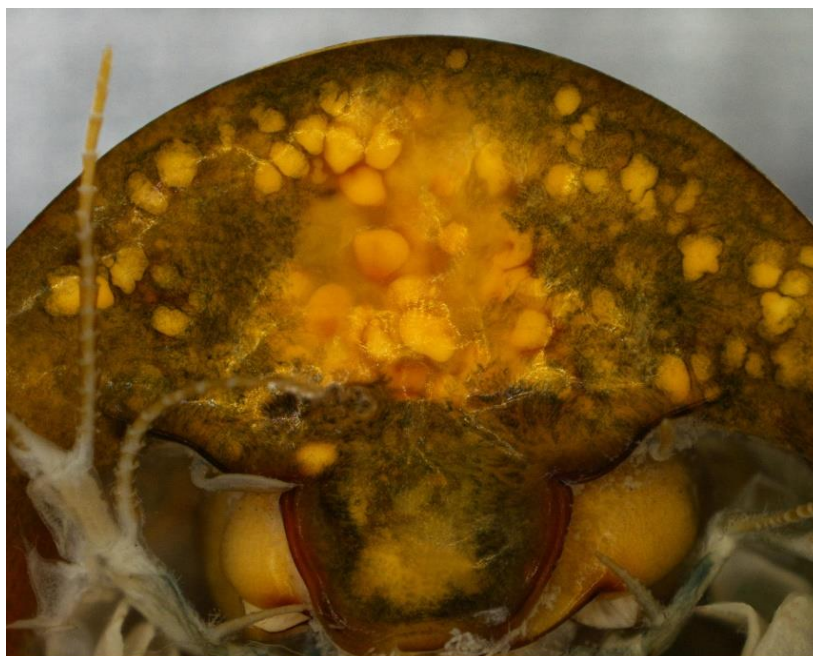
Kod nekih jedinki su primećeni drugi oblici anomalija različitog porekla, kao što su lezije, promene u boji tela, parazitska oboljenja i izrasline nalik na tumore. Ove promene su mogle da se prepoznaju na osnovu izmenjene morfologije i/ili hitinizovanih tamnijih ivica, kao i pojavom zadebljalog sloja tkiva (kalus) na mestu ozlede jedinke. Najčešće su uočene ozlede karapaksa (kod 16.85% razmatranih jedinki) i ekstremiteta (23.70%), zatim oštećenja telzona sa kaudalnom laminom (kod 5.16 % razmatranih jedinki) i cercopoda (ozlede i značajan gubitak dužine cercopoda uočene su kod 4.81% razmatranih jedinki). Značajna ozleda (gubitak) jedanaestog ekstremiteta, koji uključuje i gubitak jajne kese, uočena je samo kod dve jedinke.

U određenim slučajevima karapaks jedinki nije bio potpuno razvijen, odnosno došlo je do delimične redukcije desne ili leve strane karapaksa, verovatno pod uticajem činilaca različitog porekla. Na nekim karapaksima su se mogle uočiti rupe ili pukotine, praćene redukcijom dela karapaksa sa bodljama. Prema obliku ozleda, izgleda da je većina ozleda uzrokovana napadom predatora i/ili napadom drugih jedinki iste vrste (Slika 62). Neki karapaksi su imali slomljenu terminalnu bodlju.



Slika 62. Primeri ozleda različitih delova tela. a) i b) ozlede karapaksa; c) i d) ozlede kaudalne lamine; e) crtež larve Odonata sa ispruženim mandibulama (potencijalni predator na prirodnom staništu, crtež: I. Šaganović); f) i g) ozlede kaudalne lamine i cerokopoda (Iz: Šaganović et al., 2019).

Normalne adultne jedinke analiziranog uzorka uglavnom su bile braon-zelene boje. Međutim, kod nekih jedinki je primećena promena uobičajene boje tela. Uočene su okruglaste, blede žute strukture (granule) na anteroventralnoj strani cefaličnog dela karapaksa. Takođe, primećene su zone sa tamnijim tačkicama na ekstremitetima, karapaksu i telzonu. Navedena promena u pigmentaciji može da bude znak parazitskih infekcija (Slike 61c, 63).



Slika 63. Granule unutar ventralne strane glavenog regiona koje najverovatnije predstavljaju parazitsku infekciju (Iz: Šaganović et al., 2019).

Skoro četvrtina razmatranih jedinki je imala karapaks i kaudalnu laminu blago podignutu nagore, što je pokazatelj da su jedinke u trenutku uzorkovanja bile u procesu presvlačenja.

5. Diskusija

5.1. Procena taksonomskog značaja morfoloških karaktera vrste *L. couesii*

Upoređivanjem dijagnostičkih morfoloških karaktera (pregledno u Longhurst, 1955a), uočava se da je kaudalna lamina analiziranih jedinki znatno duža nego kod jedinki vrste *L. apus* koja je ranije registrovana u Srbiji (Cvetković-Miličić & Petrov 1999). Pored dugačke kaudalne lamine sa izraženim središnjim naborom („središnji dorzalni greben”, prema Linderu (1952); engl. „*middorsal keel*”) i drugi morfološki karakteri ukazuju na vrstu *L. couesii* (upoređivanjem sa podacima iz studija Linder, 1952; Lynch, 1972; Brtek et al., 1984; Rogers, 2001). Utvrđeno je da egzopoditi prvog para torakalnih ekstremiteta analizirane vrste imaju dva distalna režnja. Prema Brtek et al. (1984), karakteristike egzopodita mogu da se upotrebe za razlikovanje vrste *L. couesii* od vrste *L. apus* kod koje se očekuje samo jedan režanj. Takođe, smatra se da pozicija nukalnog organa u odnosu na složene oči, koji delimično „zalazi” u prostor između očiju, ukazuje na vrstu *L. couesii* (Linder, 1952; Lynch, 1972; Rogers, 2001).

Prema dužini tela, jedinke iz uzorka korišćenog za procenu taksonomske pripadnosti vrste mogu da se okarakterišu kao adultne jedinke manjih dimenzija tela (prema Rogers, 2001). Dužina tela je slična između analiziranih mužjaka i ženki. Međutim, kao što je spomenuto, Linder (1952), Longhurst (1955a) i dr. u svojim studijama navode da dužina tela ne može da se koristi kao pouzdan karakter za razlikovanje vrsta zbog velikog variranja, čak i u okviru jedne populacije. Ovo se dešava zbog toga što telesni segmenti mogu da budu nepotpuni, delimično redukovani, razvučeni ili spiralno uvijeni. Moguće je da se uočeno variranje dužine tela javlja i zbog skraćivanja segmenata prilikom čuvanja jedinki u etanolu. Pokazano je da fiksativi mogu da utiču na veličinu mekih tkiva rakova (Beladjal & Mertens 1999; Järvinen et al., 2014), što je primećeno i u analiziranom uzorku. Međutim, navedeni autori smatraju da se skupljaju samo prstenasti segmenti (usled gubitka vode u tkivima koja ih povezuju), ali ne i čisto hitinski delovi skeleta, kao što su karapaks i telzon sa kaudalnom laminom. Rezultati dobijeni u ovoj preliminarnoj analizi ukazuju da su dve navedene morfološke strukture potencijalno značajne u taksonomskoj identifikaciji i da, barem do nekog nivoa sigurnosti, mogu da se koriste za razlikovanje vrsta, kao i mužjaka i ženki u određenoj populaciji.

Podaci dobijeni tradicionalnom morfometrijskom analizom pokazuju da karakteri koji opisuju karapaks (CL, CW, CL/CW, CL/^{tot}L) pokazuju malu varijabilnost i da oblik karapaksa može da ima značajnu ulogu u razlikovanju mužjaka i ženki. Karapaks skoro potpuno obuhvata telo ženki i na taj način pruža bolju zaštitu od predatora i veću bezbednost jaja. Navedena osobina može da omogući bolje preživljavanje. Sa druge strane, širi, zaravnjen, okruglasti i kraći karapaks mužjaka je verovatno u vezi sa većom pokretljivošću i aktivnijim ponašanjem mužjaka. Dug i slobodan abdomen koji nije prekriven karapaksom može da omogući efikasnije plivanje i potragu za plenom (Lakka, 2015). Moguće je da u prirodnim uslovima spomenute razlike predstavljaju odgovor na pritisak predatora (Korn & Hundsdoerfer, 2016) i druge sredinske faktore, ili čak adaptaciju na izbegavanje pradaora ili kanibalizma, pojave karakteristične za čitavu grupu Notostraca (Lakka, 2013, 2015; lična zapažanja).

Analizirani meristički karakteri takođe ukazuju na vrstu *L. couesii*. Prema Linder (1952), Rogers (2001) i Lynch (1972), jedinke ove vrste imaju do 27 prstenastih segmenata i do 40 parova ekstremiteta. Međutim, kao i kod svih branhiopodnih rakova, broj parova ekstremiteta nije fiksiran i ne postoji uvek jasna korelacija između broja prstenastih segmenata i broja parova ekstremiteta. Ovakva izražena plastičnost morfoloških karaktera otežava postupak identifikacije vrsta (Rogers, 2001). Broj prstenastih segmenata bez ekstremiteta se generalno smatra veoma varijabilnim karakterom koji zavisi od odnosa ukupnog broja prstenastih segmenata i broja parova ekstremiteta – dve vrste sa istim brojem segmenata, ali

različitim brojem parova ekstremiteta, imaju različit broj segmenata bez ekstremiteta (Linder, 1952; Longhurst, 1955a). Međutim, u analiziranom uzorku nije primećen velik opseg variranja ovog karaktera čija vrednost iznosi 4 ili 5, što se poklapa sa nekim literaturnim podacima (Lynch, 1972). Broj i izgled bodlji uočenih na zadnjoj ivici karapaksa odgovara vrednostima i karakteristikama navedenim u studijama Lynch (1972) i Rogers (2001). Broj bodlji na zadnjoj ivici karapaksa predstavlja karakter koji pokazuje velik opseg variranja. Značajno je da se napomene da je upotreba merističkih karaktera u taksonomiji grupe Notostraca prolazila kroz različite faze, od potpunog odbacivanja nekih karaktera do pridavanja naročitog značaja (npr. Lynch, 1972; Macdonald et al., 2011; Meusel & Schwentner, 2016).

5.2. Morfološke i histološke karakteristike gonada ženki

Gonade ženki vrste *L. couesii* pokazuju tubularnu građu, tipičnu za Notostraca, sa glavnim uzdužnim kanalom sa kog se lateralni folikularni kanali granaju prema hemocelu. Folikuli se razvijaju na vrhu lateralnih kanala čije ćelije pokazuju sekretornu aktivnost. Slična građa gonada prisutna je kod *Limnadia* sp. (Spinicaudata), gde ćelije parnih uzdužnih kanala luče materijal za izgradnju omotača jajne ćelije, a folikuli sazrevaju u vrećastim proširenjima kanala (Zaffagnini, 1969; Scanabissi & Mondini, 2000a; Scanabissi & Mondini 2002a). Sa druge strane, izgled gonada porodice Leptestheriidae (Spinicaudata) se ciklično menja, od kompakne do razgranate forme, u zavisnosti od faze sazrevanja oocita. Gonade u okviru Leptestheriidae nemaju centralnu šupljinu, ali spuštanjem zrelih oocita iz folikula u centar gonade, dobijaju izgled nalik na kanal (Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1989; Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1992). Za razliku od Notostraca, somatske ćelije u zidu gonada ove grupe luče mukoznu materiju koja ne predstavlja materijal za izgradnju omotača jajne ćelije. Anostraca i Cladocera s druge strane imaju parne tubularne i nerazgranate jajnike (Jaglarz et al., 2014).

Neke osobenosti postoje i u rasporedu germinativnih ćelija. Notostraca, uključujući i analiziranu vrstu, kao i Limnadiidae, imaju nekoliko vršno pozicioniranih oblasti sa germinativnim ćelijama, dok se kod Leptestheriidae protogonije javljaju duž čitave gonade (pregledno u Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1992; Zaffagnini, 1969). Kod Anostraca, germinativne ćelije su raspoređene duž ventralne strane gonade, dok Cladocera imaju jednu vršnu germinativnu oblast i proizvode manji broj jaja koja se smeštaju u ležajne komore.

Jaja ispitivane vrste su krupna, sferična i glatke površine. Pokazuju slične morfološke odlike kao jaja kod vrsta roda *Triops*, ali su krupnija, i spadaju u najkrupnija jaja u okviru Branchiopoda. Najsitnija jaja imaju predstavnici Spinicaudata, dok su jaja Anostraca nešto krupnija (Trentini & Sabelli Scanabissi 1982; Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1989; Thiéry & Gasc, 1991). Poznato je da Notostraca polažu jaja na vegetaciju i čvrst supstrat u vodenom basenu, što je omogućeno postojanjem lepljive površine jajeta (Margraf & Maass, 1982; Fryer, 1988; Thiéry & Gasc, 1991; Thiéry, 1997), dok Anostraca rasipaju jaja u vodu, a Spinicaudata ne pokazuju organizovanost pri polaganju jaja (Thiéry & Gasc, 1991). Spinicaudata nemaju jajne kese ni ležajne komore tako da mogu da proizvode veći broj jaja odjednom (Dobrynina, 2011).

Smatra se da su građa gonada i broj pomoćnih ćelija u vezi sa trofičkim potrebama oocite u sazrevanju. Razgranata forma gonade približuje (efikasnije izlaže) oocite hemocelu, odnosno hemolimfi. Kod Anostraca, oocite u sazrevanju se raspoređuju u blizini creva. S obzirom da se smatra da je ovakav vid ostvarivanja trofičkih potreba nepouzdan, moguće da je iz navedenog razloga kod Anostraca prisutan veći broj pomoćnih ćelija, od kojih neke oocita

može da fagocitira (Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1992). Notostraca i Spinicaudata imaju tri pomoćne ćelije i ne dolazi do fagocitoze (Trentini & Scanabissi Sabelli, 1978; Sabelli Scanabissi & Trentini, 1979; Engelmann et al., 1997; Scanabissi & Mondini 2002a; Brantner et al., 2013; Jaglarz et al., 2014).

5.3. Poreklo, formiranje i struktura omotača jajne ćelije

5.3.1. Poreklo omotača jajne ćelije

Materijal za izgradnju omotača jajne ćelije može da se sintetiše na različite načine. Kod predstavnika familije Leptestheriidae (Spinicaudata), jaje procesom egzocitoze formira vitelinski omotač koji predstavlja jedini omotač i preuzima zaštitnu ulogu (Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1989). Prema načinu nastanka, ovaj omotač predstavlja primarni omotač jajne ćelije. U grupi Anostraca, materijal za izgradnju omotača nastaje pomoću nekoliko grupa posebnih žlezdanih jedinica. Tokom sekretorne faze, ćelije žlezde luče materijal kojim se zrele oocite obavijaju u uterusu (Anderson et al., 1970). Pošto se omotač formira u reproduktivnim kanalima ženki, predstavlja tercijarni omotač. Ovakav tip omotača se javlja i kod vrste *Limnadia lenticularis* (Spinicaudata, Limnadiidae), kao i predstavnika grupe Notostraca. Zrele oocite vrste *L. lenticularis* se nakon oslobađanja iz folikula spuštaju u uzdužne kanale gonade. Jednoslojni epitel ovih kanala pokazuje sekretornu aktivnost, tako da se oocite potpuno obavijaju materijalom koji se sintetiše (Scanabissi & Mondini, 2000a). Slično, u sintezi materijala za izgradnju omotača jajne ćelije Notostraca učestvuju ćelije folikularnih kanala. Kod ispitivane vrste je takođe utvrđena sekretorna aktivnost ovih ćelija i omotač jajne ćelije *L. couesii* pripada grupi tercijarnih omotača. U apikalnom delu ćelija folikularnih kanala ispitivane vrste, upravljenom prema lumenu kanala, se uočavaju mikrovili, kako je primećeno i kod vrste *T. cancriformis* iz Italije (Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982). Nukleus ćelija je uglavnom centralno pozicioniran, slično kao kod istraživanja na italijanskim populacijama (Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982), dok je u ćelijama kanala nemačke populacije vrste *T. cancriformis* nukleus pozicioniran apikalno (Engelmann et al., 1997). Materijal za izgradnju omotača jajne ćelije se sintetiše u velikim količinama i može da ispunjava i čitav lumen kanala. Uočeni uvrati membrane ćelija folikularnih kanala olakšavaju proces sekrecije.

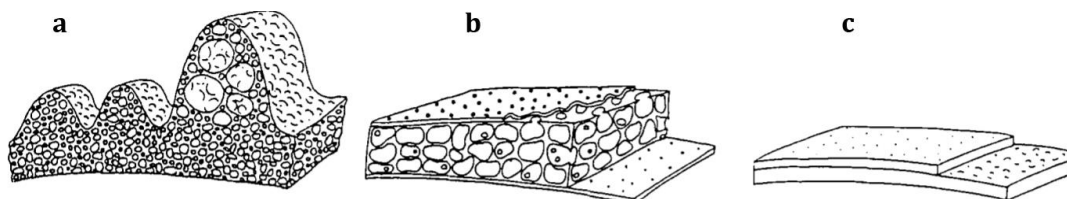
Primećeno je da je centralna masa u lumenu često „perforirana”, odnosno da se javljaju okruglasti prostori nalik na alveole koje su prisutne u formiranom omotaču jajnih ćelija. Moguće je da je sposobnost za alveolizaciju suštinska osobina ovog materijala i da se ispoljava i pre samog kontakta sa zreloom oocitom. Neravnomerna „alveolizacija” mase u lumenu je možda posledica različitih kohezivnih sila u centralnim i perifernim delovima (Scanabissi & Mondini, 2000a).

U sintezi materijala za izgradnju omotača jajne ćelije mogu da učestvuju različite organele. Kod vrste *Triops cancriformis*, i vrste *Limnadia lenticularis* u fazi aktivne sekrecije, granulirani endoplazmini retikulumi sintetišu granule materijala koje se dalje grupišu i sakupljaju u vakuolama pomoću kojih se materijal pakuje. U vakuolama se obrazuju sfere gustog materijala i prenose do vrha ćelija gde se ispuštaju u lumen kanala (Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982; Scanabissi & Mondini, 2000a). U ćelijama folikularnih kanala vrste *T. cancriformis* nije uočeno prisustvo kompleksa Goldži (Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982; Engelmann et al., 1997), slično kao i u ćelijama centralnih kanala vrste *L. lenticularis* (Scanabissi & Mondini, 2000a). Suprotno, kod ispitivanih jedinki *L. couesii* se javlja vakuolarno-vezikularni sistem pakovanja sintetisanog materijala. U ćelijama folikularnih kanala se javlja veliki broj kompleksa Goldži, ali i vakuola i granulisanog endoplazminog retikuluma. Prisustvo kompleksa Goldži je uočeno i u ćelijama žlezdanih jedinica *Artemia*

(Anderson et al., 1970), kao i kod vrste vrste *Lepidurus apus lubbocki* (Scanabissi & Mondini 2002a) i verovatno je da različita zastupljenost organela u ćelijama ukazuje na razlike u hemijskom sastavu materijala za izgradnju omotača jajne ćelije. Kako je navedeno, u citoplazmi ćelija folikularnih kanala se uočavaju i prstenaste lamele. Ove organele su uglavnom brojne u ćelijama koje se intezivno dele, kao što su npr. ćelije embriona, oocite i kancerske ćelije, i smatra se da ovaj kompartment predstavlja rezervoar za proteine nukleoporine i tako pomaže organizaciju kompleksa nukleusne pore u uslovima proliferacije ćelija (Kessel, 1983, 1992; Stafstrom & Staehelin, 1984; Raghunayakula et al., 2015). Iako postoji više teorija, njihove funkcije u svim tipovima ćelija u kojima su do sada uočene nisu sasvim razjašnjene. Jedna od hipoteza je da ove organele imaju pomoćnu ulogu pri organizaciji poliribozoma u slučaju kada se u ćeliji sintetišu velike količine proteina (Kessel, 1983). Međutim, prema nekim autorima, nema dovoljno dokaza za ovu tvrdnju, barem u slučaju embriona *Drosophila* sp. (Stafstrom & Staehelin, 1984). Prisustvo prstenastih lamela u ćelijama folikularnih kanala je veoma zanimljivo s obzirom na visoku sintetsku aktivnost ovih ćelija i prisustva izrazito razvijenih membrana granulisanog endoplazminog retikuluma. Potencijalna uloga prstenastih lamela bi mogla da bude upravo u vezi sa intezivnom sintezom materijala za izgradnju omotača jajnih ćelija, koji moguće pretežno ima proteinski sastav. Ipak, preciziranje njihove uloge u ovim ćelijama zahteva detaljne analize.

5.3.2. Formiranje i struktura omotača jajne ćelije

Osim hemijskog sastava, važna odlika omotača jajnih ćelija je i njihova struktura. Upoređivanjem građe, uočena je izuzetna sličnost omotača vrsta koje pripadaju različitim taksonima. Kod vrste *Limnadia lenticularis* (Spinicaudata), omotač je jednoslojan, perforiran celom debljinom i sa izuvijanom spoljašnjom površinom (Scanabissi & Mondini, 2000a, Slika 64a). Jaja ove vrste imaju karakterističan „uvijen” izgled (engl. „*twisted*” egg). Ovako struktuiran omotač je sličan troslojnom omotaču jajne ćelije vrste *Triops cancriformis* (Notostraca) koji takođe ima izražen alveolarni sloj, ali je spoljašnja površina jajeta glatka i bez nabora (Tommasini et al., 1989) (Slika 64b). Sa druge strane, omotač predstavnika familije Leptestheriidae (Spinicaudata) je jednoslojan i amorfan, bez alveolarnog sloja. Na površini nema pora, ali se javlja mukozni sloj koji nastaje aktivnošću žlezda u zidu gonada. Mukozni sloj nema zaštitnu ulogu i ne predstavlja deo omotača, već slepljuje jaja jedna za druge, kao i za telo ženke, i gubi se nakon polaganja jaja (Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1989) (Slika 64c). Takođe, omotač jajeta *Leptestheria* sp. je oko trinaest puta tanji od istog kod *L. lenticularis* (Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1989; Scanabissi & Mondini, 2000a). Kod ispitivane vrste *L. couesii*, omotač jajnih ćelija je sličan omotaču prisutnom kod vrste *T. cancriformis*, ali se unutrašnji sloj ne uočava, tj. omotač se sastoji od spoljašnjeg sloja, perforiranog na površini, i debelog alveolarnog sloja. Slično građen omotač kao kod analizirane vrste uočen je kod vrste *T. numidicus*, pronađene u pirinčanim poljima Japana (Mitsumoto & Yahata, 2006).



Slika 64. Uporedni prikaz građe omotača jajnih ćelija Branchiopoda. a) *Limnadia lenticularis*; b) *Triops cancriformis*; c) *Leptestheria* sp. Crteži nisu srazmerni (prema Scanabissi & Mondini, 2000a; Tommasini et al., 1989; Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1989).

Još jedna uočena razlika predstavlja način formiranja omotača jajne ćelije. Kod vrsta *Triops cancriformis* i *Lepidurus apus lubbocki* iz Italije, jednoslojni omotač se prvo diferencira u dva sloja: spoljašnji deblji sloj i tanak sloj koji se nalazi u delu omotača prema membrani jajne ćelije (Tommasini et al., 1989; Scanabissi & Mondini 2002a). Analizom oogenetskih stupnjeva, kod vrste *L. couesii* je uočena obrnuta pojava: prvobitno formiran jednoslojni omotač se deli na tanji sloj u gornjem delu, dok je unutrašnji sloj deblji. Slično, alveolarni sloj se kod dve gorepomenute vrste formira od spoljašnjeg dela omotača ka unutrašnjosti, dok se kod vrste *L. couesii* ovaj sloj formira u suprotnom smeru – od unutrašnjeg dela omotača prema površinskom. Izgleda da sazrevanje omotača počinje veoma rano, još u kanalima gonade, i da je verovatno potpuno formiran do momenta prelaska jaja u jajnu kesu. Opisane razlike između vrsta su možda u vezi sa različitim gustinama ili razlikama u hemijskom sastavu materijala koji izgrađuje omotač jajnih ćelija. Važno je da se napomene da su ova literaturna neslaganja neobična s obzirom da se radi o srodnim taksonima kod kojih se ne očekuju ovako velike razlike. Kako bi se doneli precizniji zaključci, potrebno je da se izvrše dodatna ispitivanja na većim uzorcima sve tri pomenute vrste.

Dobijeni rezultati potvrđuju stav da Notostraca pokazuju tzv. „primitivne“ odlike sinteze materijala za izgradnju omotača jajne ćelije s obzirom da nema prostorne i vremenske usklađenosti sekrecije i ovulacije, kao npr. kod Anostraca i Spinicaudata (Anderson et al., 1970; Tommasini & Scanabissi Sabelli, 1992; Scanabissi & Mondini, 2000a), već deluje da se sekrecija odvija neprekidno, čitavom dužinom folikularnih kanala, i paralelno sa prolaskom oocite kroz lumen reproduktivnih kanala (Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982).

5.4. Morfološke i histološke karakteristike gonada mužjaka

Testisi Notostraca su u literaturi opisani kao veoma režnjeviti i razgranati, slični istim kod račića iz grupe „Conchostraca“, dok su testisi prisutni u grupi Cladocera i Anostraca bez ili sa nekoliko režnjeva (Wolfe, 1971; Wingstrand, 1978; Scanabissi Sabelli & Tommasini, 1994). Režnjevita građa testisa uočena je i kod ispitivane vrste *L. couesii*.

