

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marko R. Đurakić

**Populaciona analiza morfološke varijabilnosti i
komparativna genska genealogija šumske kornjače
(*Testudo hermanni boettgeri*)**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marko R. Djuracic

**Population study of morphological variability and
comparative gene genealogy of Hermann's tortoise
(*Testudo hermanni boettgeri*)**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2019

Mentori:

Prof. dr Vesna Milankov, redovna profesorka

Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju

Prof. dr Marina Stamenković Radak, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Članovi komisije za odbranu:

Prof. dr Ana Ivanović, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

Prof. dr Jasmina Ludoški, vandredna profesorka

Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za biologiju i ekologiju

Datum odbrane:



Ešer, Moric Kornelis (Escher, Maurits Cornelis). *Butterflies*, 1950. www.WikiArt.org (preuzeto 16.07.2019.)

SADRŽAJ

Sažetak	vi
Summary	vii
Zahvala	ix
Lista ilustracija	xi
Lista tabela	xiii
1. UVOD	1
1.1. Intraspecijska varijabilnost i interspecijska divergencija	1
1.2. Taksonomska pozicija vrste <i>Testudo hermanni</i>	4
1.3. Genetička i morfološka varijabilnost vrste <i>Testudo hermanni</i>	6
2. CILJEVI RADA	17
3. MATERIJAL I METODE	18
3.1. Materijal	18
3.1.1. Materijal za genetičku analizu	18
3.1.2. Materijal za morfološku analizu	23
3.2. Metode	24
3.2.1. Metode genetičke analize	24
3.2.1.1. DNK ekstrakcija i amplifikacija	24
3.2.1.2. Statistička obrada podataka DNK varijabilnosti	25
3.2.2. Metode fenotipskih analiza	28
3.2.2.1. Prikupljanje geometrijsko - morfometrijskih podataka	28
3.2.2.2. Statistička obrada podataka fenotipske varijabilnosti	31
4. REZULTATI	36
4.1. Genetička varijabilnost <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	36
4.1.1. Genealogija <i>12S</i> rRNK vrste <i>Testudo hermanni</i>	36
4.1.2. Genealogija <i>cytb</i> mtDNK <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	47
4.1.3. Multilokusna analiza prostorne varijabilnosti <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	50
4.2. Varijabilnost oblika karapaksa i plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	52
4.2.1. Efekat greške fotografisanja	52
4.2.2. Struktura varijabilnosti oblika karapaksa i plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	53
4.2.3. Polni dimorfizam oblika karapaksa i plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	59
4.2.4. Intraseksualna varijabilnost oblika karapaksa i plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	63
5. DISKUSIJA	69
5.1. Genetička varijabilnost i genealogija gena <i>12S</i> rRNK i <i>cytb</i> mtDNK	69
5.2. Varijabilnost oblika karapaksa i plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	72
5.2.1. Polni dimorfizam oblika karapaksa i plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	73
5.2.2. Intraseksualna varijabilnost divergentnih linija <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	80
5.3. Istorijska biogeografija <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	83
5.4. Taksonomske implikacije	85
5.5. Konzervacione implikacije	86
6. ZAKLJUČAK	90
7. LITERATURA	92
8. PRILOG	113

Sažetak

Šumska kornjača, *Testudo hermanni*, je jedna od tri vrste kornjača koja nastanjuje Mediteranski region, hotspot područje sa izrazito visokim procentom endemizma i biološkog diverziteta. Taksonomska pozicija istočne podvrste, *T. h. boettgeri*, koja nastanjuje područje Balkanskog poluostrva, je predmet dugogodišnjih diskusija i ostalo je nerešeno zbog kompleksnog obrasca varijabilnosti na genetičkom i morfološkom nivou. Nepodudarnost obrazaca varijabilnosti različitih karaktera je karakteristično za inicijalne ili intermedijarne faze divergencije linija (npr. subspecijski nivo), a mogu biti artefakti analitičkih procedura korišćenih u kvantifikovanju fenotipske varijabilnosti. Naime, većina studija zasnovana je na linearnoj morfometriji i univarijantnoj statistici koje su manje informativne u odnosu na preciznost i informativnost geometrijske morfometrije u analizi varijabilnosti veličine i oblika komponenti oklopa kornjača.

Primenjujući integrativni pristup prvi put za ovaj takson, analizirali smo više od 500 jeidnki šumske kornjače sa 32 lokaliteta sa područja Balkana u cilju analize saglasnosti genetičkih i fenotipskih podataka. Genetički podaci (*12S* rRNK i *cytochrom b* mtDNK) su korišćeni u filogenetskoj i predeonoj analizi, dok su fenotipski podaci (oblik karapaksa i plastrona) dobijeni upotrebom 2D geometrijske morfometrije. Dva gena imaju neznatno različitu genealogiju, dok je multilokusna analiza bila konzistentna sa interpopulacionom podelom na tri linije *T. h. boettgeri*: 1) "Zapad", uključuje jedinke uzorkovane duž istočne obale Jadranskog i Jonskog mora; 2) "Peloponez", endemska za poluostrvo Peloponez u Grčkoj; 3) "Istok", uključuje populacije iz centralnog dela Balkana. Rezultati multilokusne genetičke analize su u saglasnosti sa fenotipskim podacima. Nekompletno linijsko sortiranje između tri balkanske linije je praćeno i sa pol'specifičnom divergencijom koja rezultira i divergencijom u obrascu polnog dimorfizma.

Rezultati ove studije ukazuju da tri linije verovatno korespondiraju sa subspecijskom podelom, ali dodatne studije u ovom pravcu su svakako neophodne. Konsekvence taksonomske podele imaju i aplikativni značaj u zaštiti šumske kornjače na Balkanu. Programi konzervacije ove vrste na Balkanu bi trebalo da se zasnivaju na detektovanim genetičkim i morfološkim specifičnostima linija koje su predstavljene u ovoj studiji, a ne na važećoj taksonomskoj podeli vrste.

Ključne reči: 2D geometrijska morfometrija, filogenija, predeona genetika, konzervacija, taksonomija, podvrsta, karapaks, plastron, *12S* rRNA, *cytb* mtDNA

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Zoologija, Genetika, Evolucija

Summary

The Hermann's tortoise, *Testudo hermanni*, is one out of three recognized species of tortoises that inhabit the Mediterranean region of Europe, which is known as the hotspot area with impressive species endemism and natural heritage of utmost importance for conservation. Although two subspecies are currently recognized, the systematic position of the eastern subspecies, *T. h. boettgeri*, which inhabits the Balkan Peninsula, has been debated but remains unresolved due to inconsistent patterns of variation at genetic and morphological levels. While such inconsistent patterns within and between different traits of organisms are usually observed during the initial or intermediate stages of lineage divergence (e.g. subspecific level), reported discrepancy may stem from analytical procedures that were used to quantify phenotypic variation. Namely, almost all studies have been used linear morphometric and univariate statistics in order to assess size and shape variation of the shell components which has been shown less powerful than geometry oriented morphometric approaches such as geometric morphometrics.

By implementing integrative approach for the first time in research of this taxon, we analyzed more than 500 individuals of Hermann's tortoise from 32 localities across the Balkans in order to assess congruence between genetic and phenotypic data. Genetic data (*12S* rRNA and *cytochrome b* mtDNK) were analyzed using phylogenetic and landscape genetic approaches while phenotypic data (carapace and plastron shape) were obtained by 2D geometric morphometrics. Two genes showed slightly different genealogy, yet multilocus approach showed low but consistent interpopulation variation separating three major *T. h. boettgeri* lineages: 1) "West lineage", including individuals sampled along the east coast of Adriatic and Ioannina Sea; 2) "Peloponnese lineage", endemic to Peloponnese in Greece; 3) "East lineage", comprising samples from the continental part of the Balkans. Results from multilocus genetic analysis were corroborated with phenotypic data. Incomplete lineage sorting between three Balkan lineages is followed by sex-specific divergence which in turn influenced the pattern of sexual shape dimorphism between them.

Results obtained herewith suggest that three lineages is likely separate subspecies yet additional studies are needed. Regardless of its taxonomic ranking, conservation planning of Hermann's tortoises in the Balkans should be based on genetic and morphological uniqueness reported herewith but not current taxonomy of the species. Geometric morphometrics appeared as a powerful tool in detection of subtle phenotypic variation with unexploited potential in turtle research.

Key words: 2D geometric morphometrics, phylogeny, landscape genetics, conservation, taxonomy, subspecies, carapace, plastron, *12S* rRNA, *cytb* mtDNA

Scientific field: Biology

Narrow scientific field: Zoology, Genetics, Evolution

Zahvala

Ova doktorska disertacija je realizovana u Laboratoriji za evolucionu biologiju (LEB) Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakultata Univerziteta u Novom Sadu. Najveći deo finansijskih sredstva obezbeđen je od strane republičkog projekta “Dinamika genofonda, genetička i fenotipska varijabilnost populacija u zavisnosti od promenljivosti sredine” (rukovodilac akademik Marko Anđelković) i pokrajinskog projekta “Molekularni i fenotipski diverzitet taksona od ekonomskog i epidemiološkog značaja, i ugroženih i endemskih vrsta u Evropi” (rukovodilac prof. dr Jasmina Ludoški), a delom iz ličnih sredstava prof. dr Vesne Milankov i moje porodice. Ova disertacija ne bi bila moguća da nije bilo adekvatnog vođenja od strane mentorki, prof. dr Vesne Milankov i prof. dr Marine Stamenković Radak, kojima hvala na ukazanom poverenju, podršci i strpljenju. Tekst disertacije je značajno poboljšana sugestijama članova komisije, prof. dr Ane Ivanović i prof. dr Jasmine Ludoški, na čemu sam im veoma zahvalan.

Veliku zahvalnost dugujem dr Ljubinki Francuski Marčetić sa kojom sam proživio nezaboravne momente tokom prikupljanja terenskog materijala po Balkanu. Takođe, prof. dr Vesna Milankov, Milica Mišković i Nemanja Ristić su svojim radom pomogli prikupljanju podataka na terenu i veoma sam im zahvalan na tome. Dobijanje dozvola za rad na terenu pomogli su prof. dr Zoran Tadić, prof. dr Panajots Pafilis (Panayiotis Pafilis) i dr Rastko Ajtić, a porodice Andrić i Saris su svojim gostoprimstvom učinile da terenski boravci u Crnoj Gori i Grčkoj budu poseban i veoma prijatan. Aleksandar Arandžević i Nevena Đurakić pomogli su mi tokom obrade materijala. Za kvalitetnu i stimulativnu radnu atmosferu tokom svog boravka u LEB-u zahvaljujem se Ljubinki Francuski Marčetić i Nemanji Gojković. Ova doktorska disertacija i moj profesionalni razvoj bili bi drugačiji da nisam imao podršku dr Entoni Herela (Anthony Herrel), dr Melite Vamberger (Melita Vamberger) i dr Uve Frica (Uwe Fritz). Sa njima sam realizovao nekoliko manjih projekata koji su mi pomogli da detaljnije sagledam rezultate ove disertacije. Imajući u vidu da sam najviše svoje energije uložio u razumevanje i primenu savremenih statističkih tehnika koje se koriste u biometriji veliku zahvalnost dugujem prof. dr Jasmini Ludoški, prof. dr Ani Ivanović, dr Vidi Jojóé, prof. dr Din Adamsu (Dean Adams), prof. dr Majk Kolijeru (Michael Collyer), prof. dr Andrea Kardiniju (Andrea Cardini), prof. dr Jan Drajdenu (Ian L. Dryden), prof. dr Kris Klingenbergu (Christian Peter Klingenberg) i prof. dr Draganu Mašuloviću. Oni su me na

različite načine inspirisali i pomogli da podobnije razumem statističke tehnike koje sam primenio u disertaciji i šire.

Izradu ove disertacije je propratio jedan turbulentan period mog života zbog koga verovatno ove reči ne bi ugledale svetlost dana da nije bilo prof. dr Vesne Milankov koja me je u “foto finišu” svog doktorandskog staža vodila kroz ceo proces na posebno ohrabrujući način. Uz Vesnu sam pored akademskih veština sticao sopstvenu sampospoznaju, a koja je ujedno i najznačajniji deo celog ovog procesa za mene.

Disertaciju namenjujem svojoj sestri Neveni, majci Vidosavi i ocu Radomiru koji su me uvek beskrajno podržavali na svom, rekao bih, delom ekscentričnom putu vođen idejom Martina Švarca “Productive stupidity means being ignorant by choice” (Martin A. Schwartz). Neizmerno hvala!

Marko

LISTA ILUSTRACIJA

1. Razlike između individua *Testudo marginata* (TM) i individua *Testudo weissingeri* (TDM) na osnovu oblika plastrona predstavljene u morfološkom prostoru definisanim sa prve dve glavne komponente 11
2. Mreža haplotipova zasnovana na *cytb* mtDNK haplotipovima *Testudo hermanni boettgeri* ukazuje na poziciju populacija iz Pčinje i Trebinja u odnosu na četiri haplogrupe *Testudo hermanni* definisane u radu Fritz i sar. (2006) 13
3. Mapa Evrope sa populacionom pripadnošću *Testudo hermanni* bazirana na *cytb* mtDNK haplotipovima i Geneland posteriornom verovatnoćom definisanom a) nekorelisanim modelom; b) korelisanim modelom 14
4. Morfološki prostor definisan prvom (pol) i drugom (genetička pripadnost) PC osom koje uključuju 60% od totalne varijabilnosti oblika karapaksa 14
5. Mapa Grčke pokazuje prostornu distribuciju *12S* rRNK haplotipova (HI-HIII) 23 jedinke *Testudo hermanni boettgeri* 15
6. Diferencijacija u obliku plastrona između jedinki divergentnih haplotipova (I-HIII) *12S* rRNK podvrste *Testudo hermanni boettgeri* 16
7. Mapa lokaliteta analiziranih jedinki *Testudo hermanni boettgeri* 20
8. Pozicija 28 homolognih tačaka digitizovanih na karapaksu (dorzalna perspektiva oklopa) *Testudo hermanni boettgeri* 29
9. Pozicija 19 homolognih tačaka digitizovanih na plastronu (ventralna perspektiva oklopa) *Testudo hermanni boettgeri* 30
10. Mreža haplotipova za 109 *12S* rRNK sekvenci [76 iz naše studije i 33 iz Banke gena: 1 (Álvarez i sar., 2000), 2 (van der Kuyl i sar., 2002), 1 (Fritz & Bininda-Emonds, 2007), 2 (Salinas i sar., 2011), 27 (Perez i sar., 2014)] se sastoji od 30 haplotipova (HI-HIV, V-XXX) 36
11. Mreža haplotipova za 109 *12S* rRNK sekvenci sa podacima o izvoru i poreklu sekvenci, i broju sekvenci za svaki haplotip ("n") koji je dobijen sabiranjem broja individua koje poseduju dati haplotip prema navedenom izvoru 37
12. Mreža haplotipova za 82 sekvence *12S* rRNK [76 iz naše studije i šest iz Banke gena: 1 (Álvarez i sar., 2000), 2 (van der Kuyl i sar., 2002), 1 (Fritz & Bininda-Emonds, 2007), 2 (Salinas i sar., 2011)] grupisanih u šest haplotipova (HI-HIV, V-VI) 38
13. Mreža haplotipova za 78 *12S* rRNK sekvenci [76 iz naše studije i 2 iz van der Kuyl i sar. (2002) i Fritz i Bininda-Emonds (2007)] grupisanih u četiri haplotipa (HI-HIV i V) 39
14. Mapa lokaliteta *de novo* analiziranih jedinki *Testudo hermanni boettgeri*. Filogenetska srodnost *T. h. boettgeri* linija na osnovu *12S* rRNK varijabilnosti analizirana Bajesovom metodom 40
15. Filogenetsko drvo *Testudo hermanni* na osnovu 109 sekvenci *12S* RNK dobijeno Bajesovom metodom u paketu MrBayes. Sekvence iz Banke gena sa ID kodovima su

navedene. Filogenetsko stablo ne podržava podelu na dve podvrste <i>Testudo hermanni hermanni</i> i <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	43
16. Filogenetsko drvo <i>Testudo hermanni</i> na osnovu 82 <i>12S</i> RNK sekvence dobijeno Bajesovom metodom u paketu MrBayes. Sekvence iz Banke gena sa ID kodovima su navedene. Filogenetsko stablo sadrži iste sekvence korišćene u prethodnoj analizi od 109 sekvenci, ali bez sekvenci iz rada Perez <i>i sar.</i> (2014). Filogenetsko stablo podržava podelu na podvrste <i>Testudo hermanni hermanni</i> i <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	44
17. Mapa posteriorne verovatnoće pripadnosti jedinki <i>Testudo hermanni boettgeri</i> genetičkim klasterima na osnovu sekvenci <i>12S</i> rRNK dobijena programom Geneland	45
18. Pretpostavljena (“?”) područja hibridnih zona <i>Testudo hermanni boettgeri</i> linija	46
19. Filogenetsko drvo <i>Testudo hermanni</i> na osnovu 66 <i>de novo cytb</i> mtDNK sekvenci konstruisano Bajesovom metodom u paketu MrBayes. Sekvence iz Banke gena sa ID kodovima su navedene (Fritz <i>i sar.</i> , 2006)	49
20. Prostorna varijabilnost <i>Testudo hermanni boettgeri</i> na osnovu sekvenci <i>cytb</i> mtDNK	50
21. Prostorna varijabilnost <i>Testudo hermanni boettgeri</i> na osnovu sekvenci <i>12S</i> rRNK i <i>cytb</i> mtDNK	51
22. Morfološki prostor definisan sa prva dva eigenvektora nakon analize glavnih komponenti (PCA) oblika karapaksa <i>Testudo hermanni boettgeri</i> . Polovi su odvojeni duž PC 1 vektora (45,1% ukupne varijabilnosti), a <i>12S</i> rRNK grupe su distribuirane duž PC 2 vektor (12,8% ukupne varijabilnosti)	56
23. Morfološki prostor definisan sa prva dva eigenvektora nakon analize glavnih komponenti (PCA) oblika plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i> . Polovi su odvojeni duž PC 1 vektora (67,1% ukupne varijabilnosti), a <i>12S</i> rRNK grupe su distribuirane duž PC 2 vektor (7,1% ukupne varijabilnosti)	59
24. Polni dimorfizam oblika karapaksa i plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i> za svaku grupu definisanu pomoću varijabilnosti <i>12S</i> rRNK gena	60
25. Analiza fenotipskih trajektorija za a) karapaks i b) plastron <i>Testudo hermanni boettgeri</i>	61
26. Promene oblika karapaksa i plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i> bez korigovanja za alometriju između <i>12S</i> rRNK grupa ženki uvećane pet puta	65
27. Promene oblika karapaksa i plastrona <i>Testudo hermanni boettgeri</i> bez korigovanja za alometriju između <i>12S</i> rRNK genetičkih klastera mužjaka uvećane pet puta	67
28. Razlike u disparitetu oblika karapaksa (gornji red) i oblika plastrona (donji red) <i>Testudo hermanni boettgeri</i> između grupa definisanim na osnovu varijabilnosti <i>12S</i> rRNK za svaki pol	68

LISTA TABELA

1. Poreklo, identifikacioni kod (DNK ID) i haplotip jedinki <i>Testudo hermanni boettgeri de novo</i> sekvenciranih za <i>12S rRNK</i> (N = 76) i <i>cytb mtDNK</i> (N = 66) gene	21
2. Poreklo i broj jedinki <i>Testudo hermanni boettgeri</i> analiziranih geometrijskom morfometrijom	23
3. Nekorigovana <i>p</i> -distanca između <i>T. horsfieldii</i> , <i>T. h. hermanni</i> , <i>T. h. boettgeri</i> Zapad, <i>T. h. boettgeri</i> Istok i <i>T. h. boettgeri</i> Peloponez izračunata na osnovu varijabilnosti <i>12S rRNA</i>	41
4. Vreme divergencije haplotipova predstavljene u milionima godina (Mya), izračunate na osnovu kalibracije <i>12S rRNA mtDNK</i> molekularnog sata po tradicionalnoj promeni od $\approx 2\%$ po Mya (iznad dijagonale) i osmostruko sporijoj stopi od $\approx 0,25\%$ po Mya (ispod dijagonale) (<i>Avise i sar.</i> , 1992).	41
5. Nekorigovana <i>p</i> -distanca između <i>T. horsfieldii</i> , <i>T. h. hermanni</i> , <i>T. h. boettgeri</i> Zapad, <i>T. h. boettgeri</i> Istok + Peloponez izračunata na osnovu varijabilnosti <i>cytb mtDNK</i>	47
6. Vreme divergencije haplotipova predstavljene u milion godina (Mya), izračunate na osnovu kalibracije <i>cytb mtDNK</i> molekularnog sata po tradicionalnoj promeni od $\approx 2\%$ po Mya (iznad dijagonale) i osmostruko sporijoj stopi od $\approx 0,25\%$ po Mya (ispod dijagonale) (<i>Avise i sar.</i> , 1992)	48
7. Prokrustova ANOVA koja testira efekat greške fotografisanja, fluktuirajuće i direkcione asimetrije, kao i individualnu varijabilnost u odnosu na ukupnu varijabilnost oblika karapaksa <i>T. h. boettgeri</i>	52
8. Prokrustova ANOVA koja testira efekat greške fotografisanja, fluktuirajuće i direkcione asimetrije, kao i individualnu varijabilnost u odnosu na ukupnu varijabilnost oblika plastrona <i>T. h. boettgeri</i>	53
9. Stuktura ukupne varijabilnosti oblika karapaksa <i>T. h. boettgeri</i> podeljena na efekat alometrije, pola, genetičkih klastera definisanim varijabilnošću <i>12S rRNK</i> , i njihovim interakcijama	55
10. Stuktura ukupne varijabilnosti oblika karapaksa <i>T. h. boettgeri</i> podeljena na efekat alometrije, pola, genetičkih klastera definisanim varijabilnošću <i>cytb mtDNK</i> , i njihovim interakcijama	55
11. Stuktura ukupne varijabilnosti oblika plastrona <i>T. h. boettgeri</i> podeljena na efekat alometrije, pola, genetičkih klastera definisanim varijabilnošću <i>12S rRNK</i> , i njihovim interakcijama	57
12. Stuktura ukupne varijabilnosti oblika plastrona <i>T. h. boettgeri</i> podeljena na efekat alometrije, pola, genetičkih klastera definisanim varijabilnošću <i>cytb mtDNK</i> , i njihovim interakcijama	58
13. Razlike u intenzitetu polnog dimorfizma između tri grupe <i>T. h. boettgeri</i> definisane varijabilnošću <i>12S rRNK</i> gena	62
14. Razlike u smeru polnog dimorfizma <i>T. h. boettgeri</i> između tri grupe definisane varijabilnošću <i>12S rRNK</i> gena	62

15. Varijabilnost oblika karapaksa i plastrona ženki *T. h. boettgeri* strukturirana na efekat alometrije, 12S rRNK klasifikacije individua i njihove interakcije 63
16. Varijabilnost oblika karapaksa i plastrona mužjaka *T. h. boettgeri* strukturirana na efekat alometrije, 12S rRNK klasifikacije individua i njihove interakcije 66

1. UVOD

1.1. Intraspecijska varijabilnost i interspecijska divergencija

Varijabilnost bioloških entiteta je fundamentalno pitanje u biologiji (Darwin, 1859; Mayr, 1942), a njihova karakterizacija i kvantifikacija sastavni su deo različitih bioloških disciplina kao što su taksonomija, sistematika, komparativna biologija, evoluciona biologija, ekologija, konzervaciona biologija i menadžment prirodnih resursa. Prirodna varijabilnost je strukturirana na unutarindividualnom i međuindividualnom nivou. Na primer, unutarindividualna varijabilnost predstavlja razliku između leve i desne strane istog organizma, a međuindividualna varijabilnost predstavlja razlike između individua iste ili različitih populacija. Takođe, jedna od najčešćih podela međuindividualne varijabilnosti je podela na intraspecijsku (unutar vrste) i interspecijsku varijabilnost (iznad nivoa vrste). Pored toga što su navedene podele često korišćene u biološkim istraživanjima, hijerarhijska struktura varijabilnosti, kao i mehanizmi koji je generišu i održavaju su daleko kompleksniji (pogledati npr. Willmore *i sar.* 2007).

Proces koji dovodi do nastanka novih vrsta je proces specijacije ili kladogeneze koji se ogleda u divergenciji individua unutar populacije i formiranja nezavisno evoluirajuće metapopulacione linije (Darwin, 1859; Mayr, 1942; de Queiroz, 2007). Najčešći mehanizmi koji dovode do divergencije su slučajne genetičke promene posredstvom mutacija i/ili genetičkog drifta, kao i determinističke promene delovanjem prirodne i seksualne selekcije (Magurran & May, 1999). Bitno je napomenuti da je divergencija između populacija nužan proces u prirodi, ali da svaki proces divergencije ne dovodi nužno do nastanka novih vrsta, tj. ne generiše interspecijsku varijabilnost već odražava intraspecijsku varijabilnost (Magurran & May, 1999; Tregenza, 2002). Kriterijum (*operativnost*) na osnovu koga se detektuje i grupiše intra- i interspecijska varijabilnost u velikoj meri zavisi od *konceptualizacije* vrste kao kategorije (de Queiroz, 1998, 2007, 2011). Na primer, poznato je da postoji više koncepata vrste, a među najpoznatijima su biološki, filogenetski, ekološki i fenetički (de Queiroz, 2005a, 2005b). Biološki koncept predviđa da su vrste (sa seksualnom reprodukcijom) reproduktivno nekompatibilne, filogenetski koncept je (najčešće) baziran na postojanju monofilije (grupa koja sadrži poslednjeg zajedničkog pretka i sve njegove potomke), ekološki je baziran na postojanju divergentnih ekoloških niša ili adaptivnih zona u čijim okvirima egzistiraju ispitivane vrste, a fenetički implicira da se vrste morfološki razlikuju (de Queiroz, 2007). Međutim, jedan od osnovnih problema savremene biologije je u tome što različiti kriterijumi

(operativnost koja posredno/neposredno zavisi od konceptualizacije) nejednako kvantifikuju/grupišu biološku varijabilnost (Agapow *i sar.*, 2004; de Queiroz, 2007). Na primer, poznato je da su fenetički i filogenetski koncept vrste više saglasni na višim sistematskim nivoima (red, klasa, tip) u odnosu na niže (podvrsta, vrsta, rod) (Wheeler, 2008). Takođe, primena filogenetskog koncepta vrste uglavnom ukazuje na veću biološku varijabilnost u odnosu na biološki koncept vrste (de Queiroz, 2007). Razlog zbog čega dolazi do neusaglašenosti različitih koncepata vrste u proceni intra- i interspecijske varijabilnosti ogleda se u činjenici da je proces divergencije kontinuirani proces u kome se genetičke, morfološke, bihevioralne i druge razlike između metapopulacija akumuliraju različitim brzinom (de Queiroz, 1998, 2007, 2011). Na primer, u ranoj fazi divergencije možemo očekivati divergenciju karakteristika koje su pod direktnim ili koreliranim uticajem divergentne selekcije, ali ne i onih koje to nisu. Takođe, čak i u odsustvu lokalno-divergentne selekcije, može doći do divergencije posredstvom stohastičkih procesa i dovoljno dugom prostornom i vremenskom izolovanosti populacija. U oba slučaja, možemo očekivati da uočimo obrazac u kome se populacije razlikuju neznatno (npr. morfološki i/ili genetički), a da se tokom procesa divergencije nije uspostavila reproduktivna barijera između njih (npr. mogu da se ukrštaju i ostavljaju plodno potomstvo). U navedenom scenariju, očigledno je da primenom fenetičkog i filogenetskog koncepta vrste divergentne linije mogu biti prepoznate kao različite vrste, dok na osnovu biološkog koncepta ne. Upravo su ovakve razlike dovele do taksonomskih nesuglasica, što je posebno elaborirano kada je u pitanju fenetički i filogenetski koncept vrste (MacLeod, 2008; Meier, 2008; Wheeler, 2008; Goldstein & DeSalle, 2011; Gippoliti & Groves, 2012; Zachos & Lovari, 2013). Problem konzistentne evaluacije intra- i interspecijske varijabilnosti primenom različitih koncepata vrste je posebno prisutan u ranoj fazi divergencije, npr. na subspecijskom nivou zbog čega je validnost ove sistematske kategorije dovedena u pitanje (Mallet, 2001; Haig *i sar.*, 2006; Phillimore & Owens, 2006; Cicero, 2010; Patten, 2015; Vinarski, 2015a, 2015b). Nasuprot toga, u kasnoj fazi divergencije, očekivano je da uočimo razlike između divergentnih linija na osnovu više kriterijuma kao što su morfološki, genetički, bihevioralni, ekološki, kao uspostavljenu reproduktivnu inkompatibilnost divergentnih linija (de Queiroz, 2007).

Bez obzira na operativne poteškoće u detekciji i grupisanju intra- i interspecijske varijabilnosti, formalna prepoznatljivost hijerarhijske strukture je veoma bitna za adekvatnu procenu biološkog diverziteta, konzervacione programe i menadžment prirodnih resursa (Mace, 2004; Sutherland *i sar.*, 2004; de Carvalho *i sar.*, 2014; Valdecasas, Peláez & Wheeler, 2014; Pante, Schoelinck & Puillandre, 2015; Karanovic, Djurakic & Eberhard,

2016; Conix, 2019). Na primer, populacije koje poseduju lokalne adaptacije ili ispoljavaju određen stepen endemizma, a koje nemaju taksonomsku prepoznatljivost najčešće nisu predmet konzervacionih strategija (Pante *i sar.*, 2015). Zbog prethodno navedenog, predložena su rešenja koja mogu nadomestiti nedostatke različitih koncepata vrste (de Queiroz, 2007) sa naglaskom na rigorozniju integrativnu kvantifikaciju više karakteristika populacija (Dayrat, 2005; Padiál *i sar.*, 2010). Naime, unitarni (generalni) koncept vrste (*Unified species concept*) je jedini koncept vrste koji eksplicitno razdvaja *konceptualizaciju* vrste u odnosu na *operativnost* detektovanja divergentnih linija (de Queiroz, 2007). Prema navedenoj konceptualizaciji, vrsta predstavlja nezavisno evoluirajuću metapopulacionu liniju bez obzira na (operativni) kriterijum koji se koristi u njenom detektovanju (npr. morfološki, genetički, filogenetski, ekološki) (de Queiroz, 2007). Dodatno, integrativni pristup (*integrative approach*) ukazao je na bitnost 1) analize više karakteristika simultano, i 2) konzistentnog obrasca varijabilnosti karakteristika koje se porede (Dayrat, 2005; Padiál *i sar.*, 2010). U kontekstu identifikacije i razdvajanja nezavisno evoluirajućih metapopulacionih linija, nije nužno da *sve* karakteristike koje se porede ukažu na njihovu divergenciju, već samo neke (de Queiroz, 2007). Takođe, odsustvo konzistentnog obrasca varijabilnosti nekih karakteristika ukazuje na nekompletan proces divergencije i potencijalno može ukazati na mehanizme koji su doveli do divergencije (Dayrat, 2005; de Queiroz, 2007; Padiál *i sar.*, 2010; Schlick-Steiner, Arthofer & Steiner, 2014; Fišer, Robinson & Malard, 2018).

Veoma je bitno naglasiti tip karakteristika (karaktera, markera) na osnovu kojih detektujemo nezavisne evolucione linije u procesu rane divergencije (npr. na intraspecijskom nivou). Naime, analiza morfoloških podataka postala je manje pouzdana u detekciji divergentnih evolucionih linija u odnosu na različite tehnike molekularne biologije (Hebert *i sar.*, 2003; DeSalle, Egan & Siddall, 2005; Wheeler, 2008; Goldstein & DeSalle, 2011). Dodatno, dobro je poznato da različiti DNK fragmenti (tip DNK markera) pokazuju različitu stopu promena tokom vremena zbog čega su neki markeri (npr. polimorfizam pojedinačnih nukleotida – SNP, mikrosateliti) informativniji za detekciju veoma rane faze divergencije, dok su drugi adekvatni za detektovanje kasnije faze divergencije (npr. 28S rDNK, *cytb* mtDNK, 12S rRNK, 16S rRNK, intron R35 DNK gena) (Avise, 2001). Međutim, slična analogija se može primeniti na morfološke podatke. Naime, eksplicitna analiza oblika morfoloških struktura kao što je geometrijska morfometrija (Bookstein, 1982, 1991, 1996; Adams, Rohlf & Slice, 2004, 2013) pokazala se kao pouzdana tehnika u detekciji suptilne morfološke varijabilnosti (Adams & Funk, 1997; Ludoški *i sar.*, 2008; Milankov *i sar.*, 2009; Karanovic *i sar.*, 2016).

U ovoj tezi analizirana je intraspecijska varijabilnost šumske kornjače, *Testudo hermanni* Gmelin, 1789 na teritoriji Balkanskog poluostrva primenom geometrijske morfometrije i genetičkih analiza dva fragmenta mitohondrijske DNK (*12S* rRNK i *cytb* mtDNK). Ova vrsta je politipska ukazujući na određen stepen divergencije populacija, međutim taksonomski odnosi na subspecijskom nivou su i dalje nerazjašnjeni zbog odsustva konzistentnog obrasca varijabilnosti morfoloških karakteristika oklopa (karapaksa i plastrona) u odnosu na genetičke podatke, kao i različitih genetičkih markera (Bertolero *i sar.*, 2011). Takođe, ova vrsta zahteva striktnu zaštitu i monitoring zbog narušavanja prirodnog staništa, urbanizacije, katastrofičnih antropogeno uzrokovanih i slučajnih požara, izlovljavanja, translokacije individua usled ilegalne trgovine (*pet trade*), čime se dodatno naglašava potreba za reevaluacijom intra- i interspecijske varijabilnosti (Bertolero *i sar.*, 2011).

1.2. Taksonomska pozicija vrste *Testudo hermanni*

Kompleksna biogeografska i evolucionarna istorija se smatraju odgovornim za nastanak taksonomskog diverziteta kopnenih kornjača roda *Testudo* L. 1758 (e.g. de Broin 2001; Fritz and Bininda-Emonds 2007; Morales Pérez and Serra 2009; Luján *i sar.* 2016; Zenboudji *i sar.* 2016). Ipak, taksonomija grupe je još uvek u fokusu intenzivnih debata zbog taksonomske konfuzije iznad i unutar nivoa vrste. Na primer, kontradiktorni rezultati filogenije dobijeni upotrebom molekularnih markera i morfoloških karaktera su doveli do sinonimizacije taksona svih nivoa klasifikacije, roda, podroda, vrste i podvrste (Bertolero *i sar.*, 2011; Fritz & Havaš, 2013; Luján *i sar.*, 2016). Danas, rod *Testudo* s.l. uključuje pet zapadnopalearktičkih vrsta: *T. graeca* L., 1758 (tipska vrsta); *T. hermanni* Gmelin, 1789; *T. marginata* Schoepff, 1793; *T. horsfieldii* Gray, 1844; i *T. kleinmanni* Lotret, 1883 (van Dijk *i sar.*, 2014). Zbog pretpostavljenog parafiletskog porekla (van der Kuyl *i sar.*, 2002), dodatna konfuzija je nastala usled nerazjašnjene pozicije *T. hermanni*, vrste koja je premeštena u novi rod *Eurotestudo* (de Broin, Bour & Perälä, 2006b). Upotrebom mitohondrijskog *12S* ribozomskog RNK gena (*12S* rRNK), van der Kuyl *i sar.* (2002) su uvrstili *T. hermanni*, *T. horsfieldii* i *Indotestudo elongata* u jednu kladu, a vrste *T. graeca*, *T. marginata* i *T. kleinmanni* su definisane kao grupa blisko srodnih vrsta. Međutim, na osnovu mitohondrijskog i dva jedarna gena, Fritz i Bininda-Emonds (2007) su predložili da zapadnopalearktičke vrste čine monofiletski rod *Testudo* sa monofiletskim podkladama [I: *T. hermanni* and *T. horsfieldii*; II: (*T. kleinmanni* + *T. marginata*) + *T. graeca*].

Šumska kornjača, *Testudo hermanni* (Gmelin, 1789), prvobitno je opisana pod imenom *Testudo graeca* Linnaeus, 1758 (Fritz and Bininda-Emonds 2007; Fritz and Havaš 2007). Tokom taksonomske revizije, šumska kornjača je klasifikovana u različite rodove (*Prototestudo*, Chkhikvadze 1970; *Agrionemys*, Gmira 1993, 1995; *Eurotestudo* de Broin i sar. 2006a, 2006b) i podrod (Fritz & Bininda-Emonds, 2007). Vrsta je bila podeljena na tri vrste (Perälä, 2001, 2004; Bour, 2004a, 2004b; Vetter, 2006): zapadnu ili Hermanovu, *T. hermanni* (Gmelin, 1789), istočnu ili Betgerovu (Boettger) *T. boettgeri* (Mojsisovics, 1889) i dalmatinsku *T. hercegovinensis* (Werner, 1899). Takođe, podela vrste *T. hermanni* na podvrste je bila diskutabilna; tri (*T. h. hermanni* – “zapadna” podvrsta; *T. h. hercegovinensis* – duž obale Hrvatske, Bosne i Hercegovine i Crne Gore; i *T. h. boettgeri* – “istočna” podvrsta) i dve podvrste (*T. h. hermanni* – “zapadna” podvrsta i *T. h. boettgeri* – “istočna” podvrsta) su bile taksonomski određene (Fritz & Havaš, 2007).

Testudo hermanni hermanni, prvobitno opisana kao *T. h. robertmertensi* Wermuth, 1952, nastanjuje istočnu Španiju, južnu Francusku, Balearska ostrva, Korziku, Sardiniju, Siciliju i južnu i centralnu Italiju, dok distribucija *T. h. boettgeri* obuhvata obale Jadranskog i Jonskog mora, kontinentalni deo Hrvatske, Albanije, Grčke, Makedonije, Srbije, Rumunije i Bugarske, kao i evropski deo Turske (Bertolero i sar., 2011). Pretpostavlja se da je zapadna podvrsta *T. h. hermanni* nedavno diverzifikovala, te da vodi poreklo iz jednog pleistocenskog refugijuma, verovatno u južnoj Italiji, možda Siciliji (van der Kuyl i sar., 2002). Smatra se da su Alpi činili barijeru između izolovane zapadnoevropske linije od balkanske klade ili *T. h. boettgeri* (Fritz i sar., 2006). Reka Po u severoistočnom delu Italije se smatra granicom koja odvajava *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri*, iako su dokumentovani hibridi u oblasti njihovog kontakta (Perez i sar., 2014).

Trenutno opšteprihvaćena podela vrste *T. hermanni* na dve podvrste, zapadnu i istočnu, datira od rada Wermuth-a (Wermuth, 1952). Međutim, ova podela se kasnije promenila pošto su populacije *T. h. boettgeri* duž Jadranske obale od severne Hrvatske do južne Crne Gore (do reke Bojane) klasifikovane u zasebnu vrstu, *T. hercegovinensis* zbog odsustva ingvinalnih pločica (Perälä, 2001, 2004). Naime, svojim morfološkim studijama Perälä (2001, 2004) je ponovo ukazao na posebnost jedinki u regionu Trebinja (Bosna i Hercegovina) koje su inicijalno prepoznate kao zaseban varijetet – *Testudo graeca* var. *hercegovinensis* (Werner, 1899). Zbog toga, nominalna vrsta *T. hermanni* je podeljena na tri vrste (*T. hermanni*, *T. hercegovinensis* i *T. boettgeri*) (Perälä, 2001, 2004). Ipak, podela *T. hermanni* kompleksa na tri vrste nije podržana (Bour, 2004a, 2004b; Vetter, 2006). Osim morfoloških podataka, analizirana je molekularna varijabilnost *cytb* i susednog regiona *tRNA-*

Thr gena mitohondrijske DNK (mtDNK) na osnovu koje je odbačena podela *T. hermanni* na tri vrste, a tradicionalna podela na dve podvrste (Wermuth, 1952) je podržana (Fritz *i sar.*, 2006). Balkanske populacije *T. h. boettgeri* grupisane u tri alopatričke haplogrupe (centralni, istočni i južni deo Balkana; zapadne padine planine Tegetos u južnom delu Peloponeza, Grčka; obala Jadranskog mora od severne Hrvatske do Epirusa u Grčkoj) su predložene za Evoluciono značajne jedinice (ESU) ali bez taksonomske pozicije (Fritz *i sar.*, 2006). Istom studijom je sugerisano da odsustvo ingvinalne pločice, prvobitno predloženo za dijagnostički karakter, nije jedinstvena karakteristika “*T. hercegovinesis*”, što je dodatno podržalo podelu *T. hermanni* na dve podvrste koju je sugerisao Wermuth (Wermuth, 1952) (Fritz *i sar.*, 2006). Treba naglasiti da je kriterijum za definisanje podvrsta u navedenoj studiji zasnovan na pristustvu/odsustvu monofiletskih grupa na filogenetskom stablu koje je rekonstruisano na osnovu analize molekularne varijabilnosti *cytb* i susednog regiona *tRNA-Thr* gena (Fritz *i sar.*, 2006). Ovaj kriterijum za definisanje vrsta (i podvrsta) je kritikovan (Knowles & Carstens, 2007) imajući u vidu da je proces divergencije najčešće praćen nejednakim linijskim sortiranjem molekularnih markera što neminovno implicira da divergentne linije prolaze kroz polifiletsku i/ili parafiletsku fazu tokom procesa divergencije (Avice, 2001). Studija zasnovana na varijabilnosti *cytb* mtDNK (Fritz *i sar.*, 2006) je za sada najsveobuhvatniji filogeografski prikaz vrste *T. hermanni*, koji se zbog toga koristi kao osnova za trenutnu taksonomsku podelu šumske kornjače. Međutim, zbog taksonomskih nejasnoća i osnovane pretpostavke o postojanju kriptičnog diverziteta, što posledično utiče i na konzervacione programe zaštite, pitanje o varijabilnosti balkanskih populacija *T. hermanni* je ostalo otvoreno.

1.3. Genetička i morfološka varijabilnost vrste

Testudo hermanni

Genetički (dalje u tekstu koristiće se i termin “molekularni” kao sinonim) diverzitet vrste *Testudo hermanni* analiziran je na osnovu varijabilnosti 12S rRNK (van der Kuyl *i sar.*, 2002; Mirimin *i sar.*, 2004; Perez *i sar.*, 2014; Vasilyev *i sar.*, 2014; Djurakic i Milankov, 2019b), *cytb* mtDNK (Fritz *i sar.*, 2006; Fritz & Bininda-Emonds, 2007; Djurakic & Milankov, 2019a), mikrosatelitskih lokusa (Forlani *i sar.*, 2005; Perez *i sar.*, 2014; Zenboudji *i sar.*, 2018) i RAPD markera (Vasilyev *i sar.*, 2014). Međutim, pored opsežnih genetičkih studija, konsenzus u vezi sa stepenom genetičke varijabilnosti i diferencijacije populacija

šumske kornjače i dalje je nepoznat uglavnom zbog nekozistentnih rezultata i razlika u dizajnu uzorkovanja. Na primer, u filogenetskoj studiji koja je koristila *12S* rRNK utvrđeno je da zapadna podvrsta, *T. h. hermanni*, poseduje manji genetički diverzitet u odnosu na istočnu podvrstu, *T. h. boettgeri*, kao i da su ove dve podvrste alopatrički distribuirane (van der Kuyl *i sar.*, 2002; Mirimin *i sar.*, 2004). Dodatno, van der Kuyl *i saradnici* (2002) ukazali su na posebnost populacija sa Peloponeza i predložili taksonomsku prepoznatljivost ovih populacija na nivou podvrste, međutim ovaj predlog nije naišao na naučnu afirmaciju. Takođe, van der Kuyl *i sar.* (2002) i Mirimin *i sar.* (2004) su registrovali tri, odnosno dva haplotipa, dok su Perez *i sar.* (2014) dokumentovali 16 različitih haplotipova koristeći isti molekularni marker (*12S* rRNA). Takođe, utvrđeno je da je stepen genetičke diferencijacije između dve nominalne podvrste mali (p -distanca = 0,7%) (van der Kuyl *i sar.*, 2002). U naknadnoj analizi filogenije *T. hermanni* na osnovu *12S* rRNK, Mirimin *i sar.* (2004) su identifikovali dva genetička klastera koja korespondiraju podvrstama *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri*. Slično prethodnim studijama, Fritz *i sar.* (2006) su potvrdili alopatričku distribuciju dve nominalne podvrste, pokazali da zapadna podvrsta poseduje manji genetički diverzitet u odnosu na istočnu i detaljnije analizirali genetičku strukturu balkanskih populacija u odnosu na prethodne studije, međutim i dalje sa limitiranim uzorkom. Naime, kao što je navedeno u prethodnom paragrafu, jedan od glavnih nalaza u studiji Fritz *i koautora* (2006) je identifikacija evoluciono značajnih jedinica (ESU) balkanskih populacija: 1) Istočne linije koja obuhvata populacije u centralnom, istočnom i južnom Balkanu; 2) Zapadne linije koja se prostire od severa Hrvatske do Epira u Grčkoj; 3) dve populacije sa Tegetos planine na Peloponezu. Međutim, fundamentalno drugačija slika filogeografske strukture ove vrste predstavljena je u studiji Perez *i saradnika* (2014) koja je ukazala na odsustvo filogeografske, alopatričke distribucije divergentnih genetičkih linija i zapravo interpretirala svoje nalaze u svetlu povećane translokacije individua posredstvom antropogenog faktora. Dakle, prethodne studije su ukazale ne samo na različit stepen i obrazac genetičke varijabilnosti istog gena, već i različitu gensku genealogiju različitih molekularnih markera, uključujući i mikrosatelitske lokuse (van der Kuyl *i sar.*, 2002; Mirimin *i sar.*, 2004; Fritz *i sar.*, 2006; Perez *i sar.*, 2014).

