

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Zvezdana S. Jovanović

**ONTOGENETSKA, HISTOLOŠKA,  
SEMIOHEMIJSKA I ETOLOŠKA  
ISTRAŽIVANJA VRSTE *PACHYIULUS  
HUNGARICUS* (KARSCH, 1881)  
(DIPLOPODA, JULIDA, JULIDAE)**

doktorska disertacija

Beograd, 2019

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Zvezdana S. Jovanović

**ONTOGENETIC, HISTOLOGICAL,  
SEMIOCHEMICAL AND ETHOLOGICAL  
RESEARCH OF *PACHYIULUS*  
*HUNGARICUS* (KARSCH, 1881)  
(DIPLOPODA, JULIDA, JULIDAE)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2019

**Mentori:**

---

Prof. dr Slobodan Makarov, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

Prof. dr Luka Lučić, redovni profesor,  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

**Članovi komisije:**

---

Prof. dr Aleksandra Korać, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

Prof. dr Sofija Pavković-Lučić, redovni profesor  
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

---

Dr Ljubodrag Vujisić, docent  
Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet

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

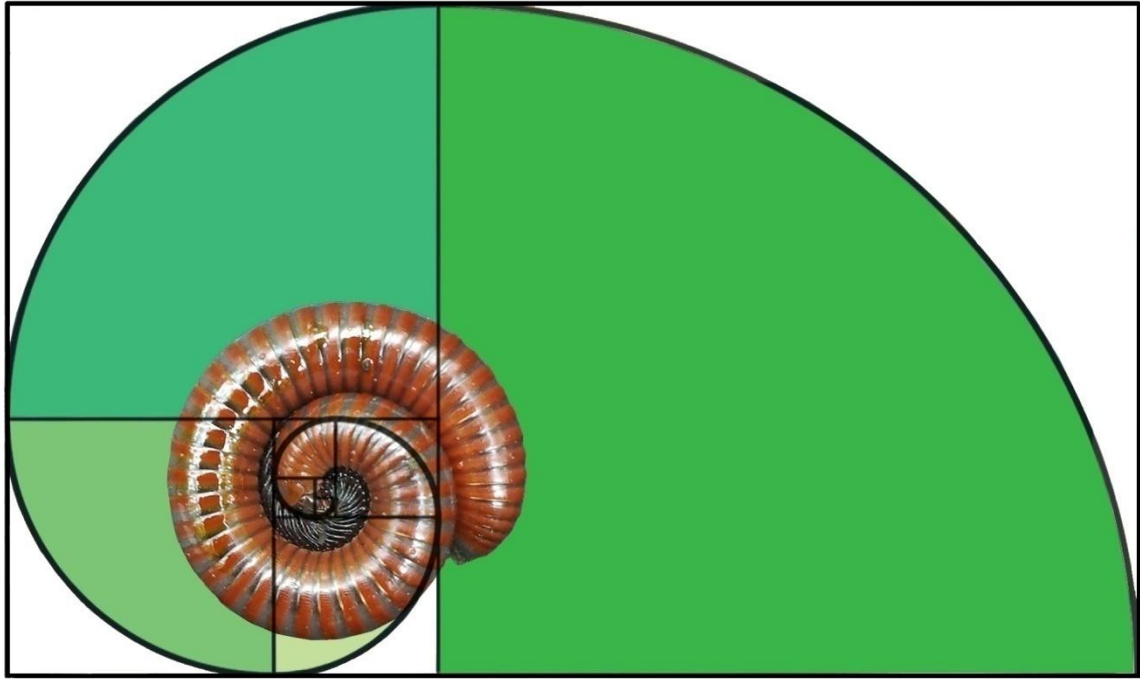
## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija je urađena na Katedri za dinamiku razvića životinja Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta, i predstavlja rezultat saradnje sa Katedrom za biologiju ćelija i tkiva i Centrom za elektronsku mikroskopiju, Katedrom za mikrobiologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta i Katedrom za organsku hemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta. Finansijska podrška obezbeđena je projektom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja pod nazivom "Ontogenetska karakterizacija filogenije bioraznovrsnosti" (OI 173038).*

*S obzirom da su u ovoj tezi prikazani rezultati istraživanja različitih aspekata biologije određenog model organizma, zahvalnost dugujem mnogobrojnim profesorima, saradnicima i istraživačima, a pre svega svojim mentorima, redovnim profesorima dr Slobodanu Makarovu i dr Luki Lučiću sa Katedre za dinamiku razvića životinja, kao i članovima komisije, prof. dr Aleksandri Korać sa Katedre za biologiju ćelija i tkiva, prof. dr Sofiji Pavković-Lučić sa Katedre za genetiku i evoluciju i doc. dr Ljubodragu Vujisiću sa Katedre za organsku hemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta.*

*Zahvaljujem se naučnom saradniku dr Bojanu Iliću i ostalim članovima Katedre za dinamiku razvića životinja, naučnom saradniku dr Vukici Vujić sa Katedre za genetiku i evoluciju, zatim članovima Katedre za biologiju ćelija i tkiva i Centra za elektronsku mikroskopiju, Katedre za mikrobiologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta, Katedre za organsku hemiju Univerziteta u Beogradu - Hemijskog fakulteta, i prof. dr Draganu Nikoliću pri Laboratoriji za elektronsku mikroskopiju Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta. Takođe, hvala mojim koleginicama sa doktorskih studija Mariji Aleksić i Ivani Šaganović.*

*Hvala mojoj mami, ostalim članovima porodice i Nemanji Jovanoviću.*



Fibonačijev niz: *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) u odbrambenom položaju

**Ontogenetska, histološka, semiohemijska i etološka istraživanja vrste *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) (Diplopoda, Julida, Julidae)**

**Sažetak**

U ovoj tezi predstavljeni su rezultati istraživanja različitih aspekata biologije diplopede *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881): kasnog perioda postembrionalnog razvića, histološke građe odbrambenih žlezda, sastava i antimikrobnog dejstva odbrambenog sekreta i reproduktivnog ponašanja.

Euanamorfno razviće je proučavano kroz stadijume VII-XII, odnosno, kroz period kasne postembriogeneze. Definisane stadijuma izvedeno je na osnovu broja nizova ocela, dok vrednosti analiziranih morfoloških osobina imaju dopunski informacioni značaj. Adultne jedinke sa funkcionalnim gonopodama i funkcionalnim vulvama uočene su na stadijumu XI.

Histološka građa odbrambenih žlezda je analizirana kod adultnih jedinki. Komponente odbrambenog sekreta su lokalizovane u sekretornim granulama, koje se, na osnovu određenih morfoloških osobina mogu svrstati u nekoliko tipova. Rezultati ultrastrukturne analize ukazuju da se sekret kanalima doprema u lumen rezervoara, što odgovara merokrinom tipu sekrecije.

Dominantna jedinjenja u sekretu *P. hungaricus* su hinoni, dok su nehinonska jedinjenja u vidu pentil i heksil estara zasićenih i nezasićenih masnih kiselina dugog niza. Sekret je ispoljio inhibitorno dejstvo na rast gljiva i bakterija, kao i baktericidno i fungicidno dejstvo.

S obzirom da u privlačenju partnera mogu da deluju i hemijski stimuli, proučavan je aspekt reproduktivnog ponašanja, prekopulatorno ponašanje. Opisano je nekoliko sekvenci ponašanja u testu nazvanom „arena za parenje“, a zatim u testovima izbora mužjaka i izbora ženki. Nekoliko morfoloških osobina jedinki koje su se parile i onih koje nisu imale uspeha u parenju, analizirano je metodama tradicionalne i geometrijske morfometrije. Rezultati su pokazali da je osobina oblika nogu podložna prekopulatornoj seksualnoj selekciji.

**Ključne reči:** *Pachyiulus hungaricus*, Diplopoda, euanamorfoza, morfološka varijabilnost, odbrambene žlezde, sekretorne ćelije, odbrambeni sekret, antimikrobno dejstvo, uspeh u parenju.

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Biologija razvića životinja

**UDK broj:** [591.8+591.572.5+591.351]: 595.61(043.3)

**Ontogenetic, histological, semiochemical and ethological research of species *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) (Diplopoda, Julida, Julidae)**

**Abstract**

In this thesis, the results of research on various aspects of biology of diplopod *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) are presented: late period of postembryonic development, histological structure of defensive glands, composition and antimicrobial effect of defensive secretion and reproductive behaviour.

Stadia VII-XII, which belong to the late period of euanamorphic development, were included in the analysis. Counting rows of ocelli was the primary method for differentiating between stadia, while the other analysed morphological traits are of supplementary informational significance. Adults possess functional gonopods and functional vulvae at the stadium XI.

Histological structure of defensive glands was investigated in adults. Components of defensive secretion are localized in secretory granules, which could be classified into several types, based on their morphology. Results of ultrastructural analysis indicate that ducts transport the secretion into reservoir lumen, which corresponds to the merocrine secretion mode.

Dominant compounds in the secretion of *P. hungaricus* are quinones, and non-quinonic compounds are pentyl and hexyl esters of long-chain fatty acids. The secretion had inhibitory effect on the growth of tested bacteria and fungi, as well as bactericidal and fungicidal effect.

Considering that chemical stimuli could be important in the mate attraction, we studied the aspect of reproductive behaviour, precopulatory behaviour. Several sequences of the behaviour were described during mating arena test and then in male and female choice tests. Also, several morphological traits of mated and nonmated individuals were analysed using traditional and geometric morphometrics. The results indicate that the leg shape is subjected to precopulatory sexual selection.



**Key words:** *Pachyiulus hungaricus*, Diplopoda, euanamorphosis, morphological variability  
defensive glands, secretory cells, defensive secretion, antimicrobial effect, mating success.

**Scientific field:** Biology

**Scientific subfield:** Biology of Animal Development

**UDC number:** [591.8+591.572.5+591.351]: 595.61(043.3)

## Sadržaj

<b>1. UVOD</b>	1
1.1. Opšte odlike klase Diplopoda	1
1.2. Postembriogeneza Diplopoda	6
1.2.1 Anamorfno razviće Diplopoda	6
1.2.2 Definisane postembrionalnih stadijuma Diplopoda	12
1.3. Anatomske i fiziološke odlike odbrambenih žlezda Diplopoda	13
1.4. Odbrambeni mehanizmi klase Diplopoda	16
1.4.1. Hemijska odbrana	20
1.4.1.1. Glomeridni tip žlezda	21
1.4.1.2. Polidezmidni tip žlezda	22
1.4.1.3. Julidni tip žlezda	25
1.5. Poliginandrija, seksualna selekcija i reproduktivno ponašanje Diplopoda	27
<b>2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA</b>	31
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	32
3.1. <i>Pachyiulus hungaricus</i> – rasprostranjenje i osnovne morfološke odlike	32
3.2. Prikupljanje i čuvanje jedinki u laboratorijskim uslovima	33
3.3. Metode istraživanja postembrionalnog razvića	34
3.3.1. Prikupljanje i merenje jedinki	34
3.3.2. Analizirane morfološke osobine	34
3.3.3. Metode određivanja postembrionalnih stadijuma <i>P. hungaricus</i>	35
3.4. Metode histoloških istraživanja	36
3.4.1. Priprema odbrambenih žlezda za elektronsku mikroskopiju	36
3.4.2. Bojenje toluidinom	37
3.4.3. Imerzija ozadena u mlečnu kiselinu	37

3.4.4. Merenje morfoloških celina, histoloških i citoloških komponenti	38
3.5. Metode semiohemijjskih istraživanja	38
3.5.1. Prikupljanje i priprema odbrambenog sekreta	38
3.5.2. Hemijske analize	38
3.5.3. Patogeni sojevi i uslovi gajenja kultura	39
3.5.4. Antibakterijska aktivnost odbrambenog sekreta <i>P. hungaricus</i>	40
3.5.5. Antifungalna aktivnost odbrambenog sekreta <i>P. hungaricus</i>	42
3.6. Metode etoloških istraživanja	42
3.6.1. Uzorkovanje i pripremanje jedinki za testove parenja	42
3.6.2. Testovi parenja	43
3.6.3. Analiza odabranih morfoloških osobina kod <i>P. hungaricus</i>	44
<b>4. REZULTATI</b>	47
4.1. Rezultati istraživanja postembrionalnog razvića	47
4.1.2. Postembrionalni stadijumi <i>P. hungaricus</i>	47
4.2. Rezultati histoloških istraživanja	53
4.2.1. Morfološke i histološke odlike odbrambenih žlezda <i>P. hungaricus</i>	53
4.2.2. Ultrastrukturalna analiza odbrambenih žlezda <i>P. hungaricus</i>	58
4.3. Rezultati semiohemijjskih istraživanja	65
4.3.1. Identifikacija jedinjenja odbrambenog sekreta	65
4.3.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti difuzionim testom u bunarićima	70
4.3.3. Određivanje minimalnih inhibitornih (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC)	70
4.3.4. Određivanje minimalnih inhibitornih (MIC) i minimalnih fungicidnih koncentracija (MBC)	72
4.4. Rezultati etoloških istraživanja	73

4.4.1. Ponašanje tokom parenja vrste <i>P. hungaricus</i>	73
4.4.1.1. Arena za parenje	73
4.4.1.2. Testovi izbora mužjaka i izbora ženki	76
4.4.2. Varijabilnost odabranih morfoloških osobina kod <i>P. hungaricus</i>	78
4.4.2.1. Analiza linearnih mera	78
4.4.2.2. Analiza veličine i oblika nogu i gonopoda	79
<b>5. DISKUSIJA</b>	84
5.1. Postembrionalno razviće <i>P. hungaricus</i>	84
5.2. Funkcionalna morfologija i ultrastruktura odbrambenih žlezda <i>P. hungaricus</i>	89
5.3. Sastav i antimikrobna svojstva odbrambenog sekreta <i>P. hungaricus</i>	93
5.3.1. Sastav odbrambenog sekreta <i>P. hungaricus</i>	93
5.3.2. Antimikrobna svojstva odbrambenog sekreta <i>P. hungaricus</i>	97
5.4. Povezanost morfoloških osobina sa uspešnošću u parenju kod vrste <i>P. hungaricus</i>	102
<b>6. ZAKLJUČCI</b>	108
<b>7. LITERATURA</b>	111

# 1. UVOD

## 1.1. Opšte odlike klase Diplopoda

Podfilum Myriapoda Leach, 1814 obuhvata četiri klase: Diplopoda, Chilopoda, Pauropoda i Symphyla. Njihove zajedničke karakteristike su: prisustvo jednog para antena na glavi, jednog para mandibula, jednog ili dva para maksila i više od četiri homonomna segmenta sa nogama za hodanje (Blower, 1985). Obeležja po kojima se Diplopoda izdvajaju od ostalih klasa su: prisustvo kratkih antena, snažnih mandibula, para maksila koje su fuzionisane u gnathohilarijum i prisustvo po dva para nogu za hodanje na svakom segmentu, počevši od petog, po čemu je ova klasa i dobila ime (Blower, 1985; Hopkin & Read, 1992; Sierwald & Bond, 2007).

Do sada je opisano oko 12000 vrsta diplopoda, koje su svrstane u 16 redova i 140 porodica, dok se procene broja vrsta kreću do oko 80000 (Hoffman *et al.*, 2002; Sierwald & Bond, 2007; Golovatch & Kime, 2009; Enghoff *et al.*, 2015). Klasu Diplopoda čine dve potklase (Enghoff *et al.*, 2015). Potklasa Penicillata, sa jednim redom Polyxenida, obuhvata vrste sa nekalcifikovanom kutikulom i indirektnim transferom sperme. Svi ostali redovi su svrstani u potklasu Chilognatha i dve infraklase. Infraklasi Pentazonia pripadaju redovi sa pet odvojenih artikulisanih sklerita, po čemu su i dobili ime. Nadred Oniscomorpha ove infraklase odlikuje se sposobnošću sklupčavanja prilikom zauzimanja odbrambenog položaja. Razviće je hemianamorfno, a mužjaci poseduju telopode, modifikovani zadnji par nogu, sa funkcijom transfera sperme. Ovde su svrstane i stonoge sa sposobnošću stridulacije. Raznovrsna infraklasa Helmithomorpha obuhvata stonoge kod kojih je bar jedan par nogu na VII segmentu transformisan u gonopode za transfer sperme. Stanje sklerita varira u opsegu od slobodnog do čvrstog spajanja, kad se formiraju prstenovi, kao u redovima Julida i Polydesmida.

Monofiletsko poreklo Diplopoda, u skladu sa kladističkim principima, dokazano je nizom autapomorfni osobina u okviru svih recentnih supraordinalnih taksonomskih kategorija (Enghoff, 1984). Opsežnim istraživanjem filogenetskih odnosa unutar klase Diplopoda, u koju su uključene 64 osobine, svrstane u pet grupa (glavene, telesne,

seksualne, razvojne i hemijske osobine), potvrđeni su rezultati prethodno izvedenih kladističkih analiza (Blanke & Wesener, 2014). Ispitivanjem velikog broja nukleusnih protein-kodirajućih lokusa ukazano je na donekle drugačije odnose unutar redova klase Diplopoda u poređenju sa kladističkom klasifikacijom (Brewer & Bond, 2013). Na osnovu dobijenih rezultata, položaj reda Stemmiulida bi se promenio. Stonoge ovog reda više ne bi bile svrstane u nadred Nematophora, sa redovima Callipodida i Chordeumatida, usled prisustva spinnereta na epiproktu, već bi bile sestrinska grupa nadredu Juliformia i redu Polydesmida.

Pretpostavlja se da su se diplopode, kao zasebna grupa, pojavile tokom ranog kambrijuma, sa intenzivnom diverzifikacijom od kasnog ordovicijuma do ranog silura (Shear & Edgecombe, 2010). Verovatno je u periodu između sredine silura i kasnog devona nastala većina viših taksonomskih kategorija diplopoda (Wilson, 2006). Pretpostavlja se da su diplopode prešle na terestrični način života u ordovicijumu (Wilson, 2006) i da su velike vrste stonoga bile prisutne na kopnu barem do sredine silura (Shear & Edgecombe, 2010). Položaj fosilnih taksona u odnosu na postojeće redove nije jasno definisan, te su mnogi od njih svrstani u zasebne taksonomske kategorije (Edgecombe, 2015). Nadred Archipolypoda obuhvata prve terestrične diplopode, čiji fosili potiču iz srednjeg silura (Wilson & Anderson, 2004). *Pneumodesmus newmani* Wilson & Anderson, 2004, bila je poznata kao najstarija vrsta diplopoda i čitavog filuma zglavkara, na čijim su fosilima, starim oko 427 miliona godina, što je period srednjeg silura, potvrđeni tragovi spirakula, otvora trahejnog sistema (Wilson & Anderson, 2004). Međutim, uran-olovo (U-Pb) metoda analize zrna cirkona izolovanih iz slojeva neposredno iznad i ispod samog sloja uzorkovanja fosila *P. newmani* ukazuju na kasni devon, period posle silura (Suarez *et al.*, 2017). Ekspanzija zajednica terestričnih razlagača, među njima i diplopoda, dešavala se tokom devona i karbona (Hopkin & Read, 1992).

Diplopode su distribuirane širom sveta, osim na Antarktiku (Blower, 1985; Golovatch & Kime, 2009; Enghoff, 2015). Međutim, to nije rezultat njihovih lokomotornih i disperzivnih sposobnosti, već njihove filogenetske starosti; ova grupa je nastanjivala superkontinent Pangeu, čije raspadanje je započelo pre oko 180 miliona godina (Sierwald & Bond, 2007). Takođe, široka distribucija je odlika klase, a ne pojedinačnih redova, pri

čemu su mnoge vrste ograničenog rasprostranjenja, često i endemične (Sierwald & Bond, 2007; Golovatch & Kime, 2009). Njihov dominantni detritivorni način ishrane podrazumeva život u vlažnim umerenim, suptropskim ili tropskim šumama, ali se mnoge vrste mogu naći i u ekstremnijim uslovima (Golovatch & Kime, 2009). Na primer, visok diverzitet je zabeležen na većim visinama, a naročito u pećinama koje služe kao refugijumi. Iako salinitet čini morsku sredinu nepogodnom za preživljavanje stonoga, nekoliko vrsta se može naći u litoralnoj zoni. Morfološke i fiziološke adaptacije omogućavaju pojedinim vrstama da prežive uslove plavljenja slatkom vodom, ali isto tako, diplopode mogu da budu adaptirane i na sušne, pustinjske uslove. U zahtevnijim sredinama, česte su partenogenetske vrste kao i periodomorfoza, koja se javlja kod mužjaka određenih grupa. Periodomorfoza podrazumeva postojanje interkalarnog između zrelih stadijuma, tokom kojeg mužjak ne može da se reprodukuje. Ovakve vrste su šire rasprostranjene u odnosu na svoje srodnike istog roda (Enghoff, 1978; Golovatch & Kime, 2009). Kosmopolitsko rasprostranjenje mnogih vrsta je rezultat antropohorije. Jedna od najuspešnih antropohora, vrsta *Oxidus gracilis* (C. L. Koch, 1847), česta u staklenim baštama, pronađena je i u Srbiji, u Botaničkoj Bašti „Jevremovac“ u Beogradu (Jovanović *et al.*, 2016).