Histološke odlike gonada mužjaka se poklapaju sa literaturnim podacima o spermatogenezi u grupi Notostraca (npr. Wingstrand, 1978; Scanabissi et al., 2005). Smatra se da dobijeni rezultati pokazuju da se kod mužjaka *L. couesii* iz populacija iz Srbije odigrava spermatogeneza koja rezultuje proizvodnjom muških polnih ćelija. Uočeni su različiti spermatogeni stupnjevi, uključujući i spermatozoide. Na osnovu utvrđenih histoloških odlika reproduktivnog sistema mužjaka i ženki, kao i na osnovu udela polova, pretpostavlja se da se populacije *L. couesii* iz Srbije razmnožavaju pretežno partenogenetski. Mužjaci svakako učestvuju na neki način i imaju udela u reproduktivnoj strategiji, ali preciziranje stepena njihove uloge zahteva primenu genetičkih metoda u daljim istraživanjima.

Spermatozoidi koji se formiraju u testisima se oslobađaju u lumen testikularnih kanalića, gde ponekad mogu da se nađu i spermatide u sazrevanju (Scanabissi et al., 2005; Scanabissi & Mondini 2002b). Na osnovu raspoloživih preseka testisa, ne mogu da se donesu konačni zaključci o tome da li su u lumenu analizirane vrste prisutna oba tipa germinativnih ćelija. Takođe, histološkim analizama nisu uočene strukture koje odgovaraju primitivnim spermatoforama prisutnim kod nekih branhiopoda, npr. u grupi Leptestheriidae (Scanabissi Sabelli & Tommasini, 1994; Scanabissi & Mondini 2000b).

S obzirom na prisustvo debelog omotača oko jajne ćelije, pojedini autori su sumnjali u mogućnost oplodjenja, odnosno smatrali su da postoji povezanost između porekla i strukture omotača i reproduktivne strategije populacije (Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982; Engelmann

et al., 1997; Scanabissi & Mondini, 2000a). Histološkim analizama je pokazano da spermatozoidi uranjaju u omotač jajne ćelije dok je još dovoljno mekan (Longhurst 1955b; Mitsumoto & Yahata, 2006), dok je molekulskim metodama dokazano da dolazi do nasleđivanja roditeljskih gena kod potomstva (Sassaman & Weeks, 1993; Mitsumoto & Yahata, 2006). Dakle, barem u pomenutim slučajevima, omotač jajne ćelije ne predstavlja prepreku za oplodjenje. Međutim, način na koji spermatozoidi prolaze kroz omotač jajeta je nepoznat. Bernard (1896) je smatrao da spermatozoidi mogu da prođu kroz „omotač sluzi“ oko jajeta dok je još dovoljno mekan. On je naveo mogućnost mehaničkog utiskivanja spermatozoida u omotač koji se formira prilikom prolaska zrele oocite kroz kanale jedinki sa ovotestisima. Sličan mehanizam je opisan i kasnije, kada je ultrastrukturnim analizama gonada hermafroditnih jedinki *Limnadia lenticularis* primećeno da se spermatozoidi nakon oslobađanja u lumen ovotestisa obavijaju materijalom za izgradnju omotača jajne ćelije, kače za globulice ovog materijala ili se u njih ugrađuju (Scanabissi & Mondini 2002a; Weeks et al., 2014). Moguće je da jajna ćelija, koja se u lumenu gonade obavija ovim materijalom, pokupi i deo materijala u kom se nalaze spermatozoidi. Međutim, kod hermafroditne vrste *Triops longicaudatus* nije uočeno ni obavijanje spermatozoida, ni njihov kontakt sa globulama materijala za izgradnju omotača jajne ćelije (Scanabissi & Mondini 2002b). Moguće je da postoji više različitih mehanizama prolaska spermatozoida kroz omotač jajne ćelije.

5.5. Reprodukcijska Notostraca – različite metode za procenu načina reprodukcije

Način reprodukcije populacije može da se proceni na osnovu različitih kriterijuma, kao i njihovim kombinovanjem. Međutim, ispitivanje nije uvek jednostavno jer reprodukcija često može da bude kriptična, tako da direktno utvrđivanje nekih odlika reprodukcije nije moguće (Svendsen et al., 2015). Notostraca karakteriše čitav niz načina reprodukcije, sa razlikama koje mogu postojati čak i između populacija jedne vrste (Tabela 10).

Tabela 10. Pregled nekih od objavljenih podataka o načinu reprodukcije predstavnika grupe Notostraca. Zvezdicama je označeno koji tipovi podataka su korišćeni u navedenim studijama. Ljubičasta zvezdica – histološki podaci; plava – udeo polova; zelena – genetički podaci; crna – ponašanje jedinki; braon – gajenje jedinki u izolaciji.

Vrsta	Geografsko poreklo	♀	♂	♀	Način reprodukcije	Referenca
<i>T. cancriformis</i>	Bolonja, Italija			✓	partenogeneza*	Trentini & Sabelli Scanabissi, 1982.
<i>T. cancriformis</i>	sever Nemačke	✓	✓		partenogeneza i/ili ukrštanje**	Engelman et al., 1996, 1997.
<i>T. cancriformis</i>	Istočna Austrija	✓	✓		ukrštanje moguće, ali nepotvrđeno*	Scanabissi et al., 2005.
<i>T. cancriformis</i>	evropske populacije	✓	✓	✓	ukrštanje gonohorista, i AD/samooplodnja ili autom. p.***	Zierold et al., 2009.
<i>T. cancriformis</i>	PZA, Iran		✓	✓	pretpostavljena partenogeneza**	Golzari et al., 2009.
<i>T. cancriformis</i>	italijanske populacije	✓	✓	✓	gonohorizam, partenogeneza i AD*	Velonà et al., 2009.

<i>T. cancriformis</i>	Izrael	✓			pretpostavljena partenogeneza*	Sorek et al., 2016.
<i>T. newberryi</i>	Čihuahuan pustinja, NM		✓	✓	AD***	Sassaman, 1991; Sassaman et al., 1997; Macdonald et al. 2011.
<i>T. newberryi</i>	Čihuahuan pustinja, NM		✓	✓	samooplodnja i ukrštanje hermafrodita, ili autom. p. (AD nepotvrđena)**	Horn et al., 2014; Horn & Cowley, 2016.
<i>T. longicaudatus</i> „long” i „short”	zapadna Severna Amerika	✓	✓		obligatno ukrštanje gonohorista, i samooplodnja ili partenogeneza***	Sassaman et al., 1997; Macdonald et al. 2011.
		✓				
<i>T. longicaudatus</i> „long”	Čihuahuan pustinja, NM	✓	✓		verovatnija samooplodnja hermafrodita ili AD*	Stoeckle et al., 2013.
<i>T. longicaudatus</i> „short”	Čihuahuan pustinja, NM	✓			samooplodnja i moguće ukrštanje hermafrodita*	Horn et al., 2014.
<i>T. numidicus</i>	rižina polja Japana	✓	✓		ukrštanje jedinki***	Mitsumoto & Yahata, 2006.
<i>T. cf. australiensis</i> linija A	NJV, Australija	✓	✓		ukrštanje gonohorista***	Murugan et al., 2009.
<i>T. cf. australiensis</i> linija B	NJV, Australija		✓	✓	moguća AD***	Murugan et al., 2009.
<i>Triops</i> sp.	Meksiko	✓	✓		ukrštanje gonohorista i AD**	García-Velazco et al., 2009.
			✓	✓		
<i>L. apus</i>	Danska			✓	samooplodnja/AD*	Bernard, 1891, 1896; Wingstrand, 1978.
<i>L. apus lubbocki</i>	Rim, Italija	✓	✓		partenogeneza*	Wingstrand, 1978; Scanabissi & Mondini, 2002a, b
<i>L. apus lubbocki</i>	Izrael	✓	✓		polna reprodukcija**	Sorek et al., 2016.
<i>L. arcticus</i>	lokaliteti iznad 60° N	✓			moguća partenogeneza + slučajno ukrštanje*	Hessen et al., 2004; Wojtasik & Bryłka-Wołk, 2010.
<i>L. arcticus</i>	CP region			✓	samooplodnja/AD**	Bernard, 1891, 1896; Longhurst, 1955a, b; Wingstrand, 1978.

<i>L. couesii</i>	Srbija	✓	✓		pretpostavljena partenogeneza; učešće mužjaka zahteva genetičku potvrdu**	Šaganović et al., 2017; ova studija
-------------------	--------	---	---	--	---	-------------------------------------

Skraćenice i oznake: AD – androdioecija; autom. p. – automiktična partenogeneza; NM – Novi Meksiko; NJV – Novi Južni Vels; PZA – pokrajina Zapadni Azerbejdžan; CP region – cirkumpolarni region; ♀ – jedinke sa jajnim kesama; ♂ – jedinke bez jajnih kesa (mužjaci); ♀♂ – hermafroditi, pretpostavljeni na osnovu prethodnih studija o datoj vrsti ili utvrđeni histološkim analizama.

Hermafroditne populacije su označene kao potencijalno androdioecijske jer je utvrđivanje potpunog odsustva mužjaka iz populacije dugotrajan proces (Sassaman, 1991; Zierold et al., 2007; Mathers et al., 2013). Neposredni način procene reprodukcije podrazumeva korišćenje podataka o udelu polova u populaciji (Zierold et al., 2007). Obično se smatra da je približno jednak udeo polova (50:50) pokazatelj gonohorizma tj. da se populacija sastoji od mužjaka i ženki koje se ukrštaju. Uniseksualne populacije, ili populacije sa malim brojem mužjaka, ukazuju na androdioeciju (hermafroditizam) ili partenogenezu, tako da korišćenje informacija o udelu polova nije uvek pouzdan pokazatelj načina reprodukcije (Brantner et al., 2013). Takođe, broj uzorkovanih ženki ili mužjaka može slučajno da bude u korist jednog ili drugog pola (Bernard, 1891). Mužjaci se možda ne uzorkuju zbog male učestalosti u populaciji ili se možda ne pojavljuju svake godine (Wojtasik & Bryłka-Wołk, 2010). Maloj učestalosti mužjaka moguće doprinosi i primećena pojava kanibalizma u populacijama *Notostraca* (Golzari et al., 2009; Berning et al., 2012; Lakka, 2015), ili muške jedinke možda imaju veći stepen mortaliteta u odnosu na hermafrodite, kao što je primećeno npr. kod vrste *Eulimnadia texana* koja pripada taksonu Spinicaudata (Weeks et al., 2006a). Takođe, u AD metapopulaciji se javlja velika varijabilnost između lokalnih populacija u učestalosti mužjaka, koja može da iznosi i nula ukoliko je lokalna populacija nastala skorom kolonizacijom hermafrodita (Pannell, 2000, 2002).

Korišćenje podataka o sposobnosti jedinki da produkuju vijabilna jaja u izolaciji, odnosno da se razmnožavaju bez prisustva mužjaka, takođe može da bude nepouzđano. Odsustvo pozitivnog ishoda može da bude u vezi sa neadekvatnim laboratorijskim uslovima (Sassaman, 1991). Dodatno, uspešna reprodukcija izolovanih jedinki ne pruža informacije o načinu na koji se reprodukcija odvija – moguća je i partenogeneza i hermafroditizam (Zierold et al., 2009). Slično, i upotreba histoloških metoda je pretrpela izvesne kritike. Uočavanje testikularnog tkiva u ženskim gonadama je nekad otežano jer je ono locirano samo u jednom delu gonade ili je, kod *Notostraca*, često redukovano na jednu ili nekoliko cisti (Wingstrand, 1978; Sassaman & Weeks, 1993). Takođe, postoje i neslaganja u tumačenju histoloških rezultata. Pojedini autori prisustvo testikularnog tkiva u ženskim gonadama tumače kao pokazatelj hermafroditizma (Bernard, 1891, 1896; Longhurst, 1955b; Wingstrand 1978), dok je prema drugim autorima u pitanju rudimentni hermafroditizam (Zaffagnini, 1969; Zaffagnini & Trentini, 1980). Nije definisano koliko testikularni delovi mogu da budu redukovani i da zadrže svoju funkciju (Sassaman, 1991). Takođe, histološke analize ne pružaju informacije o mehanizmima ponovnog uspostavljanja diploidnog stanja.

Primena genetičkih analiza predstavlja značajnu metodu s obzirom da način reprodukcije utiče na genetički diverzitet i genetičku strukturu populacije (Zierold et al., 2009). Međutim, ono što otežava ovakve analize je postojanje smanjenog genetičkog diverziteta u prirodnim populacijama *Notostraca* (Velonà et al., 2009; Zierold et al., 2009). Istraživanja su se do sada zasnivala na analizama nukleusnih i mitohondrijskih gena, kao i na analizama alozima, a u skorije vreme je učinjen napor da se identifikuju novi mikrosatelitski lokusi koji bi mogli da se koriste u genetičkim studijama na rodu *Triops* (Stoeckle et al., 2013).

Zbog malog broja dostupnih gena, često ne mogu da se donesu konačni zaključci o načinu reprodukcije u populacijama. Takođe, razlikovanje hermafroditizma i partenogeneze zahteva primenu složenih genetičkih studija (videti odeljak 5.9, Diskusija).

5.6. Način reprodukcije populacija vrste *L. couesii* iz Srbije

Kao što je navedeno, pol je kod *Notostraca* određen ZW hromozomskim sistemom u kom je muški pol homogametan (ZZ genotip), a ženski pol heterogametan (Mathers et al., 2015). Utvrđivanje partenogenetskog načina reprodukcije populacija *Notostraca* često može da bude kontroverzno. Na primer, iako su histološkim metodama Sabelli Scanabissi & Trentini (1979) zaključili da se uniseksualne populacije *T. cancriformis* verovatno razmnožavaju automiktičnom partenogenezom, Zierold et al. (2009) smatraju da genetičke analize ukazuju da se uniseksualne populacije, i populacije sa malim brojem mužjaka, verovatnije razmnožavaju hermafroditizmom/AD. Ipak, zbog malog broja ispitivanih gena, automiktična partenogeneza putem terminalne fuzije nije isključena kao opcija. Moguća apomiktična partenogeneza je navedena za određene populacije *T. cancriformis* iz Italije, dok je „klonalna replikacija” verovatna za uniseksualne populacije iste vrste iz Izraela (Velonà et al., 2009; Sorek et al., 2016). Pregled pretpostavljene partenogenetske reprodukcije za populacije različitih vrsta *Notostraca* predstavljen je u Tabeli 10.

Utvrđivanje oblika partenogeneze prisutnog u ispitivanoj populaciji, kao i definitivno isključivanje hermafroditizma, zahteva složene genetičke analize i tek tada bi se mogli doneti precizniji zaključci. Međutim, na osnovu dobijenih rezultata može da se formuliše nekoliko pretpostavki. Različiti načini odigravanja partenogeneze mogu da se grupišu u dve glavne kategorije – apomiksis i automiksis (Pearcy et al., 2006). Ukoliko se partenogeneza odvija apomiktičnom (amejotičkom) partenogenezom, očekivano je da se heterozigotnost održava na svim lokusima, jer nema rekombinacije alela, i da se populacija sastoji samo od ženki. S obzirom da su u ispitivanoj populaciji identifikovani i mužjaci, pretpostavlja se da se populacije iz Srbije ne razmnožavaju apomiktičnom partenogenezom. Automiktična (mejotička) partenogeneza može da se odvija putem nekoliko različitih mehanizama kojima se obnavlja diploidnost: centralna fuzija, terminalna fuzija, duplikacija gameta i nekoliko alternativnih mehanizama svrstanih pod terminom „nasumične fuzije” (Suomalainen et al., 1987; Pearcy et al., 2006, 2011). U slučaju centralne fuzije dolazi do spajanja proizvoda prve mejotičke deobe, kada se razdvajaju homologe hromozomi koji nose različite alele heterozigotnog lokusa, tako da se heterozigotnost održava u predelu centromere, dok udaljeni lokusi mogu slobodno da se rekombinuju. Tokom automiktične partenogeneze koja se odvija terminalnom fuzijom, spajaju se proizvodi druge mejotičke deobe, kada se razdvajaju dve hromatide koje nose identične alele, tako je potomstvo potpuno homozigotno, osim ukoliko se odigravaju rekombinacije u delu hromozoma koji je udaljen od centromere (Svendsen et al., 2015; Pearcy et al., 2006). Primer kada je pol određen ZW sistemom i kada se u populacijama javlja mali broj mužjaka, tzv. „retki mužjaci”, poznat je u rodu *Artemia* (Bowen, 1963; Maccari et al., 2013). Skorašnja istraživanja su pokazala da se diploidne partenogene vrste ovog roda razmnožavaju automiktičnom partenogenezom, mehanizmom centralne fuzije uz rekombinacije koje se odigravaju niskom stopom čime se omogućava prisustvo mužjaka u populaciji (Nougué et al., 2015). Opisan način reprodukcije ostavlja „genetički potpis” sličan apomiksisu, jer se heterozigotnost skoro potpuno održava (Nougué et al., 2015), i mogao bi da objasni uočen odnos polova i u ispitivanim populacijama iz Srbije. Ukoliko bi se partenogeneza odvijala mehanizmom terminalne, centralne fuzije ili mešanjem ova dva načina, uz prisutnu visoku stopu rekombinacija, dolazilo bi do sveukupnog gubitka heterozigotnosti duž većine hromozoma (sa verovatnoćom 0.33 za sve lokuse) što bi kroz

generacije ostavilo genetički potpis sličan samooplodnji, odnosno inbridingu (Pearcy et al., 2011; Nogué et al., 2015). U tom slučaju bi bilo očekivano da se u populaciji javlja veći broj mužjaka od uočenog s obzirom da se smatra da su mužjaci homogametna pol. Međutim, odlike polnih hromozoma i polno specifičnih regiona hromozoma u grupi Notostraca još uvek nisu dovoljno ispitani. Postoje podaci da se ovi regioni razlikuju između populacija iste vrste koje imaju različite reproduktivne strategije (Mathers et al., 2015). Takođe, iako se i očekuje da je u ZW sistemu nivo rekombinacije manji tokom oogeneze nego tokom spermatogeneze, postoji i hipoteza da prelazak populacije na hermafroditizam može da bude praćen povećanim nivoom rekombinacija između Z i W hromozoma ZW hermafrodita (Mathers et al., 2015).

Populacije ispitivane vrste su možda fakultativno hermafroditne/AD. Ova mogućnost je i ranije navedena za populacije Notostraca (Longhurst, 1955b; Engelmann et al., 1996). Prema hipotezi Weeks et al. (2006b), krosing-over niske učestalosti između polnih hromozoma heterogametnog pola može da produkuje interseksualne jedinke, od kojih bi neke mogle da budu funkcionalni „hermafroditi”. Daljim promenama ovakvih jedinki, putem mutacija ili dodatnih krosing-overa, mogli bi da nastanu vijabilni hermafroditi. Slični mehanizmi možda deluju i između polnih hromozoma Notostraca (Weeks et al., 2006b; Mathers et al., 2015). Često pojavljivanje hermafroditizma/AD u grupi Branchiopoda, pa samim tim i Notostraca, možda može da se objasni konstantnom produkcijom malog broja interseksualnih jedinki, kao i efemernom prirodom njihovih staništa u kojim bi ove jedinke imale selektivnu prednost zbog osiguravanja reprodukcije. U grupi Ostracoda, rakova koji nastanjuju ista ili slična staništa, takođe se pored sredinskih faktora navodi i mogućnost genetičkih predispozicija za prelazak sa seksualne na aseksualan reprodukciju (Butlin et al., 1998).

Takođe, nije poznato da li u populaciji dolazi do kombinovanja reproduktivnih strategija, tj. da li se populacija sastoji od ženki, mužjaka i hermafrodita (Engelmann et al. 1997; Zierold et al., 2007; 2009). Trenutno nema dokaza koji bi podržali ovu opciju. Smatra se da su npr. kod Ostracoda neki od primećenih poremećenih odnosa polova biseksualnih populacija rezultat koegzistiranja seksualnih i aseksualnih linija (Butlin et al., 1998).

5.7. Samo-kompatibilni načini reprodukcije u grupi Notostraca

Široka rasprostranjenost ukrštanja (engl. *outcrossing*) u prirodi je paradoksalna s obzirom da samooplodnja i bespolna reprodukcija omogućavaju dvostruku prednost jer sve jedinke daju potomstvo i dolazi do bržeg uvećavanja populacije (Bell, 1982; Simon et al., 2003). Hermafroditizam/AD i partenogeneza mogu da budu selektovani u gonohornoj populaciji Notostraca kao efektivniji način reprodukcije tokom širenja areala, tj. kolonizacije novih staništa. U ovoj situaciji broj mužjaka je ograničen i samo-kompatibilni načini reprodukcije mogu da imaju selektivnu prednost jer je samo jedna jedinka dovoljna za uspostavljanje nove populacije (Bernard, 1891; Longhurst, 1955c; Incagnone et al., 2015). Na ovaj način se postiže „reproduktivna osiguranost”, odnosno zaobilazi se mogućnost da se na novom staništu nađu dve jedinke istog pola, ili jedinke koje nisu istovremeno reproduktivno zrele ili nisu dovoljno blizu da ostvare kontakt (Baker, 1955). Hipoteza osiguravanja reprodukcije tokom postglacijalne ekspanzije deluje opravdana za evropske vrste roda *Triops* (Korn et al., 2006; Zierold et al., 2007), a kasnije je podržana i u celoj grupi Notostraca (Mathers et al., 2013). Takođe, smatra se da je u slučaju postojanja velikih fluktuacija u gustini populacija, kao i brzih populacionih obrta u metapopulaciji, „reproduktivna osiguranost” pokretač evolucije androdioecije i verovatno i ostalih samo-kompatibilnih načina reprodukcije (Zierold et al., 2009; Mathers et al., 2013). Populacije Notostraca karakterišu velike fluktuacije u gustini i verovatno je da često egzistiraju u formi metapopulacija (Baker,

1955; Takahashi & Gohda, 1981; Pannell & Barrett, 1998), ali uticaj ovih faktora na evoluciju alternativnih načina reprodukcije u ovoj grupi još uvek nije dovoljno ispitan.

Tokom ledenog doba u pleistocenu, većina Evrope je bila prekrivena ledom i smatra se da nije bila naseljiva za račiče *Notostraca* (Longhurst, 1955c). Vrste su se povlačile u refugijume, koje na evropskom kontinentu predstavljaju poluostrva južne Evrope: Pirinejsko, Apeninsko i Balkansko poluostrvo (Hewitt, 1999). S obzirom da se Srbija nalazi na Balkanskom poluostrvu, očekivano je da populacije koje nastanjuju ovaj region budu gonohorne, sa približno jednakim udelom polova (Zierold et al., 2007). Kao što je navedeno, histološke analize su pokazale da se ispitivana populacija verovatno sastoji od ženki i mužjaka, odnosno nije utvrđeno prisustvo hermafroditnih jedinki. Međutim, odnos polova koji je značajno pomeren u korist ženki ne ukazuje na ukrštanje gonohorista, već na alternativni način reprodukcije. Ispitivana populacija je možda potekla od predačke gonohorne populacije koja je hipotetički postojala na području Balkana ili su kolonizujuće propagule dospеле sa nekog udaljenijeg mesta (Machado et al., 2017). S obzirom da je kod *Notostraca* evolucija samo-kompatibilnih načina reprodukcije verovatno u vezi sa osiguravanjem reprodukcije tokom kolonizacije novih staništa (Zierold et al., 2009; Mathers et al., 2013), moguće je da je neka samo-kompatibilna propagula dospela iz negonohorne populacije sa veće udaljenosti (Machado et al., 2017). Ciste *Notostraca* pokazuju potencijalno veliku sposobnost disperzije, mada kolonizacija putem pasivne disperzije nije uvek uspešna (Incagnone et al., 2015). Ipak, u grupi *Notostraca* postoje dokazi o mogućoj disperziji na velike udaljenosti (Korn et al., 2006), nekad i kao posledica ljudskih aktivnosti (videti Naganawa, 2018).

Očekivano je da prelazak sa polnog na bespolno razmnožavanje prate određene ekološke, genetičke i evolucione posledice (Innes et al., 2000; Svendsen et al., 2015). Postoji nekoliko glavnih mehanizama putem kojih može da dođe do gubitka polne reprodukcije (pregledno u Simon et al., 2003; King & Hurst, 2010). Tihopartenogeneza, odnosno spontana ili fakultativna partenogeneza, podrazumeva spontano razviće malog broja neoplođenih jaja koja se razvijaju u ženke, moguće kao posledica greške prilikom mejoze kada nastaje diploidna oocita (Simon et al., 2003; Schwander et al., 2010). Na ovaj način se stvara mogućnost da partenogeneza bude selektovana u populaciji. Ograničen broj mužjaka za parenje može da dovede do selekcije tihopartenogeneze i generiše odnos polova koji je pomeren u korist ženki (Butlin et al., 1998; Schwander et al., 2010). Prema novijoj hipotezi, gubitak mužjaka u populaciji, i prelazak sa polnog razmnožavanja na telitoknu partenogenezu (partenogeneza koja proizvodi samo ženke), može da se odigra mehanizmom pozitivne povratne sprege. Ova hipoteza nije testirana na populacijama račiča *Notostraca*, mada je očekivano da fluktuirajuće gustine populacija *Notostraca* mogu da dovedu do odsustva mužjaka iz nekih dema. Tihopartenogeneza verovatno predstavlja prelaznu fazu pri uspostavljanju obligatne automiktične partenogeneze u populaciji (Simon et al., 2003; Schwander et al., 2010).