Fenotipski diverzitet *T. hermanni* je tradicionalnom morfometrijom analiziran u cilju testiranja Bergmanovog pravila, interpopulacione varijabilnosti veličine tela i oblika, intraseksualne varijabilnosti, pigmentacije, kao i polnog dimorfizma, tako i morfo-funkcionalnih odnosa karapaksa i brzine povratka u normalni položaj nakon prisilnog okretanja na leđa (“self-righting”) (Hailey, 1989; Willemsen & Hailey, 1989, 1999b, 1999a, 2001, 2002, 2003; Zuffi & Plaitano, 2007; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013; Golubović *i sar.*,

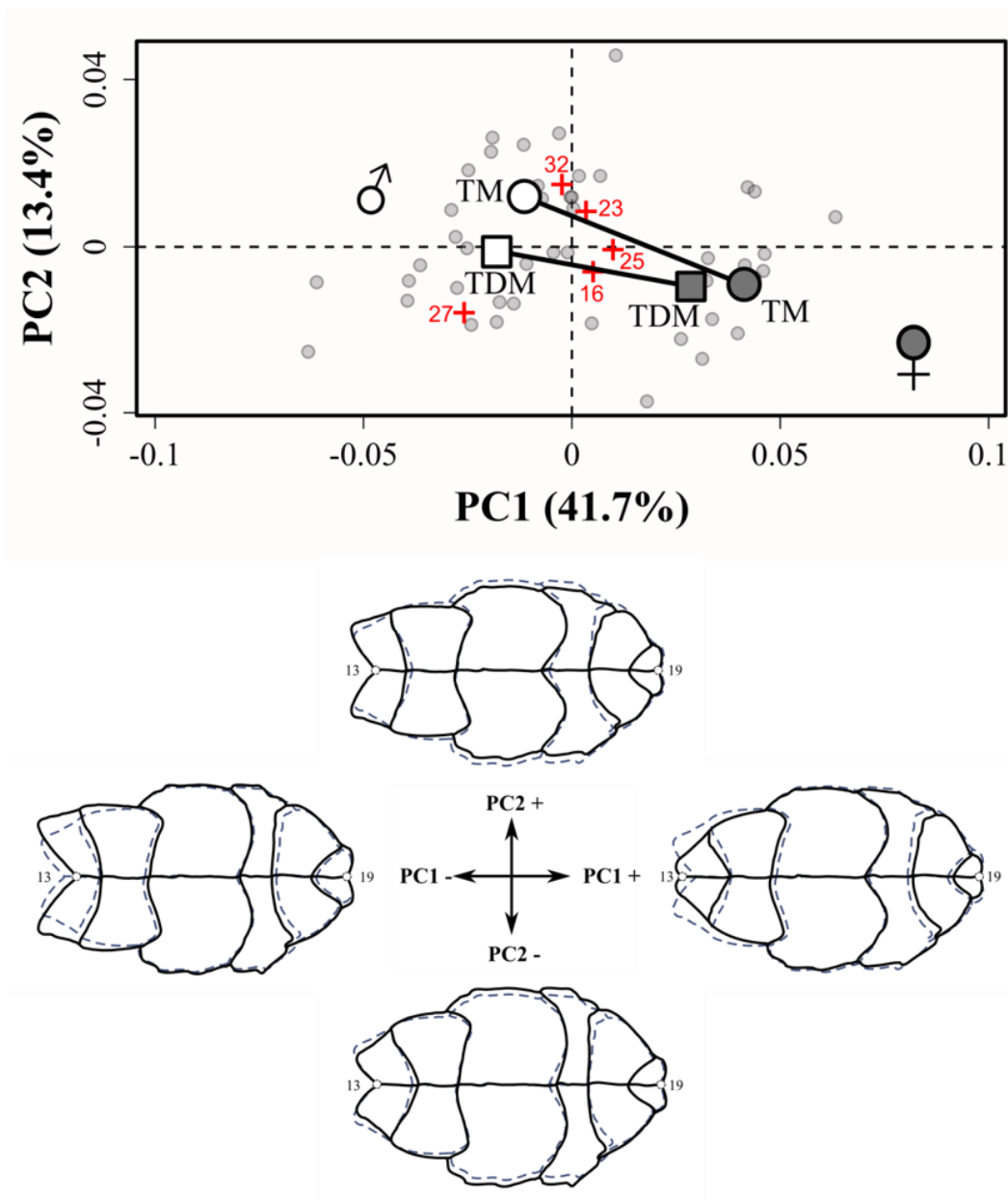
2013; Golubović, Tomović & Ivanović, 2015; Stojadinović, Milošević & Crnobrnja-Isailović, 2013). Šumska kornjača ispoljava polni dimorfizam u veličini i ženke su u proseku veće od mužjaka (Willemsen & Hailey, 2003; Vetter, 2006; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013). Takođe, studije bazirane na linearnoj morfometriji koristeći univarijantni pristup, pokazale su da je polni dimorfizam oblika konzistentniji od polnog dimorfizma u veličini u populacijama centralnog dela Balkana (Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013), što je saglasno sa obrascem koji je uočen na makroevolucionom nivou (Bonnet *i sar.*, 2010). Najčešći mehanizmi koji održavaju polni dimorfizam veličine i oblika ne samo kod šumske kornjače već i šire su prirodna i seksualna selekcija, selekcija vezana za fekunditet i ekološka selekcija (Bonnet *i sar.*, 2001; Willemsen & Hailey, 2003; Bonnet *i sar.*, 2010; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013; Golubović *i sar.*, 2013). Naime, seksualna selekcija favorizuje mužjake sa većim otvorom (prostorom) između karapaksa i plastrona koji im omogućava veću pokretljivost ekstremiteta i repa. Mobilnost mužjaka u periodu parenja omogućava uspešniju potragu za ženkama, najverovatnije omogućava brže okretanje u normalan položaj nakon okretanja na leđa koje se inače dešava u borbama mužjaka tokom sezone parenja, a povećana pokretljivost repa poboljšava transfer sperme tokom kopulacije. Selekcija vezana za fekunditet favorizuje veće ženke, posebno abdominalni region jer time se obezbeđuje veća zapremina za veći broj jaja i/ili veća jaja koje ženka nosi sa sobom pre polaganja u supstrat. Golubović *i sar.* (2013) su ukazali na to da se mužjaci uspešnije vraćaju u normalan položaj nakon prisilnog okretanja na leđa u odnosu na ženke, kao i da je veličina tela negativno korelisana sa sposobnošću okretanja u normalni položaj kod ženki ali ne i kod mužjaka (međutim pogledati i Golubović *i sar.*, 2015). Takođe, ista studija je ukazala da se životinje sa većom visinom oklopa (povećanom zakrivljenošću oklopa) i kraćim koštanim mostovima između karapaksa i plastrona uspešnije vraćaju u normalan položaj nakon prisilnog okretanja (Golubović *i sar.* 2013). Shodno prethodnom, dosadašnji rezultati ukazuju da je oblik oklopa možda pod intenzivnijim selekcionim režimom u odnosu na veličinu oklopa kod mužjaka, a da veličina oklopa kod ženki verovatno ima veću adaptivnu ulogu od oblika oklopa. Ove hipoteze je potrebno dodatno testirati, a da li i u kojoj meri polovi pokazuju pol-specifičan odgovor na sredinske faktore (plastičnost) kod šumske kornjače je i dalje nedovoljno poznato. Pol-specifičan odgovor na genetičke i sredinske faktore može uticati na obrazac polnog dimorfizma što je delom ukazano u dve eksperimentalne studije kod dve vrste vodenih kornjača (Ceballos & Valenzuela, 2011; Ceballos, Hernández & Valenzuela, 2014), međutim ovakva istraživanja nisu nikada sprovedena na nekoj terestričnoj vrsti kornjače kao što je šumska kornjača. Ove dve studije polaze od dve glavne hipoteze: 1) hipoteza adaptivne

kanalisanosti (*adaptive canalization hypothesis*) koja predviđa da veći pol ispoljava manju morfološku plastičnost (isto što i veću kanalisanost razvića, tj. manju morfološku varijansu) u odnosu na manji pol zbog izražene direkcione selekcije koja favorizuje veće individue, tj. eliminiše individue koje imaju sub-optimalnu veličinu (Stillwell *i sar.*, 2010); 2) stanje-zavisna hipoteza (*condition-dependence hypothesis*) koja predviđa da veći pol ispoljava veću plastičnost (tj. manju kanalisanost razvića, veću morfološku varijansu) jer direkciona selekcija favorizuje povećanu senzitivnost većeg pola na sredinske uslove kao oportunistički mehanizam razvića koji povećava rast životinje u povoljnim (optimalnim) uslovima sredine (Ceballos & Valenzuela, 2011; Ceballos *i sar.*, 2014). U kontekstu ove disertacije, dve navedene hipoteze moguće je testirati u neeksperimentalnim uslovima ukoliko poredimo grupe sa poznatom genetičkom pozadinom i ukoliko pretpostavimo da su oba pola u prirodnim populacijama podvrgnuta istim sredinskim selekcionim režimima. Naime, u takvom analitičkom dizajnu moguće je porediti parametre fenotipske plastičnosti preko unutargrupne fenotipske varijanse koja je ujedno i mera kanalisanosti razvića (Zelditch, Swiderski & Sheets, 2012). Što je unutargrupna varijansa manja, kanalisanost razvića je veća, a plastičnost manja i obratno. Kanalisanost razvića obuhvata sve mehanizme razvića koji pomažu organizmu da prati određenu, unapred determinisanu razvojnu putanju, uprkos sredinskim i genetičkim smetnjama (Waddington, 1957, Hall, 1992; Zelditch, 1995).

Iako su prethodne studije obezbedile dobru osnovu za poznavanje varijabilnosti šumske kornjače, one su ipak limitirane upotrebom same metode. Naime, većina navedenih studija analizirale su veličinu i oblik morfoloških karakteristika upotrebom linearne morfometrije koja ne može algebarski odvojiti veličinsku komponentu od parametara oblika u potpunosti (Bookstein, 1989, 1991; Adams *i sar.*, 2004, 2013). Drugo, većina dosadašnjih studija koristila je univarijantnu statistiku (ANOVA i ANCOVA) kako bi opisala oblik morfoloških struktura koji je inherentno multivarijantno obeležje, što znači da prethodne studije nisu razmatrale zajedničko kovariranje individualnih linearnih distanci. Treće, za razliku od tradicionalnog pristupa, geometrijskom morfometrijom se otkrivaju suptilne razlike u obliku anatomskih struktura, a sa velikom statističkom podrškom i mogućnošću vizualizacije promena oblika u anatomskom kontekstu (Adams *i sar.*, 2004; Klingenberg, 2013). Generalno, geometrijska morfometrija se samo sporadično koristila u studijama kornjača (Kaliontzopoulou, 2011), iako su publikovani podaci ukazivali na velik potencijal ove metode u detekciji suptilne morfološke diferencijacije kao što su polni dimorfizam u obliku juvenilnih primeraka koji na makromorfološkom nivou ne ispoljavaju polni dimorfizam (Valenzuela *i sar.*, 2004), fluktuirajuće asimetrije (slučajne razlike između leve i

desne strane tela) (Rivera, 2008; Bancila *i sar.*, 2012), kao i za ekološki uslovljenu varijabilnost oblika karapaksa (Rivera *i sar.*, 2013). Takođe, nekoliko studija je poredilo saglasnost fenotipske varijabilnosti detektovane geometrijskom morfometrijom i genetičkih podataka kod kornjača (Chiari & Claude, 2011; Palupčiková *i sar.*, 2012; Murray *i sar.*, 2014; Protiva *i sar.*, 2016; Vitek, 2018). Navedene studije su sugerisale velik, ali neiskorišćen potencijal geometrijske morfometrije u integrativnim taksonomskim studijama i sistematici generalno.

Značaj geometrijske morfometrije u detekciji kriptičnog morfološkog diverziteta može se ilustrovati na primeru terestrične vrste kornjače *Testudo marginata* (Djurakic & Milankov, 2015). Ova vrsta kornjače endemična je za Grčku, sam jug Albanije i potencijalno evropski deo Turske (Türkozan, Kumlutas & Ilgaz, 2001; van Dijk, Lymberakis & Böhme, 2004b). Populacije koje se nalaze na zapadnim padinama Tegetos planine na Peloponezu izdvojene su u zasebnu vrstu *T. weissingeri* na osnovu tradicionalno-morfometrijskih karakteristika (Bour, 1995). Međutim, analizom varijabilnosti *cytb* mtDNK i minisatelitnih lokusa (ISSR) utvrđeno je da ovaj takson nije validna vrsta i da ne predstavlja evoluciono značajnu jedinicu, a da je dokumentovana morfološka varijabilnost između *T. marginata* i *T. weissingeri* zapravo sredinski indukovana (Fritz *i sar.*, 2005). Analizom mikrosatelitskih lokusa pokazano je da populacije koje pripadaju *T. weissingeri* taksonu ipak predstavljaju evoluciono značajnu jedinicu jer je protok gena redukovana između ovih populacija i populacija nominalne vrste (Perez *i sar.*, 2012). Analizom oblika plastrona populacija *T. marginata* i *T. weissingeri*, a koji je kvantifikovan geometrijskom morfometrijom utvrđeno je da se ove dve grupe razlikuju u obliku, međutim uočene razlike oblika plastrona su posledica alometrijskog rasta (Slika 1). Takođe, pokazano je da je veličina (izražena kroz centroidnu veličinu) kod analiziranih populacija *T. marginata* i *T. weissingeri* u korelaciji sa sredinskim faktorima (Djurakic & Milankov, 2015). Samim tim, rezultati geometrijske morfometrije zapravo povezuju naizgled oprečne genetičke studije (Fritz *i sar.*, 2005; Perez *i sar.*, 2012) i ukazuju na kriptični diverzitet i rani proces divergencije unutar *T. marginata*. Međutim, taksonomski status divergentnih linija unutar *T. marginata* je i dalje nerazjašnjen.



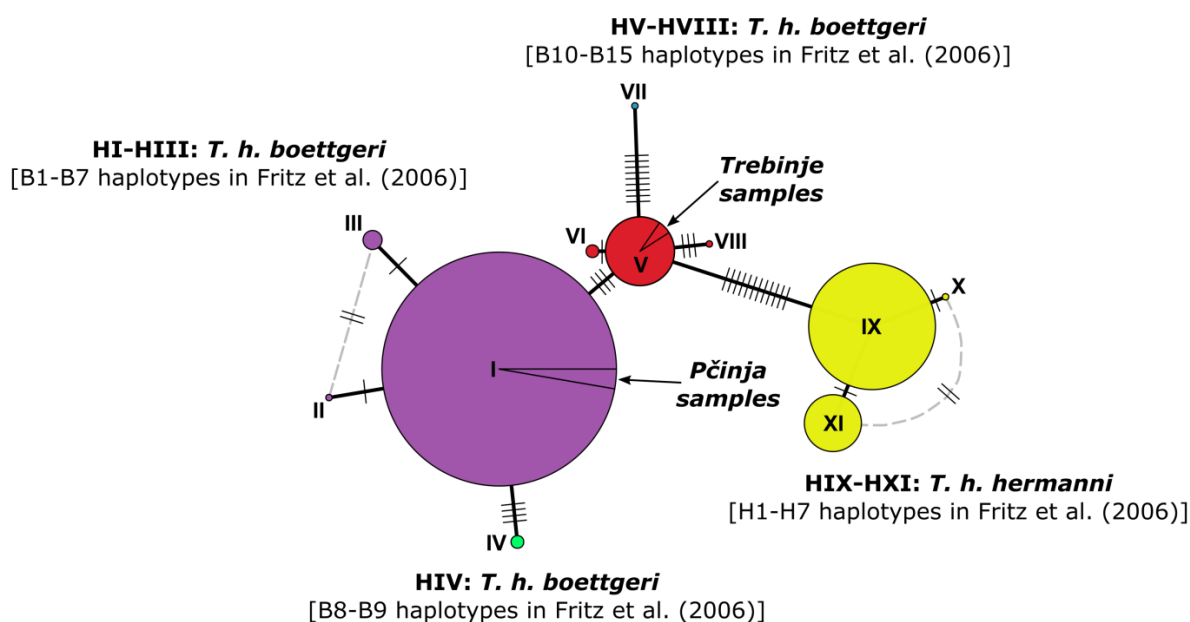
Slika 1. Razlike između individua *Testudo marginata* (TM) i individua *Testudo weissingeri* (TDM) na osnovu oblika plastrona predstavljene u morfološkom prostoru definisanim sa prve dve glavne komponente. Pune linije na gornjem grafiku povezuju polove unutar taksona i predstavljaju stepen i smer polnog dimorfizma oblika plastrona (Djurakic & Milankov, 2015).

Osim toga, fenotipska varijabilnost šumske kornjače kvantifikovana geometrijskom morfometrijom korišćena je samo u četiri studije (Sacchi *i sar.*, 2007; Golubović *i sar.*, 2015; Djurakic & Milankov, 2019a, 2019b). Od toga, dve studije su koristile geometrijsku morfometriju u cilju proučavanja Bergmanovog pravila u populacijama kod *T. hermanni* iz Italije (Sacchi *i sar.*, 2007), kao i odnos između oblika karapaksa i brzine povratka u normalan položaj nakon prisilnog okretanja na leđa u nekoliko populacija sa Balkanskog poluostrva (Golubović *i sar.*, 2015). Međutim, navedene morfološke studije nisu imale za cilj

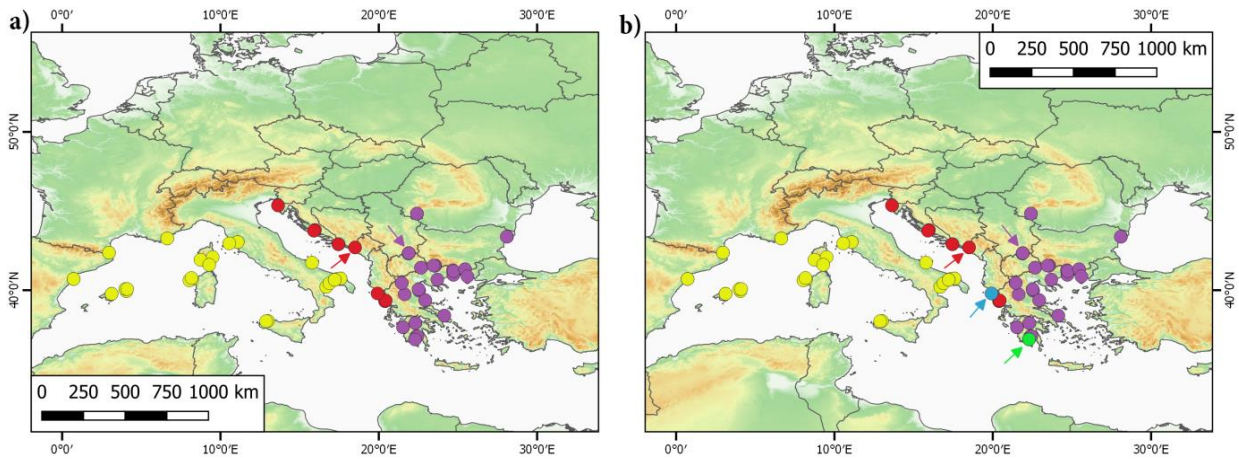
da utvrde vezu genetičke i morfološke diferencijacije. Takođe, analizirane populacije su klasifikovane na osnovu široko prihvaćene podele bazirane na osnovu rada Fritz i saradnika (2006), bez obzira na odsustvo konsenzusa u vezi sa genetičkim i taksonomskim diverzitetom šumske kornjače, pogotovu na teritoriji Balkanskog poluostrva.

Nasuprot prethodnih studija, koristeći integrativni pristup koji podrazumeva analiziranje više tipova podataka (npr. morfološki i genetički) (Dayrat, 2005; Padić i sar., 2010) utvrđena je saglasnost varijabilnosti *cytb* mtDNK i *12S* rRNK sa geometrijsko morfometrijskim parametrima oblika karapaksa i plastrona taksonomski relevantnih populacija šumske kornjače sa Balkana (Djurakic & Milankov, 2019a, 2019b.). Naime, imajući u vidu taksonomski značaj u detekciji kriptičnog diverziteta *T. hermanni boettgeri*, uporednom analizom varijabilnosti *cytb* mtDNK i oblika karapaksa su proučavane dve populacije koje prostorno pripadaju različitim geografskim regionima (dolina reke Pčinje, Srbija; i Trebinje, Bosna i Hercegovina) (Djurakic & Milankov, 2019a). Trebinje je tipski lokalitet problematičnog taksona *T. greaca* var. *hercegovinensis* (Werner, 1899), a dolina reke Pčinje je region od velikog konzervacionog značaja zbog biogeografske istorije i izraženog taksonomskog diverziteta (Zlatkovic i sar., 2011; Tomović i sar., 2014, 2015; Petrović i sar., 2016). U cilju testiranja hipoteze o povezanosti genealogije *cytb* mtDNK i geografske distribucije, jedinke sa lokaliteta Pčinja i Trebinje su upoređene sa *cytb* mtDNK haplotipovima *T. hermanni* poreklom iz različitih regiona areala vrste (Fritz i sar., 2006). U datom radu je registrovano 11 *cytb* mtDNK haplotipova koji su grupisani u tri haplogrupe. Dve haplogrupe koje uključuju HI - HIV i HV - HVIII su dokumentovane u populacijama istočne podvrste *T. h. boettgeri*, dok je haplogrupa koju čine HIX - HXI detektovane u populacijama zapadne podvrste, *T. h. hermanni* (Djurakic & Milankov, 2019a). Međutim, Fritz i sar. (2006) koristeći isti set, ali dužih (1150 bp) sekvenci (bez Pčinje i Trebinja) su utvrdili 22 haplotipa u okviru četiri haplogrupe. Na primer, dve jedinke sa lokaliteta Saidona (Saidhona, zapadna padina planine Tegetos u južnom delu Peloponeza, Grčka) su klasifikovane u haplogrupu B8 - B9 (Fritz i sar., 2006), dok su u proširenoj studiji (Djurakic & Milankov, 2019a) definisani kao HIV, koji je srodan najčešćem haplotipu (HI) podvrste *T. h. boettgeri* (Slika 2). Dve studije o *cytb* mtDNK varijabilnosti se razlikuju i u broju jedinstvenih haplotipova. Dok su analizom skraćenih sekvenci *cytb* mtDNK detektovana četiri (36%) (Djurakic & Milankov, 2019a), u studiji Fritz i sar. (2006) je ukazano da je 15 haplotipova (68%) registrovano kod pojedinačnih jedinki. Molekularnom identifikacijom je utvrđeno da sve jedinke iz Pčinje (centralni Balkan) poseduju HI (B1 - B7 haplogrupa prema (Fritz i sar., 2006), a koji je širokoprisutan u populacijama *T. h. boettgeri* iz Bugarske,

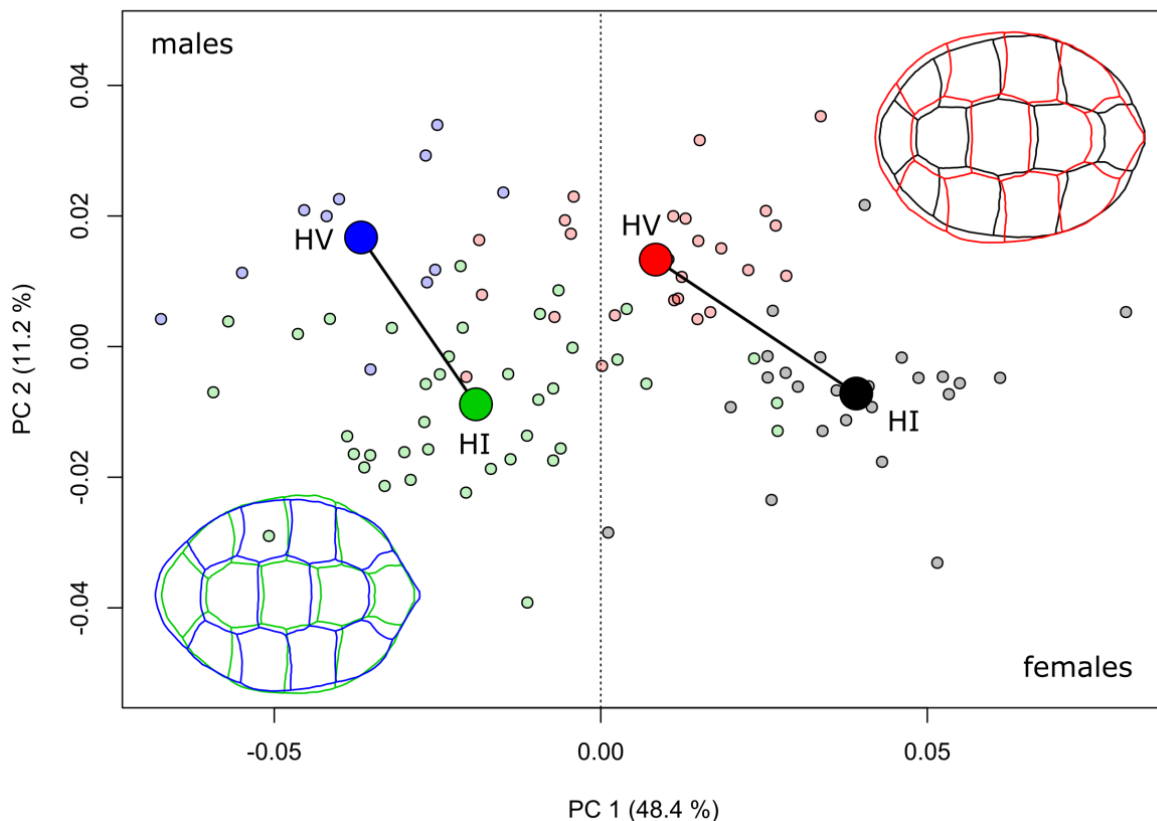
Rumunije, Republike Severne Makedonije, Grčke (Makedonija, Trakija, Tesalija Peloponez) izuzev južnog dela (Fritz *i sar.*, 2006). Sa druge strane, jedinke iz Trebinja poseduju HV (B10 - B15 haplogrupa prema (Fritz *i sar.*, 2006) koji je sveprisutan u populacijama sa istočne obale Jadranskog mora (Fritz *i sar.*, 2006). Stoga, rezultati varijabilnosti *cytb* mtDNK su ukazali na pripadnost populacija iz Pčinje i Trebinja različitim, a divergentnim genetičkim klasterima u okviru istočne podvrste *T. h. boettgeri* (Djurakic & Milankov, 2019a). Takođe, metodama prostorne genetike (*landscape genetics*) definisana su tri genetička klastera (A: *T. h. hermanni* iz Španije, Francuske i Italije; B: populacije duž obale Jadranskog mora od severnog dela Hrvatske, Bosne i Hercegovine i severne Grčke – Krf i Epir; C: populacije iz Rumunije, Srbije, Bugarske, Republike Severne Makedonije i Grčke) čime je ukazano na tesnu povezanost molekularne varijabilnosti i geografske distribucije (Slika 3). Registrovana tri divergentna genetička klastera su u potpunoj saglasnosti sa mrežom haplotipova. Na primer, klasteri A, B i C detektovani programom Geneland odgovaraju haplogrupama HIX - HXI, HV - HVIII i HI - HIV (Djurakic & Milankov, 2019a).



Slika 2. Mreža haplotipova zasnovana na *cytb* mtDNK haplotipovima *Testudo hermanni boettgeri* ukazuje na poziciju populacija iz Pčinje i Trebinja u odnosu na četiri haplogrupe *Testudo hermanni* definisane u radu Fritz *i sar.* (2006). Isprekidane linije ukazuju na alternativnu povezanost haplotipova, a vertikalne linije predstavljaju broj substitucija između haplotipova (Djurakic & Milankov, 2019a).



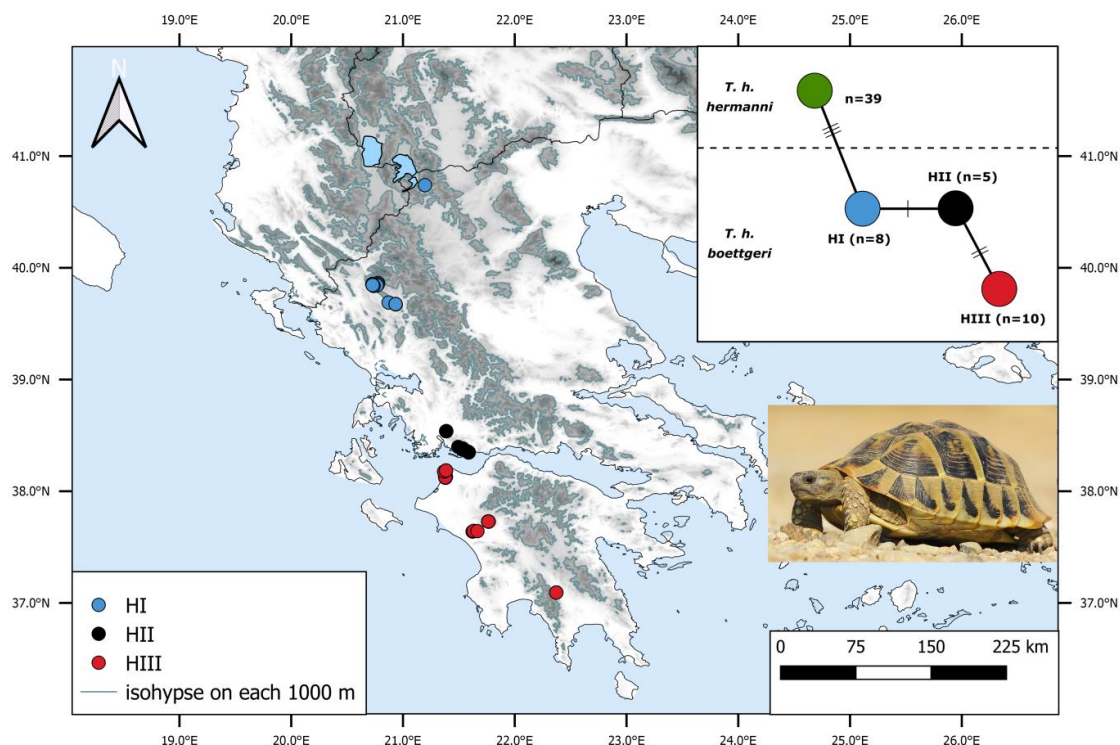
Slika 3. Mapa Evrope sa populacionom pripadnošću *Testudo hermanni* bazirana na *cytb* mtDNK haplotipovima i Geneland posteriornom verovatnoćom definisanom a) nekoreliranim modelom; b) koreliranim modelom. Ljubičasta i crvena strelica ukazuju na lokalitete Pčinja i Trebinje. Plava i zelena strelica pokazuju jedinice sa lokaliteta Krf (Corfu) i Saidona (Saidhona) u Grčkoj. Boje odgovaraju haplogrupama predstavljanim na Sl. 2 (Djurakic & Milankov, 2019a).



Slika 4. Morfološki prostor definisan prvom (pol) i drugom (genetička pripadnost) PC osom koje uključuju 60% od totalne varijabilnosti oblika karapaksa. Vertikalna isprekidana linija razdvaja polove i haplotipove svakog pola *Testudo hermanni boettgeri*. HI – populacija iz Pčinje; HV – populacija iz Trebinja (Djurakic & Milankov, 2019a).

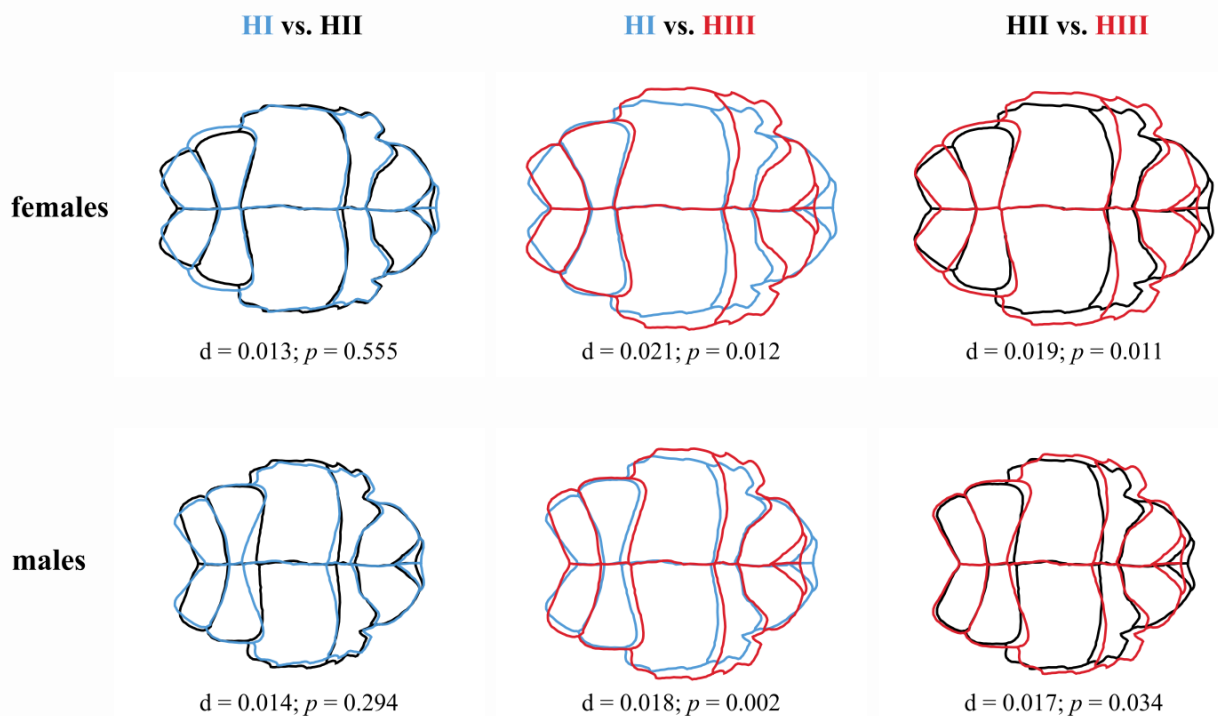
U kontekstu publikovanih podataka (Fritz *i sar.*, 2006) razmatrana je varijabilnost oblika karapaksa, čime je dat novi uvid u sadašnje poznavanje subspecijskog diverziteta *T. hermanni* na Balkanskom poluostrvu (Djurakic & Milankov, 2019a). Testirajući upotrebljivost geometrijske morfometrije u razlikovanju genetički divergentnih populacija (Pčinja, Srbija i Trebinje, Bosna i Hercegovina) utvrđeno je da se u obliku karapaksa populacije statistički značajno razlikuju (Slika 4). U datoj studiji, Djurakic i Milankov (2019a) podvlače da geometrijska morfometrija ima visok potencijal za detekciju suptilnih interpopulacionih razlika (Adams & Funk, 1997; Milankov *i sar.*, 2009; Valenzuela *i sar.*, 2004; Adams *i sar.*, 2013; Davis *i sar.*, 2016; Karanovic *i sar.*, 2016).

Odsustvo intrapopulacione varijabilnosti *12S* rRNK je utvrđeno i u populacijama podvrste *T. h. boettgeri* iz Grčke (Djurakic & Milankov, 2019b). Analizom jedinki šumske kornjače sa sedam lokaliteta u Grčkoj registrovana su tri divergentna haplotipa koja se međusobno razlikuju u jednoj (HI vs. HII), dve (HII vs. HIII) i tri (HI vs. HIII) supstitucije (Slika 5). Mrežom haplotipova je ukazano na povezanost distribucije haplotipova sa geografskim oblastima u Grčkoj, u smislu da je HI prisutan u severnoj Grčkoj (Ioannina), HII na jugu kontinentalnog dela Grčke (Evinochori), a HIII isključivo na Peloponezu (Slika 5) (Djurakic & Milankov, 2019b).



Slika 5. Mapa Grčke pokazuje prostornu distribuciju *12S* rRNK haplotipova (HI-HIII) 23 jedinke *Testudo hermanni boettgeri*. Genetički odnos haplotipova i sekvenci *Testudo hermanni hermanni* je predstavljen u gornjem desnom uglu (n – broj individua; vertikalne linije predstavljaju broj supstitucija između haplotipova) (Djurakic & Milankov, 2019b).

Na osnovu analize oblika plastrona utvrđeno je da se individue koje pripadaju HI haplotupu ne razlikuju od individua haplotipa HII (Slika 6). Nasuprot toga, individue koje pripadaju haplotipu HIII (Peloponez) se sistematski razlikuju od individua oba haplotipa (Slika 6). Prethodne studije (Djurakic & Milankov, 2019a, 2019b) su ukazale na veliku saglasnost geometrijske morfometrije sa molekularnim analizama u detekciji intraspecijske varijabilnosti i samim tim na njen veliki potencijal jer omogućava rigoroznu morfološku analizu. Međutim, prethodne dve studije su bazirane na analizi populacija šumske kornjače sa dela distribucije ove vrste na Balkanu i obuhvatnije studije morfološke i genetičke varijabilnosti populacija ove vrste su potrebne.



Slika 6. Diferencijacija u obliku plastrona između jedinki divergentnih haplotipova (I-HIII) 12S rRNK podvrste *Testudo hermanni boettgeri*. Distanca između srednjih vrednosti (d) i statistička značajnost (p) su predstavljeni za svaki pol. Boje haplotipova odgovaraju haplotipovima sa slike 4 (Djurakic & Milankov, 2019b).

2. CILJEVI RADA

Opšti cilj rada je bio analiza genetičke i fenotipske varijabilnosti istočne podvrste *Testudo hermanni boettgeri*.

Specifični ciljevi rada bili su:

1. Analiza genetičke varijabilnosti populacija *T. h. boettgeri* na Balkanskom poluostrvu na osnovu *12S* rRNK i *cytb* mtDNK gena;
2. Filogeografska struktuiranost na osnovu *de novo* *12S* rRNK i *cytb* mtDNK sekvenci *T. h. boettgeri* i dostupnih podataka *T. hermanni*;
3. Sagledavanje intenziteta i obrasca polnog dimorfizma *T. h. boettgeri* analizom varijabilnosti oblika plastrona i karapaksa primenom geometrijske morfometrije;
4. Kvantifikovanje varijabilnosti oblika plastrona i karapaksa populacija *T. h. boettgeri* klasifikovanih u genetičke klastere na osnovu *12S* rRNK gena i multilokusnom analizom;
5. Saglasnost molekularne i morfološke diferencijacije *T. h. boettgeri*;
6. Taksonomski i konzervacioni značaj strukturiranosti *T. h. boettgeri*.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Materijal

Jedinke šumske kornjače *Testudo hermanni boettgeri* su uzorkovane rukom u svom prirodnom staništu, nakon čega su obeležene individualnim brojevima kako bi se izbeglo potencijalno dvostruko uzorkovanje (Djordjevic *i sar.*, 2011). Sve jedinke su fotografisane i zavedene u terenski protokol koji sadrži podatke kao što su identifikacioni broj jedinke, pol, lokalitet, GPS koordinate, datum uzorkovanja i starost životinje. Takođe, iz jugularne vene određenog broja jedinki izvađeno je maksimalno 300 µl krvi nakon čega je razmazana na filter papir (FTA™ Classic Card Whatman™). Nakon toga, sve jedinke su vraćene na istovetno mesto uzorkovanja. Dozvola za uzorkovanje je dobijena od strane relevantnih institucija u državama koje zakonski propisuju ovu obavezu u momentu vršenja terenskog istraživanja (Republika Crna Gora: 02-UPI-625/1; Republika Hrvatska: 517-07-1-1-1-12-2; Republika Grčka: BEA20-I1A; Republika Srbija: 119-01-5/17/2014-09). Adultne individue su identifikovane na osnovu dužine karapaksa, gde svaka individua duža od 100 mm predstavlja adultnu individuu (Stubbs *i sar.* 1985). Polovi su razlikovani na osnovu makro-karakteristika oblika karapaksa i plastrona, kao i dužine repa (Arnold & Ovenden, 2002).

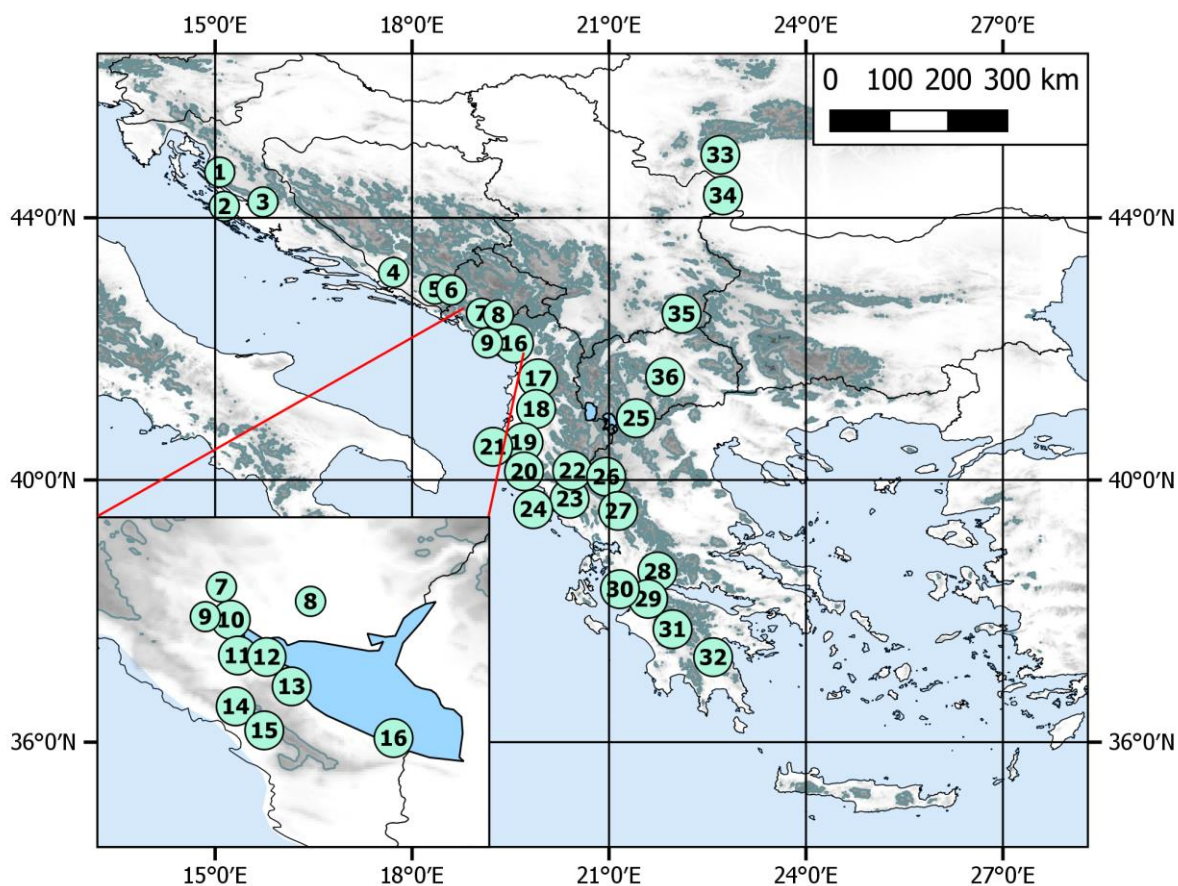
3.1.1. Materijal za genetičku analizu

U radu su analizirana dva gena, *12S* rRNK (*12S* gen za rRNK) i *cytb* (citohrom *b*) geni mitohondrijskog genoma (mtDNK). Ekstrakcija DNK je izvršena iz krvi 69 živih kornjača i sedam mrtvih jedinki *T. h. boettgeri* sa 32 lokaliteta iz sedam zemalja na Balkanskom poluostrvu (Tabela 1; Tabela P1; Slika 7). Pored *de novo* sekvenci gena, korišćene su i sekvence gena *12S* rRNK i *cytb* mtDNK pohranjene u Banci gena (*GenBank*, www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) (Tabela P2).

Analiza varijabilnosti *12S* rRNK je uključila je 76 *de novo* sekvenci *T. h. boettgeri* (Tabela 1; Tabela P1; Slika 7) i 34 sekvence *T. hermanni* preuzetih iz Banke gena. *12S* rRNA *de novo* sekvence su pohranjene u Banku gena (MN194513 – MN194588), dok su preuzete sekvence AF067503.1 (Álvarez *i sar.*, 2000); AF175326.1, AF175327.1 (van der Kuyl *i sar.*, 2002); AM491032.1 (Fritz & Bininda-Emonds, 2007); DQ445845.1, DQ445846.1 (Salinas *i sar.*, 2011); KF591452.1, KF591453.1, KF591454.1, KF591455.1, KF591456.1, KF591457.1, KF591458.1, KF591459.1, KF591460.1, KF591461.1, KF591462.1,

KF591463.1, KF591464.1, KF591465.1, KF591466.1, KF591467.1, KF591468.1, KF591469.1, KF591470.1, KF591471.1, KF591472.1, KF591473.1, KF591474.1, KF591475.1, KF591476.1, KF591477.1, KF591478.1 (Perez *i sar.*, 2014); i KY762026.1 (Carvalho *i sar.*, 2017). Jedna 12S rRNK sekvenca vrste *Testudo horsfieldii* (AF175328.1) (van der Kuyl *i sar.*, 2002) je korišćena kao autgrupa i jedna sekvenca kompletnog mitohondrijskog genoma *T. horsfieldii* (DQ080045) (Parham *i sar.*, 2006) je uzeta za određivanje tačne pozicije nukleotidnih substitucija 12S rRNK gena. Vrsta *T. horsfieldii* je određena za autgrupu jer je najbliži srodnik vrste *T. hermanni* (van der Kuyl *i sar.*, 2002; Fritz & Bininda-Emonds, 2007; Vasilyev *i sar.*, 2008; Luján *i sar.*, 2016).

U analizi varijabilnosti *cytb* mtDNK gena korišćene su 66 *de novo* sekvence *T. h. boettgeri* (Tabela 1; Tabela P1; Slika 7) i 31 sekvenca *T. h. hermanni* preuzete iz Banke gena. *Cytb* mtDNK *de novo* sekvence su pohranjene u Banku gena (MN245450 – MN245515), dok su preuzete sekvence AJ888361.1, AJ888362.1, AJ888363.1, AJ888364.1, AM230495.1, AM230496.1, AM230497.1, AM230498.1, AM230499.1, AM230500.1, AM230501.1, AM230502.1, AM230503.1, AM230504.1, AM230505.1, AM230506.1, AM230507.1, AM230508.1, AM230509.1, AM230510.1, AM230511.1, AM230512.1, AM230513.1, AM230514.1, AM230515.1, AM230516.1, AM230517.1, AM230518.1, AM230519.1, AM230520.1, AM230521.1 (Fritz *i sar.*, 2006) (Tabela P2).



Slika 7. Mapa lokaliteta analiziranih jedinki *Testudo hermanni boettgeri*. Hrvatska: 1. Pag, 2. Vir, 3. Benkovac, 4. Badžula, Bosna i Hercegovina: 5. Trebinje, 6. Lastva; Crna Gora: 7. Rijeka Crnojevića, 8. Vranjina, 9. Trnovo, 10. Komarno, 11. Crmnica, 12. Seoce, 13. Kršica, 14. Brce, 15. Popovići, 16. Veliki Ostros; Albanija: 17. Shëngjin, 18. Rogozhine, 19. Radhimë, 20. Tragias, 21. Orikum, 22. Gjirokastër, 23. Syri Kalter, 24. Ksamil; Grčka: 25. Antartiko, 26. Kipi, 27. Ioannina, 28. Evinochori, 29. Cape Araxos, 30. Kalogria, 31. Olympia, 32. Sparta; Rumunija: 33. Ilovita; Srbija: 34. Negotin, 35. Pčinja; Republika Severna Makedonija: 36. Prilep - Pletvar

Tabela 1. Poreklo, identifikacioni kod (DNK ID) i haplotip jedinki *Testudo hermanni boettgeri de novo* sekvenciranih za *12S* rRNK (N = 76) i *cytb* mtDNK (N = 66) gene (kurzivom su označene jedinke za koje je analiziran samo gen *12S* rRNK).

Zemlja	Lokalitet	DNK ID	<i>12S</i> rRNA		<i>Cytb</i> mtDNK	
			Haplotip	Filogrupa	Haplotip	Filogrupa
Bosna i Hercegovina	Lastva (6)	K27, K42	I	Zapad	I	Zapad
Hrvatska	Pag (1)	K29, K40				
	Vir (2)	<i>K30</i>				
	Benkovac (3)	K31, K41				
	Badžula (4)	K28, K39				
N (<i>12S</i> rRNA/ <i>cytb</i>)		9/8				
Crna Gora	Rijeka Crnojevica (7)	K12				
	Vranjina (8)	K20, K21				
	Komarno (10)	<i>K9</i> , K11				
	Seoce (12)	K19				
	Kršića (13)	<i>K17</i>				
	Brce (14)	K4, K5				
	Popovici (15)	K6, <i>K8</i>				
	Veliki Ostros (16)	K18				
N (<i>12S</i> rRNA/ <i>cytb</i>)		12/9				
Albanija	Shëngjin (17)	K96, K97, K147, K148				
	Rrogozhine (18)	K99				
	Radhimë (19)	K101, <i>K150</i> , <i>K151</i>				
	Tragias (20)	K100				
	Orikum (21)	<i>K149</i>				
	Gjirokastër (22)	K105				
	Syri Kalter (23)	K103, K152				
	Ksamil (24)	K102				
N (<i>12S</i> rRNA/ <i>cytb</i>)		14/11				

Grčka	Antartiko (25)	K106				
Tabela 1. (Nastavak)						
	Kipi (26)	K104, K109, K153, K154				
	Ioannina (27)	K110, K155, K156				
	Kalogria (30)	K24, K44	II	Peloponez	II	Istok
	Olympia (31)	K35, K36, K45, K47				
	Sparta (32)	K22, K23, K43, K49				
	Evinochori (28)	K32, K38, K46, K87, K88	III			
N (12S rRNA/ <i>cytb</i>)		23/21				
Srbija	Negotin (34)	K80, K81, K82				
	Pčinja (35)	K76-K79, K144-K146	IV	Istok		
	Pčinja (35)	K75				
N (12S rRNA/ <i>cytb</i>)		11/11	III	Istok		
Rumunija*	Ilovita (33)	K83 - K86				
N (12S rRNA/ <i>cytb</i>)		4				
Republika Severna Makedonija*	Prilep-Pletvar (36)	K107, K108, K157	III	Istok		
N (12S rRNA/ <i>cytb</i>)		3/2				

Brojevi u zagradi odgovaraju brojevima lokaliteta na Sl. 7.

*ekstrakcija urađena iz tkiva mrtvih jedinki

3.1.2. Materijal za morfološku analizu

U radu je geometrijskom morfometrijom analiziran oblik karapaksa i plastrona jedinki *T. h. boettgeri* poreklom iz Hrvatske (četiri lokaliteta), Bosne i Hercegovine (dva lokaliteta), Crne Gore (10 lokaliteta), Albanije (8 lokaliteta), Grčke (8 lokaliteta), Srbije (2 lokaliteta) i Republike Severne Makedonije (1 lokalitet). U konačnom odabiru odgovarajućih fotografija za dalju analizu su korišćeni podaci karapaksa 587 i plastrona 564 jedinki (Tabela 2). Pri uzorkovanju jedinki bilo je uključeno više legatora (Hrvatska: Francuski Marčetić Lj., Đurakić M., Milankov V.; Bosna i Hercegovina: Francuski Marčetić Lj., Đurakić M., Milankov V.; Crna Gora: Francuski Marčetić Lj., Đurakić M.; Albanija: Đurakić M., Milankov V.; Republika Severna Makedonija: Đurakić M., Milankov V.; Grčka: Francuski Marčetić Lj., Đurakić M., Milankov V., Mišković M.; Srbija: Đurakić M., Ristić N.; Rumunija: Đurakić M., Ristić N.), dok je fotografisanje jedinki vršila jedna osoba (Đurakić M.).

Tabela 2. Poreklo i broj jedinki *Testudo hermanni boettgeri* analiziranih geometrijskom morfometrijom (brojevi u zagradi odgovaraju brojevima lokaliteta na Sl. 7). * - mrtve jedinke.

Zemlja	Lokalitet	Karapaks		Plastron	
		Ženke	Mužjaci	Ženke	Mužjaci
Hrvatska	Pag (1)	25	24	26	23
	Vir (2)	9	1	10	1
	Benkovac (3)	20	12	21	13
	Badžula (4)	20	11	20	11
N		74	48	77	48
Bosna i Hercegovina	Trebinje (5)	1	1	1	1
	Lastva (6)	24	11	24	11
N		25	12	25	12
Crna Gora	Rijeka Crnojevića (7)	4	3	4	3
	Vranjina (8)	6	10	6	10
	Trnovo (9)	5	2	5	2
	Komarno (10)	6	4	6	4
	Crmnica (11)	2	0	2	0
	Seoce (12)	1	0	1	0
	Kršića (13)	2	1	2	1
	Brce (14)	7	24	7	24
	Popovići (15)	17	18	17	17
	Veliki Ostros (16)	2	1	2	1
N		52	63	52	62

Tabela 2. (Nastavak)					
Albanija	Shëngjin (17)	24	17	26	20
	Radhimë (19)	10	6	1	0
	Tragias (20)	2	2	3	0
	Orikum (21)	2	0	0	0
	Gjirokastër (22)	0	1	0	0
	Syri Kalter (23)	9	5	0	0
	Ksamil (24)	0	1	0	0
	N		47	32	30
Grčka	Kipi (26)	12	18	12	18
	Ioannina (27)	1	5	2	5
	Evinochori (28)	16	12	15	13
	Cape Araxos (29)	5	1	5	1
	Kalogria (30)	22	38	22	39
	Olympia (31)	10	23	10	23
	Sparta (32)	3	4	3	4
	N		69	101	69
Srbija	Pčinja (35)	22	39	24	39
N		22	39	24	39
Republika Severna Makedonija*	Prilep-Pletvar (36)	1	2	1	2
N		1	2	1	2
Suma		290	297	278	286
		587		564	

3.2. Metode

3.2.1. Metode genetičke analize

3.2.1.1. DNK ekstrakcija i amplifikacija

Sa svakog FTA papira uz pomoću Harris ubodnog sečiva isečena su četiri do pet filter diska (prečnik diska 1,2 mm) na kojima se nalazi osušena krv analiziranih kornjača. Nakon toga, isečeni diskovi filter papira sa osušenom krvi su procesuirani sa NucleoSpin® Tissue DNK kompletom za ekstrakciju (Macherey-Nagel) prema protokolu proizvođača.