Diplopode su detritivori koji se hrane biljnim materijalom u procesu raspadanja, gljivama, plodonosnim telima, pa i ekskrementima drugih herbivora (Hoffman & Payne, 1969; Hopkin & Read; David, 2015). Međutim, svaka biljna vrsta nema podjednaku nutritivnu vrednost. Polidezmidne i julide ispoljavaju jasnu preferencu prema lišću određene vrste drveta i starosti (Kheirallah, 1978, 1979). Pojedine vrste se hrane i živim biljnim materijalom, uključujući i neke poljoprivredne biljke. Mnoge vrste su omnivorne, s obzirom da se hrane i uginulim životinjama različitih grupa, larvama i lutkama insekata, dok redu Callipodida pripadaju karnivorne vrste čiji plen su sitni beskičmenjaci, druge stonoge ili juvenilne jedinke iste vrste (Hoffman & Payne, 1969; Harvey *et al.*, 2000). Koprofagija se javlja kod mnogih vrsta usled ograničene dostupnosti hranjivih resursa (Hopkin & Read, 1992; Buch *et al.*, 2018). Diplopode imaju ulogu u fragmentaciji stelje, čime se pospešuje aktivnost mikroorganizama, a time i procesi kruženja nutrijenata (Kaneko, 1999; Smit & Van Aarde, 2001; David, 2015).

Proučavanja funkcionere morfologije i načina života rezultirala su klasifikacijom stonoga u pet ekomorfoloških tipova ili morfotipova (Manton, 1977; Hopkin & Read, 1992; Golovatch & Kime, 2009; Koch, 2015a). Grupe kratkog tela pripadaju poliksenoidnom i glomeridnom tipu. Stonoge reda Polyxenida, tzv. čekinjaste diplopode, bez izraženih rijućih sposobnosti, zaravnjenog su tela i male veličine, što im omogućava da žive u procepima i ispod kore drveta. Glomeridni tip može da se nađe u redovima Glomerida i Sphaerotheriida, širokog je tela, sa sposobnošću sklupčavanja. Preostala tri tipa su izdvojena na osnovu različith specijalizacija na rijući način života. Cilindrične forme, sposobne za spiralno uvijanje, sa čvrstom kutikulom, širokom glavom kojom se zemlja nabija i velikim brojem nogu kojima se zemlja otklanja sa putanje kretanja, predstavljaju juloidni tip nadreda Juliformia. Polidezmidni tip čine tzv. klinasti tipovi reda Polydesmida, kraćeg tela, dužih nogu, sa lateralnim proširenjima segmenata sa dorzalne strane, paranotumima; ovde su svrstane i neke Chordeumatida. Platidezmidni tip, kratkih nogu, bez mogućnosti spiralnog uvijanja tela, pripada redovima Polyzoniida, Platydesmida, Siphonophorida, Chordeumatida i Polydesmida.

Telo diplopoda se sastoji iz glave i trupa, koga čine haplosegmenti i diplosegmenti. Udvojeni segmenti, zajedno sa aflagelatnim spermatozoidima i prisustvom četiri ili više velikih, apikalnih senzornih konusa distalnog segmenta antena, su autapomorfne osobine koje ukazuju na monofiletsko poreklo grupe (Enghoff, 1984; Hopkin & Read, 1992). Između glavene kapsule i prvog trupnog segmenta sa parom nogu za hodanje je kolum, region prekriven tergitom, odnosno dorzalnim skleritom. Kolum se često označava kao prvi trupni segment, mada se pretpostavlja da u njegovom obrazovanju učestvuju postmaksilarni segment glave, kao i prvi trupni segment sa nogama (Janssen, 2011; Koch, 2015a). Iza koluma se nalaze tri haplosegmenta, sa po jednim parom nogu, dok je segment V prvi diplosegment, sa po dva para nogu. Skleriti koji čine diplosegmente su međusobno povezani artrodijalnim membranama u potklasi Penicillata. Kod svih ostalih stonoga potklase Chilognatha, skleriti podležu različitom stepenu srastanja, te mogu da budu i bez artrodijalne membrane, kada se segmenti označavaju kao prstenovi *sensu stricto*. Noge čine uglavnom šest podomera (koksa, prefemur, femur, postfemur, tibija, tarsus), ponekad sedam (sa trohanterom) ili osam (sa tarsusom II). Broj parova nogu varira od 11 do 375,



odnosno 750 nogu na 192 tergita (dorzalnih sklerita na osnovu kojih se određuje broj trupnih segmenata), koliko poseduje ženka vrste *Illacme plenipes* Cook & Loomis, 1928, iz porodice Siphonophorida (Marek *et al.*, 2012). Noge često nedostaju na poslednjem trupnom segmentu odmah ispred telzona (Koch, 2015a). Veličina tela, izuzetno varijabilna osobina klase, je u opsegu od približno 1,5-344 mm, sa predstavnicima reda Polyxenida kao najmanjim, i juliformnog reda Spirostreptida kao najvećim diplopodama (Enghoff, 1992; Koch, 2015a).

Glaveni segment čine glavena kapsula sa jednim parom antena, parom mandibula i gnathohilarijumom. Sa bočne strane nalaze se grupe ocela, čiji je nedostatak kod svih Polydesmida i nekih pripadnika svih ostalih redova, isključujući Sphaerotheriida, verovatno adaptacija na subterestrične uslove (Harvey *et al.*, 2000; Blanke & Wesener, 2004). Druge čulne strukture prisutne na glavi su trihobotrije, mehanosenzorne kutikularne senzile specifične za red Polyxenida, i Tömösváry-jev organ, parni receptor koji se nalazi posteriorno u odnosu na bazu antena. Njegova funkcija je raznolika u različitim grupama, poput primanja vibratornih i auditornih signala, percepcije gravitacije i olfakcije (Müller & Sombke, 2015).

Trup se završava telzonom, koga čine preanalni sklerit (epiprokt) koji pokriva par valvi (paraprokti) ispod kojih je sklerit označen kao subanalna ploča ili hipoprokt. Paraprokti zatvaraju analni otvor.

Udvojeno stanje karakteriše i raspored spirakuluma na diplosegmentima. Otvori trahejnog sistema nedostaju na kolumu, dok je njihov raspored na ostalim segmentima različit kod različitih grupa: u potklasi Penicillata i infraklasi Pentazonia jedan par spirakuluma je prisutan od drugog do četvrtog segmenta, dok kod Helminthomorpha nema spirakuluma ni na prvom, ni na drugom segmentu, sa jednim parom prisutnim na četvrtom segmentu. Kod svih diplopoda, dva para spirakuluma su raspoređena od petog pa sve do poslednjeg segmenta koji nosi noge (Hilken *et al.*, 2015). Od prvog diplosegmenta, odnosno petog segmenta, različitog rasporeda duž trupa kod različitih redova, javlja se par odbrambenih žlezda (repugnatorijalnih žlezda) ili ozadena. Ove žlezde su prisutne kod pripadnika reda Glomerida i većine redova infraklase Helminthomorpha (Shear, 2015; Makarov, 2015).

Diplopode su odvojenih polova, sa često izraženim polnim dimorfizmom u pogledu veličine, broja segmenata ili broja parova nogu. Ženke su krupnije od mužjaka, dok i mužjaci i ženke mogu da budu pol sa većim brojem parova nogu, u zavisnosti od grupe. Iza drugog para nogu nalaze se gonopore, polni otvori spoljašnjih genitalnih struktura oba pola. Kod ženki, te strukture su par vulvi, a kod mužjaka parni ili neparni penis, koji nije prisutan u svim grupama, već se gonopore mogu otvarati direktno kroz kokse drugog para nogu (Minelli & Michalik, 2015).

Kod mužjaka postoje i sekundarne polne strukture koje imaju ulogu u pridržavanju ženke i transferu sperme u vulve (Haacker, 1969a; Koch, 2015a; Minelli & Michalik, 2015). Ove funkcije se, kod predstavnika infraklase Pentazonia, vrše telopodama i paratelopodama, koje predstavljaju modifikovana poslednja dva ili tri para nogu (Wesener & Sierwald, 2005). U infraklasi Helminthomorpha, jedan ili oba para nogu, koje mogu odgovarati VIII i IX, IX i X, ili samo VIII paru nogu, modifikovani su u gonopode, koje mogu biti izuzetno složene, sa različitim modifikacijama i izraštajima. U grupama u kojima postoje anteriorne i posteriorne gonopode, jedan par ima funkciju deponovanja sperme, ili spermatofora, u vulve ženki, dok funkcija drugog para nije u potpunosti poznata. Par gonopoda koji ima zaštitnu funkciju označava se kao peltogonopode (Koch, 2015a; Enghoff *et al.*, 2015). Parovi nogu odmah iza ili ispred gonopoda, paragonopode, mogu imati pomoćnu ulogu (Koch, 2015a; Minelli & Michalik, 2015).

Diplopode se razvijaju anamorfno, dostižući adultni broj segmenata postepeno kroz seriju presvlačenja koja se mogu završiti ili nastaviti nakon dostizanja polne zrelosti, sa ili bez dodavanja novih segmenata, što je opisano kroz tri anamorfna modela postembriogeneze (Enghoff *et al.*, 1993).

## **1.2. Postembriogeneza Diplopoda**

### 1.2.1 Anamorfno razviće Diplopoda

Kod diplopoda su prisutna tri modela anamornog razvića: euanamorfoza, teloanamorfoza i hemianamorfoza (Enghoff *et al.*, 1993; Minelli, 2015). Euanamorfoza se

javlja u subterklasi Colobognatha, redovima Julida, Stemmiulida, i podredu Cambalidea reda Spirostreptida. U ovim grupama, presvlačenje i dodavanje novih segmenata odvija se tokom celog života. Teloanamorfoza podrazumeva da se presvlačenje i dodavanje novih segmenata odvijaju do dostizanja određenog broja segmenata i sticanja polne zrelosti, i prisutna je u redovima Chordeumatida i Polydesmida, kao i kod većine pripadnika reda Callipodida. Hemianamorfno se razvijaju Polyxenida i Pentazonia, pojedine Callipodida i predstavnici podreda Spirostreptidea; u ovim grupama, dodavanje novih segmenata prestaje na određenom stadijumu, ali je neophodno još nekoliko presvlačenja da bi se dostigla polna zrelost. Razviće mužjaka nekih semelparnih Julida može da se okarakteriše kao telo- i euanamorfno. Novi segmenti dodaju se na posteriornom delu tela, u proliferacionoj zoni. Ovakav tip segmentacije, gde se novi segmenti obrazuju anteroposteriorno u odnosu na subterminalnu zonu, označava se kao sekvencijalna segmentacija (Fusco, 2005).

Filogenetskim analizama nukleusnih protein-kodirajućih gena potvrđeno je da hemianamorfoza predstavlja predački vid postembrionalnog razvića potklase Chilognatha (Miyazawa *et al.*, 2014). Međutim, s obzirom da hemianamorfoza karakteriše ne samo Myriapoda, već i mnoge Crustacea, Protura, Pycnogonida, neke izumrle Chelicerata i Trilobita, može da se smatra predačkim stanjem na nivou čitave grupe Euarthropoda (Fusco, 2005; Miyazawa *et al.*, 2014). Nakon diverzifikacije infraklase Helminthomorpha od predačkih hemianamorfnih Chilognatha evoluirale su grupe sa euanamorfnim razvićem. Teloanamorfoza predstavlja najizvedeniji vid anamorfoze, razvijen kod prvobitno hemianamorfnih ili euanamorfnih taksona.

Hemianamorfno razviće se smatra složenijim vidom postembrionalnog razvića u odnosu na euanamorfozu s obzirom da podrazumeva, pored anamorfne, i epimorfnu fazu, gde se presvlačenja odvijaju bez dodavanja segmenata, rezultujući povećanjem dužine do dostizanja polne zrelosti. Stepenn regionalne diferencijacije tela prati razlike u složenosti razvića. Najniži stepenn regionalne diferencijacije tela poseduju upravo euanamorfne, cilindrične stonoge, dok hemianamorfne forme poseduju najizraženiju regionalizaciju (Minelli, 2003).

Izgle stonoge i prvih nekoliko postembrionalnih stadijuma, po nekim autorima, mogu da se označe kao larve usled manjeg broja segmenata i parova nogu u odnosu na

adulte (Minelli, 2009), međutim, s obzirom da nema posebnih larvalnih organa koji se gube kod adulta, jedinke na postembrionalnim stadijumima označavaju se kao juvenilne jedinke (Enghoff *et al.*; 1993).

U okviru istih grupa, prisutni su različiti načini razvića. Unutar nadreda Juliformia, red Julida je euanamorfna, dok su pripadnici reda Spirobolida uglavnom hemianamorfni. Među spirostreptidama, postoje i euanamorfni i hemianamorfni podredovi. Iz ovoga može se zaključiti da se vid postembrigeneze u okviru Helminthomorpha menjao nekoliko puta tokom evolucije. Moguća su dva validna objašnjenja ovakvog rasporeda tipova anamorfoze (Miyazawa *et al.*, 2014). Prema prvoj pretpostavci, euanamorfoza je više puta nezavisno evoluirala od hemianamornog stanja. Drugo objašnjenje podrazumeva pojavu euanamorfoze samo jednom u predačkoj grupi Helminthomorpha. Nakon toga, sledi pojava teloanamorfoze, a kod nekih grupa, povratak na hemianamorfni načina razvića. Evoluciju anamorfoze pratilo je i povećanje broja segmenata. Današnje grupe koje se razvijaju hemianamorfno imaju manje segmenata od grupa koje se razvijaju izvedenim oblicima anamorfoze, što je, kako se smatra, bio slučaj i sa predačkim grupama.

Kod Polydesmida, a kasnije i kod drugih redova koji poseduju segmente u vidu prstenova, nadreda Juliformia, opisana je pravilnost postembrionalnog razvića koja se označava kao „zakon anamorfoze“ (Enghoff *et al.*, 1993; Minelli & Fusco, 2014; Minelli, 2015). Naime, svi segmenti bez nogu na određenom stadijumu postaju segmenti sa nogama na narednom stadijumu. Ovaj princip se uočava i kod vrsta drugih grupa, recimo u redu Polyzoniida, ali samo na kasnijim stadijumima (Minelli, 2015). Kod grupa koje slede ovu zakonitost u povećanju broja segmenata sa nogama prisutna su sva tri vida anamorfoze (Minelli & Fusco, 2014).

Broj stadijuma je izuzetno varijabilan, naročito kod euanamornih vrsta. Ne može se sa sigurnošću tvrditi da li je konačan broj stadijuma unapred određen i ograničen, ili ograničen stanjem jedinke. U drugom slučaju, opet postoji mogućnost neodređenog povećanja stadijuma ili do unapred određenog maksimuma (Minelli, 2015). Do sada najveći zabeležen broj stadijuma je kod euanamorfne julide *Tachypodoiulus niger* (Leach, 1814), i iznosi 24 (Sahli, 1969).

Takođe, pripadnici klase Diplopoda odlikuju se velikom varijabilnošću perioda za koji se dostiže polna zrelost, kao i same dužine životnog ciklusa. Na primer, među polidezmidama nalaze se vrste čiji životni ciklus traje od jedne, preko nekoliko godina, do više od osam, u slučaju teloanamorfne vrste *Parafontaria armigera* Verhoeff, 1936 [= *Parafontaria laminata* (Attems, 1909)], kojoj je osam godina neophodno za dostizanje adultnog stadijuma (Fujiyama & Yoshida, 1984; Minelli, 2015). Kod julide *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758), polna zrelost se dostiže u drugoj ili trećoj godini, u zavisnosti od stadijuma (David & Coulis, 2015). Blower (1974) je zabeležio starost od 10-11 godina kod vrste *Glomeris marginata* (Villers, 1789).

Proces presvlačenja podrazumeva četiri faze (Blower, 1985; Hopkin & Read, 1992). Stonoge su pre presvlačenja aktivne, povećavaju unos hrane i akumuliraju višak vode da bi se postigao pritisak hemolimfe na kutikulu (Ambarish & Sridhar, 2014). U pripremnoj fazi, stonoga gradi komoru za presvlačenje. Tokom naredne faze, stonoga je nepokretna, u polukružnom položaju. Proliferaciona zona se izdužuje, usni delovi su istureni, dolazi i do izvlačenja vulvi, gonopoda, ili njihovih rudimenata. Treću fazu karakteriše egdizis, odnosno pucanje kutikule, prvo sa dorzalne strane, između glave i koluma, a zatim i uzdužno, duž ventralne i lateralnih strana. Jedinke napušta egzuviju, koja je kod Julida, usled teleskopskih osobina prstenova, znatno kraća od tela, što se može videti i na slici 1, koja prikazuje juvenilnu jedinku *Pachyiulus hungaricus*. Tokom poslednje faze, označene kao faza oporavka, dolazi do postepenog povratka aktivnosti. Nova kutikula je bleđa i meka, a antene i noge su usmerene posteriorno. Jedinke će pojesti egzuviju pre nego što, nakon nekoliko dana od završenog presvlačenja, ne napuste komore. Iako je trajanje samog procesa presvlačenja nekoliko dana, do ponovnog uspostavljanja prvobitne obojenosti proći će nekoliko nedelja, kao što je slučaj kod nekoliko vrsta roda *Arthrospira* Pocock, 1895 reda Glomerida, kojima je za to potrebno 3-9 nedelja (Ambarish & Sridhar, 2014). Presvlačenje je, kao kod svih artropoda, pod kontrolom egdisteroidnih hormona (Cheong *et al.*, 2015). Početak presvlačenja može da bude određen spoljašnjim faktorima, prevashodno temperaturom i vlažnošću (Hopkin & Read, 1992). Kod pustinjske vrste *Orthoporus ornatus* (Girard, 1853) presvlačenje nastupa nakon što se akumulira odgovarajuća količina toplote u tlu, uz pogodne nivoe vlažnosti (Crawford, 1974). Severnoamerička vrsta koja

nastanjuje listopadne šume, *Narceus americanus* (Palisot de Beauvois, 1817), započinje presvlačenje kao odgovor na produženo trajanje sušnih uslova (O'Neill, 1969). Komora može da bude izgrađena na različite načine, od zemljišnih čestica koje su prošle kroz digestivni trakt ili trulih čestica drveta, ili da bude u vidu plitkih udubljenja u zemljištu i semenih kapsula. Analne žlezde, koje se otvaraju u distalni deo zadnjeg creva, luče sekret kojim se naslage čestica oblikuju u komoru.



**Slika 1.** Juvenilna jedinka *P. hungaricus* (Karsch, 1881) nakon presvlačenja, u komori sa egzuvijom. Slika: B. Ilić

Stonoge nadreda Nematophora, u koji spadaju redovi Chordeumatida, Callipodida i Stemmiulida, prave poseban tip komore, u vidu kokona, odnosno čaure (Enghoff & Akkari, 2011). Ove grupe poseduju, kao što njihov zajednički naziv upućuje, dve ili više spinnereta koje se pružaju sa epiprokta telzona. Spinnerete predstavljaju filamentozne izraštaje u koje se ulivaju kanali žlezda koje luče vlakna za izgradnju komora (Koch, 2015a). Pripadnici reda Callipodida i Chordeumatida karakterišu se prisustvom jednog para, a reda

Stemmiulida jednim do tri para spinnereta. Polydesmide poseduju uglavnom dva para spinnereta (Shear, 2008), a strukture koje nalikuju spinneretama zapažene su i u redu Siphoniulida (Sierwald *et al.*, 2003). Upotreba spinnereta za izgradnju i oblaganje kokona opisana je kod Chordeumatida, Callipodida i Polydesmida, a smatra se, na osnovu prisustva spinnereta, da ovu sposobnost poseduju i Siphoniulida i Stemmiulida (Shear, 2008).

Polno zreli mužjaci nekoliko vrsta porodica Julidae i Blaniulidae mogu da se presvuku u interkalarni stadijum, koji podrazumeva regresiju sekundarnih seksualnih karaktera i nemogućnost reprodukcije, što se označava kao periodomorfoza (Akkari & Enghoff, 2011b). Narednim presvlačenjem, jedinka se vraća u stanje sa svim morfološkim osobinama koje karakterišu polno zrelog mužjaka. Kod nekih vrsta, postoji više interkalarnih stadijuma (Minelli, 2015). Dato je nekoliko objašnjenja uzroka periodomorfoze (Enghoff *et al.*, 1993; Akkari & Enghoff, 2011b). Proces zamene stare kutikule novom uslozjava se uz strukture kao što su gonopode, tako da se njihovim redukovanjem mogu izbeći eventualne komplikacije tokom presvlačenja. Interkalarni stadijum omogućava mirovanje, tokom čega se odvija spermatogeneza između sezona parenja, jer, iako se gonopode redukuju, sa gonadama to nije slučaj. Periodomorfoza podrazumeva i produženje životnog veka mužjaka, čime se postiže pogodan odnos polova, a time i povećana verovatnoća za uspešnu sezonu parenja u područjima koja mobilne vrste još uvek nisu uspešno kolonizovale. Jedna od važnih prednosti koja se stiče prolaskom kroz interkalarne stadijume je smanjeno opterećenje creva usled redukovanih gonopoda (Minelli; 2015).

Kod diplopoda su registrovane partenogenetske populacije (Hopkin & Read, 1992; Pinheiro *et al.*, 2009). Broj mužjaka može biti veoma mali u odnosu na broj ženki, ili mužjaci nedostaju, što se označava kao spanandrija i dešava se u određenim periodima godine, ili na određenim staništima. Obligatna partenogeneza je retka i uglavnom je u vidu telitokije, gde se samo ženke legu iz neoplođenih jaja. Partenogenetske vrste se nalaze u okviru redova Polyxenida, Polydesmida i Julida (Minelli & Michalik, 2015).