Prema konceptu geografske partenogeneze, populacije koje se razmnožavaju bespolno se češće pronalaze na određenom tipu staništa u odnosu na blisko srodne seksualne linije (Bell, 1982; Lynch, 1984; Butlin et al., 1998). Generalno pravilo je da bespolno razmnožavanje postaje dominantno na neuobičajenim ili nestabilnim staništima. Smatra se da većina partenogenih linija potiče od srodnih linija koje se polno razmnožavaju (Bell, 1982; Innes et al., 2000; Simon et al., 2003). Klasični modeli predlažu pojavljivanje partenogeneze kao rezultat istorijskih događaja, kao što su glacijalni ciklusi i kolonizacije, kada aseksualnost ima privremenu prednost. U novije vreme su se razvile alternativne hipoteze prema kojim i aktuelni sredinski uslovi, kao i strukturalna organizovanost populacije, mogu da utiču na raspored partenogenih populacija (Haag & Ebert, 2004; Schmit et al., 2013). Prema metapopulacionoj hipotezi, koja se ne zasniva na geografskim korelacijama, aseksualna

reprodukcija na izdijeljenom staništu omogućava veći fitnes jedinkama (Haag & Ebert, 2004). Aseksualne populacije postaju prisutnije idući ka marginalnim (ekstremnim) staništima, kao što su veće geografske širine ili nadmorske visine, gde su često prisutne u formi izdijeljene metapopulacije koje mogu da se formiraju i ljudskom aktivnošću. Lokalne ekstinkcije prati proces rekolonizacije, kada genetička uska grla i genetički drift imaju veći negativan efekat na populacije koje se polno razmnožavaju, nego na aseksualne populacije. Očekuje se da samo jedan deo aseksualnih klonova može da izvrši invaziju na populaciju koja se polno razmnožava (Innes et al., 2000). Ukoliko bi dolazilo do ukrštanja sa nesrodnim imigrantima iz susednih populacija, jedinke koje se polno razmnožavaju bi mogle privremeno da povećaju fitnes zbog heteroze, odnosno hibridnog vigora (Ebert et al., 2002). Aseksualni klonovi nastali od ovakvih jedinki bi mogli da imaju velik fitnes koji ne bi opadao i na taj način bi mogle da izvrše invaziju u populaciji jedinki koje se polno razmnožavaju. Sa druge strane, kod nekih vrsta Ostracoda je pokazana veza između načina reprodukcije i odlika životne sredine (Schmit et al., 2013). Prema ovim autorima, važno je da se razlikuju stabilnost i predvidivost staništa, kao i geološka i ekološka vremenska skala. Polno razmnožavanje je očekivano na prirodnim, geološki stabilnim staništima veće geološke starosti, koja karakterišu velike fluktuacije ekoloških uslova. Ovakva staništa su nepredvidiva, ali se ta nepredvidivost odnosi na prirodnu varijabilnost staništa. Suprotno, aseksualne populacije su očekivane na staništima koja su geološki mlada i ekološki stabilnija. Nestabilnost ovih staništa je predvidiva jer su to uglavnom staništa koja su formirana i održavana u određene svrhe. Dakle, aseksualne linije su očekivane na staništima sa antropogenim uticajem. Navedeni koncepti rasporeda partenogenih i seksualnih linija su ispitivani na branhiopodnim račićima roda *Daphnia* i *Artemia* (Innes et al., 2000; Haag & Ebert, 2004; Muñoz et al., 2010), kao i na primeru Ostracoda (Schmit et al., 2013), ali složena i detaljna istraživanja nisu izvršena u grupi Notostraca. Primećeno je da se italijanske populacije vrste *T. cancriformis* koje nastanjuju pirinčana polja, koja predstavljaju veštačka staništa sa antropogenim uticajem, razmnožavaju partenogenezom (Haag & Ebert, 2004; Velonà et al., 2009). Lokaliteti sa kojih su uzorkovane analizirane populacije, Crni Lug i Galovica, predstavljaju staništa duž nasipa, u zoni izgrađenoj u svrhu kontrole režima podzemnih voda i sprečavanja izlivanja viška vode iz nizijskih delova na severu. Na količinu i zadržavanje vode na lokalitetu utiču i padavine i hidrološke karakteristike reke Save (Šaganović et al., 2017). Ovo su zanimljive informacije, ali u ovom trenutku ne mogu da se donesu pouzdani zaključci o povezanosti pretpostavljene partenogeneze i staništa nastalog ljudskom aktivnošću.

5.8. Uloga mužjaka u populacijama Notostraca

Udeo mužjaka u populacijama Notostraca može značajno da varira, i kreće se od < 1% do oko 70% (Linder, 1952; Sassaman, 1991; Zierold et al., 2007; Stephan, 2008). Populacije sa malim brojem mužjaka su često bile posmatrane kao „abnormalne” ili „nepravilne”, i njihovo pojavljivanje se uglavnom objašnjavalo mešavinom različitih proporcija reproduktivno izolovanih uniseksualnih i biseksualnih populacija (Longhurst, 1955c; Zaffagnini & Trentini, 1980; Sassaman, 1991).

Kao što je navedeno, Wingstrand (1978) je razmatrao biološku ulogu testikularnih lobusa hermafroditnih jedinki kod kojih je uočen visok stepen degeneracije spermatozoida. Slično, Scanabissi & Mondini (2002a) su pokazali da su mužjaci *L. apus lubbocki* sterilni i da su spermatozoidi u procesu degeneracije, što je u skladu sa zapažanjima koje je izneo Wingstrand (1978). Uzrok uočene degeneracije spermatozoida mužjaka vrste *L. apus lubbocki* možda predstavljaju pogrešna sparivanja tokom mejoze I, primećena analizom kariotipa (Ombretta et al., 2005). Međutim, uloga mužjaka u populacijama Notostraca nije razmatrana

samo u slučaju kada mužjaci naizgled ne proizvode spermatozoide, ili kada je u dioecijskoj populaciji prisutan mali broj mužjaka. Skorašnje genetičke studije sprovedene na američkim vrstama *Triops* su pokazale iznenađujuć nedostatak dokaza o učešću mužjaka u reprodukciji (Horn et al., 2014; Horn & Cowley, 2016; Stoeckle et al., 2013).

Kod AD vrste *Eulimnadia texana* (Spinicaudata), samooplodnja predstavlja dominantan način reprodukcije, dok je ukrštanje sa mužjacima retko, ali se smatra da ima važnu ulogu u smanjivanju negativnih efekata inbriding depresije (Scanabissi et al., 2006b; Pannell, 2008). Međutim, iako su prvobitne analize alozima pokazale da postoji korelacija između udela mužjaka i genetičkog diverziteta *Triops* populacija (Sassaman et al., 1997), novijim istraživanjima nije utvrđen značajan uticaj mužjaka na genetički diverzitet i smanjenje inbridinga u populaciji (Zierold et al., 2009; Horn et al., 2014; Horn & Cowley, 2016). Analize različitih markera, kao i kontrolisana gajenja u laboratoriji, ukazali su da je samooplodnja glavni način reprodukcije *T. newberryi* račića, ali ni automiktična partenogeneza nije statistički isključena kao mogućnost (Horn & Cowley, 2016). Deluje da je ukrštanje sa mužjacima retko i postoji mogućnost da su mužjaci *T. newberryi* u stvari nereprodukujuće jedinice (Horn et al., 2014; Horn & Cowley, 2016). Slično, genetičkim analizama navodno gonohornih populacija *T. longicaudatus* „long”, dobijeni su rezultati koji ukazuju na verovatniju samooplodnju ili androdioeciju kao način reprodukcije (Stoeckle et al., 2013). Ukoliko mužjaci ne učestvuju u ukrštanju, postavlja se pitanje zbog čega nisu eliminisani iz populacije (Chasnov & Chow, 2002). Postoji nekoliko mogućih objašnjenja.

Formiranjem partenogenih linija mogu da nastanu linije u kojima su prisutne partenogene ženke i mužjaci (Simon et al., 2003). Partenogeni taksoni koji povremeno proizvode mužjake se javljaju kod Ostracoda (Butlin et al., 1998), Anostraca (Browne, 1992; Maccari et al., 2013), kao i u rodu *Daphnia* (Innes & Hebert, 1988; Innes et al., 2000), a navodno partenogeni taksoni sa malim brojem mužjaka su poznati i u grupi Notostraca (videti Engelmann et al., 1996). Većina mužjaka u partenogenim populacijama ima abnormalnu spermatogenezu ili ne proizvodi spermatozoide, ali javljaju se i funkcionalni mužjaci (Lynch, 1984). Ovi mužjaci bi mogli da imaju veliki evolucionarni značaj kao vektor za razmenu genetičkog materijala između aseksualnih i srodnih seksualnih linija. Diploidne partenogene vrste roda *Artemia* proizvode mali broj funkcionalnih mužjaka, tzv. „retke mužjake”. Molekulskim metodama je potvrđeno da su mužjaci nastali aseksualnom reprodukcijom (Browne et al., 1991), a histološkim metodama da mogu da proizvedu spermatozoide (MacDonald & Browne, 1987). Identitet i funkcionalnost mužjaka su kasnije potvrđeni primenom DNK barkoding metode i mikrosatelitskih lokusa (Maccari et al., 2013). Pokazano je da retki mužjaci *Artemia* ne mogu da oplode ženke diploidne partenogene linije iz koje potiču, kao ni ženke seksualnih vrsta sa kojim nisu blisko srodni (Maccari et al., 2013). Međutim, oplođenje ženki blisko srodnih seksualnih vrsta je moguće i u laboratorijskim uslovima je pokazano da mužjaci *Artemia* mogu da prenesu gene za partenogenezu ženkama (Maccari et al., 2013, 2014), mehanizmom koji je poznat kao „zarazna partenogeneza” (Lynch, 1984; Simon et al., 2003). Ovakav način generisanja aseksualnih linija je prvi put predložen u grupi Cladocera. Većina vrsta roda *Daphnia* se razmnožava cikličnom partenogenezom (Hebert, 1987a, b). Ovaj način reprodukcije podrazumeva proizvodnju aseksualnih jaja koja se razvijaju u ženke ili mužjake u zavisnosti od sredinskih uslova. Kada je gustina populacije velika, i kada se smanji dostupni izvor hrane, ženke proizvode haploidna seksualna jaja i u populaciji se pojavljuju mužjaci koji mogu da izvrše oplođenje. Ciklična partenogeneza često prelazi u obligatnu partenogenezu i prelazak verovatno podrazumeva mutacije na više gena. Kao što je navedeno, neke obligatno partenogene linije zadržavaju sposobnost proizvodnje mužjaka (Innes & Hebert, 1988). Pokazano je da ukrštanjem ovih mužjaka sa ženkama

srodnih vrsta koje se razmnožavaju cikličnom partenogenezom mogu da nastanu nove hibridne linije koje se razmnožavaju obligatnom partenogenezom, tj. da geni koji sprečavaju mejozu mogu da se prenesu putem mužjaka (Innes & Hebert, 1988). Mutacija koja zaustavlja mejozu samo kod ženki, ali ne i kod mužjaka, ne kontroliše i pojavu mužjaka u populaciji jer je pol sredinski određen. Ženka koja je nosilac mutacije bi mogla da proizvodi mužjake, tako da bi se bespolno razmnožavanje širilo u populaciji kao „zaraza” putem mužjaka nosioca mutacije za bespolno razmnožavanje. Mutacija koja suzbija mejozu kod ženki Cladocera koje se razmnožavaju cikličnom partenogenezom je dominantna (Innes & Hebert, 1988), dok je kod *Artemia* izgleda recesivna (Maccari et al., 2014). Mogućnost „zaraznog” širenja partenogeneze putem mužjaka nije još uvek ispitana u populacijama Notostraca.

Proizvodnja mužjaka često predstavlja trošak za populaciju i, kao što je spomenuto, pokazano je da neke obligatno aseksualne linije *Daphnia* produkuju veoma mali broj mužjaka (Innes et al., 2000). Međutim, trošak proizvodnje mužjaka seksualnih linija može da bude kompenzovan većim fekunditetom i/ili boljim preživljavanjem, što bi moglo da objasni povremeno koegzistiranje seksualnih i aseksualnih linija (Innes et al., 2000). Slično, npr. i partenogene populacije vrste *Artemia parthenogenetica* su veoma uspešne u Starom Svetu, ali je pokazano da njihova uspešnost nije u vezi sa izbegavanjem troška proizvodnje mužjaka, već partenogene ženke imaju duži reproduktivni period od seksualnih ženki, kao i veći broj legala sa većim brojem potomaka (Browne, 1992). Jedan od mogućih benefita zadržavanja sposobnosti nekih partenogenih ženki da proizvode mužjake može da predstavlja njihova uloga u produkciji novih aseksualnih linija (Innes et al., 2000).

Iako u testikularnim kanalićima ispitivane vrste *L. couesii* nije uočen veliki broj spermatozoida, moguće je da spermatozoidi povremeno oplode jajnu ćeliju iste ili srodne vrste. Potencijalne uloge mužjaka u populaciji mogu da se grupišu u nekoliko stavki: 1) kod biseksualnih populacija, prisustvo mužjaka je možda neophodno kako bi ženke položile jaja u jajnu kesu; 2) populacija se možda nalazi u prelaznoj fazi iz polne reprodukcije u partenogenezu; 3) mužjaci možda učestvuju u „zaraznom” prenošenju partenogeneze; 4) mužjaci su sterilni, ili ne dolazi do uspešnog oplodjenja, i njihovo prisustvo će se ukloniti selekcijom; 5) možda se proizvode zbog neke druge osobine koja je adaptivna, odnosno postoji neki neutvrđen benefit (Longhurst, 1955b; Bell, 1982; MacDonald & Browne, 1987; Butlin et al., 1998; Browne, 1992; Scanabissi & Mondini 2002a, b; Chasnov & Chow, 2002; Weeks et al., 2006a; Schmit et al., 2013). Realna mogućnost, koja svakako zahteva genetičku potvrdu, je da se u ispitivanoj populaciji mužjaci formiraju samo kao „rezidualan proizvod” partenogenetskih događaja (Simon et al., 2003). Slična situacija postoji u divljim populacijama nematode *Caenorhabditis elegans*. Ova vrsta se primarno razmnožava samooplodnjom, ali se tokom samooplodnje u populacijama proizvodi mali broj mužjaka kao rezultat nerazvdavanja polnih hromozoma u gametogenezi (Chasnov & Chow, 2002). Smatra se da prirodna selekcija favorizuje mužjake koji se pare, čime se održava njihov mali broj u populaciji iako ukrštanje ne donosi neku prednost i samooplodnja omogućava veći fitnes jedinkama (Chasnov & Chow, 2002).

5.9. Buduća genetička istraživanja

Kao što je spomenuto, precizno razlikovanje hermafroditizma i partenogeneze zahteva složene genetičke analize (Macdonald et al. 2011; Pearcy et al., 2006, 2011; Svendsen et al., 2015). Suština ovih analiza se ogleda u praćenju unutarhromozomske promene stope heterozigotnosti. Svaki heterozigotni lokus ima određenu verovatnoću da postane homozigotan u zavisnosti od mehanizma putem kog se odvija partenogeneza i pozicije lokusa na hromozomu, kao i slučaju samooplodnje. Ukoliko se reprodukcija odigrava

partenogenezom, matematička verovatnoća da određen heterozigotni lokus (npr. lokus ab) postane homozigotan kod potomstva iznosi 0.33, bez obzira na mehanizam kojim se odvija partenogeneza (Pearcy et al., 2011). Verovatnoća da se zajedno nađu dva identična alela (a_1a_2 ili b_1b_2), nakon što je jedan već izabran, iznosi 0.33 jer u slučaju partenogeneze dolazi do fuzije proizvoda koji nastaju u okviru iste mejotičke deobe. U slučaju centralne fuzije, u blizini centromere se održava heterozigotnost i ne odigravaju se rekombinacije, dok se lokusi udaljeni od centromere slobodno rekombinuju i očekivana verovatnoća prelaska na homozigotnost iznosi 0.33. Kada se partenogeneza odvija mehanizmom terminalne fuzije, homozigotnost se održava u delu centromere hromozoma, dok se lokusi udaljeni od centromere slobodno rekombinuju i očekivana verovatnoća homozigotnosti se smanjuje i iznosi 0.33. Dupliranje gameta dovodi do potpune homozigotnosti svih lokusa kod potomaka, dok kod nasumične fuzije svaki lokus, bez obzira na poziciju na hromozomu, ima verovatnoću 0.33 da postane homozigotan. U slučaju samooplodnje dolazi do spajanja dva gameta koja potiču od dve različite mejotičke deobe, tako da verovatnoća da se kod potomstva zajedno nađu dva ista alela iznosi 0.5 (Pearcy et al., 2011). Upoređivanjem očekivane i utvrđene stope gubitka heterozigotnosti duž hromozoma, moguće je da se utvrdi da li se populacija razmnožava samooplodnjom ili partenogenezom, kao i kojim mehanizmom se odvija partenogeneza. Ovakva studija je sprovedena na evropskim populacijama vrste *T. cancriformis*, kao i na jedinkama *T. newberryi* gajenim u laboratoriji, ali zbog toga što je u analizama korišćen samo jedan gen, kao i zbog malog broja ženki sa heterozigotnim lokusima, dobijeni su dvosmisleni rezultati (Zierold et al., 2009; Horn & Cowley, 2016). Buduće genetičke studije bi dakle trebalo da se zasnivaju na primeni navedenih metoda, uz uključivanje odgovarajućeg broja polimorfnih gena.

5.10. Procena taksonomskog značaja morfoloških karaktera vrste *L. couesii* analiziranih primenom metoda geometrijske morfometrije

U okviru ove studije, primenom metoda geometrijske morfometrije, prvi put je ispitivana morfološka varijabilnost prisutna kod vrste *L. couesii*. Detaljne i raznovrsne morfološke analize vrsta iz grupe Notostraca su neophodne s obzirom na dugotrajne neudoumice u vezi sa taksonomskim odnosima u ovoj grupi. Iako je generalna morfologija ovih račića ostala nepromenjena milionima godina (Suno-Uchi, 1997; Mathers et al., 2013), u prirodnim populacijama vrsta se javlja izuzetna morfološka varijabilnost (Longhurst, 1955a; Rogers, 2001; Korn et al., 2010; Macdonald et al. 2011). Pored definisanja ove morfološke varijabilnosti, jedan od glavnih problema predstavlja i česta nemogućnost razgraničenja intraspecijske i interspecijske varijabilnosti (Meusel & Schwentner, 2016). Kako bi se neki morfološki karakter adekvatno koristio u taksonomiji, procena i definisanje njegove varijabilnosti u grupi adultnih jedinki, ali i tokom ontogenije, je od velike važnosti (Longhurst, 1955a).

Posmatrajući dobijene rezultate, može da se zaključi da dve analizirane morfološke strukture karakterišu prilično različiti obrasci morfološkog variranja. Ispitano na uzorku ženki, na morfološko variranje oblika telzona sa kaudalnom laminom najveći uticaj ima alometrija. Obrasci ovih promena oblika su jasno definisani i ogledaju se u smanjivanju širine telzona i izduživanju kaudalne lamine tokom rasta jedinki. Sa druge strane, izraženo morfološko variranje karapaksa nije naročito uzrokovano alometrijskim promenama oblika. Ukoliko se uzme u obzir deo variranja koji opisuju veličina karapaksa i faktor lokaliteta (populacije), veliki deo variranja oblika karapaksa je ostao neobjašnjen. Ovo variranje je verovatno pod uticajem faktora koji nisu razmatrani u ovoj studiji.

Telzon sa kaudalnom laminom, kao struktura na posteriornom delu abdomena, verovatno ima pomoćnu ulogu u efikasnoj mobilnosti jedinki. Fryer (1988) je zabeležio da ove strukture moguće imaju ulogu i pri bežanju iz opasnih situacija i zbunjivanju predatora. Dugačak „rep” može da odvlači predatore od vitalnih struktura, što je i primećeno u populacijama ovih račića u kojima su identifikovane jedinke sa povredama kaudalne lamine (videti odeljak 4.6, Rezultati). Rast (izduživanje) kaudalne lamine je ranije označen kao alometrijski (Longhurst, 1955a), što je pokazano i analizirajući oblik ove morfološke strukture. Međutim, poredeći oblik telzona i oblik kaudalne lamine, utvrđeno je da telzon pokazuje veće morfološko variranje kada se posmatra nealometrijska komponenta variranja oblika – ženke sa dva lokaliteta se najviše razlikuju u širini telzona. Linder (1952) i Longhurst (1955a) su oblik telzona, definisan dužinom i širinom telzona, označili kao nepouzdan taksonomski karakter. Primenom metoda GM je pokazano da analizama oblika telzona sa kaudalnom laminom mogu da se identifikuju i kvantifikuju razlike između populacija i potencijalno i između različitih vrsta ovih račića. Velika morfološka varijabilnost telzona je pokazana na primeru roda *Triops*, kada su primenom metoda GM, uz genetičke analize, utvrđene razlike između više linija (vrsta) ispitivanih australijskih predstavnika (Meusel & Schwentner, 2016). Na osnovu rezultata dobijenih u ovoj disertaciji, oblik kaudalne lamine predstavlja pouzdaniji morfološki karakter u odnosu na telzon, ali s obzirom da telzon i kaudalna lamina predstavljaju morfološku celinu, identifikovanje razlika između populacija je od velikog značaja i predstavlja barem prvi korak u rešavanju određenih taksonomskih problema.

Rast (izduživanje) karapaksa je istorijski označavan kao izometrijski (Longhurst, 1955a). Primenom metoda GM i analizom oblika karapaksa, pokazano je da je verovatniji alometrijski rast, barem u slučaju vrste iz Srbije. „Alometrijske tendencije” su ranije identifikovane kod predstavnika roda *Triops* (Suno-Uchi, 1997). Međutim, u ovom slučaju su nezavisno razmatrane četiri specifične tačke postavljene na karapaks i, prema mišljenju autora, zaključeno je da oblik karapaksa ne može da se upotrebi kao pouzdan taksonomski karakter, što je ranije naveo i Linder (1952). Slično je primećeno i u slučaju populacija iz Srbije. Na osnovu dobijenih rezultata, smatra se da ovaj morfološki karakter verovatno pokazuje izraženu fenotipsku plastičnost – fenomen koji je poznat u grupi Notostraca (Rogers, 2001; Brendonck et al., 2008; Korn et al., 2010; Vanschoenwinkel et al., 2012). Suprotno, Wagner et al. (2019) su identifikovali smanjeno intraspecijsko variranje oblika karapaksa u poređenju sa interspecijskim variranjem i ovaj morfološki karakter je definisan kao podoban taksonomski karakter. Iako su podaci korigovani za efekat veličine, bitno je da se naglasi da je u ovoj studiji oblik karapaksa definisan dužinom i maksimalnom širinom karapaksa (Wagner et al., 2019). Longhurst (1955a) je naveo da su razlike u veličini i obliku karapaksa korelisane sa brojem segmenata jedinki, tj. da se razlike javljaju između „dugačkih i kratkih formi iste vrste”. Mada je analizama oblika pokazano da se karapaks tokom rasta izdužuje, slična izjava ne može da se formuliše za populacije iz Srbije s obzirom da skoro sve analizirane ženke imaju 26 ili 27 segmenata.

Uzroci morfološkog variranja važnih taksonomskih karaktera nisu sasvim rasvetljeni. Iako postoje navodi o mogućim faktorima koji utiču na veličinu ili oblik neke morfološke strukture, uglavnom nije ispitivan oblik kao geometrijska karakteristika. Preliminarni rezultati do kojih je Rogers (2001) došao, ukazuju da bi kvalitet ishrane mogao da utiče na varijabilnost formi morfoloških karaktera koji se koriste u taksonomiji. Izučavajući morfološku varijabilnost populacija vrste *L. arcticus* iz cirkumpolarnog regiona, dobijeni rezultati su ukazali da su dva različita haplotipa ove vrste pokazala značajne razlike u relativnoj dužini kaudalne lamine, koja je određena kao najpouzdaniji taksonomski karakter (Hessen et al., 2004). U navedenom radu je „dužina kaudalne lamine” definisana zajedno sa dužinom telzona. Slično, neki ispitivani haplotipovi su pokazali jedinstvene osobine, kao npr.

izrazito malu relativnu dužinu telzona (Hessen et al., 2004). Ovi rezultati su ukazali na moguću povezanost određenih haplotipova i morfoloških karakteristika. Ipak, u navedenoj studiji uticaj alometrije nije uzet u obzir i zanimljivo je pitanje kakvi bi se rezultati dobili ukoliko bi se analizirao oblik kaudalne lamine jedinki iz obe grupe. U grupi Notostraca, genetičke razlike su često identifikovane i između barica koje se nalaze na bliskoj udaljenosti, čak i na udaljenosti 1.5–2 km (Wojtasik & Bryłka-Wołk, 2010; Horn et al., 2014). Predmet izučavanja u ovoj disertaciji nisu bile genetičke odlike populacija iz Srbije. Korn et al. (2010) smatraju da su morfološke analize smislene samo na nivou populacija, dok su genetičke analize neophodne za pouzdanu identifikaciju. Međutim, analize procene morfološke varijabilnosti metodama geometrijske morfometrije nikad nisu sprovedene u grupi Notostraca. Metode GM imaju veliki potencijal primene u svrhu definisanja obrazaca morfološkog variranja, kao i u taksonomske svrhe. Na primer, u novijoj studiji na slatkovodnim krabama, primenom GM u analizama oblika karapaksa pokazana je mogućnost identifikovanja polova i važnih taksonomskih karakteristika (Grinang et al., 2019).