Umnožavanje željenih fragmenata DNK izvršeno je metodom lančane reakcije polimeraze (*PCR, Polymerase Chain Reaction*) upotrebom kompleta *Illustra™ puReTaq™ Ready-To-Go™ PCR Beads* (GE Healthcare, Velika Britanija) prema protokolu proizvođača. Fragment od 450 bp, koji obuhvata oba kraja *12S* rRNA gena, je amplificiran prajmerima: L1091 (5'- AAAAAGCTTCAAACCTGGGATTAGATACCCCACTAT -3') i H1478 (5'- TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT -3') (Kocher *i sar.*, 1989; Álvarez *i sar.*, 2000). Lančana reakcija polimeraze se odvijala u mikrotubi u ukupnoj zapremini od 25 µl, od čega je 18 µl činila ultra čista voda, 5 µl ekstrakt DNK i po 1 µl prajmera (10pmol/µl).

Reakcija se odvijala sledećim redosledom: početno razdvajanje (denaturacija) lanaca DNK na 94°C u trajanju od 1 minuta, zatim 30 ciklusa, od kojih se svaki sastojao od koraka denaturacije na 94°C u trajanju od 30 sekundi, vezivanje prajmera na 45°C u trajanju od 30 sekundi i sinteze željenih fragmenata na 72°C u trajanju od 1 minuta. Poslednji korak reakcije je finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 7 minuta (Perez *i sar.*, 2014). Fragment dužine 750 bp, obuhvatajući oba kraja *cytb* mtDNK gena je umnožen prajmerima: L 14722 (5'-CGAAGCTTGATATGAAAACCATCGTTG-3') (Juste *i sar.*, 1999) i H 15231 (5'-GCAAATAGGAAGTATCATTCTGG-3') (Fritz *i sar.*, 2012). Reakcija se odvijala sledećim redosledom: početna denaturacija lanaca DNK na 94°C u trajanju od 5 minuta, zatim 40 ciklusa, od kojih se svaki sastojao od koraka denaturacije na 94°C u trajanju od 45 sekundi, vezivanje prajmera na 53°C u trajanju od 45 sekundi i sinteze željenih fragmenata na 72°C u trajanju od 90 sekundi. Poslednji korak reakcije je finalna ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 minuta (Fritz *i sar.*, 2012).

Uspešnost *PCR* reakcije je proverena elektroforezom na 2% agaroznom gelu. Produkti *PCR* reakcije su potom prečišćeni pomoću *ExoSAP-IT*® kompleta (USB Corporation) na osnovu protokola proizvođača. Reakcija se odvijala u ukupnoj zapremini od 18 µl, od čega je 8 µl *ExoSAP* reakciona smeša (*exonuclease-I*, *shrimp alkaline phosphate*, 10 U/ml) i 10 µl *PCR* produkta. Produkti i reakciona smeša inkubirani su na 37°C 30 minuta i potom na 80°C 15 minuta. Produkti *PCR* reakcije (sa *PCR* prajmerima) sekvencirani su u oba pravca pomoću kompleta za sekvenciranje *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit ver. 1.1* (Applied Biosystems) Sangerovom metodom koristeći jednu četvrtinu preporučene količine na poluautomatskom sekvenceru ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

3.2.1.2. Statistička obrada podataka DNK varijabilnosti

Sve sekvence su nakon sekvenciranja pregledane radi otklanjanja mogućih grešaka u očitavanju baza pomoću programa Chromas Lite 2.1.1. (Technelysium Pty Ltd, <http://www.technelysium.com.au/chromas2.html>). Sve sekvence su poravnate pomoću ClustalW algoritma (Thompson, Higgins & Gibson, 1994) u programu Mega X (Kumar *i sar.*, 2018). Nakon poravnanja, utvrđeno je da *T. hermanni* ima inserciju između 833 i 834 bp gena *12S* rRNK u odnosu na *T. horsfieldii* DQ080045 sekvencu i *T. horsfieldii* AF175328.1. Zbog toga je tačna pozicija dijagnostičkih nukleotidnih supstitucija nakon 833 bp obeležena sa zvezdicom (“*”). Slično, sekvenca KY762026.1 (Carvalho *i sar.*, 2017) nije analizirana jer je pregledom sekvence uočeno osam delecija u odnosu na ostale sekvence vrste *T. hermanni*.

Sve sekvence gena *12S* rRNK iz Banke gena i *de novo* dobijene sekvence su poravnate isecanjem nevarijabilnih pozicija na marginama oba kraja DNK lanca, te je dužina analiziranog fragmenta iznosila 266 bp. Ukupna dužina umnoženog *cytb* mtDNK fragmenta iznosila je 585 bp. Nakon poravnanja *de novo cytb* mtDNK sekvenci sa sekvencame preuzetim iz Banke gena (Fritz *i sar.*, 2006) uočeno je da se okvir čitanja ova dva seta sekvenci ne podudara u potpunosti zbog čega je u analizama rekonstrukcije filogenetskih odnosa korišćen okvir od 518 bp *cytb* mtDNK gena.

Evolucionni model nukleotidnih supstitucija koji najbolje opisuje *12S* rRNK i *cytb* mtDNK varijabilnost gena utvrđen je pomoću programa PartitionFinder2 (Lanfear *i sar.*, 2016) u kome su podešeni sledeći parametri: dužine grana su tretirane kao “*linked*”, algoritam za ispitivanje/traženje evolucionog modela nukleotidnih supstitucija koji najadekvatnije opisuje podatke je podešen na “*greedy*”, a selekcija modela izvršena je na osnovu korigovanog Akaiikovog informacionog kriterijuma (*corrected Akaike Information Criterion* – AICc). Utvrđeno je da je najbolji model nukleotidnih supstitucija za *12S* rRNK gen HKY + G, a za *cytb* mtDNK GTR + X model i oni su korišćeni kao jedan od ulaznih parametara za rekonstrukciju evolucione istorije *12S* rRNK i *cytb* mtDNK gena. Rekonstrukcija evolucione istorije *12S* rRNK i *cytb* mtDNK gena dobijena pomoću programa MrBayes koji je baziran na MCMC simulacijama (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Svi ulazni parametri za MCMC simulacije su podešeni na uobičajne (*default*) sem sledećih: nruns = 2, nchains = 4 (*one cold and three heated chains*), ngen = 50,000,000, samplefreq = 250 (thinning parameter), diagnfreq = 1000 and starttree = random. Nakon isključenja 25% uzoraka hladnog lanca (*cold chain*), konvergencija između simulacija proverena je pomoću: 1) srednje standardne devijacije frekvencije podela klada na drvetu (uzeta je standardna vrednost od 0.01 kao granična vrednost), i 2) programa Tracer (Rambaut *i sar.*, 2018) gde je testirana efektivna veličina uzorka (ESS) korišćenjem standardnih vrednosti softvera. Rekonstruisano konsenzus drvo, kao i podrška čvorištima (nodusima) izražena preko posteriorne verovatnoće (*posterior probability*) vizualizovana je u programu FigTree (<https://github.com/rambaut/figtree/releases>).

Koristeći R paket Geneland (Guillot, Mortier & Estoup, 2005; Guillot, Santos & Estoup, 2008; Guillot *i sar.*, 2012), analizirano je: 1) 76 *de novo* sekvenci *12S* rRNK gena; 2) 66 *de novo* sekvenci *cytb* mtDNK gena; i 3) 66 *de novo* kombinovane sekvence *12S* rRNK i *cytb* mtDNK gena. Geneland je baziran na Bajesovoj MCMC simulaciji koja može eksplicitno analizirati georeferencirane multilokusne podatke bez *a priori* grupisanja individua u genetičke klastere. Takođe, ovaj R paket ne koristi određeni evolucionni model nukleotidnih

supstitucija kao što je slučaj sa MrBayes softverom, već je baziran na statističkom modelu koji maksimizuje Hardi-Vajnbergov ekvilibrijum i linkidž ekvilibrijum unutar analiziranih populacija (Guillot *i sar.*, 2012). Mitohondijski geni se tretiraju kao haploidni podaci kod kojih svako varijabilno mesto u genetičkom okviru predstavlja jedan lokus, a varijante DNK baza predstavljaju različite alele. Shodno tome, varijabilna mesta su utvrđena u programu MEGA X (Kumar *i sar.*, 2018) – 4 varijabilne supstitucije za *12S* rRNK i *cytb* mtDNK, a 8 za kombinovani dataset – koje su potom kodirane T = 1, C = 2, G = 3, A = 4 i kao takve korišćene u Geneland analizi. Imajući u vidu da su svi uzorci georeferencirani, korišćen je prostorni model (*spatial model*) u kom su koordinate tretirane kao tačne (*exact*). MCMC procedure u Geneland programu podešena je na 10 nezavisnih ciklusa (10 *runs*), svaki sa 100000 iteracija, thinning = 100; burning parameter = 200; maximum rate of Poisson process je bio jednak broju individua u uzorku; minimal number of populations = 1; maximal number of populations = 20; maximum number of nuclei in the Poisson-Voronoi tessellation je tri puta veći od broja jedinki; korišćen je i korelisani i nekorelisani model frekvencije alela (Guillot *i sar.*, 2008). Ova dva modela se razlikuju u pretpostavci u vezi sa retkim alelima, gde korelisani model predviđa da prostorno srodni klasteri dele retke alele, dok nekorelisani model nema tu pretpostavku. Korelisani model ima tendenciju da pronađe suptilniju genetičku strukturu od nekorelisanog, međutim, osetljiviji je na odstupanja od teorijskih pretpostavki (npr. prisustvo izolacije distancom) (Guillot, 2008) Konvergencija MCMC simulacija u 10 nezavisnih ciklusa testirana je pomoću: 1) trejs plota (*trace plot*) u kom 10 nezavisnih ciklusa treba da pokažu sličan obrazac posteriorne verovatnoće, i 2) proverom utvrđenog broja populacija u 10 nezavisnih ciklusa, kao i raspored individua u date populacije. Broj i raspored individua u populacije utvrđene na osnovu posteriorne verovatnoće u Geneland-u mapirani su na kartu Balkanskog poluostrva u QGIS softveru (<http://qgis.osgeo.org>).

Odnosi između analiziranih DNK sekvenci šumske kornjače predstavljeni su i pomoću mreže haplotipova koja identične sekvence tretira kao jedan haplotip, a različite sekvence grupiše u mrežu na osnovu sličnosti koristeći princip parsimonije (Templeton, Crandall & Sing, 1992). Različiti haplotipovi u mreži su međusobno odvojeni brojem supstitucija na osnovu kojih se razlikuju. Utvrđivanje broja haplotipova, kao i rekonstrukcija mreže haplotipova urađena je u R (R Development Core Team, 2019) paketu pegas (Paradis, 2010).

Koristeći standardne opcije u MEGA X (Kumar *i sar.*, 2018), izračunata je nekorigovana *p*-distanca i odgovarajuća standardna greška između genetičkih klastera za *12S* rRNK i *cytb* mtDNK gene utvrđenih pomoću MrBayes i Geneland paketa koristeći 1000 butstrap iteracija. U ovom testu korišćene su sekvence *T. h. hermanni* i *T. horsfieldii* takođe u

cilju procene vremena divergencije sekvenci između genetičkih klastera, kao i između taksona *T. h. hermanni* i *T. horsfieldii*. Vreme divergencije izraženo u milionima godina (Mya) je izračunato na osnovu standardne kalibracione stope molekularnog sata koja iznosi $\approx 2\%$ za svakih milion godina, kao i osam puta usporene stope $\approx 0,25\%$ jer određena istraživanja ukazuju da je stopa molekularnih promena u mitohondrijskoj DNK kornjača sporija (Avise *i sar.*, 1992; Lourenço *i sar.*, 2013).

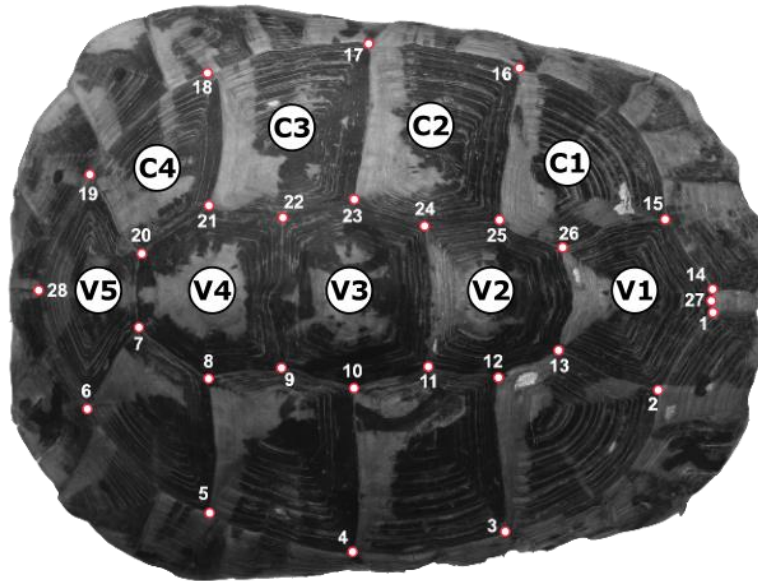
U cilju vizualizacije potencijalnih hibridnih zona između genetičkih klastera u okviru *Testudo hermanni boettgeri* analizirani su 15 arc-second Digital Elevation Model (DEM) Balkanskog poluostrva u QGIS softveru (<http://qgis.osgeo.org>). Naime, *T. hermanni* retko naseljava staništa iznad 1000 metara nadmorske visine (Bertolero *i sar.* 2011, <https://biologer.org/sr/groups/6/species/97>) zbog čega možemo pretpostaviti da planinski lanci i visoravni iznad ove nadmorske visine predstavljaju fizičku barijeru za protok gena između genetičkih klastera. Takođe, kontaktne zone između genetičkih klastera ispod ove nadmorske visine su očekivane, tj. verovatnije i geografske lokacije sa ovim karakteristikama su identifikovane i mapirane na mapu Balkanskog poluostrva.

3.2.2. Metode fenotipskih analiza

3.2.2.1. Prikupljanje geometrijsko - morfometrijskih podataka

Struktura varijabilnosti oblika karapaksa i plastrona jedinki šumske kornjače uzorkovanih na 32 lokaliteta (Tabla 2) utvrđena je 2D geometrijsko-morfometrijskom tehnikom (2D *landmark-based geometric morphometrics*, skraćeno 2D GM). 2D GM je multivarijantna tehnika koja analizira prostornu distribuciju i varijabilnost morfoloških struktura na osnovu konfiguracije specifičnih tačaka (*landmarks*), a koja eksplicitno odvaja veličinu (*Centroid size*, *Centroidna veličina*) i oblik (*Procrustes coordinates*, *Prokrustove kordinate*) pomoću matematičkih funkcija kao što su translacija, rotacija i skaliranje matrica (Bookstein 1991). Specifične tačke se pozicioniraju na fotografijama morfološke strukture koja se analizira. Fotografije karapaksa i plastrona jedinki šumske kornjače u rezoluciji 14,2 MP prikupljene su uz pomoć aparata Nikon coolpix S8000 koji je vertikalno postavljen u odnosu na postolje na kom su pozicionirane jedinke. Upotrebom milimetarske hartije i skaliranjem rešen je problem nejednake udaljenosti aparata od objekata fotografisanja. Svaka individua je fotografisana dva puta u cilju preciznije procene oblika i utvrđivanja greške

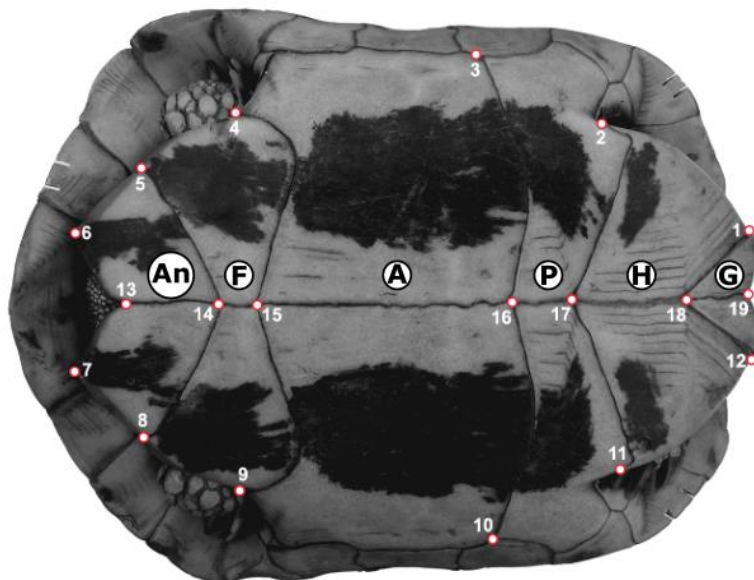
između sukcesivnih fotografija (*imaging error*; u daljem tekstu „greška fotografisanja“), a fotografisanje je izvršila ista osoba (MĐ).



Slika 8. Pozicija 28 homolognih tačaka digitizovanih na karapaksu (dorzalna perspektiva oklopa) *Testudo hermanni boettgeri*. Tačke 27 i 28 su neparne i definišu osu simetrije, dok su ostale tačke parne. Specifične tačke za 2D geometrijsku morfometriju su pozicionirane na suturama između vertebralnih (označene sa V) i kostalnih (C) dermalnih elemenata, kao i na distalnom delu karapaksa (npr. tačke 16 – 19 nalaze se na suturama između kostalnih i marginalnih elemenata). Marginalni dermalni elementi nisu analizirani. Desna strana slike je anteriorni, a leva strana je posterioni deo životinje.

Na fotografijama je na mestima preseka (sutura) dermalnih ploča karapaksa digitizovano 28 homolognih specifičnih tačaka pomoću programa TpsDig 2.19 (Rohlf, 2013) (Slika 8). Tačke su pozicionirane kako sa leve, tako i sa desne strane karapaksa, pri čemu tačke 27 i 28 predstavljaju tačke pozicionirane duž longitudinalne (aksijalne) ose simetrije koja deli oklop na dve simetrične celine. Karapaks obuhvata vertebralne (označene sa V, Slika 8), kostalne (označene sa C, Slika 8) i marginalne dermalne elemente koji nisu analizirani u radu. Veći deo vertebralnih i kostalnih koštanih elemenata koji se nalaze ispod dermalnih elemenata inkorporira aksijalni skelet kornjače, tj. predstavljaju osifikovan gruni koš. Na fotografijama plastrona je digitalizovano 19 homolognih tačaka od kojih su tačke 13 – 19 neparne i definišu osu simetrije (Slika 9). Dermalni elementi plastrona na kojima su pozicionirane tačke za 2D geometrijsku morfometriju su gularne, humeralne, pektoralne, abdominalne, femoralne i analne pločice koje su parne (Slika 9), a nalaze se iznad koštanih elemenata epiplastron, entoplastron, hioplastron, hipoplastron i ksifiplastron od kojih su svi

sem entoplastrona parni koštani elementi. Marginalni dermalni elementi koji nisu analizirani u disertaciji povezuju karapaks i plastron na bokovima životinje formirajući koštane mostove. Tačke 2-4, tj. 9-11 na plastronu (Slika 9) nalaze se na rubnim pozicijama koštanih mostova.



Slika 9. Pozicija 19 homolognih tačaka digitizovanih na plastronu (ventralna perspektiva oklopa) *Testudo hermanni boettgeri*. Tačke 13 – 19 su neparne i definišu osu simetrije, dok su ostale tačke parne. Dermalni elementi plastrona na kojima su pozicionirane tačke za 2D geometrijsku morfometriju su G – gularne, H – humeralne, P – pektoralne, A – abdominalne, F – femoralne i An – analne pločice. Neparne tačke koje definišu osu simetrije nalaze se na suturama između sukcesivnih dermalnih elemenata (tačke 14 – 18) ili na njihovom obodu (tačke 13 i 19). Parne tačke su pozicionirane na suturama između dermalnih elemenata na distalnom delu plastrona. Desna strana slike je anteriorni, a leva strana je posterioni deo životinje.

Nakon pozicioniranja tačaka, dobijene su x , y koordinate homolognih tačaka, koje poseduju sirove informacije o prostornom odnosu ispitivanih tačaka forme (forma= veličina + oblik). Za matematičko uklanjanje veličinske komponente i stvaranje zajedničkog koordinatnog sistema za sve homologne tačke upotrebljena je GPA analiza (*General Procrustean Analysis*) (Rohlf & Slice, 1990; Dryden & Mardia, 1998). GPA analiza podrazumeva superpoziciju, odnosno translaciju, rotaciju i skaliranje specifičnih tačaka nakon čega su sve analizirane jedinke postavljene u isti koordinatni sistem definisane Prokrustovim koordinatama. Te koordinate definišu poziciju svake individue u nelinearnom prostoru, odnosno Kendalovom prostoru (Rohlf, 1999; Slice, 2001), gde su varijable isključivo varijable oblika. Konačno, Prokrustove koordinate su transformisane u linearni prostor uz pomoć ortogonalne projekcije kako bi se dalje mogle koristiti u standardnim multivarijantnim

statističim analizama koje zahtevaju da su analizirane varijable u Euklidovom prostoru (Dryden & Mardia, 1998). Centroidna veličina je skalarna vrednost veličine životinje, koja se dobija kvadratnim korenovanjem sume kvadrata rastojanja specifičnih tačaka od središta konfiguracije (Dryden & Mardia, 1998). Imajući u vidu da su karapaks i plastron simetrične strukture, nakon GPA i procene efekta greške fotografisanja, za svaku jedinku generisan je idealno simetričan oblik za obe strukture tako što je izračunat srednji oblik na osnovu leve i desne strane karapaksa, odnosno plastrona. Naime, karapaks i plastron poseduju osu simetrije koja deli ove dve strukture na levu i desnu stranu, tj. osa simetrije se nalazi u okviru karapaksa i plastrona (*object symmetry*; Klingenberg, Barluenga & Meyer, 2002). Prilikom fotografisanja, nemoguće je postaviti objektiv fotoaparata pod idealnim pravim uglom (90°) u odnosu na objekat fotografisanja, pa je samim tim strana tela sa kojom objektiv zaklapa manji ugao uvek korelisano “veća” (“više razvijena”) u odnosu na suprotnu stranu (Fruciano, 2016). Zbog toga, kod morfoloških struktura koje imaju objektnu simetriju, veoma je važno da se analizira srednji, potpuno simetričan oblik leve i desne strane jer na taj način se algebarski delom eliminiše efekat prethodno navedene korelisane greške (Cardini, 2016). Dakle, osim u slučaju procene efekta greške fotografisanja, u daljim analizama korišćena je samo simetrična komponenta varijabilnosti oblika, koja se dobija izračunavanjem srednje vrednosti između leve i desne strane objekta. Dodatno, zbog toga što su merenja vršena dva puta u cilju ispitivanja greške fotografisanja, simetrična komponenta individualnih oblika formirana je kao srednja vrednost dva sukcesivna oblika svake individue (*within-individual average shape*). Svi postupci koji su obuhvatali GPA analizu su sprovedeni pomoću geomorph (Adams, Collyer & Kaliontzopoulou, 2019) paketa u programskom jeziku R (R Development Core Team, 2019).

3.2.2.1. Statistička obrada podataka fenotipske varijabilnosti

Nakon GPA, za procenu efekta greške fotografisanja primenjena je Prokrustova ANOVA (Goodall, 1991; Klingenberg, McIntyre & Zaklan, 1998; Klingenberg *i sar.*, 2002), a statistička značajnost faktora određena je pomoću permutacija reziduala (Collyer, Sekora & Adams, 2015; Collyer & Adams, 2018) u geomorph (Adams *i sar.*, 2019) i RRPP (Collyer & Adams, 2018, 2019) paketu. Naime, ova metoda testira efekat faktora kao što su individualna varijabilnost (varijabilnost između jedinki), direkciona asimetrija (sistematska unutar individualna varijabilnost – sistematska razlika između leve i desne strane morfološke strukture), fluktuirajuća asimetrija (nesistematska unutar individualna varijabilnost –

nesistematska razlika između leve i desne strane morfološke strukture) i greške merenja (u ovom slučaju greška fotografisanja – razlika između sukcesivnih fotografija za svaku jedinku) (Goodall, 1991; Klingenberg *i sar.*, 1998, 2002). Ukoliko je efekat fluktuirajuće asimetrije veći od efekta greške merenja (izražen preko F vrednosti u Prokrustovoj ANOVA-i), onda je efekat greške merenja marginalan. Efekat faktora kao što su alometrija (kovariranje veličine i oblika gde je veličina izražena kao logaritmovana centroidna veličina svake individue i ova varijabla je u modelima tretirana kao kovarijabla), pol (kategorička varijabla sa dve grupe: mužjak, ženka), genetički klaster [kategoričke varijable: *cytb* mtDNK (grupe: Zapad, Istok) i *12S* rRNK (grupe: Zapad, Istok, Peloponez)], kao i njihova interakcija analizirana je u seriji linearnih modela čija značajnost je takođe testirana metodom permutacije reziduala, a koja se pokazala superiornijom od standardne permutacione procedure (Collyer *i sar.*, 2015; Collyer & Adams, 2018). Linearni modeli su poređeni na dva načina. Naime, ako pretpostavimo da se dva linearna modela razlikuju jedino u jednom faktoru, recimo genetičkim klasterima, gde model A ima formu shape $\sim \log(\text{CS}) + \text{Sex} + \text{cytb}$, a model B ima formu shape $\sim \log(\text{CS}) + \text{Sex} + 12S$ moguće je uporediti ova dva modela pomoću koeficijenta determinacije (R^2) i direktnom statističkom evaluacijom. Model sa većim koeficijentom determinacije smatra se da bolje opisuje strukturiranost varijabilnosti karapaksa i plastrona. Takođe, dva modela se mogu uporediti direktno gde se statistički poredi razlika reziduala sume kvadrata (RSS – *residual sum of squares*) dva modela. Statistički značajna razlika poređenih RSS ukazuje da alternativni model (drugi u nizu poređenja) bolje opisuje ukupnu varijabilnost u odnosu na nulti (prvi model u nizu). S obzirom na to da se poređeni modeli jedino razlikuju u načinu grupisanja individua prema genetičkim klasterima, dok su ostali faktori identični, statistička evaluacija ovakvih modela ukazuje na to da li *cytb* mtDNK ili *12S* rRNK klasifikacija individua bolje opisuje morfološku varijabilnost ili ne. Linearni modeli koji su korišćeni u analizi strukture morfološke varijabilnosti karapaksa i plastrona su posebno pogodni za visoko dimenzione podatke jer: 1) nisu osetljivi na povećanje broja varijabli u odnosu na broj analiziranih individua kao tradicionalna MANOVA; 2) permutacije reziduala imaju veću statističku moć detekcije efekta u odnosu na tradicionalne permutacije kod kojih se naizmenično permutuju individualne vrednosti; 3) veličina efekta je izražena preko Z skorova koji su intuitivniji u kontekstu p vrednosti u odnosu na tradicionalnu F vrednost, a takođe predstavljaju parametar koji se može porediti između različitih studija jer su Z skorovi multivarijantna generalizacija standardne devijacije (Collyer *i sar.*, 2015). U modelima koji su testirali interakciju dva faktora (npr. Pol : 12S) testirana je konzistentnost jednog faktora u odnosu na drugi (npr. konzistentnost polnog dimorfizma u grupama definisanim genetičkim

klasterom) i ukoliko je interakcija značajna rezultati sugerišu da postoje za grupu specifične promene oblika, tj. da promene oblika nisu konzistentne za ceo uzorak (Collyer & Adams, 2007, 2013; Adams & Collyer, 2009). U slučaju detekcije značajne interakcije faktora u modelu, dodatno je urađena analiza fenotipskih trajektorija pomoću koje je utvrđeno da li se grupe razlikuju u intenzitetu promena (*magnitude of shape differences*) i/ili njihovom smeru (*direction of shape differences*) (Collyer & Adams, 2013), a fenotipske trajektorije su projektovane u dvodimenzionalni morfološki prostor definisan vektorima međugrupne analize glavnih komponenti (bg-PCA) (Collyer & Adams, 2018). Međugrupna PCA nema isti procenat opisane varijabilnosti kao tradicionalna PCA i ona je korišćena samo za grafički prikaz fenotipskih trajektorija (Collyer & Adams, 2018). Pošto je utvrđeno da je polni dimorfizam dominantan izvor fenotipske varijabilnosti, kao i da njegov obrazac nije konzistentan (npr. Pol : 12S interakcija je značajna) između grupa definisanim genetičkim klasterima (pogledati rezultate), u analizama koje su poredile razlike u obliku karapaksa i plastrona između grupa definisanih genetičkim klasterima polovi su odvojeno analizirani (intra-seksualna varijabilnost). Treba naglasiti da u slučaju odsustva značajne interakcije između dva faktora, moguće je korigovati podatke za željeni faktor (npr. polni dimorfizam) pomoću regresije ili redukcije linearnih modela (Collyer & Adams, 2018) što je korišćeno u analizama koje su pokazale odsustvo značajnosti interakcije analiziranih faktora. Linearni modeli su testirani pomoću paketa geomorph (Adams *i sar.*, 2019) i RRPP paketa (Collyer & Adams, 2018, 2019) u programskom jeziku R (R Development Core Team, 2019).

Osim u slučaju vizualizacije fenotipskih trajektorija, za grafičko predstavljanje strukture fenotipske varijabilnosti, tj. opisivanje trenda varijabilnosti i ordinaciju individua u morfološkom prostoru korišćena je analiza glavnih komponenti (PCA). To je multivarijantna tehnika koja transformiše set korelisanih u set nekorelisanih (ortogonalnih) varijabli (sopstveni vector matrice “eigenvektor”), koje opisuju određen procenat varijabilnosti u odnosu na ukupnu (eigen varijansa). Organizacija sopstvenih vektora je takva da prvi vektor uvek opisuje najveći procenat varijabilnosti, a svaki sledeći sukcesivno niži procenat varijabilnosti u odnosu na prethodni. U najvećem broju slučajeva nekoliko glavnih komponenti opisuje veliku proporciju ukupne varijabilnosti originalnih varijabli, jer su originalne morfometrijske varijable uglavnom visoko korelisane. Sumarno, PCA redukuje broj originalnih varijabli na set međusobno nekorelisanih novih vektora, odnosno novih varijabli koji u geometrijskoj morfometriji služe kao osnova za vizualizaciju trenda promena oblika morfoloških struktura (Klingenberg, 2013). Step (količina) morfoloških razlika između poređenih grupa izražen je pomoću Prokrustove i Mahalanobisove distance, a njihova

značajnost je testirana pomoću permutacija sa 1000 iteracija u R programskom jeziku. Dve distance, Prokrustova i Mahalanobisova, razlikuju se u načinu tretiranja glavnog smera morfoloških promena (prve glavne komponente, PC1 vektora) i mogu različito da kvantifikuju razliku između grupa (Klingenberg i Monteiro 2005; Francuski *i sar.* 2013). Prokrustova distanca meri razlike između grupa tako što ne uzima u obzir smer unutargrupne varijabilnosti (izotropan model, distribucija individua je sferična oko srednje vrednosti grupe), te ova distanca zavisi isključivo od razlika između srednjih vrednosti grupa (Klingenberg & Monteiro, 2005). Nasuprot Prokrustove distance, Mahalanobisova distanca meri razlike između grupa uzimajući u obzir i različitu unutargrupnu varijabilnost (anizotropan model, distribucija individua je elipsoidna oko srednje vrednosti grupe gde najduža osa elipse ujedno predstavlja i dominantni smer morfoloških promena za tu grupu) (Klingenberg & Monteiro, 2005). Grupe čija je unutargrupna varijabilnost u smeru varijabilnosti ukupnog uzorka, teže se razlikuju od grupa koje su ortogonalne u odnosu na glavni smer varijabilnosti ukupnog uzorka kada su poređene Mahalanobisovom distancom (Klingenberg & Monteiro, 2005). Takođe, Mahalanobisova distanca je osetljiva na veličinu uzorka.

Vizualizacija promene oblika predstavljana je metodom beskonačno tanke metalne ploče (*Thin plate splines* - TPS) koja numeričkom ekstrapolacijom predstavlja deformaciju/razlike između homolognih tačaka, tj. oblika morfoloških struktura (Klingenberg, 2013). Svaka promena oblika bazirana je na razlici dva oblika nezavisno od toga da li oblik predstavlja jedna (hipotetička) individua ili srednja vrednost grupe individua. Prilikom PCA, promene oblika su bazirane na razlici hipotetičkog oblika koji je u smeru PC vektora u odnosu na srednju vrednost celog uzorka (centar morfološkog prostora – kosenzus celokupnog uzorka). Nasuprot tome, promene oblika na interseksualnom i intraseksualnom nivou bazirane su na razlici srednjih oblika poređenih grupa (npr. mužjaci u odnosu na ženke). Vizualizacija promena oblika izvršena je pomoću programa MorphoJ (Klingenberg, 2011).

Na kraju, u tezi je analizirana fenotipska varijansa tri genetičkih klastera unutar svakog pola, a varijansa je izražena preko Prokrustove varijanse (Zelditch *i sar.*, 2012). Numerički, ova vrednost se dobija kada se saberu dijagonalni elementi kovarijacione matrice oblika (varijansa svake pojedinačne koordinate) ispitivane grupe i potom taj broj podeli sa $n-1$ gde n predstavlja broj individua grupe (Zelditch *i sar.*, 2012). Treba naglasiti da se fenotipska varijansa koristi kao mera kanalisnosti razvića kao i za procenu morfološkog dispariteta. Analitički, obe varijanse se računaju na isti način, a jedina razlika je u odnosu na koju srednju vrednost se računa varijansa. Kod kanalisnosti razvića, a što je korišćeno i u ovoj tezi, fenotipska varijansa izračunata je za svaku grupu posebno, te samim tim predstavlja unutar-

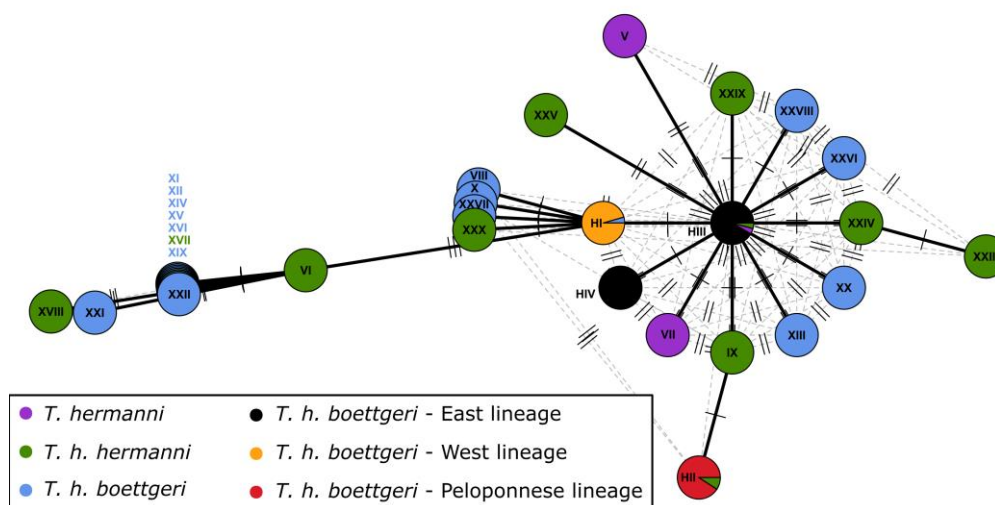
grupnu fenotipsku varijansu. Nasuprot toga, morfološki disparitet predstavlja međugrupnu varijansu gde se srednje vrednosti grupa porede u odnosu na konsenzus oblika celog uzorka. Morfološki disparitet nije poređen u ovoj tezi. Kanalisnost razvića za svaki genetički klaster, kao i statističke razlike u fenotipskoj varijansi (nakon 1000 permutacija) između divergentnih linija dobijene su pomoću geomorph R paketa korišćenjem funkcije “morphol.disparity” (Adams *i sar.*, 2019). Dodatno, nulta distribucija fenotipske varijanse za svaku grupu dobijena je pomoću metode ponovnog uzorkovanja jedinki sa ponavljanjem (*resampling with replacement; bootstrap*) u R programskom jeziku (funkcija “variance.boot” u Prilogu, skriptu pisao Marko Đurakić) prateći standardne procedure (Manly, 2007). Nulta distribucija fenotipske varijanse svake grupe posebno predstavljena je pomoću boksploata (*box plot*) koji je takođe konstruisan u R programskom jeziku uz pomoć osnovnog grafičkog paketa.

4. REZULTATI

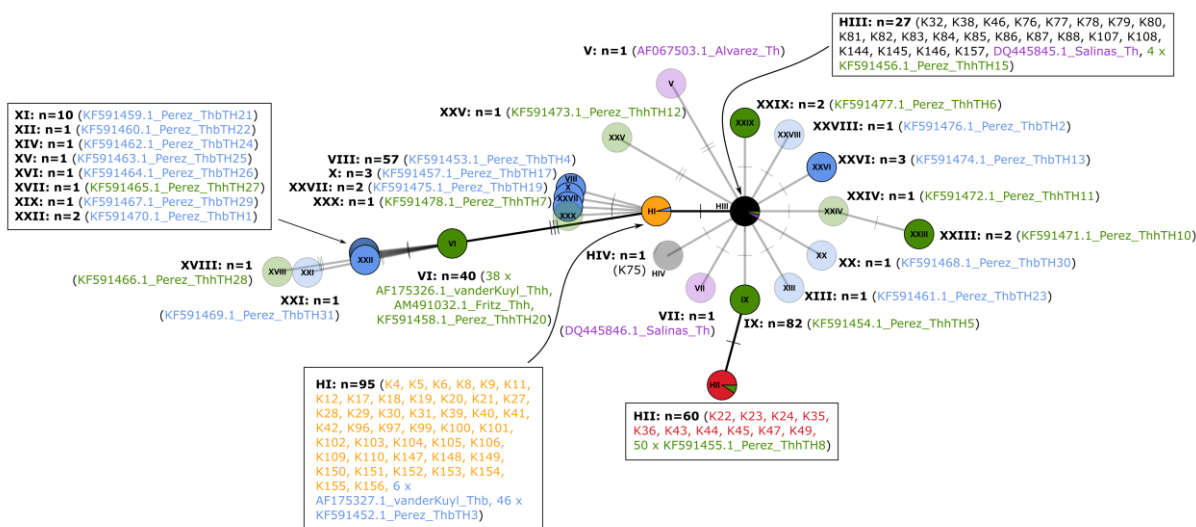
4.1. Genetička varijabilnost *Testudo hermanni boettgeri*

4.1.1. Genealogija *12S* rRNK vrste *Testudo hermanni*

Mreža haplotipova koja se zasniva na 266 bp 76 *de novo* sekvenci podvrste *T. h. boettgeri* (Tabela 1, Tabela P1) i 33 *12S* rRNK sekvenci preuzetih iz Banke gena (Álvarez *i sar.*, 2000; van der Kuyl *i sar.*, 2002; Fritz & Bininda-Emonds, 2007; Salinas *i sar.*, 2011; Perez *i sar.*, 2014; Carvalho *i sar.*, 2017) je ukazala na prisustvo 30 haplotipova (Slike 10, 11). Haplotipovi su označeni sa i bez prefiksa “H” uz latinsku numerologiju u zavisnosti od toga da li su u pitanju *de novo* sekvence (sa H) ili su u pitanju sekvence iz Banke gena (bez H). Od 30 haplotipova, 17 je prisutno kod pojedinačnih jedinki i svi, osim HIV (jedinka iz Pčinje, Srbija), su deo već publikovanih studija (Slika 11). Mreža haplotipova konstruisana na osnovu 109 *12S* rRNK sekvenci ne podržava poddelu vrste na nominalne podvrste *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri*, već implicira jaku genetičku povezanost između populacija vrste *T. hermanni*.



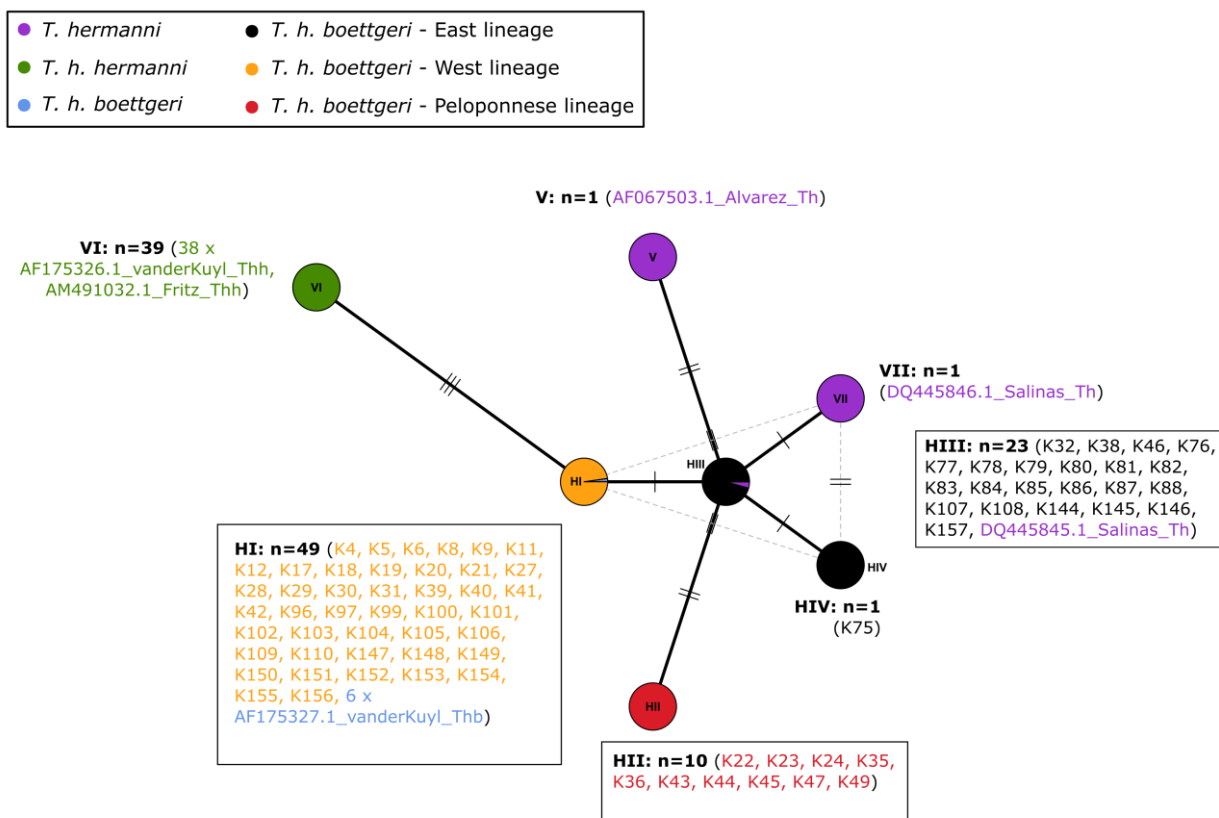
Slika 10. Mreža haplotipova za 109 *12S* rRNK sekvenci [76 iz naše studije i 33 iz Banke gena: 1 (Álvarez *i sar.*, 2000), 2 (van der Kuyl *i sar.*, 2002), 1 (Fritz & Bininda-Emonds, 2007), 2 (Salinas *i sar.*, 2011), 27 (Perez *i sar.*, 2014)] se sastoji od 30 haplotipova (HI-HIV, V-XXX). Haplotipovi sa prefiksom “H” se odnose na *de novo* haplotipove 76 sekvenci, koji obrazuju tri linije: *Testudo hermanni boettgeri* – Istok, *T. h. boettgeri* – Zapad, *T. h. boettgeri* – Peloponez. Haplotipovi bez prefiksa “H” se odnose na 33 sekvence preuzete iz Banke gena. Boja haplotipova se odnosi na *T. hermanni*, *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri*, u zavisnosti od njihovog porekla. Isprekidane linije su alternativni putevi veze u mreži haplotipova. Vertikalne linije ukazuju na broj substitucija između haplotipova. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.



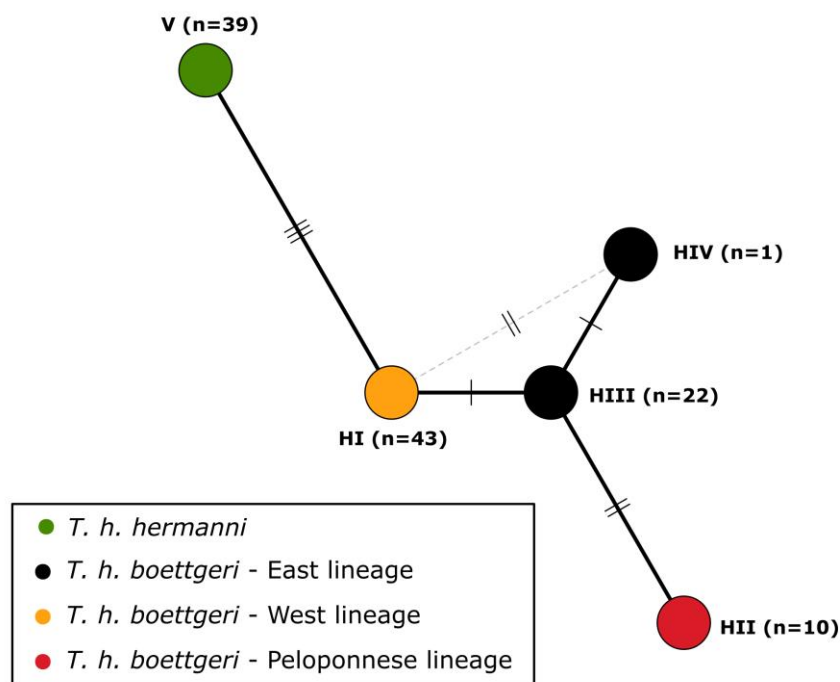
Slika 11. Mreža haplotipova za 109 *12S* rRNK sekvenci sa podacima o izvoru i poretku sekvenci, i broju sekvenci za svaki haplotip (“n”) koji je dobijen sabiranjem broja individua koje poseduju dati haplotip prema navedenom izvoru. Sekvence sa prefiskom “K” su iz ovog rada i drugih izvora iz Banke gena koje sadrže ID kod, izvor i haplotip/podvrstu imenovanu u navedenom izvoru. Transparentni haplotipovi su definisani na osnovu jedne sekvence, a boje haplotipova odgovaraju bojama sa Slike 10.

Vizuelnom proverom sekvenci publikovanih u radu Perez *i sar.* (2014) utvrđeno je da su najvarijabilnije i sa supstitucijama koje su nekonzistentne sa obrascem publikovanim u drugim radovima. Zbog toga je urađena dodatna analiza koja je isključila 27 sekvenci, od toga 23 haplotipa registrovanu pojedinačnim jedinkama (Perez *i sar.*, 2014). U ovoj drugoj analizi je dobijena jasna podela na podvrste *T. hermanni* (Slika 12). Na primer, 82 *12S* rRNK sekvence su bile identične i klasifikovane kao VI za podvrstu *T. h. hermanni* i šest haplotipova (HI-HIV, V, VII) za *T. h. boettgeri* (Slika 12). U kontekstu geografske distribucije registrovanih haplotipova, utvrđena su tri genetička klastera ili linije unutar podvrste *T. h. boettgeri*: HI, imenovan kao “*T. h. boettgeri* Zapad”, je uključio populacije poreklom sa istočne obale Jadranskog i Jonskog mora, duž obale Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne Gore i Albanije, kao i iz Epira i severnog dela Makedonije (ID K106) u Grčkoj. Haplotip II, imenovan “*T. h. boettgeri* Peloponez”, uključuje individue poreklom sa Peloponeza u Grčkoj. Haplotipovi III, HIV (pojedinačne jedinke iz Pčinje u Srbiji), V (AF067503.1; (Álvarez *i sar.*, 2000)) i VII (DQ445846.1; (Salinas *i sar.*, 2011)), imenovani kao “*T. h. boettgeri* Istok”, sadrže jedinke iz kontinentalnog dela Balkana [južna Rumunija, Srbija, Republika Severna Makedonija i Grčke sem dela Epira, severnog dela Makedonije i Peloponeza (centralna, istočna, jugo-istočna Grčka, region oko jezera Limni Trichonida u Epiru)]. Važno je napomenuti da haplotipovi V i VII, kao i jedna jedinka DQ445845.1 (Salinas *i sar.*, 2011) nemaju geografsku odrednicu

jedinki *T. hermanni* korišćenih u analizama, tako da je naša analiza date sekvence uključila unutar podvrste *T. h. boettgeri* (Slika 12), sugerišući da je Balkan region njihovog porekla. Na kraju, mreža haplotipova konstruisana na osnovu *de novo* 76 sekvenci jedinki uzorkovanih sa 32 lokaliteta i dve *T. hermanni hermanni* sekvence (AF175326.1, (van der Kuyl *i sar.*, 2002); AM491032.1, (Fritz & Bininda-Emonds, 2007)) je predstavljena na Slici 13.