### 1.2.2 Definisiranje postembrionalnih stadijuma Diplopoda

Može da se izdvoji nekoliko metoda za određivanje postembrionalnih stadijuma: brojanje parova nogu ili segmenata, brojanje nizova ocela, razlikovanje ozadena po boji i veličini, i analiza diskontinuiteta dimenzija (Enghoff *et al.*, 1993). Svaka od ovih metoda podrazumeva određena ograničenja, mada su se neke pokazale preciznijim od drugih.

Brojanje parova nogu i segmenata sa nogama i bez nogu je pouzdano ukoliko se postembrionalno razviće odvija po zakonu anamorfoze, i može se primeniti kod Polydesmida, Chordeumatida, i ranih stadijuma mnogih grupa, uključujući i Julida, jer se kasniji stadijumi odlikuju velikom varijabilnošću u ovim osobinama (Enghoff *et al.*, 1993).

Upotreba nizova ocela za određivanje postembrionalnih stadijuma ima naročito značajnu primenu kod euanamornih stonoga (Hornung & Vajda, 1988; Peitsalmi & Pajunen, 1991, 1992; Minelli, 2015). Brojanje nizova ocela ne može da se primeni kod mnogih grupa koje nemaju razvijene ocele ili kod kojih dolazi do različitog stepena redukcije ili izostanka čitavih nizova. Takođe, ocele nisu osobina pouzdana za određivanje stadijuma u kasnom periodu postembriogeneze. Pretpostavlja se da jedinka vrste *T. niger*, sa 64 prstena sa nogama za hodanje i jednim apodnim prstenom, pripada XVIII stadijumu, što se ne može utvrditi na osnovu ocelarnog polja (Enghoff *et al.*, 1993).

Broj ozadena takođe može da se koristi u svrhu određivanja broja parova nogu, po formuli  $L = 2g + 5$ , gde je  $g$  broj ozadena, a  $L$  broj parova nogu. Ovaj metod, u kombinaciji sa brojem prstenova sa nogama i bez nogu, i brojem ocela, primenjen je za utvrđivanje stadijuma kod blanijulide *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847) (Kheirallah *et al.*, 2000). U svrhu određivanja stadijuma mogu da se koriste boja i veličina ozadena, ali je neophodno da se jedinke analiziraju ubrzo po uzorkovanju (Enghoff *et al.*, 1993).

Kod nekoliko vrsta kod kojih je nemoguće precizno odrediti broj redova ocela, može se koristiti analiza diskontinuiteta dimenzija, zasnovana na postepenom povećanju veličine tela kroz stadijume (Enghoff *et al.*, 1993). Uspešnost ove metode, do sada primenjivane na julidne vrste, varira. Stadijumi vrste *Cylindroiulus nitidus* [= *Allajulus nitidus* (Verhoeff, 1819)] definisani su ovom metodom, jer nije bilo moguće da se ocelarni nizovi odrede, s obzirom na preklapanje i gubitak ocela (Blower & Miller, 1977).



Brojanje segmenata i parova nogu ne može da bude pouzdan kao samostalan metod određivanja stadijuma, s obzirom na veliku varijabilnost u broju segmenata sa nogama i bez nogu koji se dodaju nakon presvlačenja posle IV stadijuma (Enghoff *et al.*, 1993).

### 1.3. Anatomske i fiziološke odlike odbrambenih žlezda Diplopoda

Egzokrine žlezde zglavkara, ektodermalnog porekla, izuzetno su varijabilne morfologije, anatomije, položaja, funkcije, načina sekrecije (Noirot & Quennedey, 1974; Gnaspini & Hara, 2007; Giglio *et al.*, 2011). Mnoge žlezde u kojima se proizvodi sekret odbrambene funkcije predstavljaju invaginacije epidermisa. U cilju što efikasnijeg dopremanja sekreta do potencijalnog predatora, odbrambene žlezde mogu da se izmeste iz svog ležišta usled pritiska hemolimfe, povećaju zapreminu usvajanjem vazduha ili velikom brzinom rasprše sekret. Kod žlezda koje ne menjaju svoj položaj, žlezdane ćelije mogu da budu deo rezervoara, što je slučaj kod julidnog tipa žlezda diplopoda, ili su sekretorni region i rezervoar zasebni odeljci spojeni kanalom, kao kod pigidijalnih žlezda koleoptera (Chapman, 1998; McNeil & Millar, 2013).

Žlezdane ćelije epidermalnih žlezda mogu da se svrstaju u tri klase u zavisnosti od tipa sekrecije i načina na koji sekret prevazilazi kutikularnu barijeru (Noirot & Quennedey, 1974). Ćelije I klase prekrivene su kutikulom koja nastaje aktivnošću samih ćelija. Žlezdana ćelija, okružena epidermalnim ćelijama različitog stepena diferenciranosti, u kojima sekret sakuplja pre nego što pređe kutikulu, označava se kao ćelija II klase. Ukoliko se sekret doprema kanalom, koji prodire kroz žlezdanu ćeliju, zatim prolazi kroz kanalnu ćeliju i u kontinuitetu je sa kutikulom, žlezdana ćelija pripada III klasi. Žlezde mogu biti izgrađene od jedne ili više klasa ćelija. Ćelije III klase često su prisutne u žlezdama u kojima se produkuje odbrambeni sekret ili feromoni insekata (Chapman, 1998; McNeil & Millar, 2013). Mnoge žlezde navedenih funkcija čine isključivo ćelije III klase, poput otrovnih žlezda opnokrilaca reda Hymenoptera (Billen, 2011), žlezdanog tkiva sekretornih reznjeva pigidijalnog odbrambenog sistema tvrdokrilaca potporodice Brachininae (Di Giulio *et al.*, 2015), kristalnih žlezda termita roda *Neocapritermes* Holmgren, 1912 (Šobotnik *et al.*, 2014), Ričardove žlezde osa tribusa Epiponini, u kojoj se proizvode

feromoni traga za obeležavanje puta između starog i novog gnezda (Billen, 2011; Da Silva *et al.*, 2014).

Osnovne morfološke odlike tri tipa repugnatorijalnih žlezda: glomeridnog, julidnog i polidezmidnog, prisutnih kod diplopoda, opisane su u potpoglavlju 1.4.1. Histološka istraživanja do sada nisu vršena na glomeridnom tipu žlezda, dok su anatomija i fiziologija žlezda polidezmidnog i julidnog tipa, metodama svetlosne mikroskopije, opisane proučavanjem polidezmidne *Pachydesmus crassicutus* (Wood, 1864) (Woodring & Blum, 1963), a zatim i spirobolide *Anadenobolus arboreus* (De Saussure, 1859) [= *Orthocricus arboreus* (De Saussure, 1859)] (Woodring & Blum, 1965) i julide *Uroblaniulus canadensis* (Newpoet, 1844) (Weatherston & Percy, 1969). Transmisiona elektronska mikroskopija primenjena je u studiji odbrambenih žlezda neidentifikovane vrste *Pachyiulus sp.* Berlese, 1883 (Tichy, 1974).

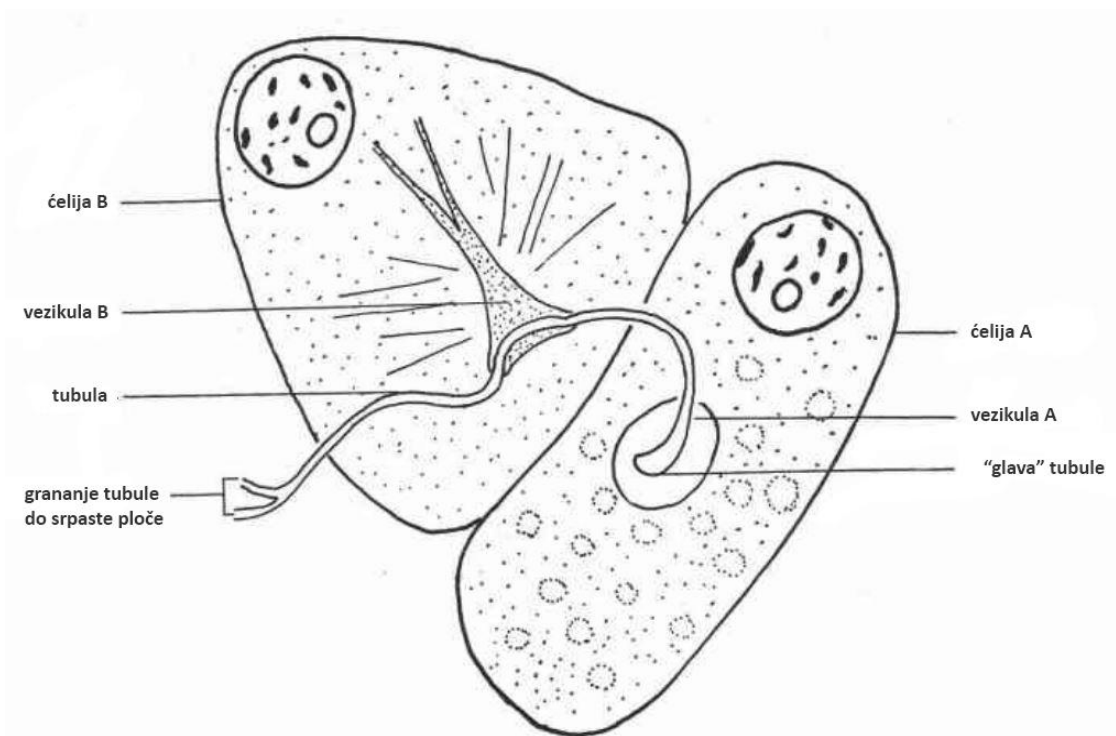
Žlezdani aparat reda Polydesmida, sastavljen od rezervoara, reakcione komore (vestibule) i kanala koji se otvara ozoporom, okružen je kutikularnim slojem, intimom, koji je u kontinuitetu sa egzoskeletom. Kod vrste *P. crassicutus*, suženje rezervoara ka komori, označeno kao „vrat” je sa ventralne strane sklerotizovano i invaginisano, čime nastaje uska, izdužena struktura označena kao „jezik”. Dobro razvijena intima oko kanala, komore i „jezika”, u odnosu na intimu rezervoara i „vrata”, čini komoru i kanal rigidnim komponentama aparata. Protok između rezervoara i komore kontrolisan je „jezikom” i mišićem koji na njemu inserira, a koji polazi sa lateralnog telesnog zida. Uz kanal, sa spoljašne strane, kao i uz „jezik”, „vrat” i deo rezervoara koji nije žlezdane prirode, nalaze se epidermalne ćelije. Žlezdane ćelije rezervoara, koji sadrži prekursorska jedinjenja, poseduju ovalne citoplazmatske inkluzije sa centralnim kanalom, od koga potiču mnoge ekstenzije kroz intimu rezervoara. Od ćelija koje okružuju komoru polaze kanali koji prožimaju intimu komore. Enzimi, koji razlažu prekursore do vodonik cijanida i benzaldehida, dopremaju se kanalima u lumen komore. Granule su detektovane u lumenu komore i kanala, ali ne i u oblasti „vrata” i žlezdanog dela rezervoara. Pretpostavlja se da se u citoplazmi ćelija komore nalaze granule glikogena ili drugih ugljenih hidrata (Woodring & Blum, 1963).

Ozadene proučavane spirobolide *A. arboreus* sastoje se od rezervoara i ejakulatornog aparata (Woodring & Blum, 1965). Rezervoar se postepeno sužava u „vrat“, čijom invaginacijom nastaje izvodni kanal. Kutikularni navoji “vrata” omogućavaju snažno izbacivanje sekreta. Deo kanala, opisan kao „jezik”, ima funkciju kupastog čepa koji, nezavisno od aktivnosti navoja kanala, može da omogući prolaz sekreta kroz ozoporu. Sekret se izlučuje na dva načina: isticanjem kroz ozoporu ili izbacivanjem u vidu spreja, dometa i većeg od 30 cm kod ove vrste (Woodring & Blum, 1965). Sekret dospeva u lumen kanala kontrakcijama mišića retraktora koji polaze od kanala ka telesnom zidu. Kada se lumen kanala napuni sekretom, mišići retraktori blizu rezervoara se opuštaju, nakon čega kutikularni navoji zatvaraju kanal ka rezervoaru. Time se sprečava protok sekreta nazad u rezervoar, kao i dalje lučenje sekreta iz rezervoara u kanal. Nakon toga sledi postepeno opuštanje mišića ka ozopori, što rezultuje visokim pritiskom tečnosti u lumenu kanala. Kontrakcijama mišića „jezika”, ozopora se otvara, i usled visokog pritiska tečnosti, sekret se izlučuje u vidu spreja. Kada je stonoga blago stimulisana, simultanim kontrakcijama mišića kanala i „jezika” sekret ističe kroz ozoporu.

Kod proučavane spirobolide, žlezdane ćelije su sincicijalne, sa mnogobrojnim grupacijama granula u citoplazmi. U regionu „vrata“, granice između ćelija su jasnije uočljive. U ćelijama ozadena nisu detektovane citoplazmatske, kutikularne inkluzije.

Rezultati studije julidnog tipa žlezda *U. canadensis* ukazuju na značajne razlike u odnosu na isti tip žlezda *A. arboreus* (Weatherston & Percy, 1969). Dok se kod ozadena spirobolide sve komponente žlezdanog aparata smatraju sekretornim, ozadene julidne vrste poseduju sekretorne jedinice u distalnom delu intime rezervoara. U ovom regionu nalazi se struktura označena kao srpasta ploča sa kojom su povezane mnogobrojne tubule. Između hipodermalnih ćelija raspoređeno je manje od 20 sekretornih jedinica od koji polaze tubule ka srpastoj ploči. Sekretornu jedinicu čine dve ćelije od kojih prozirna vezikula ćelije A sadrži „glavu” tubule, dok drugi, nabrani deo tubule, prolazi kroz vezikulu ćelije B. Nukleus prve ćelije je krupan, a citoplazma poseduje mnogobrojne vakuole. Ovakva organizacija sekretorne jedinice upućuje na žlezdane ćelije III klase, prema klasifikaciji koju su dali Noirot & Quenedey (1974), gde bi ćelija B mogla da ima funkciju kanalne ćelije (slika 2). Tubula može da se grana nakon prolaska kroz ćeliju B, ali neće prolaziti

kroz druge ćelije dok ne dosegne srpastu ploču. Od srpaste ploče, tubule mogu dalje da prolaze kroz ćelije, verovatno one nalik ćelijama B, ili da se direktno ulivaju u lumen rezervoara. Za razliku od ozadena spirobolide, specijalizovane kutikularne inkluzije, koje povezuju sekretorne ćelije sa rezervoarom, postoje u sekretornom regionu odbrambene žlezde julidne vrste.



**Slika 2.** Šematski prikaz sekretorne jedinice *U. canadensis*. Prema Weatherston & Percy (1969).

#### 1.4. Odbrambeni mehanizmi klase Diplopoda

U klasi Diplopoda, prisutno je nekoliko vidova odbrane. Primarna, pasivna odbrana, poput kriптиčne obojenosti i mimikrije čija je funkcija da spreči predatora da primeti plen, ili da prepozna jedinku kao svoj plen, prisutna je kod mnogih vrsta. Nakon što predator detektuje stonogu nastupaju aktivni, sekundarni mehanizmi odbrane: ponašajni, mehanički i hemijski (Dettner, 2015).

Predstavnici klase Diplopoda poseduju različite lokomotorne sposobnosti (Manton, 1977; Koch, 2015b), koje često ne omogućavaju uspešno izbegavanje predatora. Vrste roda *Stemmiulus* Gervais, 1844, iz Afrike, odlikuju se skokovitom reakcijom na pretnju (Evans i Blower, 1973; Hopkin & Read, 1992, Koch, 2015b). Kretanje vrste *Stemmiulus regressus* (Silvestri, 1916), sastoji se od nekoliko etapa: skok na razdaljini od 2-3 cm, prizemljenje, proklizavanje, brzo kretanje ka napred, naredno odbacivanje od podloge (Evans & Blower, 1973). Pomenuti rod pripada nadredu Nematophora, stonogama koje su poznate po najbržem kretanju u odnosu na ostale grupe (Manton, 1958; Blower, 1985, Koch, 2015b). Stonoge mogu na potencijalnu pretnju da reaguju i energičnim, često zmijolikim, pokretima tela (Blower, 1985; Shear, 2015). Kada su izložene opasnosti, stonoge mogu i da se saviju u spiralu, u jednoj ravni ili u vidu heliksa, ili da se sklupčaju, time smanjujući površinu izloženu potencijalnoj opasnosti (Blower, 1985; Hopkin & Read, 1992). Spiralno uvijanje tela je sposobnost mnogih stonoga infraklase Helminthomorpha, dok se volvacijom, odnosno sposobnošću sklupčavanja odlikuju redovi Sphaerotheriida i Glomerida, nadreda Oniscomorpha, ali i predstavnici nekoliko familija Polydesmida i jedan rod Polyzoniida (Golovatch, 2003). Potklasu Penicillata čine „meke“ ili „čekinjaste“ diplopode koje nemaju mineralizovanu kutikulu, kao ni hemijsku odbranu. Pored toga što poseduju glavene, tergalne i pleuralne nizove trihoma, na kaudalnom delu tela nalaze se snopovi trihoma koji imaju zaštitnu funkciju. Kada ih napadnu mravi, ove stonoge izlože kaudalne trihome, koji se odvajaju od svog ležišta i vršnim kukicama kače o sete mrava. Pokušaji mrava da se oslobode dovode do još čvršćeg povezivanja trihoma (Eisner *et al.*, 1996).

Sklerotizovana kutikula, sa deponovanim karbonatima kalcijuma i magnezijuma, odlikuje se mehaničkim svojstvima koja predstavljaju adaptacije na zahteve rijućeg načina života, poput čvrstine i otpornosti na savijanje i pucanje (Borrell, 2004). Kutikula zajedno sa epidermisom čini integument, koji sprečava prodor patogena, gubitak vode, pruža zaštitu od predatora i učestvuje u razmeni informacija sa spoljašnjom sredinom. Osnovni model kutikule je predstavljen višeslojnom epikutikulom, koja prepokriva prokutikulu. Površinski slojevi epikutikule su: cementni, (sačinjen od proteina impregniranih voskom), voštani (od uglavnom nezasićenih lipidnih jedinjenja) i kutikulinski sloj (od proteina sklerotina i lipida) (Wigglesworth, 1990; Compère *et al.*, 1996). Ovi slojevi omogućavaju kutikularnu

permeabilnost, dok su unutrašnja epikutikula sa prokutikulom, u kojima se nalaze hitinska mikrovlakna, prevashodno odgovorni za mehanička svojstva kutikule (Makarov, 2015). Različite adaptacije kutikule su efikasan odgovor na specifične uslove života, poput prisustva cerotegumenta sa mikrotuberkulima koji zadržava tanak sloj vazduha kod stonoga koje žive u često plavljenim područjima (Golovatch & Kime, 2009) ili sloj voska na samoj površini epikutikule, koji značajno smanjuje odavanje vode u sušnim uslovima (Hopkin & Read, 1992). Mnoge vrste se odlikuju makro- i mikroskulpturama kutikule kao i različitim izraštajima, što je naročito izraženo u redu Polydesmida (Mesibov, 2008; Akkari & Enghoff, 2011a). Paranotumi, odlika većine Polydesmida i nekih Choreumatida, su raznolika lateralna ili dorzolateralna proširenja metazonita, posteriornog dela segmenta. Kod nekoliko vrsta, paranotumi mogu biti izoštrjeni ili posedovati oštrolike izraštaje koji odbijaju potencijalne predatore, jer čine životinju većom i „nezgodnog“ oblika za uspešno hvatanje (Shear, 2015). Upadljivo obojeni pripadnici roda *Desmoxytes* Chamberlin, 1923 poseduju spiniformne paranotume sa izraženim rogolikim izraštajima (Golovatch *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014).

Mnoge diplopode su kriptično obojene sa različitim adaptacijama koje im omogućavaju da ostanu neopažene od strane predatora (Vane Wright, 1980; Shear, 2015). Stonoge nekoliko redova poseduju istaknute obrasce boja koji se sastoje od ponovljenih elemenata duž nekoliko nizova segmenata, i koji otežavaju opažanje obrisa tela stonoge (Enghoff, 2011). Kutikularni izraštaji nekih Polydesmida omogućavaju zadržavanje čestica zemlje, pri čemu se može formirati i sloj u vidu „kore“ preko njihovog tela (Akkari & Enghoff, 2011a). Neuočljivost se može postići i formiranjem isparčanog „tepiha“ mahovina koje su na čvrstoj kutikuli polidezme *Psammodesmus bryophorus* Hoffman, Martínez & Flórez, 2011, našle pogodnu, stabilnu podlogu (Martínez-Torres *et al.*, 2011).