Faktori koji utiču na morfološko variranje oblika karapaksa nisu ispitani. Postoje studije koje ukazuju da različiti abiotički faktori, kao što su temperatura vode, sastav podloge vodenog basena, ishrana (Rogers, 2001; Harings, 2008; Kwon et al., 2010.), kao i biotički faktori, npr. gustina populacije odnosno stepen kompeticije (Takahashi, 1977; Weeks, 1990), mogu da utiču na veličinu (rast) i stopu rasta jedinki iz grupe Notostraca. Podaci ukazuju da na razviće račića snažno utiče količina raspoložive hrane i gustina populacije (Takahashi, 1977). Takođe, na gustinu populacije može da utiče dužina trajanja hidroperioda tako da, posredno, i ovaj abiotički faktor može da utiče na rast jedinki (Boix et al., 2002). Prema nekim podacima, morfološke karakteristike Notostraca nisu adaptirane za plivanje, već za bentosni način života (Fryer, 1988; Takahashi, 1977). Moguće je da slični faktori koji utiču na rast jedinki utiču i na oblik karapaksa, ali u ovom trenutku je teško da se definišu potencijalne povezanosti. Primenom metoda GM u analizi variranja oblika karapaksa južnoameričkih kraba, pokazano je da karapaks pokazuje izraženu plastičnost, sa razlikama koje se javljaju i između populacija iste vrste (Metri et al., 2016). Ove razlike su objašnjene upravo lokalnim adaptacijama populacija na specifične uslove životne sredine. S obzirom da notostrake nastanjuju efemerna staništa, čije se ekološke odlike menjaju i na dnevnom nivou (Rogers, 2009; Thorp & Rogers, 2011), bilo bi zanimljivo da se ispita plastičnost fenotipskih osobina, ali bi dizajniranje ovakvog eksperimenta verovatno bilo komplikovano (Miner et al., 2005). Izvesno je da je u uzorcima iz Srbije jedan deo kvantifikovanog variranja uzrokovan delimičnim deformisanjem kontura karapaksa. Slično su primetili i Meusel & Schwentner (2016), koji su iz ovih razloga odustali od analiziranja oblika karapaksa. Bez obzira na moguću artefakt u proceni efekata, ovu analizu bi trebalo uzeti u obzir kao izvor preliminarnih i generalnih podataka o simetričnoj komponenti oblika karapaksa vrste *L. couesii*. Buduća istraživanja bi idealno trebalo da se zasnivaju na metodama kontrolisanih gajenja ovih račića, kako bi se ispitao potencijalni efekat sredinskih uslova. Da bi se smanjila greška merenja, analize karapaksa bi trebalo raditi na najsvežijim uzorcima.

S obzirom na ograničene podatke, polni dimorfizam u obliku nije jednostavno sagledati. PCA grafici koji prikazuju variranje oblika obe analizirane strukture ukazuju na razdvajanje mužjaka i ženki, naročito posmatrajući jedinke prikupljene sa lokaliteta Galovica (Slike 46, 54). Ovi grafici ukazuju da postoji verovatnoća da se u populacijama javlja polni dimorfizam u obliku. Situacija se dodatno komplikuje zbog nemogućnosti ispitivanja alometrijskih promena oblika karakterističnih za mužjake. Ukoliko bi se povećali uzorci, mogle bi da se kvantifikuju razlike između polova, uporede alometrijski obrasci i razmotre potencijalni evolucionari mehanizmi koji dovode do postojanja polnog dimorfizma. Međutim, izvesno je da će podaci za statističke analize dugo biti nedostupni s obzirom da se populacije iz Srbije pretežno sastoje od ženki (jedinki sa jajnim kesama).

5.11. Uzroci koji dovode do pojave razvojnih anomalija

Do sada je publikovano mnogo studija koje su obuhvatile analizu telesnih anomalija kod različitih grupa Arthropoda (Lučić, 1995; Makarov, 1995; Zanata et al., 2008; Martinelli-Filho et al., 2009; Fernandez et al., 2011; Feullassier et al., 2012; Tomić et al., 2016; Yi et al., 2017). Morfološke abnormalnosti su takođe uočene i opisane kod nekih vrsta velikih branhiopoda (Lakka, 2013; Miličić et al., 2013). Pojavljivanje telesnih deformiteta se uglavnom pripisuje genetičkim faktorima (Zou & Fingerman, 2000), promenama nastalim tokom procesa presvlačenja (Luppi & Spivak, 2007; Napiorkowska et al., 2015a), ozledama nastalim pri napadu predatora, oboljenjima, ili regeneraciji tkiva nakon povreda (Gregati & Negreiros-Fransozo, 2009).

Analizom jedinki iz Srbije, uočene su jedinke čiji izgled odudara od uobičajenog obrasca građe. Promene mogu da nastanu pod uticajem faktora unutrašnjeg i spoljašnjeg porekla. Opisana nejednaka segmentacija tela i nepravilan rast su se ispoljili u obliku spiralnog rasta, skraćenih telesnih segmenata ili nepotpunog niza prstenastih segmenata. Ovakve pojave se uglavnom povezuju sa odlikama razvića karakterističnim sa Notostraca (Barnard, 1929; Longhurst, 1958), ali i za druge grupe Arthropoda (pregledno u Leśniewska et al., 2009). Anomalija obrasca segmentacije artropoda poznata je kao „helikomerija” – stanje u kome organizacija segmenata ne uključuje diskretne jedinice građe (pojaseve ili segmente) oko glavne osovine tela (Minelli & Pasqual, 1986). Prema istraživanjima rađenim na centipedama (Leśniewska et al., 2009), helikomerija ne bi trebalo da se posmatra kao pojedinačna telesna anomalija, već da nastaje kao rezultat kombinacije nekoliko različitih deformiteta, pogrešnih sparivanja, i raspoređivanja sklerita tokom kasnog embrionalnog razvića i segmentacije. Jedna od zajedničkih odlika embrionalnog razvića rakova roda *Lepidurus* i drugih rakova iz grupe velikih branhiopoda je postojanje perioda dormancije, kada je embrion zaustavljen u ranom stadijumu organogeneze (na stupnju gastrule). Period mirovanja karakteriše odsustvo ćelijskih deoba i replikacije DNK molekula (Dumont & Negrea, 2002). Nakon ulaska u kriptobiozu, jedino rehidratacija, odgovarajući osmotski pritisak, ili dovoljna koncentracija kiseonika (Clegg et al., 1996) mogu da pokrenu završetak razvića u incistiranoj gastruli. Period pre izleganja se poklapa sa povećanom aktivnošću ćelija (Olson & Clegg, 1978) i intenzivnom morfogenezom (Morris & Afzelius 1967). Rast abdomena se bazira na proliferaciji ektoteloblasta i posteriornoj segmentaciji (segmenti se dodaju u nizu, sa posteriornog dela rastućeg embriona). S obzirom da vrste roda *Lepidurus* naseljavaju kratkotrajna staništa (efemerne vode), u kojima je veliki selektivni pritisak na osobine životne istorije koje su povezane sa brzim razvićem, brzim rastom i ranim sazrevanjem jedinki, važno je da jedinke brzo dostignu polnu zrelost (kod vrste *L. apus* (Linnaeus, 1758), polna zrelost se postiže za oko 30 dana (Miličić & Petrov, 1999)). Cena brzog rasta i brzog dostizanja polne zrelosti može biti ozbiljno narušavanje procesa razvića, povećana učestalost morfogeneze koja odstupa od uobičajenog obrasca, kao i pojava malformacija unutar organa i čitavih telesnih regiona. Ova tema može da bude zanimljiva za buduća istraživanja, barem u grupi velikih branhiopoda.

Ranije je primećeno da broj segmenata nalik prstenu („prstenasti segmenti”) može da se razlikuje čak i između jedinki roda *Lepidurus* koje pripadaju istoj populaciji (Linder, 1952; Longhurst, 1955a). S obzirom da broj segmenata bez ekstremiteta takođe varira u grupi Notostraca, abdominalni regioni tela generalno nisu smatrani dobrim parametrima za opisivanje vrste (Korn et al., 2006). Dobijeni rezultati potvrđuju da vrednosti navedenih karaktera mogu da variraju čak i u okviru uzorka sakupljnog iz iste bare.

Dorzalni središnji nabor karapaksa je bez bodlji, barem kod vrste *L. couesii* (prema Lynch, 1972). Međutim, u uzorku iz Srbije, kod oko 40% pregledanih jedinki je došlo do blage

sklerotizacije u obliku male bodlje (ili nekoliko bodlji) i/ili okruglastih kvržica. Izgleda da se neke od vidljivih fenotipskih odlika kojima se opisuju branhiopode javljaju kao odgovor genotipa na heterogenu sredinu (fenotipska plastičnost), a ne kao posledica razvojne nestabilnosti (Miličić et al., 2017).

Kao što je navedeno, specifičan oblik i struktura karapaksa pružaju zaštitu jajima i omogućavaju hidrodinamičnost tela. U obrađenom uzorku su uočene jedinke sa ozledama karapaksa. U većini slučajeva su to bile spoljašnje povrede, uzrokovane napadima predatora i/ili drugih pripadnika ove vrste. Oblik pojedinih pukotina i rupa na karapaksu znatno nalikuje morfologiji vilice potencijalnih predatora, uglavnom iz grupe Anisoptera (vilini konjici) i/ili larvi drugih vodenih insekata. Neke telesne ozlede takođe mogu da nastanu kao rezultat kanibalizma, koji je česta pojava kod notostraka (Arnold, 1966; Lakka, 2013, 2015). Oštećenja su uglavnom bila praćena delimičnom regeneracijom, kada se na mestu ozlede sakuplja novi sloj hitina koji ima ulogu da zaštiti narušenu kutikulu. Regenerisani hitin očvršćava sklerotizacijom, tako da se mesto regeneracije prepoznaje prema tamnijim ivicama. Sa druge strane, najčešće su uočene ozlede ekstremiteta (kod skoro četvrtine razmatranog uzorka) s obzirom da su ekstremiteti najmekši delovi ventralne strane tela koja nije zaštićena karapaksom.

Kod analiziranih jedinki su uočene i ozlede telzona i cerkopoda. Neke jedinke su imale značajno oštećenu i nepotpuno regenerisanu kaudalnu laminu, uglavnom duplo (ili više) kraću od normalne dužine, asimetričnu, i često bez ivičnog kutikularnog ojačanja. Duge i tanke cerkopode se takođe razlikuju prema izgledu, čak i između jedinki sa istog staništa. U nekoliko slučajeva su uočene izvijane cerkopode, ili cerkopode nejednake dužine. Sa druge strane, tamne ivice u obliku prstena regenerativnog tkiva na nekim cerkopodama ukazuju na ozlede. Navedene tanke, izdužene i fleksibilne strukture, cerkopodije, imaju značajnu pomoćnu ulogu prilikom plivanja. Jedinke sa anomalijom, ozledom ili nedostatkom ovih struktura, mogu da imaju poteškoća u postizanju snage potrebne za plivanje i savladavanje površinskog napona vode (Lakka, 2015).

Obojenost tela, kao i kriптиčna obojenost, mogu da imaju veliku biološku važnost. Obojenost verovatno zavisi od variranja fizičkih karakteristika staništa i od uslova u efemernim vodama (Rogers, 2001; Lakka, 2015). Neke jedinke analiziranog uzorka imale su karapaks, ekstremitete ili telzon izmenjene, netipične boje, verovatno zbog prisustva parazita na površini tela. Pošto zaražene jedinke mogu da prošire infekciju unutar populacije, i mogu da pokažu abnormalno ponašanje (Lakka, 2013), ova pojava bi trebalo da bude tema budućih istraživanja.

Razvojne, i druge pomenute, anomalije mogu nesumnjivo da imaju ekološke i etološke posledice s obzirom da utiču na ponašanje i onemogućavaju povoljan odgovor jedinki na uslove u životnoj sredini. Ovo može da bude još važnije ako se uzme u obzir da staništa ovih račića naseljava i nekoliko njihovih potencijalnih predatora (kao što su neki vodozemci i neki beskičmenjaci), koji predstavljaju značajan biotički stresor u životinjskim zajednicama kratkotrajnih staništa (Brendonck et al., 2002). Pomenute morfološke promene i deformiteti mogu da utiču na oblik čitavog tela i da konačno doprinesu izmeni simetrije jedinki. Neuobičajeno izmenjene ili abnormalne polno dimorfne odlike, kao što su odlike karapaksa, telzona, kaudalne lamine i cerkopoda (videti Hessen et al., 2004; Lakka, 2015; Šaganović et al., 2017), mogu biti pod delovanjem seksualne selekcije i na taj način uticati na adaptivnu vrednost jedinki.

Razmatranjem svih dobijenih rezultata u ovoj disertaciji, smatra se da je nalaz ove vrste značajan. Iako postoje brojne novije studije o distribuciji velikih branhiopoda, nema dovoljno podataka o rasprostranjenju vrste *L. couesii* u Evropi. Nalaz ove vrste, koja je nova za Srbiju, proširuje oblast rasprostranjenja vrste na teritoriju Zapadnog Balkana. Dobijeni podaci potvrđuju da ovaj region još uvek nije dovoljno istražen. S obzirom da velike branhiopode pokazuju izražen potencijal za širenje svog areala na druga pogodna staništa vektorskim rasejavanjem pomoću ptica i letećih insekata, vodozemaca, riba i prilikom ispaše stoke (Bohonak & Whiteman 1999; Bilton et al., 2001; Beladjal et al., 2007; Beladjal & Mertens, 2009; Rogers, 2014), kao i pasivno – delovanjem vetra (Graham & Wirth, 2007), mogu se očekivati nova nalazišta u nizijskim barama i drugim efemernim vodenim basenima. Potencijalna nova staništa bi mogle biti grupe barica u ravničarskoj plavnoj oblasti koje mogu da budu dugotrajnije u odnosu na bare u okruženju. U skladu sa tim, potrebno je da se istraži još lokaliteta u Srbiji i regionu, kao i da se sprovedu dodatne studije o sredinskim parametrima koji utiču na rasprostranjenje vrste.

6. Zaključci

- **Račići iz grupe Notostraca su identifikovani kao uzorci populacija *Lepidurus couesii*.** Analizom taksonomskih morfoloških karaktera, koji su odabrani u skladu sa literaturnim podacima o njihovom značaju, ustanovljeno je da jedinke pokazuju stepen razvijenosti odabranih karaktera koji odgovara odlikama vrste *L. couesii*. Smatra se da relativna dužina kaudalne lamine ($^{cl}L/CL$) ima najveći značaj u taksonomiji, dok dužina kaudalne lamine, dužina karapaksa i odnos dužine kaudalne lamine i dužine karapaksa imaju značaj u razlikovanju polova.
- **S obzirom na ovaj nalaz, postoji potreba za otkrivanjem novih staništa i populacija na teritoriji Srbije.** Populacije Notostraca karakteriše potencijal za uspešnu disperziju, čak i na veće udaljenosti. Nova nalazišta vrste *L. couesii* bi mogla da se očekuju u nizijskim barama i drugim efemernim vodenim basenima. Potencijalna nova staništa bi mogla biti grupe barica u ravničarskoj plavnoj oblasti. Čitav region Srema je dobra polazna geografska oblast za istraživanje, a zatim i ostatak Vojvodine.
- **Nisu uočeni pokazatelji prisustva hermafroditnih jedinki u populacijama.** Histološka analiza reproduktivnog sistema jedinki sa jajnim kesama pokazala je da tkivo gonada prema svim karakteristikama odgovara tkivu ovarijuma, dok elementi muškog reproduktivnog sistema kod ispitivanih ženki nisu uočeni.
- **Populacije se uglavnom sastoje od ženki, dok su mužjaci malobrojni.** Jedinke koje karakteriše prisustvo jajnih kesa na jedanaestom paru torakopoda su determinisane kao ženke, dok su jedinke bez jajnih kesa determinisane kao mužjaci. Uočena učestalost mužjaka u populacijama iz Srbije je manja od 5%.
- **Histološka analiza gonada mužjaka ukazuje na funkcionalnu morfo-anatomsku strukturu.** Prema karakteristikama, poziciji i obojenosti ćelija testikularnih kanalića, rezultati sugerišu da se gametogeneza odvija i da mužjaci produkuju spermatozoide. U skladu sa tim, mužjaci verovatno imaju fiziološku mogućnost da oplode ženke.
- **Pretpostavlja se da se jedinke razmnožavaju prvenstveno partenogenezom, dok je polna reprodukcija moguća, ali zahteva genetičku potvrdu.** S obzirom na uočen odnos polova, i na to da nisu identifikovane hermafroditne jedinke, smatra se da je primarni način reprodukcije partenogeneza. Dalje studije bi trebalo da obuhvataju složene genetičke analize i izučavanje ponašanja jedinki, npr. da li ženke i mužjaci interaguju na način koji je karakterističan tokom parenja.
- **Uloga malobrojnih mužjaka u populacijama analizirane vrste zahteva dalja istraživanja.** Prisustvo mužjaka je možda neophodno radi uspešnog polaganja jaja u jajne kese ili postoji mogućnost da se populacije nalaze u prelaznoj fazi iz polne reprodukcije u partenogenezu. Još neka od mogućih objašnjenja prisustva mužjaka u populacijama koje se razmnožavaju partenogenetski je učešće mužjaka u „zaraznom” prenošenju partenogeneze, ili su mužjaci možda samo genetički „rezidualan proizvod” partenogenetskih događaja.
- **Dve populacije ženki karakterišu isti obrasci alometrijskih promena oblika telzona sa kaudalnom laminom, kao i karapaksa.** Analize kovariranja oblika i veličine na nivou obe morfološke celine nisu pokazale statistički značajne razlike između ženki poreklom sa dva lokaliteta.

- **Alometrijski obrasci variranja oblika dve analizirane morfološke strukture se veoma razlikuju.** Ispitano na uzorku adultnih ženki, više od 70% variranja oblika telzona sa kaudalnom laminom tokom rasta jedinki je objašnjeno alometrijskim promenama oblika, dok je najveći deo variranja oblika karapaksa ostao neobjašnjen. Iako je rast karapaksa do sada uglavnom određivan kao izometrijski, u analiziranim uzorcima je pokazano da je prisutna alometrija, koja objašnjava oko 5% ukupnog variranja oblika karapaksa. Promene oblika telzona sa kaudalnom laminom ženki obuhvataju sužavanje telzona i izduživanje kaudalne lamine tokom rasta jedinki. Karapaks se tokom rasta ženki izdužuje i sužava, a promene oblika su najviše koncentrisane prema posteriornom delu karapaksa.
- **Nakon uklanjanja efekta veličine, dve populacije ženki se najviše razlikuju prema obliku telzona.** Oblik kaudalne lamine se pokazao kao pouzdaniji morfološki karakter za taksonomsku identifikaciju vrste *L. couesii* u odnosu na oblik telzona. Poredeći srednje oblike, tj. oblike korigovane za zajedničku alometriju, oblik kaudalne lamine je sličan između ženki poreklom iz dve populacije, dok su razlike najizraženije u obliku telzona.
- **Primenom metoda geometrijske morfometrije, otkriveni su novi aspekti obrazaca morfološkog variranja karaktera vrste roda *Lepidurus*.** Analizama su jasno utvrđeni obrasci variranja oblika telzona sa kaudalnom laminom. Na ovaj način je povećana mogućnost upotrebe ovog karaktera u taksonomskoj identifikaciji vrste. Moguće je da oblik kaudalne lamine predstavlja važan dijagnostički karakter vrsta roda *Lepidurus*. Dodatno, u prvom delu disertacije, kvantifikovanjem oblika karapaksa primenom tradicionalne morfometrije, nije pokazana velika intrapopulaciona varijabilnost karaktera CL/CW (odnos dužine i širine karapaksa). Sa druge strane, primenom geometrijske morfometrije je ustanovljeno značajno variranje oblika karapaksa, koje je moguće u vezi sa postojanjem plastičnog odgovora na variranje uslova životne sredine. Ovakav pristup, koji se bavi geometrijskim odlikama morfoloških karaktera, može da bude prvi korak u pokušaju razrešenja dugoročnih taksonomskih problema u okviru roda *Lepidurus* i u grupi Notostraca.
- **U prirodnim populacijama su uočene jedinke izmenjenog ili neuobičajenog fenotipa.** Izmenjeni obrasci segmentacije su se ispoljili u obliku spiralnog rasporeda segmenata (helikomera), skraćenih ili nepotpunih segmenata. Prisustvo ovog tipa anomalija se uglavnom objašnjava promenama koje potencijalno nastaju tokom ontogenetskog razvića, koje u grupi Notostraca karakteriše period mirovanja embriona (kriptobioza). Uočene ozlede različitih delova tela jedinki se objašnjavaju prisustvom predatora ovih račića na njihovim prirodnim staništima, kao i pojavom kanibalizma. U uzorku su primećene i jedinke delimično izmenjene obojenosti ili sa drugim naznakama parazitske infekcije.
- **Izmenjene odlike jedinki mogu da budu pod delovanjem prirodne ili seksualne selekcije.** Jedinke sa navedenim anomalijama, ozledama ili deformitetima mogu da pokazuju smanjenu performansu plivanja ili neadekvatnu mogućnost kamufliranja, što može da utiče na njihovo preživljavanje. Slično, promene koje se javljaju na karapaksu ili telzonu sa kaudalnom laminom, za koje se smatra da su polno dimorfni morfološki karakteri vrste, mogu da budu pod delovanjem seksualne selekcije.

7. Literatura

- 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.
- Adams, D.C., Rohlf, F.J., Slice, D.E. (2013) A field comes of age: geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24: 7–14.
- Adams, D.C., Collyer, M., Kaliontzopoulou, A., Baken, E. (2021a) Geometric Morphometric Analyses of 2D/3D Landmark Data. <https://github.com/geomorphR/geomorph>
- Adams, D.C., Collyer, M.L., Kaliontzopoulou, A., Baken, E.K (2021b) Geomorph: Software for geometric morphometric analyses. R package version 4.0. <https://cran.r-project.org/package=geomorph>
- Anderson, E., Lochhead, J.H., Lochhead, M.S., Huebner, E. (1970) The origin and structure of the tertiary envelope in thick-shelled eggs of the brine shrimp, *Artemia*. *Journal of ultrastructure research*, 32: 497–525.
- Anderson, M.J. & terBraak, C.J.F. (2003) Permutation tests for multi-factorial analysis of variance. *Journal of Statistical Computation and Simulation*, 73: 85–113.
- Andersson, M. (1994) *Sexual selection*. Princeton University Press: Princeton, New Jersey, 624 pp.
- Andrew, D.R. (2011) A new view of insect-crustacean relationships II. Inferences from expressed sequence tags and comparisons with neural cladistics. *Arthropod Structure and Development*, 40: 289–302.
- Arnold, G.P. (1966) Observations on *Lepidurus arcticus* (Pallas) (Crustacea, Notostraca) in east Greenland. *Annals and Magazine of Natural History*, 9: 599–617.
- Baken, E.K., Collyer, M.L., Kaliontzopoulou, A., Adams, D.C. (2021) gmShiny and geomorph v4.0: new graphical interface and enhanced analytics for a comprehensive morphometric experience. *Methods in Ecology and Evolution*. Submitted.
- Baker, H.G. (1955) Self-compatibility and establishment after "long-distance" dispersal. *Evolution*, 9: 347–348.
- Beladjal, L. & Mertens, M. (1999) Direct preservation in alcohol causes deformation of taxonomic key-characters in Anostraca (Crustacea). *Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie*, 84: 17–22.
- Beladjal, L., Dierckens, K., Mertens, J. (2007) Dispersal of Fairy Shrimp *Chirocephalus diaphanus* (Branchiopoda: Anostraca) by the Trout (*Salmo trutta*). *Journal of Crustacean Biology*, 27: 71–73.
- Beladjal, L. & Mertens, J. (2009) Diaspore dispersal of anostraca by flying insects. *Journal of Crustacean Biology*, 29: 266–268.
- Bell, G. (1982) *The masterpiece of nature: the evolution and genetics of sexuality*. Berkeley: University of California Press, 635 pp.
- Benítez, H.A. (2013) Sexual Dimorphism Using Geometric Morphometric Approach. In: Moriyama, H. (Ed.), *Sexual Dimorphism*. InTech, Croatia, pp. 35–50.
- Bernard, H.M. (1891) Hermaphroditism of the Apodidae. *Nature*, 43: 343–344.