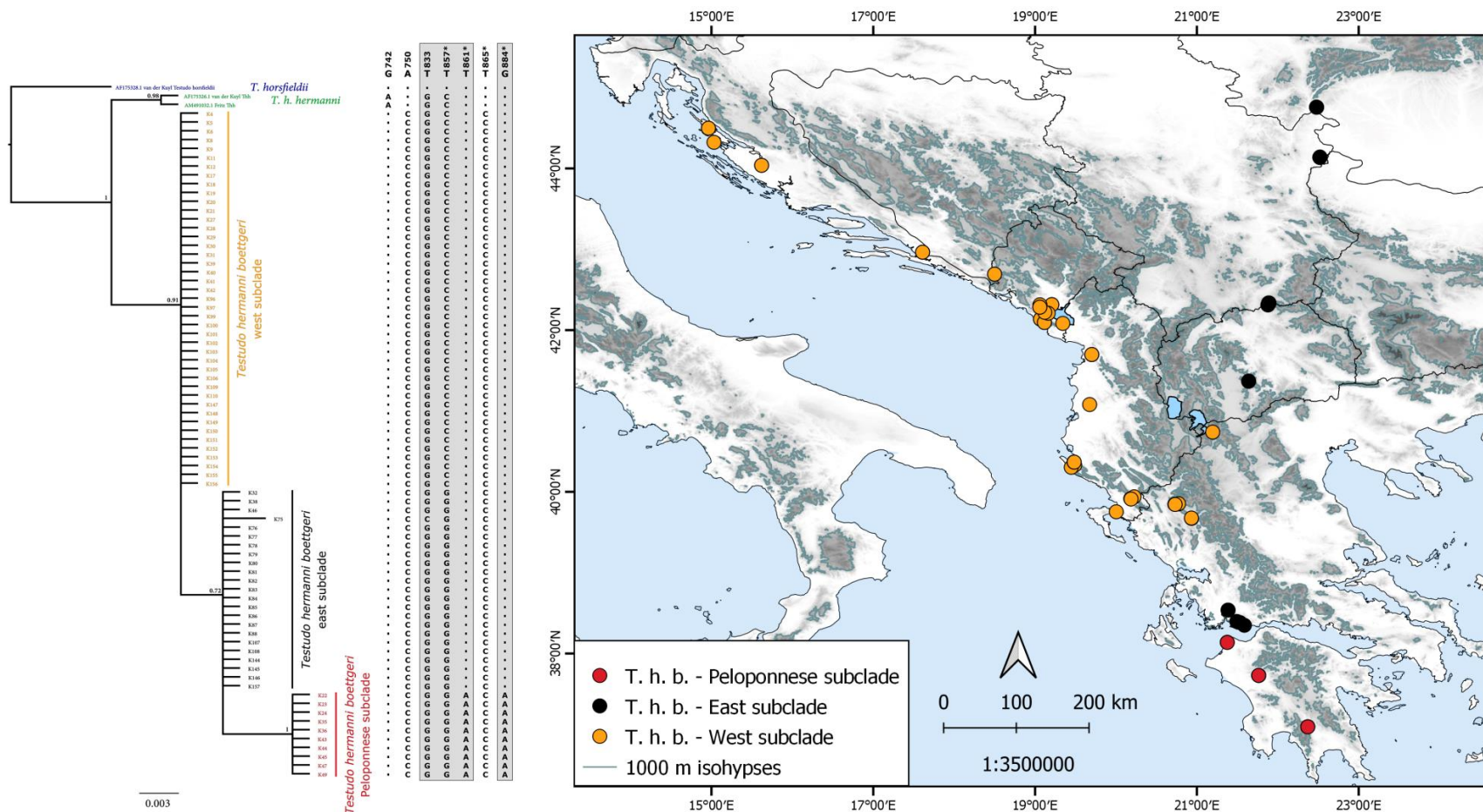


Slika 12. Mreža haplotipova za 82 sekvence *12S* rRNA [76 iz naše studije i šest iz Banke gena: 1 (Álvarez *i sar.*, 2000), 2 (van der Kuyl *i sar.*, 2002), 1 (Fritz & Bininda-Emonds, 2007), 2 (Salinas *i sar.*, 2011)] grupisanih u šest haplotipova (HI-HIV, V-VI). Haplotipovi sa prefiksom “H” se odnose na *de novo* haplotipove 76 sekvenci, koji obrazuju tri linije: *Testudo hermanni boettgeri* – Istok, *T. h. boettgeri* – Zapad, *T. h. boettgeri* – Peloponez. Haplotipovi bez prefiksa “H” se odnose na šest sekvenci preuzetih iz Banke gena. Broju sekvenci za svaki haplotip (“n”) dobijen je sabiranjem individua koje poseduju dati haplotip prema navedenom izvoru. Isprekidane linije su alternativni putevi veze u mreži haplotipova. Vertikalne linije ukazuju na broj substitucija između haplotipova. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese-Peloponez.



Slika 13. Mreža haplotipova za 78 *12S* rRNA sekvenci [76 iz naše studije i 2 iz van der Kuyl *i sar.* (2002) i Fritz i Bininda-Emonds (2007)] grupisanih u četiri haplotipa (HI-HIV i V). Haplotipovi sa prefiksom “H” se odnose na *de novo* haplotipove 76 sekvenci, koji obrazuju tri linije: *Testudo hermanni boettgeri* – Istok, *T. h. boettgeri* – Zapad, *T. h. boettgeri* – Peloponez. Haplotipovi bez prefiksa “H” se odnose na dve sekvence preuzete iz Banke gena. Broju sekvenci za svaki haplotip (“n”) dobijen je sabiranjem individua koje poseduju dati haplotip prema navedenom izvoru. Boja haplotipova se odnosi na *T. hermanni*, *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri*, u zavisnosti od njihovog porekla. Isprekidane linije su alternativni putevi veze u mreži haplotipova. Vertikalne linije ukazuju na broj substitucija između haplotipova. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.

U radu je korišćena sekvenca vrste *T. horsfieldii* AF175328.1 (van der Kuyl *i sar.*, 2002) kao autvrsta i *T. horsfieldii* DQ080045 (Parham *i sar.*, 2006) kao referentni genom za utvrđivanje tačne pozicije dijagnostičkih nukleotidnih pozicija. U našim poravnatim sekvencama, *T. h. hermanni* se razlikuje od *T. h. boettgeri* u tri konzistentne pozicije: 742, 750 i 865* u odnosu na *T. horsfieldii* DQ080045 (Parham *i sar.*, 2006) sekvencu (Slika 14). Definisane su tri genetičke linije unutar *T. h. boettgeri* koje se razlikuju u četiri dijagnostičke substitucije na pozicijama 833, 857*, 861* i 884*, a koje su definisane u odnosu na kompletan mitohondrijski genom vrste *Testudo horsfieldii* (DQ080045) (van der Kuyl *i sar.*, 2002) (Slika 14). Tri haplotipa se razlikuju u jednoj (Zapad vs. Istok), dve (Istok vs. Peloponez) i tri (Zapad vs. Peloponez) baze. Haplotip HIV, pozicioniran unutar linije Istok je registrovan samo kod jedne jedinice iz Pčinje (Srbija). HIV se razlikuje od Istok, Zapada i Peloponez linija u 1, 2 i 3 substitucije, respektivno (Slika 14).



Slika 14. Mapa lokaliteta *de novo* analiziranih jedinki *Testudo hermanni boettgeri*. Filogenetska srodnost *T. h. boettgeri* linija na osnovu *12S* rRNK varijabilnosti analizirana Bajesovom metodom. Dijagnostičke substitucije na desnoj strani kladograma za tri *T. h. boettgeri* linije su zasene, sa brojevima iznad nukleotidnih pozicija u odnosu na referentnu sekvencu mitohondrijskog genoma vrste *Testudo horsfieldii* DQ080045 (Parham *i sar.*, 2006). Filogeografska struktura utvrđenih linija je predstavljena na mapi. Tirkiznom bojm su označene izohipse na svakih 1000 m nadmorske visine. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.

Matrica nekorigovanih p -distanci između *T. horsfieldii*, *T. h. hermanni*, *T. h. boettgeri* Zapad, *T. h. boettgeri* Istok, i *T. h. boettgeri* Peloponez i njihova standardna greška (S.E.) su izračunati na osnovu 12S rRNK haplotipova (Tabela 3). Najveća vrednost nekorigovane p -distance je izračunata za par *T. horsfieldii* i *T. h. boettgeri* Peloponez (3,8%, S.E. = 0,012), a najmanja nekorigovana p -distanca je dobijena za par *T. h. boettgeri* Zapad i *T. h. boettgeri* Istok (0,4%, S.E. = 0,004). Unutar *T. hermanni* taksona, najveća p -distanca je dobijena za par *T. h. boettgeri* Peloponez i *T. h. hermanni* (2,3%, S.E. = 0,009). Nekorigovana p -distanca između *T. h. hermanni* i tri druge *T. h. boettgeri* linije postepeno opada smanjenjem geografske distance (Zapad-Istok-Peloponez). Upotrebom tradicionalne vrednosti od $\approx 2\%$ divergencije sekvenci u milion godina, razdvajanje između *T. horsfieldii* i *T. hermanni* se desilo između 1,9-1,5 Mya, dok je prema osmostruko sporijem modelu molekularnog sata (Avisé *i sar.*, 1992) vreme divergencije datirano na period 15,2-12,0 Mya (Tabela 4).

Tabela 3. Nekorigovana p -distanca između *T. horsfieldii*, *T. h. hermanni*, *T. h. boettgeri* Zapad, *T. h. boettgeri* Istok i *T. h. boettgeri* Peloponez izračunata na osnovu varijabilnosti 12S rRNA. Nekorigovana p -distanca (u %) je ispod dijagonale, a standardna greška izračunata na osnovu butstrap sa 1000 simulacija je iznad dijagonale.

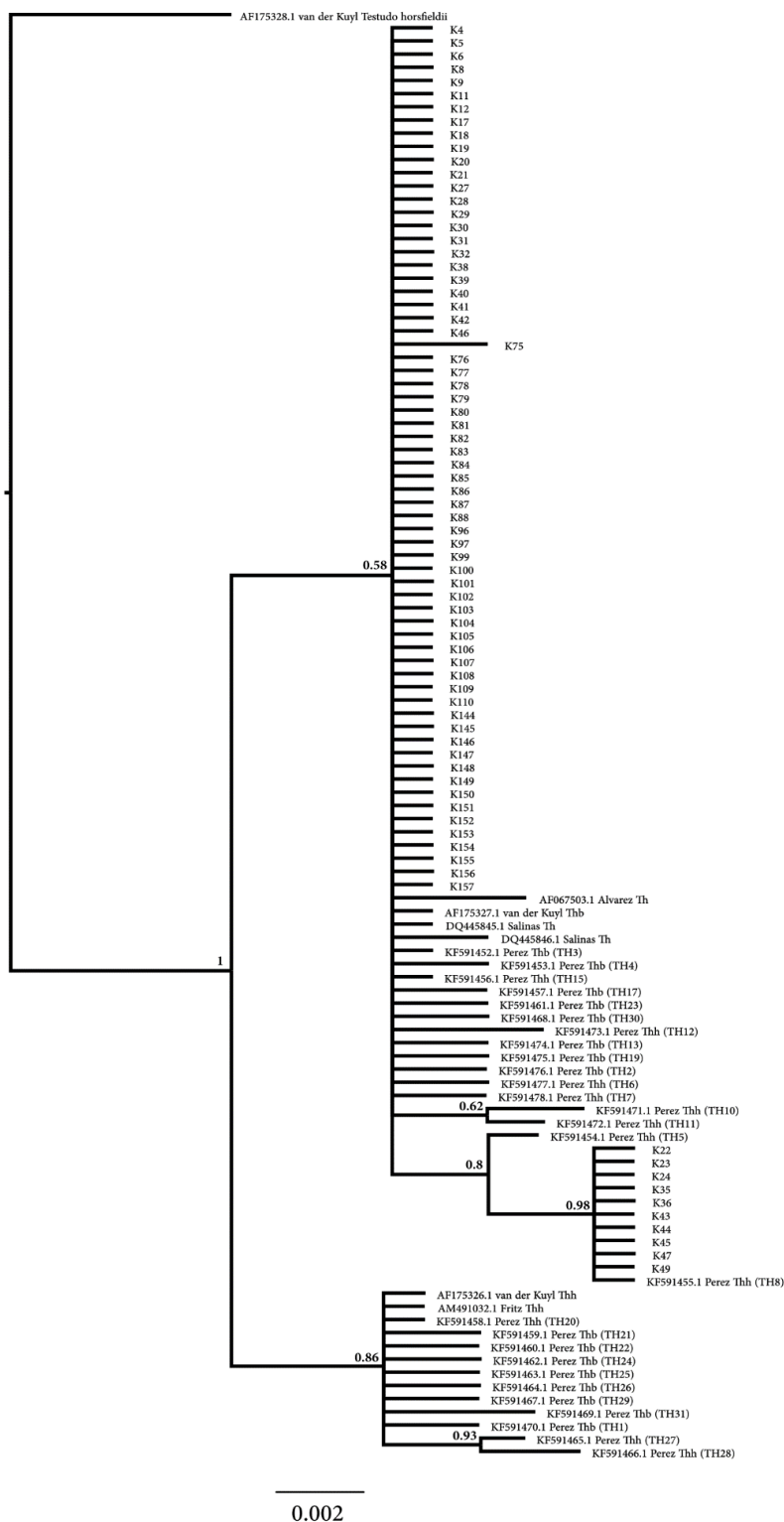
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
(1) <i>T. horsfieldii</i>		0,011	0,012	0,010	0,010
(2) <i>T. h. boettgeri</i> Zapad	3,4		0,006	0,004	0,006
(3) <i>T. h. boettgeri</i> Peloponeze	3,8	1,1		0,005	0,009
(4) <i>T. h. boettgeri</i> Istok	3,0	0,4	0,8		0,007
(5) <i>Testudo hermanni hermanni</i>	3,0	1,1	2,3	1,5	

Tabela 4. Vreme divergencije haplotipova predstavljene u milionima godina (Mya), izračunate na osnovu kalibracije 12S rRNA mtDNK molekularnog sata po tradicionalnoj promeni od $\approx 2\%$ po Mya (iznad dijagonale) i osmostruko sporijoj stopi od $\approx 0,25\%$ po Mya (ispod dijagonale) (Avisé *i sar.*, 1992).

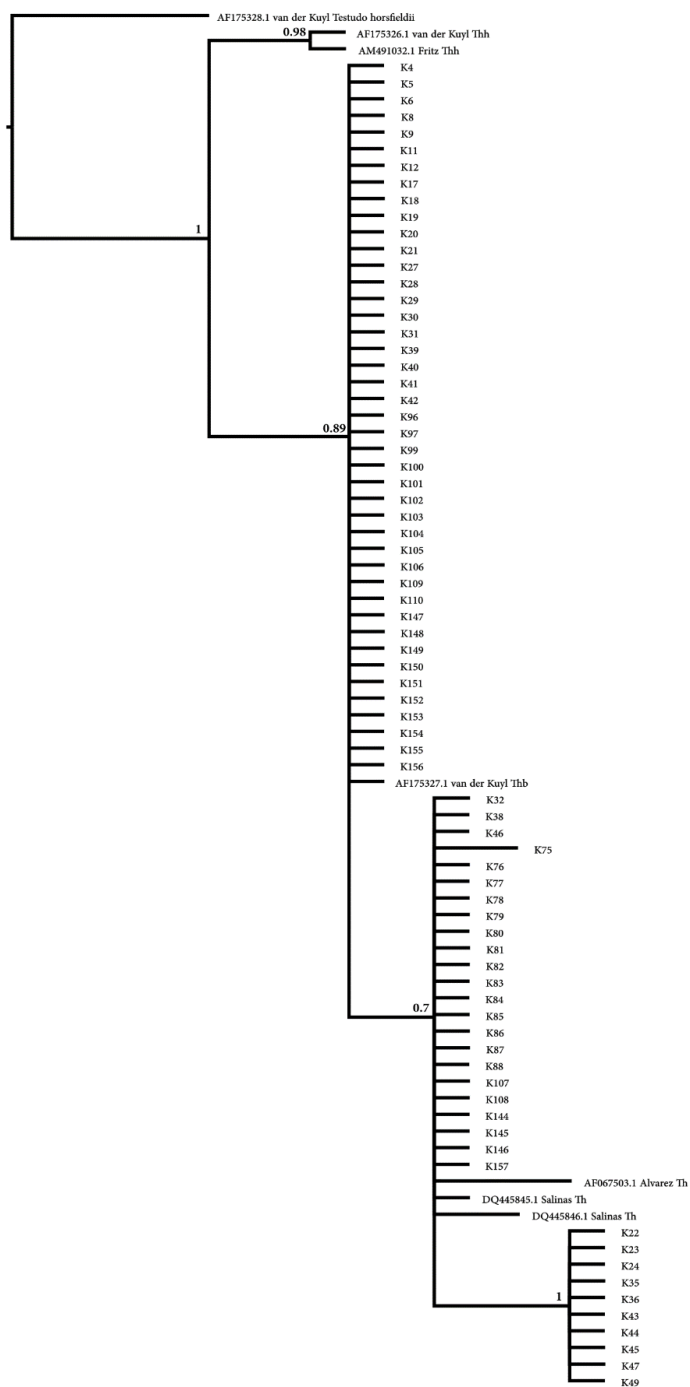
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
(1) <i>T. horsfieldii</i>		1,7	1,9	1,5	1,5
(2) <i>T. h. boettgeri</i> Zapad	13,6		0,6	0,2	0,6
(3) <i>T. h. boettgeri</i> Peloponeze	15,2	4,4		0,4	1,1
(4) <i>T. h. boettgeri</i> Istok	12,0	1,6	3,2		0,8
(5) <i>Testudo hermanni hermanni</i>	12,0	4,4	9,2	6,0	

Uzimajući u obzir mrežu haplotipova, rekonstrukcija 12S rRNK drveta gena upotrebom softverskog paketa MrBayes je urađena na tri nivoa/seta podataka (109, 82 i 78 sekvenci) upotrebom *T. horsfieldii* (AF175328.1) kao autvrste. Konsezus drvo konstruisano na osnovu 109 sekvenci [76 originalnih iz ovog rada + 1 (Álvarez *i sar.*, 2000) + 2 (van der

Kuyl *i sar.*, 2002) + 1 (Fritz & Bininda-Emonds, 2007) + 2 (Salinas *i sar.*, 2011) + 27 (Perez *i sar.*, 2014) + *T. horsfieldii* AF175328.1 korišćena kao autgrupa (van der Kuyl *i sar.*, 2002)] ukazuje na plitku filogeografsku strukturu vrste *T. hermanni* (Slika 15) i ova analiza nije podržala poznatu podelu između *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri* podvrsta. Sa druge strane, konsenzus drvo konstrisano na osnovu redukovano broj sekvenci (bez sekvenci publikovanih u radu Perez *i sar.* (2014) jasno ukazuje na podelu dve poznate *T. hermanni* podvrste (78 sekvenci: Slika 14; 82 sekvenci: Slika 16). Slično ovome, obrazac strukturiranosti dobijen filogenetskom analizom u potpunosti podržava podelu unutar podvrste *T. h boettgeri* (npr. između *T. h boettgeri* linija) dobijenu na osnovu analize mreže haplotipova (Slike 12, 13). Međutim, podela između linija, osim u slučaju *T. h. boettgeri* Peloponez populacija, nije statistički podržana pošto je posteriorna verovatnoća bila manja od 0,95 (Slike 14, 16). Zbog toga, sa statističke perspektive, linije definisane na osnovu mreže haplotipova nisu podržane u analizi filogenetske rekonstrukcije upotrebom paketa MrBayes, pošto su formirane parafiletske, a ne monofiletske grupe.



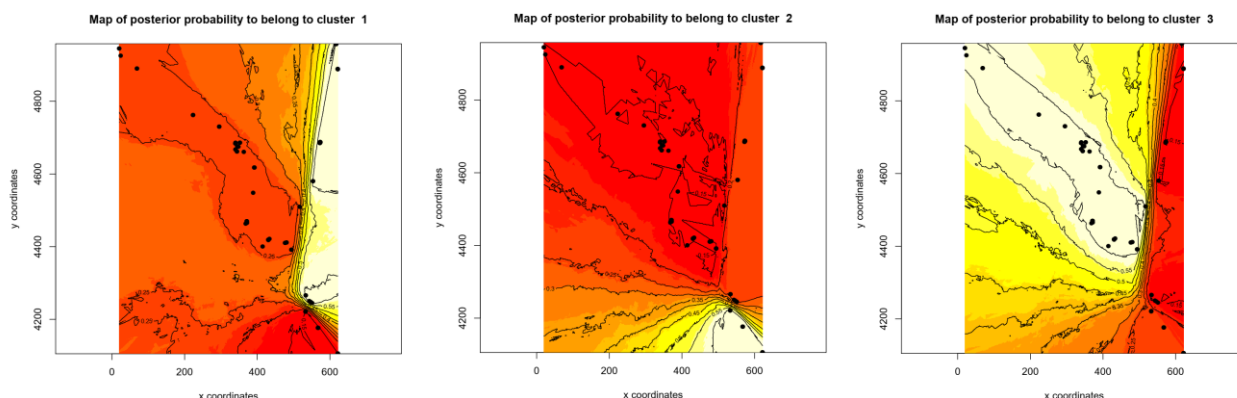
Slika 15. Filogenetsko drvo *Testudo hermanni* na osnovu 109 sekvenci 12S RNK dobijeno Bajesovom metodom u paketu MrBayes. Sekvence iz Banke gena sa ID kodovima su navedene. Filogenetsko stablo ne podržava podelu na dve podvrste *Testudo hermanni hermanni* i *Testudo hermanni boettgeri*.



0.002

Slika 16. Filogenetsko drvo *Testudo hermanni* na osnovu 82 12S RNK sekvence dobijeno Bajesovom metodom u paketu MrBayes. Sekvence iz Banke gena sa ID kodovima su navedene. Filogenetsko stablo sadrži iste sekvence korišćene u prethodnoj analizi od 109 sekvenci, ali bez sekvenci iz rada Perez *i sar.* (2014). Filogenetsko stablo podržava podjelu na podvrste *Testudo hermanni hermanni* i *Testudo hermanni boettgeri*.

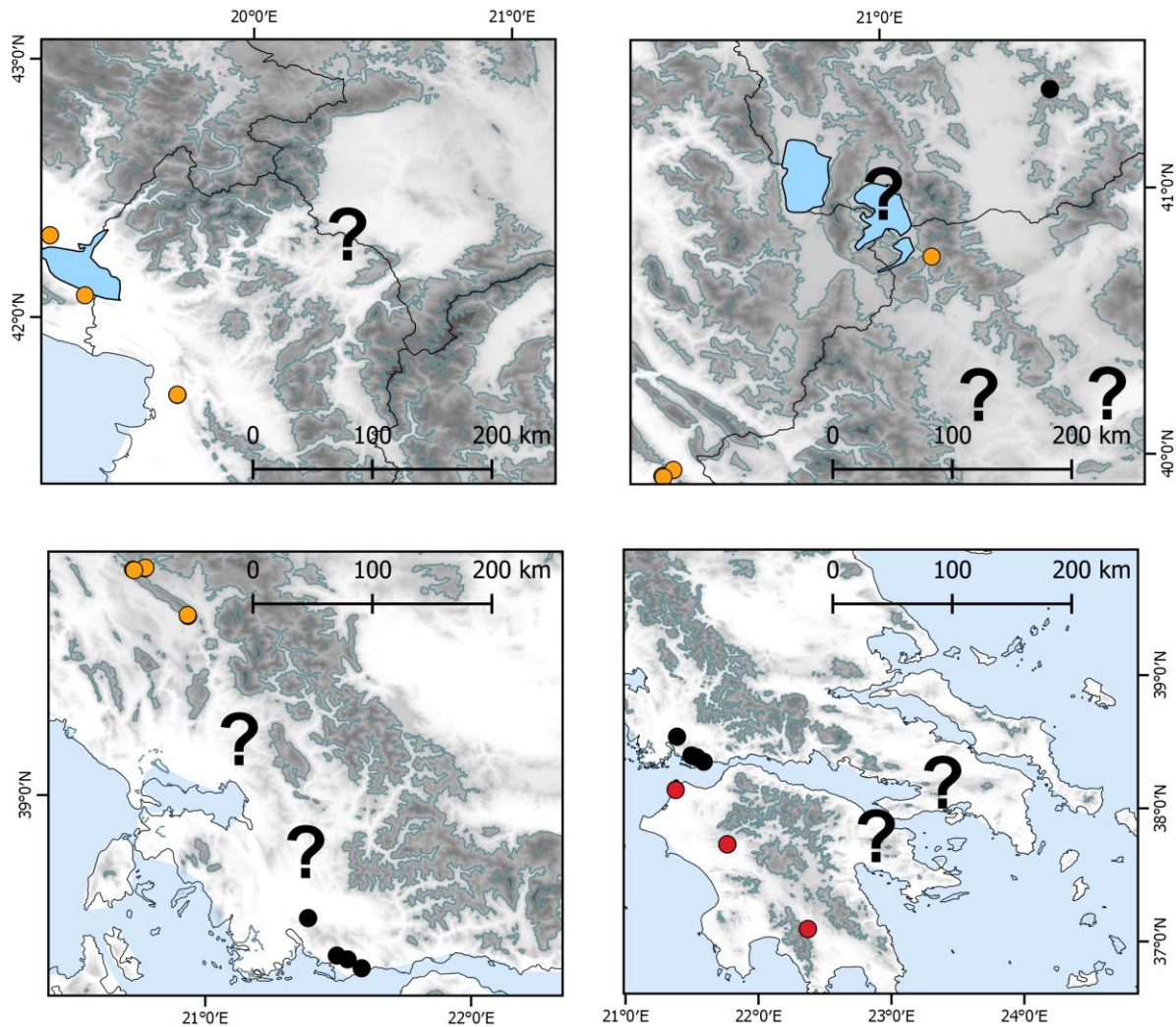
Analizom prostorne distribucije varijabilnosti pomoću paketa Geneland dobijena su tri genetička klastera kao najverovatniji broj unutar podvrste *T. h. boettgeri* uz pomoć 10 nezavisnih simulacija (Slike P1, P2). Tri definisana klastera odgovaraju *T. h. boettgeri* linijama dobijenim analizama programom MrBayes (posteriorna verovatnoća je predstavljena na Slici P2). U svim simulacijama, 12 individua *T. h. boettgeri* Zapad su pogrešno klasifikovane kao *T. h. boettgeri* Istok (28% pogrešne klasifikacije) što čini 16% od celokupnog uzorka korišćenog u analizi Geneland. Slika 17 prikazuje populacionu pripadnost klasterima na osnovu posteriorne verovatnoće.



Slika 17. Mapa posteriorne verovatnoće pripadnosti jedinki *Testudo hermanni boettgeri* genetičkim klasterima na osnovu sekvenci *12S* rRNK dobijena programom Geneland. Klaster 1 (cluster 1) odgovara haplotipu HIII, klaster 2 (cluster 2) obuhvata individue haplotipa HII, a klaster 3 (cluster 3) sadrži individue sa haplotipom HI prema Slici 13. Jedinka sa haplotipom HIV koja je identifikovana na lokalitetu Pčinja, Srbija, grupisana je u klaster 1. Bela boja označava visoku posteriornu verovatnoću (100%), a crvena nisku (0%).

Hipotetičke hibridne zone između *T. h. boettgeri* linija na Balkanu su takođe razmatrane (Slika 18). *Testudo h. boettgeri* Zapad i *T. h. boettgeri* Istok verovatno hibriduju u regionima: 1) nizija između severoistočnog dela Albanije i jugozapadnog dela Kosova i Metohije. Nizija je severnim delom planine Prokletije i južnim delom Šar planine izolovana. Najmanja nadmorska visina čini korito reke Beli Drim (Slika 18, gore levo); 2) nizija ograničena jugozapadnim delom jezera Ohrid i Prespanskog jezera (granica između Albanije, Republike Severna Makedonija i Grčke) prema gradu Kastoria u zapadnom regionu Makedonija u Grčkoj. Upravo sekvenca K106 jedinke koja pripada *T. h. boettgeri* Zapad iz datog regiona ukazuje na najistočniji deo linije Zapad koja prodire u kontinentalni deo Balkana (Slika 18, gore desno); 3) region u okolini Ambracian zaliva koji je granica između Epira i centralnog regiona Grčke. U južnom delu centralne Grčke su identifikovane jedinke *T. h. boettgeri* Istok na istočnim padinama planine Pindos koja je ujedno i najistočniji lokalitet

ove linije. Ovi rezultati ukazuju da je Pindos planina u Grčkoj, koja je južni ogranak Dinarida, nije barijera za protok gena između Zapad i Istok linija *T. h. boettgeri* (Slika 18, dole levo). Moguća hibridna zona između *T. h. boettgeri* Istok i Peloponez linija se nalazi sa obe strane Korintskog kanala, koji odvaja kontinentalni deo Grčke i Peloponez (Slika 18, dole desno).



Slika 18. Pretpostavljena (“?”) područja hibridnih zona *Testudo hermanni boettgeri* linija. Tirkiznom bojom su označene izohipse na svakih 1000 m nadmorske visine.

4.1.2. Genealogija *cytb* mtDNK *Testudo hermanni boettgeri*

U radu su analizom *cytb* mtDNK 66 jedinki (*de novo* sekvence) *T. h. boettgeri* sa Balkanskog poluostrva utvrđena dva haplotipa od kojih je HI prisutan u populacijama duž jadranske obale (Hrvatska, Crna Gora, Albanija, severni deo Grčke), dok je HII registrovan u populacijama sa/iz Peloponeza (Grčka), jugozapadnog dela Grčke (Evinochori), Republike Severna Makedonija, Srbije i Rumunije (Tabela 1). Znači, u okviru *T. h. boettgeri* zabeležene su dve divergentne genetičke linije Zapad (HI) i Istok + Peloponez (HII).

Matriks nekorigovanih *p*-distanci između *T. horsfieldii*, *T. h. hermanni*, *T. h. boettgeri* Zapad, *T. h. boettgeri* Istok + Peloponez i njihova standardna greška (S.E.) su izračunati na osnovu *cytb* mtDNK haplotipova (Tabela 5). Najveća vrednost nekorigovanih *p*-distance je izračunata za par *T. horsfieldii* i *T. h. hermanni* (12,2%, S.E. = 0,016), a najmanja nekorigovanih *p*-distanca je dobijena za par *T. h. boettgeri* Zapad i *T. h. boettgeri* Istok + Peloponez (0,7%, S.E. = 0,003). Unutar *T. hermanni* taksona, najveća *p*-distanca je dobijena za par *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri* Istok + Peloponez (2,5% S.E. = 0,007). Upotrebom tradicionalne vrednosti od $\approx 2\%$ divergencije sekvenci u milion godina, razdvajanje između *T. h. boettgeri* Zapad i *T. h. boettgeri* Istok + Peloponez se desilo pre oko 0,35 Mya, dok je prema osmostruko sporijem modelu molekularnog sata (Avice *i sar.*, 1992) vreme divergencije datirano na period od pre oko 2,8 Mya (Tabela 6).

Tabela 5. Nekorigovana *p*-distanca između *T. horsfieldii*, *T. h. hermanni*, *T. h. boettgeri* Zapad, *T. h. boettgeri* Istok + Peloponez izračunata na osnovu varijabilnosti *cytb* mtDNK. Nekorigovana *p*-distanca (u %) je ispod dijagonale, a standardna greška izračunata na osnovu butstrap sa 1000 simulacija je iznad dijagonale.

	(1)	(2)	(3)	(4)
(1) <i>T. horsfieldii</i>		0,015	0,015	0,016
(2) <i>T. h. boettgeri</i> Zapad	11,8		0,003	0,007
(3) <i>T. h. boettgeri</i> Istok + Peloponez	11,1	0,7		0,007
(4) <i>Testudo hermanni hermanni</i>	12,2	2,2	2,5	

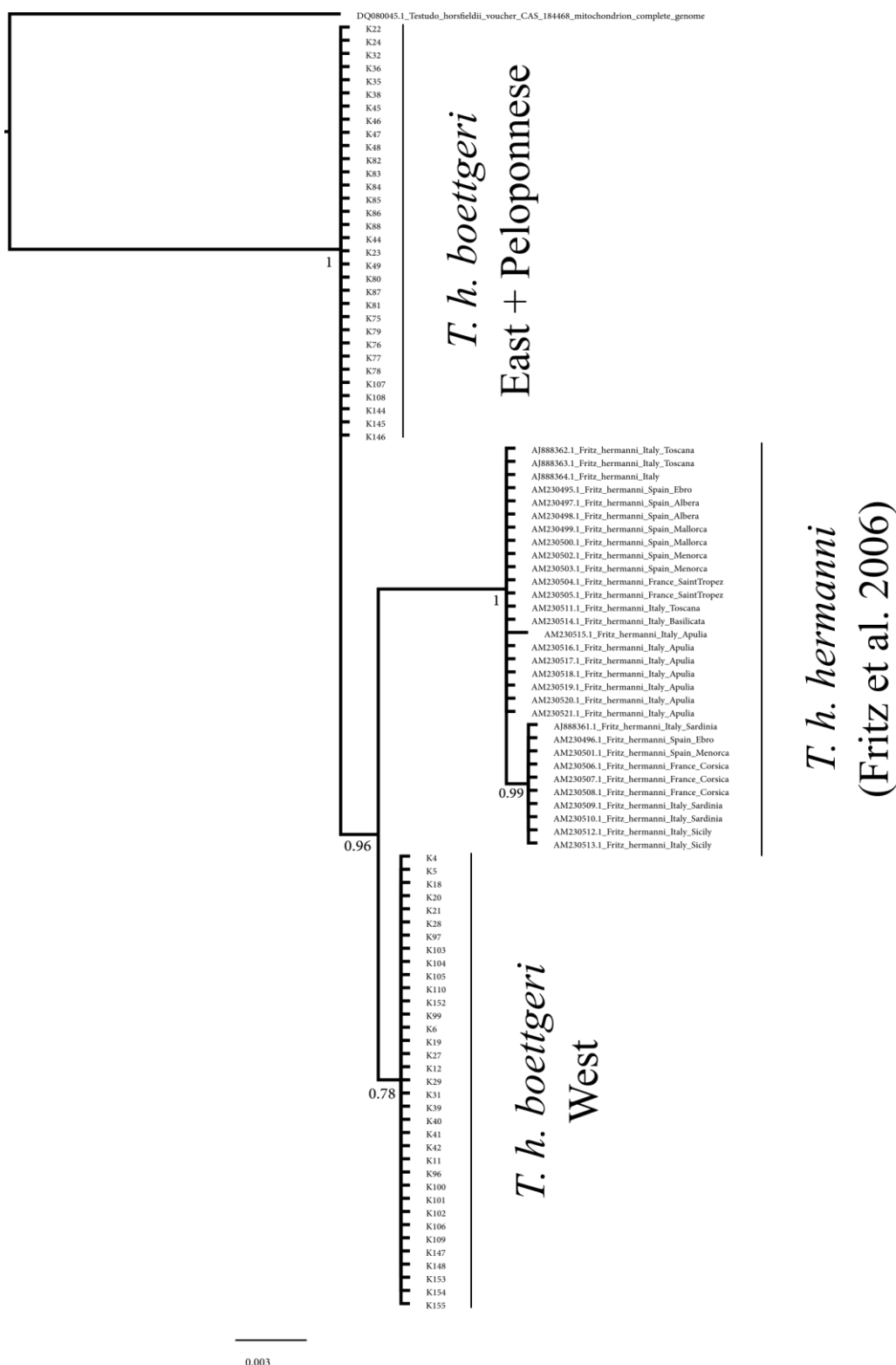
Rekonstrukcija *cytb* mtDNK drveta gena upotrebom softverskog paketa MrBayes je urađena na osnovu 66 *de novo* sekvenci *T. h. boettgeri* i 31 sekvence *T. h. hermanni* (Fritz *i sar.*, 2006) i *T. horsfieldii* DQ080045 (Parham *i sar.*, 2006) kao autvrste (Slika 19). Filogenetsko drvo bazirano na *cytb* mtDNK haplotipovima ukazuje na podelu vrste *T. hermanni* na tri monofiletske klade, kladu nominalne zapadne podvrste *T. h. hermanni* i dve

klade u okviru istočne podvrste *T. h. boettgeri*. Genetička linija Zapad podvrste *T. h. boettgeri* je filogenetski srodna podvrsti *T. h. hermanni*, nasuprot genetičkoj liniji Istok + Peloponez *T. h. boettgeri* (Slika 19).

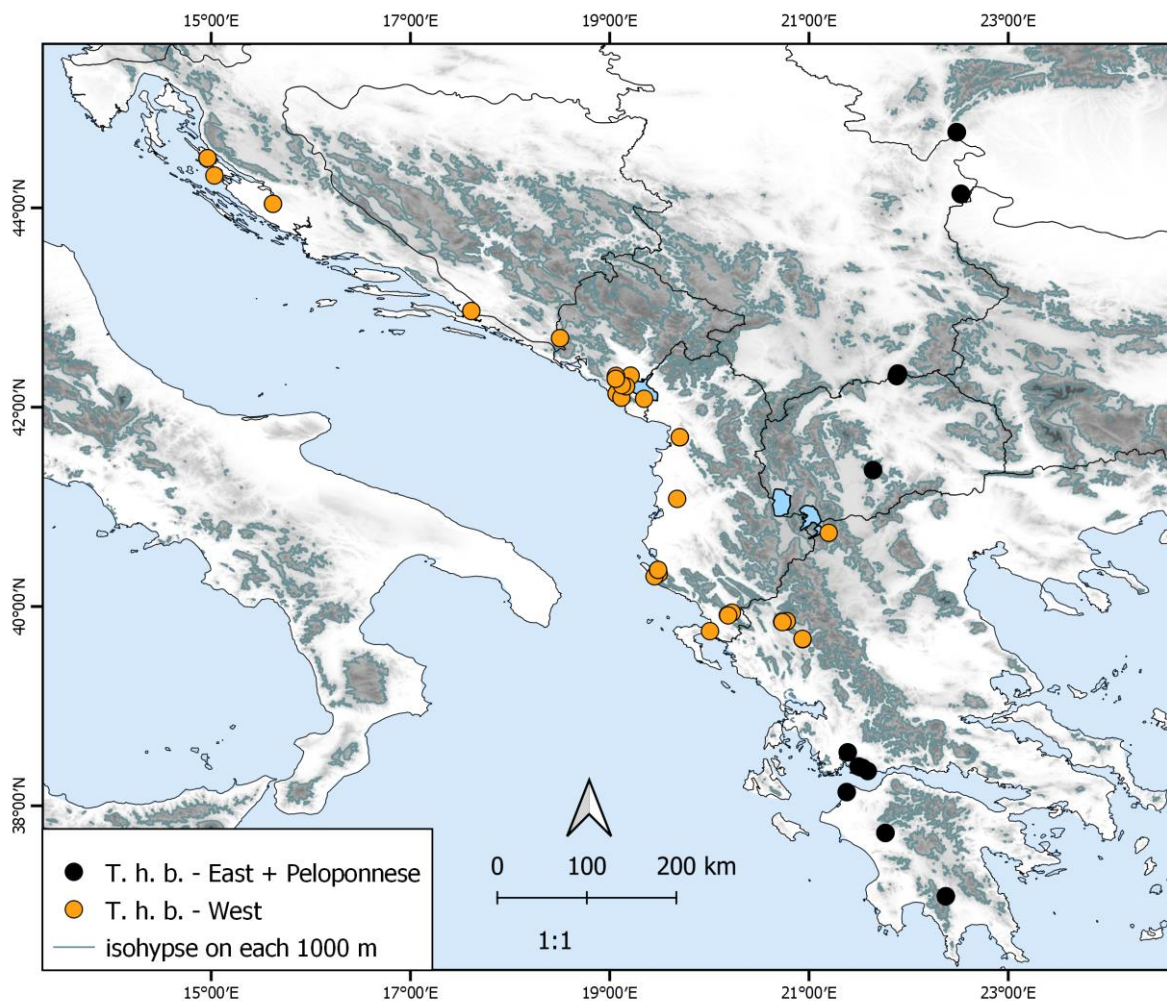
Tabela 6. Vreme divergencije haplotipova predstavljene u milionima godina (Mya), izračunate na osnovu kalibracije *cytb* mtDNK molekularnog sata po tradicionalnoj promeni od $\approx 2\%$ po Mya (iznad dijagonale) i osmostruko sporijoj stopi od $\approx 0,25\%$ po Mya (ispod dijagonale) (Avice *i sar.*, 1992)

	(1)	(2)	(3)	(4)
(1) <i>T. horsfieldii</i>		5,90	5,55	6,10
(2) <i>T. h. boettgeri</i> Zapad	47,20		0,35	1,10
(3) <i>T. h. boettgeri</i> Istok + Peloponez	44,40	2,80		1,25
(4) <i>Testudo hermanni hermanni</i>	48,80	8,80	10,00	

Analizom prostorne distribucije varijabilnosti pomoću paketa Geneland dobijena su dva genetička klastera kao najverovatniji broj unutar podvrste *T. h. boettgeri* (Slika 20). Dva definisana klastera odgovaraju *T. h. boettgeri* linijama dobijenim analizama MrBayes (posteriorna verovatnoća je predstavljena na Slici 20).



Slika 19. Filogenetsko drvo *Testudo hermanni* na osnovu 66 *de novo cytb* mtDNK sekvenci konstruisano Bajesovom metodom u paketu MrBayes. Sekvence iz Banke gena sa ID kodovima su navedene (Fritz *i sar.*, 2006). West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.

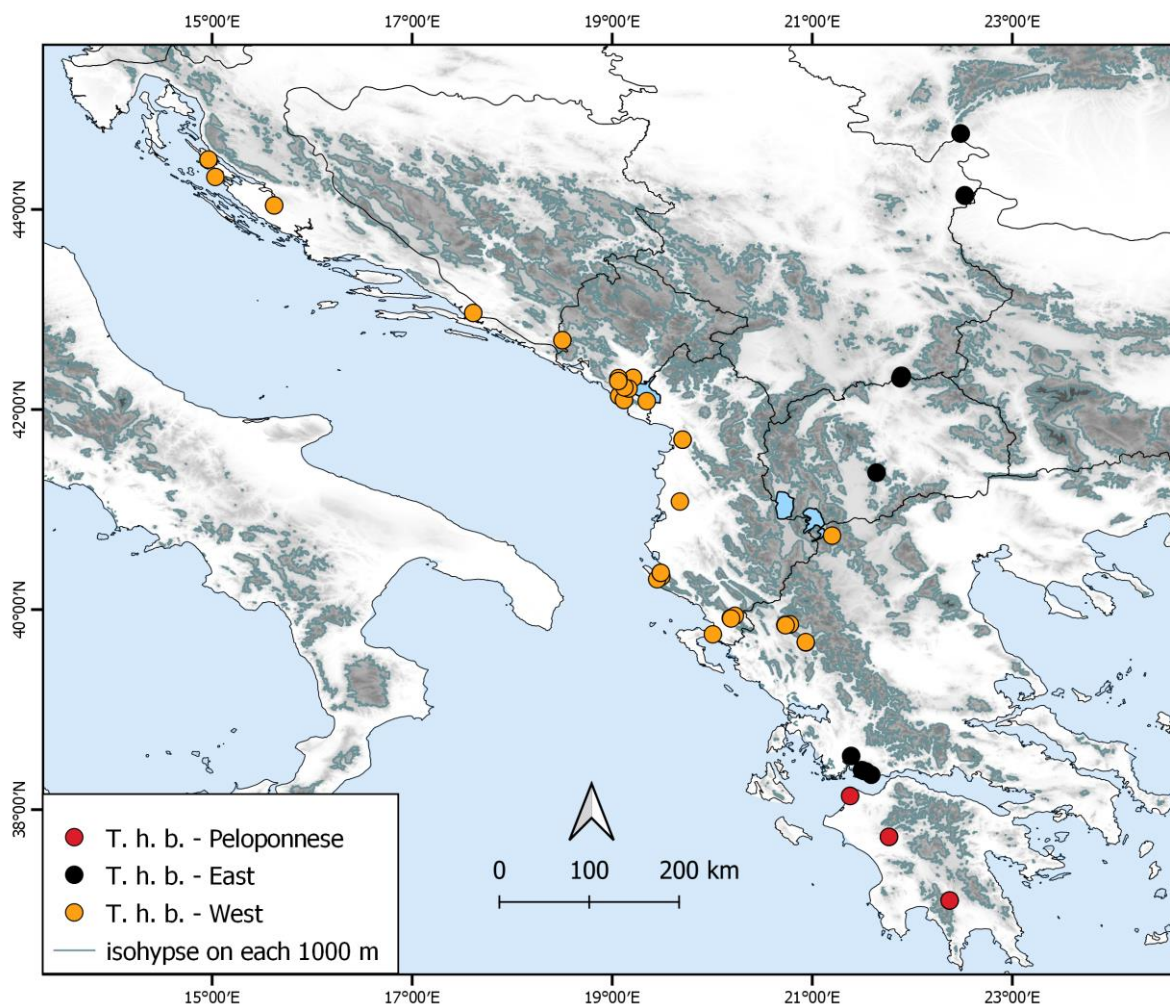


Slika 20. Prostorna varijabilnost *Testudo hermanni boettgeri* na osnovu sekvenci *cytb* mtDNK. T. h. b. – *Testudo hermanni boettgeri*. Tirkiznom bojom su označene izohipse na svakih 1000 m nadmorske visine. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.

4.1.3. Multilokusna analiza prostorne varijabilnosti

Testudo hermanni boettgeri

Kombinovanom analizom varijabilnosti *12S* rRNK i *cytb* mtDNK *T. h. boettgeri* poreklom sa 32 lokaliteta na Balkanskom poluostrvu programom Geneland utvrđena su tri nezavisna genetička klastera / linije (Slika 21). Multilokusnom analizom prostorne varijabilnosti potvrđena je *12S* rRNK strukturiranost *T. h. boettgeri* na linije Zapad, Istok i Peloponez (Slike 14, 21).



Slika 21. Prostorna varijabilnost *Testudo hermanni boettgeri* na osnovu sekvenci 12S rRNK i *cytb* mtDNK. T. h. b. – *Testudo hermanni boettgeri*. Tirkiznom bojom su označene izohipse na svakih 1000 mnv. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.

4.2. Varijabilnost oblika karapaksa i plastrona

Testudo hermanni boettgeri

4.2.1. Efekat greške fotografisanja

Greška fotografisanja je manja u odnosu na nesistematsku razliku leve i desne strane (fluktuirajuću asimetriju) 2,3 puta za karapaks (F vrednost, Tabela 7) i 9,8 puta za plastron (F vrednost, Tabela 8). Uočeno je značajno prisustvo fluktuirajuće i direkcione asimetrije, međutim, analiza parametara asimetrije je van predmeta istraživanja ove teze. Konačno, individualna varijabilnost dominira sa 86% ($R^2 \times 100$, Tabela 7) i 94% ($R^2 \times 100$, Tabela 8) u odnosu na ukupnu varijabilnost karapaksa (Tabela 7) i plastrona (Tabela 8).

Tabela 7. Prokrustova ANOVA koja testira efekat greške fotografisanja, fluktuirajuće i direkcione asimetrije, kao i individualnu varijabilnost u odnosu na ukupnu varijabilnost oblika karapaksa *T. h. boettgeri*. Statistička značajnost je utvrđena metodom permutacija reziduala sa 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

	Df	SS	MS	R^2	F	Z	<i>p</i>
IV	586	4,3813	0,0075	0,860	11,86	15,47	0,001
DA	1	0,0206	0,0206	0,004	32,68	9,09	0,001
FA	586	0,3693	0,0006	0,073	2,29	30,87	0,001
ME	1170	0,3227	0,0003	0,063			
Suma	2343	5,0938					

IV – individualna varijabilnost; DA – direkcionalna asimetrija; FA – fluktuirajuća asimetrija; ME – greška fotografisanja; Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost sume kvadrata; R^2 – koeficijent determinacije (pomnožen sa 100 daje % učešća datog faktora u odnosu na ukupnu varijabilnost uzorka); F – F vrednost; Z – Z skorovi; *p* – statistička značajnost.

Tabela 8. Prokrustova ANOVA koja testira efekat greške fotografisanja, fluktuirajuće i direkcione asimetrije, kao i individualnu varijabilnost u odnosu na ukupnu varijabilnost oblika plastrona *T. h. boettgeri*. Statistička značajnost je utvrđena metodom permutacija reziduala sa 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

	Df	SS	MS	R ²	F	Z	<i>p</i>
IV	563	6,5761	0,0117	0,940	20,49	3,45	0,002
DA	1	0,0331	0,0331	0,005	58,14	9,21	0,001
FA	563	0,3209	0,0006	0,046	9,77	31,21	0,001
ME	1124	0,0656	0,0001	0,009			
Suma	2251	6,9957					

IV – individualna varijabilnost; DA – direkcionalna asimetrija; FA – fluktuirajuća asimetrija; ME – greška fotografisanja; Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost sume kvadrata; R² – koeficijent determinacije (pomnožen sa 100 daje % učešća datog faktora u odnosu na ukupnu varijabilnost uzorka); F – F vrednost; Z – Z skorovi; *p* – statistička značajnost.