Aposematska obojenost javlja se kod stonoga koje su relativno velike, dnevno aktivne i izložene vizuelnim predatorima (Shear, 2015). Diplopode koje su stanovnici pećina i dubljih slojeva zemljišta uglavnom nemaju pigmente (Makarov, 2015). Različitim bojama i obrascima šara, u vidu traka ili tačaka, često na paranotumima, postiže se uočljivost u odnosu na sredinu. Upadljiva obojenost je uglavnom karakteristika tropskih vrsta Spirobolida i Spirostreptida, kao i nekoliko porodica Polydesmida (Enghoff *et al.*,

2007; Wesener *et al.*, 2009; Shear, 2015). Primera Bejtsove mimikrije, kada bezopasna vrsta izgledom podseća na aposematski obojenu vrstu, odbojnu za potencijalne predatore, nema mnogo među stonogama. Milerova mimikrija, odnosno slična obojenost odbojnih vrsta koje u različitom stepenu dele stanište, temeljno je proučena u studiji o tribusu Apheloriini reda Polydesmida sa Apalačkih planina (Marek & Bond, 2009). U oblastima gde se stanište ispitivanih vrsta poklapa, primećena je velika sličnost u boji i obrascima šara. Kao aposematski upozoravajući signal koji odbija noćne sisare, predatore stonoga, opisana je i bioluminiscencija u rodu polidezmid *Motyxia* Chamberlin, 1941 (Marek *et al.*, 2011). Svetlost nastaje u egzoskeletu zahvaljujući fotoproteinu koji sadrži hromoforu sa porfirin-funkcionalnom grupom.

Pripadnike reda Chordeumatida ne karakteriše prisustvo repugnatorijalnih žlezda, ali one ipak poseduju vid hemijske odbrane (Youngsteadt, 2008; Shear & Krejca, 2011; Shear, 2015). Lepljive kapljice se javljaju u bazi makroheta, koje su raspoređene u grupama od po 3 makrohete na obe strane pleurotergalnog luka, što predstavlja dijagnostičku osobenost reda (Enghoff *et al.*, 2015). Krećući se od baze ka vrhu, ove kapljice skupljaju u sebi strana tela koja se mogu naći na životinji, a koja će dalje biti eliminisana čim se zalepe za neki drugi objekat. Tačan sastav ovog sekreta za sada nije utvrđen.

Iako poseduju različite mehanizme zaštite, diplopode su plen mnogim predatorima, kičmenjacima i beskičmenjacima, među kojima ima i generalista i specijalista (Hopkin & Read, 1992; Shear, 2015). Jaja i raniji stadijumi ne poseduju hemijsku zaštitu, a nakon izleganja, juvenilne jединke su često ograničene pokretljivošću, što ih čini ugroženijim u odnosu na adultne jединke. Stonoge reda Glomerida su važan deo ishrane ježeva *Erinaceus europaeus* Linnaeus, 1758 (David, 2015). Prugasti mungosi, *Mungos mungo* Gmelin, 1788 razbijaju kutikulu stonoga roda *Sphaerotherium* Brandt, 1833 o čvrstu podlogu (Eisner & Davis, 1967). Drugi kičmenjaci koji se hrane stonogama su različite žabe, gušteri, neke ptice, rovčice, kornjače (Blower, 1985). Afrički karnivorni puževi endemične porodice Chlamydephoridae se takođe hrane pripadnicima roda *Sphaerotherium sp.*, imobilizujući ih, nakon čega im mekani delovi tela stonoge postaju lako dostupni (Herbert, 2000). Neki predatori koriste upravo najefikasniji vid zaštite, sekret odbrambenih žlezda, da bi locirali stonogu, poput parazita iz roda *Myriophora* Brown, 1992 reda Diptera, koji polažu jaja u

telo stonoge, i hrane se njenim tkivima i kao adulti i kao larve (Hash *et al.*, 2017). Specijalisti koji se hrane samo stonogama, i to često samo određene grupe, živim ili već uginulim, nalaze se među larvama tvrdokrilaca porodice Phengodidae, bar jedne vrste roda *Promecognathus* Chaudoir, 1846, porodice Carabidae, pripadnicima potporodice Etrichodiinae i Scarabeidae (Shear, 2015).

Stonoge su domaćini ne samo larvama dvokrilaca, već i mnogim bakterijama, gljivama, protozoama, nematodama, grinjama (Hopkin & Read, 1992; David, 2015). Nematode roda *Mermis* Dujardin, 1842 su česti endoparaziti (Blower, 1985). Nematomorfe onemogućavaju sazrevanje jaja, razvoj sekundarnih seksualnih karakteristika, kao i gonopoda i vulvi (David, 2015). Na anteriornom delu tela česte su gljivice reda *Laboulbeniales* (Santamaría *et al.*, 2014). Neke vrste ovog reda mogu da se smatraju ektoparazitima, ali postoje i vrste kojima nedostaju strukture za prodiranje u telo stonoge, pa se u tom slučaju odnos između gljivica i stonoge može označiti kao komensalski (Santamaría *et al.*, 2018). Parazitska vrsta *Rickia pachyiuli* Bechet & Bechet, 1986 nađena je na prvim parovima nogu vrste *Pachyiulus hungaricus* Karch, 1881, sa talusima koji se prostiru i sa dorzalne strane prvih nekoliko segmenata (De Kesel *et al.*, 2013; Santamaría *et al.*, 2016).

#### 1.4.1. Hemijska odbrana

Egzokrine repugnatorijalne žlezde prisutne su kod svih redova, osim Chordeumatida, Sphaerotheriida, Glomeridesmida, Polyxenida i Siphoniulida (Makarov, 2015; Shear *et al.*, 2015; Rodriguez *et al.*, 2018). Prvi fosilni nalazi koji su ukazali na prisustvo ozopora pripadaju devonskoj nadporodici Xyloiuloidea, nadreda Juliformia. Takođe, ovaj nalaz je i prvi dokaz prisustva ozopora ne samo kod diplopoda, već i kod svih životinja koje poseduju hemijsku odbranu (Wilson, 2006; Shear & Edgecombe, 2010). Analizama odbrambenog sekreta kod više od 150 vrsta izdvojene su četiru grupe dominantnih jedinjenja: alkaloidi, hinoni, fenoli i cijanogena jedinjenja. Pored njih, prisutno je i nekoliko grupa manje zastupljenih jedinjenja, različitih, često još uvek nedovoljno poznatih funkcija (Eisner *et al.*, 1978; Makarov, 2015; Shear, 2015).



U odnosu na specifičnu morfologiju žlezda i hemijski sastav sekreta, mogu se razlikovati tri tipa ozadena: glomeridni, polidezmidni i julidni.

#### 1.4.1.1. Glomeridni tip žlezda

Dva tima naučnika su, nezavisno jedan od drugog, sredinom 60-tih godina prošlog veka, analizirali hemijski sastav sekreta vrste *Glomeris marginata* (Villers, 1789) i detektovali prisustvo dva hinazolinonska alkaloida, nazvana glomerin i homoglomerin (odnosno 1,2-dimetil-4(H)-hinazolinon i 1-etil-2-metil-4(3H)-hinazolinon (Schildknecht *et al.*, 1966; Meinwald *et al.*, 1966; Schildknecht *et al.*, 1967; Schildknecht & Wenneis, 1967; Shear *et al.*, 2011).

Prvobitno se smatralo da su ozopore reda Glomerida raspoređene od IV do XI segmenta (Eisner *et al.*, 1978), ali su Shear i saradnici (2011) ustanovili da su otvori ozadena smešteni odmah iza segmenata III-X. Kasnije, utvrđeno je da se pore ne otvaraju u okviru segmenta, već anteriorno u odnosu na segmente IV-XI, dok su same žlezde smeštene u okviru segmenata III-X (Shear, 2015). Otvori odbrambenih žlezda mogu da budu jednodelni, kao kod *G. marginata*, suženi po sredini, kod *Onomeris sinuata* (Loomis, 1943) ili bilateralno udvojeni, što je verovatno slučaj kod vrste *Glomeroides primus* (Silvestri, 1929). Tanak mišićni sloj koji obavija žlezde dovodi do kompresije rezervoara, pri čemu se izlučuje sekret u vidu lepljivih kapljica. Izduženi, ovalni rezervoar žlezde nastavlja se u eferentni kanal koji se spaja sa kanalom druge žlezde istog segmenta i otvara na sredini dorzalne strane tela, čime je omogućena hemijska zaštita dok je životinja sklupčana. Obnova sekreta u žlezdama je proces koji u slučaju adulta *G. marginata* može da traje i više od četiri meseca ukoliko su one potpuno ispražnjene (Carrel, 1984).

Glomerin i homoglomerin izazivaju letargiju, paralizu i smrt kod miševa, povraćanje kod žaba, usporene alarmne reakcije ptica (Eisner *et al.*, 1978). Ova dva alkaloida su strukturno slična jedinjenjima sa sedativnim dejstvom na kičmenjake, biljnom arborinu, kao i metakvalonu, sintetičkom leku. Dejstvo sekreta vrste *G. marginata* testirano je na nekoliko vrsta paukova iz porodice Lycosidae (Carrel & Eisner, 1984). Kontakti glomeride i paukova u laboratorijskim uslovima rezultirali su sedativnim efektom sekreta

na paukove koji su, u većini slučajeva, napali stonogu i time se izložili dejstvu alkaloida. Delotvornost hinazolinona kao supstanci koje predatora odbijaju od plena, jer ga čine nejestivim i nekusnim, nije bila efikasna, jer su doze neophodne da bi se postigao ovaj efekat odgovarale letalnim vrednostima, tako da su glomeride često bile ubijene pre nego što bi sedativno dejstvo nastupilo. Međutim, bitno ograničenje ove studije je to što vrste testiranih paukova ne mogu da budu prirodni neprijatelji evropske *G. marginata*, jer žive u južnom delu SAD-a. Pored alkaloida, pretpostavljalo se i prisustvo proteinske komponente u sekretu (Schildknecht *et al.*, 1967) što je i dokazano analizama sekreta *G. klugii* Brandt, 1833 i *Onychoglomeris herzegowinensis* (Verhoeff, 1898) (Vujisić, 2013). Adhezivno svojstvo kapljica sekreta pruža fizičku zaštitu od mrava, brzo ih imobilizujući (Carrel, 1984; Shear *et al.*, 2011).

#### 1.4.1.2. Polidezmidni tip žlezda

Dok je odbrambeni sekret glomerida do sada ispitivan kod pet vrsta, odbrambeni sekret u redu Polydesmida proučavan je kod više od 50 vrsta (Makarov, 2015). Raspored ozadna nije isti kod svih vrsta, ali je najčešći obrazac prisustvo parnih žlezda na segmentima V, VII, IX, X, XII, XIII i XV-XIX, kod vrsta koje imaju 20 segmenata; kod vrsta koje imaju 19 segmenata, XVIII je poslednji segment sa žlezdama (Golovatch *et al.*, 2014; Koch, 2015a). Žlezdani aparat je složeniji u odnosu na ostala dva tipa; čine ga rezervoar, nalik istome kod julidnog tipa žlezda, reakciona komora (vestibulum) i eferentni kanal koji se otvara ozoporama različitog položaja na segmentu, često na ivici paranotuma, ali i na kratkim stubastim izraštajima, porostelama (Eisner *et al.*, 1978; Golovatch, 2013; Shear, 2015; Liu *et al.*, 2016). Jedinjenja koja dominiraju u odbrambenom sekretu ovog reda su vodonik cijanid (HCN) i benzaldehid (Makarov *et al.*, 2010). Terminalni deo kanala je čvrsto okružen invaginacijom sopstvenog zida koja funkcioniše kao zalistak, i koja je mesto insercije mišića za regulisanje otvaranja i zatvaranja zaliska (Eisner *et al.*, 1963). Prekursori sekreta, uglavnom mandelonitril ili benzoil cijanid se preko kanala, iz rezervoara dopremaju u vestibulu, okruženu debljim kutikularnim slojem nego što je to slučaj sa rezervoarom. Čelije koje okružuju vestibulu proizvode enzime koji katalizuju reakciju

nastajanja vodonik cijanida i benzaldehida. Kada je stonoga u opasnosti, kontrakcijama mišića se otvara zalistak, prekursori iz rezervoara prelaze u komoru, odakle se zajedno sa enzimima koji katalizuju cijanogenezu, izlučuju kroz ozoporu (Eisner *et al.*, 1978). Hidrostatički pritisak hemolimfe takođe može imati funkciju stimulisanja protoka prekursora kroz vestibulu, a zatim i gotovog cijanogenog produkta do spoljašnosti (Duffey, 1981). U sekretu nekoliko vrsta detektovani su, pored vodonik cijanida i mandelonitril benzoat, produkt reakcije mandelonitrila i benzoil cijanida u alkalnim uslovima izlučenih sekretornih tečnosti (Kuwahara *et al.*, 2011). Mandelonitril-benzoat u sekretu vrste *Chamberlinius hualienensis* Wang, 1956 nastaje u reakciji katalizovanoj hidroksinitril liazom (Dadashipour *et al.*, 2015). Kada je stonoga uznemirena, (*R*)-mandelonitril, koji se nalazi u rezervoaru, stupa u reakciju sa liazom pri čemu nastaju benzaldehid i vodonik cijanid, koji se izlučuju kroz ozoporu. Mandelonitril oksidaza, enzim hemolimfe, katalizuje konverziju (*R*)-mandelonitrila u benzoil cijanid, koji, u spontanoj kondenzaciji sa prekursorom mandelonitrilom proizvodi mandelonitril benzoat. Biosinteza (*R*)-mandelonitrila počinje l-fenilalaninom, od koga nastaje prekursor, (*E/Z*)-fenilacetaldoksim čija dehidracija vodi ka fenilacetanitrilu. Konačno, stereoselektivna hidroksilacija fenilacetanitrila rezultira nastankom (*R*)-mandelonitrila (Yamaguchi *et al.*, 2017). L-fenilalanin je i prekursor jedinjenja u sekretu polidezmidnih stonoga koje ne proizvode cijanogena jedinjenja (Kuwahara *et al.*, 2002). Dve vrste porodice Haplodesmidae luče sekret koji je smeša tri azotna jedinjenja: (2-nitroetil) benzena i (*Z*)- i (*E*)-(2-nitroetenil) benzena). Jedinjenja (*Z*)- i (*E*)-fenilacetaldoksim su biosintetski prekursori (2-nitroetil) benzena, koji u reakciji desaturacije, rezultira (*Z*)- i (*E*)-(2-nitroetenil) benzenom (Kuwahara *et al.*, 2018).

Detoksifikacija toksičnih cijanogenih jedinjenja se odvija procesom koji se odvija i u biljkama (Duffey and Towers, 1978). Do sada identifikovani enzimi, koji su uključeni u procese transformacije ovih jedinjenja u neškodljive su  $\beta$ -cijanoalanin sintaza i rodaneza, dok aktivnošću tirozin fenol liaze od fenola nastaje tirozin (Makarov, 2015).

Pored fenola, među jedinjenjima koja uz cijanogene čine odbrambeni sekret polidezmidna su gvajakol, ketoni, estri, organske kiseline, poput formične, miristinske,

benzoeve, acetatne, izovalerične, stearinske (Eisner *et al.*, 1978; Makarov *et al.*, 2010; Makarov, 2015).

Vodonik cijanid deluje prevashodno toksično na beskičmenjake i kičmenjake. Benzaldehid je repelent mrava. Fenoli, gvajakol, benzoeva kiselina i benzoil cijanid inhibiraju germinaciju spora i ispoljavaju bakteriostatično i fungistatično dejstvo, što može sprečiti rast bakterija i gljiva na kutikularnoj površini i u enzimskom rastvoru reakcione komore koja se otvara ozoporum ka spoljašnoj sredini. Isparljiva fenolna jedinjenja mogu sprečiti i da male spore ili fragmenti kontaminirane organske materije prodru kroz ozoporu do žlezde stvaranjem efuzionog pritiska (Duffey *et al.*, 1977). Benzoil cijanid deluje uznemiravajuće na mrave i ometa agresivno ponašanje tokom napada, a nakon višeminutnog izlaganja mravi podležu anestetizirajućem dejstvu ovog jedinjenja. Estri mogu da imaju različite funkcije, kao prekursori odbrambenih jedinjenja, toksini ili repelenti, kao i supstance koje pospešuju rasprostiranje sekreta po površini ili olakšavaju prodor sekreta kroz kutikulu (Eisner *et al.*, 1978; Blum, 1981; Shear, 2015; Makarov, 2015).

Nekoliko vrsta polidezmida, koje su većinom stanovnici zemljišta, ne proizvode cijanogena jedinjenja (Ômura *et al.*, 2002; Kuwahara *et al.*, 2002; Shear *et al.*, 2007). Jedinjenja detektovana kod ovih vrsta imaju različite funkcije: 1-okten-3-ol i geosmin nisu repelenti za mrave, ali deluju antimikrobno i fungistatično, a pretpostavlja se i kao alarmni feromoni, dok 2-nitroetilbenzeni ispoljavaju jako repelentno dejstvo prema mravima. U sekretu vrste *Leonardasmus injucundus* Shelley & Shear, 2006 utvrđeno je prisustvo *p*-krezola, ali ne i mandelonitrila, benzaldehida i vodonik cijanida (Shear *et al.*, 2007). Za razliku od mnogih „cijanogenih” stonoga, ova vrsta, naseljava dublje slojeve stelje i tla i nije aposematski obojena, te se pretpostavlja da njena odbrana nije usmerena ka vizuelno orijentisanim predatorima, već ka mravima ili predatorskim tvrdokrilcima. S obzirom da cijanogena jedinjenja nisu efikasna odbrana protiv svih vrsta mrava (Eisner *et al.*, 1978), a da fenoli deluju odbojno na mrave (Duffey *et al.*, 1977), *p*-krezol u sekretu ove vrste potencijalno obezbeđuje optimalnu zaštitu protiv predatora koji ne reaguju na cijanogena jedinjenja.

### 1.4.1.3. Julidni tip žlezda

Najrasprostranjeniji tip žlezda, julidni tip, postoji kod nekoliko grupa: nadreda Juliformia, redova Callipodida, Polyzoniida, Platydesmida, a pretpostavlja se i kod redova Stemmiulida, Siphonophorida i Siphonocryptida (Makarov, 2015; Shear, 2015). Od polusferičnog rezervoara, izduženog kod Polyzoniida i cevastog kod Platydesmida, pruža se eferentni kanal, koji se završava ozoporom sa lateralne strane tela. U zidu terminalnog dela kanala nalazi se zalistak, navoj u vidu opruge, na kome je mesto insercije mišića koji ga otvara. Kontrakcijom ovog mišića i istovremenom kompresijom rezervoara dolazi do izlučivanja sekreta. Kompresija rezervoara se postiže povećanim pritiskom hemocela ili kontrakcijom mišića integumenta oko žlezde, ili delovanjem oba procesa. Sekret se kod nekih većih vrsta, uglavnom Spirobolida i Spirostreptida, izlučuje u vidu spreja, sa maksimalno zabeleženom razdaljinom od 84 cm kod spirobolide *Haitobolus haitensis* (Gervais, 1847) (Buden *et al.*, 2004).

Po nekim autorima (Gruner *et al.*, 1993), tip žlezda prisutan u redovima Polyzoniida i Platydesmida iz subterklase Colobognatha, može se da se izdvoji u zaseban tip, kolobognatni. Specifičnost oblika žlezda smatra se jednom od autapomorfnihih osobina Colobognatha (Enghoff, 1984; Rodriguez *et al.*, 2018). Polyzoniida sadrže alkaloidne u svom odbrambenom sekretu, kao što su polizonimin i nitropolizonamin (Meinwald *et al.*, 1975),  $\beta$ -pinen, limonen i buzonamin koji deluju repelentno na mrave (Wood *et al.*, 2000), i spiropirolizidin *O*-metiloksim (Saporito *et al.*, 2003; Kuwahara *et al.*, 2007).

Pripadnici nadreda Juliformia nazivaju se „hinonskim diplopodama“, s obzirom na dominantnost različitih hinona u odbrambenom sekretu (Eisner *et al.*, 1978; Shear, 2015; Bodner *et al.*, 2016). Hinoni su bili prva dokumentovana klasa odbrambenih jedinjenja stonoga, kada su Béhal i Phisalix (1900), nedugo nakon što je Cook (1900) objavio pregled hemijske odbrane kod diplopoda, identifikovali benzohinone iz sekreta vrste *Julus terrestris* Linnaeus, 1758 (Makarov, 2015; Shear, 2015). Pored dominantnih metil- i/ili metoksi-benzohinona, etil-benzohinoni preovlađuju u sekretu nekih vrsta rodova *Typhloiulus* Latzel, 1884, *Serboilus* Strasser, 1962 i *Lamellotyphlus* Tabacaru, 1976 (Makarov *et al.*, 2017). Nehinonske komponente sekreta julida su uglavnom estri, ali i

alkoholi, alkenoli, aldehidi, fenoli, ketoni (Bodner & Raspotnig, 2012; Shimizu *et al.*, 2012; Sekulić *et al.*, 2014; Stanković *et al.*, 2016; Rodriguez *et al.*, 2018; Ilić *et al.*, 2018).