- Bernard, H.M. (1896) XL.—Hermaphroditism among the Apodidæ. *Annals and Magazine of Natural History*, 17: 296–309.
- Barnard, K.H. (1929) Contributions to the crustacean fauna of South Africa No. 10. A revision of the South African Branchiopoda (Phyllopoda). *Annals of the South African Museum*, 29: 181–272.
- Berning, A.W., Gadd, R.D.H., Sweeney, K., MacDonald, L., Eng, R.Y.Y., Hess, Z.L., Pruitt, J.N. (2012) Sexual cannibalism is associated with female behaviour type, hunger stage and increased hatching success. *Animal Behaviour*, 84: 715–721.
- Berns, C.M. (2013) The evolution of sexual dimorphism: understanding mechanisms of sexual shape differences. In: Moriyama, H. (Ed.), *Sexual dimorphism*. InTech: Rijeka, pp. 1–16.
- Bilton, D.T., Freeland, J.R., Okamura, B. (2001) Dispersal in freshwater invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 32: 159–181.
- Bohonak, A.J. & Whiteman, H.H. (1999) Dispersal of the fairy shrimp *Branchinecta coloradensis* (Anostraca): Effects of hydroperiod and salamanders. *Limnology and Oceanography*, 44: 487–493.
- Boix, D., Sala, J., Moreno-Amich, R. (2002) Population dynamics of *Triops cancriformis* (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca) of the Espolla temporary pond in the northeastern Iberian peninsula. *Hydrobiologia*, 486: 175–183.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R., Lourdais, O. (2000) Reproductive versus ecological advantages to larger body size in female snakes, *Vipera aspis*. *Oikos*, 89: 509–518.
- Bookstein, F.L. (1991) Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. Cambridge University Press, New York, 435 pp.
- Bookstein, F.L. (1997) Landmark methods for forms without landmarks: morphometrics of group differences in outline shape. *Medical Image Analysis*, 1: 225–243.
- Bowen, S.T. (1963) The genetics of *Artemia salina*. II. White eye, a sex-linked mutation. *Biological Bulletin*, 124:17–23.
- Braband, A., Richter, S., Hiesel, R., Scholtz, G. (2002) Phylogenetic relationships within the Phyllopoda (Crustacea, Branchiopoda) based on mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25: 229–244.
- Brantner, J.S., Ott, D.W., Duff, R.J., Orridge, J.I., Waldman, J.R., Weeks, S.C. (2013) Evidence of selfing hermaphroditism in the clam shrimp *Cyzicus gynecia* (Branchiopoda: Spinicaudata). *Journal of Crustacean Biology*, 33: 184–190.
- Brendonck, L., Michels, E., De Meester, L., Riddoch, B. (2002) Temporary pools are not 'enemy-free'. *Hydrobiologia*, 486: 147–159.
- Brendonck, L., Rogers, D.C., Olesen, J., Weeks, S., Hoeh, W.R. (2008) Global diversity of large branchiopods (Crustacea: Branchiopoda) in freshwater. *Hydrobiologia*, 595: 167–176.
- Browne, R.A., Li, M., Wanigasekara, G., Brownlee, S.S.D., Eiband, G., Cowan, J. (1991) Ecological, physiological and genetic divergence of sexual and asexual (diploid and polyploid) brine shrimp (*Artemia*). *Advances in Ecological Research*, 1: 41–52.

- Browne, R.A. (1992) Population genetics and ecology of *Artemia*: insights into parthenogenetic reproduction. *Trends in Ecology and Evolution*, 7: 232–237.
- Brtek, J., Forró, L., Ponyi, J.E. (1984) Contributions to the knowledge of the Branchiopoda (Crustacea) fauna of Mongolia. *Annales Historico-naturales Musei Nationalis Hungarici*, 76: 91–99.
- Brtek, J. & Thiéry, A. (1995) The geographic distribution of the European Branchiopods (Anostraca, Notostraca, Spinicaudata, Laevicaudata). *Hydrobiologia*, 298: 263–280.
- Brusca, R.C., Moore, W., Shuster, S.M. (2016) Chapter 21: Phylum Arthropoda, Crustacea: Crabs, Shrimps, and Their Kin. In: Brusca, R.C., Martin, J.W. (Eds.), *Invertebrates, Third Edition*. Oxford University Press, pp. 761–841.
- Butlin, R., Schön, I., Martens, K. (1998) Asexual reproduction in non-marine ostracods. *Heredity*, 81: 473–480.
- Cáceres, C.E. & Rogers, D.C. (2015) Class Branchiopoda. In: Rogers, D.C., Thorp, J.H. (Eds.), *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, Volume 1: Ecology and General Biology*. Academic Press, pp. 687–708.
- Carapelli, A., Liò, P., Nardi, F., van der Wath, E., Frati, F. (2007) Phylogenetic analysis of mitochondrial protein coding genes confirms the reciprocal paraphyly of Hexapoda and Crustacea. *BMC Evolutionary Biology*, 7(Suppl. 2): S8.
- Carlisle, D.B. (1968) *Triops* (Entomostraca) eggs killed only by boiling. *Science*, 161: 279–280.
- Chasnov, J.R. & Chow, K.L. (2002) Why are there males in the hermaphroditic species *Caenorhabditis elegans*? *Genetics*, 160: 983–994.
- Clegg, J.S. & Jackson, S.A. (1992) Aerobic heat shock activates trehalose synthesis in embryos of *Artemia franciscana*. *FEBS Letters*, 303: 45–47.
- Clegg, J.S. (1994) Unusual response of *Artemia franciscana* to prolonged anoxia. *Journal of Experimental Zoology*, 270: 332–334.
- Clegg, J.S., Jackson, S.A., Warner, A.H. (1994) Extensive intracellular translocations of a major protein accompany anoxia in embryos of *Artemia franciscana*. *Experimental Cell Research*, 212: 77–83.
- Clegg, J.S., Drinkwater, L.E., Sorgeloos, P. (1996) The metabolic status of diapause embryos of *Artemia franciscana* (SFB). *Physiological zoology*, 69: 49–96.
- Clegg, J.S. (1997) Embryos of *Artemia franciscana* survive four years of continuous anoxia: the case for complete metabolic rate depression. *The Journal of Experimental Biology*, 200: 467–475.
- Clegg, J.S., Willsie, J.K., Jackson, S.A. (1999) Adaptive significance of a small heat shock/ α -crystallin protein (p26) in encysted embryos of the brine shrimp, *Artemia franciscana*. *American Zoologist*, 39: 836–847.
- Clegg, J.S. (2001) Cryptobiosis – a peculiar state of biological organization. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 128: 613–624.
- Clegg, J.S. (2005) Desiccation Tolerance in Encysted Embryos of the Animal Extremophile, *Artemia*. *Integrative and Comparative Biology*, 45: 715–724.

- Cock, A.G. (1966) Genetical aspects of metrical growth and form in animals. *Quarterly Review of Biology*, 41: 131–190.
- Collyer, M.L., Sekora, D.J., Adams, D.C. (2015) A method for analysis of phenotypic change for phenotypes described by high-dimensional data. *Heredity*, 115: 357–365.
- Collyer, M.L. & Adams, D.C. (2018) RRPP: RRPP: An R package for fitting linear models to high-dimensional data using residual randomization. *Methods in Ecology and Evolution*, 9: 1772–1779. <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/2041-210X.13029>
- Collyer, M.L. & Adams, D.C. (2021) RRPP: Linear Model Evaluation with Randomized Residuals in a Permutation Procedure. <https://cran.r-project.org/web/packages/RRPP>
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M. (1998a) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 60: 73–103.
- Crowe, J.H., Clegg, J.S., Crowe, L.M. (1998b) Anhydrobiosis: the water replacement hypothesis. In: Reid, D.S. (Ed.), *The Properties of Water in Foods (ISOPOW 6)*. Chapman and Hall, New York, pp. 440–455.
- Cvetković-Miličić, D. & Petrov, B. (1999) Life histories of *Triops cancriformis* (Bosc, 1801) and *Lepidurus apus* (Linnaeus, 1758) (Crustacea, Notostraca) in a group of rainpools in the Banat Province in Yugoslavia. In: von Vaupel Klein, J.C., Shram, F.R. (Eds.), *Crustacean Issues, 12: The Biodiversity Crisis and Crustacea*. Rotterdam. The Netherlands (A. A. Balkema), pp. 411–417.
- Czyż, M.J., Woliński, P., Gołdyn, B. (2016) Cyst morphology of large branchiopod crustaceans (Anostraca, Notostraca, Laevicaudata, Spinicaudata) in western Poland. *Biological Letters*, 53: 73–82.
- Darwin, C.R. (1859) *On the origin of species by means of natural selection or the preservation of favoured races in the struggle for life*. London: John Murray, 251 pp.
- Darwin, C.R. (1871) *The descent of man and selection in relation to sex*. London: John Murray, 424 pp.
- Demeter, L. & Stoicescu, A. (2008) A review of the distribution of large branchiopods (Branchiopoda: Anostraca, Notostraca, Spinicaudata, Laevicaudata) in Romania. *North-Western Journal of Zoology*, 4: 203–223.
- Dias, O.C. (1999) Morphological abnormalities of *Acartia lilljeborgi* (Copepoda, Crustacea) in the Espírito Santo Bay (E. S. Brazil). *Hydrobiologia*, 394: 249–251.
- Dobrynina, T.I. (2011) Resting eggs of conchostracans and their adaptive possibilities. *Inland Water Biology*, 4: 111–118.
- Dryden, I.L. & Mardia, K.V. (1998) *Statistical Shape Analysis*. Chichester: John Wiley, 347 pp.
- Dumont, H.J. & Negrea, S.V. (2002) Introduction to the class Branchiopoda. In: Dumont, H.J.F. (Ed.), *Guides to the Identification of the Microinvertebrates of the Continental Waters of the World, Volume 78*. Backhys Publishers, Leiden, Belgium, 398 pp.
- Dumont, H.J., Nandini, S., Sarma, S.S.S. (2002) Cyst ornamentation in aquatic invertebrates: a defence against egg-predation. *Hydrobiologia*, 486: 161–167.

- Ebert, D., Haag, C., Kirkpatrick, M., Riek, M., Hottinger, J.W., Pajunen, V.I. (2002). A selective advantage to immigrant genes in a *Daphnia* metapopulation. *Science*, 295: 485–488.
- Engelmann, M., Hoheisel, G., Hahn, T., Joost, W., Vieweg, J., Naumann, W. (1996) Populations of *Triops cancriformis* (Bosc) (Notostraca) in Germany north of 50°N are not clonal and at best facultatively hermaphroditic. *Crustaceana*, 69: 755–768.
- Engelmann, M., Hahn, T., Hoheisel, G. (1997) Ultrastructural characterization of the gonads of *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca) from populations containing both females and males: no evidence for hermaphroditic reproduction. *Zoomorphology*, 117: 175–180.
- Engelmann, M. & Hahn, T. (2005) Vorkommen von *Lepidurus apus*, *Triops cancriformis*, *Eubbranchipus (Siphonophanes) grubei*, *Tanymastix stagnalis* und *Branchipus schaefferi* in Deutschland und Österreich (Crustacea: Notostraca und Anostraca). *Faunistische Abhandlungen*, 25: 3–67.
- Ertas, B., von Reumont, B.M., Wägele, J-W., Misof, B., Burmester, T. (2009) Hemocyanin suggests a close relationship of Remipedia and Hexapoda. *Molecular Biology and Evolution*, 26: 2711–2718.
- Fairbairn, D.J., Blanckenhorn, W.U., Székely, T. (2007) *Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism*. New York: Oxford University Press, 280 pp.
- Fanenbruck, M., Harzsch, S., Wägele, J-W. (2004) The brain of the Remipedia (Crustacea) and an alternative hypothesis on their phylogenetic relationships. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101: 3868–3873.
- Fernandez, C.S., Gregati, R.A., Bichuette, M.E. (2011) The first record of external abnormalities in the subterranean *Aegla marginate* Bond-Buckup & Buckup, 1994 (Crustacea: Decapoda: Aeglidae), from a karst area of Southnearsten Brazil. *Subterranean Biology*, 8: 33–38.
- Fernández-Montraveta, C. & Marugán-Lobón, J. (2017) Geometric morphometrics reveals sex-differential shape allometry in a spider. *PeerJ*, 5: e3617.
- Feuillassier, L., Beguer, M., Pauliac, G., Boët, P., Girardin, M., Elie, P. (2012) Morphological anomalies in estuarine shrimp Lomae. *Crustaceana*, 85: 11–25.
- Förster, F., Liang, C., Shkumatov, A., Beisser, D., Engelmann, J.C., Schnölzer, M., Frohme, M., Müller, T., Schill, R.O., Dandek, T. (2009) Tardigrade workbench: comparing stress-related proteins, sequence-similar and functional protein clusters as well as RNA elements in tardigrades. *BMC Genomics*, 10: 1–10.
- Fryer, G. (1987) A new classification of the branchiopod Crustacea. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 91: 357–383.
- Fryer, G. (1988) Studies on the functional morphology and biology of the Notostraca (Crustacea: Branchiopoda). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 321: 27–124.
- Fryer, G. (1996) Diapause, a potent force in the evolution of freshwater crustaceans. *Hydrobiologia*, 320: 1–14.
- García-Velazco, H., Obregón-Barboza, H., Rodríguez-Jaramillo, C., Maeda-Martínez, A.M. (2009) Reproduction of the tadpole shrimp *Triops* (Notostraca) in Mexican waters. *Current Science*, 96: 91–97.
- Gayon, J. (2000) History of the concept of allometry. *American Zoologist*, 40: 748–758.

- Gidaszewski, N.A., Baylac, M., Klingenberg, C.P. (2009) Evolution of sexual dimorphism of wing shape in the *Drosophila melanogaster* species. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 110.
- Gilbert, S.F. (2000) *Developmental Biology*. 6th edition. Sinauer Associates, Sunderland, 639 pp. ISBN-10: 0-87893-243-7
- Giribet, G., Edgecombe, G.D., Wheeler, W.C. (2001) Arthropod phylogeny based on eight molecular loci and morphology. *Nature*, 413: 157–161.
- Giribet, G. & Edgecombe, G.D. (2012) Reevaluating the Arthropod Tree of Life. *Annual Review of Entomology*, 57: 167–186.
- Giribet, G. & Edgecombe, G.D. (2019) The Phylogeny and Evolutionary History of Arthropods. *Current Biology*, 29: R592–R602.
- Golzari, A., Khodabandeh, S., Seyfabadi, J. (2009) Some Biological Characteristics of Tadpole Shrimp, *Triops cancriformis*, from Seasonal Pools of West Azarbaijan (Iran). *Journal of Agricultural Science and Technology*, 11: 81–90.
- Goodall, C.R. (1991) Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society B*, 53: 285–339.
- Gould, S.J. (1966) Allometry and size in ontogeny and phylogeny. *Biological Review*, 41: 587–640.
- Goyal, K., Walton, L.J., Tunnacliffe, A. (2005a) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal*, 388: 151–157.
- Graham, J.H., Freeman, D.C., Emlen, J.M. (1993) Developmental stability: A sensitive indicator of population stress. In: Landis, W.G., Hughes, J.S., Lewis, M.A. (Eds.), *Environmental toxicology and risk assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 136–158.
- Graham, T.B. & Wirth, D. (2007) Dispersal of large branchiopod cysts: potential movement by wind from potholes on the Colorado Plateau. *Hydrobiologia*, 600: 17–27.
- Gregati, R.A. & Negreiros-Fransozo, M.L. (2009) Occurrence of shell disease and carapace abnormalities on natural population of *Neohelice granulata* (Crustacea: Varunidae) from a tropical mangrove forest, Brazil. *Marine Biodiversity Records* 2, 60: 1–3.
- Grinang, J., Das, I., Ng, P.K.L. (2019) Geometric morphometric analysis in female freshwater crabs of Sarawak (Borneo) permits addressing taxonomy-related problems. *PeerJ*, 7: e6205.
- Gunz, P. & Mitteroecker, P. (2013) Semilandmarks: a method for quantifying curves and surfaces. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 24: 103–109.
- Haag, C.R. & Ebert, D. (2004) A new hypothesis to explain geographic parthenogenesis. *Annales Zoologici Fennici*, 41: 539–544.
- Hamer, M.L. & Appleton, C.C. (1991) Life history adaptations of phyllopod in response to predators, vegetation, and habitat duration in north-eastern Natal. *Hydrobiologia*, 212: 105–116.
- Hand, S.C., Jones, D., Menze, M.A., Witt, T.L. (2007) Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *Journal of Experimental Zoology*, 307: 62–66.

- Hann, B.J. & Lonsberry, B. (1991) Influence of temperature on hatching of eggs of *Lepidurus couesii* (Crustacea, Notostraca). *Hydrobiologia*, 212: 61–66.
- Harings, N.M. (2008) Behavioral and morphological ontogeny of the tadpole shrimp *Triops longicaudatus* (LeConte) (Notostraca: Triopsidae). Dissertation for the degree Master of Science. Biology Eastern New Mexico University, pp. 1–58.
- Harvey, T.H.P., Vélez, M.I., Butterfield, N.J. (2012) Exceptionally preserved crustaceans from western Canada reveal a cryptic Cambrian radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109: 1589–1594.
- Hebert, P.D.N. (1987a) Genotypic characteristics of cyclic parthenogens and their obligately asexual derivatives. In: Stearns, S.C. (Ed.), *The Evolution of Sex and Its Consequences*. Birkhäuser, Basel AG, pp. 175–195.
- Hebert, P.D.N. (1987b) Genotypic characteristics of the Cladocera. *Hydrobiologia*, 145: 183–193.
- Hedrick, A.V. & Temeles, E.J. (1989) The evolution of sexual dimorphism in animals: hypotheses and tests. *Trends in Ecology & Evolution*, 4: 136–138.
- Heidecke, D. & Neumann, V. (1987) Zur Verbreitung und Ökologie von *Triops cancriformis* Bosc. und *Lepidurus apus* L. in der DDR. *Hercynia N.F.*, 24: 166–173.
- Hengherr, S., Worland, M.R., Reuner, A., Brümmer, F., Schill, R.O. (2009) High-temperature tolerance in anhydrobiotic tardigrades is limited by glass transition. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82: 749–755.
- Hengherr, S., Heyer, A.G., Brümmer, F., Schill, R.O. (2011) Trehalose and Vitreous States: Desiccation Tolerance of Dormant Stages of the Crustaceans *Triops* and *Daphnia*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 84: 147–153.
- Hessen, D.O., Rueness, E.K., Stabell, M. (2004) Circumpolar analysis of morphological and genetic diversity in the Notostracan *Lepidurus arcticus*. *Hydrobiologia*, 519: 73–84.
- Hewitt, G.M. (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 87–112.
- Horn, R.L., Kuehn, R., Drechsel, V., Cowley, D.E. (2014) Discriminating between the effects of founding events and reproductive mode on the genetic structure of *Triops* populations (Branchiopoda: Notostraca). *PLoS ONE*, 9: e97473.
- Horn, R.L. & Cowley, D.E. (2016) Self-Fertilization and the Role of Males in Populations of Tadpole Shrimp (Branchiopoda: Notostraca: *Triops*). *Journal of Heredity*, 107: 518–526.
- Horne, F.R. (1966) The Effect of Digestive Enzymes on the Hatchability of *Artemia salina* Eggs, *Transactions of the American Microscopical Society*, 85: 271–274.
- Hossack, B.R., Newell, R.L., Rogers, D.C. (2010) Branchiopods (Anostraca, Notostraca) from protected areas of western Montana. *Northwest Science*, 84: 52–59.
- Incagnone, G., Marrone, F., Barone, R., Robba, L., Naselli-Flores, L. (2015) How do freshwater organisms cross the “dry ocean”? A review on passive dispersal and colonization processes with a special focus on temporary ponds. *Hydrobiologia*, 750: 103–123.
- Innes, D.J. & Hebert, P.D.N. (1988) The origin and genetic basis of obligate parthenogenesis in *Daphnia pulex*. *Evolution*, 42: 1024–1035.

- Innes, D.J., Fox, C.J., Winsor, G.L. (2000) Avoiding the cost of males in obligately asexual *Daphnia pulex* (Leydig). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267: 991–997.
- Ito, C., Goto, S.G., Numata, H. (2013) Desiccation and heat tolerance of eggs of the Asian tadpole shrimp, *Triops granarius*. *Zoological Science*, 30: 760–766.
- Ivanović, A. & Kalezić, M. (2013) *Evoluciona morfologija: teorijske postavke i geometrijska morfometrija*. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 223 pp.
- Jagadeesan, L. & Jyothibabu, R. (2016) Tumour-like anomaly of copepods – an evaluation of the possible causes in Indian marine waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 188: 244. doi: 10.1007/s10661-016-5230-6
- Jaglarz, M.K., Kubrakiewicz, J., Bilinski, S.M. (2014) The ovary structure and oogenesis in the basal crustaceans and hexapods. Possible phylogenetic significance. *Arthropod Structure and Development*, 43: 349–360.
- Janssen, R. (2013) A curious abnormally developed embryo of the pill millipede *Glomeris marginata* (Villers, 1789). *Zookeys*, 276: 67–75.
- Järvinen, A., Lakka, H.K., Sujala, M. (2014) Arktinen kilpikidusjalkainen, tunturivesien elävä fossiili, löydetty jälleen Suomesta. *Luonnon Tutkija*, 1: 19–24.
- Jenner, R.A. (2010) Higher-level crustacean phylogeny: consensus and conflicting hypotheses. *Arthropod Structure & Development*, 39: 143–153.
- Keilin, D. (1959) The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 150: 149–191.
- Kelly, C.D. (2015) Sexual size and shape dimorphism and allometric scaling patterns in head traits in the New Zealand common gecko *Woodworthia maculatus*. *Zoology*, 118: 248–254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.zool.2015.02.002>
- Kendall, D.G. (1977) The diffusion of shape. *Advances in Applied Probability*, 9: 428–430.
- Kessel, R.G. (1983) The Structure and Function of Annulate Lamellae: Porous Cytoplasmic and Intranuclear Membranes. *International Review of Cytology*, 82: 181–303.
- Kessel, R.G. (1992) Annulate lamellae: a last frontier in cellular organelles. *International Review of Cytology*, 133: 43–120.
- King, J.L. & Hanner, R. (1998) Cryptic species in a 'living fossil' lineage: taxonomic and phylogenetic relationships within the genus *Lepidurus* (Crustacea: Notostraca) in North America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 10: 23–36.
- King, K.C. & Hurst, G.D.D. (2010) Losing the desire: selection can promote obligate asexuality. *BMC Biology*, 8: 101.
- Klingenberg, C.P. (1996) Multivariate Allometry. In: Corti, M., Loy, A., Naylor, G.J.P., Slice, D.E. (Eds.), *Advances in Morphometrics*. Plenum Press, New York, pp. 23–49.
- Klingenberg, C.P. (1998) Heterochrony and allometry: the analysis of evolutionary change in ontogeny. *Biological Reviews*, 73: 79–123.
- Klingenberg, C.P. (2010) Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews/Genetics*, 11: 623–635.

- 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.
- Korn, M., Marrone, F., Pérez-Bote, J.L., Machado, M., Cristo, M., da Fonseca, L.C., Hundsdoerfer, A.K. (2006) Sister species within the *Triops cancriformis* lineage (Crustacea, Notostraca). *Zoologica Scripta*, 35: 301–322. doi: 10.1111/j.1463-6409.2006.00230.x
- Korn, M., Green, A.J., Machado, M., García-de-Lomas, J., Cristo, M., Cancela da Fonseca, L., Frisch, D., Pérez-Bote, J.L., Hundsdoerfer, A.K. (2010) Phylogeny, molecular ecology and taxonomy of southern Iberian lineages of *Triops mauritanicus* (Crustacea: Notostraca). *Organisms Diversity & Evolution*, 10: 409–440.
- Korn, M. & Hundsdoerfer, A.K. (2016) Molecular phylogeny, morphology and taxonomy of Moroccan *Triops granarius* (Lucas, 1864) (Crustacea: Notostraca), with the description of two new species. *Zootaxa*, 4178: 328–346.
- Kwon, S.J., Jun, Y.C., Park, J.H., Won, D.H., Seo, E.W., Lee, J.E. (2010) Effect of Water Temperature on the Growth of *Triops longicaudatus* (LeConte) (Notostraca: Triopsidae). *Journal of Life Science*, 20: 1662–1666.
- Lakka, H.K. (2013) The ecology of a freshwater crustacean: *Lepidurus arcticus* (Branchiopoda: Notostraca) in a High Arctic region. *M.Sc. Thesis No. 111*. The University of Helsinki, Lahti, pp. 1–151.
- Lakka, H.K. (2015) Description of the male *Lepidurus arcticus* (Branchiopoda: Notostraca) and the potential role of cannibalism in defining male form and population sex ratio. *Journal of Crustacean Biology*, 35: 319–329.
- Lande, R. (1980) Sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in polygenic characters. *Evolution*, 34: 292–305.
- Lapinski, J. & Tunnacliffe, A. (2003) Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. *FEBS Letters*, 553: 387–390.
- Leśniewska, M., Bonato, L., Minelli, A., Fusco, G. (2009) Trunk anomalies in the centipede *Stigmatogaster subterranea* provide insight into late-embryonic segmentation. *Arthropod Structure and Development*, 38: 417–426.
- Liang, P., Amons, R., MacRae, T.H., Clegg, J.S., (1997a) Purification, structure and molecular chaperone activity in vitro of *Artemia* p26, a small heat-shock/ α -crystallin protein. *European Journal of Biochemistry*, 243: 225–232.
- Liang, P., Amons, R., Clegg, J.S., MacRae, T.H. (1997b) Molecular characterization of a small heat shock/ α -crystallin protein in encysted *Artemia* embryos. *Journal of Biological Chemistry*, 272: 19051–19058.
- Linder, F. (1952) Contributions to the morphology and taxonomy of the Branchiopoda Notostraca, with special reference to the North American Species. *Proceedings of the United States National Museum*, 102: 1–69.
- Longhurst, A.R. (1954) Reproduction in Notostraca (Crustacea). *Nature*, 173: 781–782.