Imajući u vidu da individualna varijabilnost dominira u oba seta podataka, kao i da je efekat greške fotografisanja manji od efekta fluktuirajuće asimetrije, u sledećim analizama je korišćena simetrična komponenta oblika.

4.2.2. Struktura varijabilnosti oblika karapaksa i plastrona *Testudo hermanni boettgeri*

Efekat alometrije, pola, genetičkih klastera i njihove međusobne interakcije na ukupnu varijabilnost karapaksa *T. h. boettgeri* prikazani su u Tabelama 9 i 10. Efekat alometrije, pola i genetičkih klastera na varijabilnost oblika karapaksa su statistički značajni (Tabele 9, 10). Najveći doprinos u varijabilnosti oblika karapaksa ima pol (19,7%), zatim efekat alometrije (7,3%), efekat genetičkih klastera (*12S* rRNK sa 3,7% i *cytb* mtDNK sa 2,4%) (Tabele 9, 10). Alometrijske trajektorije između polova (interakcija „log (CS) : Sex”, Tabele 9, 10) nisu homogene (odsustvo istog inteziteta i/ili odsustvo paralelnih alometrijskih trajektorija), a nasuprot toga, alometrijske trajektorije između genetičkih klastera su homogene (interakcija „log (CS) : *12S*“, Tabela 9; interakcija „log (CS) : *Cytb*“, Tabela 10). Utvrđeno je da obrazac polnog dimorfizma oblika karapaksa nije konzistentan između genetičkih klastera (interakcija „Sex : *12S*“, Tabela 9; interakcija „Sex : *Cytb*“, Tabela 10). Slično alometrijskim trajektorijama genetičkih klastera, nije uočena divergencija alometrijskih trajektorija pol-specifičnih genetičkih klastera (interakcija „log (CS) : Sex : *12S*“, Tabela 9; interakcija „log (CS) : Sex : *Cytb*“, Tabela 10).

Poređenjem koeficijenta determinacije (R^2) koji se odnosi na genetičke klastere (*12S* rRNK, Tabela 9; *cytb* mtDNK, Tabela 10), uočeno je da podela individua prema *12S* rRNK varijabilnosti bolje opisuje varijabilnost oblika karapaksa u odnosu na klasifikaciju na osnovu varijabilnosti *cytb* mtDNK. Ovaj podatak je podržan i statističkim testom gde je model sa *cytb* mtDNK tretiran kao nulti, a model sa *12S* rRNK kao alternativni model ($F = 3,35$; $Z = 5,79$; $p < 0,001$). U daljim analizama korišćena je podela individua na osnovu varijabilnosti *12S* rRNK gena (saglasno i sa podelom zasnovanom na multilokusnoj analizi). Ordinacijom varijabilnosti oblika karapaksa pomoću analize glavnih komponenti (PCA) vizualizovan je trend varijabilnosti u odnosu na faktore pol i *12S* rRNK genetičke klastere (Slika 22). Polni dimorfizam je dominantan faktor i polovi su značajno odvojeni duž PC 1 ose koja opisuje 45,1% ukupne varijabilnosti oblika karapaksa (Slika 22). Promene oblika koje su u asocijaciji sa PC 1 osom pokazuju trend razlika oblika karapaksa između polova gde ženke poseduju relativno širi karapaks u nivou treće vertebralne pločice – središnji deo abdominalnog regiona posmatrano sa dorzalne strane, dok im je kaudalni region (četvrta kostalna – tačke 9, 11, 22 i 24; i peta vertebralna pločica – tačke 5, 6, 7, 8, 18, 19, 20, 21 i 28) relativno už i kraći u odnosu na mužjake (Slika 22). Takođe, polno dimorfne promene oblika karapaksa uključuju i prvu vertebralnu pločicu (tačke 1, 2, 13, 14, 15, 26 i 27). Druga glavna komponenta nosi 12,8% ukupne varijabilnosti i duž tog vektora distribuirani su *12S* rRNK genetički klasteri (Slika 22) koji se u velikoj meri preklapaju u morfološkom prostoru ukazujući da je varijabilnost karapaksa u odnosu na *12S* rRNK klastere veoma suptilna. Dominantne promene oblika karapaksa koje su u asocijaciji sa PC 2 vektorom vezane su za anteriorni deo prve vertebralne pločice (tačke 1, 2, 14, 15 i 27), kao i suture između druge i treće (tačke 11 i 24) i treće i četvrte (tačke 9 i 22) vertebralne pločice (Slika 22). Takođe, indikativno je da su populacije definisane genetičkim klasterom Zapad relativno šire u anteriornom delu karapaksa u odnosu na Istok i Peloponez, kao i da imaju relativno kraći i už i posteriorni deo karapaksa (Slika 22).

Tabela 9. Stuktura ukupne varijabilnosti oblika karapaksa *T. h. boettgeri* podeljena na efekat alometrije, pola, genetičkih klastera definisanim varijabilnošću 12S rRNK, i njihovim interakcijama. Statistička značajnost je utvrđena metodom permutacija reziduala sa 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

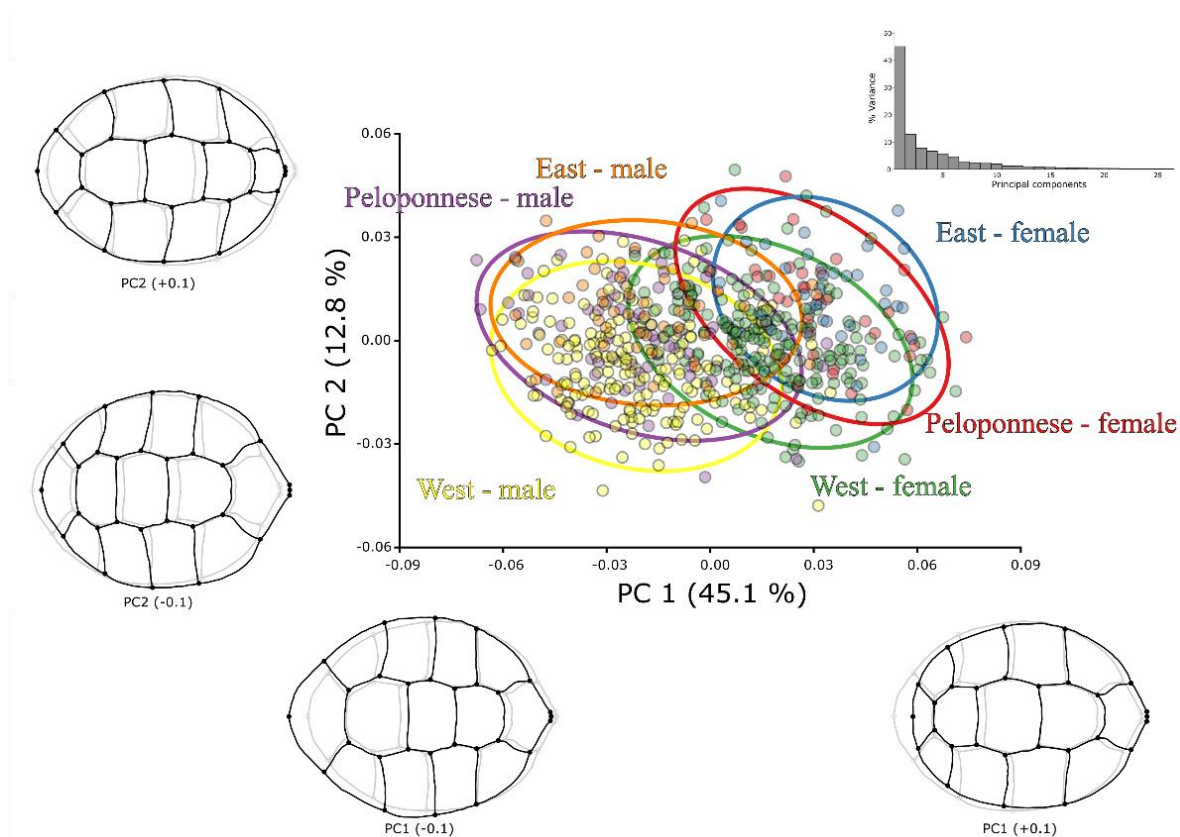
	Df	SS	MS	R ²	F	Z	<i>p</i>
log (CS)	1	0,0798	0,0798	0,073	62,00	6,42	0,001
Pol	1	0,2162	0,2162	0,197	167,99	8,41	0,001
12S	2	0,0407	0,0204	0,037	15,81	7,59	0,001
log (CS) : Pol	1	0,0088	0,0088	0,008	6,82	3,91	0,001
log (CS) : 12S	2	0,0038	0,0019	0,004	1,49	1,22	0,117
Pol : 12S	2	0,0052	0,0026	0,005	2,03	2,12	0,019
log (CS) : Pol : 12S	2	0,0024	0,0012	0,002	0,92	-0,01	0,506
Rezidualna varijansa	575	0,7400	0,0013	0,675			
Ukupna varijansa	586	1,0969					

log (CS) – logaritmovana centroidna veličina svake individue (korišćena kao kovarijabla u linearnom modelu, predstavlja efekat alometrije); Pol – kategorička varijabla sa dva nivoa (mužjak, ženka); 12S – kategorička varijabla koja definiše genetičke klastera u tri nivoa (Zapad, Istok i Peloponez); Rezidualna varijansa – neopisana varijabilnost linearnog modela; Ukupna varijansa – ukupna varijabilnost linearnog modela; Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost sume kvadrata; R² – koeficijent determinacije (pomnožen sa 100 daje % učešća datog faktora u odnosu na ukupnu varijabilnost uzorka); F – F vrednost; Z – Z skorovi; *p* – statistička značajnost.

Tabela 10. Stuktura ukupne varijabilnosti oblika karapaksa *T. h. boettgeri* podeljena na efekat alometrije, pola, genetičkih klastera definisanim varijabilnošću *cytb* mtDNK, i njihovim interakcijama. Statistička značajnost je utvrđena metodom permutacija reziduala sa 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

	Df	SS	MS	R ²	F	Z	<i>p</i>
log (CS)	1	0,0798	0,0798	0,073	61,01	6,42	0,001
Pol	1	0,2162	0,2162	0,197	165,31	8,41	0,001
Cytb	1	0,0263	0,0263	0,024	20,09	6,20	0,001
log (CS) : Pol	1	0,0093	0,0093	0,008	7,08	3,98	0,001
log (CS) : Cytb	1	0,0027	0,0027	0,002	2,04	1,63	0,054
Pol : Cytb	1	0,0043	0,0043	0,004	3,26	2,63	0,004
log (CS) : Pol : Cytb	1	0,0012	0,0012	0,001	0,94	0,11	0,459
Rezidualna varijansa	579	0,7572	0,0013	0,690			
Ukupna varijansa	586	1,0969					

log (CS) – logaritmovana centroidna veličina svake individue (korišćena kao kovarijabla u linearnom modelu, predstavlja efekat alometrije); Pol – kategorička varijabla sa dva nivoa (mužjak, ženka); Cytb – kategorička varijabla koja definiše genetičke klastera u dva nivoa (Zapad i Istok); Rezidualna varijansa – neopisana varijabilnost linearnog modela; Ukupna varijansa – ukupna varijabilnost linearnog modela; Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost sume kvadrata; R² – koeficijent determinacije (pomnožen sa 100 daje % učešća datog faktora u odnosu na ukupnu varijabilnost uzorka); F – F vrednost; Z – Z skorovi; *p* – statistička značajnost.



Slika 22. Morfološki prostor definisan sa prva dva eigenvektora nakon analize glavnih komponenti (PCA) oblika karapaksa *Testudo hermanni boettgeri*. Polovi su odvojeni duž PC 1 vektora (45,1% ukupne varijabilnosti), a *I2S* rRNK grupe su distribuirane duž PC 2 vektor (12,8% ukupne varijabilnosti). Polovi i *I2S* rRNK grupe su označene različitim bojama, a elipsoidi na plotu predstavljaju interval poverenja svake grupe gde je za graničnu vrednost intervala uzeta vrednost od 90% uzorka svake grupe. Promene oblika karapaksa od srednje vrednosti celog uzorka (konsenzusa) duž prve dve ose u pozitivnom i negativnom smeru predstavljen je na grafiku. Anteriorna strana karapaksa je usmerena ka desnoj strani, dok je posteriorna orijentisana ka levoj strani grafika. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez, male- mužjak, female- ženka.

Kao i u slučaju strukturiranosti oblika karapaksa, efekat alometrije, pola i genetičkih klastera takođe statistički značajno utiče na strukturiranje varijabilnosti oblika plastrona *T. h. boettgeri* (Tabele 11 i 12). Alometrija opisuje 11,9% ukupne varijabilnosti, pol 47%, a genetički klasteri 3,2% (*I2S* rRNK, Tabela 11), odnosno 1,4% (*cytb* mtDNK, Tabela 12). Kao i u slučaju karapaksa, alometrijske trajektorije se razlikuju između polova (interakcija „log (CS) : Sex”, Tabele 11, 12). Međutim, nasuprot karapaksu, alometrijske trajektorije između genetičkih klastera kada polni dimorfizam nije testiran simultano (interakcija „log (CS) : *I2S*“, Tabela 11; interakcija „log (CS) : *Cytb*“, Tabela 12) je pokazala statističku značajnost što ukazuje da ispitivani genetički entiteti nemaju isti obrazac povezanosti veličine i oblika plastrona. Kao i u slučaju karapaksa, obrazac polnog dimorfizma nije konzistentan između

genetičkih klastera (interakcija „Sex : *I2S*“, Tabela 11; interakcija „Sex : *Cytb*“, Tabela 12) i nije uočena divergencija alometrijskih trajektorija pol-specifičnih genetičkih klastera (interakcija „log (CS) : Sex : *I2S*“, Tabela 11; interakcija „log (CS) : Sex : *Cytb*“, Tabela 12). Dakle, osnovna razlika između karapaksa i plastrona je u tome što je plastron više polno dimorfan, pokazuje veći stepen alometrije i obrasci alometrijskih trajektorija se generalno razlikuju.

Tabela 11. Struktura ukupne varijabilnosti oblika plastrona *T. h. boettgeri* podeljena na efekat alometrije, pola, genetičkih klastera definisanim varijabilnošću *I2S* rRNK, i njihovim interakcijama. Statistička značajnost je utvrđena metodom permutacija reziduala sa 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

	Df	SS	MS	R ²	F	Z	<i>p</i>
log (CS)	1	0,1960	0,1960	0,119	181,43	5,54	0,001
Pol	1	0,7744	0,7744	0,470	716,77	7,75	0,001
<i>I2S</i>	2	0,0534	0,0267	0,032	24,71	8,79	0,001
log (CS) : Pol	1	0,0129	0,0129	0,008	11,91	5,58	0,001
log (CS) : <i>I2S</i>	2	0,0063	0,0032	0,004	2,92	3,23	0,001
Pol : <i>I2S</i>	2	0,0050	0,0025	0,003	2,33	2,68	0,004
log (CS) : Pol : <i>I2S</i>	2	0,0032	0,0016	0,002	1,49	1,35	0,096
Rezidualna varijansa	552	0,5964	0,0011	0,362			
Ukupna varijansa	563	1,6477					

log (CS) – logaritmovana centroidna veličina svake individue (korišćena kao kovarijabla u linearnom modelu, predstavlja efekat alometrije); Pol – kategorička varijabla sa dva nivoa (mužjak, ženka); *I2S* – kategorička varijabla koja definiše genetičke klastere u tri nivoa (Zapad, Istok i Peloponez); Rezidualna varijansa – neopisana varijabilnost linearnog modela; Ukupna varijansa – ukupna varijabilnost linearnog modela; Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost sume kvadrata; R² – koeficijent determinacije (pomnožen sa 100 daje % učešća datog faktora u odnosu na ukupnu varijabilnost uzorka); F – F vrednost; Z – Z skorovi; *p* – statistička značajnost.

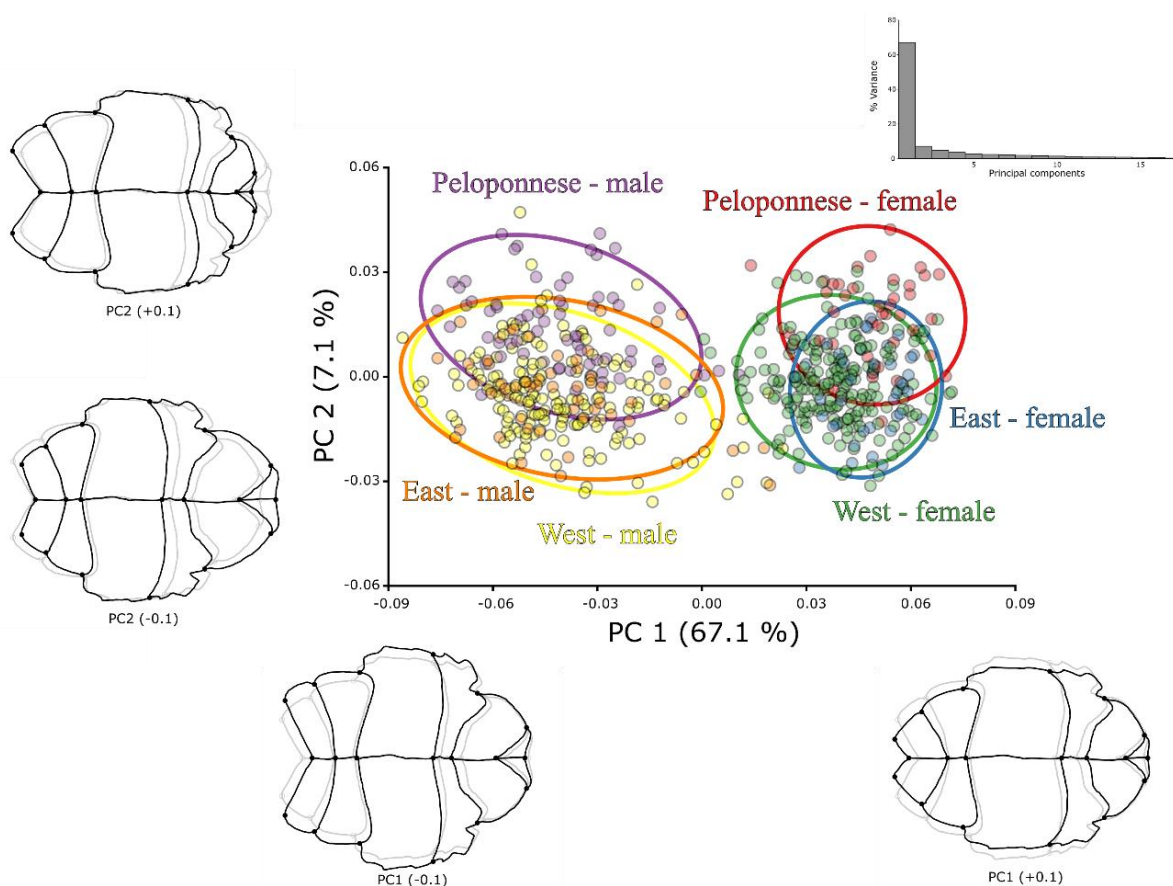
Poređenjem koeficijenta determinacije (R²) koji se odnosi na genetičke klastere (*I2S* rRNK, Tabela 11; *cytb* mtDNK, Tabela 12), uočeno je da podela individua prema *I2S* rRNK varijabilnosti bolje opisuje varijabilnost oblika plastrona *T. h. boettgeri* u odnosu na klasifikaciju na osnovu varijabilnosti *cytb* mtDNK, što je potvrđeno i statističkim testom (F = 7,78; Z = 10,93; $p < 0.001$). Kao i u slučaju karapaksa, u daljim analizama korišćena je podela individua na osnovu varijabilnosti *I2S* rRNK gena. Ordinacijom varijabli oblika plastrona pomoću PCA vizualizovan je trend varijabilnosti u odnosu na faktore pol i *I2S* rRNK genetičke klastere (Slika 23). Generalni trend varijabilnosti je isti kao u slučaju karapaksa, ali za razliku od njega ispitivani faktori (pol i *I2S* rRNK) pokazuju veći efekat na plastron u odnosu na karapaks (pogledati R² vrednosti), pa se samim tim ove grupe manje preklapaju u morfološkom prostoru (Slika 23). Promene oblika koje su u asocijaciji sa PC 1 osom

pokazuju trend razlika oblika plastrona između polova gde ženke poseduju relativno uži i duži plastron od mužjaka (Slika 23). Dužina humeralne (tačke 17-18) i analne (tačke 13-14) suture najviše doprinose promenama koje su relevantne za polnu dimorfnost relativne dužine plastrona. Takođe, međuanalni razmak (distanca između tačaka 6 i 7) je polno dimorfna karakteristika gde mužjaci imaju znatno širi ovaj region u odnosu na ženke. S obzirom na to da se koštani mostovi koji povezuju karapaks i plastron nalaze između tačaka 2-4 i 9-11, na osnovu promena oblika duž PC 1 ose možemo uočiti da ženke imaju nešto duže koštane mostove u odnosu na mužjake (Slika 23). Druga glavna komponenta nosi 7,1% ukupne varijabilnosti i duž tog vektora distribuirani su 12S rRNK genetički klasteri od kojih su populacije sa Peloponeza morfološki najrazličitije u odnosu na ostale dve grupe na osnovu oblika plastrona (Slika 23). Zbog toga, diskriminacija 12S rRNK genetičkih klastera je bolja na osnovu varijabilnosti oblika plastrona u odnosu na oblik karapaksa. Dominantne promene oblika plastrona koje su asocijaciji sa PC 2 vektorom vezane su za anteriorni deo plastrona, tj. gularne (tačke 1, 12, 18, 19), humeralne (tačke 1, 2, 11, 12, 17, 18) i pektoralne dermalne pločice (tačke 2, 3, 10, 11, 16, 17) (Slika 23). U nešto manjoj meri, genetički klasteri se razlikuju u širini posteriornog dela plastrona koji obuhvata primarno analne pločice (tačke 5-8, 13 i 14).

Tabela 12. Struktura ukupne varijabilnosti oblika plastrona *T. h. boettgeri* podeljena na efekat alometrije, pola, genetičkih klastera definisanim varijabilnošću *cytb* mtDNK, i njihovim interakcijama. Statistička značajnost je utvrđena metodom permutacija reziduala sa 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

	Df	SS	MS	R ²	F	Z	<i>p</i>
log (CS)	1	0,1960	0,1960	0,119	173,00	5,54	0,001
Pol	1	0,7744	0,7744	0,470	683,46	7,75	0,001
Cytb	1	0,0226	0,0226	0,014	19,95	6,34	0,001
log (CS) : Pol	1	0,0121	0,0121	0,007	10,67	5,25	0,001
log (CS) : Cytb	1	0,0075	0,0075	0,005	6,58	4,09	0,001
Pol : Cytb	1	0,0031	0,0031	0,002	2,70	2,33	0,007
log (CS) : Pol : Cytb	1	0,0020	0,0020	0,001	1,79	1,44	0,072
Rezidualna varijansa	556	0,6300	0,0011	0,382			
Ukupna varijansa	563	1,6477					

log (CS) – logaritmovana centroidna veličina svake individue (korišćena kao kovarijabla u linearnom modelu, predstavlja efekat alometrije); Pol – kategorička varijabla sa dva nivoa (mužjak, ženka); Cytb – kategorička varijabla koja definiše genetičke klastera u dva nivoa (Zapad i Istok); Rezidualna varijansa – neopisana varijabilnost linearnog modela; Ukupna varijansa – ukupna varijabilnost linearnog modela; Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost sume kvadrata; R² – koeficijent determinacije (pomnožen sa 100 daje % učešća datog faktora u odnosu na ukupnu varijabilnost uzorka); F – F vrednost; Z – Z skorovi; *p* – statistička značajnost.

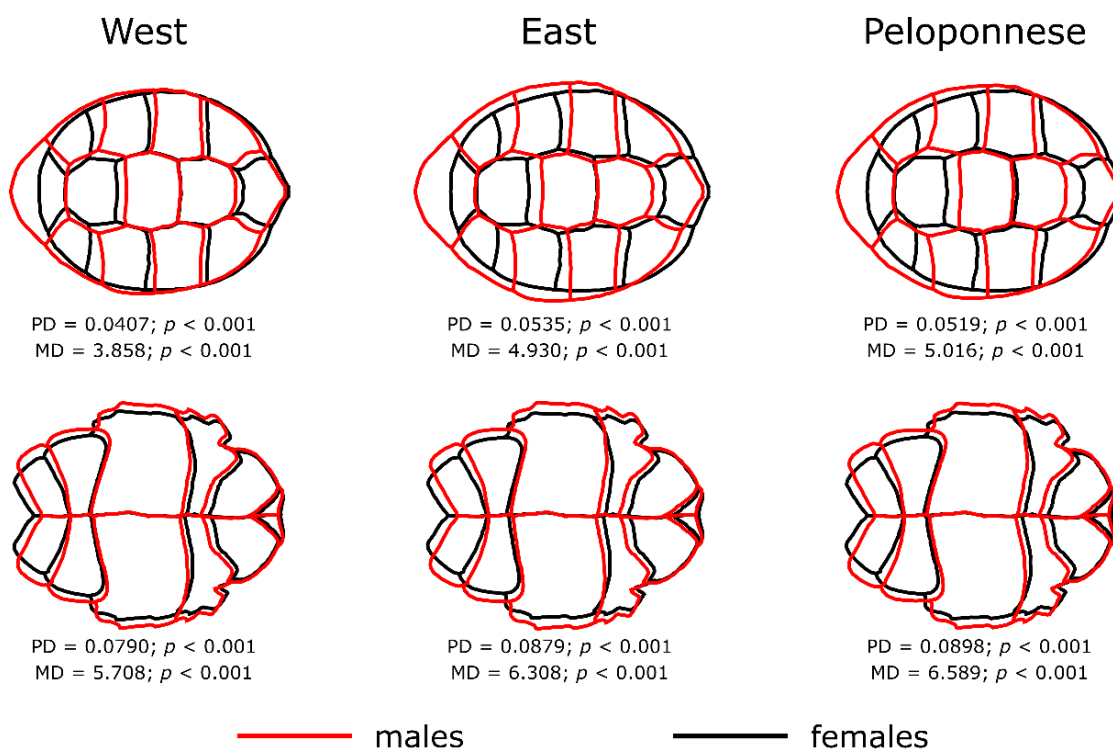


Slika 23. Morfološki prostor definisan sa prva dva eigenvektora nakon analize glavnih komponenti (PCA) oblika plastrona *Testudo hermanni boettgeri*. Polovi su odvojeni duž PC 1 vektora (67,1% ukupne varijabilnosti), a 12S rRNK grupe su distribuirane duž PC 2 vektor (7,1% ukupne varijabilnosti). Polovi i 12S rRNK grupe su označene različitim bojama, a elipsoidi na plotu predstavljaju interval poverenja svake grupe gde je za graničnu vrednost intervala uzeta vrednost od 90% uzorka svake grupe. Promene oblika plastrona od srednje vrednosti celog uzorka (konsenzusa) duž prve dve ose u pozitivnom i negativnom smeru predstavljen je na grafiku. Anteriorna strana plastrona je usmerena ka desnoj strani, dok je posteriorna orjentisana ka levoj strani grafika. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez, male- mužjak, female- ženka.

4.2.3. Polni dimorfizam oblika karapaksa i plastrona

Testudo hermanni boettgeri

S' obzirom na to da su oblik karapaksa i plastrona *T. h. boettgeri* izrazito polno dimorfni (Tabela 9 i 11), na Slici 24 prikazan je polni dimorfizam oblika ovih struktura za svaku 12S rRNK grupu uz prateće statističke parametre (intenzitet polnog dimorfizma izražen je Prokrustovom distancom, PD, i Mahalanobisovom distancom, MD, dok je statistička značajnost utvrđena permutacionim testom sa 1000 iteracija).

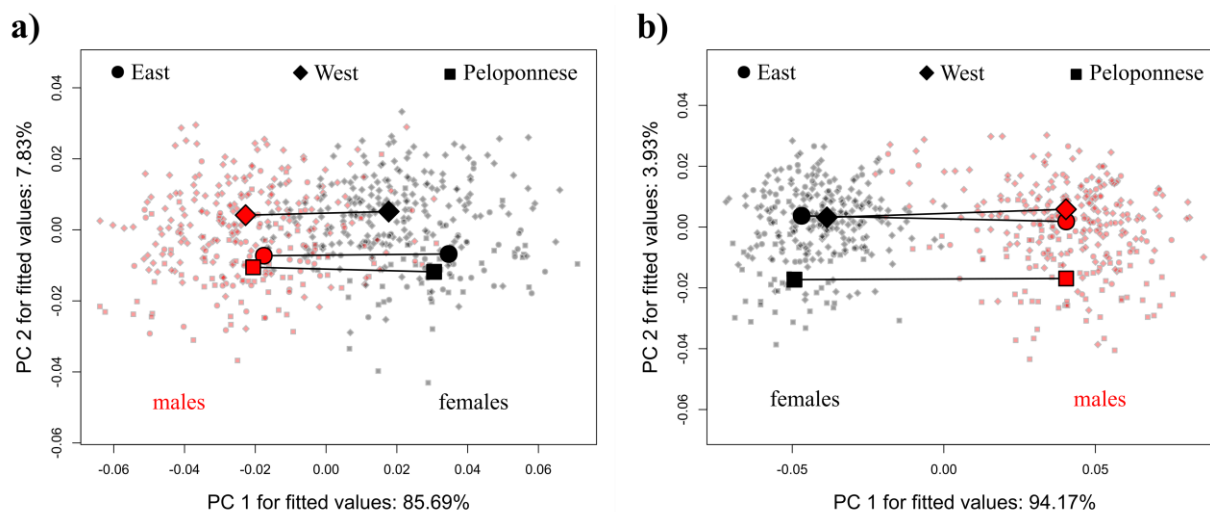


Slika 24. Polni dimorfizam oblika karapaksa i plastrona *Testudo hermanni boettgeri* za svaku grupu definisanu pomoću varijabilnosti *12S* rRNK gena. Oblik mužjaka je prikazan crvenom bojom, a oblik ženki crnom. Step (intenzitet,) polnog dimorfizma izražen je Prokrustovom distancom (PD) i Mahalanobisovom distancom (MD). Statistička značajnost distanci utvrđena je pomoću permutacionog testa sa 1000 iteracija. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.

Najveći intenzitet polnog dimorfizma karapaksa uočen je kod Istok *12S* rRNK grupe, dok je najmanji zabeležen kod linije Zapad (Slika 24). Sličan obrazac intenziteta polnog dimorfizma uočen je na plastronu kod koga najmanji intenzitet polnog dimorfizma pokazuje Zapad grupa, a za razliku od karapaksa, najveći intenzitet polnog dimorfizma u obliku plastrona zabeležen je u populacijama linije Peloponez. Treba naglasiti da sve analizirane *12S* rRNK grupe pokazuju generalni trend polnog dimorfizma kako karapaksa, tako i plastrona, a koji su elaborirani u prethodnom paragrafu.

Pošto smo utvrdili da je obrazac polnog dimorfizma nekonzistentan između *12S* rRNK grupa, kako za karapas (Tabela 9), tako i plastron (Tabela 11), primenom analize fenotipskih trajektorija utvrđeno je koje grupe se razlikuju u obrascu polnog dimorfizma, kao i u kojim parametrima (intenzitet i/ili smer). O ovoj analizi logaritmovana centroidna veličina nije korišćena kao kovarijabla zbog toga što alometrijske trajektorije između polova nisu homogene (interakcija “log (CS) : *12S*” u Tabelama 9 i 11). Obrazac polnog dimorfizma je prikazan na Slici 25 gde su polovi unutar svake *12S* rRNK grupe povezani linijom koja predstavlja vektor u multivarijantnom prostoru. Distanca između polova je mera intenziteta

polnog dimorfizma za datu grupu, koja u ovom slučaju izražena Prokrustovom distancom (pogledati parameter “PD” na Slici 24). Takođe, vektori se mogu razlikovati u smeru, tj. uglu koji zaklapaju, a ukoliko se izvrši normalizacija vektora, taj ugao je korelacija (r) između dva vektora.



Slika 25. Analiza fenotipskih trajektorija za a) karapaks i b) plastron *Testudo hermanni boettgeri*. Vektori (horizontalne linije) na oba grafika povezuju srednje vrednosti oblika polova (ženke – crnom bojom i mužjake – crvenom bojom) za svaku 12S rRNK grupu posebno (Istok, Zapad i Peloponez). Dužina vektora je intenzitet polnog dimorfizma, a ugao između vektora je smer polnog dimorfizma. Fenotipske trajektorije su projektovane pomoću međugrupne PCA (bg-PCA) zbog bolje vizualizacije (vektori su usaglašeni sa glavnim trendom međugrupne varijabilnosti) zbog čega procenat opisane varijanse za svaki bg-PC vektor ne odgovara opisanoj varijabilnosti PC vektora kod standarde PCA (Slike 22 i 23). West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.

Razlike u intenzitetu polnog dimorfizma između 12S rRNK genetičkih klastera *T. h. boettgeri* predstavljene su u Tabeli 13, dok su razlike u smeru polnog dimorfizma predstavljene u Tabeli 14. Rezultati ukazuju da je intenzitet polnog dimorfizma statistički značajno manji u populacijama koje pripadaju Zapad 12S rRNK genetičkom klasteru u odnosu na polni dimorfizam preostala dva genetička klastera (Slika 25a, Tabela 13).

Tabela 13. Razlike u intenzitetu polnog dimorfizma između tri grupe *T. h. boettgeri* definisane varijabilnošću *I2S* rRNK gena. Statistička značajnost je utvrđena permutacijama nakon 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

	Karapaks				Plastron			
	d	UCL (95%)	Z	p	d	UCL (95%)	Z	p
Istok : Peloponez	0,002	0,010	-0,83	0,763	0,002	0,010	-0,72	0,727
Istok : Zapad	0,013	0,008	3,70	0,003	0,009	0,008	2,30	0,033
Peloponez : Zapad	0,011	0,008	3,20	0,008	0,011	0,008	3,37	0,006

d – razlika između Prokrustovih distanci parova vektora polnog dimorfizma; UCL (95%) – gornji interval poverenja koji obuhvata 95% uzorka; Z – Z skorovi; p – statistička značajnost.

Razlike u smeru polnog dimorfizma oblika karapaksa *T. h. boettgeri* uočene su u populacijama koje pripadaju Zapad *I2S* rRNK genetičkom klasteru u odnosu na smer polnog dimorfizma preostala dva genetička klastera (Slika 25b, Tabela 14). Ovaj nalaz je u saglasnosti sa obrascem polnog dimorfizma u intenzitetu (Slika 24, Tabela 13). Nasuprot tome, smer polnog dimorfizma oblika plastrona jedino je statistički značajano drugačiji između Istok i Zapad grupa, dok ostali parovi pokazuju marginalno neznačajnu statističku vrednost ($p = 0,062$; Tabela 14), sa malim efektom (pogledati Z skorove, Tabela 14). Ova činjenica ukazuje da smer polnog dimorfizma plastrona pokazuje drugačiji obrazac u odnosu na intenzitet polnog dimorfizma karapaksa i plastrona, kao i smer polnog dimorfizma karapaksa kod ispitivanih *I2S* rRNK grupa.

Tabela 14. Razlike u smeru polnog dimorfizma *T. h. boettgeri* između tri grupe definisane varijabilnošću *I2S* rRNK gena. Statistička značajnost je utvrđena permutacijama sa 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

	Karapaks					Plastron				
	r	ugao	UCL (95%)	Z	P	r	angle	UCL (95%)	Z	p
Istok : Peloponez	0,98	11,4	16,9	0,08	0,481	0,99	7,9	8	1,63	0,062
Istok : Zapad	0,95	18,3	13,3	3,96	0,002	0,99	9,5	6,5	4,66	0,001
Peloponez : Zapad	0,96	15,8	12,7	3,12	0,013	0,99	6,2	6,2	1,63	0,062

r – korelacija vektora; ugao – ugao između dva vektora izražen u stepenima; UCL (95%) – gornji interval poverenja koji obuhvata 95% uzorka; Z – Z skorovi; p – statistička značajnost.

4.2.4. Intraseksualna varijabilnost oblika karapaksa i plastrona

Testudo hermanni boettgeri

Imajuću u vidu da 12S rRNK grupe imaju manji efekat na strukturiranje varijabilnosti oblika karapaksa i plastrona u odnosu na polni dimorfizam (karapaks: Slika 22, Tabela 9; plastron: Slika 23, Tabela 11), kao i da obrazac polnog dimorfizma nije konzistentan između navedenih grupa (Slika 25, Tabele 13, 14), izvršena je analiza 12S rRNK grupa za svaki pol posebno.

Kod ženki, utvrđeno je da alometrija učestvuje sa 4,3% (karapaks), odnosno 5,3% (plastron) u strukturiranju varijabilnosti oblika karapaksa i plastrona, međutim, alometrijske trajektorije 12S rRNK grupa su homogene (Tabela 15). Takođe, linearni model je pokazao da se 12S rRNK grupe ženki statistički značajno razlikuju, opisujući 6,4% (karapaks), odnosno 8% (plastron) ukupne varijabilnosti oblika karapaksa i plastrona (Tabela 15).

Tabela 15. Varijabilnost oblika karapaksa i plastrona ženki *T. h. boettgeri* strukturirana na efekat alometrije, 12S rRNK klasifikacije individua i njihove interakcije. Statistička značajnost je utvrđena permutacijama sa 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

		Df	SS	MS	R ²	F	Z	P
		Karapaks	log (CS)	1	0,0168	0,0168	0,043	13,89
12S	2		0,0246	0,0123	0,064	10,16	6,12	0,001
log (CS):12S	2		0,0014	0,0007	0,004	0,59	-1,09	0,868
Rezidualna varijansa	284		0,3435	0,0012	0,889			
Ukupna varijansa	289		0,3863					
		Df	SS	MS	R ²	F	Z	P
		Plastron	log (CS)	1	0,0157	0,0157	0,053	16,86
12S	2		0,0235	0,0118	0,080	12,62	7,68	0,001
log (CS):12S	2		0,0029	0,0015	0,010	1,56	1,56	0,058
Rezidualna varijansa	272		0,2537	0,0009	0,857			
Ukupna varijansa	277		0,2958					

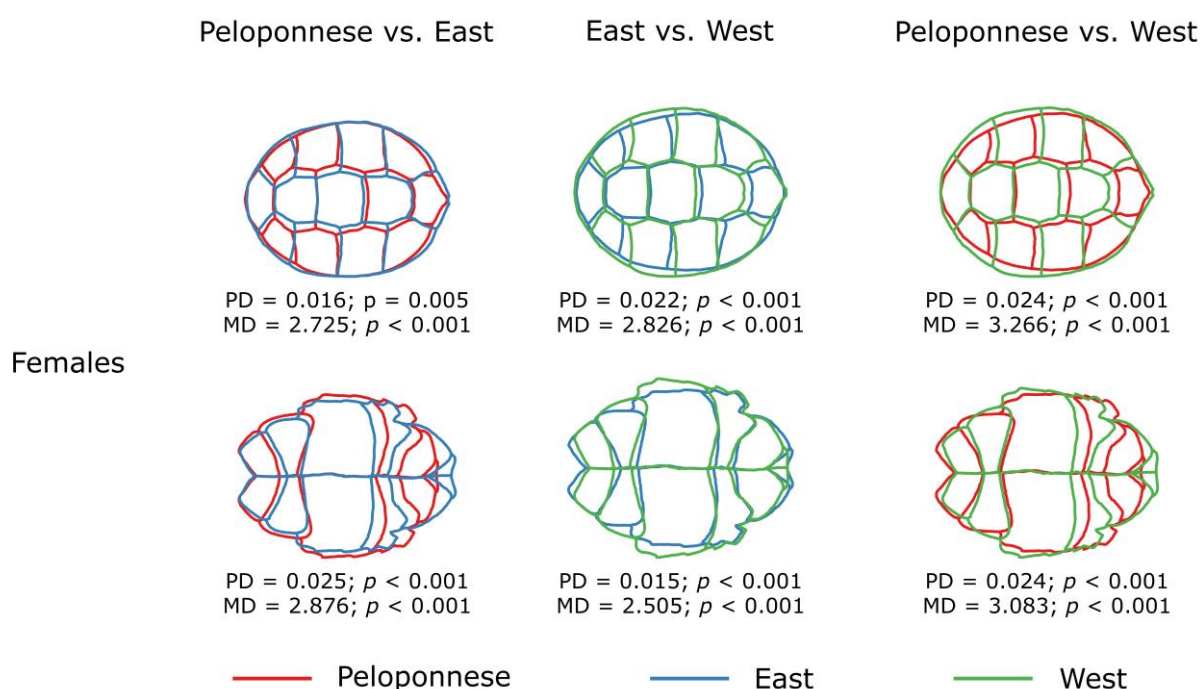
log (CS) – logaritmovana centroidna veličina svake individue (korišćena kao kovarijabla u linearnom modelu, predstavlja efekat alometrije); 12S – kategorička varijabla koja definiše genetičke klastere u tri nivoa (Zapad, Istok i Peloponez); Rezidualna varijansa – neopisana varijabilnost linearnog modela; Ukupna varijansa – ukupna varijabilnost linearnog modela; Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost sume kvadrata; R² – koeficijent determinacije (pomnožen sa 100 daje % učešća datog faktora u odnosu na ukupnu varijabilnost uzorka); F – F vrednost; Z – Z skorovi; p – statistička značajnost.

Poređenjem parova 12S rRNK grupa ženki bez alometrijske korekcije (Slika 26) uočeno je da se svi parovi međusobno statistički razlikuju i da taj obrazac ostaje identičan nakon alometrijske korekcije (rezultati nisu priloženi). Najmanju sličnost oblika karapaksa ispoljavaju Peloponez i Istok (PD = 0,016; Slika 26), dok najveću Peloponez i Zapad (PD =

0,024; Slika 26). *12S* rRNK grupe ženki pored toga što se suptilno ali visoko statistički razlikuju, njihov oblik karapaksa se razlikuje u različitim aspektima. Na primer, Peloponez i Istok se razlikuju primarno u širini vertebralnih pločica, gde grupa Peloponez ima relativno šire vertebralne ploče u odnosu na Istok. Poređenjem promena oblika između Zapad *12S* rRNK grupe ženki u odnosu na preostale dve grupe, može se uočiti da su jedinke koje pripadaju Zapad *12S* rRNK grupi poseduju relativno širi karapaks u nivou distalnog dela kostalnih pločica, kao i da ispoljavaju relativno razvijeniju (širu) prvu vertebralnu pločicu (Slika 26). Ova razlika je najočiglednija između Zapad i Peloponez grupa gde se takođe može uočiti da širi karapaks Zapad grupe nije posledica relativne promene širine vertebralnih, već kostalnih pločica. Na osnovu varijabilnosti oblika plastrona, utvrđeno je da se ženke linija Zapad i Istok najmanje razlikuju ($PD = 0,015$; Slika 26), a najveća razlika uočena je između grupa Peloponez i Istok ($PD = 0,025$; Slika 26). *12S* rRNK linije ženki se najviše razlikuju u anteriornom i distalnom delu plastrona, kao i relativnoj dužini koštanih mostova. Promenama oblika u anteriornom delu plastrona najviše doprinose pektoralne i humeralne pločice (Slika 26). Individue sa Peloponeza poseduju najkraći anteriorni region plastrona i najduže koštane mostove, dok je plastron najširi kod individua iz Zapad linije (Slika 26).

Kod mužjaka, utvrđeno je da alometrija učestvuje sa 3,2% (karapaks), odnosno 6,4% (plastron) u strukturiranju varijabilnosti oblika karapaksa i plastrona, kao i da se genetički klasteri razlikuju na osnovu oblika ovih struktura nakon korigovanja za alometrijski efekat (Tabela 16). Međutim, za razliku od ženki, alometrijske trajektorije oblika plastrona mužjaka nisu homogene (Tabela 16). Poređenjem parova *12S* rRNK genetičkih klastera, utvrđeno je da se svi parovi statistički razlikuju na osnovu oblika karapaksa koji nije korigovan za alometrijski efekat, a nakon alometrijske korekcije Peloponez i Istok linije se ne razlikuju (Slika 27). Imajući u vidu da su alometrijske trajektorije plastrona između *12S* rRNK grupa nekonzistentne (Tabela 16), poređenje parova izvršeno je samo na podacima nekorigovanim za alometriju (Slika 27). Najmanju sličnost oblika karapaksa ispoljavaju Peloponez i Zapad ($PD = 0,016$; Slika 27), dok ostala dva para imaju isti stepen razlika oblika karapaksa ($PD = 0,021$; Slika 27). *12S* rRNK grupe mužjaka najviše se razlikuju u relativnoj širini vertebralnih pločica, posebno anteriornom delu prve vertebralne pločice (Slika 27). Kao i kod ženki, Peloponez linija poseduje najšire vertebralne pločice, dok Zapad liniju karakteriše najširi deo prve vertebralne pločice. Za razliku od ženki, relativna širina karapaksa mužjaka je nevarijabilna što se može uočiti na osnovu promena oblika distalnog dela kostalnih pločica (Slika 27). Kao i kod ženki, na osnovu varijabilnosti oblika plastrona utvrđeno je da se mužjaci linija Zapad i Istok najmanje razlikuju ($PD = 0,018$; Slika 27), kao i da su najveće

razlike uočene između Peloponeza i Istoka (PD = 0,025; Slika 27). Slično kao kod ženki, 12S rRNK linije mužjaka se najviše razlikuju u anteriornom delu plastrona (pektoralne i humeralne pločice), kao i relativnom položaju ali ne i dužini koštanih mostova (Slika 27). Individue sa Peloponeza poseduju najkraći anteriorni region plastrona, a koštani mostovi su im pomereni više ka glavenom regionu u odnosu na ostale dve grupe (Slika 27). Za razliku od ženki, relativan položaj sutura femoralnih i analnih pločica plastrona su varijabilne kod mužjaka (Slika 27).



Slika 26. Promene oblika karapaksa i plastrona *Testudo hermanni boettgeri* bez korigovanja za alometriju između 12S rRNK grupa ženki uvećane pet puta (značajnost grupa je utvrđena u podacima koji su korigovani za alometriju). 12S rRNK grupe su obeležene sa tri boje: Peloponez – crvena, Istok – plava i Zapad – zelena. Stepenn razlika je izražen Prokrustovom distancom (PD) i Mahalanobisovom distancom (MD). Statistička značajnost distanci utvrđena je permutacionim testom sa 1000 iteracija. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.

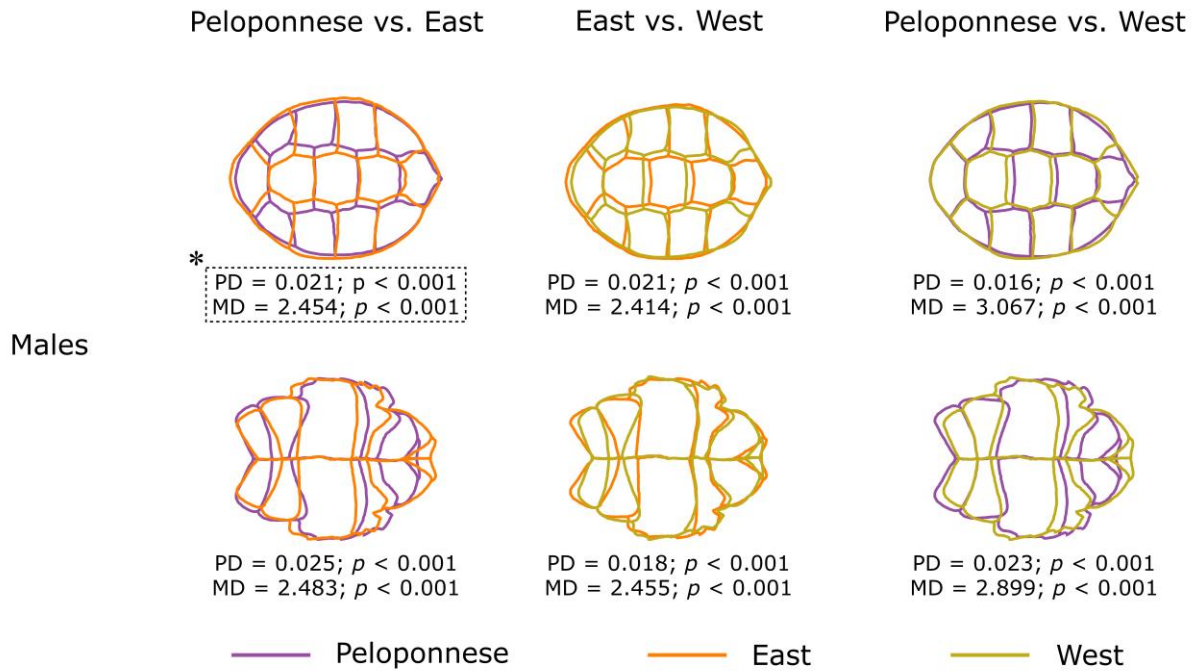
Tabela 16. Varijabilnost oblika karapaksa i plastrona mužjaka *T. h. boettgeri* strukturirana na efekat alometrije, 12S rRNK klasifikacije individua i njihove interakcije. Statistička značajnost je utvrđena permutacijama sa 1000 iteracija, a statistički značajni efekti sa pouzdanjem većim od 95% ($\alpha = 0,05$) su osenčeni sivom bojom.