Benzohinoni su kristalnog čvrstog stanja, dok je odbrambeni sekret tečnost, iako u njemu nisu prisutna i jedinjenja koje bi mogla da služe kao njihovi rastvarači. Ugljovodonici su prisutni u rezervoaru odbrambenih žlezda buba bombardera, kao zasebna lipoidna faza, funkcionišući kao rastvarači hinona, ali i kao surfaktanti koji olakšavaju rasprostiranje sekreta po telu insekta (Eisner *et al.*, 2000, Shimizu *et al.*, 2012). Do danas su alifatični ugljovodonici detektovani jedino u sekretu spirobolide *Rhinocricus padbergi* Verhoeff, 1938 (Arab *et al.*, 2003). Međutim, postoji mogućnost da je njihovo prisustvo posledica kontaminacije kutikularnim ugljovodonicima tokom analize. Tečno stanje sekreta može da se objasni principom optimizacije koji se ogleda u prisustvu odgovarajućih izomera hinona, u odgovarajućim razmerama u sekretu, sa znatno nižom tačkom topljenja u odnosu na druge poznate izomere, što rezultira sniženom tačkom topljenja smeše (Attygalle *et al.*, 1993). Međutim, proučavanjem nekoliko julidnih vrsta, nisu utvrđeni neophodni odnosi udela jedinjenja u sekretu kojima može da se postigne sniženje tačke topljenja i prelazak u tečno stanje (Huth, 2000). Ipak, sniženje tačke topljenja moglo bi da rezultira iz same smeše benzohinona i drugih komponenti, čime bi se pospešila potentnost sekreta, koji je, kod velikih juliformnih stonoga prevashodno usmeren protiv sisara i na njihove osetljive mukozne membrane, pre nego na insekte (Wu *et al.*, 2007). Funkciju rastvarača mogu imati i estri, komponente sekreta i kod insekata i kod stonoga (Shimizu *et al.*, 2012).

Do sada je pokazano da hinoni deluju iritirajuće na mrave, paukove, kičmenjake, dovode do očne iritacije miševa i ptica, i izazivaju češanje kod žaba (Eisner *et al.*, 1978). Isparenja sekreta pružaju zaštitu od ponovnog napada mrava, što je pokazano i u slučaju hinonskog sekreta juliformnih stonoga, fenolnog kod kalipodida i cijanogenog kod polidezmidia (Eisner *et al.*, 1978). „Hemijski štiti“ koji nastaje nakon izlučivanja sekreta, detektovan i kod jedne vrste opiliona sa benzohinonskim sekretom, onemogućava ponovni napad mrava, bar tokom onoliko vremena koliko je dovoljno životinji da pobegne (Machado *et al.*, 2005). Predator može napasti stonogu, međutim, ukoliko je odmah ne proguta, može da se izloži dejstvu hinona i odbaci plen. To je pokazano testovima u kojima su korišćene žabe *Anaxyrus cognatus* (Say, 1823) koje se, ukoliko stonogu premeštaju u

ustima, izlažu dejstvu sekreta plena i odbacuju ga (Eisner *et al.*, 1978). Toksičnost hinonskog sekreta je utvrđena potkožnim injektiranjem u trbušnu šupljinu pacova, morskih prasadi i miševa (Eisner *et al.*, 1978). Međutim, oralna primena benzohinona ili ishrana stonogama kod pacova i miševa ne dovodi ni do kakvih efekata, dok kod pasa može izazvati povraćanje (Eisner *et al.*, 1978). S obzirom da su benzohinoni veoma reaktivna jedinjenja, verovatno je da podležu promeni u crevima (Eisner *et al.*, 1978; Shear, 2015). Alkilovani 1,4-benzohinoni, koji dominiraju u sekretu artropoda, su efektivniji iritanti od nesupstituisanih 1,4-benzohinona (Eisner *et al.*, 2004).

### **1.5. Poliginandrija, seksualna selekcija i reproduktivno ponašanje Diplopoda**

Poliginandrija kao sistem parenja podrazumeva da se mužjaci i ženke pare više puta tokom sezone; pri tom, uočena je veća varijabilnost u uspešnosti u parenju među mužjacima nego među ženkama (Shuster & Wade, 2003; Kokko *et al.*, 2014). Parenje sa većim brojem partnera podrazumeva određene koristi (benefite), ali i odgovarajuće rizike za oba pola. Višestruka parenja imaju uticaj na komponente adaptivne vrednosti (dužinu života, fertilitet, fekunditet), i podrazumevaju značajan utrošak energije i vremena, povećavaju izloženost predatorima, rizik od fizičke povrede i infekcije, a mogu da dovedu i do redukovane efikasnosti imunog odgovora (Siva-Jothy *et al.*, 1998; Arnqvist & Nilsson, 2000; Jennions & Petrie, 2000). Povećanom učestalošću parenja po reproduktivnom periodu (Maklakov *et al.*, 2005), mužjaci pospešuju reproduktivni uspeh (Arnqvist & Nilsson, 2000) određen brojem ženki sa kojima se mužjaci pare, fekunditetom tih ženki, i količinom oplodjenih jaja (Kokko *et al.*, 2006). Reproductivni uspeh ženki određen je, između ostalog, ulaganjem u proizvodnju vijabilnih jaja (Arnqvist & Nilsson, 2000). Takođe, reproduktivni uspeh može da zavisi od osobina životne istorije (npr. starost prilikom prve reprodukcije, broj reproduktivnih pokušaja, stope preživljavanja) (King *et al.*, 1991; Blums & Clark, 2004; Spong *et al.*, 2008), morfoloških osobina (Jensen *et al.*, 2004; Ward *et al.*, 2014; Fricke *et al.*, 2015), osobina ponašanja (Bensch *et al.*, 1998; Fricke *et al.*, 2015), kao i eventualne srodnosti roditelja (Amos *et al.*, 2001; Charpentier *et al.*, 2005).

S druge strane, benefiti koje jedinke imaju od višestrukih parenja mogu da se grupišu u direktne, „materijalne“ i indirektne, tzv. „genetičke“ (Archer & Elgar, 1999). Neki od benefita podrazumevaju davanje „hranljivog poklona” prilikom udvaranja, podelu brige o potomstvu, kao i zaštitu od uznemiravanja od strane drugih mužjaka (Bateman, 1998; Archer & Elgar, 1999; Jennions & Petrie, 2000). Sam čin parenja i prisustvo sperme u reproduktivnom traktu ženke, kao i dodatnih hemijskih materija koje se unose sa spermom, uz nutritivne vrednosti ejakulata mogu da stimulišu produkciju jaja i pospeše fertilitet (Arnqvist & Nilsson, 2000). Ipak, akcesorne hemijske materije, koje poseduju različite funkcije (inhibicija receptivnosti ženki, repelentno dejstvo prema drugim mužjacima), utiču na smanjenje stope ponovnog parenja ženki, a hemijska jedinjenja koja imaju negativno dejstvo na spermu prethodnih mužjaka, mogu da ispolje toksične nuspojave za ženke (Andersson *et al.*, 2000).

Pored „materijalnih“, parenjem sa većim brojem partnera ženke stiču i indirektne benefite tako što ostavljaju genetički varijabilno potomstvo (Archer & Elgar, 1999; Puurtinen *et al.*, 2009; Tuni & Bilde, 2010).

Poliandrija omogućava ženkama da vrše i tzv. postkopulatorni izbor, kao i da smanje rizik od ukrštanja u srodstvu ili sa genetički nekompatibilnim partnerima (Newcomer *et al.*, 1999; Firman & Simmons, 2008). Da bi se umanjili rizici usled parenja sa različitim partnerima, prekopulatorni i kriptični mehanizmi izbora razvili su se kod oba pola i ostvaruju se različitim strategijama (Hunt & Sakaluk, 2014).

Mehanizmi seksualne selekcije su: kompeticija unutar polova (intraseksualna selekcija) i izbor partnera (interseksualna selekcija) (Darwin, 1871; Tucić, 2003). Fizičkom borbom kojom se obezbeđuje pristup ženkama ili čuvanjem resursa koji su ženkama neophodni za preživljavanje i reprodukciju, mužjaci stiču selektivnu prednost. Međutim, i ženke nekih vrsta mogu da stupe u kompetitivne interakcije, što je praćeno i razvojem morfoloških osobina koje takvo ponašanje podržavaju (Young & Bennett, 2013). Interseksualna selekcija podrazumeva izbor partnera, na osnovu uočljivih morfoloških, fizioloških ili ponašajnih osobina, kakvo je, recimo, upadljivo oglašavanje ili ponuda „materijalnih“ resursa (Miller, 2013). Izbor partnera zavisi i od faktora kao što su: fiziološko stanje jedinke koja bira, sredinski faktori koji utiču na vreme i energiju koji se



ulažu u potragu i izbor partnera, gustina populacije i operacionalni odnos polova (Widemo & Sæther, 1999).

U velikom broju eksperimenata posvećenih izučavanju seksualne selekcije na različitim model-sistemima, u prirodnim i laboratorijskim uslovima, utvrđena je povezanost između različitih morfoloških osobina i uspeha u parenju. Kod različitih grupa artropoda, morfološka varijabilnost veličine tela korelisana je sa uspehom u parenju oba pola (Harari *et al.*, 1999; Danielsson, 2001; Serrano-Meneses *et al.*, 2006; Pavković-Lučić *et al.*, 2009; Helinski & Harrington, 2011; Cator & Zanti, 2016). Kod *Drosophila melanogaster* Meigen, 1830, pored veličine, i oblik krila utiče na uspešnost parenja mužjaka (Menezes *et al.*, 2013). Kod pauka *Schizocosa stridulans* Stratton, 1984 na uspešnost parenja mužjaka utiče ornamentacija prednjih nogu i trajanje udvaranja, koje uključuje tapkanje nogama (Hebets *et al.*, 2011). Reproductivna uspešnost mužjaka može da zavisi i od trajanja kopulacije (Arnqvist & Danielsson, 1999; Andrés & Rivera, 2000; Barbosa, 2011). Mužjaci vodene device *Ceriatrion tenellum* (De Villers, 1789) mogu da produže trajanje parenja i tako obezbede oplodjenje veće količine jaja (Andrés & Rivera, 2000). Pre parenja, mužjaci nekih vrsta mogu da izmeste i uklone ejakulate prethodnih mužjaka iz reproduktivnog trakta ženke (Edward *et al.*, 2015). Pri tom, izuzetna varijabilnost i složenost intromitentnih organa, koja upućuje na funkcije koje se odnose na transfer sperme, kao i na manipulaciju ejakulatom može da bude oblikovana postkopulatornom, pre nego prekopulatornom selekcijom (Eberhard, 1985; Wenninger & Averill, 2006). Tako su, recimo, kod heteroptera roda *Gerris* Fabricius 1794, intromitentne genitalne strukture podvrgnute postkopulatornoj, a neintromitentne prekopulatornoj selekciji (Rowe & Arnqvist, 2011). Preduslovi za delovanje postkopulatorne selekcije su: unutrašnje oplodjenje, parenje sa većim brojem partnera, skladištenje sperme u reproduktivnom traktu ženke i izostanak prednosti sperme prvog mužjaka prilikom oplodjenja (Archer & Elgar, 1999; Wojcieszek & Simmons, 2011). Prednost poslednjeg mužjaka prilikom oplodjenja uslovljena je blizinom njegovog ejakulata u odnosu na bazu kanala spermateke kao mesta gde se odvija fertilizacija (Parker, 1970). Unos i skladištenje sperme mogu da se stimulišu akcesornim supstancama koje mužjaci dopremaju sa spermom u reproduktivni trakt ženke (Arnqvist & Nilsson, 2000). Takođe, ženke mogu da

luče sekret spermicidnog dejstva iz svojih akcesornih polnih žlezda, kao što je slučaj kod balegarske muve *Scathophaga stercoraria* (Linnaeus, 1758) (Hosken *et al.*, 2001). Mehanizmi kriptičnog izbora, evolucija genitalnih i drugih morfoloških struktura obezbeđuje i mužjacima i ženka održavanje seksualnog konflikta, odnosno „borbu“ za različite reproduktivne interese i kontrolu nad procesom fertilizacije (Arnqvist & Rowe, 1995; Simmons, 2014).

Kod diplopoda, oba pola se pare više puta sa istim i/ili različitim partnerima tokom sezone (Carey & Bull, 1986; Rowe, 2010; Wojcieszek & Simmons, 2011). Mužjaci infraklase Helminthomorpha poseduju gonopode kao intromitentne strukture, često složene i specifične građe, što ih čini najpouzdanijim morfološkim karakterom za identifikaciju vrsta (Sierwald & Bond, 2007; Koch, 2015a). Različiti izraštaji na gonopodama mogu imati funkciju u spermalnoj kompeticiji, što je do sada najbolje proučeno kod pripadnika reda Spirostreptida nadreda Juliformia (Barnett *et al.*, 1993; Barnett & Telford, 1996; Frederiksen & Enghoff, 2015). Ženke čuvaju spermu u seminalnom receptakulumu (spermateki), koga čine komore različitog oblika i broja, smeštene u udubljenju između valvularnih nabora burze (tela vulve) (Koch, 2015a). S obzirom na postojanje višestrukih parenja i skladištenja sperme u genitalnom traktu ženki, pretpostavlja se da postkopulatorna seksualna selekcija utiče na morfološku varijabilnost gonopoda stonoga (Telford & Dangerfield, 1993a; Tadler, 1996).

Prekopulatorno ponašanje do sada opisanih vrsta diplopoda odvija se po sledećem obrascu: mužjak provodi određeno vreme na dorzalnoj strani tela ženke, dodirujući antenama njen glaveni region, a zatim okreće svoju ventralnu stranu tela ka njenoj ventralnoj strani, da bi došlo do transfera sperme u vulve ženki (Cooper & Telford, 2000; Jovanović *et al.*, 2017; Vujić *et al.*, 2018). Pre kopulacije mužjaci i ženke mogu da primaju informacije o kvalitetu potencijalnog partnera na osnovu određenih morfoloških osobina koje bi bile pod uticajem prekopulatorne seksualne selekcije.

## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Prema raspoloživim literaturnim podacima pretpostavlja se da su Diplopode prve artropode koje su naselile terestrična staništa. Nova sredina je zahtevala i odgovarajuće adaptacije. Stoga je analiza različitih aspekata biologije diplopoda, kao što su način postembrionalnog razvića, način razmnožavanja ili mehanizmi zaštite, od velikog značaja u tumačenju evolucije živog sveta generalno. Pored toga, prisustvo specifičnih sekundarnih metabolita ili prirodnih proizvoda pruža mogućnost da se analizira ne samo njihov fiziološki ili filogenetski značaj, već i njihova biološka aktivnost i potencijalna aplikativnost. Stoga, kao model sistem u ovoj doktorskoj disertaciji odabrana je diplopoda *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881). Navedena vrsta je jedna od najvećih evropskih stonoga i predstavlja pogodan model organizam za proučavanje različitih aspekata biologije diplopoda, kao što su način postembrionalnog razvića, analiza odbrambenog sistema i reproduktivnog ponašanja.

Ciljevi istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji su sledeći:

- Utvrđivanje tipa anamorfoze;
- Distinkcija anamorfnih stadijuma tokom kasne postembriogeneze korišćenjem relevantnih morfoloških osobina;
- Određivanje tipa odbrambenih žlezda *P. hungaricus* na osnovu morfoloških, anatomskih i ultrastrukturnih odlika ozadena;
- Utvrđivanje tipa sekrecije;
- Analiza sastava odbrambenog sekreta i identifikacija komponenti odbrambenog sekreta kod oba pola;
- Ispitivanje antibakterijskog i antifungalnog dejstva sekreta i poređenje sa dejstvom komercijalnih antibiotika i antimikotika;
- Analiza reproduktivnog ponašanja vrste *P. hungaricus* u laboratorijskim uslovima;
- Utvrđivanje povezanosti morfološke varijabilnosti odabranih karakteristika i uspeha u parenju jedinki oba pola.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. *Pachyiulus hungaricus* – rasprostranjenje i osnovne morfološke odlike

*Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881), karpato-balkanskog rasprostranjenja, je jedna od najvećih evropskih diplopoda čije ženke dostižu veličinu i preko 10 cm (Frederiksen *et al.*, 2012). Ova vrsta pripada redu Julida, koji, zajedno sa redovima Spirostreptida i Spirobolida čini nadred Juliformia, stonoge cilindričnog oblika, izduženog tela.

Distribucija vrste je poglavito na Balkanskom poluostrvu (Albaniji, Bosni i Hercegovini, Bugarskoj, Crnoj Gori, Grčkoj, Hrvatskoj, Makedoniji, Rumuniji i Srbiji) (Kime & Enghoff, 2017). Živi u listopadnim šumama bukve, hrasta i graba, kao i u mešovitim i četinarskim šumama bora, smrče i jele, na različitim nadmorskim visinama, ali se može naći i na otvorenim žbunastim i travnatim staništima (Kime & Enghoff, 2017). Ovo je detritivorna vrsta, koja svoju aktivnost reguliše u odnosu na vlažnost tla i vazduha, pri čemu se uglavnom nalazi u stelji, ispod ili unutar trulih, oborenih stabala, panjeva, pored potoka, a kad su uslovi pogodni, sreće se i van svojih skrovišta, pa i nekoliko metara uz koru drveća (Jovanović *et al.*, 2017).

Jedinke su upadljivo, aposematski obojene, dominantne crveno-braon boje, na metazonitima i tamno zelene na prozonitima. Adultne ženke su često znatno krupnije u odnosu na adultne mužjake. Mužjaci poseduju gonopode na VII segmentu na mestu VIII i IX para nogu. Gonopore se otvaraju kroz strukture iza II para nogu, kroz paran penis kod mužjaka, i sklerotizovane vulve kod ženki. Prvi par nogu kod mužjaka je modifikovan u čvrste strukture sa kukastim vrhom koje služe za pridržavanje ženke tokom parenja (slika 3). Mužjaci poseduju i adhezivne jastučice na tibiji i postfemuru. Noge se sastoje od šest podomera, sa kandžicom na vrhu tarzusa. Epiprokt telzona nije izražen i ne prelazi paraprokte; epiprokt, paraprokti i hipoprokt su gusto setozni.



**Slika 3.** Modifikovani prvi par nogu mužjaka *P. hungaricus*. Slika: Z. Jovanović.

### **3.2. Prikupljanje i čuvanje jedinki u laboratorijskim uslovima**

Jedinke korišćene u istraživanjima predstavljenim u ovoj tezi prikupljane su na Avali kod Beograda (lokaliteti: Sakinac N 44°42'23''; E 20°31'12'' i Čarapićev Brest N 44°41'32''; E 20°31'06'') u periodu od 2013. do 2018. godine, tokom prolećne i jesenje sezone. Uzorak za istraživanja postembrionalnog razvića, pored lokaliteta na Avali, sakupljen je i na Goču, lokalitet Gvozdac (N 43°33'49''; E 20°50'29''). U laboratorijskim uslovima, stonoge su čuvane u plastičnim kutijama sa steljom sa lokaliteta prikupljanja. Posebni uslovi čuvanja jedinki naznačeni su za svako istraživanje. Vlažnost je održavana svakodnevnim prskanjem stelje u kutijama svežom vodom.

### 3.3 Metode istraživanja postembrionalnog razvića

#### 3.3.1. Prikupljanje i merenje jedinki

Ukupno je prikupljena 71 jedinka, od čega 56 na lokalitetima na Avali, Sakincu i Čarapićevom Brestu i 15 na Goču, lokalitet Gvozdac. Jedinke su fotografisane fotoaparatom Canon PowerShot 230HS, sa iste visine, uz lenjir sa najmanjim podeokom od 1 mm. Binokularna lupa Nikon SMZ 745T je korišćena za disekciju i analizu jedinki. Za određivanje širine i visine trupa fotografisani su segmenti sa sredine tela Nikon DS-Fi2 kamerom sa Nikon DS-L3 kontrolorom kamere prikačenim za Nikon SMZ 1270 binokularni stereomikroskop. Za merenje dužine tela, visine i širine trupa korišćen je program ImageJ v. 1.51j8 (Abràmoff *et al.*, 2004).

#### 3.3.2. Analizirane morfološke osobine

Prilikom opisivanja postembrionalnih stadijuma analizirano je osam morfoloških osobina, koji podrazumevaju linearne mere (dužina tela, visina i širina trupa), broj segmenata sa nogama za hodanje, broj segmenata bez nogu za hodanje, broj parova nogu za hodanje, broj redova ocela, i ukupan broj ocela. Kod pripadnika reda Julida, segmenti mogu da se označavaju i kao prstenovi, s obzirom da po jedan dorzalni tergite srasta sa sternitima dva ventralna segmenta da bi formirao diplosegment ili diploprsten. Opisi linearnih mera i skraćenice svih analiziranih osobina dati su u Tabeli 1.

**Tabela 1.** Analizirane osobine postembrionalnih stadijuma kod *P. hungaricus*.

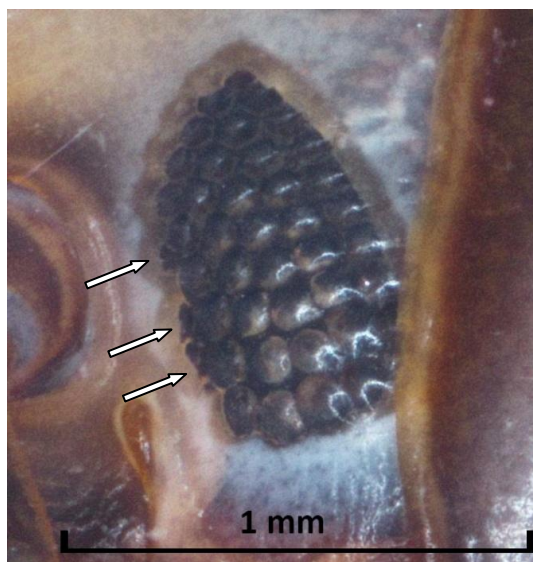
Osobina	Opis analiziranih osobina
<b>BL</b>	Dužina tela (merena od proksimalne ivice glavene kapsule do kraja telzona)
<b>TH</b>	Visina trupa (izražena kao maksimalno rastojanje između dorzalne i ventralne strane središnjeg prstena)
<b>TW</b>	Širina trupa (izražena kao maksimalno rastojanje između leve i desne strane središnjeg prstena)
<b>pR</b>	Broj prstenova sa nogama za hodanje

<b>apR</b>	Broj prstenova bez nogu za hodanje
<b>LP</b>	Broj parova nogu za hodanje
<b>RO</b>	Broj redova ocela
<b>O</b>	Broj ocela

### 3.3.3. Metode određivanja postembrionalnih stadijuma *P. hungaricus*

U ovoj disertaciji primenjeno je nekoliko metoda za određivanje postembrionalnih stadijuma: brojanje nizova ocela i ukupnog broja ocela u ocelarnom polju, brojanje parova nogu i segmenata, i analiza diskontinuiteta dimenzija.