- Longhurst, A.R. (1955a) A review of the Notostraca. *Bulletin of the British Museum (Natural History)*, 3: 1–57.
- Longhurst, A.R. (1955b) The reproduction and cytology of the Notostraca (Crustacea, Phyllopoda). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 125: 671–680.
- Longhurst, A.R. (1955c) Evolution in the Notostraca. *Evolution*, 9: 84–86.
- Longhurst, A.R. (1958) Abnormal Variation in the Notostraca. *Systematic Zoology*, 7: 84–88. <http://dx.doi.org/10.2307/2411795>
- Lozano-Fernandez, J., Carton, R., Tanner, A.R., Puttick, M.N., Blaxter, M., Vinther, J., Olesen, J., Giribet, G., Edgecombe, G.D., Pisani, D. (2016) A molecular palaeobiological exploration of arthropod terrestrialization. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 371: 20150133.
- Lozano-Fernandez, J., Giacomelli, M., Fleming, J.F., Chen, A., Vinther, J., Thomsen, P.F., Glenner, H., Palero, F., Legg, D.A., Iliffe, T.M., Pisani, D., Olesen, J. (2019) Pancrustacean evolution illuminated by taxon-rich genomic-scale data sets with an expanded remipede sampling. *Genome Biology and Evolution*, 11: 2055–2070.
- Lučić, L.R. (1995) Structural changes in the abdominal segmentation during postembryogenesis in *Neobisium carpaticum* Beier, 1934 and *Roncus pannoniensis* Ćurčić, Dimitrijević, Karamata, 1992 (Neobisiidae, Pseudoscorpiones, Arachnida). *Master Thesis*. University of Belgrade, Faculty of Biology, Belgrade, pp. 1–97.
- Lukić, D., Nahirnić, A., Marković, A., Karan Žnidaršič, T., Šćiban, M., Miličić, D. (2012) An Updating of Large Branchiopods (Crustacea: Branchiopoda) distribution in Serbia. *Acta Zoologica Bulgarica, Supplement*, 4: 19–23.
- Luppi, T.A. & Spivak, E.D. (2007) Morphology of megalopa and first crab of *Cyrtograpsus angulatus*, with comments on the presence of an anomalous first crab stage in brachyuran crabs. *Journal of Crustacean Biology*, 27: 80–89.
- Lynch, J.E. (1972) *Lepidurus couesii* Packard (Notostraca) redescribed with a discussion of specific characters in the genus. *Crustaceana*, 23: 43–49.
- Lynch, M. (1984) Destabilizing hybridization, general-purpose genotypes and geographic parthenogenesis. *The Quarterly Review of Biology*, 59: 257–290.
- Maccari, M., Gómez, A., Hontoria, F., Amat, F. (2013) Functional rare males in diploid parthenogenetic *Artemia*. *Journal of Evolutionary Biology*, 26: 1934–1948.
- Maccari, M., Amat, F., Hontoria, F., Gómez, A. (2014) Laboratory generation of new parthenogenetic lineages supports contagious parthenogenesis in *Artemia*. *PeerJ*, 2: e439.
- MacDonald, G.H. & Browne, R.A. (1987) Inheritance and reproductive role of rare males in a parthenogenetic population of the brine shrimp *Artemia parthenogenetica*. *Genetica*, 75: 47–54.
- Macdonald, K.S., Sallenave, R., Cowley, D.E. (2011) Morphological and genetic variation in *Triops* (Branchiopoda: Notostraca) from ephemeral waters of the northern Chihuahuan Desert of North America. *Journal of Crustacean Biology*, 31: 468–484.

- Machado, M., Sousa, L.G., Cancela da Fonseca, L., Galioto, E.D., Caramujo, M.J. (2017) First record of the tadpole shrimp *Triops cancriformis* (Lamarck,1801) (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca) in Portugal. *Limnetica*, 36: 543–555.
- Makarov, S.E. (1995) Malformation of the limbs in the later ontogenesis of *Roncus pannoniensis* Ćurčić, Dimitrijević, Karamata, 1992 (Neobisiidae, Pseudoscorpiones, Arachnida). *Master Thesis*. University of Belgrade, Faculty of Biology, Belgrade, pp. 1–112.
- Mantovani, B., Cesari, M., Scanabissi, F. (2009) Molecular taxonomy and phylogeny of Italian *Lepidurus* taxa (Branchiopoda: Notostraca). *Italian Journal of Zoology*, 76: 358–365.
- Mardia, K.V., Bookstein, F.L., Moreton, I.J. (2000) Statistical assessment of bilateral symmetry of shapes. *Biometrika*, 87: 285–300.
- Margraf, J. & Maass, B. (1982) Zur Ökologie der temporären Süßwasserflachseen des Tafelberges “Giara di Gesturi” auf Sardinien. *Spixiana*, 5: 69–99.
- Martin, J.W. (1992) Chapter 3: Branchiopoda. In: Harrison, F.W., Humes, A.G. (Eds.), *Microscopic Anatomy of Invertebrates. Crustacea, Volume 9*. Wiley-Liss, Inc., NY, pp. 25–244.
- Martin, J.W. & Davis, G. (2001) An Updated Classification of the Recent Crustacea. *Natural History Museum of Los Angeles County, Science Series 39*, Los Angeles, CA, pp. 1–124.
- Martin, J.W. & Boyce, S.L. (2004) Crustacea: non-cladoceran Branchiopoda. In: C. M. Yule, C.M., Yong, H.S. (Eds.), *Freshwater Invertebrates of the Malaysian Region*. Academy of Science Malaysia and Monash University, Kuala Lumpur, pp. 284–297.
- Martinelli-Filho, J.E., Melo-Júnior, M., Cunha, D.R., Lopes, R.M. (2009) Rare sexual anomalies in *Temora stylifera* (Dana, 1849) (Copepoda: Calanoida). *Brazilian Journal of Biology*, 69: 455–456.
- Mathers, T.C., Hammond, R.L., Jenner, R.A., Zierold, T., Hänfling, B., Gómez, A. (2013) High lability of sexual system over 250 million years of evolution in morphologically conservative tadpole shrimps. *BMC Evolutionary Biology*, 13: 30.
- Mathers, T.C., Hammond, R.L., Jenner, R.A., Hänfling, B., Atkins, J., Gómez, A. (2015) Transition in sexual system and sex chromosome evolution in the tadpole shrimp *Triops cancriformis*. *Heredity*, 115: 37–46.
- Mazzini, M., Callaini, G., Mencarelli, C. (1984) A comparative analysis of the evolution of the egg envelopes and the origin of the yolk. *Italian Journal of Zoology*, 51: 35–101.
- Melo, P.A., Melo, J.M., Araújo, M., Neumann-Leitão, S. (2014) A morphological anomaly in *Clausocalanus mastigophorus* (Claus, 1863) (Copepoda, Calanoida) from St. Peter and St. Paul Archipelago. *Brazilian Journal of Biology*, 74: 728–729.
- Metri, R., de Oliveira, A.R., Baptista-Metri, C. (2016) Carapace shape of some aeglid crabs: plasticity at different levels. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44: 453–459.
- Meusel, F. & Schwentner, M. (2016) Molecular and morphological delimitation of Australian *Triops* species (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca)—large diversity and little morphological differentiation. *Organisms Diversity & Evolution*, 17: 137.

- Miličić, D., Pavković-Lučić, S., Lučić, L. (2013) On some morphological abnormalities in adult fairy shrimp *Branchipus schaefferi* Fischer, 1834, from Serbia. *Archives of Biological Sciences Belgrade*, 65: 1645–1650.
- Miličić, D., Lukić, D., Nahirnić, A., Šćiban, M., Marković, A. (2014) Current status of ephemeral habitats of ancient Crustaceans (Class Branchiopoda) in Serbia with varying degrees of human impact. *Journal of BioScience and Biotechnology*, SE/ONLINE: 165–170.
- Miličić, D., Pavković-Lučić, S., Savić, T., Trajković, J., Tomović, Lj. (2017) Morphological analyses allow to separate *Branchipus* species (Branchiopoda, Anostraca) from different geographic Regions. *Hydrobiologia*, 801: 33–45. DOI 10.1007/s10750-017-3286-0
- Miller, M.C. (1980) Tadpole shrimp. In: Hobbie, J.E. (Ed.), *Limnology of Tundra Ponds, Barrow, Alaska, Volume 13*. U.S./IBP Synthesis Series, pp. 323–335.
- Minelli, A. & Pasqual, C. (1986) On some abnormal specimens of centipedes (Chilopoda). *Lavori della Società Veneziana di Scienze Naturale*, 11: 135–141.
- Miner, B.G., Sultan, S.E., Morgan, S.G., Padilla, D.K., Relyea, R.A. (2005) Ecological consequences of phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution*, 20: 685–692.
- Minton, R.L. & Wang, L.L. (2011) Evidence of sexual shape dimorphism in *Viviparus* (Gastropoda: Viviparidae). *Journal of Molluscan Studies*, 77: 315–317.
- Mitsumoto, H. & Yahata, K. (2006) Evidence of cross-fertilization in a gonochoric population of the tadpole shrimp *Triops numidicus* (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca). *Zoological Science*, 23: 1109–1113.
- Mitteroecker, P., Gunz, P., Bernhard, M., Schaefer, K., Bookstein, F.L. (2004) Comparison of cranial ontogenetic trajectories among great apes and humans. *Journal of Human Evolution*, 46: 679–698.
- Mitteroecker, P. & Gunz, P. (2009) Advances in Geometric Morphometrics. *Evolutionary biology*, 36: 235–247.
- Mitteroecker, P., Gunz, P., Windhager, S., Schaefer, K. (2013) A brief review of shape, form, and allometry in geometric morphometrics, with applications to human facial morphology. *Hystrix*, 24: 59–66.
- Møller, A.P. & Swaddle, J.P. (1997) *Asymmetry, Developmental Stability and Evolution*. Oxford University Press, 291 pp.
- Moore, D.S., Hansen, R., Hand, S.C. (2016) Liposomes with diverse compositions are protected during desiccation by LEA proteins from *Artemia franciscana* and trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1858: 104–115.
- Moreno, N. (2006) Image Processing with ImageJ. *Optical Imaging Techniques in Cell Biology*, 249–258.
- Morotomi, K., Murakami, K., Nagashima, J. (2004) Proteins in the diapause eggs of *Triops longicaudatus*. *Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology*, 48: 49–53.
- Morris, J.E. & Afzelius, B.A. (1967) The structure of the shell and outer membranes in encysted *Artemia salina* embryos during cryptobiosis and development. *Journal of Ultrastructure Research*, 20: 244–259.

- Moura, G. & Christoffersen, M.L. (1996) The system of the mandibulate arthropods: Tracheata and Remipedia as sister groups, “crustacea” non-monophyletic. *Journal of Computational Biology*, 1: 95–113.
- Muñoz, J., Gómez, A., Green, A.J., Figuerola, J., Amat, F., Rico, C. (2010) Evolutionary origin and phylogeography of the diploid obligate parthenogen *Artemia parthenogenetica* (Branchiopoda: Anostraca). *PLoS ONE*, 5: e11932.
- Murugan, G., Obregón-Barboza, H., Maeda-Martínez, A.M., Timms, B.V. (2009) Co-occurrence of two tadpole shrimp, *Triops cf. australiensis* (Branchiopoda: Notostraca), lineages in middle Paroo, north-western New South Wales, with the first record of *Triops* hermaphrodites for the Australian continent. *Australian Journal of Zoology*, 57: 77–84.
- Naganawa, H. (2018) First record of *Triops strenuus* Wolf, 1911 (Branchiopoda, Notostraca), a tadpole shrimp of Australian origin, from Japan. *Crustaceana*, 91: 425–438.
- Napiórkowska, T., Templin, J., Napiórkowski, P. (2015a) Morphological and anatomical changes related to leg anomalies in *Tegenaria atrica*. *Zoomorphology*, 134: 237–245.
- Napiórkowska, T., Napiórkowski, P., Templin, J. (2015b) Teratological deformities of pedipalps in the *Tegenaria atrica* spider, induced by low and high temperatures applied alternately. *Journal of Thermal Biology*, 56: 50–54.
- Negrea, S., Botnariuc, N., Dumont, H.J. (1999) Phylogeny, evolution and classification of the Branchiopoda (Crustacea). *Hydrobiologia*, 412: 191–212.
- Nougué, O., Rode, N.O., Jabbour-Zahab, R., Ségard, A., Chevin, L.-M., Haag, C.R., Lenormand, T. (2015) Automixis in *Artemia*: solving a century-old controversy. *Journal of Evolutionary Biology*, 28: 2337–2348.
- Oakley, T.H., Wolfe, J.M., Lindgren, A.R., Zaharoff, A.K. (2012) Phylotranscriptomics to Bring the Understudied into the Fold: Monophyletic Ostracoda, Fossil Placement, and Pancrustacean Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 215–233.
- Obregon-Barboza, H., Maeda-Martinez, A.M., Murugan, G. (2001) Reproduction, molting, and growth rate of two Mexican uniparental forms of the tadpole shrimp *Triops* (Branchiopoda: Notostraca) under a recirculating culture system. *Hydrobiologia*, 462: 173–184.
- Olesen, J. (2000) An updated phylogeny of the Conchostraca – Cladocera clade (Branchiopoda, Diplostraca). *Crustaceana*, 73: 869–886.
- Olesen, J. (2007) Monophyly and phylogeny of Branchiopoda, with focus on morphology and homologies of branchiopod phyllopodous limbs. *Journal of crustacean biology*, 27: 165–183.
- Olesen, J. (2009) Phylogeny of Branchiopoda (Crustacea) – character evolution and contribution of uniquely preserved fossils. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 67: 3–39.
- Olesen, J. & Richter, S. (2013) Onychocaudata (Branchiopoda: Diplostraca), a new high-level taxon in branchiopod systematics. *Journal of Crustacean Biology*, 33: 62–65.
- Olesen, J. (2013) The crustacean carapace: morphology, function, development, and phylogenetic history. In: Watling, L., Thiel, M. (Eds.), *Functional Morphology and Diversity*. Oxford University Press, pp. 103–139.

- Olson, C.S. & Clegg, J.S. (1978) A cell division during development of *Artemia salina*. *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, 184: 1–13.
- Olsson, M., Shine, R., Wapstra, E., Ujvari, B., Madsen, T. (2002) Sexual dimorphism in lizard body shape: the roles of sexual selection and fecundity selection. *Evolution*, 56: 1538–1542.
- Ombretta, M., Cesari, M., Eder, E., Scanabissi, F., Mantovani, B. (2005) Chromosomes in sexual populations of Notostracan and Conchostracan taxa (Crustacea, Branchiopoda). *Caryologia*, 58: 164–170.
- Packard, A.S. (1875) New phyllopod crustaceans. *American Naturalist*, 9: 311–312.
- Pannell, J.R. & Barrett, S.C.H. (1998) Baker's law revisited: reproductive assurance in a metapopulation. *Evolution*, 52: 657–668.
- Pannell, J.R. (2000) A hypothesis for the evolution of androdioecy: the joint influence of reproductive assurance and local mate competition in a metapopulation. *Evolutionary Ecology*, 14: 195–211.
- Pannell, J.R. (2002) The evolution and maintenance of androdioecy. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 33: 397–425.
- Pannell, J.R. (2008) Consequences of inbreeding depression due to sex-linked loci for the maintenance of males and outcrossing in branchiopod crustaceans. *Genetics Research*, 90: 73–84.
- Pearcy, M., Hardy, O.J., Aron, S. (2006) Thelytokous parthenogenesis and its consequences on inbreeding in an ant. *Heredity*, 96: 377–382.
- Pearcy, M., Hardy, O.J., Aron, S. (2011) Automictic parthenogenesis and rate of transition to homozygosity. *Heredity*, 107: 187–188. doi:10.1038/hdy.2010.172
- Petrov, B. & Cvetković, D. (1997) Community structure of branchiopods (Anostraca, Notostraca and Conchostraca) in the Banat Province in Yugoslavia. *Hydrobiologia*, 359: 23–28.
- Pincheira-Donoso, D., Hunt, J. (2015) Fecundity selection theory: concepts and evidence. *Biological Reviews*, 92: 341–356.
- Punzalan, D. & Hosken, D.J. (2010) Sexual Dimorphism: Why the Sexes Are (and Are Not) Different. *Current Biology*, 20: R972–R973.
- R Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>
- Raghunayakula, S., Subramonian, D., Dasso, M., Kumar, R., Zhang, X.-D. (2015) Molecular Characterization and Functional Analysis of Annulate Lamellae Pore Complexes in Nuclear Transport in Mammalian Cells. *PLoS ONE*, 10: e0144508.
- Regier, J.C., Schultz, J.W., Kambic, R.E. (2005) Pancrustacean phylogeny: hexapods are terrestrial crustaceans and maxillopods are not monophyletic. *Proceedings of the Royal Society B*, 272: 395–401.
- Regier, J.C., Shultz, J.W., Zwick, A., Hussey, A., Ball, B., Wetzler, R., Martin, J.W., Cunningham, C.W. (2010) Arthropod relationships revealed by phylogenomic analysis of nuclear protein coding sequences. *Nature*, 463: 1079–83.

- Richter, S. (2002) The Tetraconata concept: hexapod-crustacean relationships and the phylogeny of Crustacea. *Organisms Diversity and Evolution*, 2: 217–237.
- Richter, S. (2004) A comparison of the mandibular gnathal edges in branchiopod crustaceans: implications for the phylogenetic position of the Laevicaudata. *Zoomorphology*, 123: 31–44.
- Richter, S., Olesen, J., Wheeler, W.C. (2007) Phylogeny of Branchiopoda (Crustacea) based on a combined analysis of morphological data and six molecular loci. *Cladistics*, 23: 301–336.
- Richter, S., Møller, O.S., Wirkner, C.S. (2009) Advances in Crustacean Phylogenetics. *Arthropod Systematics & Phylogeny*, 67: 275–286.
- Rogers, D.C. (2001) Revision of the Nearctic *Lepidurus* (Notostraca). *Journal of Crustacean Biology*, 21: 991–1006.
- Rogers, D.C. (2009) Branchiopoda (Anostraca, Notostraca, Laevicaudata, Spinicaudata, Cyclotherida). In: Likens, G.F. (Ed.), *Encyclopedia of Inland Waters*, 2: 242–249.
- Rogers, D.C. (2014) Larger hatching fraction in avian dispersed anostracan eggs (Branchiopoda). *Journal of Crustacean Biology*, 34: 135–143.
- Rogers, D.C. (2019) Introduction to the Subphylum Crustacea. In: Rogers, D.C., Thorp, J.H. (Eds.), *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, Volume 4: Keys to Palaearctic Fauna*. Academic Press, pp. 565–641.
- Rogers, D.C., Kotov, A.A., Sinev, A.Y., Glagolev, S.M., Korovchinsky, N.M., Smirnov, N.N., Bekker, E.I. (2019) Arthropoda: Class Branchiopoda. In: Rogers, D.C., Thorp, J.H. (Eds.), *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, Volume 4: Keys to Palaearctic Fauna*. Academic Press, pp. 643–724.
- Rohlf, F.J. & Slice, D. (1990) Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, 39: 40–59.
- Rohlf, F.J. (2006) tpsDig, version 2.26. State University of New York, Stony Brook, New York, USA. Available at: <http://life.bio.sunysb.edu/morph>
- Sabelli Scanabissi, F. & Trentini, M. (1979) Ultrastructural observations on the oogenesis of *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca). II. Early developmental stages of the oocyte. *Cell and Tissue Research*, 201: 361–368.
- Sars, G.O. (1896) *Fauna Norvegiae. I. Descriptions of the Norwegian species at present known belonging to the suborders Phyllocarida and Phyllopora*. Joint-Stock Printing Co., Aschehoug, Christiania, 140 pp.
- Sassaman, C. (1991) Sex-ratio variation in female-biased populations of Notostracans. *Hydrobiologia*, 212: 169–179.
- Sassaman, C. & Weeks, S.C. (1993) The genetic mechanism of sex determination in the conchostracan shrimp *Eulimnadia texana*. *The American Naturalist*, 141: 314–328.
- Sassaman, C., Simovich, M.A., Fugate, M. (1997) Reproductive isolation and genetic differentiation in North American species of *Triops* (Crustacea: Branchiopoda: Notostraca). *Hydrobiologia*, 359: 125–147.

- Scanabissi Sabelli, F.S. & Tommasini, S. (1994) Functional morphology and ultrastructure of the male reproductive system in the Leptestheriidae (Branchiopoda, Conchostraca). *Crustaceana*, 67: 362–370.
- Scanabissi, F. & Mondini, C. (2000a) Origin and formation of eggshell in *Limnadia lenticularis* (Linnaeus, 1761), Crustacea, Branchiopoda, Conchostraca. *Invertebrate Reproduction and Development*, 37: 1–9.
- Scanabissi, F. & Mondini, C. (2000b) Sperm transfer and occurrence of spermatophore in the Conchostraca Leptestheriidae (Crustacea, Branchiopoda). *Invertebrate Reproduction and Development*, 38: 99–106.
- Scanabissi, F. & Mondini, C. (2002a) A survey of the reproductive biology in Italian branchiopods. Part A. The female gonad of *Limnadia lenticularis* (Linnaeus, 1761) (Spinicaudata) and *Lepidurus apus lubbocki* Brauer, 1873 (Notostraca). *Hydrobiologia*, 486: 263–272.
- Scanabissi, F. & Mondini, C. (2002b) A survey of the reproductive biology in Italian branchiopods. Part B. The male gonad of *Lepidurus apus lubbocki* Brauer, 1873 (Notostraca). *Hydrobiologia*, 486: 273–278.
- Scanabissi, F., Eder, E., Cesari, M., (2005) Male occurrence in Austrian populations of *Triops cancriformis* (Branchiopoda, Notostraca) and ultrastructural observations of the male gonad. *Invertebrate Biology*, 124: 57–65.
- Scanabissi, F., Alfonso, G., Bergamaschi, S., Mantovani, B. (2006a) Primo Ritrovamento di *Lepidurus couesii* Packard, 1875 in Italia. *Thalassia Salentina*, 29: 113–124.
- Scanabissi, F., Cesari, M., Reed, S.K., Weeks, S.C. (2006b) Ultrastructure of the male gonad and male gametogenesis in the clam shrimp *Eulimnadia texana* (Crustacea, Branchiopoda, Spinicaudata). *Invertebrate Biology*, 125: 117–124.
- Schmit, O., Bode, S.N.S., Camacho, A., Horne, D.J., Lamatsch, D.K., Martens, K., Martins, M.J.F., Namiotko, T., Rossetti, G., Rueda-Sevilla, J., Schön, I., Vandekerkhove, J., Mesquita-Joanes, F. (2013) Linking present environment and the segregation of reproductive modes (geographical parthenogenesis) in *Eucypris virens* (Crustacea: Ostracoda). *Journal of Biogeography*, 40: 2396–2408.
- Schwander, T., Vuilleumier, S., Dubman, J., Crespi, B.J. (2010) Positive feedback in the transition from sexual reproduction to parthenogenesis. *Proceedings of the Royal Society B*, 277: 1435–1442.
- Schwentner, M., Combosch, D.J., Pakes Nelson, J., Giribet, G. (2017) A Phylogenomic Solution to the Origin of Insects by Resolving Crustacean-Hexapod Relationships. *Current Biology*, 27: 1818–1824.
- Sheets, H.D. (2014) Integrated Morphometrics Package (IMP) 8, 2014.
- Shimizu, T., Kanamori, Y., Furuki, T., Kikawada, T., Okuda, T., Takahashi, T., Mihara, H., Sakurai, M. (2010) Desiccation-induced structuralization and glass formation of the group 3 late embryogenesis abundant protein model peptides. *Biochemistry*, 49: 1093–1104.
- Shine, R. (1989) Ecological Causes for the Evolution of Sexual Dimorphism: A Review of the Evidence. *Quarterly Review of Biology*, 64: 419–461.
- Shingleton, A.W., Frankino, W.A., Flatt, T., Nijhout, H.F., Emlen, D.J. (2007) Size and shape: the developmental regulation of static allometry in insects. *BioEssays*, 29: 536–548.