		Df	SS	MS	R ²	F	Z	<i>p</i>
Karapaks	log (CS)	1	0,0140	0,0140	0,032	10,27	4,78	0,001
	12S	2	0,0232	0,0116	0,053	8,50	5,86	0,001
	log (CS):12S	2	0,0036	0,0018	0,008	1,33	0,95	0,165
	Rezidualna varijansa	291	0,3965	0,0014	0,907			
	Ukupna varijansa	296	0,4373					
		Df	SS	MS	R ²	F	Z	<i>p</i>
Plastron	log (CS)	1	0,0263	0,0263	0,064	21,47	5,83	0,001
	12S	2	0,0370	0,0185	0,090	15,13	7,19	0,001
	log (CS):12S	2	0,0066	0,0033	0,016	2,71	3,03	0,002
	Rezidualna varijansa	280	0,3427	0,0012	0,830			
	Ukupna varijansa	285	0,4127					

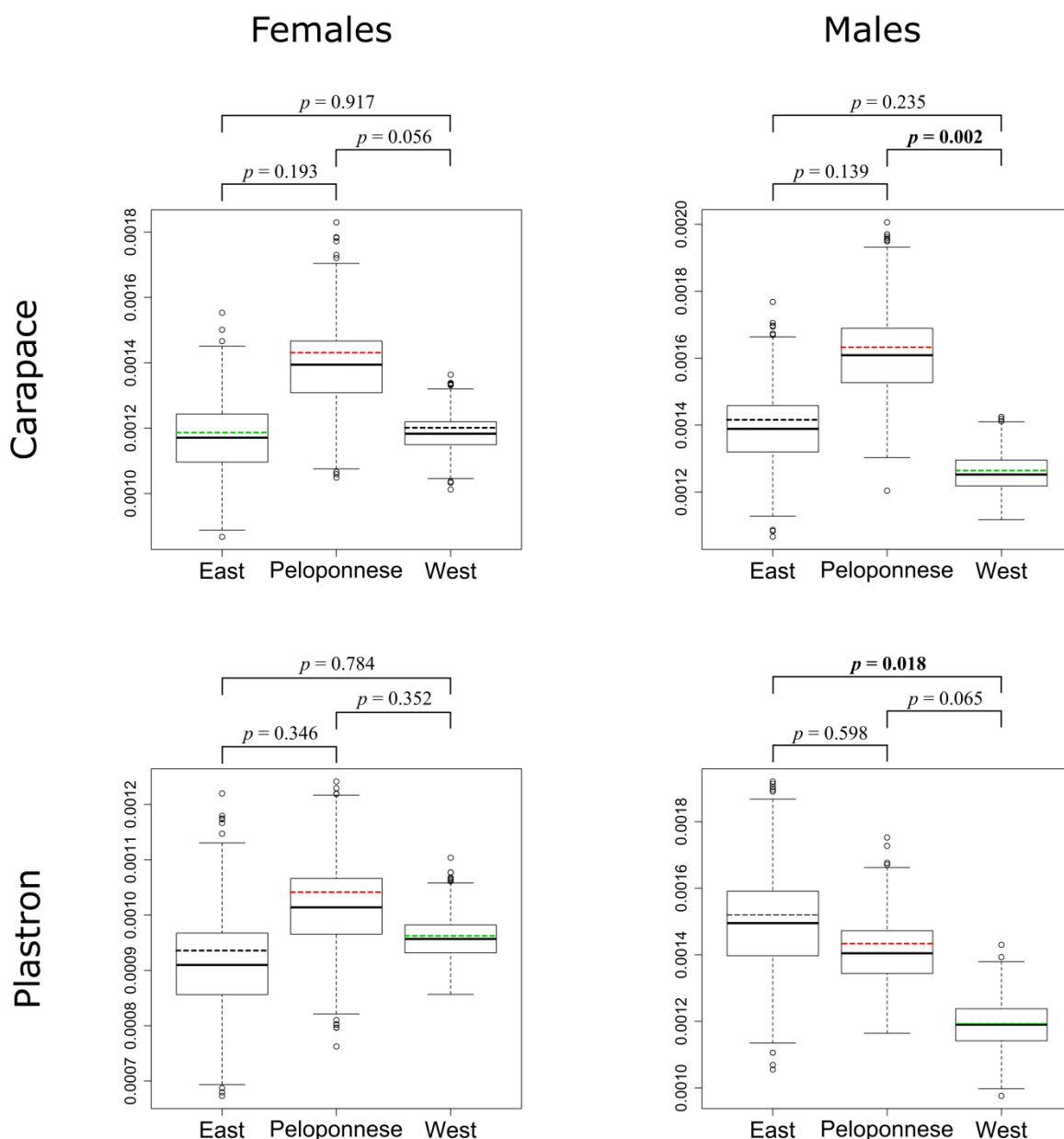
log (CS) – logaritmovana centroidna veličina svake individue (korišćena kao kovarijabla u linearnom modelu, predstavlja efekat alometrije); 12S – kategorička varijabla koja definiše genetičke klastere u tri nivoa (Zapad, Istok i Peloponez); Rezidualna varijansa – neopisana varijabilnost linearnog modela; Ukupna varijansa – ukupna varijabilnost linearnog modela; Df – stepeni slobode; SS – suma kvadrata; MS – srednja vrednost sume kvadrata; R² – koeficijent determinacije (pomnožen sa 100 daje % učešća datog faktora u odnosu na ukupnu varijabilnost uzorka); F – F vrednost; Z – Z skorovi; *p* – statistička značajnost.

Konačno, poređen je morfološki disparitet (varijansa, kanalisanos razvića) između 12S rRNK klastera unutar polova (Slika 28). Utvrđeno je da morfološki disparitet ženki tri grupe konzistentan, dok se kod mužjaka razlikuje (karapaks: Peloponez i Zapad, plastron: Istok i Zapad) (Slika 28). Generalno, najmanji morfološki disparitet uočen je kod linije Zapad (Slika 28).

Na osnovu interseksualne i intraseksualne varijabilnosti oblika karapaksa i plastrona evidentno je da ove dve morfološke strukture ne pokazuju isti obrazac diskriminacije polova i genetičkih klastera, tj. da su promene oblika pol-specifične (Tabele 11-16, Slika 22-27).



Slika 27. Promene oblika karapaksa i plastrona *Testudo hermanni boettgeri* bez korigovanja za alometriju između 12S rRNK genetičkih klastera mužjaka uvećane pet puta. Sem u slučaju oblika karapaksa između Peloponez i Istok – označen par sa zvezdicom, razlike u obliku karapaksa mužjake su statistički značajne u podacima koji su korigovani za alometriju. Oblik plastrona nije ispitivan nakon korigovanja za alometriju zbog utvrđenih razlika u alometrijskim trajektorijama između 12S rRNK grupe mužjaka. 12S rRNK grupe su obeležene sa tri boje: Peloponez – crvena, Istok – plava i Zapad – zelena. Stepenn razlika je izražen Prokrustovom distancom (PD) i Mahalanobisovom distancom (MD). Statistička značajnost distanci utvrđena je permutacionim testom sa 1000 iteracija. West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez.



Slika 28. Razlike u disparitetu oblika karapaksa (gornji red) i oblika plastrona (donji red) *Testudo hermanni boettgeri* između grupa definisanim na osnovu varijabilnosti 12S rRNK za svaki pol. Svaki boksplot predstavlja distribuciju dispariteta svake grupe nakon 1000 butstrap iteracija koja je izdvojena na četiri kvartila, a puna horizontalna linija unutar boksplota označavaju medijanu. Isprekidane horizontalne linije unutar boksplota označavaju uočeni disparitet svake grupe (Istok – crna boja, Peloponez – crvena boja, Zapad – zelena boja). Statistička značajnost razlike dispariteta utvrđena je permutacionim testom sa 1000 iteracija i p vrednosti nalaze se iznad svakod para koji se poredi na boksplotu. Carapace- karapaks, West- Zapad, East- Istok, Peloponnese- Peloponez, Females- ženke, Males- mušjaci.

5. DISKUSIJA

5.1. Genetička varijabilnost i genealogija gena

12S rRNK i *cytb* mtDNK

U radu je analizirana prostorna distribucija varijabilnosti *12S* rRNK *Testudo hermanni boettgeri* korišćenjem dostupnih sekvenci iz Banke gena i 76 *de novo* sekvenci jedinki poreklom sa 32 lokaliteta sa Balkanskog poluostrva (Hrvatska, Crna Gora, Bosna i Hercegovina, Srbija, Rumunija, Republika Severna Makedonija, Albanija i Grčka). Naši podaci su ukazali na odsustvo intrapopulacione varijabilnosti, osim u uzorku sa Pčinje u kome su detektovana dva (HIII i HIV) od ukupno četiri geografski distribuirana haplotipa (HI-HIV) registrovana na celom Balkanu. Nasuprot našoj studiji Perez *i sar.* (2014) su utvrdili intra- i interpopulacionu varijabilnost *12S* rRNK u celom arealu vrste *T. hermanni*. U datoj studiji se navodi 27 haplotipova koji se međusobno razlikuju u 25 varijabilnih pozicija sa 26 supstitucija, a koji su grupisani u “zapadne” i “istočne” populacije korespondirajući sa nominalnim podvrstama *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri*. Od 27 haplotipova, 15 haplotipova (56%) su jedinstveni, tj. zabeleženi su za pojedinačne jedinke, od toga šest od 11 u populacijama zapadne podvrste *T. h. hermanni* i devet od 16 haplotipova u populacijama istočne podvrste *T. h. boettgeri* (Perez *i sar.*, 2014). Iako se geografska distribucija populacija korišćenih u analizama Perez *i sar.* (2014) i našem radu razlikuje, smatramo da ovo nije uzrok uočenim razlikama. Na primer, podaci o varijabilnosti *T. h. boettgeri* u Grčkoj ukazuju da razlike u dizajnu uzoraka verovatno nije objašnjenje razlikama između studija. U Grčkoj su u našem radu utvrđena tri haplotipa (Djurakic & Milankov, 2019b), dok su Perez *i sar.* (2014) dokumentovali 11 od 16 uočenih za podvrstu *T. h. boettgeri*. Slično našoj studiji, van der Kuyl *i sar.* (2002) su analizom 40 jedinki podvrste *T. h. hermanni* i devet jedinki podvrste *T. h. boettgeri* registrovali samo tri varijabilne pozicije (p -distanca = 0,7%) između dve podvrste (dve supstitucije za *T. h. hermanni* i tri za *T. h. boettgeri*). U sledećoj analizi filogenije *T. hermanni* na osnovu *12S* rRNK gena (Mirimin *i sar.*, 2004) su identifikovana dva divergentna klastera koja korespondiraju podvrstama *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri*.

Uzimajući u obzir da varijabilnost *12S* rRNK gena u radu Perez *i sar.* (2014) nije u saglasnosti sa (manjom) varijabilnošću koja je dobijena u našem radu, kao i činjenicu da su naši podaci u saglasnosti sa publikovanim podacima u drugim studijama (van der Kuyl *i sar.*, 2002; Mirimin *i sar.*, 2004), u ovom radu su urađene dve nezavisne filogenetske analize. Prva, Bajesova analiza koja je uključila sve dostupne sekvence iz Banke gena (Álvarez *i sar.*, 2000;

van der Kuyl *i sar.*, 2002; Fritz & Bininda-Emonds, 2007; Salinas *i sar.*, 2011; Perez *i sar.*, 2014) nije podržala podelu vrste *T. hermanni* na dve podvrste (Slika 15), inače, opšteprihvaćenu taksonomiju šumske kornjače (Bertolero *i sar.*, 2011) zasnovanu na nezavisnoj analizi *cytb* mtDNK varijabilnosti (Fritz *i sar.*, 2006). U sledećoj analizi u našoj studiji, u koju su isključene sekvence Perez *i sar.* (2014), podela vrste na podvrste *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri* je podržana (Slika 16). Važno je naglasiti da su Perez *i sar.* (2014) utvrdili podelu vrste na dve nominalne podvrste upotrebom metode parsimonije (Templeton *i sar.*, 1992) prilikom rekonstruisanja mreže haplotipova. Međutim, neusaglašenost između filogenetskih analiza baziranim na određenom evolucionom modelu nukleotidnih supstitucija i rekonstruisane mreže haplotipova moguće je objasniti sa analitičkog stanovišta. Naime, rekonstrukcija mreže haplotipova osetljiva je na odsustvo haplotiva koji nisu analizirani zbog dizajna uzorkovanja (Cassens, Mardulyn & Milinkovitch, 2005), nedostajućim bazama u sekvencama (npr. zbog greške u očitavanju zimograma) (Joly, Stevens & van Vuuren, 2007) ili pod povećanom stopom supstitucije (Woolley, Posada & Crandall, 2008). Takođe, potencijalno objašnjenje krije se u činjenici da rekonstrukcija mreže haplotipova nije bazirana na određenom evolucionom modelu već statističkom (Morrison, 2005).

Prostorna distribucija molekularne varijabilnosti *T. hermanni* je testirana i analizom *cytb* mtDNK. Studija varijabilnosti *cytb* mtDNK šumske kornjače je ujedno i prva sveobuhvatna filogeografska analiza (Fritz *i sar.*, 2006), koja je polazna osnova za taksonomsku podelu i poziciju *T. hermanni* (Bertolero *i sar.*, 2011). U našem radu je baza podataka o *cytb* mtDNK varijabilnosti šumske kornjače proširena i upotpunjena, čime je obezbeđen bolji uvid i razumevanje o povezanosti genske genealogije i geografske distribucije. Primenom analize prostorne molekularne varijabilnosti *cytb* mtDNK vrste *T. hermanni* u celom njenom arealu, utvrđeno je da zapadna (HV - HVIII) i istočna (HI - HIV) haplogrupa korespondiraju nominalnim podvrstama *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri* koje su Alpskim i Dinarskim planinskim sistemima razdvojene (Djurakic & Milankov, 2019a). U okviru balkanskih populacija, našom analizom su utvrđena dva divergentna haplotipa koja i geografski korepsondiraju. Naime, HI je registrovan u populacijama duž Jadranske obale, od severnog dela Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Albanije do severnog dela Grčke, dok se HII isključivo nalazi u populacijama istočnog, centralnog i južnog dela Balkana (Rumunija, Srbija, Republika Severna Makedonija, južni deo kontinentalne Grčke i Peloponez). Znači, *cytb* mtDNK genealogija deli nominalnu podvrstu *T. h. boettgeri* na dve jasne genetičke jedinice ili linije, Zapad i Istok. Za razliku od *12S* rRNK, kojom su populacije sa Peloponeza identifikovane kao zasebna evolucionarna jedinica, u slučaju *cytb* mtDNK, *T. h.*

boettgeri sadrži dve genetičke linije. Zbog posedovanja zajedničkog haplotipa filogenetske linije Istok i Peloponez, prethodno definisane na osnovu *12S* rRNK, čine jednu evolucionu jedinicu. Međutim, prostornom analizom varijabilnosti oba gena upotrebom Geneland paketa potvrđena je strukturiranost *T. h. boettgeri* na tri genetička klastera ili evolucione linije, čime je dobijena saglasnost između *12S* rRNK genealogije i multilokusne (*12S* rRNK + *cytb* mtDNK) genealogije.

Uporednom analizom dva gena (*12S* rRNK i *cytb* mtDNK) na istom setu uzoraka obezbeđen je bolji uvid u njihovu molekularnu evoluciju i informativnu vrednost. Značajne razlike u vremenu divergencije *Testudo* taksona ukazuju na važnost u pažljivom izboru molekularnih markera u kontekstu evolucione istorije i taksonomske pozicije grupe koja se analizira. Recimo, vreme divergencije kalibrisano po osmostruko sporijoj stopi od $\approx 0,25\%$ po Mya (Avice *i sar.*, 1992) između *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri* Zapad je dvostruko sporije u slučaju *cytb* mtDNK (8,8 Mya) u odnosu na *12S* rRNK (4,4 Mya). Slično tome, vreme divergencije između *T. h. boettgeri* Zapad i Istok je na osnovu *cytb* mtDNK datirano na Kasni Pliocen (2,8 Mya), za razliku od Ranog Pleistocen (1,6 Mya), pretpostavljenog vremena divergencije izračunatog na osnovu *12S* rRNK gena. Očekivano veće razlike u datiranju vremena divergencije na osnovu dva analizirana gena su dobijena u slučaju *T. horsfieldii* i *T. hermanni* (*cytb* mtDNK: 44 Mya; *12S* rRNK: 14 Mya). Imajući u vidu paleontološke podatke koji ukazuju da je *T. hermanni* bila jedina *Testudo* vrsta u zapadnoj Evropi tokom Pleistocena (vrsta *T. hermanni* je zamenila pliocensku vrstu *T. globosa* Portis 1890 tokom Ranog Pleistocena), da najstariji *Testudo* fosili u Evropi datiraju od pre oko 10 Mya (de Broin, 2001), kao i da klada *T. hermanni* datira od pre oko 2,5 Mya (Luján *i sar.*, 2016), molekularni sat zasnovan na *12S* rRNK se čini verovatnijim u odnosu na sporoevoluirajući *cytb* mtDNK. Od brojnih molekularnih markera koji se koriste u filogenetskim i filogeografskim studijama kornjača (McGaugh *i sar.*, 2007), *cytb* mtDNK i *12S* rRNK su geni koji su najviše analizirani. Utvrđene razlike u našem radu između *12S* rRNK i *cytb* mtDNK su posledica razlike u stopi mutacije, te je stoga, na primeru *T. hermanni* još jednom potvrđeno da svaki gen, fragment DNK i/ili genom ima specifičnu evolucionu istoriju i da predstavlja za vrstu specifičnu karakteristiku (Funk & Omland, 2003).

Osim što je razlika u stopi mutacija molekularnih markera korišćenih u sistematici i filogeniji *Testudo* taksona uticala na diskutabilnu poziciju *T. hermanni*, i filogenija samog roda je imala značajan uticaj. Naime, revizijom filogenije roda *Testudo* je ukazano na nestanak brojnih blisko srodnih vrsta tokom Miocena i Pliocena koji je rezultovao opstankom samo *T. hermanni* u datoj filogenetskoj kladi, a vrsta *T. horsfieldii* je postala njen najbliži živi

srodnik (Luján *i sar.*, 2016). Nadalje, u bližoj prošlosti, tokom Pleistocena, velike fluktuacije u vlažnosti (i temperaturi) su uslovile nastanak polupustinjskih ekosistema u Mediteranskoj oblasti, te je fragmentacija staništa bila izražena (Morales Pérez & Serra, 2009). Smatra se da je *T. hermanni* tokom Poslednjeg Maksimuma Glacijacije (pre oko 25000 godina) bila fragmentisana u samo nekoliko refugijalnih populacija u zapadnoj Evropi, što je ostavilo genetički otisak u recentnim populacijama (redukovana genetička varijabilnost i alopatrička diverzifikacija) (van der Kuyl *i sar.*, 2002; Fritz *i sar.*, 2006; Perez *i sar.*, 2014). Znači, kompleksna biogeografska istorija je imala snažan efekat na evoluciju *Testudo* taksona (više o tome u poglavlju Istorijaska biogeografija).

5.2. Varijabilnost oblika karapaksa i plastrona

Testudo hermanni boettgeri

Upotrebom geometrijske morfometrije analiziran je oblik karapaksa na uzorku od 587 jedinki i plastrona (564 jedinke) šumske kornjače. Analiziran je polni dimorfizam kao i razlike u obliku morfoloških struktura između genetički definisanih klastera unutar svakog pola. Podaci ukazuju da je oblik karapaksa i plastrona izrazito polno dimorfan, kao i da postoje suptilne ali statistički značajne razlike između genetičkih klastera unutar oba pola. Efekat polnog dimorfizma je višestruko veći u strukturiranju varijabilnosti oblika karapaksa i plastrona u odnosu na efekat genetičkih klastera.

5.2.1. Polni dimorfizam oblika karapaksa i plastrona

Testudo hermanni boettgeri

Polni dimorfizam je dobro dokumentovan fenomen, kako kod tetrapodnih kičmenjaka (Fairbairn, Blanckenhorn & Székely, 2007; Berns, 2013; Fairbairn, 2013), tako i kod kornjača (Stephens & Wiens, 2009; Bonnet, Delmas & El-Mouden, 2010; Ceballos *i sar.*, 2012; Halámková, Schulte & Langen, 2013; Ceballos & Iverson, 2014), uključujući i ispitivanu vrstu u ovoj tezi (Willemsen & Hailey, 1999a, 2003; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013; Golubović *i sar.*, 2013; Stojadinović *i sar.*, 2013; Golubović *i sar.*, 2015). Međutim, polni dimorfizam u veličini morfoloških struktura (Demuth, 2001; Gosnell, Rivera & Blob, 2009; Lubiana & Ferreira Júnior, 2009; Stephens & Wiens, 2009) bolje je ispitan u odnosu na polni dimorfizam u obliku (Bonnet *i sar.*, 2001; Valenzuela *i sar.*, 2004; Ben Kaddour *i sar.*, 2008; Bonnet *i sar.*, 2010; Ceballos & Valenzuela, 2011; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013). Dodatno, studije koje su ispitivale polni dimorfizam u obliku gde su morfološke strukture analizirane geometrijskom morfometrijom (Valenzuela *i sar.*, 2004; Ceballos & Valenzuela, 2011; Macale, Venchi & Scalici, 2011; Vega & Stayton, 2011; Golubović *i sar.*, 2015), daleko su malobrojnije u odnosu na studije koje su oblik, tj. formu, izražavale preko relativnih linearnih distanci i indeksa (Bonnet *i sar.*, 2001; Ben Kaddour *i sar.*, 2008; Bonnet *i sar.*, 2010; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013; Stojadinović *i sar.*, 2013).

U našem radu je utvrđen polni dimorfizam oblika karapaksa i plastrona što je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje su ispitivale polni dimorfizam oblika kod *Testudo hermanni* koristeći linearne distance (Willemsen & Hailey, 2003; Zuffi & Plaitano, 2007; Bonnet *i sar.*, 2010; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013). Za razliku od prethodnih studija koje nisu testirale efekat alometrije (Willemsen & Hailey, 2003; Zuffi & Plaitano, 2007; Bonnet *i sar.*, 2010; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013), naše analize pokazuju da je odnos veličine i oblika (statičke alometrijske trajektorije; (Klingenberg, 1996) kako kod karapaksa, tako i plastrona polno-specifičan, tj. da su alometrijske trajektorije različite između mužjaka i ženki. Studija koja je ispitivala vezu oblika karapaksa i parametre samookretanja kornjača (*self-rigithing*) gde je oblik kvantifikovan geometrijskom morfometrijom, pokazala je da alometrijski efekat postoji kod oba pola, međutim nije utvrđena pol-specifičan alometrijski efekat kao u ovoj tezi (Golubović *i sar.*, 2015). Uzorak koji je analiziran u Golubović *i sar.* (2015) obuhvatio je 118 adultnih šumskih kornjača (54 mužjaka i 64 ženke) poreklom sa pet lokaliteta od kojih se dva nalaze u Crnoj Gori, dva u Republici Severnoj Makedoniji i jedan u Srbiji. Na teritoriji Crne

Gore distribuiran je haplotip HI, a na teritoriji Srbije i Republici Severnoj Makedoniji HIII (i HIV), dok individue koje pripadaju HII haplotipu (Peloponez) nisu analizirane. Moguće je da su razlike dve studije posledica heterogenosti uzorkovanja i/ili analitičke procedure jer su Golubović *i sar.* (2015) u svom radu analizovali i distalni deo marginalnih pločica (4 parne specifične tačke) koje nisu obuhvaćene u ovoj studiji. Diferencijalni rast morfoloških struktura između polova najčešće ima adaptivan značaj pored toga što je značajno kanalisano razvićem (Egset *i sar.*, 2012; Voje *i sar.*, 2014; Harrison, 2015). Dodatno, uočeno je da količina i kvalitet dostupnih hranidbenih resursa može uticati na diferencijalnu brzinu razvića polova (pol-specifična stopa rasta), a samim tim i na pojavu divergentnih alometrijskih trajektorija (Bonduriansky, 2007). Kod kornjača, pol-specifična plastičnost u razviću (veliçine i oblika) je testirana kod dve vrste, *Chelydra serpentina* (Ceballos & Valenzuela, 2011) i *Podocnemis expansa* (Ceballos *i sar.*, 2014). Rezultati studija ukazuju na odsustvo konsenzusa jer *Chelydra serpentina* ispoljava pol-specifičan odgovor, dok *Podocnemis expansa* ne ispoljava. Dosadašnji rezultati (Ceballos & Valenzuela, 2011; Ceballos *i sar.*, 2014), uključujući i one koji su predstavljeni u ovoj studiji ukazuju da su pol-specifični odgovori na genetičke i sredinske faktore kod kornjača najverovatnije specifični za vrstu, mada dodatna istraživanja su potrebna. Pored toga što ispitivanje statičke alometrije (Klingenberg, 1996) nije primarni fokus ove studije, naši podaci 1) predstavljaju osnovu za detaljniju analizu evolucije i održavanja polnog dimorfizma posredstvom alometrije kod *Testudo hermanni*; 2) ukazuju da regresione metode (ANCOVA, MANCOVA) nisu najadekvatnije za ispitivanje polnog dimorfizma u slučaju kada alometrijske trajektorije nisu homogene imajući u vidu da su bazirane na pretpostavci homogenih alometrijskih trajektorija (Klingenberg, 1996; Fairbairn, 1997; Smith, 1999). Polno dimorfne promene oblika unutar *12S* rRNK genetičkih klastera u velikoj meri se podudaraju pored toga što smo analizom fenotipskih trajektorija utvrdili da intenzitet i smer polnog dimorfizma nije isti u *12S* rRNK definisanim grupama (pogledati sledeći paragraf).

Polno dimorfne promene oblika karapaksa u svim populacijama ogledaju se u relativno razvijenijoj IV i V vertebralnoj pločici kod mužjaka, kao i u činjenici da su mužjaci relativno širi u odnosu na ženke, posebno u posteriornom delu. U saglasnosti sa našim nalazima, prethodne studije su pokazale da je IV vertebralna pločica relativno šira kod mužjaka (Djordjević *i sar.*, 2011, 2013), međutim ovaj obrazac nije potvrđen u populacijama *Testudo hermanni* iz Grčke (Willemsen & Hailey, 2003). Relativno širi karapaks mužjaka u odnosu na ženke šumske kornjače dokumentovan je u prethodnim studijama baziranim na linearnoj (Willemsen & Hailey, 2003; Djordjević *i sar.*, 2011, 2013) i geometrijskoj

morfometriji (Golubović *i sar.*, 2015). Varijabilnost oblika V vertebralne pločice do sada nije detaljno analizirana kvantitativnim metodama, međutim značajnost ovog regiona ukazana je u studiji koja je bazirana na makromorfološkoj kvalitativnoj analizi koštanih elemenata karapaksa i linearnim distancama koje su merile lateralno zakrivljenje ovog regiona (Djordjevic, 2015). Naime, u prirodnim populacijama uočene su kornjače koje poseduju ispuščenu V vertebralnu pločicu (posmatrano sa lateralne strane životinje) i one koje imaju blago zakrivljenje (Djordjevic, 2015). Međutim, ove studije nisu direktno uporedive imajući u vidu da je u ovoj tezi analizirana dorzalna perspektiva karapaksa upotrebom kvantitativne metode, a u prethodnoj studiji istražena je lateralna strana karapaksa (uključujući i V vertebralnu pločicu) tradicionalnim kvalitativnim i kvantitativnim pristupom (indeksi linearnih distanci) (Djordjevic, 2015). V vertebralna pločica je u neposrednom kontaktu sa posteriornim marginalnim pločicama - suprapakaudalnim, a za koje se smatra da (pored analnih pločica plastrona) direktno učestvuju u formiranju prostora koji omogućava veću pokretljivost repa mužjaka prilikom parenja (Willemsen & Hailey, 2003; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013). Slično prethodnom, relativno širi posteriorni deo karapaksa mužjaka je u neposrednom kontaktu sa osmom, devetom i desetom marginalnom pločicom koje formiraju takozvanu "haljinicu" i omogućavaju veću pokretljivost zadnjih ekstremiteta koja je krucijalno bitna prilikom kopulacije (Willemsen & Hailey, 2003; Zuffi & Plaitano, 2007; Bonnet *i sar.*, 2010; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013). Efekat marginalnih pločica nije direktno analiziran u tezi, ali dosadašnja ispitivanja pokazuju da se mužjaci sa razvijenijim marginalnim pločicama u proseku sporije okreću (*self-righting*) u odnosu na mužjake kod kojih su marginalne pločice manje razvijene (Golubović *i sar.*, 2015). To implicira na efekat međusobnog ograničenja (*trade-off*), jer karapaks pored uloge u okretanju ima ulogu u kretanju, kao i odbrani od predatora, a navedene funkcije favorizuju drugačiji fenotip (Stayton, 2019). Polno dimorfna karakteristika karapaksa je i položaj suture između prve i druge vertebralne pločice, tj. prva vertebralna pločica kod mužjaka je relativno više razvijena u odnosu na ženke. Generalno, polno dimorfne karakteristike karapaksa *Testudo hermanni* koje su predstavljene u ovoj studiji su u saglasnosti sa nalazima prethodnih studija (Willemsen & Hailey, 2003; Zuffi & Plaitano, 2007; Bonnet *i sar.*, 2010; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013; Djordjevic, 2015; Golubović *i sar.*, 2015). Održavanje polno dimorfnih karakteristika karapaksa mužjaka najčešće se dovodi u vezu sa delovanjem seksualne selekcije koja favorizuje veću pokretljivost ekstremiteta (povećanjem relativne širine karapaksa u posteriornom delu) i repa (razvijenije marginalne pločice – posebno suprapakaudalna), dok dorzalna perspektiva oblika karapaksa ženki najverovatnije se održava selekcijom koja povećava fekunditet – karapaks

ženki je više ovalan, tj. poseduje veću zapreminu što omogućava skladištenje većih i/ili većeg broja jaja (Willemsen & Hailey, 2003; Valenzuela *i sar.*, 2004; Carretero *i sar.*, 2005; Zuffi & Plaitano, 2007; Bonnet *i sar.*, 2010; Djordjevic *i sar.*, 2011; Macale *i sar.*, 2011; Djordjevic *i sar.*, 2013; Djordjevic, 2015; Golubović *i sar.*, 2015). Za razliku od prethodnih studija, održavanje polno dimorfnih (ili konzervativnih) karakteristika karapaksa mogu se interpretirati u svetlu filogenetskog i/ili ontogenetskog konzervatizma razvića (Sanger *i sar.*, 2013; Abzhanov, 2017). Naime, dorzalna perspektiva karapaksa (vertebralne i kostalne pločice analizirane u ovom radu) predstavlja modifikovan grudni koš vertebrata (Gilbert *i sar.*, 2001; Gilbert, Cebra-Thomas & Burke, 2008; Kuratani & Nagashima, 2012; Hirasawa *i sar.*, 2015; Rice *i sar.*, 2015), tj. aksijalni skelet koji je na makromorfološkom planu konzervativan kod tetrapodnih kičmenjaka (McIntyre *i sar.*, 2007). Kod kornjača vertebralne dermalne pločice II – IV se nalaze iznad koštanih vertebralnih elemenata koji su srasli sa kičmenicom, dok su kostalne dermalne pločice I – IV iznad okoštalog dela koji inkorporira rebra (Kuratani & Nagashima, 2012). Svi ovi dermalni elementi, sem vertebralne pločice IV, ispoljavaju značajnu konzervativnost između polova implicirajući na to da mužjaci i ženke tokom ontogenije dele slične razvojne trajektorije karapaksa, tj. da je varijabilnost ovog dela karapaksa filogenetski i ontogenetski konzervativniji u odnosu na elemente karapaksa koji nisu direktno srasli sa aksijalnim skeletom. Elementi koji nisu direktno srasli sa aksijalnim skeletom su anteriorni deo I, kao i posteriorni deo V vertebralne pločice, i ovi koštani elementi su se pokazali u ovom radu kao dominantno polno dimorfne karakteristike, a i prethodne studije na *T. hermanni*, kao i drugim vrstama kornjača ukazuju na ovu konzistentnost (Willemsen & Hailey, 2003; Valenzuela *i sar.*, 2004; Carretero *i sar.*, 2005; Zuffi & Plaitano, 2007; Bonnet *i sar.*, 2010; Ceballos & Valenzuela, 2011; Djordjevic *i sar.*, 2011; Macale *i sar.*, 2011; Djordjevic *i sar.*, 2013; Djordjevic, 2015; Golubović *i sar.*, 2015). Kao I i V vertebralna pločica, marginalni koštani elementi nisu direktno srasli sa aksijalnim skeletom, a pored te činjenice, marginalne pločice su morfološka celina prisutna samo kod kornjača (apomorfna karakteristika) (Lyson *i sar.*, 2010; Kuratani, Kuraku & Nagashima, 2011; Hirasawa, Nagashima & Kuratani, 2013). Imajući u vidu da vertebralne i kostalne pločice zajedno sa marginalnim formiraju karapaks, možemo očekivati značajno kovariranje ovih struktura iako su one različitog filogenetskog porekla (Lyson *i sar.*, 2010; Kuratani *i sar.*, 2011; Hirasawa *i sar.*, 2013). U tom kontekstu, relativno duža V vertebralna, kao i distalno proširenje kostalnih pločica u posteriornom region mužjaka je očekivano zbog korelativne (funkcionalne) veze sa marginalnih koštanim elementima čija građa i oblik direktno utiče na povećanje fizičkog prostora za manevrisanje ekstremiteta i repa prilikom

kopulacije (Willemsen & Hailey, 2003; Carretero *i sar.*, 2005; Zuffi & Plaitano, 2007; Bonnet *i sar.*, 2010; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013b; Djordjevic, 2015; Golubović *i sar.*, 2015).

Polno dimorfne karakterisitke oblika plastrona najizraženije su u posteriornom, distalnom i nivou suture između humeralnih i pektoralnih pločica. Naime, mužjaci poseduju relativno šire analne i femoralne pločice, uključujući distalni deo abdominalnih pločica u odnosu na ženke, a takođe plastron mužjaka je relativno kraći nego kod ženki. Koštani mostovi koji su ekstenzija pektoralnih i abdominalnih pločica i artikulušu sa marginalnim pločicama karapaksa su nešto kraći kod mužjaka u odnosu na ženke. Obrazac polnog dimorfizma oblika plastrona kod *Testudo hermanni* uočen u ovom radu je u saglasnosti sa studijama baziranim na linearnim merama (Willemsen & Hailey, 2003; Zuffi & Plaitano, 2007; Ben Kaddour *i sar.*, 2008; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013). Kao i u slučaju oblika karapaksa, širi razmak između analnih pločica plastrona povećava prostor za manevrisanje repa prilikom kopulacije zbog čega se smatra da su ovi regioni pod izrazitim uticajem seksualne selekcije (Willemsen & Hailey, 2003; Mann, O’Riain & Hofmeyr, 2006; Zuffi & Plaitano, 2007; Ben Kaddour *i sar.*, 2008; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013). Kraći mostovi mužjaka omogućavaju veću pokretljivost ekstremiteta prilikom kopulacije (Willemsen & Hailey, 2003; Zuffi & Plaitano, 2007; Ben Kaddour *i sar.*, 2008; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013), brže samookretanja (Golubović *i sar.*, 2013) zbog čega je ovakav oblik plastrona favorizovan od strane seksualne i prirodne selekcije. Konačno, naša studija je pokazala da oblik dve makromorfološke celine oklopa kornjača, karapaks i plastron, ne ispoljavaju isti stepen polnog dimorfizma, gde je oblik plastrona daleko polno dimorfiji u odnosu na karapaks. Slična opažanja su uočena kod *Chelydra serpentina* gde je pokazano da juvenilne jedinke ove vrste akvatične kornjače prvo postaju polno dimorfne u obliku plastrona, dok oblik karapaksa ispoljava polni dimorfizam u kasnijim fazama ontogenije (Ceballos & Valenzuela, 2011). U suprotnosti sa prethodnim, juvenilne jedinke druge dve vrste akvatičnih kornjača, *Chrysemys picta* i *Podocnemis expansa*, ispoljavaju polni dimorfizam oblika karapaksa u juvenilnom stadijumu (Valenzuela *i sar.*, 2004; Ceballos *i sar.*, 2014). Ovi rezultati ukazuju da je pol specifična diferencijacija oblika karapaksa tokom ontogenije najverovatnije specifičana za vrstu.

Pored toga što smo u radu utvrdili postojanje za pol specifičnih alometrijskih trajektorija, na osnovu analize fenotipskih trajektorija (Collyer & Adams, 2013) utvrđeno je da se obrazac polnog dimorfizma razlikuje između grupa definisanim genetičkim klasterima. Stepem, intenzitet (magnitudo) polnog dimorfizma oblika karapaksa i plastrona izražen je preko Prokrustove distance (PD), dok je smer polnog dimorfizma izražen preko ugla između

dve fenotipske trajektorije (Collyer & Adams, 2013). Na osnovu vrednosti PD uočeno je da je stepen polnog dimorfizma oblika karapaksa i plastrona šumske kornjače najmanji u populacijama Zapadne *I2S* rRNK grupe i da se on statistički razlikuje od stepena polnog dimorfizma preostala dva genetička klastera, kao i da je stepen polnog dimorfizma oblika karapaksa i plastrona između Istok i Peloponez genetičkih klastera isti. Za razliku od stepena polnog dimorfizma oblika karapaksa i plastrona koji pokazuju isti obrazac (između grupa genetičkih klastera), smer polnog dimorfizma u obliku ne pokazuje konzistentne rezultate za ove dve morfološke strukture što ukazuje na pol-specifične odgovore karapaksa i plastrona. Naime, smer polnog dimorfizma oblika karapaksa jedino je konzistentan između Istok i Peloponez genetičkih klastera, dok je smer polnog dimorfizma oblika plastrona različit jedino između Istok i Zapad klastera. Prethodne studije bazirane na linearnim distancama ukazale su da polni dimorfizam oblika karapaksa i plastrona kod *Testudo hermanni* (Willemsen & Hailey, 2003; Djordjevic *i sar.*, 2011), kao i kod drugih predstavnika roda *Testudo* (Bonnet *i sar.*, 2001; Ben Kaddour *i sar.*, 2008) konzistentno varira kada su generalne mere u pitanju (npr. relativne distance dužine, širine, visine karapaksa i plastrona). Dodatno, makroevolucionarni obrazac smer polnog dimorfizma oblika karapaksa i plastrona kod akvatičnih i terestričnih kornjača je ukazao na konzervativnost ovog fenomena (Bonnet *i sar.*, 2010) što je u suprotnosti sa obrascem koji je predstavljen u tezi. Međutim, neke karakteristike (npr. relativne distance koje opisuju oblik lateralnog zakrivljenja V vertebralne pločice) nisu konzistentno polno dimorfne (Djordjevic *i sar.*, 2011). Razlike između naše studije i prethodnih mogu se interpretirati na dva načina. Prvo, razlika između naše studije i prethodnih koje su ispitivale obrazac polnog dimorfizma populacija šumske kornjače poreklom sa Balkanskog poluostrva (Willemsen & Hailey, 2003; Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013) može se objasniti činjenicom da su prethodne studije najverovatnije analizirale populacioni obrazac polnog dimorfizma unutar jednog genetičkog klastera, tj. populacije koje pripadaju našem Istok *I2S* rRNK klasteru (zbog geografske distribucije analiziranih populacija u kontekstu genetičke strukture utvrđene u ovom radu). U tom slučaju nalazi prethodnih studija u odnosu na naše mogu se interpretirati kao saglasni, mada potrebna su dodatna istraživanja sa adekvatnijim uzorkom u cilju testiranja ove hipoteze. Drugo, razlike između studija mogu se objasniti metodološkim razlikama prilikom analize ispitivanog fenomena: 1) linearne distance su zapravo set autokoreliranih veličinskih parametara određene morfološke strukture koje se u ANCOVA dizajnu analiziraju kao nezavisne karakteristike, dakle ne uzima u obzir kovarianje (autokorelaciju) pojedinačnih linearnih distanci zbog čega je veoma teško generalizovati da li je polni dimorfizam oblika (morfološke

strukture u celini) konzistentan i u kojoj meri (Bookstein, 1982); 2) imajući u vidu da se alometrijske trajektorija polova razlikuju (rezultat ove studije), skaliranje linearnih distanci pomoću regresionih metoda (ANCOVA, MANCOVA) je statistički neopravdano (Klingenberg, 1996; Fairbairn, 1997; Smith, 1999); 3) nasuprot metodologiji koju su primenili Bonnet i koautori (2010), makroevolucione obrasce morfološke varijabilnosti trebalo bi analizirati eksplicitno komparativnim metodama koje uzimaju u obzir autokorelaciju morfoloških karakteristika zbog deljene zajedničke istorije taksona [pod uslovom da morfološke celine evoluiraju po modelu Braunovog kretanja (*Brownian motion*)] (Felsenstein, 1985, 1988); 4) poznato je da je gometrijska morfometrija daleko osetljivija metoda u odnosu na linearnu morfometriju kada je u pitanju detektovanje suptilne varijabilnosti oblika, a takođe u tradicionalnoj morfometriji fundamentalno je nemoguće odvojiti parametre veličine od parametara oblika (Bookstein, 1991; Adams *i sar.*, 2004, 2013). Zbog prethodno navedenog, direktno poređenje naše studije sa prethodnim je limitirano. Konačno, u kojoj meri sredinski faktori utiču na obrazac polnog dimorfizma oblika karapaksa i plastrona kod nedavno divergiranih linaja unutar *T. h. boettgeri* ostaje otvoreno. Dostupni podaci ukazuju da je obrazac polnog dimorfizma oblika karapaksa (kvantifikovan geometrijskom morfometrijom) invarijabilan u odnosu na sredinske faktore kod kornjače *Chelydra serpentina* (Ceballos *i sar.*, 2014).

5.2.2. Intraseksualna varijabilnost divergentnih linija

Testudo hermanni boettgeri

S obzirom na to da je polni dimorfizam najdominantniji efekat koji strukturira varijabilnost oblika karapaksa i plastrona, kao i da se obrazac polnog dimorfizma razlikuje između genetičkih klastera, polovi su odvojeno analizirani. U našem radu utvrdili smo da se genetički klasteri Zapad, Istok i Peloponez razlikuju na osnovu oblika karapaksa (opisan % varijabilnosti: ženke – 6,4%, mužjaci – 5,3%), kao i oblika plastrona (opisan % varijabilnosti: ženke – 8%, mužjaci – 9%). Utvrđena suptilna varijabilnost je visoko statistički značajna između svih poređenih parova, stim da su razlike između mužjaka Peloponez i Istok linije posledica alometrijskog rasta karapaksa (npr. nakon alometrijske korekcije ove dve grupe se ne razlikuju). Takođe, alometrijske trajektorije plastrona kod mužjaka analiziranih genetičkih klastera divergiraju, dok su kod ženki homogene.

Promene oblika karapaksa ženki variraju u opsegu 0,016 – 0,024 jedinica Prokrustove distance i genetički klasteri se razlikuju na osnovu relativne širine vertebralnih pločica (npr. populacije sa Peloponeza imaju najšire vertebralne pločice), distalnog dela karapaksa, kao i prve vertebralne pločice (ove strukture su relativno šire kod jedinki Zapad genetičke linije u odnosu na druge dve). Kod mužjaka, promene oblika karapaksa variraju u opsegu od 0,016 – 0,021 jedinica Prokrustove distance i odnose se na relativnu širinu vertebralnih pločica (najšire su kod linije Peloponez, takođe), posebno prve vertebralne pločice koja je izražena u Zapad liniji. Interesantno je napomenuti da se anteriorni deo prve vertebralne dermalne pločice nalazi iznad nihalne kosti koja je derivat kleitruma i predstavlja neomorfnu karakteristiku kornjača (Lyson *i sar.*, 2013) i koja čini zaseban morfološki modul (Djurakic, Herrel & Jojić, 2014), a pokazano je da modularnost doprinosi morfološkoj i taksonomskoj diverzifikaciji (Eble, 2003; Wagner, Pavlicev & Cheverud, 2007; Frédérich *i sar.*, 2014). Za razliku od ženki, relativna širina karapaksa mužjaka je ista za sve genetičke linije. Geografska intraseksualna varijabilnost oblika karapaksa i plastrona analizirana je tradicionalnim pristupom (Djordjevic *i sar.*, 2013), međutim ne u kontekstu intraseksualne varijabilnosti divergentnih linija kao što je to u ovom radu. Studija koja je analizirala oblik karapaksa populacija *T. h. hermanni* u Italiji geometrijskom morfometrijom, pokazala je da oblik karapaksa kovarira sa geografskom širinom, kao i da se individue različitog geografskog porekla mogu razlikovati na osnovu oblika karapaksa (oba pola) i oblika plastrona (samo mužjaci) (Sacchi *i sar.*, 2007). Imajući u vidu da je genetička struktura populacija šumske

kornjače u Italiji uniformna (Mirimin *i sar.*, 2004; Fritz *i sar.*, 2006; Perez *i sar.*, 2014), ovi rezultati ukazuju da intraseksualne promene mogu biti posledica negenetičkih faktora kao što je već napomenuto.

Promene oblika plastrona ženki variraju u opsegu 0,015 – 0,025 jedinica Prokrustove distance i genetički klasteri se razlikuju primarno u anteriornom delu plastrona (npr. populacije sa Peloponeza imaju relativno kraće humeralne pločice u odnosu na druge dve linije), relativnom položaju i dužini koštanih mostova. Kod mužjaka, promene oblika plastrona variraju u opsegu od 0,018 – 0,025 jedinica Prokrustove distance i odnose se na anteriorni deo plastrona (isti obrazac kao kod ženki), kao i u medijalnom delu analnih i femoralnih pločica. Makroevoluciona analiza efekta filogenije na strukturiranje oblika plastrona pokazala je da je ova morfološka struktura filogenetski informativna (Angielczyk, Feldman & Miller, 2011). Takođe, ista studija je pokazala da je taj signal jači za filogeniju konstruisanu na osnovu mitohondrijske DNK (11% ukupne varijabilnosti oblika plastrona) u odnosu na jedarnu DNK (6% ukupne varijabilnosti oblika plastrona). Kvantitativna genetička studija (mikroevolucioni nivo) ukazala je da je oblik plastrona kvantifikovan geometrijskom morfometrijom heritabilna morfološka celina (Myers *i sar.*, 2006), dodatno ukazujući na značajnost ove morfološke strukture u detektovanju suptilne genetičke divergencije. Treba naglasiti da je indeks humeralne i pektoralne suture plastrona predložen za makromorfološki karakter koji razlikuje dve nominalne podvrste *T. hermanni* (Soler, Pfau & Martínez-Silvestre, 2012), a da je naša studija pokazala da taj region konzistentno varira između genetičkih linija koje su identifikovane unutar trenutno prepoznate istočne podvrste šumske kornjače, *T. h. boettgeri*. Kao i u slučaju nuhalne kosti karapaksa koja je derivat kleitruma (Lyson *i sar.*, 2013), koštani elementi ispod humeralne i pektoralne pločice – entoplastron i epiplastron – predstavljaju derivate interklavikule i klavikule i ti elementi prvi osifikuju, tj. morfološki se diferenciraju u odnosu na ostale koštane elemente plastrona (Cebra-Thomas *i sar.*, 2007; Rice *i sar.*, 2016).

U radu je analizirana fenotipske varijansa oblika karapaksa i plastrona između genetičkih klastera unutar polova. Uočeno je da se fenotipska varijansa ženki ne razlikuje značajno. Nasuprot toga, kod mužjaka razlike su detektovane između Peloponez i Zapad linije na osnovu oblika karapaksa i između Istok i Zapad linije na osnovu oblika plastrona. Zapad linija poseduje najmanju fenotipsku varijansu u odnosu na druge dve grupe. Promene fenotipske varijanse tokom divergencije mogu se limitirano interpretirati sa dva aspekta. Prvo, fenotipska varijansa predstavlja meru kanalisiranosti razvića jer razviće posreduje između sirovog genetičkog materijala i realizovanog fenotipa na koji deluje prirodna selekcija

(Waddington, 1957, Hall, 1992; Zelditch, 1995; Gibson & Wagner, 2000; Debat & David, 2001; Siegal & Bergman, 2002; Klingenberg, 2005; West-Eberhard, 2005; Flatt, 2005; Willmore *i sar.*, 2006; Pfennig *i sar.*, 2010; Sears, 2014). Naši rezultati ukazuju da su mehanizmi razvića koji generišu fenotipsku varijabilnost ženki verovatno stabilniji u odnosu na mužjake, što dodatno ukazuje na pol-specifičnu divergenciju genetičkih klastera koja je elaborirana prethodno (Ceballos & Valenzuela, 2011; Ceballos *i sar.*, 2014). Hipoteza adaptivne kanalisnosti (*adaptive canalization hypothesis*) predviđa da veći pol ispoljava manju morfološku plastičnost (tj. veću kanalisnost, manju morfološku varijansu) (Stillwell *i sar.*, 2010). Ženke šumske kornjače su veće od mužjaka (Willemsen & Hailey, 1999a; Djordjevic *i sar.*, 2011) i naši rezultati sugerišu da ženke ispoljavaju veći stepen kanalisnosti (manji stepen fenotipske varijanse) u odnosu na mužjake što je saglasno sa hipotezom adaptivne kanalisnosti (Stillwell *i sar.*, 2010). Mehanizam koji dovodi do veće kanalisnosti oblika karapaksa i plastrona ženki (manje morfološke varijanse) prema hipotezi adaptivne kanalisnosti je selekcija vezana za fekunditet što je saglasno sa prethodnim studijama koje su analizirale obrazac polnog dimorfizma kod šumske kornjače (Djordjevic *i sar.*, 2011, 2013). Međutim, naši rezultati su oprečni u odnosu na prethodnu studiju koja je ispitivala ovaj fenomen kod vodene kornjače *Chelydra serpentina* (Ceballos & Valenzuela, 2011). Konačno, smatra se da kanalisnost „amortizuje“, tj. ublažava (engl. *buffer*) efekte varijabilnih sredinskih faktora (sredinska kanalisnost) i/ili genetičkog opterećenja kao što su na primer mutacije (genetička kanalisnost) (Gibson & Wagner, 2000). Analitički dizajn u ovoj tezi ne omogućava da sa sigurnošću odvojimo sredinski efekat od genetičkog, stoga, naredne analize pod kontrolisanim eksperimentalnim uslovima će omogućiti bolje razumevanje interakcije sredinske i genetičke kanalisnosti u determinaciji oblika oklopa kornjača (Ceballos & Valenzuela, 2011; Ceballos *i sar.*, 2014).