Nizovi ocela, kao i pojedinačne ocele, broje se od posteriornog dela polja ka anteriornom, pri čemu je posteriorni deo određenom blizinom koluma, a anteriorni blizinom antena. Usled blizine baze antena, ocele su male i nepravilnog oblika, što ne ometa brojanje (slika 4).



**Slika 4.** Ocelarno polje jedinke na XI stadijumu, sa deset nizova ocela. Tri modifikovane ocele se uočavaju u anteriornom redu uz bazu antene (strelice). Slika: Z. Jovanović.

Kod Julida, s obzirom da se broj segmenata izražava formulom  $pR+apR+T$ , gde  $pR$  označava broj prstenova sa nogama,  $apR$  broj prstenova bez nogu, a  $T$  telzon, broj parova

nogu se izvodi iz formule  $L=2pR-5$  (Enghoff *et al.*, 1993). Kolum se označava kao prvi segment sa nogama za hodanje. Kod mužjaka je neophodno, prilikom računanja uzeti u obzir gubitak VIII i IX para nogu, na čijem mestu se razvijaju gonopode, i označiti VII segment kao apR. Takođe, kod polno zrelih mužjaka, dolazi do modifikacije prvog para nogu, koji gubi ulogu u kretanju, tako da se izuzima iz brojanja (Enghoff *et al.*, 1993).

Analizom diskontinuiteta dimenzija stadijumi su predstavljeni kao različite uzrasne klase određene varijacijom visine trupa u odnosu na broj prstenova sa nogama za hodanje. Za ovu analizu neophodno je uzeti u obzir vrednosti linearnih mera za svaku jedinku.

Širina i visina trupa merene su na prstenovima na sredini tela, kao maksimalno rastojanje između leve i desne strane, odnosno dorzalne i ventralne strane prstena.

### **3.4. Metode histoloških istraživanja**

#### **3.4.1. Priprema odbrambenih žlezda za elektronsku mikroskopiju**

Odbrambene žlezde izolovane su iz tela ženki, s obzirom da su ženke krupnije u odnosu na mužjake. Disekcije su izvedene u maloj količini 2% glutaraldehida. Nakon fiksacije u smeši 2% paraformaldehida i 2% glutaraldehida u 0.1 M fosfatnom puferu, tokom 1 h na 4°C, sledi serija ispiranja u istom puferu. Zatim, žlezde su postfiksirane u 1% OsO<sub>4</sub> u 0.1 M fosfatnom puferu tokom 1 h na sobnoj temperaturi, ponovo podvrgnute ispiranju, a nakon toga i dehidraciji kroz seriju etanola rastuće koncentracije. Žlezde, koje će biti podvrgnute DAB metodi citohemijske detekcije aktivnosti katalaze, nakon fiksacije i serije ispiranja u 0.1 M Sørensen fosfatnom puferu, preinkubirane su u 0.1% 3,3'-diaminobenzidinu (DAB, Sigma-Aldrich, Nemačka) u 0.1M fosfatnom puferu tokom 30 min, na sobnoj temperaturi, u mraku. Nakon toga, u preinkubacioni medijum dodat je 0.01% vodonik peroksid, nakon čega su žlezde inkubirane tokom 1h, na 37°C, u mraku. Inkubacija žlezda praćena je ispiranjem, postfiksacijom u 1% OsO<sub>4</sub> tokom 1h, na sobnoj temperaturi, još jednom serijom ispiranja i, na kraju, dehidracijom u etanolu rastuće koncentracije.



Žlezde iz obe grupe tretmana su potom rutinski ukalupljene u Araldit. Ultratanki preseći žlezda (80-100 nm), dobijeni korišćenjem Leica UC6 ultramikrotoma (Leica Microsystems, Nemačka), montirani su na bakarne mrežice, a zatim analizirani i snimljeni na Philips CM12 transmisionom elektronskom mikroskopu (Philips/FEI, Holandija), u Centru za elektronsku mikroskopiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta.

Za analizu skenirajućim elektronskim mikroskopom, proces pripreme žlezda podrazumevao je istovetan postupak kao i u slučaju analize transmisionom mikroskopijom, pri čemu, nakon prve serije ispiranja, žlezde nisu bile postfiksirane, već odmah podvrgnute dehidrataciji u etanolu. Uzorci, montirani na aluminijumski nosač prečnika 1 cm, preko koga je zalepljena dvostruko lepljiva traka, prekriveni su zlatom u uređaju za napanje provodnim slojem BAL-TEC SCD 005 (Capovani Brothers Inc., SAD), a zatim posmatrani pod skenirajućim elektronskim mikroskopom JSM-6390LV (JEOL, Japan). Pomenuta analiza je izvedena u Laboratoriji za elektronsku mikroskopiju Univerziteta u Beogradu - Poljoprivrednog fakulteta.

#### 3.4.2. Bojenje toluidinom

Polutanki preseći žlezda (2  $\mu\text{m}$ ), sečeni na Leica UC6 ultramikrotomu (Leica Microsystems), bojeni su rastvorom 1% toluidin plavog u 1% natrijum tetraboratu, tokom 30 s na sobnoj temperaturi, a potom isprani česmenskom vodom. Nakon sušenja i dehidratacije u alkoholima rastuće koncentracije, preparati su montirani u DPX medijumu (DPX mountant for histology, Sigma-Aldrich, Nemačka). Fotografije su snimljene na svetlosnom mikroskopu Leica DMLB, opremljenom DFC295 kamerom (Leica Microsystems, Nemačka).

#### 3.4.3. Imerzija ozadena u mlečnu kiselinu

Izolovane žlezde tretirane su mlečnom kiselinom po postojećem protokolu (Ruan *et al.*, 2018). Trahejni sistem uz žlezde je postepeno postajao vidljiv u periodu 30-60 min nakon imerzije ozadena u 90% mlečnu kiselinu. Fotografije su napravljene Nikon DS-Fi2

kamerom sa Nikon DS-L3 kontrolorom kamere povezanim sa Nikon SMZ 1270 binokularnim stereomikroskopom (Nikon Inc., Japan), u periodu od 30-120 min od imerzije žlezda.

#### 3.4.4. Merenje morfoloških celina, histoloških i citoloških komponenti

Merenja su izvršena u programu ImageJ Version 1.52o 23 April 2019 na osnovu fotomikrografija, kao i na osnovu skenirajućih i transmisionih elektronskih mikrofografija.

### **3.5. Metode semiohemijskih istraživanja**

#### 3.5.1. Prikupljanje i priprema odbrambenog sekreta

Da bi se dobila dovoljna količina sekreta za analize, adultni mužjaci i ženke, nakon čuvanja na 10°C, u mraku, izloženi su mehaničkom stresu, u zatvorenoj test-cevčici dimenzija 20 x 150 mm. Dobijeni sekret je odmah nakon rastvaranja u odgovarajućim rastvaračima podvrgnut analizama gasne hromatografije/masene spektrometrije (GC-MS) i antimikrobnom testiranju, da ne bi došlo do degradacije jedinjenja ili promene sastava tokom oksidacije.

Četiri ženke su stresirane u zatvorenom flakonu dok nije izazvano lučenje sekreta iz odbrambenih žlezda. Sekret je rastvoren u 10 mL metanola, a zatim podvrgnut evaporaciji do suvog ekstrakta u evaporatoru (Rotavapor R-215, Buchi, Švajcarska). Suvi ekstrakt je rastvoren u 50% metanolu i u daljim testovima korišćen u koncentraciji od 10 mg/mL.

#### 3.5.2. Hemijske analize

Za GC i GC-MS analize korišćen je gasni hromatograf Agilent 7890A povezan na 5975C maseno-selektivni detektor (MSD) i plameno-jonizacioni detektor (FID), sa HP-5MSI kapilarnom kolonom (Agilent Technologies, 0.25 mm x 30 m I.D., 0.25 µm debljina filma). Uzorci su ubrizgani splitsles injektorom. Injektirana zapremina je iznosila 1 µL, a

temperatura injektora 250°C. Protok helijuma (He), kao nosećeg gasa, je iznosio 1.0 mL/min na 210°C (pod stalnim pritiskom). Temperatura kolone je linearno povećavana u opsegu od 60-315°C stopom od 3°C/min da bi na finalnoj vrednosti ostala 15 minuta. Transferna linija je zagrevana do 315°C. Temperatura FID detektora je iznosila 300°C. Maseni spektri, snimani tehnikom elektronske jonizacije (EI) (70 eV), dobijeni su u  $m/z$  opsegu od 35-550, pri čemu je temperatura izvora za jonizaciju bila 230°C, a kvadrupola 150°C. Maseni spektri, snimani tehnikom hemijske jonizacije (CI), dobijeni su korišćenjem izobutana (sa energijom od 235 eV) u  $m/z$  opsegu od 60-550, pri čemu je temperatura jonskog izvora bila 300°C, a kvadrupola 150°C (Vujisić *et al.*, 2011; Bodner *et al.*, 2016).

MSD ChemStation softver za analizu podataka, verzija E.02.02, integrisan sa DRS (Deconvolution Reported Software), i NIST AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System) softverom, verzija 2.70, korišćeni su za pretragu biblioteka i masenu spektralnu dekonvoluciju i ekstrakciju. Za pretragu masenih spektara dobijenih elektronskom jonizacijom (EI MS), korišćena je biblioteka Hemijskog fakulteta - Univerziteta u Beogradu, koja sadrži 4,951 spektar, kao i komercijalno dostupne NIST11 i Wiley07 biblioteke, koja sadrže više od 500 000 EI masenih spektara. Na osnovu podataka iz spektara dobijenih hemijskom jonizacijom (CI MS), vršena je identifikacija i/ili potvrđivanje molekulske formule jedinjenja, kao i determinacija alkoholnih i kiselinskih delova estara. Relativni procenti identifikovanih jedinjenja su izračunati na osnovu odgovarajućih GC-FID površina pikova. Za identifikaciju većine hinonskih jedinjenja korišćeni su podaci iz do sada objavljene literature (Vujisić *et al.*, 2011; Bodner & Raspotnig, 2012; Bodner *et al.*, 2016).

### 3.5.3. Patogeni sojevi i uslovi gajenja kultura

Antibakterijska aktivnost odbrambenog sekreta vrste *P. hungaricus* je testirana na sledeće bakterijske sojeve: *Aeromonas hydrophila* ATCC 49140, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442, *Echerichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, meticilin-rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, *Listeria monocytogenes* 1/2a ATCC 19111, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 i *Xanthomonas*

*arboricola*; i na vrste gljiva: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Fusarium subglutinans*, *Fusarium semitectum*, *Fusarium equiseti*, *Penicillium sp.*, *Gliocladium roseum* i *Chaetomium sp.* Korišćeni referentni sojevi bakterija pripadaju Američkoj kolekciji ćelijskih kultura (American Type Culture Collection-ATCC), kao i postojećim laboratorijskim kolekcijama, osim soja *Xanthomonas arboricola*, koji je prethodno izolovan iz ploda lešnika (Dimkić *et al.*, 2013). Bakterijski sojevi su gajeni u kulturama na MHB i MHA medijumima (Müller-Hinton bujon i agar, HiMedia, Mumbaj, Indija), izuzev *L. monocytogenes* koji je gajen u kulturi na BHI (brain-heart infusion) bujonu (Biomedics, Madrid, Španija). Temperatura rasta je bila 37°C za sve ATCC sojeve i 30°C za *X. arboricola*. Testirane gljive su bile izolovane i identifikovane (Stević *et al.*, 2012; Dimkić *et al.*, 2015) iz sušenih medicinskih biljnih vrsta koje se uglavnom koriste za proizvodnju različitih proizvoda, naročito čajeva. Uzorci su uzeti iz skladišta Instituta za proučavanje lekovitog bilja “Dr Josif Pančić” u Beogradu. Fungalni izolati su gajeni u kulturi na PDA medijumu (Potato Dextrose Agar) i na MEA medijumu (Malt Extract Agar) na temperaturi rasta od 25°C.

#### 3.5.4. Antibakterijska aktivnost odbrambenog sekreta *P. hungaricus*

Antibakterijska aktivnost odbrambenih jedinjenja protiv patogenih bakterija testirana je difuzionom metodom u bunarićima i mikrodilucionom metodom. Bakterijske suspenzije su bile prilagođene McFarland standardu zamućenosti (0.5) (BioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francuska), koji odgovara vrednosti od  $1 \times 10^8$  CFU/mL. Inokulumi su pripremljeni i čuvani na 4°C do upotrebe. Svi eksperimenti su ponovljeni tri puta.

**Difuzioni test u bunarićima.** Difuzioni test u bunarićima (Harris *et al.*, 1989) je korišćen kao preliminarni metod u utvrđivanju antimikrobnog potencijala odbrambenog ekstrakta. Sterilni kalupi za bunariće (načinjeni od donjih delova vrhova 200 µL pipeta, prečnika 5 mm) su postavljeni na čvrsti medijum MHA/BHI, i na MHB/BHI soft agar, koji je prethodno inokulisan sa 50 µL odgovarajućeg soja uniformno nanesenog na MHA/BHA. Nakon što se soft agar učvrstio, kalupi su uklonjeni i dodato je 10 µL testiranog odbrambenog ekstrakta u bunariće. Kao negativna kontrola pripremljeno je 20 µL 50%

metanola. Petri posude su inkubirane tokom 24 h na optimalnoj temperaturi za indikatorske sojeve. Nivo bakterijske podložnosti je bio određen u odnosu na prečnik zone. Zone inhibicije su izražene u mm.

**Mikrodilucioni test.** Bujon mikrodilucioni metod je korišćen za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) i minimalne baktericidne koncentracije (MBC) ekstrakta protiv testiranih bakterijskih sojeva. Modifikovani metod korišćen je za utvrđivanje MIC i MBC vrednosti (Sarker *et al.*, 2007). Ukupno je izvedeno dvanaest dvostrukih serijskih razblaženja MHB medijumom u mikrotitracionim pločama sa 96 mesta, osim u slučaju *L. monocytogenes*, za koji je korišćen BHI medijum. Koncentracija testiranog ekstrakta je bila u opsegu 2-0.05 mg/mL. Konačna koncentracija rastvarača, 50% metanola, bila je 10%. Pored negativne kontrole, kontrole sterilnosti i kontrole rastvarača, antibiotik rifampicin (Sigma-Aldrich, Carlsbad, SAD) je takođe testiran kao pozitivna kontrola. Svaki bunarić, osim u slučaju kontrole sterilnosti, je inokulisan sa 20  $\mu$ L bakterijske kulture (približno  $1 \times 10^8$  CFU/mL), dostižući konačnu zapreminu od 200  $\mu$ L. Veća zapremina inokuluma bakterijskih kultura je primenjena kada je ekstrakt bio intenzivnije boje. U poslednjem koraku, dodato je 22  $\mu$ L resazurina (0.675 mg/mL) u svaki bunarić. Ploče su bile inkubirane tokom 24 h na optimalnoj temperaturi za indikatorske sojeve. Svi testovi su izvedeni u osvetljenoj sredini, ali su ploče bile inkubirane u mraku. Resazurin je oksido-redukcioni indikator koji se koristi za procenu ćelijskog rasta. To je plava, nefluorescentna i netoksična boja, koja postaje ružičasta i fluorescentna kada se, u živim ćelijama, redukuje do rezorufina oksido-reduktazama (Sarker *et al.*, 2007). Najniža koncentracija koja nije dovela do promene u boji je definisana kao MIC. MBC je određena pripremom subkultura (transferom mikroorganizama u sveži hranljivi medijum) testiranih razblaženja iz svakog bunarića u kome nije došlo do promene boje na agar pločama, a zatim inkubiranjem tokom 18-24 h. MBC je definisana kao koncentracija na kojoj je uništeno 99.9% početnog inokuluma. Rezultati su predstavljeni u mg/mL.

### 3.5.5. Antifungalna aktivnost odbrambenog sekreta *P. hungaricus*

Za ispitivanje antifungalne aktivnosti odbrambenog sekreta vrste *P. hungaricus*, korišćena je modifikovana verzija mikrodilucione tehnike (Daouk *et al.*, 1995). Gljivične spore su isprane sa površine malt agar ploča (MA) (malt ekstrakt, 50 g/L; agar, 15 g/L) sterilnim 0.85% 113 fiziološkim rastvorom koji sadrži 0.1% Tween 80 (v/v). Da bi se napravile koncentracije suspenzije spora od približno  $1.0 \times 10^5$  u konačnoj zapremini od 100  $\mu$ L po bunariću, korišćen je sterilni fiziološki rastvor. Inokulumi su čuvani na 4°C za dalju upotrebu. Razblaženja inokuluma su gajena u kulturi na čvrstom MA da bi se potvrdilo odsustvo kontaminacije i da bi se proverilo stanje inokuluma. Određivanje MIC vrednosti je izvedeno mikrodilucionom tehnikom korišćenjem mikrotitracionih ploča sa 96 mesta. TBS (Tryptic bile soy broth) (u g/L: kazein, 20; žučne soli, 1.5; X-B-D glukuronska kiselina, 0.075; dimetil sulfoksid, 3) je korišćen kao baza bunarića, u koji su dodati 0.01% Tween 80, različite zapremine ispitivanog ekstrakta i gljivični inokulum. Koncentracija testiranog ekstrakta je bila u opsegu 0.35-0.05 mg/mL. Mikroploče su inkubirane tokom 72 h na 28°C. Najniža koncentracija na kojoj nije zabeležen vidljivi rast je definisana kao minimalna koncentracija koja u potpunosti inhibira rast gljiva (MIC). Minimalne fungicidne koncentracije (MFC) su utvrđene serijskom subkultivacijom 2  $\mu$ L zapremine na mikrotitracionim pločama, koje sadrže 100  $\mu$ L bujona po bunariću, i daljom inkubacijom tokom 72 h na 28°C. Najniža koncentracija na kojoj nije zabeležen vidljiv rast je definisana kao MFC, i ukazuje da je uništeno 99.5% početnog inokuluma, u poređenju sa fungicidnom vrednošću flukonazola, koji je služio kao pozitivna kontrola.

## 3.6. Metode etoloških istraživanja

### 3.6.1. Uzorkovanje i pripremanje jedinki za testove parenja

Za analizu reproduktivnog ponašanja vrste *P. hungaricus* u laboratorijskim uslovima, sakupljen je uzorak od 95 jedinki (44 mužjaka i 51 ženka) na Avali (lokalitet Čarapićev Brest, selo Beli Potok), tokom maja 2016. godine. Jedinke su razdvojene po

polovima na samom terenu, s obzirom da su gonopode adultnih mužjaka lako uočljive. Mužjaci i ženke su potom stavljeni u zasebne kutije napunjene steljom sa mesta njihovog nalaženja. S obzirom da je ova vrsta detritivor, stelja sa lokaliteta prikupljanja je zadovoljavala nutritivne potrebe jedinki u laboratorijskim uslovima. Pre izvođenja eksperimenata, stonoge su čuvane sedam dana u laboratorijskim uslovima, svaka jedinka u posebnoj kutiji, na sobnoj temperaturi, relativnoj vlažnosti od približno 60%, pri 12-časovnoj smeni svetlosti i mraka.

### 3.6.2. Testovi parenja

Kako bi se testiralo ponašanje prilikom parenja, jedinke su testirane u tri tipa testa: „areni za parenje“ (engl. *mating arena*), testu izbora mužjaka (engl. *male choice*) i testu izbora ženki (engl. *female choice*). Svi ponašajni testovi su sprovedeni u periodu od 8:00-20:00 h. Arena za parenje je predstavljena plastičnom kutijom dimenzija 38 cm x 25 cm, ispunjena steljom, zemljom i komadima kore drveta sa nalazišta. Jedinke su se tokom 30 minuta slobodno kretale po areni, pri čemu su stupale u kontakte i parile se. Svaki par je premeštan u posebnu plastičnu kutiju sa steljom. Po završetku parenja, životinje su razdvajane i čuvane pojedinačno u odvojenim kutijama tokom 48 h, da bi zatim bile podvrgnute testovima izbora.

Testovi izbora izvedeni su u manjim plastičnim kutijama, dimenzija 20 cm x 13 cm, čije je dno bilo pokriveno steljom, korom i zemljom. U testu izbora ženki, u svaku plastičnu kutiju stavljeni su jedna ženka i dva mužjaka, pri čemu je jedan od ponuđenih mužjaka onaj koji se prethodno pario sa datom ženkom u areni. U testovima izbora mužjaka, jedan mužjak je imao izbor između dve ženke, od kojih je jedna bila njegov prethodni partner u testu „arena za parenje“. U testu „arena za parenje“ i u testu izbora mužjaka, ukupno su se sparila 22 mužjaka, dok se u testu „arena za parenje“ i u testu izbora ženki ukupno sparilo 27 ženki. Kako bi se razlikovale jedinke koje su se prethodno parile u areni od onih koje su novouvedene u testovima izbora, korišćen je UV prah koji se koristi prilikom markiranja insekata (Hagler & Jackson, 2001) i koji ne utiče na ponašanje prilikom parenja (Terzić *et al.*, 1994; Pavković-Lučić & Kekić, 2013). Pri tom, prvobitni partner je obeležen crvenim,

a novi partner zelenim prahom. Mala količina UV praha je nanosena na telzon svake stonoge, a boja je, nakon parenja, identifikovana korišćenjem UV lampe.