- Shingleton, A.W. (2010) Allometry: The Study of Biological Scaling. *Nature Education Knowledge*, 3: 2.
- Sidorovsky, S.A., Kargapolitseva, I.A., Kholmogorova, N.V. (2014) New data on the fauna of Anostraca, Notostraca and Conchostraca of the Udmurt Republic. *Amurian Zoological Journal*, 6: 12–14.
- Simon, J.-C., Delmotte, F., Rispe, C., Crease, T. (2003) Phylogenetic relationships between parthenogens and their sexual relatives: the possible routes to parthenogenesis in animals. *Biological Journal of the Linnean Society*, 79: 151–163.
- Sorek, M., Douek, J., Guy-Haim, T., Simon-Blecher, N., Rinkevich, B., Achituv, Y. (2016) Population genetics and reproductive strategies of two Notostraca (Crustacea) species from winter ponds in Israel. *Zoology in the Middle East*, 62: 331–341.
- Stafstrom, J.P. & Staehelin, L.A. (1984) Are Annulate Lamellae in the *Drosophila* Embryo the Result of Overproduction of Nuclear Pore Components? *Journal of Cell Biology*, 98: 699–708.
- Stenderup, J.T., Olesen, J., Glenner, H. (2006) Molecular phylogeny of the Branchiopoda (Crustacea) – multiple approaches suggest a ‘diplostracan’ ancestry of the Notostraca. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 41: 182–194.
- Stephan, S. (2008) Männchen von *Lepidurus apus* (Notostraca, crustacea) in der Rühstädter Elbtalaue. *Abhandlungen und Berichte für Naturkunde*, 31: 47–57.
- Stoeckle, B.C., Cowley, D.E., Schaack, Y., Macdonald III, K.S., Sallenave, R., Keuhn, R. (2013) Microsatellites for North American species of *Triops* (Branchiopoda: Notostraca). *Journal of Crustacean Biology*, 33: 48–55.
- Straka, U. (2004) Aktuelle Vorkommen von Groß-Branchiopoden (Crustacea: Anostraca, Notostraca, Conchostraca) im Tullner Feld (Niederösterreich). *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, 105B: 35–45.
- Strausfeld, N.J. & Andrew, D.R. (2011) A new view of insect-crustacean relationships I. Inferences from neural cladistics and comparative neuroanatomy. *Arthropod Structure and Development*, 40: 276–288.
- Suno-Uchi, N. (1997) Morphological stasis and phylogenetic relationships in Tadpole shrimps, *Triops* (Crustacea: Notostraca). *Biological Journal of the Linnean Society*, 61: 439–457.
- Suomalainen, E., Saura, A., Lokki, J. (1987) *Cytology and Evolution in Parthenogenesis*, CRC Press, Boca Raton, FL, 206 pp.
- Svendsen, N., Reisser, C.M.O., Dukić, M., Thuillier, V., Ségard, A., Liautard-Haag, C., Fasel, D., Hürlimann, E., Lenormand, T., Galimov, Y., Haag, C.R. (2015) Uncovering cryptic asexuality in *Daphnia magna* by RAD-sequencing. *Genetics*, 201: 1143–1155.
- Šaganović, I.D., Tomić, V.T., Lučić, L.R., Miličić, D.M. (2017) The first finding of *Lepidurus couesii* Packard, 1875 (Crustacea, Notostraca) in Western Balkans: A record based on the level of development of diagnostic body characters in a bisexual population from Serbia. *Acta Zoologica Bulgarica*, 8: 91–97.
- Šaganović, I., Makarov, S., Lučić, L., Pavković-Lučić, S., Tomić, V., Miličić, D. (2019) Developmental and other body abnormalities in the genus *Lepidurus* Leach 1819 (Crustacea: Notostraca) from Serbia. *Arthropoda Selecta*, 28: 65–72.

- Šarić, M. & Tomić, J. (2016) The first record of malformed pectines in genus *Euscorpius* (Scorpiones: Euscorpiidae). *Euscorpius*, 221: 1–10.
- Takahashi, F. (1977) Pioneer life of the tadpole shrimp, *Triops* spp. (Notostraca: Triopsidae). *Applied Entomology and Zoology*, 12: 104–117.
- Takahashi, F. & Gohda, M. (1981) The type of egg production curve with respect to population preservation: Ecological studies of tadpole shrimps (Branchiopoda: Triopsidae) for the biological control of weeds in rice paddies. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Theoretische und Angewandte Limnologie*, 21: 1531–1540.
- Tanguay, J.A., Reyes, R.C., Clegg, J.S. (2004) Habitat diversity and adaptation to environmental stress in encysted embryos of the crustacean *Artemia*. *Journal of Biosciences*, 29: 489–501.
- Tasch, P. (1969) Branchiopoda. In: Raymond, M.C. (Ed.), *Treatise on Invertebrate Paleontology, Part R, Arthropoda 4, Volume 1*. Boulder CO, University of Kansas, pp. 129–191.
- Thiéry, A. & Gasc, C. (1991) Resting eggs of Anostraca, Notostraca and Spinicaudata (Crustacea, Branchiopoda) occurring in France: identification and taxonomical value. *Hydrobiologia*, 212: 245–259.
- Thiéry, A. (1996) Large branchiopods (Crustacea: Anostraca, Notostraca, Spinicaudata, Laevicaudata) from temporary inland waters of the Arabian Peninsula. In: Krupp, F., Mahnert, V. (Eds.), *Fauna of Saudi Arabia, Riyadh, Saudi Arabia. National Commission for Wildlife Conservation and Development*. Basle Pro Entomologica, c/o Natural History Museum, pp. 37–98.
- Thiéry, A. (1997) Horizontal distribution and abundance of cysts of several large branchiopods in temporary pool and ditch sediments. *Hydrobiologia*, 359: 177–189.
- Thorp, J.H. (2009) Arthropoda and Related Groups. In: Resh, V.H., Cardé, R.T. (Eds.), *Encyclopedia of Insects. 2nd edition*. Academic Press, San Diego, CA, pp. 50–56.
- Thorp, J.H. & Rogers, D.C. (2011) Fairy Shrimp, Tadpole Shrimp, Clam Shrimp, and Water Fleas: Subphylum Crustacea, Class Branchiopoda. In: Thorp, J.H., Rogers, D.C. (Eds.), *Field Guide to Freshwater Invertebrates of North America*. Academic Press, pp. 127–138.
- Thorp, J.H. & Rogers, D.C. (2015) Introduction to the Phylum Arthropoda. In: Rogers, D.C., Thorp, J.H. (Eds.), *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, Volume 1: Ecology and General Biology*. Academic Press, pp. 591–597.
- Thorp, J.H., Rogers, D.C., Covich, A.P. (2015) Introduction to "Crustacea". In: Rogers, D.C., Thorp, J.H. (Eds.), *Thorp and Covich's Freshwater Invertebrates, Volume 1: Ecology and General Biology*. Academic Press, pp. 671–686.
- Timmermans, M.J.T.N., Roelofs, D., Mariën, J., van Straalen, N.M. (2008) Revealing pancrustacean relationships: Phylogenetic analysis of ribosomal protein genes places Collembola (springtails) in a monophyletic Hexapoda and reinforces the discrepancy between mitochondrial and nuclear DNA markers. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 83.
- Tomić, V., Dudić, B., Lučić, L., Büchs, W., Sivčev, I., Gotlin-Čuljak, T. (2016) A case of palpal malformation in *Pardosa agrestis* (Westring, 1861). *Arachnology*, 17: 155–156.
- Tomkins, J.L. & Kotiaho, J.S. (2001) Fluctuating Asymmetry. In: Macmillan Publishers Ltd., Nature Publishing Group (Eds.), *Encyclopedia of Life Sciences*, pp. 1–5. doi.org/10.1038/npg.els.0003741

- Tommasini, S. & Scanabissi Sabelli, F. (1989) Eggshell origin and structure in two species of Conchostraca (Crustacea, Phyllopoða). *Zoomorphology*, 109: 33–37.
- Tommasini, S., Scanabissi Sabelli, F., Trentini, M. (1989) Scanning electron microscope study of eggshell development in *Triops cancriformis* (Bosc) (Crustacea, Notostraca). *Vie Milieu*, 39: 29–32.
- Tommasini, S. & Scanabissi Sabelli, F. (1992) Morphological and functional aspects of the female gonad of the conchostracan *Leptestheria dahalacensis* Rüppel, 1837 (Crustacea, Branchiopoda), and a comparison with the gonads of other Branchiopoda. *Canadian Journal of Zoology*, 70: 511–517.
- Trentini, M. & Scanabissi Sabelli, F. (1978) Ultrastructural observations on the oogenesis of *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca). I. Origin and differentiation of nurse cells. *Cell and Tissue Research*, 194: 71–77.
- Trentini, M. & Sabelli Scanabissi, F. (1982) Follicle duct cell ultrastructure and eggshell formation in *Triops cancriformis* (Crustacea, Notostraca). *Journal of Morphology*, 172: 113–121.
- Tucić, N. (2003) *Evoluciona biologija*. 2. izdanje. NNK International, Beograd, 436 pp.
- Tunnacliffe, A., Lapinski, J., McGee, B. (2005) A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia*, 546: 315–321.
- Tunnacliffe, A. & Wise, M.J. (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften*, 94: 791–812.
- Tunnacliffe, A., Hinch, D., Leprince, O., Macherel, D. (2010) LEA Proteins: Versatility of Form and Function. In: Lubzens, E., Cerda, J., Clark, M. (Eds.), *Dormancy and Resistance in Harsh Environments*. Springer, Berlin/Heidelberg, pp. 91–108.
- Vanschoenwinkel, B., Pinceel, T., Vanhove, M.P.M., Denis, C., Jocque, M., Timms, B.V., Brendonck, L. (2012) Toward a Global Phylogeny of the “Living Fossil” Crustacean Order of the Notostraca. *PLoS ONE*, 7 (4): e34998. doi:10.1371/journal.pone.0034998
- Velonà, A., Luchetti, A., Scanabissi, F., Mantovani, B. (2009): Genetic variability and reproductive modalities in European populations of *Triops cancriformis* (Crustacea, Branchiopoda, Notostraca). *Italian Journal of Zoology*, 7: 366–375.
- Viner, R.I. & Clegg, J.S. (2001) Influence of trehalose on the molecular chaperone activity of p26, a small heat shock/ α -crystallin protein. *Cell Stress Chaperones*, 6: 126–135.
- von Reumont, B.M., Jenner, R.A., Wills, M.A., Dell’Ampio, E., Pass, G., Ebersberger, I., Meyer, B., Koenemann, S., Iliffe, T.M., Stamatakis, A., Niehuis, O., Meusemann, K., Misof, B. (2012) Pancrustacean phylogeny in the light of new phylogenomic data: support for Remipedia as the possible sistergroup of Hexapoda. *Molecular Biology and Evolution*, 29: 1031–1045.
- Wagner, P., Haug, J.T., Haug, C. (2019) A new calmanostracan crustacean species from the Cretaceous Yixian Formation and a simple approach for differentiating fossil tadpole shrimps and their relatives. *Zoological Letters*, 5: 20.
- Wallossek, D. (1993) The Upper Cambrian *Rehbachella* and the phylogeny of Branchiopoda and Crustacea. *Fossils and Strata*, 32: 1–202.

- Weeks, S.C. (1990) Life-history variation under varying degrees of intraspecific competition in the tadpole shrimp *Triops longicaudatus* (LeConte). *Journal of Crustacean Biology*, 10: 498–503.
- Weeks, S.C., Posgai, R.T., Cesari, M., Scanabissi, F. (2005) Androdioecy inferred in the clam shrimp *Eulimnadia agassizii* (Spinicaudata: Limnadiidae). *Journal of Crustacean Biology*, 25: 323–328.
- Weeks, S.C., Benvenuto, C., Reed, S.K. (2006a) When males and hermaphrodites coexist: a review of androdioecy in animals. *Integrative and Comparative Biology*, 46: 449–464.
- Weeks, S.C., Reed, S.K., Cesari, M., Scanabissi, F. (2006b) Production of intersexes and the evolution of androdioecy in the clam shrimp *Eulimnadia texana* (Crustacea, Branchiopoda, Spinicaudata). *Invertebrate Reproduction and Development*, 49: 113–119.
- Weeks, S.C., Sanderson, T.F., Reed, S.K., Zofkova, M., Knott, B., Balaraman, U., Pereira, G., Senyo, D.M., Hoeh, W.R. (2006c). Ancient androdioecy in the freshwater crustacean *Eulimnadia*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273: 725–734.
- Weeks, S.C., Benvenuto, C., Sanderson, T.F., Duff, R.J. (2010) Sex chromosome evolution in the clam shrimp, *Eulimnadia texana*. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 1100–1106.
- Weeks, S.C., Brantner, J.S., Astrop, T.I., Ott, D.W., Rabet, N. (2014) The evolution of hermaphroditism from dioecy in crustaceans: selfing hermaphroditism described in a fourth spinicaudatan genus. *Evolutionary Biology*, 41: 251–261.
- Welch, W.J. & Brown, C.R. (1996) Influence of molecular and chemical chaperones on protein folding. *Cell Stress and Chaperones*, 1: 109–115.
- Wickham, H. (2016) ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York
- Wingstrand, K.G. (1978) Comparative Spermatology of the Crustacea Entomostraca. 1. Subclass Branchiopoda. *Det Kongelige Danske Videnskabernes Selskab Biologiske Skrifter*, 22: 1–67.
- Wise, M.J. (2002) The POPPs: Clustering and searching using peptide probability profiles. *Bioinformatics*, 18: S38–S45.
- Wise, M.J. (2003) LEAping to conclusions: A computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics*, 4: 52.
- Wise, M.J. & Tunnacliffe, A. (2004) POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends in Plant Science*, 9: 13–17.
- Wojtasik, B. & Bryłka-Wołk, M (2010) Reproduction and genetic structure of a freshwater crustacean *Lepidurus arcticus* from Spitsbergen. *Polish Polar Research*, 31: 33–44.
- Wolfe, A.F. (1971). A histological and histochemical study of the male reproductive system of *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda). *Journal of Morphology*, 135: 51–69.
- Yi, D.A., Kuprin, A.V., Bae, Y.J. (2017) Morphological anomalies of endangered Korean relict long-horned beetle *Callipogon relictus* (Cerambycidae, Coleoptera) during ontogenesis and possible causes of their occurrence. *Zookeys*, 714: 53–60.
- Zaffagnini, F. (1969) Rudimentary Hermaphroditism and Automictic Parthenogenesis in *Limnadia lenticularis* (Phyllopoda, Conchostraca). *Experientia*, 25: 650–651.

- Zaffagnini, F. & Trentini, M. (1980) The distribution and reproduction of *Triops cancriformis* (Bosc) in Europe (Crustacea Notostraca). *Monitore zoologico italiano (NS)*, 14: 1–8.
- Zanata, L.H., Espíndola, E.L.G., Rocha, O., Pereira, R.H.G. (2008) Morphological abnormalities in Cladocera (Branchiopoda) in a cascade of reservoirs in the middle and lower Tietê River São Paulo, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 68: 681–682.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L., Sheets, H.D. (2012) *Geometric Morphometrics for Biologists: A Primer*. 2nd edition. Elsevier Academic Press, San Diego, 478 pp.
- Zhang, Z.-Q. (2013) Animal biodiversity: An update of classification and diversity in 2013. *Zootaxa*, 3703: 005–011.
- Zierold, T. (2006) Morphological variation and genetic diversity of *Triops cancriformis* (Crustacea: Notostraca) and their potential for understanding the influence of postglacial distribution and habitat fragmentation. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Doctor rerum naturalium. Der Fakultät für Chemie und Physik, der Technischen Universität Bergakademie Freiberg eingereichte, pp. 1–212.
- Zierold, T., Hanfling, B., Gomez, A. (2007) Recent evolution of alternative reproductive modes in the 'living fossil' *Triops cancriformis*. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 161.
- Zierold, T., Montero-Pau, J., Hänfling, B., Gómez, A. (2009) Sex ratio, reproductive mode and genetic diversity in *Triops cancriformis*. *Freshwater Biology*, 54: 1392–1405.
- Zou, E. & Fingerman, M. (2000) External features of an intersex fiddler crab, *Uca pugilator* (Bosc, 1802) (Decapoda, Brachyura). *Crustaceana*, 73: 417–423.

8. Prilozi

Prilog Tabela 1. Detaljan prikaz karakteristika uzoraka vrste *L. couesii* korišćenih za analizu variranja oblika telzona sa kaudalnom laminom primenom metoda geometrijske morfometrije.

br.	ID	Lokalitet	Pol	Datum uzorkovanja
1	II_f_1	Crni Lug	ž	April 2010.
2	II_f_12	Crni Lug	ž	April 2010.
3	II_f_14	Crni Lug	ž	April 2010.
4	II_f_15	Crni Lug	ž	April 2010.
5	II_f_18	Crni Lug	ž	April 2010.
6	II_f_19	Crni Lug	ž	April 2010.
7	II_f_2	Crni Lug	ž	April 2010.
8	II_f_20	Crni Lug	ž	April 2010.
9	II_f_21	Crni Lug	ž	April 2010.
10	II_f_22	Crni Lug	ž	April 2010.
11	II_f_23	Crni Lug	ž	April 2010.
12	II_f_25	Crni Lug	ž	April 2010.
13	II_f_26	Crni Lug	ž	April 2010.
14	II_f_27	Crni Lug	ž	April 2010.
15	II_f_29	Crni Lug	ž	April 2010.
16	II_f_3	Crni Lug	ž	April 2010.
17	II_f_30	Crni Lug	ž	April 2010.
18	II_f_31	Crni Lug	ž	April 2010.
19	II_f_33	Crni Lug	ž	Maj 2010.
20	II_f_34	Crni Lug	ž	Maj 2010.
21	II_f_37	Crni Lug	ž	Maj 2010.
22	II_f_38	Crni Lug	ž	Maj 2010.
23	II_f_39	Crni Lug	ž	Maj 2010.
24	II_f_40	Crni Lug	ž	Maj 2010.
25	II_f_42	Crni Lug	ž	Maj 2010.
26	II_f_43	Crni Lug	ž	Maj 2010.
27	II_f_47	Crni Lug	ž	April 2010.
28	II_f_48	Crni Lug	ž	April 2010.
29	II_f_5	Crni Lug	ž	April 2010.
30	II_f_50	Crni Lug	ž	April 2010.
31	II_f_51	Crni Lug	ž	April 2010.
32	II_f_52	Crni Lug	ž	April 2010.
33	II_f_53	Crni Lug	ž	April 2010.
34	II_f_54	Crni Lug	ž	April 2010.

35	II_f_55	Crni Lug	ž	April 2010.
36	II_f_58	Crni Lug	ž	April 2011.
37	II_f_59	Crni Lug	ž	April 2011.
38	II_f_60	Crni Lug	ž	April 2011.
39	II_f_61	Crni Lug	ž	April 2011.
40	II_f_62	Crni Lug	ž	April 2011.
41	II_f_63	Crni Lug	ž	April 2011.
42	II_f_64	Crni Lug	ž	April 2011.
43	II_f_66	Crni Lug	ž	April 2011.
44	II_f_67	Crni Lug	ž	April 2011.
45	II_f_68	Crni Lug	ž	April 2011.
46	II_f_7	Crni Lug	ž	April 2010.
47	II_f_71	Crni Lug	ž	Mart 2013.
48	II_f_74	Crni Lug	ž	Mart 2013.
49	II_f_75	Crni Lug	ž	Mart 2013.
50	II_f_80	Crni Lug	ž	Maj 2013.
51	II_f_82	Crni Lug	ž	Maj 2013.
52	II_f_83	Crni Lug	ž	Maj 2013.
53	II_f_84	Crni Lug	ž	Maj 2013.
54	II_f_85	Crni Lug	ž	Maj 2013.
55	II_f_86	Crni Lug	ž	Maj 2013.
56	II_f_88	Crni Lug	ž	Maj 2021.
57	II_f_89	Crni Lug	ž	Maj 2021.
58	II_f_91	Crni Lug	ž	Maj 2021.
59	II_m_76	Crni Lug	m	Maj 2013.
60	II_m_78	Crni Lug	m	Maj 2013.
61	II_m_81	Crni Lug	m	Maj 2013.
62	II_m_90	Crni Lug	m	Maj 2021.
63	I_f_1	Galovica	ž	Maj 2008.
64	I_f_10	Galovica	ž	Maj 2008.
65	I_f_100	Galovica	ž	Maj 2008.
66	I_f_102	Galovica	ž	Maj 2008.
67	I_f_104	Galovica	ž	Maj 2008.
68	I_f_109	Galovica	ž	Maj 2008.
69	I_f_11	Galovica	ž	Maj 2008.
70	I_f_112	Galovica	ž	Maj 2008.
71	I_f_113	Galovica	ž	Maj 2008.
72	I_f_116	Galovica	ž	Maj 2008.
73	I_f_117	Galovica	ž	Maj 2008.

74	I_f_118	Galovica	ž	Maj 2008.
75	I_f_119	Galovica	ž	Maj 2008.
76	I_f_12	Galovica	ž	Maj 2008.
77	I_f_120	Galovica	ž	Maj 2008.
78	I_f_122	Galovica	ž	Maj 2008.
79	I_f_13	Galovica	ž	Maj 2008.
80	I_f_18	Galovica	ž	Maj 2008.
81	I_f_2	Galovica	ž	Maj 2008.
82	I_f_20	Galovica	ž	Maj 2008.
83	I_f_21	Galovica	ž	Maj 2008.
84	I_f_22	Galovica	ž	Maj 2008.
85	I_f_23	Galovica	ž	Maj 2008.
86	I_f_24	Galovica	ž	Maj 2008.
87	I_f_25	Galovica	ž	Maj 2008.
88	I_f_27	Galovica	ž	Maj 2008.
89	I_f_28	Galovica	ž	Maj 2008.
90	I_f_3	Galovica	ž	Maj 2008.
91	I_f_31	Galovica	ž	Maj 2008.
92	I_f_33	Galovica	ž	Maj 2008.
93	I_f_34	Galovica	ž	Maj 2008.
94	I_f_35	Galovica	ž	Maj 2008.
95	I_f_36	Galovica	ž	Maj 2008.
96	I_f_37	Galovica	ž	Maj 2008.
97	I_f_4	Galovica	ž	Maj 2008.
98	I_f_40	Galovica	ž	Maj 2008.
99	I_f_41	Galovica	ž	Maj 2008.
100	I_f_45	Galovica	ž	Maj 2008.
101	I_f_46	Galovica	ž	Maj 2008.
102	I_f_48	Galovica	ž	Maj 2008.
103	I_f_5	Galovica	ž	Maj 2008.
104	I_f_50	Galovica	ž	Maj 2008.
105	I_f_52	Galovica	ž	Maj 2008.
106	I_f_53	Galovica	ž	Maj 2008.
107	I_f_54	Galovica	ž	Maj 2008.
108	I_f_55	Galovica	ž	Maj 2008.
109	I_f_58	Galovica	ž	Maj 2008.
110	I_f_59	Galovica	ž	Maj 2008.
111	I_f_63	Galovica	ž	Maj 2008.
112	I_f_64	Galovica	ž	Maj 2008.

113	I_f_67	Galovica	ž	Maj 2008.
114	I_f_68	Galovica	ž	Maj 2008.
115	I_f_69	Galovica	ž	Maj 2008.
116	I_f_7	Galovica	ž	Maj 2008.
117	I_f_70	Galovica	ž	Maj 2008.
118	I_f_72	Galovica	ž	Maj 2008.
119	I_f_73	Galovica	ž	Maj 2008.
120	I_f_79	Galovica	ž	Maj 2008.
121	I_f_81	Galovica	ž	Maj 2008.
122	I_f_82	Galovica	ž	Maj 2008.
123	I_f_84	Galovica	ž	Maj 2008.
124	I_f_85	Galovica	ž	Maj 2008.
125	I_f_90	Galovica	ž	Maj 2008.
126	I_f_95	Galovica	ž	Maj 2008.
127	I_m_1	Galovica	m	Maj 2008.
128	I_m_2	Galovica	m	Maj 2008.
129	I_m_3	Galovica	m	Maj 2008.
130	I_m_4	Galovica	m	Maj 2008.
131	I_m_5	Galovica	m	Maj 2008.

Prilog Tabela 2. Detaljan prikaz karakteristika uzoraka vrste *L. couesii* korišćenih za analizu variranja oblika karapaksa primenom metoda geometrijske morfometrije.

br.	ID	Lokalitet	Pol	Datum uzorkovanja
1	II_f_12	Crni Lug	ž	April 2010.
2	II_f_13	Crni Lug	ž	April 2010.
3	II_f_15	Crni Lug	ž	April 2010.
4	II_f_16	Crni Lug	ž	April 2010.
5	II_f_17	Crni Lug	ž	April 2010.
6	II_f_18	Crni Lug	ž	April 2010.
7	II_f_19	Crni Lug	ž	April 2010.
8	II_f_20	Crni Lug	ž	April 2010.
9	II_f_21	Crni Lug	ž	April 2010.
10	II_f_25	Crni Lug	ž	April 2010.
11	II_f_26	Crni Lug	ž	April 2010.
12	II_f_27	Crni Lug	ž	April 2010.
13	II_f_28	Crni Lug	ž	April 2010.
14	II_f_29	Crni Lug	ž	April 2010.