Shodno predstavljenim rezultatima, naša studija je ukazala da su oblik karapaksa i plastrona informativne morfološke celine koje mogu detektovati ranu genetičku divergenciju na subspecijskom nivou. Naša studija je jedna od pionirskih koje su eksplicitno testirale korisnost geometrijske morfometrije u detektovanju genetičkih/taksonomskih entiteta kod kornjača, a koje su pokazale saglasnost morfoloških i genetičkih podataka (Chiari & Claude, 2011; Palupčíková *i sar.*, 2012; Murray *i sar.*, 2014; Protiva *i sar.*, 2016; Vitek, 2018). Generalno, kvantitativna analiza oblika je slabo korišćena u studijama taksonomije i sistematike životinja pored toga što ima veliki potencijal (Karanovic *i sar.*, 2016).

5.3. Istorijska biogeografija *Testudo hermanni boettgeri*

Naši rezultati zasnovani na Bajesovoj filogenetskoj rekonstrukciji i analizi koja eksplicitno uzima u obzir prostornu distribuciju varijabilnosti *12S* rRNK gena (saglasno sa multilokusnom analizom *12S* rRNK + *cytb* mtDNK), ukazuje na jasnu filogeografsku strukturu *Testudo hermanni boettgeri*, na populacije koje geografski korespondiraju sa tri evolucione linije. Prva linija – Zapad (HI) uključuje populacije sa Balkanskog poluostrva duž obala Jadranskog i Jonskog mora, od severne Hrvatske (populacije oko planine Velebit), Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Albanije i dva administrativna regiona u Grčkoj (Epirus i Makedonija). Druga evoluciona linija – Istok (HIII i HIV) uključuje populacije iz centralnog dela Balkana (istočno od Dinarida), južnu Rumuniju, istočnu i jugoistočnu Srbiju, Republiku Severnu Makedoniju, i (iznenađujuće) jugozapadnu centralnu Grčku. Treća linija – Peloponez (HII) uključuje populacije sa Peloponeza (Grčka). Važno je i napomenuti da su dobijene (neočekivane) vrednosti genetičke divergencije na osnovu *12S* rRNK između evolucionih linija u smislu da je razlika između *T. h. boettgeri* Peloponez i druge dve linije (Istok i Zapad) skoro jednaka genetičkim razlikama između *T. h. hermanni* i *T. h. boettgeri* Zapad i Istok linija. Najveći stepen razlika je dobijen za par *T. h. boettgeri* Zapad i Peloponez, a najmanja razlika je izračunata za par linija *T. h. boettgeri* Istok i Peloponez, ukazujući da je uzrok koji je doveo do stvaranja barijere i nezavisne evolucije linije Peloponez se desio ranije u odnosu na podelu koja je dovela do divergencije linija *T. h. boettgeri* Istok i Zapad.

Znači, našom filogeografskom analizom su otkrivene divergentne evolucione linije u okviru istočne podvrste *T. h. boettgeri*. Postavlja se pitanje da li utvrđena filogeografska struktura oslikava evolucione procese i biogeografsku istoriju Balkanskog poluostrva. Poznato je da su dramatične promene u klimi tokom Pleistocena uticale na fragmentaciju ancestralnog areala vrste *T. hermanni* (Fritz *i sar.*, 2006), a koja je kasnije uzrokovana degradacijom staništa, urbanizacijom i translokacijama i introdukcijama od strane čoveka (Perez *i sar.*, 2014). Zaista, Alpi i Dinaridi se smatraju važnim geografskim barijerama koje su uslovile diverzifikaciju organskog sveta na Balkanu (Schmitt, 2007; Grabowski *i sar.*, 2017). Stvaranjem Grčkog i Dinarskog planinskog masiva tokom Neogena, klimatskim oscilacijama, promenama u nivou mora tokom Pliocena i Pleistocena (Anastasakis & Dermitzakis, 1990; Perissoratis & Conispoliatis, 2003) su nastale dramatične promene na Balkanskom poluostrvu. Stoga, istorijski faktori se smatraju važnim uzročnikom taksonomske, genetičke i fenotipske diverzifikacije na Balkanu, posebno tokom Pleistocena

(Hewitt, 2000, 2004). Takođe, saglasnost genetičkih otisaka kod brojnih vrsta na Balkanu sugerise da klimatski ciklusi tokom Pleistocena su doveli do podele istok-zapad, koja korespondira sa Ilirskim regionom, Egejskom obalom i jugozapadnom obalom Crnog mora (Schmitt, 2007).

Biogeografski obrasci diverziteta herpetofaune Egejskog područja (Poulakakis *i sar.*, 2005; Poulakakis & Sfenthourakis, 2008; Ursenbacher *i sar.*, 2008; Lymberakis & Poulakakis, 2010; Kamilari *i sar.*, 2014; Kindler & Fritz, 2018) su oblikovani paleogeografskim događajima koji su korespondirali formiranjem Egejskog rascepa (12-9 Mya), Mesijske krize saliniteta (~5 Mya) i drugih fragmentacija tokom Pliocena (~3.5 Mya) koji su izolovali centralna Egejska ostrva od Krita i Peloponeza (Poulakakis *i sar.*, 2015). Takođe, istočno-zapadna podela je posledica formirane barijere izdizanjem planine Pindos od severa ka jugu (Lymberakis & Poulakakis, 2010). Zbog kompleksne biogeografske istorije, za Balkansko poluostrvo je karakteristično bogatstvo diverziteta i beskičmenjaka i kičmenjaka (Poulakakis *i sar.*, 2015; Dufresnes *i sar.*, 2018; Kornilios *i sar.*, 2019), dok za herpetološku faunu predstavlja hotspot evropskog biodiverziteta i endemizma (Džukić & Kalezić, 2004; Lymberakis & Poulakakis, 2010; Carvalho *i sar.*, 2011). Slično našim rezultatima, van der Kuyle *i sar.* (2002) su sugerisali prisustvo divergentne jedinice u okviru *T. h. boettgeri* registrovane na Peloponezu. Međutim, podaci (tj. sekvence jedinki sa Peloponeza) i/ili rezultati koji bi potvrdili ovaj stav nisu eksplicitno navedeni u radu Van der Kuyle *i sar.* (2002), a nisu ni dostupni u bazi podataka. Delimična saglasnost sa našim rezultatima je dokumentovana u drugoj studiji sa specifičnim haplotipom *cytb* mtDNK *T. h. boettgeri* u populaciji sa zapadne strane planine Tegetos u južnom delu Peloponeza (Fritz *i sar.*, 2006). Međutim, drugi uzorci sa Peloponeza su posedovali haplotipove B1-B7, a koji korespondiraju našim HIII i HIV haplotipovima. Stoga, naši podaci potvrđuju specifičnost ne samo pojedinačne populacije *T. h. boettgeri*, već i celog Peloponeza. Šire posmatrano, kao i u slučaju divergentne evolucione linije *T. h. boettgeri* sa Peloponeza utvrđene u našem radu, lokalne endemske linije su takođe registrovane i za rod *Podarcis* (Poulakakis *i sar.*, 2005; Kornilios *i sar.*, 2019), dok se u slučaju vaskularne flore, Peloponez smatra centrom diverziteta (Medail & Quezel, 1999).

Stoga, istorijska fragmentacija je rezultovala geografskim diskontinuitetima i posledično, i genetičkom strukturom *T. h. boettgeri* u filogeografske divergentne *12S* rRNK (= *12S* rRNK + *cytb* mtDNK) linije Zapad, Istok i Peloponez utvrđene u našem radu.

Na kraju, na osnovu varijabilnosti *12S* rRNK gena u radu smo na karakteru zasnovanom pristupu (*character-based approach*) utvrdili dijagnostički set karaktera

(specifične nukleotidne pozicije; *character-based approach*) (DeSalle *i sar.*, 2005; Rach *i sar.*, 2008; Damm, Schierwater & Hadrys, 2010) kojima se razlikuju genetičke linije šumske kornjače na Balkanu (Zapad, Peloponez i Istok). Naše filogenetske analize delom su saglasne sa analizom dijagnostičkih nukleotidnih pozicija i rezultatima predeone genetike. Naime, obrazac distribucija linija na filogenetskom drvetu odgovara obrascu koji je uočen analizom dijagnostičkih nukleotidnih pozicija i predeone genetike. Međutim, podrška čvorištima na filogenetskom stablu u nekim slučajevima je manja od 0,95 (npr. čvorište koje odvaja HI od HII + HIII je 0,7; Slika 16) što ukazuje na nekompletno linijsko sortiranje populacija šumske kornjače na Balkanskom poluostrvu, ako i da je filogenetska analiza koja koristi kriterijum monofilije manje adekvatana u detektovanju genetičkog diverziteta šumske kornjače u odnosu na prethodne dve metode naglašavajući značajnost integrativnog pristupa. Zaista, ranije je na primeru 174 vrsta kornjača ukazano na važnost komplementarnog pristupa na distanci- i na karakteru- zasnovanim genetičkim metodama (Reid *i sar.*, 2011).

5.4. Taksonomske implikacije

Filogeografske linije utvrđene u našem radu impliciraju na povezanost između filogeografije i obrasca alopatričke specijacije. Divergentne alopatričke populacije unutar jedne vrste su uobičajeno kategorisane na nivou podvrsta i predstavljaju nekompletnu fazu procesa specijacije (Wilson & Brown, 1953; Patten, 2015; Vinarski, 2015a; Kindler & Fritz, 2018). Međutim, saglasnost filogrupa ili MOTU (*Molecular Operational Taxonomic Units*) sa kategorijom podvrste ostaje otvoreno pitanje zbog, uglavnom, nedostatka konsenzusa u operativnoj identifikaciji (Kindler and Fritz 2018). Zbog toga, nedavne studije se slažu da bi identifikacija podvrsta trebala da se zasniva na više vrsta nezavisnih podataka (npr. genetički, fenotipski i bihevioralni) kojima bi se potvrdilo da divergentne alopatričke populacije imaju određen stepen protoka gena (Klüttsch, Dyer & Misof, 2012; Wilson, Sing & Sofian-Azirun, 2013; Kindler & Fritz, 2018). Kao i u slučaju naše studije koja je bazirana na genima jednog genoma (*cytb* mtDNK i *12S* rRNK), definicija podvrsta unutar *T. h. boettgeri* bi mogla biti upitna. Ipak, saglasnost naših rezultata i publikovanih studija obezbeđuje solidnu polaznu osnovu za taksonomsku reviziju *T. hermanni* vrste. Trenutno, argumenti za podelu *T. hermanni* na podvrste pre svega potiču iz genetičke studije bazirane na *cytb* mtDNK (Fritz *i sar.*, 2006) kojom je odbačena *T. graeca* var *hercegovinensis* Werner, 1899 i na nivou vrste i na nivou podvrste. Ovaj takson je prethodno bio smatran vrstom (*T. hercegovinensis*) jer je za

jedinke iz populacija od severne Hrvatske do južne Crne Gore (reka Bojana je smatrana najjužnijim lokalitetom) utvrđeno odsustvo ingvinalne pločice (Perälä, 2001, 2004), a ova podela je potvrđena i drugim studijama (Bour, 2004a, 2004b; Vetter, 2006). Zbog konzistentne genetičke diferencijacije filogrupa oba gena (*12S* rRNK i *cytb* mtDNK), validnost taksona *T. h. hercegovinensis* je vrlo verovatna. Naime, zbog distribucije HI haplotipa *12S* rRNK i HI haplotipa *cytb* mtDNK, distribucija taksona *T. h. hercegovinensis* je verovatno šira u odnosu na prethodno dokumentovanu (Perälä, 2001, 2004). Našim radom se ukazuje da distribucija taksona *T. h. hercegovinensis* obuhvata prostor od severne Hrvatske do granične linije između regiona Epirus u Grčkoj i centralne Grčke. Važno je naglasiti da je ova distribucija u saglasnosti sa distribucijom B10-B15 *cytb* mtDNK haplotipova (Fritz *i sar.*, 2006). Koliko je nama poznato, populacija sa Peloponeza (HIII haplotip *12S* rRNK) nije do sada bila opisana kao podvrsta, iako je na njenu specifičnu poziciju unutar vrste *T. hermanni* bilo sugerisano zbog jedinstvenog haplotipa *12S* rRNK (van der Kuyl *i sar.*, 2002). Na kraju, naši rezultati naglašavaju potrebu za taksonomskom revizijom *T. hermanni* kompleksa na osnovu integrativnog pristupa koji bi se zasnivao na multilokusnoj filogeniji jedarnih i mitohondrijskih DNK fragmenata i fenotipskim analizama (npr. pogledati Kindler and Fritz 2018), a što je važno za rešavanje podele *T. hermanni* kompleksa.

5.5. Konzervacione implikacije

Testudo hermanni je prema Crvenoj listi IUCN-a kategorisana kao globalno skoro ugrožena vrsta (*Near Threatened*) (van Dijk *i sar.*, 2004a), iako se zbog nepotpunih podataka predlaže njena rekategorizacija (Bertolero *i sar.*, 2011; Nikolić *i sar.*, 2018). Vrsta je trenutno zaštićena CITES regulativom (Apendiks II), Direktivom o staništima (*Habitats Directive*) (Aneksi II i IV) i Bernovom Konvencijom (Anex II) (Zenboudji *i sar.*, 2016; Nikolić *i sar.*, 2018). *Testudo h. boettgeri* ima status strogo zaštićene vrste u Hrvatskoj i Bugarskoj (Nikolić *i sar.*, 2018), zaštićena je u Srbiji, Federaciji Bosne i Hercegovine, Crnoj Gori, Republici Severnoj Makedoniji, Grčkoj, Rumuniji i Turskoj, dok status u Republici Srpskoj (Bosna i Hercegovina) nije evaluiran, a vrsta nije zaštićena pravnom regulativom u Albaniji zbog svog statusa “Najmanje zabrinjavajući” (*Least Concern*) (Nikolić *i sar.*, 2018). Status vrste *T. hermanni* se kreće od Najmanje zabrinjavajući (Albanija), preko statusa Osetljiva vrsta (Srbija, Federacija Bosne i Hercegovine, Grčka), Skoro ugrožena (Hrvatska) i Ugrožena

(Bugarska i Rumunija), dok njen status nije određen u Crnoj Gori, Republici Severnoj Makedoniji i Turskoj (Nikolić *i sar.*, 2018).

Značajan pad brojnosti populacija vrste *T. hermanni* je posledica većeg broja faktora, uključujući degradaciju i fragmentaciju sredine, katastrofične požare, izlovljavanje u cilju ilegalne trgovine, povećanje brojnosti predatora koji pre svega napadaju juvenilni stadijum, upotreba pesticida, smrtnost na putevima, i urbanizacija i proširenje poljoprivrednih površina u obalskim predelima Mediterana (Bertolero *i sar.*, 2011; Ljubisavljević, Džukić & Kalezić, 2011; Iosif *i sar.*, 2013).

Osim fundamentalnog aspekta, rezultati ove studije imaju i konzervacione implikacije. Prvo, detekcija divergentnih evolucionih linija sugerise na kriptični genetički i taksonomski diverzitet čime se obezbeđuju dodatni podaci za reevaluaciju konzervacionog statusa vrste *T. hermanni*. Osim toga, plan zaštite ove ugrožene i osetljive vrste će se moći bazirati i na genetičkim granicama registrovanih linija unutar *T. h. boettgeri* definisanih u ovom radu. Ipak, kategorisanje evoluciono nezavisnih linija (*Evolutionarily Significant Units*, ESU) u našoj studiji na osnovu *12S* rRNK i *cytb* mtDNK gena delimično zadovoljava kriterijume definisane od strane autora: "...linije treba da su značajno divergentne u frekvenciji alela jedarnih lokusa i recipročnoj monofiliji mtDNK" (Moritz, 1994) i "Podgrupa koja poseduje genetičke attribute značajne za sadašnje i buduće generacije date vrste" (Ryder, 1986). Pošto kriptični diverzitet reflektuje nezavisne evolucionne procese, utvrđena genetička posebnost geografski strukturiranih linija registrovanih u ovom radu bi trebalo smatrati ESU u širem smislu (Fraser & Bernatchez, 2001): "Linija sa značajnom restrikcijom protoka gena u odnosu na druge linije unutar višeg organizacionog nivoa/linije date vrste". Zbog toga, na osnovu divergentnih haplotipova *12S* rRNK i multilokusne prostorne analize (*12S* rRNK + *cytb* mtDNK) predlažemo da se tri divergentne genetičke jedinice (Istok, Zapad, Peloponez) u okviru *T. h. boettgeri* podklade redefinišu u status ESU u širem kontekstu kako bi se na taj način razmatrale u budućim planovima zaštite.

Razmatrajući primenu DNK taksonomije u proučavanju biološke raznovrsnosti (DeSalle *i sar.*, 2005; Goldstein & DeSalle, 2011), DNK podaci iz našeg rada će značajno doprineti u formiranju DNK baze podataka ugroženih gmizavaca Mediteranskog hotspot područja. Ovaj zadatak je od primarnog značaja ukoliko se uzme u obzir da je region Mediterana (*Mediterranean Basin Biodiversity Hotspot*) drugo najveće hotspot područje u svetu, a najveće od pet na svetu iz regiona mediteranske klime (Critical Ecosystem Partnership Fund, 2017), pošto sadrži oko 300 vrsta terestričnih gmizavaca, od kojih je 40% endema (Cox, Chanson & Stuart, 2006; IUCN, 2016). Zabrinjavajući podatak je i taj da su na

globalnom nivou gmizavci veoma ugrožena grupa (Gibbons *i sar.*, 2006; Todd, Willson & Gibbons, 2010), dok je 61% od 356 vrsta kornjača na svetu ugroženo ili pred izumiranjem (Lovich *i sar.*, 2018). Na primer, prostorna heterogenost kombinovana sa globalnom promenom klime povećava rizik od nestanka *T. hermanni* u sadašnjem arealu (Fernández-Chacón *i sar.*, 2011), a populacije koje su velike i brojne se mogu suočiti sa nestankom zbog izlovljavanja (Nikolić *i sar.*, 2018). Tako, podacima o varijabilnosti *12S* rRNK i *cytb* mtDNK gena moguće je formiranje i proširenje DNK baze podataka značajne za forenziku divljih vrsta, uključujući i identifikaciju vrsta i populaciono razlikovanje. DNK baza podataka bi bila značajna kao komplementaran izvor podataka za dizajniranje konzervacionih programa zaštite *T. hermanni*, a koji bi se zasnivao na reintrodukciji, programu ukrštanja i drugim konzervacionim akcijama (Bertolero *i sar.*, 2011). Pošto se selekcija jedinki u dosadašnjim konzervacionim programima zasnivala na fenotipu (Zenboudji *i sar.*, 2016), rizik od autbriding depresije je velik usled mogućeg mešanja jedinki iz različitih genetičkih jedinica ili filogenetskih linija (Frankham *i sar.*, 2011). Stoga, DNK podaci su veoma korisni dodatni instrumenti u genetičkom menadžmentu ugroženih vrsta, kao što je već prethodno naglašeno (Frankham, 2010).

Genealogijom *12S* rRNK je naglašen značaj Grčke, posebno Egejskog regiona, kao regiona sa visokim stepenom diverziteta i endemizma zbog prisustva tri istorijski izolovane linije od kojih je jedna endemska na Peloponezu. Zaštitom filogenetski divergentnih linija koje reflektuju kriptični diverzitet će se istovremeno zaštititi i evolucionni procesi uključeni u istoriju datih populacija (Moritz, 2002). U odnosu na kornjače, Grčka je bila prepoznata kao ključni region u okviru Mediteranskog hotspot područja (Hailey & Willemsen, 2003) upravo zbog prisustva tri vrste roda *Testudo* (*T. hermanni*, *T. graeca*, *T. marginata*), endemske *T. marginata*, kao i intraspecijskog diverziteta – uključujući i patuljastu formu vrste *T. marginata* (*T. m. weissingeri* Bour, 1996) i *T. hermanni* (Willemsen and Hailey, 1999).

Dodatno, pretpostavljene kontaktne zone između linija Zapad i Istok, kao i između linija Istok i Peloponez u okviru podvrste *T. h. boettgeri* (Slika 18) bi trebalo razmatrati kao regione od konzervacionog prioriteta. Naime, zaštita evolucionih procesa u hibridnim zonama filogenetskih linija je ranije već bila sugerisana (Camargo, Sinervo & Sites Jr., 2010; Davis *i sar.*, 2008) zato što: 1) hibridizacija ima važnu ulogu u evoluciji mnogih biljnih i životinjskih vrsta (Allendorf *i sar.*, 2001; Dong, Xue-dong & Jian-zhang, 2008) i 2) slučajne i namerne antropogene translokacije jedinki iz genetičkih divergentnih grupa mogle bi dovesti do autbriding depresije i raskidanja koadaptiranih genskih kompleksa (Ricciardi & Simberloff, 2009; Loss, Terwilliger & Peterson, 2011). Zbog toga, konzervacioni programi bi trebalo da

budu usklađeni sa definisanim genetičkim jedinicama i njihovim pretpostavljenim geografskim granicama. Na primer, nacionalne regulative u zaštiti vrste Grčke i Republike Severne Makedonije bi posebno trebale imati u vidu i pretpostavljene hibridne zone.

Sa konzervacionog aspekta, menadžment strategija zaštite vrste *T. hermanni* bi trebala da bude fokusirana na regione sa detektovanim endemizmom (Peloponez) i velikim intraspecijskim diverzitetom (Grčka), konzervaciju evolucionih procesa odgovornih za diverzifikaciju (evolucioni procesi u divergentnim filogenetskim linijama) i evolucionih procesa koji operišu u hibridnim zonama nastalim u kontaktnim oblastima divergentnih linija *T. h. boettgeri*.

6. ZAKLJUČAK

- U radu je analiziran genetički i morfološki diverzitet šumske kornjače, *Testudo hermanni boettgeri*, poreklom sa 36 lokaliteta na Balkanskom poluostrvu na osnovu molekularne varijabilnosti *12S* rRNK i citohroma *b* mitohondrijskih gena, kao i oblika karapaksa i plastrona kvantifikovan geometrijskom morfometrijom;
- Metodama predeone genetike i filogenetskim analizama *12S* rRNK gena utvrđeno je da su populacije *T. h. boettgeri* na Balkanskom poluostrvu strukturirane u tri alopatričke linije: 1) “*T. h. boettgeri* Zapad” (HI) obuhvata populacije duž obale Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne Gore i Albanije, kao i iz Epira i severnog dela Makedonije u Grčkoj; 2) “*T. h. boettgeri* Peloponez” (HII) obuhvata populacije sa Peloponoza u Grčkoj; 3) “*T. h. boettgeri* Istok” (HIII+HIV) obuhvata populacije kontinentalnog dela Balkana;
- Genetičkim analizama gena *cytb* mtDNK je takson *T. h. boettgeri* strukturiran na dva genetička klastera: 1) “*T. h. boettgeri* Zapad” (HI) obuhvata populacije duž obale Hrvatske, Bosne i Hercegovine, Crne Gore i Albanije, kao i iz Epira i severnog dela Makedonije u Grčkoj; 2) obuhvata populacije sa Peloponoza u Grčkoj i populacije kontinentalnog dela Balkana (“*T. h. boettgeri* Peloponez” + “*T. h. boettgeri* Istok”);
- Multilokusnom analizom (*12S* rRNK + *cytb* mtDNK) je potvrđena strukturiranost *T. h. boettgeri* u tri evolucione linije (genetički klasteri);
- Molekularna evolucija i informativna vrednost sekvenci dva mitohondrijska gena nije ista i *12S* rRNK pokazuje veću informativnost u kontekstu detektovanja genetičke varijabilnosti, kao i konzistentnije vreme divergencije u odnosu na paleontološke podatke;
- Oblik karapaksa i plastrona kao i alometrijske promene oblika izrazito su polno dimorfne;
- Tri genetičke linije mogu se dijagnostifikovati na osnovu oblika oklopa, a intenzitet i smer polnog dimorfizma oblika nije konzistentan između njih ukazujući na pol-specifičnu divergenciju;
- Pol-specifična divergencija genetičkih linija ogleđa se u obrascu alometrije koja je homogena kod ženki ali ne i kod mužjaka, kao i obrascu unutargrupne fenotipske varijanse koja je manja i uniformna kod ženki ali ne i kod mužjaka šumske kornjače

što ukazuje na pol-specifične selekzione režime i/ili pol-specifičnu kanalisano razvića;

- Pokazano je da su oblik karapaksa i plastrona informativni u detekciji rane divergencije na subspecijskom nivou ukazujući na potencijal geometrijske morfometrije u populacionim i taksonomskim studijama kornjača;
- Imajući u vidu 1) alopatričku distribuciju tri divergentne linija koja oslikava evolucione procese i biogeografsku istoriju Balkanskog poluostrva, 2) mogućnost morfološke dijagnostifikacija genetičkih linija, 3) obrazac divergencije koji je tipičan za nekompletno linijsko sortiranje u okviru nominalne *T. hermanni boettgeri*, pokazani su konceptualni i operativni argumenti da se tri linije mogu tretirati kao zasebne podvrste, međutim dodatne studije su potrebne;
- Konzervacioni planovi i zaštita šumske kornjače na Balkanu trebali bi da budu bazirani na prepoznatljivosti genetičkog i morfološkog diverziteta (ESU, Evoluciono značajne jedinice), a ne na trenutnoj subspecijskoj taksonomskoj podeli.

7. LITERATURA

- Abzhanov, A. (2017). The old and new faces of morphology: the legacy of D'Arcy Thompson's "theory of transformations" and "laws of growth". *Development* **144**, 4284–4297.
- Adams, D.C. & Collyer, M.L. (2009). A general framework for the analysis of phenotypic trajectories in evolutionary studies. *Evolution*. **63**, 1143–1154.
- Adams, D.C., Collyer, M.L. & Kaliontzopoulou, A. (2019). Software for geometric morphometric analyses. R package.
- Adams, D.C. & Funk, D.J. (1997). Morphometric inferences on sibling species and sexual dimorphism in *Neochlamisus bebbianae* Leaf Beetles: multivariate applications of the thin-plate spline. *Syst. Biol.* **46**, 180.
- Adams, D.C., Rohlf, F.J. & Slice, D.E. (2004). Geometric morphometrics: ten years of progress following the "revolution". *Ital. J. Zool.* **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* **24**, 7–14.
- Agapow, P.-M., Bininda-Emonds, O.R.P., Crandall, K.A., Gittleman, J.L., Mace, G.M., Marshall, J.C. & Purvis, A. (2004). The impact of species concept on biodiversity studies. *Q. Rev. Biol.* **79**, 161–179.
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P. & Wenburg, J.K. (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* **16**, 613–622.
- Álvarez, Y., Mateo, J., Andreu, A., Diaz-Paniagua, C., Diez, A. & Bautista, J. (2000). Mitochondrial DNA haplotyping of *Testudo graeca* on both continental sides of the Straits of Gibraltar. *J. Hered.* **91**, 39–41.
- Anastasakis, G.C. & Dermitzakis, M. (1990). Post-Middle-Miocene paleogeographic evolution of the Central Aegean Sea and detailed Quaternary reconstruction of the region. Its possible influence on the distribution of the Quaternary mammals of the Cyclades Islands. *Neues Jahrb. für Geol. und Paläontologi* **1**, 1–16.
- Angielczyk, K.D., Feldman, C.R. & Miller, G.R. (2011). Adaptive evolution of plastron shape in emydine turtles. *Evolution* **65**, 377–394.
- Arnold, N. & Ovenden, D. (2002). *Reptiles and Amphibians of Britain and Europe*. London: Collins.
- Avise, J.C., Bowen, B.W., Lamb, T., Meylan, A.B. & Bermingham, E. (1992). Mitochondrial

- DNA evolution at a turtle's pace: evidence for low genetic variability and reduced microevolutionary rate in the Testudines. *Mol. Biol. Evol.* **9**, 457–473.
- Avise, J.C. (2001). *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press.
- Bancila, R.I., Plaiasu, R., Tudor, M., Samoila, C. & Cogalniceanu, D. (2012). Fluctuating asymmetry in the Eurasian Spur-Thighed Tortoise, *Testudo graeca iberica* Linnaeus, 1758 (Testudines: Testudinidae). *Chelonian Conserv. Biol.* **11**, 234–239.
- Berns, C.M. (2013). The evolution of sexual dimorphism: understanding mechanisms of sexual shape differences. In *Sexual Dimorphism*: 1–16.
- Bertolero, A., Cheylan, M., Hailey, A., Livoreil, B. & Willemsen, R.E. (2011). *Testudo hermanni* (Gmelin 1789) – Hermann's Tortoise. In *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises: 059.1-059.20*. Rhodin, A., Pritchard, P., van Dijk, P.P., Saumure, R., Buhlmann, K., Iverson, J. & Mittermeier, R. (Eds.). Chelonian Research Foundation.
- Bonduriansky, R. (2007). The evolution of condition-dependent sexual dimorphism. *Am. Nat.* **169**, 9.
- Bonnet, X., Delmas, V. & El-Mouden, H. (2010). Is sexual body shape dimorphism consistent in aquatic and terrestrial chelonians? *Zoology* **113**, 213–220.
- Bonnet, X., Lagarde, F., Henen, B.T., Corbinl, J., Nagy, K.A., Naulleau, G., Balhoull, K., Legrand, A. & Cambag, R. (2001). Sexual dimorphism in steppe tortoise (*Testudo horsfieldii*): influence of the environment and sexual selection on body shape and mobility. *Biol. J. Linn. Soc.* **72**, 357–372.
- Bookstein, F.L. (1982). Foundations of morphometrics. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **13**, 451–470.
- Bookstein, F.L. (1989). "Size and shape": a comment on semantics. *Syst. Zool.* **38**, 173–180.
- Bookstein, F.L. (1991). *Morphometric Tools for Landmark Data: Geometry and Biology*. New York: Cambridge University Press.
- Bookstein, F.L. (1996). Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bull. Math. Biol.* **58**, 313–365.
- Bour, R. (1995). Une nouvelle espèce de tortue terrestre dans le Péloponnèse (Grèce). *Dumerilia* **2**, 23–54.
- Bour, R. (2004a). *Testudo boettgeri* Mojsisovics, 1889. *Manouria* **7**, 9–10.
- Bour, R. (2004b). A new character for the identification of populations of the Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* Gmelin, 1789. *Salamandra* **40**, 59–66.
- de Broin, F.D.L. (2001). The European turtle fauna from the Triassic to the present. *Dumerilia* **4**, 155–217.

- de Broin, F.D.L., Bour, R., Parham, J.F. & Perälä, J. (2006a). *Eurotestudo*, a new genus for the species *Testudo hermanni* Gmelin, 1789 (Chelonii, Testudinidae). *Syst. Paleontol.* **5**, 803–811.
- de Broin, F.D.L., Bour, R. & Perälä, J. (2006b). Morphological definition of *Eurotestudo* (Testudinidae, Chelonii): First part. *Ann. Paléontologie* **92**, 255–304.
- Camargo, A., Sinervo, B. & Sites Jr., J.W. (2010). Lizards as model organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Mol. Ecol.* **19**, 3250–3270.
- Cardini, A. (2016). Lost in the other half: improving accuracy in geometric morphometric analyses of one side of bilaterally symmetric structures. *Syst. Biol.* **65**(6), 1096–106.
- Carretero, M.A., Znari, M., Harris, J.D. & Macé, J. (2005). Morphological divergence among populations of *Testudo graeca* from west-central Morocco. *Anim. Biol.* **55**, 259–279.
- de Carvalho, M.R., Ebach, M.C., Williams, D.M., Nihei, S.S., Trefaut Rodrigues, M., Grant, T., Silveira, L.F., Zaher, H., Gill, A.C., Schelly, R.C., Sparks, J.S., Bockmann, F. a., Séret, B., Ho, H.C., Grande, L., Rieppel, O., Dubois, A., Ohler, A., Faivovich, J., Assis, L.C.S., Wheeler, Q.D., Goldstein, P.Z., De Almeida, E. a B., Valdecasas, A.G. & Nelson, G. (2014). Does counting species count as taxonomy? On misrepresenting systematics, yet again. *Cladistics* **30**, 322–329.
- Carvalho, S.B., Brito, J.C., Crespo, E.J. & Possingham, H.P. (2011). Incorporating evolutionary processes into conservation planning using species distribution data: a case study with the western Mediterranean herpetofauna. *Divers. Distrib.* **17**, 408–421.
- Carvalho, S.B., Velo-Antón, G., Tarroso, P., Portela, A.P., Barata, M., Carranza, S., Moritz, C. & Possingham, H.P. (2017). Spatial conservation prioritization of biodiversity spanning the evolutionary continuum. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 0151.
- Cassens, I., Mardulyn, P. & Milinkovitch, M.C. (2005). Evaluating intraspecific “Network” construction methods using simulated sequence data: do existing algorithms outperform the global maximum parsimony approach? *Syst. Biol.* **54**, 363–372.
- Ceballos, C.P. & Valenzuela, N. (2011). The role of sex-specific plasticity in shaping sexual dimorphism in a long-lived vertebrate, the Snapping turtle *Chelydra serpentina*. *Evol. Biol.* **38**, 163–181.
- Ceballos, C.P., Adams, D.C., Iverson, J.B. & Valenzuela, N. (2012). Phylogenetic patterns of sexual size dimorphism in turtles and their implications for Rensch’s rule. *Evol. Biol.* **40**, 194–208.
- Ceballos, C.P., Hernández, O.E. & Valenzuela, N. (2014). Divergent sex-specific plasticity in long-lived vertebrates with contrasting sexual dimorphism. *Evol. Biol.* **41**, 81–98.

- Ceballos, C.P. & Iverson, J.B. (2014). Patterns of sexual size dimorphism in Chelonia: revisiting Kinosternidae. *Biol. J. Linn. Soc.* **111**, 806–809.
- Cebra-Thomas, J.A., Betters, E., Yin, M., Plafkin, C., McDow, K. & Gilbert, S.F. (2007). Evidence that a late-emerging population of trunk neural crest cells forms the plastron bones in the turtle *Trachemys scripta*. *Evol. Dev.* **9**, 267–277.
- Chiari, Y. & Claude, J. (2011). Study of the carapace shape and growth in two Galápagos tortoise lineages. *J. Morphol.* **272**, 379–86.
- Chkhikvadze, V.M. (1970). [On the origin of the modern Palaearctic land tortoises]. *Soobshcheniya Akad. Nauk Gruz. SSR [Bulletin Acad. Sci. Georg.]* **57**, 245–247.
- Cicero, C. (2010). The significance of subspecies: a case study of sage sparrows (Emberizidae, *Amphispiza belli*). *Ornithol. Monogr.* **67**, 103–113.
- Collyer, M.L. & Adams, D.C. (2007). Analysis of two-state multivariate phenotypic change in ecological studies. *Ecology* **88**, 683–692.
- Collyer, M.L. & Adams, D.C. (2013). Phenotypic trajectory analysis: comparison of shape change patterns in evolution and ecology. *Hystrix* **24**, 75–83.
- Collyer, M.L. & Adams, D.C. (2018). RRPP : An R package for fitting linear models to high-dimensional data using residual randomization. *Methods Ecol. Evol.* **9**, 1772–1779.
- Collyer, M.L. & Adams, D.C. (2019). RRPP: Linear model evaluation with randomized residuals in a permutation procedure.
- 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.
- Conix, S. (2019). Taxonomy and conservation science: interdependent and value-laden. *Hist. Philos. Life Sci.* **41**, 15.
- Cox, N., Chanson, J. & Stuart, S. (2006). *The Status and distribution of reptiles and amphibians of the Mediterranean basin*.
- Critical Ecosystem Partnership Fund. (2017). *Mediterranean basin biodiversity hotspot*.
- Damm, S., Schierwater, B. & Hadrys, H. (2010). An integrative approach to species discovery in odonates: From character-based DNA barcoding to ecology. *Mol. Ecol.* **19**, 3881–3893.
- Darwin, C. (1859). *On the Origin of the Species*. London: John Murray.
- Davis, M.A., Douglas, M.R., Collyer, M.L. & Douglas, M.E. (2016). Deconstructing a species-complex: geometric morphometric and molecular analyses define species in the Western rattlesnake (*Crotalus viridis*). *PLoS One* **11**, e0146166.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biol. J. Linn. Soc.* **85**, 407–415.

- Debat, V. & David, P. (2001). Mapping phenotypes: canalization, plasticity and developmental stability. *Trends Ecol. Evol.* **16**, 555–561.
- Demuth, J.P. (2001). The effects of constant and fluctuating incubation temperatures on sex determination, growth, and performance in the tortoise *Gopherus polyphemus*. *Can. J. Zool.*
- DeSalle, R., Egan, M.G. & Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **360**, 1905–1916.
- van Dijk, P.P., Corti, C., Mellado, V.P. & Cheylan, M. (2004a). *Testudo hermanni*. *The IUCN Red List of Threatened Species 2004: e.T21648A9306057*.
- van Dijk, P.P., Iverson, J., Rhodin, A., Shaffer, B. & Bour, R. (2014). Turtles of the World, 7th Edition: Annotated Checklist of Taxonomy, Synonymy, Distribution with Maps, and Conservation Status. In *Conservation Biology of Freshwater Turtles and Tortoises*: 243–328. Chelonian Research Foundation.
- van Dijk, P.P., Lymberakis, P. & Böhme, W. (2004b). *Testudo marginata*. *The IUCN Red List of Threatened Species*.
- Djordjevic, S. (2015). Carapace peculiarities of Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*) in several Balkan populations. *North. West. J. Zool.* **11**, 16–26.
- Djordjevic, S., Djurakic, M., Golubovic, A., Ajtic, R., Tomovic, L. & Bonnet, X. (2011). Sexual body size and body shape dimorphism of *Testudo hermanni* in central and eastern Serbia. *Amphibia-Reptilia* **32**, 445–458.
- Djordjevic, S., Tomović, L., Golubović, A., Simovic, A., Sterijovski, B., Djurakic, M. & Bonnet, X. (2013). Geographic (in-) variability of gender-specific traits in Hermann's tortoise. *Herpetol. J.* **23**, 67–74.
- Djurakic, M., Herrel, A. & Jojić, V. (2014). Grasping flexibility: evolutionary modularity and developmental origin of carapace integration in Chelonians. In *5th meeting of the European Society for Evolutionary Developmental Biology*: 221. Vienna, Austria.
- Djurakic, M. & Milankov, V. (2015). A recognition of species taxon is a tail of microevolutionary processes in *Testudo marginata*: An evidence of a sex-specific environmentally-induced variation of plastron morphology. In *12th Croatian Biological Congress*: 58. Sveti Martin na Muri.
- Djurakic, M. & Milankov, V. (2019a). Geometric morphometric assessment of genetically divergent populations of *Testudo hermanni boettgeri* (Reptilia: Testudines). *Arch. Biol. Sci.* doi: 10.2298/ABS190604043D.
- Djurakic, M. & Milankov, V. (2019b). The utility of plastron shape for uncovering cryptic

- diversity in Hermann's tortoise. *J. Zool.* doi: 10.1111/jzo.12736.
- Dong, Z., Xue-dong, L. & Jian-zhang, M. (2008). Hybrid zone and its genetic analysis: implication for conservation. *J. For. Res.* **14**, 167–170.
- Dryden, I.L. & Mardia, K. V. (1998). *Statistical shape analysis.* , Wiley Series in Probability & Statistics. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd.
- Dufresnes, C., Lymberakis, P., Kornilios, P., Savary, R., Perrin, N. & Stöck, M. (2018). Phylogeography of Aegean green toads (*Bufo viridis* subgroup): continental hybrid swarm vs. insular diversification with discovery of a new island endemic. *BMC Evol. Biol.* **18**, 67.
- Džukić, G. & Kalezić, M.L. (2004). The biodiversity of amphibians and reptiles in the Balkan Peninsula. In *Springer, Dordrecht*. Griffiths, H.I., Kryštufek, B. & Reed, J.M. (Eds.). Dordrecht: Springer, Dordrecht.
- Eble, G.J. (2003). Morphological modularity and macroevolution: conceptual and empirical aspects. *Modul. Underst. Dev. Evol. complex Nat. Syst.*
- Egset, C.K., Hansen, T.F., Le Rouzic, A., Bolstad, G.H., Rosenqvist, G. & Pélabon, C. (2012). Artificial selection on allometry: change in elevation but not slope. *J. Evol. Biol.* **25(5)**, 938-948.
- Fairbairn, D.J. (1997). Allometry for sexual size dimorphism: pattern and process in the coevolution of body size in males and females. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **28**, 659–687.
- Fairbairn, D.J. (2013). *Odd couples: extraordinary differences between the sexes in the animal kingdom*. Princeton University Press.
- Fairbairn, D.J., Blanckenhorn, W.U. & Székely, T. (2007). *Sex, size and gender roles: evolutionary studies of sexual size dimorphism*.
- Felsenstein, J. (1985). Phylogenies and the comparative method. *Am. Nat.* **125(1)**, 1–15.
- Felsenstein, J. (1988). Phylogenies and quantitative characters. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **19**, 445–471.
- Fernández-Chacón, A., Bertolero, A., Amengual, A., Tavecchia, G., Homar, V. & Oro, D. (2011). Spatial heterogeneity in the effects of climate change on the population dynamics of a Mediterranean tortoise. *Glob. Chang. Biol.* **17**, 3075–3088.
- Fišer, C., Robinson, C.T. & Malard, F. (2018). Cryptic species as a window into the paradigm shift of the species concept. *Mol. Ecol.* **27**, 613–635.
- Flatt, T. (2005). The evolutionary genetics of canalization. *Q. Rev. Biol.* **80**, 287–316.
- Forlani, A., Crestanello, B., Mantovani, S., Livoreil, B., Zane, L., Bertorelle, G. & Congiu, L. (2005). Identification and characterization of microsatellite markers in Hermann's

- tortoise (*Testudo hermanni*, Testudinidae). *Mol. Ecol. Notes* **5**, 228–230.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Eldridge, M.D.B., Lacy, R.C., Ralls, K., Dudash, M.R. & Fenster, C.B. (2011). Predicting the probability of outbreeding depression. *Conserv. Biol.* **25**, 465–75.
- Fraser, D.J. & Bernatchez, L. (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Mol. Ecol.* **10**, 2741–2752.
- Frédérich, B., Olivier, D., Litsios, G., Alfaro, M.E. & Parmentier, E. (2014). Trait decoupling promotes evolutionary diversification of the trophic and acoustic system of damselfishes. *Proc. R. Soc. London B* **281**, 20141047.
- Fritz, U., Alcalde, L., Vargas-Ramírez, M., Goode, E. V., Fabius-Turoblin, D.U. & Praschag, P. (2012). Northern genetic richness and southern purity, but just one species in the *Chelonoidis chilensis* complex. *Zool. Scr.* **41**, 220–232.
- Fritz, U., Auer, M., Bertolero, A., Cheylan, M., Fattizzo, T., Hundsdorfer, A.K., Martin Sampayo, M., Pretus, J.L., Široký, P. & Wink, M. (2006). A rangewide phylogeography of Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Reptilia: Testudines: Testudinidae): implications for taxonomy. *Zool. Scr.* **35**, 531–543.
- Fritz, U. & Bininda-Emonds, O.R.P. (2007). When genes meet nomenclature: tortoise phylogeny and the shifting generic concepts of *Testudo* and *Geochelone*. *Zoology* **110**, 298–307.
- Fritz, U. & Havaš, P. (2007). Checklist of Chelonians of the World. *Vertebr. Zool.* **57**, 148–368.
- Fritz, U. & Havaš, P. (2013). Order Testudines: 2013 update. In: Zhang, Z.-Q. (Ed.) Animal Biodiversity: An Outline of Higher-level Classification and Survey of Taxonomic Richness (Addenda 2013). *Zootaxa* **3703**, 12.
- Fritz, U., Široký, P., Kami, H. & Wink, M. (2005). Environmentally caused dwarfism or a valid species - is *Testudo weissingeri* Bour, 1996 a distinct evolutionary lineage? New evidence from mitochondrial and nuclear genomic markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* **37**, 389–401.
- Fruciano, C. (2016). Measurement error in geometric morphometrics. *Dev. Genes Evol.* **226**, 139–158.
- Funk, D.J. & Omland, K.E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **34**, 397–423.
- Gibbons, J.W., Scott, D.E., Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S.,

- Greene, J.L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S. & Winne, C.T. (2006). The global decline of reptiles, Déjà Vu Amphibians. *Bioscience* **50**, 653–666.
- Gibson, G. & Wagner, G.P. (2000). Canalization in evolutionary genetics: a stabilizing theory? *Bioessays* **22**, 372–80.
- Gilbert, S.F., Cebra-Thomas, J.A. & Burke. (2008). How the turtle gets its shell. In *The Biology of Turtles*: 1–16. Wyneken, J., Godfrey, M. & Bels, V. (Eds.). CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Gilbert, S.F., Loredó, G.A., Brukman, A. & Burke, A.C. (2001). Morphogenesis of the turtle shell: the development of a novel structure in tetrapod evolution. *Evol. Dev.* **3**, 47–58.
- Gippoliti, S. & Groves, C.P. (2012). “Taxonomic inflation” in the historical context of mammalogy and conservation. *Hystrix* **23**, 8–11.
- Gmira, S. (1993). Nouvelles données sur les espèces actuelles de Testudo. *Bull. la Société Herpétologique Fr.* **65/66**, 49–56.
- Gmira, S. (1995). *Étude des Chéloniens Fossiles du Maroc. Anatomie, Systématique, Phylogénie. Cahiers de Paléontologie*. Paris: CNRS Editions.
- Goldstein, P.Z. & DeSalle, R. (2011). Integrating DNA barcode data and taxonomic practice: Determination, discovery, and description. *BioEssays* **33**, 135–147.
- Golubović, A., Bonnet, X., Djordjevic, S., Djurakic, M. & Tomović, L. (2013). Variations in righting behaviour across Hermann’s tortoise populations. *J. Zool.* **291**, 69–75.
- Golubović, A., Tomović, L. & Ivanović, A. (2015). Geometry of self righting: the case of Hermann’s tortoises. *Zool. Anz.* **254**, 99–105.
- Goodall, C. (1991). Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **285–339**.
- Gosnell, S.J., Rivera, G. & Blob, R.W. (2009). A Phylogenetic analysis of sexual size dimorphism in turtles. *Herpetologica* **65**, 70–81.
- Grabowski, M., Mamos, T., Baćela-Spychalska, K., Rewicz, T. & Wattier, R.A. (2017). Neogene paleogeography provides context for understanding the origin and spatial distribution of cryptic diversity in a widespread Balkan freshwater amphipod. *PeerJ* **5**, e3016.
- Guillot, G. (2008). Inference of structure in subdivided populations at low levels of genetic differentiation - the correlated allele frequencies model revisited. *Bioinformatics* **24**, 2222–2228.
- Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. (2005). GENELAND: A computer package for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes* **5**, 712–715.

- Guillot, G., Renaud, S., Ledevin, R., Michaux, J. & Claude, J. (2012). A unifying model for the analysis of phenotypic, genetic, and geographic data. *Syst. Biol.* **61**, 897–911.
- Guillot, G., Santos, F. & Estoup, A. (2008). Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* **24**, 1406–1407.
- Haig, S.M., Beever, E. A, Chambers, S.M., Draheim, H.M., Dugger, B.D., Dunham, S., Elliott-smith, E., Fontaine, J.B., Kesler, D.C., Knaus, B.J., Lopes, I.F., Loschl, P., Mullins, T.D. & Sheffield, L.M. (2006). Taxonomic considerations in listing subspecies under the U.S. Endangered Species Act. *Conserv. Biol.* **20**, 1584–1594.
- Hailey, A. (1989). How far do animals move? Routine movements in a tortoise. *Can. J. Zool.* **67(1)**, 208-2015.
- Hailey, A. & Willemsen, R.E. (2003). Changes in the status of tortoise populations in Greece 1984-2001. *Biodivers. Conserv.* **12(5)**, 991-1011.
- Halámková, L., Schulte, J.A. & Langen, T.A. (2013). Patterns of sexual size dimorphism in Chelonia. *Biol. J. Linn. Soc.* **108**, 396–413.
- Hall, B.K. (1992). Waddington's legacy in development and evolution. *Am. Zool.* **32**, 113–122.
- Harmon, L.J., Schulte, J.A., Larson, A. & Losos, J.B. (2003). Tempo and mode of evolutionary radiation in iguanian lizards. *Science.* **301**, 961–964.
- Harrison, J.F. (2015). Evolvability and nonevolvability of allometric slopes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10.1073/pnas.1505357112.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & deWaard, J.R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* **270**, 313–21.
- Hewitt, G.M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* **405**, 907–913.
- Hewitt, G.M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos. Trans. R. Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* **359**, 183–195.
- Hirasawa, T., Nagashima, H. & Kuratani, S. (2013). The endoskeletal origin of the turtle carapace. *Nat. Commun.* **4**, 2107.
- Hirasawa, T., Pascual-Anaya, J., Kamezaki, N., Taniguchi, M., Mine, K. & Kuratani, S. (2015). The evolutionary origin of the turtle shell and its dependence on the axial arrest of the embryonic rib cage. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* **324**, 194–207.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* **17**, 754–755.
- Iosif, R., Iosif, R., Rozyłowicz, L., Iosif, R., Rozyłowicz, L. & Popescu, V.D. (2013).