U eksperimentima su definisane i kvantifikovane sledeće sekvence ponašanja:

1. latenca (engl. *mating latency*, ML, definisana kao vreme proteklo od stavljanja jedinki u arenu do početka kopulacije);
2. dužina kopulacije (engl. *duration of copulation*, DC, definisana kao vreme koje protekne od momenta kada su jedinke počele da se pare do momenta kada su se razdvojile);
3. vreme koje protekne od uspostavljanja kontakta između jedinki do početka kopulacije (engl. *contact to copulation time*, CC);
4. vreme od stavljanja jedinki u kutiju do uspostavljanja kontakta koji će rezultirati kopulacijom (engl. *entry to contact with copulation time*, ECC);
5. vreme od stavljanja jedinki u kutiju do uspostavljanja kontakta koji nije rezultirao kopulacijom (engl. *entry to contact without copulation time*, ECWC);
6. trajanje kontakta između jedinki različitog pola koji nije rezultirao kopulacijom (engl. *contact without copulation*, CWC).

Razlike u prosečnim vrednostima DC, ECC i CC između prvog parenja (koje se odvijalo u „areni za parenje“) i drugog parenja (koje se odvijalo u testovima izbora) testirane su t-testom. Ponašanje prilikom parenja je takođe opisano deskriptivnom statistikom.  $\chi^2$  test je korišćen kako bi se, u testovima izbora, utvrdilo da li postoje razlike u uspehu u parenju između „prethodnog“ i „novog“ partnera. Sve statističke analize su urađene u programu Statistica 7 (StatSoft, Tulsa, SAD).

### 3.6.3. Analiza odabranih morfoloških osobina kod *P. hungaricus*

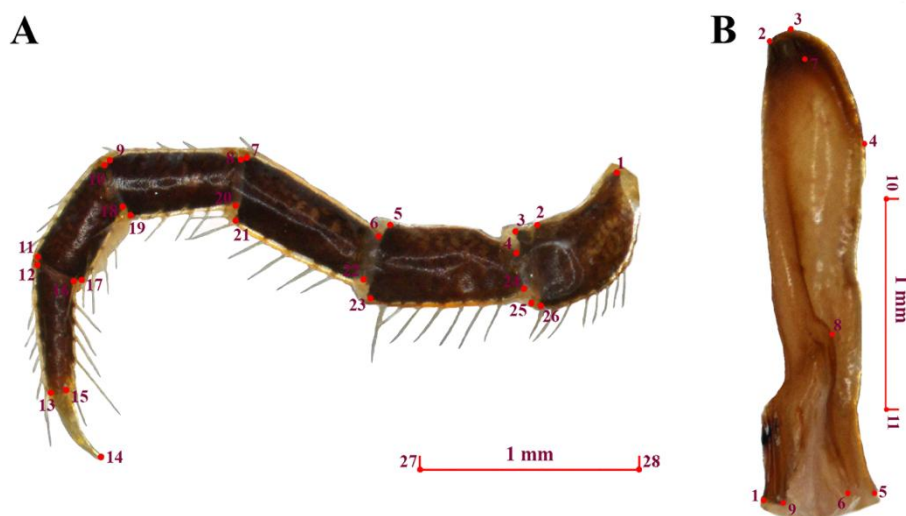
U morfološke analize uključene su sparene (28 parova) i nesporene jedinke (21 jedinka, od toga 11 ženki i 10 mužjaka). Kako bi se utvrdilo da li postoji značajna morfološka razlika između sparenih i nesparenih jedinki, analizirane su sledeće morfološke osobine: dužina tela (engl. *body length*, BL), masa tela (engl. *body mass*, M), dužina antena (engl. *antennae length*, AL), visina trupa (engl. *trunk height*, TH), širina trupa (engl. *trunk*



*width*, TW) i dužina nogu (eng. *leg length*, LL). Za mere trupa korišćen je 30. trupni segment, a za merenje dužine nogu anteriorni par 31. segmenta. Sva merenja su izvršena u programu ImageJ (Abrámoff *et al.*, 2004). Numerički podaci su logaritamski transformisani, kako bi bili podvrgnuti parametarskim statističkim testovima.

Veličina i oblik nogu i promerita gonopoda analizirani su geometrijskom morfometrijom, metodom za ispitivanje morfološke varijabilnosti (Drake & Klingenberg, 2008; Jojić *et al.*, 2012; Sherratt *et al.*, 2014; Lazić *et al.*, 2015). Za procenu morfološke varijabilnosti u odnosu na status parenja (sparene vs. nesporene jedinke) korišćeni su: anteriorni par nogu sa 31. segmenta (kod 28 parova i 21 nesporene jedinke, 11 ženki i 10 mužjaka) i promerit gonopoda (kod 26 sparenih i 8 nesparenih mužjaka). Obe strukture su fotografisane sa referentnom skalom binokularnim stereomikroskopom Nikon SMZ 1270 sa Nikon DS-Fi2 kamerom povezanom sa Nikon DS-L3 kontrolorom kamere. Postavljeno je 26 tačaka na fotografijama nogu i 9 tačaka na fotografijama promerita u TpsDig softveru (Rolf, 2008) (slika 5A, B). Pozicije tačaka na nogama su sledeće: 1. proksimalno najistaknutija tačka na koksi (dorzalna strana); 2. distalno najistaknutija tačka na koksi (dorzalna strana); 3. distalno najistaknutija tačka trohantera (dorzalna strana); 4. proksimalno najistaknutija tačka prefemura; 5. distalno najistaknutija tačka prefemura (dorzalna strana); 6. proksimalno najistaknutija tačka femura (dorzalna strana); 7. distalno najistaknutija tačka femura (dorzalna strana); 8. proksimalno najistaknutija tačka postfemura (dorzalna strana); 9. distalno najistaknutija tačka postfemura (dorzalna strana); 10. proksimalno najistaknutija tačka tibije (dorzalna strana); 11. distalno najistaknutija tačka tibije (dorzalna strana); 12. proksimalno najistaknutija tačka tarzusa (dorzalna strana); 13. distalno najistaknutija tačka tarzusa (dorzalna strana); 14. vrh kandže tarzusa; 15. distalno najistaknutija tačka tarzusa (ventralna strana); 16. proksimalno najistaknutija tačka tarzusa (ventralna strana); 17. distalno najistaknutija tačka tibije (ventralna strana); 18. proksimalno najistaknutija tačka tibije (ventralna strana); 19. distalno najistaknutija tačka postfemura (ventralna strana); 20. proksimalno najistaknutija tačka postfemura (ventralna strana); 21. distalno najistaknutija tačka femura (ventralna strana); 22. proksimalno najistaknutija tačka femura (ventralna strana); 23. distalno najistaknutija tačka prefemura (ventralna strana); 24. proksimalno najistaknutija tačka prefemura (ventralna strana); 25.

distalno najistaknutija tačka trohantera (ventralna strana); 26. distalno najistaknutija tačka na koksi (ventralna strana); 27. i 28. tačke na skali. Pozicije tačaka na gonopodama su sledeće: 1. spoljašnja strana baze mezalnog ispupčenja; 2. mezalni zuboliki izraštaj; 3. apikalni vrh promerita; 4. apikalni vrh središnjeg grebena; 5. spoljašnja strana baze središnjeg grebena; 6. unutrašnja strana baze središnjeg grebena; 7. lateralni zuboliki izraštaj; 8. izraštaj mezalnog ispupčenja; 9. unutrašnja strana baze mezalnog ispupčenja; 10. i 11. – tačke na skali.



**Slika 5.** **A** – pozicije tačaka na nogama *P. hungaricus*; **B** – pozicije tačaka na promeritu gonopode, mezokaudalni izgled. Slika: V. Vujić (Jovanović *et al.*, 2017).

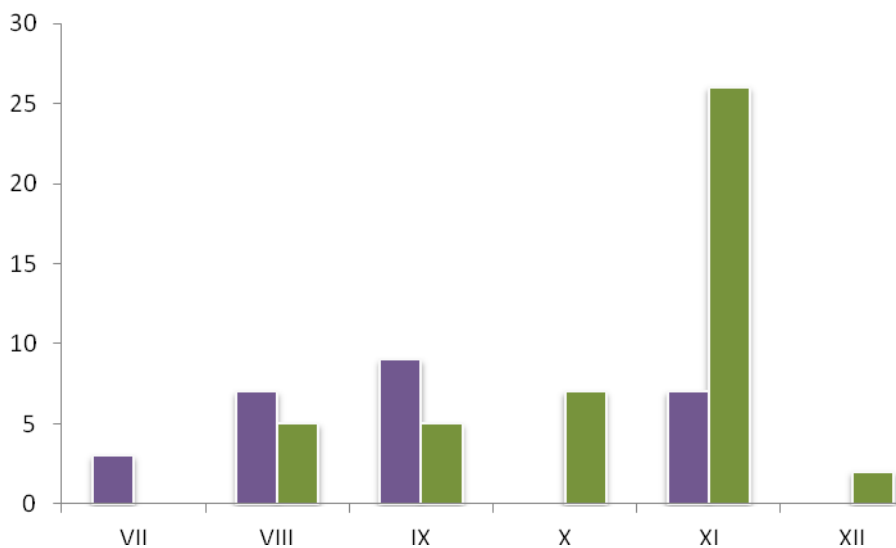
Vrednosti veličine centroida (engl. *centroid size*, CS) ispitivanih osobina izračunate su u CoordGen6 programu (Sheets, 2003). Analizom glavnih komponenti (engl. *Principal Component Analysis*, PCA) analizirana je varijabilnost veličine i oblika analiziranih morfoloških osobina. Kanonijskom varijantnom analizom (engl. *Canonical Variate Analysis*, CVA) analizirano je postojanje razlika u obliku nogu i promerita između *a priori* definisanih grupa. Obe analize, PCA i CVA, su urađene u programu MorphoJ (Klingenberg, 2011). Razlike u veličini centroida ovih struktura u odnosu na status parenja su testirane analizom varijanse (ANOVA). Statističke analize linearnih mera i variranja veličine centroida posmatranih morfoloških osobina su urađene u programu Statistica 7 (StatSoft, Tulsa, SAD).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati istraživanja postembrionalnog razvića

#### 4.1.2. Postembrionalni stadijumi *P. hungaricus*

U prikupljenom uzorku registrovano je ukupno šest stadijuma kasne postembriogeneze. Ženke pripadaju VII, VIII, IX, i XI, a mužjaci VIII, IX, X, XI i XII stadijumu (slika 6), tako da su jedinke u ovom uzorku u kasnom periodu postembrionalnog razvoja. Jedinke prikupljene na lokalitetima na Avali pripadaju svim navedenim stadijumima, dok su među mužjacima sa Goča zabeleženi stadijumi VIII, X i XI, a među ženkama VII, VIII i IX. Neke od segmentnih formula karakterišu samo jedinke određenog pola prikupljene na Goču: 33+6 (VII ♀), 37+6 (VIII ♀), 37+7 (VIII ♀), 43+6 (IX ♀), 38+5 (VIII ♂) i 54+2 (XI ♂) (tabela 3).



**Slika 6.** Broj jedinki *P. hungaricus* po polovima i stadijumima u prikupljenom uzorku. Ljubičasti stubovi predstavljaju ženke, dok se zeleni stubovi odnose na mužjake.

Kod jedinki na stadijumu VII prisutan je polni dimorfizam. U našem uzorku, na ovom stadijumu su nađene samo tri ženke, nediferenciranih vulvi. Dužina tela iznosi 18.61-20.20 mm, visina 1.93-2.20 mm, a širina 1.90-2.12 mm (tabela 2). Ocelarno polje čini šest redova ocela, dok sam broj ocela može biti 20, 21 i 22, s tim što kod jedne ženke polje sa desne i leve strane glavene kapsule ima različit broj ocela, 21 i 22. Broj segmenata sa nogama za hodanje iznosi 33 i 34, a broj segmenata bez nogu iznosi šest, što znači da su na ovom stadijumu zabeležene dve segmentne formule (tabela 3). Broj pari nogu je 61 ili 63. Telo je bledo braon-žute boje.

Na narednom, VIII stadijumu, dužina tela kod mužjaka iznosi 22.75-24.8 mm, dok je visina u opsegu 2.30-2.86 mm, a širina 2.30-2.63mm. Kod ženki, linearne mere su sličnog opsega, dužina se kreće između 20.49-25.88 mm, visina 2.30-2.65, a širina tela 2.35-2.57mm (tabela 2). Ocelarno polje sada ima jedan red više u odnosu na prethodni stadijum VII, i sastoji se od sedam nizova u okviru kojih se nalazi 24-27 ocela kod ženki, i 26-28 kod mužjaka. Leva i desna strana glavene kapsule i ovde mogu imati različit broj ocela. Od ukupno pet mužjaka, kod dve jedinke postoji razlika u jednoj oceli, a kod jedne u dve ocele. Od ukupno sedam ženki, razlika u jednoj, odnosno dve ocele prisutna je kod dve jedinke. Broj segmenata sa nogama za hodanje kod mužjaka je 37 i 38, bez nogu pet i šest, a kod ženki 37-40, dok je apodnih pet, šest i sedam. Broj parova nogu za hodanje je 65 i 67 kod mužjaka, a 69, 71, 73 i 75 kod ženki. Kod ženki može da se razlikuje šest segmentnih formula, a kod mužjaka tri (tabela 3). Obojenost tela je slična stadijumu VII. Kod mužjaka su prisutni rudimenti gonopoda.

Na stadijumu IX, kod mužjaka, zabeležena je dužina tela u opsegu od 27.99-31.30 mm, visina 3.01-3.4, a širina 2.82-3.22 mm. Ženke su dužine 25.07-33.71 mm, visine 2.79-3.53 mm, a širine 2.77-3.41 mm (tabela 2). Ocele su raspoređene u osam nizova, i kod mužjaka njihov ukupan broj može biti 30, 31, 32 ili 33, a kod ženki 30, 32, 33. Od ukupno pet mužjaka, leva i desna strana se razlikuju u jednoj oceli blizu baze antena kod dve jedinke, a od ukupno devet ženki, kod tri jedinke razlika je u jednoj oceli, kod jedne ženke u tri ocele, i kod jedne ženke u dve ocele. Broj segmenata sa nogama kod mužjaka iznosi 44, a segmenata bez nogu iznosi pet. Kod ženki, zabeleženi opseg segmenata sa nogama je širi, 43-46, a apodnih segmenata može biti pet ili šest. Broj parova nogu za hodanje je 79 i

84 kod mužjaka, a 81, 84, 85 i 87 kod ženki. Broj segmentnih formula iznosi četiri i kod mužjaka i kod ženki (tabela 3). Telo je tamnije braon boje, sa crveno-braon metazonitima. Rudimentno stanje gonopoda prisutno je i na ovom stadijumu.

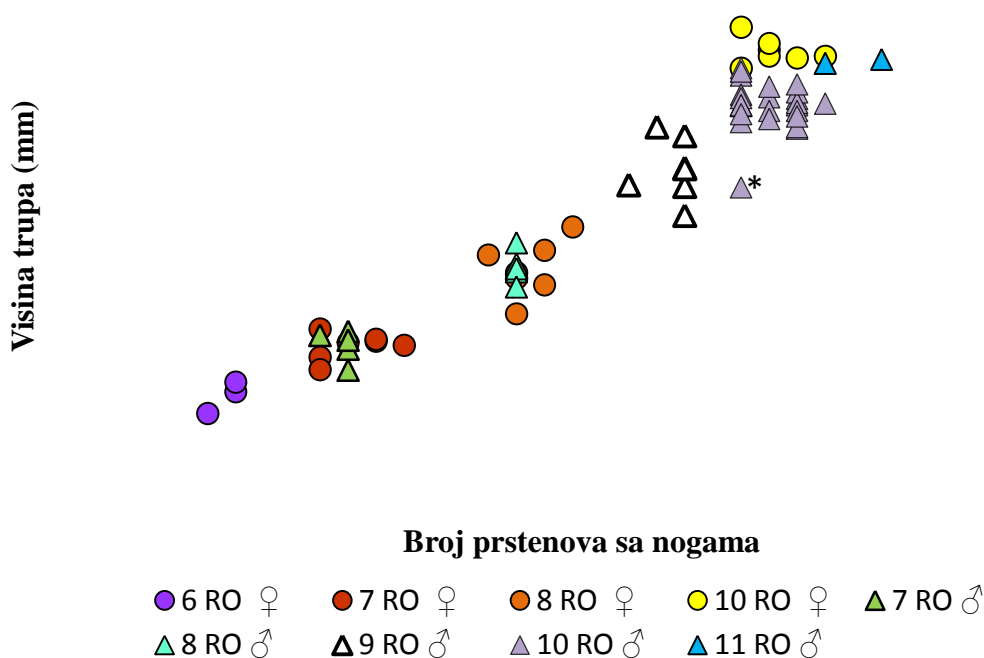
Sve prikupljene jedinke X stadijuma su mužjaci. Dužina tela iznosi 38.92-47.14 mm, visina 3.63-4.59 mm, a širina trupa 3.51-4.55 mm (tabela 2). Devet nizova ocela može činiti 34, 36, 37, 38 ili 39 ocela. Od ukupno sedam mužjaka, kod jednog je zabeležena razlika između leve i desne strane od tri ocele. Broj segmenata sa nogama za hodanje iznosi 48, 49 ili 50, a bez nogu četiri i pet. Broj parova nogu za hodanje može biti 87, 89, 91 ili 93. Četiri segmentne formule opisuju brojeve segmenata sa nogama i bez nogu (tabela 3). Gonopode na ovom stadijumu su razvijenije u odnosu na gonopode mužjaka prethodnih stadijuma.

Adulti se javljaju na XI stadijumu. Dužina tela mužjaka je u opsegu 52.06-61.24, visina trupa 3.87-4.89, a širina 3.77-4.70 mm. Ženke su dužine opsega 50.38-59.34 mm, visine 4.89-5.24 mm, a širine 4.84-5.08 mm (tabela 2). Ocele, raspoređene u deset nizova, su u opsegu 40-47 kod mužjaka, dok kod ženki njihov broj iznosi 40, 43, 44, 45 i 46. Od ukupno 26 mužjaka, ocelarno polje sa leve i desne strane glavene kapsule razlikuje se kod 10 jedinki u jednoj oceli, kod četiri jedinke u dve i kod jedne jedinke tri ocele. Od ukupno 11 ženki, po jedna jedinka se razlikuje u jednoj, dve i četiri ocele u broju ocela sa leve i desne strane ocelarnog polja. Broj segmenata sa nogama za hodanje je 52-55 kod ženki, a 52-54 kod mužjaka, dok je broj apodnih segmenata dva ili tri kod mužjaka, a dva, tri ili četiri kod ženki. Sedam segmentnih formula opisuje broj segmenata sa nogama i bez nogu kod ženki, a četiri segmentne formule kod mužjaka (tabela 3). Broj parova za hodanje je 95, 97, 99 i 100, kod mužjaka, a kod ženki 99, 100, 103, 104 i 105. Na ovom stadijumu zabeležen je i jedan mužjak sa potpuno razvijenim gonopodama i modifikovanim prvim parom nogu, tako da je broj parova nogu za hodanje ove jedinke 98. Preostale jedinke poseduju gonopode sličnog stanja, kao i mužjaci na prethodnom stadijumu. Vulve su na ovom stadijumu diferencirane.

Stadijum XII zastupljen je u uzorku sa dva mužjaka dužine 62,93 i 67,05 mm, visine trupa 4.93 i 4.97 mm i širine 4.91 i 4.97 mm (tabela 2). Broj segmenata sa nogama za hodanje je 55 i 57, a prisutan je jedan segment bez nogu, što znači da su na ovom stadijumu

zabeležene dve segmentne formule (tabela 3). Broj pari nogu za hodanje je 101 i 105. Ocelarno polje čini 11 redova sa ukupno 46, 48 ili 49 ocela. Kod jedne od dve jedinke na ovom stadijumu prisutna je razlika između leve i desne strane glavene kapsule od jedne ocele. Nema značajnije razlike u diferenciranosti gonopoda u odnosu na stadijum XI.

Stadijumi, definisani na osnovu nizova ocela, mogu se razdvojiti na osnovu odnosa broja prstenova sa nogama i visine trupa (slika 7). Visina trupa jedinog polno zrelog mužjaka, na stadijumu XI, sa 10 redova ocela, u opsegu je visine trupa mužjaka na stadijumu X, sa devet redova ocela. Jedan mužjak na stadijumu XI, sa 10 redova ocela poseduje isti broj segmenata sa nogama kao i mužjak na stadijumu XII, sa 11 redova ocela.



**Slika 7.** Veličina jedinki po stadijumima prikazana kroz varijaciju visine trupa u odnosu na broj prstenova sa nogama za hodanje. Jedinica označena zvezdicom predstavlja polno zrelog mužjaka. Krugovi različite obojenosti predstavljaju ženke na stadijumima VII-XI (ljubičasti: VII stadijum, crveni: VIII, narandžasti: IX, žuti: XI). Trouglovi predstavljaju mužjake na stadijumima VIII-XII (zeleni: VIII stadijum, svetlo plavi: IX, beli: X, sivi: XI, plavi: XII). Skraćenice: RO - redovi (nizovi) ocela.