15	II_f_3	Crni Lug	ž	April 2010.
16	II_f_30	Crni Lug	ž	April 2010.
17	II_f_33	Crni Lug	ž	Maj 2010.
18	II_f_35	Crni Lug	ž	Maj 2010.
19	II_f_37	Crni Lug	ž	Maj 2010.
20	II_f_38	Crni Lug	ž	Maj 2010.
21	II_f_39	Crni Lug	ž	Maj 2010.
22	II_f_41	Crni Lug	ž	Maj 2010.
23	II_f_42	Crni Lug	ž	Maj 2010.
24	II_f_43	Crni Lug	ž	Maj 2010.
25	II_f_48	Crni Lug	ž	April 2010.
26	II_f_5	Crni Lug	ž	April 2010.
27	II_f_50	Crni Lug	ž	April 2010.
28	II_f_52	Crni Lug	ž	April 2010.
29	II_f_53	Crni Lug	ž	April 2010.
30	II_f_55	Crni Lug	ž	April 2010.
31	II_f_56	Crni Lug	ž	April 2010.
32	II_f_58	Crni Lug	ž	April 2011.
33	II_f_59	Crni Lug	ž	April 2011.
34	II_f_61	Crni Lug	ž	April 2011.
35	II_f_63	Crni Lug	ž	April 2011.
36	II_f_64	Crni Lug	ž	April 2011.
37	II_f_66	Crni Lug	ž	April 2011.
38	II_f_67	Crni Lug	ž	April 2011.
39	II_f_68	Crni Lug	ž	April 2011.
40	II_f_69	Crni Lug	ž	Mart 2013.
41	II_f_7	Crni Lug	ž	April 2010.
42	II_f_74	Crni Lug	ž	Mart 2013.
43	II_f_75	Crni Lug	ž	Mart 2013.
44	II_f_79	Crni Lug	ž	Maj 2013.
45	II_f_82	Crni Lug	ž	Maj 2013.
46	II_f_85	Crni Lug	ž	Maj 2013.
47	II_f_88	Crni Lug	ž	Maj 2021.
48	II_f_89	Crni Lug	ž	Maj 2021.
49	II_f_91	Crni Lug	ž	Maj 2021.
50	II_f_92	Crni Lug	ž	Maj 2021.
51	II_m_76	Crni Lug	m	Maj 2013.
52	II_m_78	Crni Lug	m	Maj 2013.
53	II_m_81	Crni Lug	m	Maj 2013.

54	II_m_90	Crni Lug	m	Maj 2021.
55	I_f_11	Galovica	ž	Maj 2008.
56	I_f_113	Galovica	ž	Maj 2008.
57	I_f_114	Galovica	ž	Maj 2008.
58	I_f_115	Galovica	ž	Maj 2008.
59	I_f_116	Galovica	ž	Maj 2008.
60	I_f_117	Galovica	ž	Maj 2008.
61	I_f_118	Galovica	ž	Maj 2008.
62	I_f_119	Galovica	ž	Maj 2008.
63	I_f_12	Galovica	ž	Maj 2008.
64	I_f_120	Galovica	ž	Maj 2008.
65	I_f_121	Galovica	ž	Maj 2008.
66	I_f_13	Galovica	ž	Maj 2008.
67	I_f_14	Galovica	ž	Maj 2008.
68	I_f_16	Galovica	ž	Maj 2008.
69	I_f_18	Galovica	ž	Maj 2008.
70	I_f_19	Galovica	ž	Maj 2008.
71	I_f_21	Galovica	ž	Maj 2008.
72	I_f_24	Galovica	ž	Maj 2008.
73	I_f_27	Galovica	ž	Maj 2008.
74	I_f_28	Galovica	ž	Maj 2008.
75	I_f_31	Galovica	ž	Maj 2008.
76	I_f_41	Galovica	ž	Maj 2008.
77	I_f_53	Galovica	ž	Maj 2008.
78	I_f_70	Galovica	ž	Maj 2008.
79	I_f_85	Galovica	ž	Maj 2008.
80	I_m_3	Galovica	m	Maj 2008.
81	I_m_4	Galovica	m	Maj 2008.
82	I_m_5	Galovica	m	Maj 2008.

Prilog Tabela 3. Vrednosti Pirsonovih koeficijenta korelacije i nivo statističke značajnosti za određena poređenja.

Parovi morfoloških karakteristika	Pirsonov koeficijent korelacije	P vrednost
dužina karapaksa-dužina telzona sa kaudalnom laminom	0.9295	<0.001
širina telzona-dužina telzona sa kaudalnom laminom	0.9123	<0.001

Prilog Tabela 4. Sirove vrednosti za dijagnostičke karaktere deskriptivne statistike ispitane na uzorku ženki (32 jedinke). CL – dužina karapaksa, CW – širina karapaksa, AL – dužina abdomena od posteriorne ivice karapaksa do kraja telzona (bez kaudalne lamine), ^{cl}L – dužina kaudalne lamine, ^{tot}L – ukupna dužina tela, PS – broj prstenastih segmenata koji nisu prekriveni karapaksom, ^{LlessS} – broj prstenastih segmenata bez ekstremiteta, PL – broj parova ekstremiteta. Linearne mere su izražene u milimetrima (mm).

CL	CW	AL	^{cl} L	^{tot} L	PS	^{LlessS}	PL	^{cl} L/CL	CL/CW	AL/CL	CL/ ^{tot} L
16.77	10.21	3.83	3.43	24.03	6	4	36	0.20	1.64	0.23	0.70
18.84	11.73	3.25	3.05	25.14	6	5	36	0.16	1.61	0.17	0.75
19.19	11.63	3.39	3.12	25.7	7	4	34	0.16	1.65	0.18	0.75
17.62	10.55	2.35	2.81	22.78	5	5	37	0.16	1.67	0.13	0.77
16.79	11.02	2.96	2.77	22.52	5	4	38	0.16	1.52	0.18	0.75
17.77	10.89	1.91	2.82	22.5	3	4	37	0.16	1.63	0.11	0.79
18.71	11.29	1.15	2.86	22.72	1	4	37	0.15	1.66	0.06	0.82
21.06	12.38	2.76	3.54	27.36	5	4	37	0.17	1.70	0.13	0.77
17.03	10.33	2.1	2.44	21.57	5	4	38	0.14	1.65	0.12	0.79
20.59	11.77	2.54	3.55	26.68	4	5	38	0.17	1.75	0.12	0.77
20.63	11.57	0.43	3.17	24.23	0	5	35	0.15	1.78	0.02	0.85
17.67	10.52	1.39	2.68	21.74	3	5	37	0.15	1.68	0.08	0.81
18.58	10.92	2.41	2.65	23.64	5	5	36	0.14	1.70	0.13	0.79
16.98	10.44	2.76	2.77	22.51	5	4	37	0.16	1.63	0.16	0.75
19.65	10.99	1.41	3.46	24.52	3	4	37	0.18	1.79	0.07	0.80
19.05	10.69	4.05	3.54	26.64	6	4	38	0.19	1.78	0.21	0.72
19.88	12.22	1.27	3.47	24.62	2	4	38	0.17	1.63	0.06	0.81
19.54	11.4	1.37	3.1	24.01	2	4	38	0.16	1.71	0.07	0.81
17.98	11.34	3.69	3.4	25.07	6	4	37	0.19	1.59	0.21	0.72
17.41	10.03	1.62	2.69	21.72	4	4	38	0.15	1.74	0.09	0.80
16.26	11.14	2.46	2.73	21.45	3	4	37	0.17	1.46	0.15	0.76
17.73	10.35	2.04	2.88	22.65	4	5	38	0.16	1.71	0.12	0.78
18.17	10.51	0.95	3.3	22.42	2	4	38	0.18	1.73	0.05	0.81
20.34	12.51	0.35	3.3	23.99	0	4	39	0.16	1.63	0.02	0.85
20.06	12.37	0.34	3.42	23.82	0	5	38	0.17	1.62	0.02	0.84
20.54	11.93	0.79	3.53	24.86	1	4	39	0.17	1.72	0.04	0.83
18.25	10.54	1.22	3.07	22.54	2	4	39	0.17	1.73	0.07	0.81
20.4	11.5	0.21	3.66	24.27	0	4	37	0.18	1.77	0.01	0.84
15.86	9.85	0.96	2.32	19.14	2	4	39	0.15	1.61	0.06	0.83
16.84	10.34	1.21	2.56	20.61	2	5	39	0.15	1.63	0.07	0.82
16.92	10.71	0.92	2.52	20.36	1	5	37	0.15	1.58	0.05	0.83
16.72	10.1	1.24	2.69	20.65	2	4	35	0.16	1.66	0.07	0.81

Prilog Tabela 5. Opseg variranja i koeficijent varijacije (CV) za analizirane morfološke karaktere ($N_{\phi} = 32$). Oznake su iste kao u Prilog Tabeli 4.

Karakter	Opseg variranja	CV (%)
CL	15.86–21.06 mm	8.08
CW	9.85–12.51 mm	6.69
AL	0.21–4.05 mm	58.38
^{cl} L	2.32–3.66 mm	12.83
^{tot} L	19.14–27.36 mm	8.31
PS	0–7	64.89
L _{less} S	4–5	10.90
PL	34–39	3.30
^{cl} L/CL	0.14–0.20	6.25
CL/CW	1.46–1.79	4.79
AL/CL	0.01–0.23	60
CL/ ^{tot} L	0.70–0.85	5.06

Prilog Tabela 6. Prikaz sopstvenih vrednosti (engl. *eigenvalues*) i proporcije varijanse koju opisuju glavne komponente dobijene PCA analizom simetrične komponente oblika telzona sa kaudalnom laminom.

PC osa	Sopstvene vrednosti	Proporcija (%)	Kumulativno (%)
PC 1	0.008282846	89.93	89.93
PC 2	0.0003395519	3.69	93.62
PC 3	0.0002497025	2.71	96.33
PC 4	0.0001578856	1.71	98.04
PC 5	7.568242e-05	0.82	98.86
PC 6	3.724297e-05	0.40	99.27
PC 7	2.692597e-05	0.29	99.56
PC 8	1.678326e-05	0.18	99.74
PC 9	1.311443e-05	0.14	99.88
PC 10	8.651093e-06	0.09	99.98
PC 11	1.629721e-06	0.02	≈ 100
PC 12	2.988118e-07	0.003	≈ 100
PC 13	2.473166e-08	0.0003	≈ 100

PC 14	1.334945e-17	≈ 0	≈ 100
PC 15	2.821639e-18	≈ 0	≈ 100

Prilog Tabela 7. Prikaz sopstvenih vrednosti (engl. *eigenvalues*) i proporcije varijanse koju opisuju glavne komponente dobijene PCA analizom simetrične komponente oblika telzona sa kaudalnom laminom korigovane za efekat alometrije (uzorak ženki).

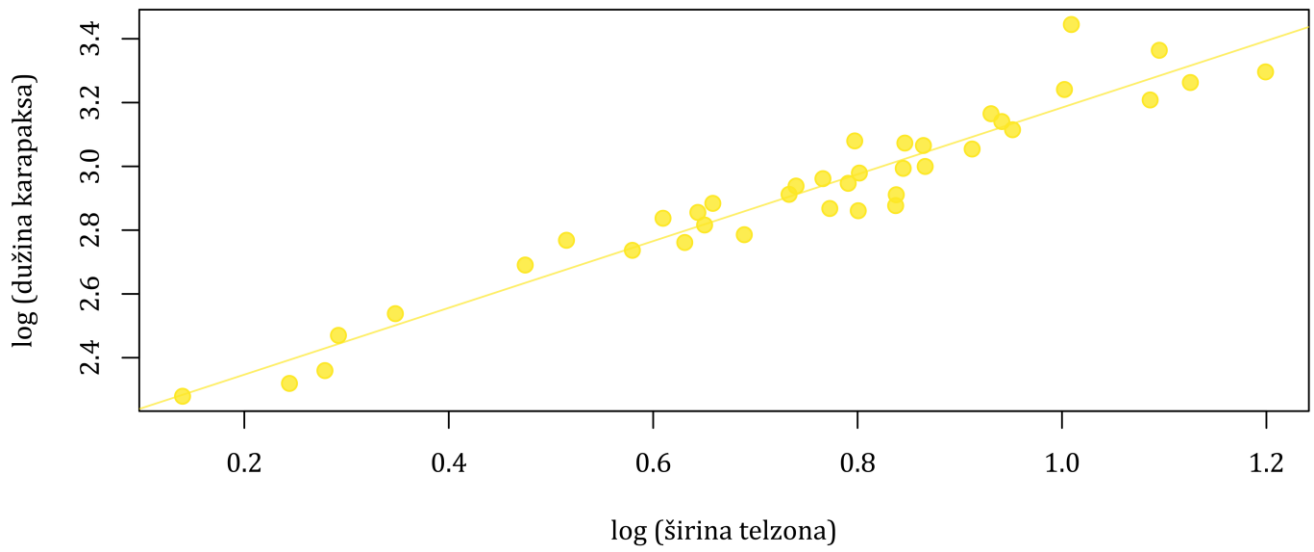
PC osa	Sopstvene vrednosti	Proporcija (%)	Kumulativno (%)
PC 1	0.001038664	55.89	55.89
PC 2	0.0003084013	16.59	72.48
PC 3	0.0002041336	10.98	83.47
PC 4	0.0001488028	8.01	91.47
PC 5	6.127856e-05	3.30	94.77
PC 6	3.474918e-05	1.87	96.64
PC 7	2.300533e-05	1.24	97.88
PC 8	0.000017622	0.95	98.82
PC 9	1.249159e-05	0.67	99.50
PC 10	7.961709e-06	0.43	99.93
PC 11	1.128153e-06	0.06	99.99
PC 12	2.231832e-07	0.01	≈ 100
PC 13	2.258894e-08	0.001	≈ 100
PC 14	1.046775e-17	≈ 0	≈ 100
PC 15	2.575247e-18	≈ 0	≈ 100
PC 16	5.214644e-19	≈ 0	≈ 100
PC 17	3.280431e-19	≈ 0	≈ 100

Prilog Tabela 8. Prikaz sopstvenih vrednosti (engl. *eigenvalues*) i proporcije varijanse koju opisuju glavne komponente dobijene PCA analizom simetrične komponente oblika karapaksa.

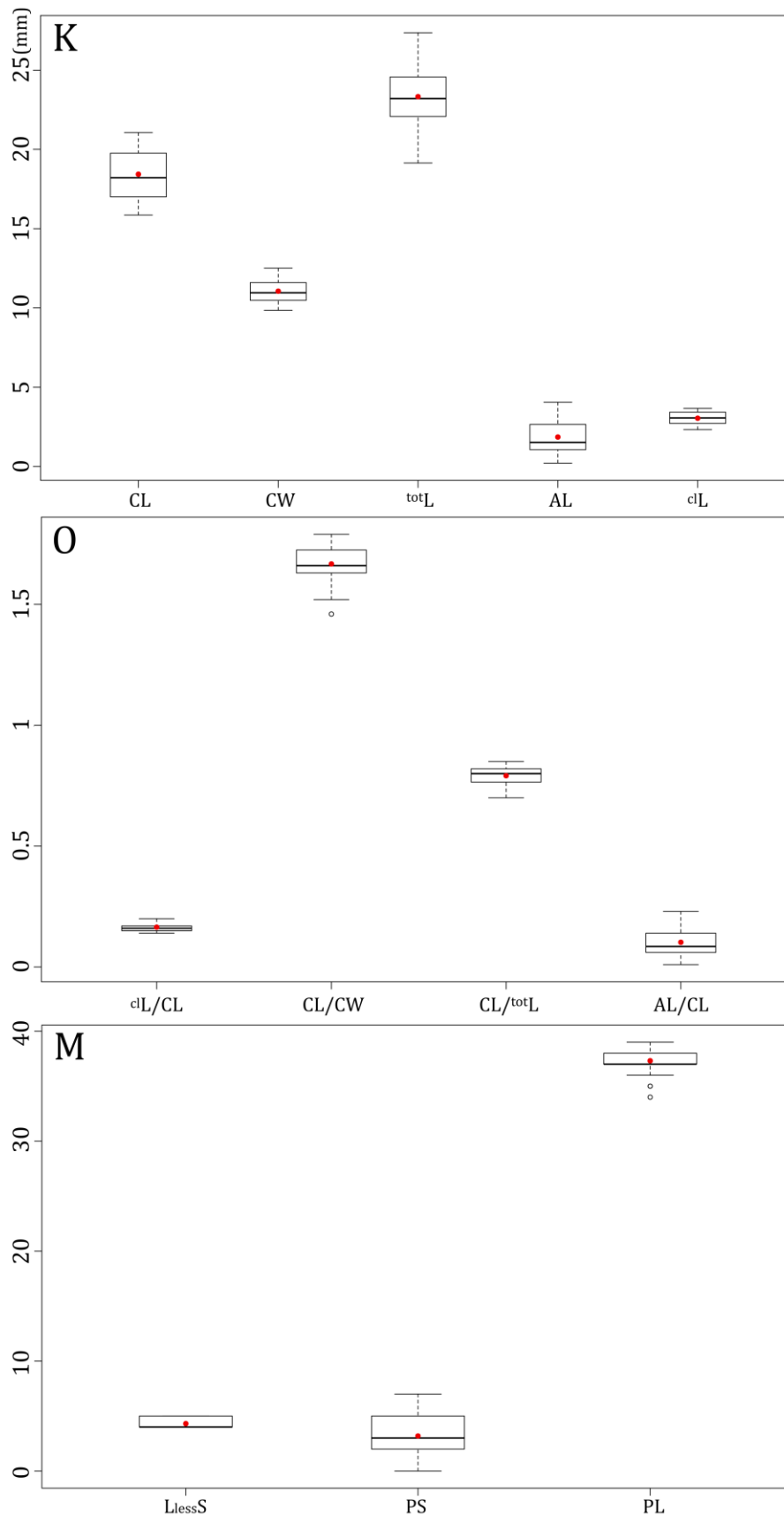
PC osa	Sopstvene vrednosti	Proporcija (%)	Kumulativno (%)
PC 1	0.003154121	73.44	73.44
PC 2	0.0006803504	15.84	89.28
PC 3	0.0002823981	6.57	95.85
PC 4	0.0001367257	3.18	99.04

PC 5	2.414463e-05	0.56	99.60
PC 6	1.053091e-05	0.24	99.84
PC 7	5.993908e-06	0.14	99.98
PC 8	5.712203e-07	0.01	99.99
PC 9	5.128657e-08	0.001	≈ 100
PC 10	3.350382e-08	0.0008	≈ 100
PC 11	1.047998e-15	≈ 0	≈ 100
PC 12	1.480613e-16	≈ 0	≈ 100
PC 13	3.723333e-17	≈ 0	≈ 100
PC 14	1.863215e-17	≈ 0	≈ 100
PC 15	8.628267e-18	≈ 0	≈ 100
PC 16	3.969628e-18	≈ 0	≈ 100
PC 17	3.622507e-18	≈ 0	≈ 100

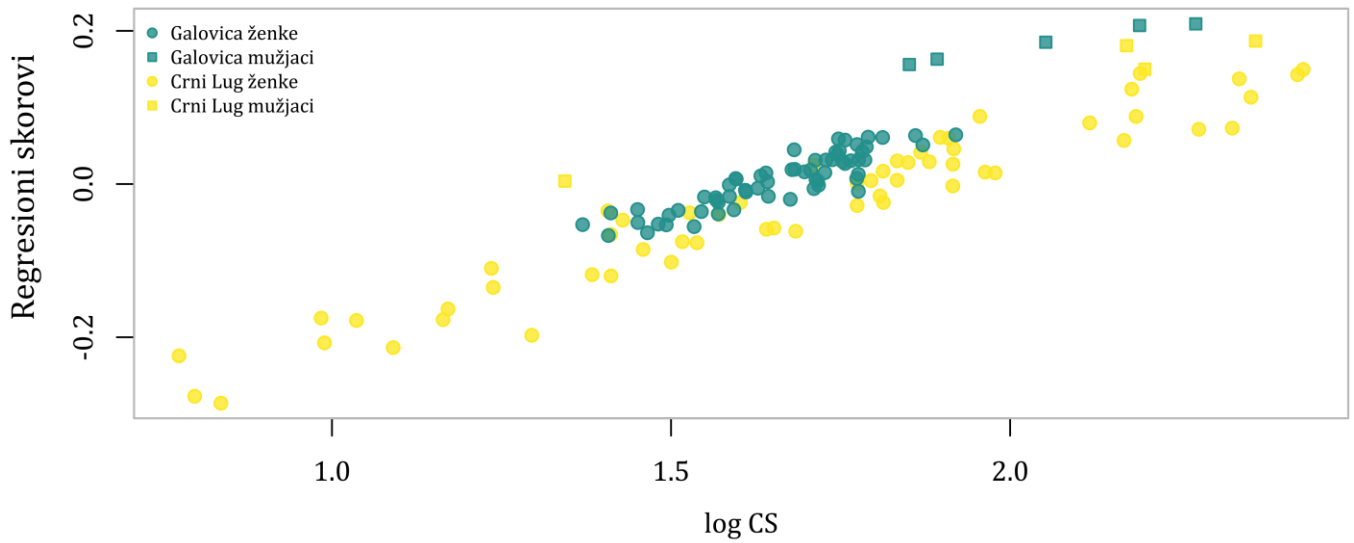
Prilog Slika 1. Grafik zavisnosti logaritmovanih vrednosti anteriorne širine telzona i dužine karapaksa (uzorak od 38 ženki sa lokaliteta Crni Lug).



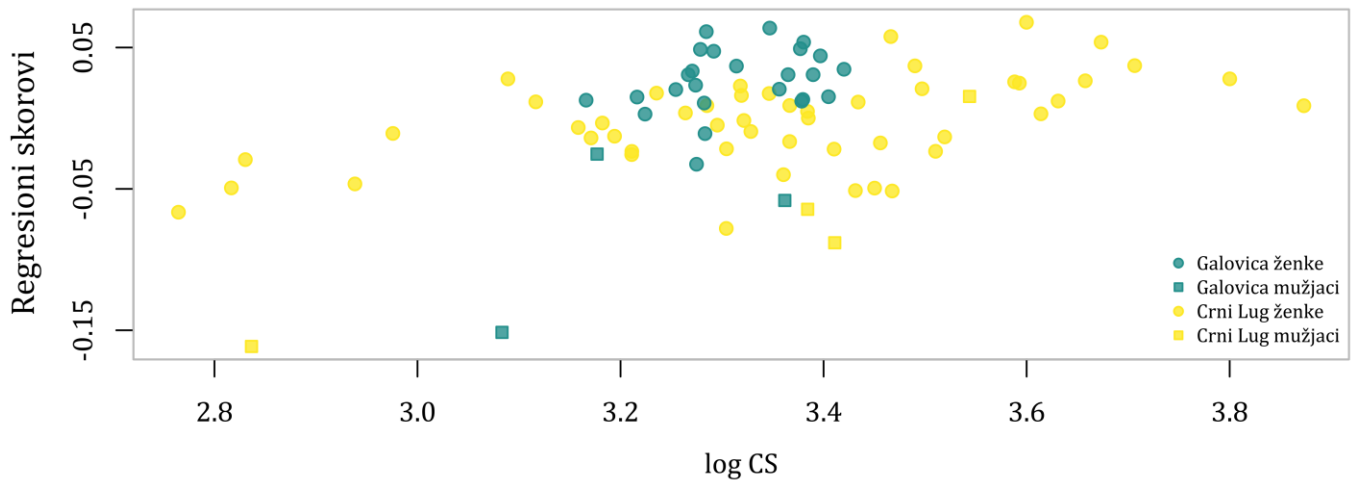
Prilog Slika 2. Boks dijagrami analiziranih morfoloških varijabli (oznake su iste kao u Tabeli 3). Horizontalne unutrašnje linije predstavljaju medijane. Donja i gornja ivica pravougaonika (boksova) definišu prvi i treći kvartil i obuhvataju interkvartilni raspon. Vertikalne linije se pružaju do minimalnih i maksimalnih vrednosti. Crvenim kružićima su predstavljene srednje vrednosti, dok su autlajeri predstavljeni praznim kružićima ($N_{\varnothing} = 32$).



Prilog Slika 3. Grafik zavisnosti regresionih skorova simetrične komponente oblika telzona sa kaudalnom laminom i logaritmovane vrednosti veličine centroida ($\log CS$) za četiri grupe jedinki.



Prilog Slika 4. Grafik zavisnosti regresionih skorova simetrične komponente oblika karapaksa i logaritmovane vrednosti veličine centroida ($\log CS$) za četiri grupe jedinki.



Biografija autora

Ivana D. Šaganović rođena je u Sremskoj Mitrovici, gde je završila osnovnu i srednju školu. Diplomirala je na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije je upisala školske 2014/2015. godine, na modulu Biologija razvića životinja. Kao doktorand, učestvovala je kao saradnik u nastavi na predmetima Biologija rakova i Zoologija beskičmenjaka. Autor je i koautor dva naučna rada u međunarodnim časopisima i sedam kongresnih saopštenja. Član je Srpskog biološkog društva.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора **Ивана Шагановић**

Број индекса **Б3039/2014**

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Морфолошка варијабилност и развојне аномалије врсте *Lepidurus couesii* Packard, 1875 (Branchiopoda, Notostraca) из Србије

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског
рада**

Име и презиме аутора **Ивана Шагановић**

Број индекса **Б3039/2014**

Студијски програм **Биологија**

Наслов рада **Морфолошка варијабилност и развојне аномалије врсте *Lepidurus couesii* Packard, 1875 (Branchiopoda, Notostraca) из Србије**

Ментори **др Владимир Томић**, ванредни професор

Универзитет у Београду – Биолошки факултет

др Драгана Миличић, доцент

Универзитет у Београду – Биолошки факултет

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

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада. Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Морфолошка варијабилност и развојне аномалије врсте *Lepidurus couesii* Packard, 1875 (Branchiopoda, Notostraca) из Србије

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

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

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

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

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

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци. Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

У Београду, _____

Потпис аутора

1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.