- Modeling road mortality hotspots of Eastern Hermann's tortoise in Romania. *Amphibia-Reptilia* **34**, 163–172.
- IUCN. (2016). *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-2.* www.iucnredlist.org.
- Joly, S., Stevens, M.I. & van Vuuren, B.J. (2007). Haplotype networks can be misleading in the presence of missing data. *Syst. Biol.* **56**, 857–862.
- Juste, J.B., Álvarez, Y., Tabarés, E., Garrido-Pertierra, A., Ibáñez, C. & Bautista, J.M. (1999). Phylogeography of African Fruitbats (Megachiroptera). *Mol. Phylogenet. Evol.* **13**, 596–604.
- Ben Kaddour, K., Mouden, E.H. El, Slimani, T., Bonnet, X. & Lagarde, F. (2008). Sexual dimorphism in the Greek Tortoise: a test of the body shape hypothesis. *Chelonian Conserv. Biol.* **7**, 21–27.
- Kaliontzopoulou, A. (2011). Geometric morphometrics in herpetology: modern tools for enhancing the study of morphological variation. *Basic Appl. Herpetol.* **25**, 5–32.
- Kamilari, M., Klossa-Kilia, E., Kiliass, G. & Sfenthourakis, S. (2014). Old Aegean palaeoevents driving the diversification of an endemic isopod species (Oniscidea, Trachelipodidae). *Zool. Scr.* **43**, 379–392.
- Karanovic, T., Djuracic, M. & Eberhard, S.M. (2016). Cryptic species or inadequate taxonomy? Implementation of 2D geometric morphometrics based on integumental organs as landmarks for delimitation and description of copepod taxa. *Syst. Biol.* **65**(2), 304–327.
- Kindler, C. & Fritz, U. (2018). Phylogeography and taxonomy of the barred grass snake (*Natrix helvetica*), with a discussion of the subspecies category in zoology. *Vertebr. Zool.* **68**, 269–281.
- Klingenberg, C.P. (1996). Multivariate allometry. In *Advances in morphometrics: 23–49.* Marcus, L.F., Corti, M., Loy, A., Naylor, G.J.P. & Slice, D.E. (Eds.). New York: Plenum press.
- Klingenberg, C.P. (2005). Developmental constraints, modules, and evolvability. In *Variation: A central concept in biology: 219–247.* Hallgrímsson, B. & Hall, B.K. (Eds.). Academic Press San Diego.
- Klingenberg, C.P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 353–7.
- Klingenberg, C.P. (2013). Visualizations in geometric morphometrics: How to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix* **24**, 15–24.

- Klingenberg, C.P., Barluenga, M. & Meyer, A. (2002). Shape analysis of symmetric structures: quantifying variation among individuals and asymmetry. *Evolution* **56**, 1909–1920.
- Klingenberg, C.P., McIntyre, G.S. & Zaklan, S.D. (1998). Left-right asymmetry of fly wings and the evolution of body axes. *Proc. Biol. Sci.* **265**, 1255–1259.
- Klingenberg, C.P. & Monteiro, L.R. (2005). Distances and directions in multidimensional shape spaces: implications for morphometric applications. *Syst. Biol.* **54**, 678–688.
- Klütsch, C.F.C., Dyer, R.J. & Misof, B. (2012). Combining multiple analytical approaches for the identification of population structure and genetic delineation of two subspecies of the endemic Arabian burnet moth *Reissita simonyi* (Zygaenidae; Lepidoptera). *Conserv. Genet.* **13**, 21–37.
- Knowles, L.L. & Carstens, B.C. (2007). Delimiting species without monophyletic gene trees. *Syst. Biol.* **56**, 887–895.
- Kocher, T.D., Thomas, W.K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F.X. & Wilson, A.C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 6196–6200.
- Kornilios, P., Thanou, E., Lymberakis, P., Ilgaz, Ç., Kumlutaş, Y. & Leaché, A. (2019). Genome-wide markers untangle the green-lizard radiation in the Aegean Sea and support a rare biogeographical pattern. *J. Biogeogr.* **46**, 552–567.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547–1549.
- Kuratani, S., Kuraku, S. & Nagashima, H. (2011). Evolutionary developmental perspective for the origin of turtles: the folding theory for the shell based on the developmental nature of the carapacial ridge. *Evol. Dev.* **13**, 1–14.
- Kuratani, S. & Nagashima, H. (2012). A developmental basis for innovative evolution of the turtle shell. In *From clone to bone: the synergy of morphological and molecular tools in palaeobiology*. Asher, R.J. & Müller, J. (Eds.). Cambridge University Press.
- van der Kuyl, A.C., Ballasina, D.L.P., Dekker, J.T., Maas, J., Willemsen, R.E. & Goudsmit, J. (2002). Phylogenetic relationships among the species of the genus *Testudo* (Testudines: Testudinidae) inferred from mitochondrial *12S* rRNA gene sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **22**, 174–183.
- Lanfear, R., Frandsen, P.B., Wright, A.M., Senfeld, T. & Calcott, B. (2016). PartitionFinder

- 2: New methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. *Mol. Biol. Evol.* **34**, msw260.
- Ljubisavljević, K., Džukić, G. & Kalezić, M.L. (2011). The commercial export of the land tortoises (*Testudo spp.*) from the territory of the former Yugoslavia: A historical review and the impact of overharvesting on wild populations. *North. West. J. Zool.* **7**, 250–260.
- Loss, S.R., Terwilliger, L.A. & Peterson, A.C. (2011). Assisted colonization: integrating conservation strategies in the face of climate change. *Biol. Conserv.* **144**, 92–100.
- Lourenço, J.M., Glémin, S., Chiari, Y. & Galtier, N. (2013). The determinants of the molecular substitution process in turtles. *J. Evol. Biol.* **26**, 38–50.
- Lovich, J.E., Ennen, J.R., Agha, M. & Gibbons, J.W. (2018). Where have all the turtles gone, and why does it matter? *Bioscience* **68**, 771–781.
- Lubiana, A. & Ferreira Júnior, P.D. (2009). Pivotal temperature and sexual dimorphism of *Podocnemis expansa* hatchlings (Testudines: Podocnemididae) from Bananal Island, Brazil. *Zoologia* **26**, 527–533.
- Ludoški, J., Francuski, L., Vujić, A. & Milankov, V. (2008). The *Cheilosia canicularis* group (Diptera: Syrphidae): species delimitation and evolutionary relationships based on wing geometric morphometrics. *Zootaxa* 40–50.
- Luján, À.H., Delfino, M., Robles, J.M. & Alba, D.M. (2016). The Miocene tortoise *Testudo catalaunica* Bataller, 1926, and a revised phylogeny of extinct species of genus *Testudo* (Testudines: Testudinidae). *Zool. J. Linn. Soc.*
- Lymberakis, P. & Poulakakis, N. (2010). Three continents claiming an archipelago: the evolution of Aegean's herpetofaunal diversity. *Diversity* **2**, 233–255.
- Lyson, T., Bhullar, B.-A.S., Bever, G.S., Joyce, W.G., de Queiroz, K., Abzhanov, A. & Gauthier, J.A. (2013). Homology of the enigmatic nuchal bone reveals novel reorganization of the shoulder girdle in the evolution of the turtle shell. *Evol. Dev.* **15**, 317–325.
- Lyson, T.R., Bever, G.S., Bhullar, B.-A.S., Joyce, W.G. & Gauthier, J. a. (2010). Transitional fossils and the origin of turtles. *Biol. Lett.* **6**, 830–833.
- Macale, D., Venchi, A. & Scalici, M. (2011). Shell shape and size variation in the Egyptian tortoise *Testudo kleinmanni* (Testudinidae, Testudines). *Folia Zool.* **60**, 167–175.
- Mace, G.M. (2004). The role of taxonomy in species conservation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **359**, 711–9.
- MacLeod, N. (2008). Understanding morphology in systematic contexts: three-dimensional specimen ordination and recognition. In *The New Taxonomy*: 143–210. Wheeler, Q.D.

- (Ed.). Boca Raton (FL): CRC Press.
- Magurran, A.E. & May, R.M. (1999). *Evolution of biological diversity*. New York: Oxford University Press.
- Mallet, J. (2001). *Subspecies, semispecies, superspecies*. Encyclopedia of Biodiversity.
- Manly, B.F.J. (2007). *Randomization, bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. CRC Press.
- Mann, G.K.H., O’Riain, M.J. & Hofmeyr, M.D. (2006). Shaping up to fight: sexual selection influences body shape and size in the fighting tortoise (*Chersina angulata*). *J. Zool.* **269**, 373–379.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press.
- McGaugh, S.E., Alacs, E.A., Edwards, S. V, Feldman, C.R., Georges, A., Sites, J.W. & Valenzuela, N. (2007). From molecules to organisms: research applications of modern genetic tools for turtle biology and conservation. *Chelonian Res. Monogr.* **4**, 47–72.
- McIntyre, D.C., Rakshit, S., Yallowitz, A.R., Loken, L., Jeannotte, L., Capecchi, M.R. & Wellik, D.M. (2007). *Hox* patterning of the vertebrate rib cage. *Development* **134**, 2981–2989.
- Medail, F. & Quezel, P. (1999). Biodiversity hotspots in the Mediterranean basin: setting global conservation priorities. *Conserv. Biol.* **13**, 1510–1513.
- Meier, R. (2008). DNA sequences in taxonomy. In *The New Taxonomy*: 95–127. Wheeler, Q.D. (Ed.).
- Milankov, V., Ludoški, J., Stähls, G., Stamenković, J. & Vujić, A. (2009). High molecular and phenotypic diversity in the *Merodon avidus* complex (Diptera, Syrphidae): cryptic speciation in a diverse insect taxon. *Zool. J. Linn. Soc.* **155**, 819–833.
- Mirimin, L., Vernesi, C., Bertolucci, C., Mazzotti, S. & Bertorelle, G. (2004). Mitochondrial DNA variation and divergence in three Hermann’s tortoise (*Testudo hermanni*) populations. *Ital. J. Zool.* **71**, 199–201.
- Morales Pérez, J.V. & Serra, A.S. (2009). The Quaternary fossil record of the genus *Testudo* in the Iberian Peninsula. Archaeological implications and diachronic distribution in the western Mediterranean. *J. Archaeol. Sci.* **36**, 1152–1162.
- Moritz, C. (1994). Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 373–375.
- Moritz, C. (2002). Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Syst. Biol.* **51**, 238–254.
- Morrison, D.A. (2005). Networks in phylogenetic analysis: new tools for population biology.

- Int. J. Parasitol.* **35**, 567–582.
- Murray, C.M., McMahan, C.D., Dobie, J.L. & Guyer, C. (2014). Cranial variation amongst independent lineages of the alligator snapping turtle (*Macrochelys temminckii*). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **52**, 305–311.
- Myers, E.M., Janzen, F.J., Adams, D.C. & Tucker, J.K. (2006). Quantitative genetics of plastron shape in slider turtles (*Trachemys scripta*). *Evolution* **60**, 563–572.
- Nikolić, S., Golubović, A., Bonnet, X., Arsovski, D., Ballouard, J.-M., Ajtić, R., Sterijovski, B., Iković, V., Vujović, A. & Tomović, L. (2018). Why an apparent prosperous subspecies needs strict protection? The case of *Testudo hermanni boettgeri* from the central Balkans. *Herpetol. Conserv. Biol.* **13**, 673–690.
- Padial, J.M., Miralles, A., De la Riva, I. & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Front. Zool.* **7**, 16.
- Palupčíková, K., Somerová, B., Protiva, T., Reháč, I., Velenský, P., Hulva, P., Gunalen, D. & Frynta, D. (2012). Genetic and shell-shape analyses of *Orlitia borneensis* (Testudines: Geoemydidae) reveal limited divergence among founders of the European zoo population. *Zootaxa* **3280**, 56.
- Pante, E., Schoelinck, C. & Puillandre, N. (2015). From integrative taxonomy to species description: one step beyond. *Syst. Biol.* **64**, 152–160.
- Paradis, E. (2010). Pegas: An R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics* **26**, 419–420.
- Parham, J.F., Macey, J.R., Papenfuss, T.J., Feldman, C.R., Türkozan, O., Polymeni, R. & Boore, J. (2006). The phylogeny of Mediterranean tortoises and their close relatives based on complete mitochondrial genome sequences from museum specimens. *Mol. Phylogenet. Evol.* **38**, 50–64.
- Patten, M.A. (2015). Subspecies and the philosophy of science. *Auk* **132**, 481–485.
- Perälä, J. (2001). Biodiversity in relatively neglected taxa of *Testudo* L., 1758 s.l. *Chelonii* **3**, 40–53.
- Perälä, J. (2004). *Testudo hercegovinensis* Werner, 1899. *Manouria* **7**, 19–20.
- Perez, M., Leblois, R., Livoreil, B., Bour, R., Lambourdiere, J., Samadi, S. & Boisselier, M.-C. (2012). Effects of landscape features and demographic history on the genetic structure of *Testudo marginata* populations in the southern Peloponnese and Sardinia. *Biol. J. Linn. Soc.* **105**, 591–606.
- Perez, M., Livoreil, B., Mantovani, S., Boisselier, M.-C., Crestanello, B., Abdelkrim, J., Bonillo, C., Goutner, V., Lambourdière, J., Pierpaoli, M., Sterijovski, B., Tomovic, L.,

- Vilaça, S.T., Mazzotti, S. & Bertorelle, G. (2014). Genetic variation and population structure in the endangered Hermann's tortoise: the roles of geography and human-mediated processes. *J. Hered.* **105**, 70–81.
- Perissoratis, C. & Conispoliatis, N. (2003). The impacts of sea-level changes during latest Pleistocene and Holocene times on the morphology of the Ionian and Aegean seas (SE Alpine Europe). *Mar. Geol.* **196**, 145–156.
- Petrović, J., Dragović, S., Dragović, R., Đorđević, M., Đokić, M., Zlatković, B. & Walling, D. (2016). Using ¹³⁷Cs measurements to estimate soil erosion rates in the Pčinja and South Morava River Basins, southeastern Serbia. *J. Environ. Radioact.* **158–159**, 71–80.
- Pfennig, D.W., Wund, M.A., Snell-Rood, E.C., Cruickshank, T., Schlichting, C.D. & Moczek, A.P. (2010). Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. *Trends Ecol. Evol.* **25**, 459–467.
- Phillimore, A.B. & Owens, I.P.. (2006). Are subspecies useful in evolutionary and conservation biology? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **273**, 1049–1053.
- Poulakakis, N., Kapli, P., Lymberakis, P., Trichas, A., Vardinoyiannis, K., Sfenthourakis, S. & Mylonas, M. (2015). A review of phylogeographic analyses of animal taxa from the Aegean and surrounding regions. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **53**, 18–32.
- Poulakakis, N., Lymberakis, P., Valakos, E., Zouros, E. & Mylonas, M. (2005). Phylogenetic relationships and biogeography of *Podarcis* species from the Balkan Peninsula, by bayesian and maximum likelihood analyses of mitochondrial DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* **37**, 845–857.
- Poulakakis, N. & Sfenthourakis, S. (2008). Molecular phylogeny and phylogeography of the Greek populations of the genus *Orthometopon* (Isopoda, Oniscidea) based on mitochondrial DNA sequences. *Zool. J. Linn. Soc.* **152**, 707–715.
- Protiva, T., Gunalen, D., Bauerová, A., Palupčíková, K., Somerová, B., Frýdlová, P., Jančúchová-Lásková, J., Šimková, O., Frynta, D. & Reháč, I. (2016). Shell shape and genetic variability of Southeast Asian Box Turtles (*Cuora amboinensis*) from Borneo and Sumatra. *Vertebr. Zool.* **66**, 387–396.
- de Queiroz, K. (1998). The general lineage concept of species, and the process of speciation. *Endless Forms Species Speciat.* 57–75.
- de Queiroz, K. (2005a). Ernst Mayr and the modern concept of species. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 6600–6607.
- de Queiroz, K. (2005b). Different species problems and their resolution. *BioEssays.* **27(12)**, 1263–1269.

- de Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Syst. Biol.* **56**, 879–86.
- de Queiroz, K. (2011). Branches in the lines of descent: Charles Darwin and the evolution of the species concept. *Biol. J. Linn. Soc.* **103**, 19–35.
- R Development Core Team. (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing.
- Rach, J., DeSalle, R., Sarkar, I., Schierwater, B. & Hadrys, H. (2008). Character-based DNA barcoding allows discrimination of genera, species and populations in Odonata. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **275**, 237–247.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G. & Suchard, M.A. (2018). Posterior summarization in bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst. Biol.* **67**, 901–904.
- Reid, B.N., Le, M., McCord, W.P., Iverson, J.B., Georges, A., Bergmann, T., Amato, G., Desalle, R. & Naro-Maciel, E. (2011). Comparing and combining distance-based and character-based approaches for barcoding turtles. *Mol. Ecol. Resour.* **11**, 956–967.
- Ricciardi, A. & Simberloff, D. (2009). Assisted colonization is not a viable conservation strategy. *Trends Ecol. Evol.* **24**, 248–253.
- Rice, R., Kallonen, A., Cebra-Thomas, J. & Gilbert, S.F. (2016). Development of the turtle plastron, the order-defining skeletal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 5317–5322.
- Rice, R., Riccio, P., Gilbert, S.F. & Cebra-Thomas, J. (2015). Emerging from the rib: Resolving the turtle controversies. *J. Exp. Zool. Part B Mol. Dev. Evol.* **324(3)**, 208–220.
- Rivera, G. (2008). Ecomorphological variation in shell shape of the freshwater turtle *Pseudemys concinna* inhabiting different aquatic flow regimes. *Integr. Comp. Biol.* **48**, 769–787.
- Rivera, G., Davis, J.N., Godwin, J.C. & Adams, D.C. (2013). Repeatability of habitat-associated divergence in shell shape of turtles. *Evol. Biol.* **41(1)**, 29–37.
- Rohlf, F.J. (1999). Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *J. Classif.* **16(2)**, 197–223.
- Rohlf, J.F. (2013). tpsDIG 2: software for digitization of landmarks and outlines, version 2.17.
- Rohlf, J.F. & Slice, D. (1990). Extensions of the procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Syst. Zool.* **39**, 40.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* **19**, 1572–1574.
- Ryder, O.A. (1986). Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trends Ecol. Evol.* **1**, 9–10.

- Sacchi, R., Pupin, F., Rosa, D.P. & Fasola, M. (2007). Bergmann's rule and the Italian Hermann's tortoises (*Testudo hermanni*): latitudinal variations of size and shape. *Amphibia-Reptilia* **28**, 43–50.
- Salinas, M., Altet, L., Clavel, C., Almela, R.M., Bayón, A., Burguete, I. & Sánchez, A. (2011). Genetic assessment, illegal trafficking and management of the Mediterranean spur-thighed tortoise in Southern Spain and Northern Africa. *Conserv. Genet.* **12**, 1–13.
- Sanger, T.J., Sherratt, E., Mcglothlin, J.W., Brodie, E.D., Losos, J.B. & Abzhanov, A. (2013). Convergent evolution of sexual dimorphism in skull shape using distinct developmental strategies. *Evolution* **67**, 2180–2193.
- Schlick-Steiner, B.C., Arthofer, W. & Steiner, F.M. (2014). Take up the challenge! Opportunities for evolution research from resolving conflict in integrative taxonomy. *Mol. Ecol.* **23**, 4192–4194.
- Schmitt, T. (2007). Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Front. Zool.* **4**, 11.
- Sears, K.E. (2014). Quantifying the impact of development on phenotypic variation and evolution. *J. Exp. Zool. B. Mol. Dev. Evol.* **322(8)**, 643–653.
- Siegal, M.L. & Bergman, A. (2002). Waddington's canalization revisited: developmental stability and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 10528–10532.
- Slice, D.E. (2001). Landmark coordinates aligned by procrustes analysis do not lie in Kendall's shape space. *Syst. Biol.* **50**, 141–149.
- Smith, R.J. (1999). Statistics of sexual size dimorphism. *J. Hum. Evol.* **36**, 423–458.
- Soler, J., Pfau, B. & Martínez-Silvestre, A. (2012). Detecting intraspecific hybrids in *Testudo hermanni* (Gmelin 1789). *Radiata* **21**, 4–29.
- Stayton, C.T. (2019). Performance surface analysis identifies consistent functional patterns across 10 morphologically divergent terrestrial turtle lineages. *Integr. Comp. Biol.* 1–12.
- Stephens, P.R. & Wiens, J.J. (2009). Evolution of sexual size dimorphisms in emydid turtles: ecological dimorphism, rensch's rule, and sympatric divergence. *Evolution* **63**, 910–925.
- Stillwell, R.C., Blanckenhorn, W.U., Teder, T., Davidowitz, G. & Fox, C.W. (2010). Sex differences in phenotypic plasticity affect variation in sexual size dimorphism in insects: from physiology to evolution. *Annu. Rev. Entomol.* **55**, 227–245.
- Stojadinović, D., Milošević, Đ. & Crnobrnja-Isailović, J. (2013). Righting time versus shell size and shape dimorphism in adult Hermann's tortoises: field observations meet theoretical predictions. *Anim. Biol.* **63**, 381–396.
- Stubbs, D., Swingland, I.R., Hailey, A. & Pulford, E. (1985). The ecology of the

- mediterranean tortoise *Testudo hermanni* in northern Greece (the effects of a catastrophe on population structure and density). *Biol. Conserv.* **31**, 125–152.
- Sutherland, W.J., Pullin, A.S., Dolman, P.M. & Knight, T.M. (2004). The need for evidence-based conservation. *Trends Ecol. Evol.* **19**, 305–308.
- Templeton, A.R., Crandall, K.A. & Sing, C.F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**, 619–633.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680.
- Todd, B., Willson, J. & Gibbons, J. (2010). The global status of reptiles and causes of their decline. In *Ecotoxicology of Amphibians and Reptiles, Second Edition*: 47–67. CRC Press, Pensacola, FL, USA.
- Tomović, L., Ajtić, R., Ljubisavljević, K., Urošević, A., Jović, D., Krizmanić, I., Labus, N., Đorđević, S., Kalezić, M.L., Vukov, T. & Džukić, G. (2014). Reptiles in Serbia - distribution and diversity patterns -. *Bull. Nat. Hist. Museum* **7**, 129–158.
- Tomović, L.T., Urošević, A., Ajtić, R., Krizmanić, I., Simovic, A., Labus, N., Jović, D., Krstić, M., Đorđević, S., Anđelković, M., Golubović, A. & Džukić, G. (2015). Contribution to the knowledge of distribution of Colubrid snakes in Serbia. *Ecol. Montenegrina* **2**, 162–186.
- Tregenza, T. (2002). Divergence and reproductive isolation in the early stages of speciation. *Genetica* **116**, 291–300.
- Türkozan, O., Kumlutas, Y. & Ilgaz, Ç. (2001). On the possible occurrence of the Marginated tortoise, *Testudo marginata*, in Turkey. *Chelonian Conserv. Biol.* **4**, 208–210.
- Ursenbacher, S., Schweiger, S., Tomović, L., Crnobrnja-Isailović, J., Fumagalli, L. & Mayer, W. (2008). Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): Evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan peninsula. *Mol. Phylogenet. Evol.* **46**, 1116–1128.
- Valdecasas, A.G., Peláez, M.L. & Wheeler, Q.D. (2014). What's in a (biological) name? The wrath of Lord Rutherford. *Cladistics* **30**, 215–223.
- Valenzuela, N., Adams, D.C., Bowden, R.M. & Gauger, A.C. (2004). Geometric morphometric sex estimation for hatchling turtles: a powerful alternative for detecting subtle sexual shape dimorphism. *Copeia* **2004**, 735–742.

- Vasilyev, V.A., Bondarenko, D.A., Peregontsev, E.A., Voronov, A.S., Ryskov, A.P. & Semenova, S.K. (2008). Polymorphism of the *12S* rRNA gene and phylogeography of the Central Asian tortoises *Agrionemys horsfieldii* gray, 1844. *Russ. J. Genet.* **44**, 682–685.
- Vasilyev, V.A., Korsunenkov, A. V, Pereshkolnik, S.L., Mazanaeva, L.F., Bannikova, A.A., Bondarenko, D.A., Peregontsev, E.A. & Semyenova, S.K. (2014). Differentiation of tortoises of the genera *Testudo* and *Agrionemys* (Testudinidae) based on the polymorphism of nuclear and mitochondrial markers. *Russ. J. Genet.* **50**, 1060–1074.
- Vega, C. & Stayton, T.C. (2011). Dimorphism in shell shape and strength in two species of emydid turtle. *Herpetologica* **67**, 397–405.
- Vetter, H. (2006). *Hermann's Tortoise, Boettger's and Dalmatian Tortoises*. Frankfurt am Main: Chelonian Library, Edition Chimaira.
- Vinarski, M. V. (2015a). The fate of subspecies category in Zoological systematics. 1. The history. *Biol. Bull. Rev.* **5**, 395–404.
- Vinarski, M. V. (2015b). The fate of subspecies category in Zoological systematics. 2. The present. *Biol. Bull. Rev.* **5**, 405–414.
- Vitek, N.S. (2018). Delineating modern variation from extinct morphology in the fossil record using shells of the Eastern Box Turtle (*Terrapene carolina*). *PLoS One* **13**, e0193437.
- Voje, K.L., Hansen, T.F., Egset, C.K., Bolstad, G.H. & Pélabon, C. (2014). Allometric constraints and the evolution of allometry. *Evolution* **68**, 866–885.
- Waddington, C. (1957). *The Strategy of the Genes; a Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology*. Allen & Unwin, London
- Wagner, G.P., Pavlicev, M. & Cheverud, J.M. (2007). The road to modularity. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 921–931.
- Wermuth, H. (1952). *Testudo hermanni robertmertensi* n.subsp. und ihr Vorkommen in Spanien. *Senckenbergiana* **33(1/3)**, 157–164.
- Werner, F. (1899). Beiträge zur Kenntnis der reptilien- und Batrachierfauna der Balkanhalbinsel. *Wissenschaftliche Mitth. aus Bosnien und der Hercegovina, Wien* **6**, 817–841.
- West-Eberhard, M.J. (2005). Developmental plasticity and the origin of species differences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102 Suppl**, 6543–6549.
- Wheeler, Q.D. (2008). *The New Taxonomy*. New York: CRC Press/Taylor & Francis Group.
- Willemsen, R.E. & Hailey, A. (1989). Status and conservation of tortoises in Greece. *Herpetol. J.* **1**, 315–330.

- Willemsen, R.E. & Hailey, A. (1999a). Variation of adult body size of the tortoise *Testudo hermanni* in Greece: proximate and ultimate causes. *J. Zool.* **248**, 379–396.
- Willemsen, R.E. & Hailey, A. (1999b). A latitudinal cline of dark plastral pigmentation in the tortoise *Testudo hermanni* in Greece. *Herpetol. J.* **9(3)**, 125–132.
- Willemsen, R.E. & Hailey, A. (2001). Variation in adult survival rate of the tortoise *Testudo hermanni* in Greece: implications for evolution of body size. *J. Zool.* **255**, 43–53.
- Willemsen, R.E. & Hailey, A. (2002). Body mass condition in greek tortoises: regional and interspecific variation. *Herpetol. J.* **12**, 105–114.
- Willemsen, R.E. & Hailey, A. (2003). Sexual dimorphism of body size and shell shape in European tortoises. *J. Zool.* **260**, 353–365.
- Willmore, K.E., Zelditch, M.L., Young, N., Ah-Seng, A., Lozanoff, S. & Hallgrímsson, B. (2006). Canalization and developmental stability in the Brachyrrhine mouse. *J. Anat.* **208**, 361–372.
- Willmore, K.E., Young, N.M. & Richtsmeier, J.T. (2007). Phenotypic variability: its components, measurement and underlying developmental processes. *Evol. Biol.* **34**, 99–120.
- Wilson, E.O. & Brown, W.L.J. (1953). The subspecies concept and its taxonomic application. *Syst. Zool.* **2**, 97–111.
- Wilson, J.-J., Sing, K.-W. & Sofian-Azirun, M. (2013). Building a DNA barcode reference library for the true butterflies (Lepidoptera) of Peninsula Malaysia: what about the subspecies? *PLoS One* **8**, e79969.
- Woolley, S.M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2008). A comparison of phylogenetic network methods using computer simulation. *PLoS One* **3**, e1913.
- Zachos, F.E. & Lovari, S. (2013). Taxonomic inflation and the poverty of the Phylogenetic Species Concept – a reply to Gippoliti and Groves. *Hystrix* 1–3.
- Zelditch, M.L. (1995). Developmental regulation of of variability. In *Variation: A central concept in biology*: 1–28.
- Zelditch, M.L., Swiderski, D.L. & Sheets, H.D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: A primer second edition*.
- Zenboudji, S., Arnal, V., Cheylan, M., Bertolero, A., Druelle, G., Dubois, M.-P. & Montgelard, C. (2018). Isolation and characterization of 32 microsatellite markers in Hermann's tortoise, *Testudo hermanni* (Testudinidae). *Chelonian Conserv. Biol.* **17**, 291–297.
- Zenboudji, S., Cheylan, M., Arnal, V., Bertolero, A., Leblois, R., Astruc, G., Bertorelle, G.,

- Pretus, J.L., Lo Valvo, M., Sotgiu, G. & Montgelard, C. (2016). Conservation of the endangered Mediterranean tortoise *Testudo hermanni hermanni*: the contribution of population genetics and historical demography. *Biol. Conserv.* **195**, 279–291.
- Zlatkovic, B., Nikolic, L., Randjelovic, V., Randjelovic, N. & Stevanovic, V. (2011). Comparative analyses of the vascular flora of the Pčinja river gorges in Serbia and Macedonia. *Arch. Biol. Sci.* **63**, 1157–1166.
- Zuffi, M.A.L. & Plaitano, A. (2007). Similarities and differences in adult tortoises: a morphological approach and its implication for reproduction and mobility between species. *Acta Herpetol.* **2**, 79–86.

PRILOG

Tabela P1. Poreklo jedinki *Testudo hermanni boettgeri* korišćenih za molekularne analize.

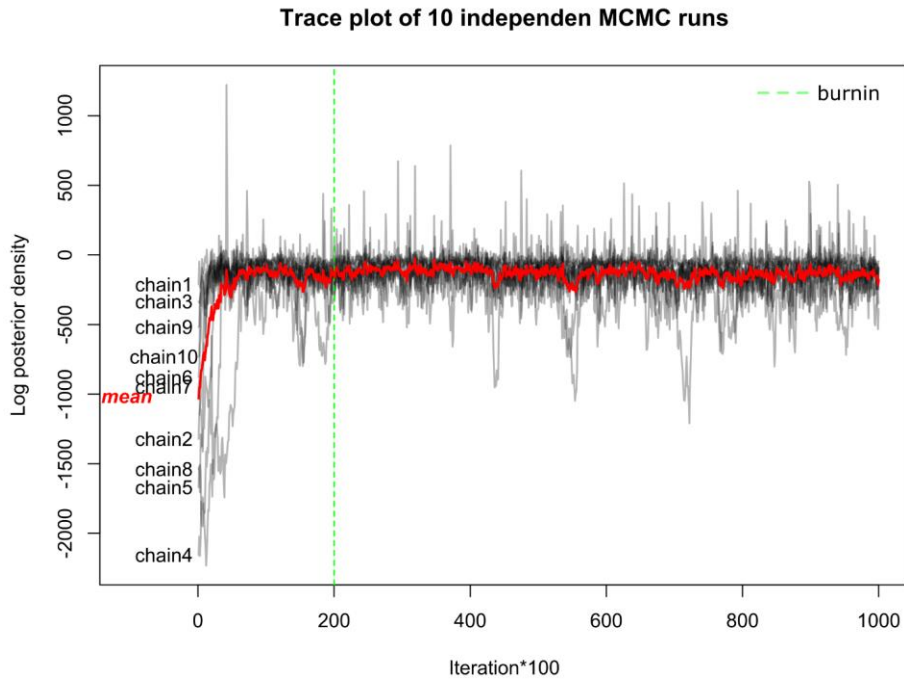
DNK ID	Geografska dužina	Geografska širina	Lokalitet	Zemlja
K4	42.13711	19.06794	Brce	Crna Gora
K5	42.13711	19.06794	Brce	Crna Gora
K6	42.09606	19.11661	Popovići	Crna Gora
K8	42.09606	19.11664	Popovići	Crna Gora
K9	42.31694	19.20819	Vranjina	Crna Gora
K11	42.31694	19.20819	Vranjina	Crna Gora
K12	42.31456	19.06103	Rijeka Crnojevića	Crna Gora
K17	42.20992	19.163	Kršica	Crna Gora
K18	42.08464	19.34389	Veliki Ostros	Crna Gora
K19	42.22153	19.12089	Seoce	Crna Gora
K20	42.28533	19.05972	Komarno	Crna Gora
K21	42.28533	19.05972	Komarno	Crna Gora
K22	37.09378	22.37183	Sparta	Grčka
K23	37.09378	22.37183	Sparta	Grčka
K24	38.14002	21.37672	Kalogria	Grčka
K27	42.69381	18.50094	Lastva	Bosna i Hercegovina
K28	42.96567	17.61022	Badžula	Hrvatska
K29	44.49939	14.96344	Pag	Hrvatska
K30	44.32497	15.03192	Vir	Hrvatska
K31	44.04064	15.62017	Benkovac	Hrvatska
K32	38.34946	21.5885	Evinochori	Grčka
K35	37.72954	21.76553	Olympia	Grčka
K36	37.72934	21.76529	Olympia	Grčka
K38	38.53773	21.38669	Evinochori	Grčka
K39	42.96567	17.61022	Badžula	Hrvatska
K40	44.49939	14.96344	Pag	Hrvatska

Tabela P1. (Nastavak)				
K41	44.04064	15.62017	Benkovac	Hrvatska
K42	42.69381	18.50094	Lastva	Bosna i Hercegovina
K43	37.09378	22.37183	Sparta	Grčka
K44	38.13756	21.37705	Kalogria	Grčka
K45	37.72894	21.76613	Olympia	Grčka
K46	38.39697	21.49488	Evinochori	Grčka
K47	37.72948	21.76503	Olympia	Grčka
K49	37.09378	22.37183	Sparta	Grčka
K75	42.33657	21.89322	Pčinja	Srbija
K76	42.33657	21.89322	Pčinja	Srbija
K77	42.33657	21.89322	Pčinja	Srbija
K78	42.313	21.88045	Pčinja	Srbija
K79	42.31286	21.87899	Pčinja	Srbija
K80	44.14328	22.52303	Negotin	Srbija
K81	44.13903	22.52053	Negotin	Srbija
K82	44.13669	22.52222	Negotin	Srbija
K83	44.75994	22.47944	Ilovita	Rumunija
K84	44.75997	22.48103	Ilovita	Rumunija
K85	44.75925	22.48164	Ilovita	Rumunija
K86	44.75906	22.4825	Ilovita	Rumunija
K87	38.53797	21.38742	Evinochori	Grčka
K88	38.38279	21.53568	Evinochori	Grčka
K96	41.69919	19.70214	Shengjin	Albanija
K97	41.69911	19.70222	Shengjin	Albanija
K99	41.08083	19.6755	Rrogozhine	Albanija
K100	40.33122	19.49081	Tragias	Albanija
K101	40.36808	19.48336	Radhime	Albanija
K102	39.75383	20.00481	Ksamil	Albanija
K103	39.91614	20.18356	Syri&Kalter	Albanija
K104	39.85106	20.77261	Kipi	Grčka
K105	39.93933	20.22506	Gjirokaster	Albanija
K106	40.74036	21.19642	Antartiko	Grčka

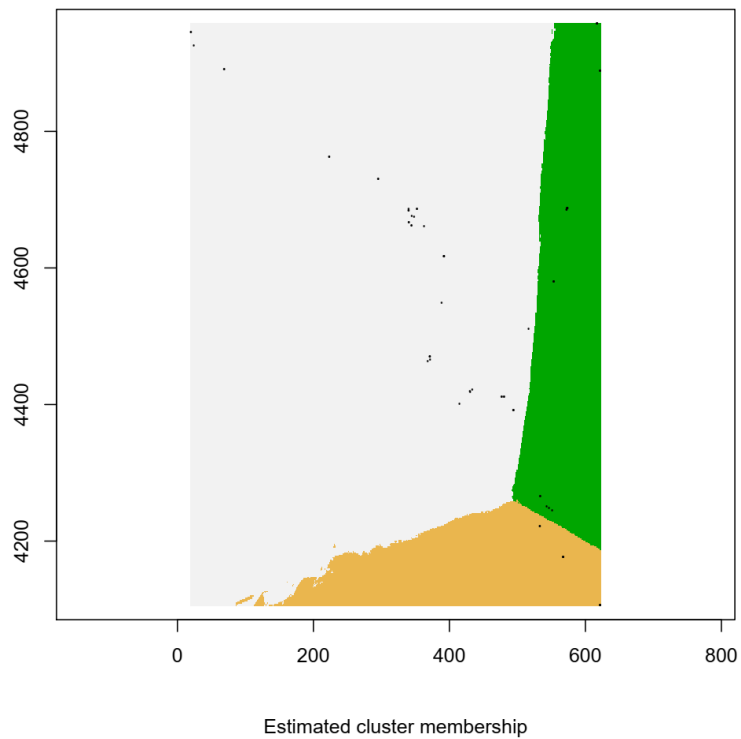
Tabela P1. (Nastavak)				
K107	41.36958	21.64108	Prilep Pletvar	Republika Severna Makedonija
K108	41.36958	21.64108	Prilep Pletvar	Republika Severna Makedonija
K109	39.84675	20.72853	Kipi	Grčka
K110	39.67331	20.93475	Ioanina	Grčka
K144	42.33757	21.88981	Pčinja	Srbija
K145	42.33845	21.88954	Pčinja	Srbija
K146	42.33657	21.89146	Pčinja	Srbija
K147	41.69906	19.70233	Shengjin	Albanija
K148	41.69978	19.70194	Shengjin	Albanija
K149	40.30436	19.44853	Orikum	Albanija
K150	40.36808	19.48283	Radhime	Albanija
K151	40.3685	19.48458	Radhime	Albanija
K152	39.91181	20.18767	Syri&Kalter	Albanija
K153	39.85369	20.77497	Kipi	Grčka
K154	39.84456	20.73278	Kipi	Grčka
K155	39.67231	20.93525	Ioanina	Grčka
K156	39.67639	20.93381	Ioanina	Grčka
K157	41.36958	21.64111	Prilep Pletvar	Republika Severna Makedonija

Tabela P2. Geografsko poreklo jedinki, identifikacioni broj iz Banke gena (Acc. No), haplotip i haplogrupa pripadnosti jedinki *Testudo hermanni hermanni* na osnovu *cytb* mtDNK sekvenci poreklom iz Banke gena (Fritz *i sar.*, 2006).

Zemlja	Region	Acc. No.	Dužina	Širina	Haplotip/Haplogrupa
Francuska	Corsica: Casabianda	AM230506	42.0833	9.5000	H5/H1-H7
	Corsica: Fontane du Salaro (Ajaccio)	AM230507	41.9167	8.7333	
	Corsica: Porto Vecchio	AM230508	41.6000	9.2833	H6/H1-H7
	Saint Tropez	AM230504	43.2667	6.6333	H1/H1-H7
	AM230505	43.2667	6.6333		
Italija	Apulia: Martina Franca	AM230516	40.7000	17.3333	H1/H1-H7
	Apulia: Ostuni	AM230517	40.7333	17.5833	
		AM230518	40.7333	17.5833	
	Apulia: Pianelle	AM230519	40.6500	17.2167	
		AM230520	40.6500	17.2167	
	Apulia: Mt. Gargano	AM230521	41.7333	15.7833	
	Apulia: Ginosa Marina	AM230515	40.4333	16.8833	H2/H1-H7
	Basilicata	AM230514	40.2000	16.6833	H1/H1-H7
	Sardinia: Bay of Porto Ferro	AJ888361	40.6833	8.2000	H7/H1-H7
	Sardinia: Alghero	AM230509	40.6167	8.0333	H5/H1-H7
	Sardinia: Porto Palmas	AM230510	40.7667	8.1667	
	Sicily: Balestrate	AM230512	38.0500	13.0000	
	Sicily: Castellamare del Golfo	AM230513	38.0333	12.8833	
	Toscana: Roccatederighi	AJ888362	43.0333	11.0833	H1/H1-H7
AJ888363		43.0333	11.0833	H4/H1-H7	
Toscana: Piombino	AM230511	42.9500	10.5500	H1/H1-H7	
South Italy	AJ888364	NA	NA		
Španija	Albera	AM230497	42.3667	2.9500	H3/H1-H7
		AM230498	42.3667	2.9500	
	Ebro	AM230495	40.7000	0.7167	H5/H1-H7
		AM230496	40.7000	0.7167	
	Mallorca: Son Real	AM230499	39.7667	3.1167	H3/H1-H7
		AM230500	39.7667	3.1167	
	Menorca: Pilar	AM230502	40.0667	3.9833	
	Menorca: Tirant	AM230503	40.0669	4.1000	
Menorca: Bec	AM230501	39.9333	4.0500	H5/H1-H7	



Slika P1. Prikaz 10 nezavisnih simulacija dobijenih programom Geneland.



Slika P2. Mapa pripadnosti genetičkim klasterima na osnovu 12S rRNA sekvenci nakon analize u paketu Geneland.

R funkcija (kod) “variance.boot” generiše butstrap (bootstrap) distribuciju i/ili grafički prikazuje unutargrupnu fenotipsku varijansu (Prokrustovu varijansu) za n grupa.

Distribuciju fenotipske varijanse za svaku grupu dobijena je pomoću metode ponovnog uzorkovanja jedinki sa ponavljanjem (resampling with replacement; bootstrap). Osnovni ulazni argument funkcije je “model” koji je linearni model dobijen pomoću geomorph ili RRPP R paketa (primer korišćenja funkcije je priložen na kraju Priloga)

```
variance.boot <- function (model, iter = 1000, plot = TRUE) {

## funkciju pisao Marko Djurakic (kontakt: marko.djurakic@dbe.uns.ac.rs)
## funkcija je vezana za dva paketa: 'geomorph' i 'rrpp'
## verzije R i paketa pod kojim je testirana funkcija su: R (3.6.0), geomorph (3.1.2) i rrpp (0.4.2)
## atribut 'model' mora imati klasu 'procD.lm' ili 'lm.rrpp' (proveriri uputstvo za geomorph i rrpp
paket)
## atribut 'model' trenutno moze imati samo jedan faktor ciji efekat se testira i n nivoa datog faktora
(npr. faktor je "pol", a nivoi su "muzjak" i "zenka")
## više faktora je moguće porediti ali delovi funkcije moraju biti izmenjeni
## atribut 'iter' je pozitivan skalar, a (iter - 1) je broj iteracija koji se koristi u analizi.
## atribut 'plot' = TRUE generise boksplo
## boksplo granicne vrednosti su standardne (npr. https://towardsdatascience.com/understanding-boxplots-5e2df7bcbd51)
## atribut 'plot' = FALSE vraća butstrap distribuciju u formi matrice (p x n; p = broj redova jednak
atributu "iter", n = broj nivoa faktora)
## u prvom redu (p = 1) svake kolone matrice nalazi se uocena varijansa (observed variance)

if (!any (class (model) %in% c ("procD.lm", "lm.rrpp"))) stop ("atribut 'model' mora imati klasu
'procD.lm' ili 'lm.rrpp'")

if (length (names (model$data)) != 2) stop ("atribut model nema ni jedan ili vise od dva faktora ciji
efekat se ispituje; funkcija je optimizovana za jedan")

groups <- model$data[[which (names (model$data) != "Y")]]
n.gr <- length (levels (groups))
Y <- model$data$Y
dists <- matrix (NA, nrow = iter, ncol = n.gr, dimnames = list (NULL, levels (groups)))
PW <- RRPP::pairwise (model, groups = groups)
dists[1, ] <- PW$vars[, 1]

for (i in 2:iter){
Y.temp <- Y

for (j in 1:n.gr){
gr.temp <- levels (groups)[j]
gr.logical <- groups %in% gr.temp
Y.temp[gr.logical, ] <- Y[gr.logical, ][sample (sum (gr.logical), replace = TRUE), ]
}

gmdf.temp <- geomorph::geomorph.data.frame (shape =Y.temp, groups = groups)
fit.temp <- geomorph::procD.lm(shape~groups, iter = 1, data = gmdf.temp, print.progress = FALSE)
dists[i, ] <- RRPP::pairwise (fit.temp, groups = groups)$vars[, 1]
}
}
```

```

if (plot) {
  boxplot.matrix (dists)
  # width of each boxplot is 0.8
  x0s <- 1:n.gr - 0.4
  x1s <- 1:n.gr + 0.4
  y0s <- dists[1, ]
  # add segments
  segments(x0 = x0s, x1 = x1s, y0 = y0s, col = palette()[1:n.gr], lty = 2, lwd = 2)
  legend ("topright", legend = c ("Obs. variance", "Median variance"), lty = c (2, 1))
}
else dists
}

##### Primer koriscenja funkcije

require (geomorph)
data ("plethodon")
Y <- gpagen (A = plethodon$land)$coords
gm.df <- geomorph.data.frame (shape = Y, groups = interaction (plethodon$species, plethodon$site))

fit <- procD.lm (shape~groups, iter = 1000, seed = 3422, data = gm.df)

## uocena fenotipska varijansa
obs.var <- RRPP::pairwise (fit, groups = gm.df$groups)$vars[, 1]

## butstrap distribucija
boot.dist <- variance.boot(fit, plot = FALSE)
head (boot.dist)
tail (boot.dist)

## prvi red butstrap distribucije odgovara uocenim vrednostima fenotipske varijanse
rbind (obs1 = obs.var, obs2 = boot.dist[1, ]) # identične vrednosti

## butstrap distribucija predstavljena graficki za svaku grupu
variance.boot (fit)

## Na osnovu grafika indikativno je da ne postoji razlika u fenotipskoj varijansi između četiri grupe
salamandera

## Provera uz pomoć permutacionog testa u geomorph-u i RRPP-u
comparison <- pairwise(fit, groups = gm.df$groups)

summary(comparison, test.type = "var") # svi parovi koji su poređeni nisu značajni, tj. ne postoji
razlika u fenotipskoj varijansi.

```

Biografija

Marko Đurakić je rođen 01.07.1984. u Čačku, SFR Jugoslavija. Diplomirao je 2010. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu. U 2011. godini zaposlen je na Departmanu za Biologiju i ekologiju, Univerzitet u Novom Sadu kao istraživač pripravnik preko republičkog projekta OI 173012, kojim rukovodi akademik Marko Anđelković, u Laboratoriji za evolucionu biologiju, koju vodi prof. dr Vesna



Milankov. 2014. godine biran je u zvanje asistenta na Katedri za Zoologiju i od tada učestvuje u realizaciji nastave, uglavnom na predmetima koji su vezani za anatomiju i sistematiku hordata. U okviru programa Erasmus+ mobilnosti vodio je istraživački projekat jedne studentkinje sa Univerziteta u Aveiru, Portugal. Takođe, vodio je dva studentska projekta koji su nagrađeni specijalnom nagradom za naučni rad od strane Univerziteta u Novom Sadu 2015. i 2016. godine. 2015. godine bio je instruktor po pozivu na kursu “Osnove geometrijske morfometrije” na Hanjang Univerzitetu (Hanyang University) u Seulu, Južna Koreja koji je ocenjen veoma visokom ocenom studenata.

Istraživački opus Marka Đurakića odnosi se na morfološku evoluciju oklopa kornjača, krila insekata i egzoskeleta račića. U svom istraživačkom radu najčešće koristeći genetičke i savremene morfometrijske tehnike na mikro- i makroevolucionom nivou. Do sada je uspostavio internacionalnu saradnju sa dr Entoni Herelom (Anthony Herrel; Muséum National d'Histoire Naturelle in Paris, CNRS, France), dr Uve Fricom (Uwe Fritz; Museum of Zoology in Dresden, Senckenberg Research Institute, Germany) i dr Melitom Vamberger (Melita Vamberger; Museum of Zoology in Dresden, Senckenberg Research Institute, Germany) preko internacionalnih SYNTHESYS grantova koji su finansirani od strane Evropske unije.

Do sada je publikovao 17 naučnih radova sa SCI liste, 24 kongresna saopštenja u zemlji i inostranstvu koji su citirani 203 puta, a trenutni *h*-indeks mu je 8. Član je udruženja kao što su: Nemačko zoološko društvo, Evropsko društvo evolucionih biologa i Međunarodno društvo za istraživanje morfologije kičmenjaka.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Марко Р. Ђуракић _____

број индекса _____ Е3011/2010 _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Популациона анализа морфолошке варијабилности и компаративна генска
генеалогичка анализа шумске корњаче (*Testudo hermanni boettgeri*)“

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

У Београду, _____ 21.08.2019. _____

Потпис докторанда



Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Марко Р. Ђуракић _____

Број индекса _____ Е3011/2010 _____

Студијски програм _____ Биологија, модул генетика _____

Наслов рада _Популациона анализа морфолошке варијабилности и компаративна генска генеологија шумске корњаче (*Testudo hermanni boettgeri*)

Ментор ___ проф. др Марина Стаменковић Радак; проф. др Весна Миланков _____

Потписани/а _____ Марко Р. Ђуракић _____


Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања 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 докторанда

У Београду, _____ 21.08.2019. _____

 _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Популациона анализа морфолошке варијабилности и компаративна генска
генеалогја шумске корњаче (*Testudo hermanni boettgeri*)

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____ 21.08.2019. _____



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 прераде. 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 прераде. 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.