**Tabela 2.** Vrednosti analiziranih morfoloških osobina tokom kasne postembriogeneze mužjaka i ženki *P. hungaricus* (izražene u milimetrima). Skraćenice: BL - dužina tela, TH - visina trupa, TW - širina trupa, pR - broj prstenova sa nogama za hodanje, apR - broj prstenova bez nogu za hodanje, LP - broj parova nogu, RO - broj redova ocela, O - broj ocela.

Stadijum (♀)	BL	TH	TW	pR	apR	LP	RO	O
VII	18.61-20.20	1.93-2.20	1.90-2.12	33,34	6	61,63	6	20-22
VIII	20.49-25.88	2.30-2.65	2.35-2.57	37-40	5-7	69,71,73,75	7	24-27
IX	25.07-33.71	2.79-3.53	2.77-3.41	43-46	5,6	81,84,85,87	8	30,32,33
XI	50.38-59.34	4.89-5.24	4.84-5.08	52-55	2-4	99,100,103-105	10	40,43-46

Stadijum (♂)	BL	TH	TW	pR	apR	LP	RO	O
VIII	22.75-24.8	2.30-2.86	2.30-2.63	37,38	5,6	65,67	7	26-28
IX	27.99-31.30	3.01-3.4	2.82-3.22	44	5	79	8	30-33
X	38.92-47.14	3.63-4.59	3.51-4.55	48-50	4,5	87,89-91,93	9	34,36-39
XI	52.06-61.24	3.87-4.89	3.77-4.70	52-54	2,3	95,97,98,99,100	10	40-47
XII	62.93-67.05	4.93-4.97	4.91-4.97	55,57	1	101,105	11	46,48,49

**Tabela 3.** Segmentne formule mužjaka i ženki koje karakterišu kasnu postembriogenezu *P. hungaricus*.

Stadijum	Segmentne formule (♀)						
VII	33+6+T	34+6+T					
VIII	37+5+T	37+6+T	37+7+T	38+6T	39+6+T	40+6+T	
IX	43+6+T	44+5+T	45+5+T	46+5+T			
XI	52+3+T	53+2+T	54+3+T	55+3+T			

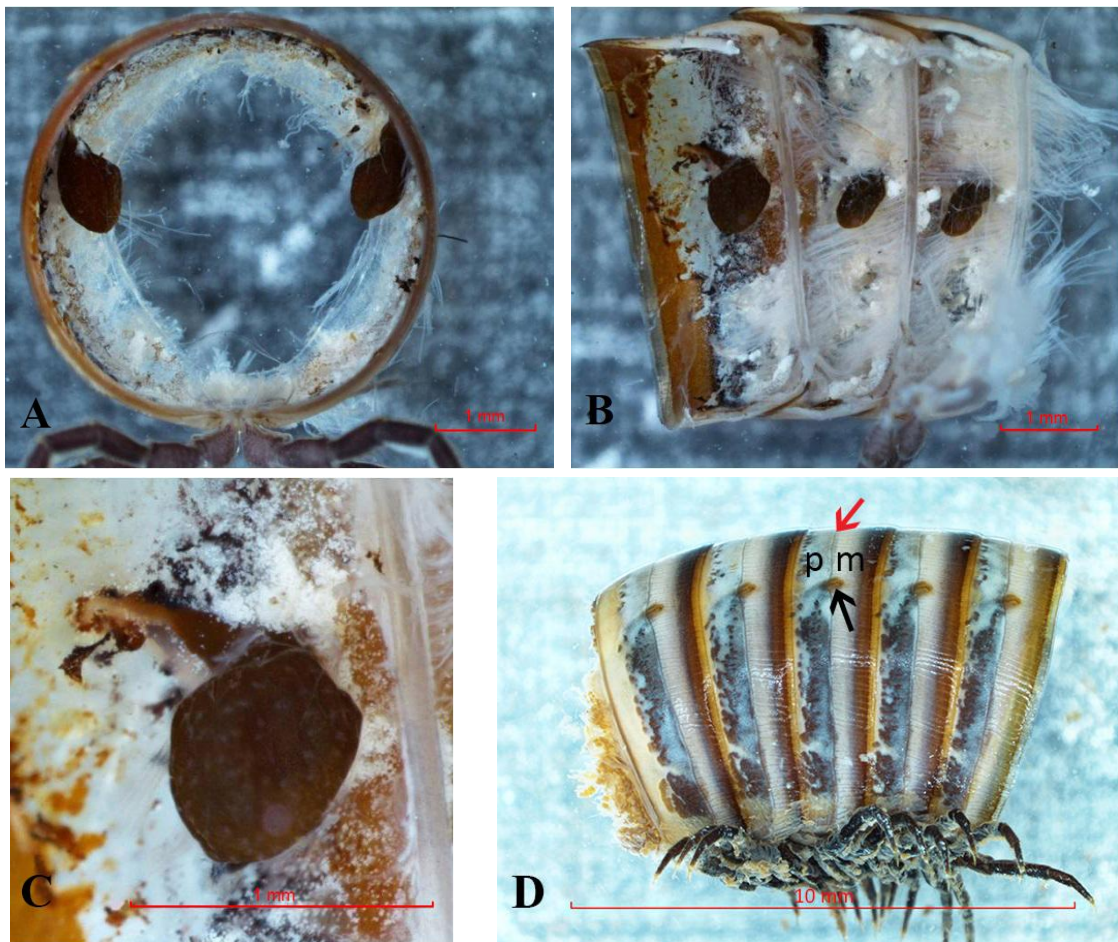
Stadijum	Segmentne formule (♂)						
VIII	37+6+T	38+5+T	38+6+T				
IX	44+5+T	44+5+T	45+5+T	46+5+T			
X	48+4+T	49+4+T	50+4+T	50+5+T			
XI	52+2+T	52+3+T	53+2+T	53+3+T	54+2+T	54+3+T	55+2+T
XII	55+1+T	57+1+T					



## 4.2. Rezultati histoloških istraživanja

### 4.2.1. Morfološke i histološke odlike odbrambenih žlezda *P. hungaricus*

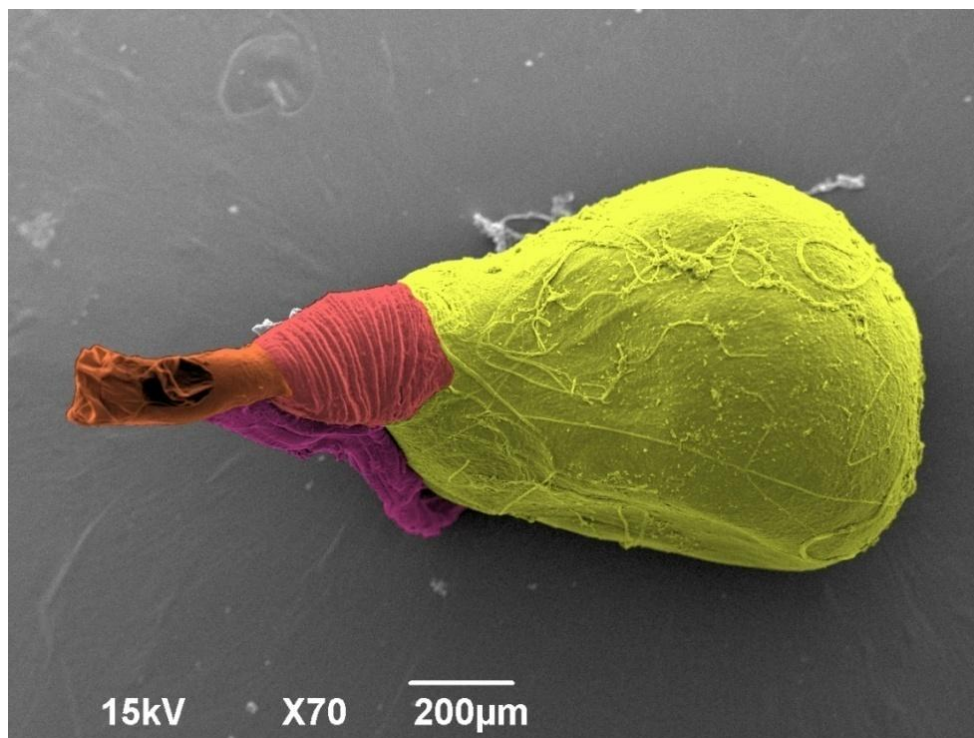
Odbrambene žlezde, okružene mišićnim vlaknima i parijetalnim masnim tkivom, otvaraju se ozoporama na metazonitima segmenta, uz suturu, ka spoljašnjoj sredini (slika 8).



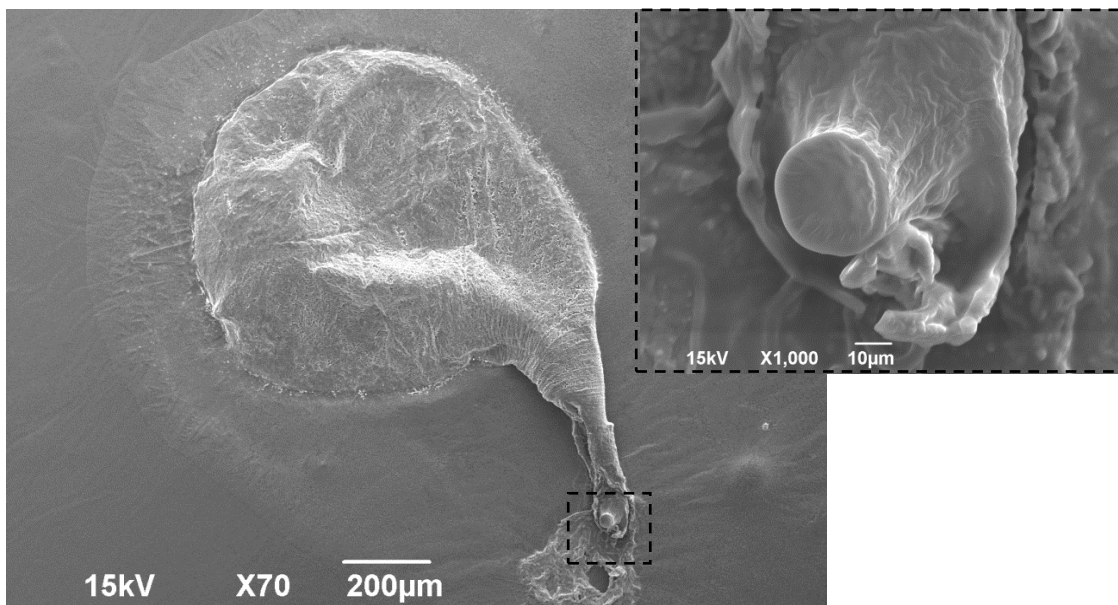
**Slika 8.** Segment sa parom odbrambenih žlezda dorzolateralnog položaja (A); uzdužni presek kroz segmente (B); odbrambena žlezda rezervoara punog sekreta (C); niz segmenata sa vidljivim ozoporama. Crvena strelica označava suturu, između prozonita (p) i metazonita (m), a crna strelica ozoporu. Skale: A-C = 1 mm, D = 10 mm.

Kod ozadena se mogu razlikovati tri morfološke celine: rezervoar (dužine ~920  $\mu\text{m}$ ), subkanalni region kutikularnih navoja (~316  $\mu\text{m}$  u opuštenom stanju) i izvodni

kanal (~388  $\mu\text{m}$ ) (slika 9). Posebna struktura koja zatvara kanal ka spoljašnjoj sredini, označena kao čep (Makarov *et al.*, 2014), vidljiva je skenirajućom elektronskom mikroskopijom, nakon tretmana žlezde mlečnom kiselinom (slika 10). Horizontalni prečnik čepa iznosi ~33  $\mu\text{m}$ .

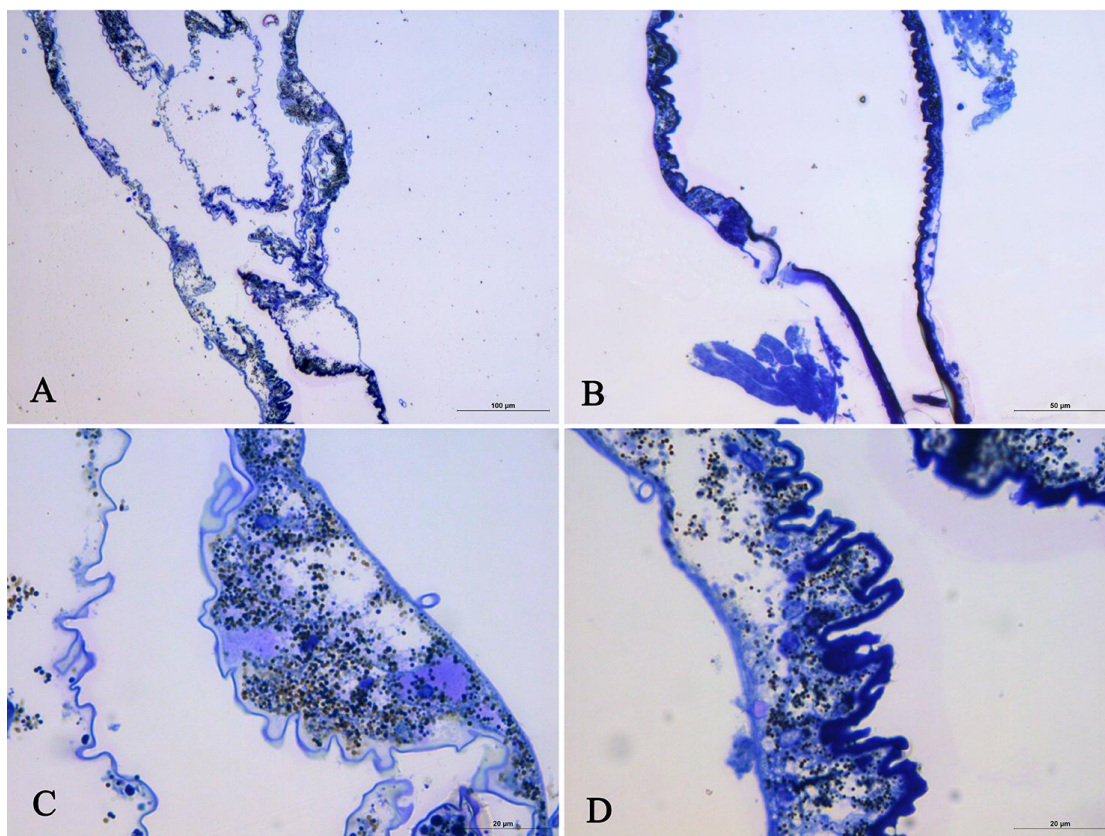


**Slika 9.** SEM ozadene sa naznačenim kanalom, subkanalnim regionom kutikularnih navoja, rezervoarom i mišićnim vlaknima koji inseriraju sa ventralne strane kanala.



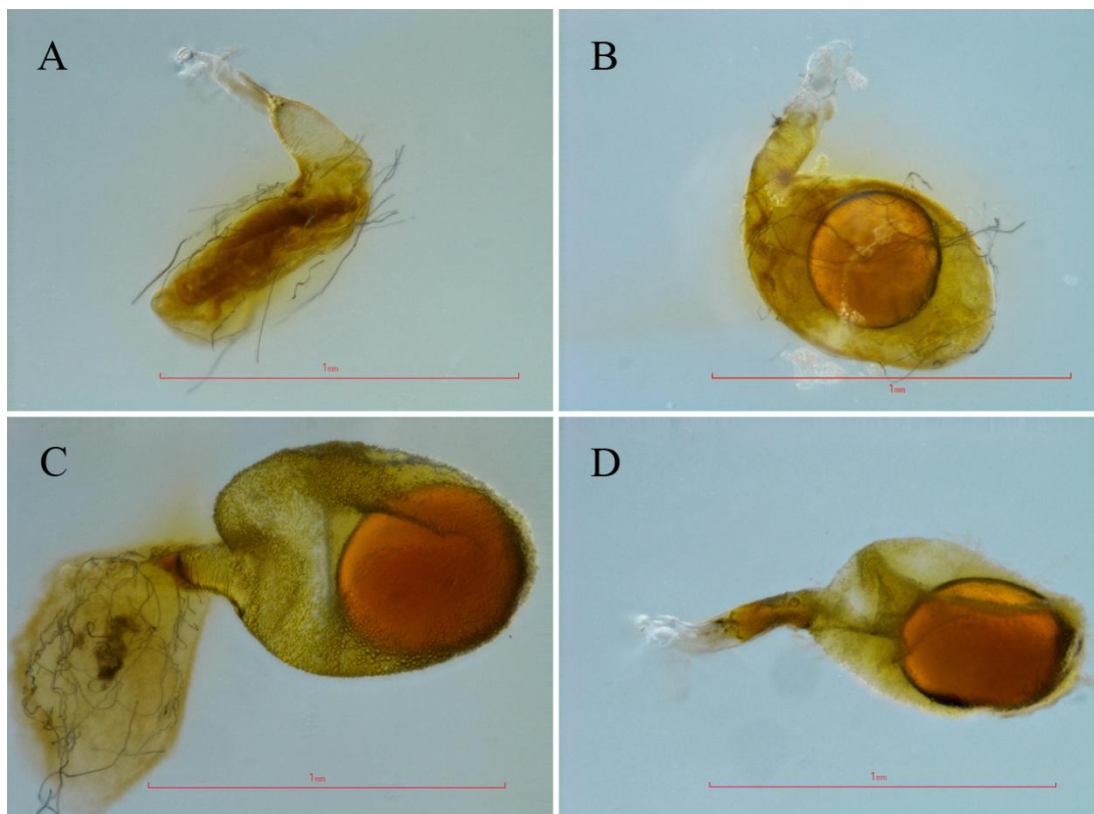
**Slika 10.** SEM odbrambene žlezde nakon imerzije u mlečnu kiselinu. Detalj: čep koji zatvara ozoporu.

Zid žlezde čine bazalna lamina, koja prekriva višćelijski sekretorni sloj, ispod koga je unutrašnji, kutikularni sloj, intima. Kutikularni sloj je najrazvijeniji uz kanal (~5 µm), zatim uz region navoja (~1.3-3.5 µm), dok se debljina intime od navoja duž rezervoara postepeno smanjuje (~1.1-0.7 µm) (slika 11A, B). U zidu rezervoara najistaknutiji je sekretorni sloj, u čijim ćelijama se nalaze mnogobrojne granule različite elektronske gustine (slika 11C). Sekretorne ćelije formiraju tanji sloj u regionu navoja u odnosu na rezervoar, a u zidu kanala ih nema. Uz bazalnu laminu nalaze se traheje, koje su na određenim mestima okružene membranom (slika 11D).

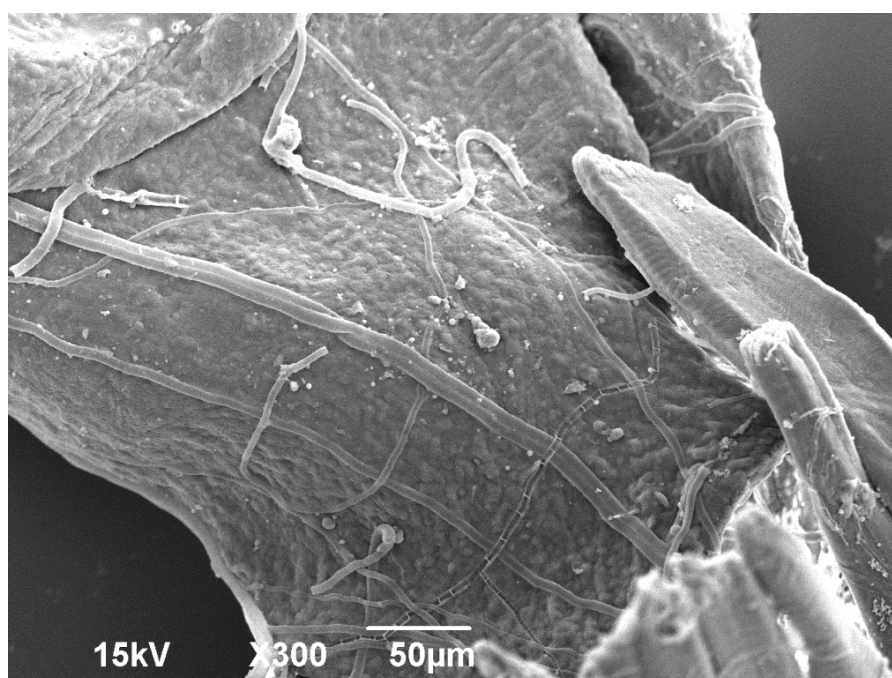


**Slika 11.** Bojenje toluidinom polutankih isečaka tkiva žlezde: uzdužni presek. Rezervoar koji se postepeno sužava u deo regiona kutikularnih navoja, x10 (A); region kutikularnih navoja od koga polazi kanal, x40 (B); deo žlezdanog sloja sa granulama različite elektronske gustine i trahejom uz bazalnu laminu, x100 (C); region kutikularnih navoja sa granulama i trahejom okruženom membranom, x100 (D).

Vizuelizacijom traheja imerzijom žlezda u mlečnu kiselinu omogućeno je jasno razlikovanje regiona koji sadrže sekretorne i pigmentne granule, odnosno regiona navoja i rezervoara od hijalinske prirode izvodnog kanala (slika 12A, B, C, D). Metodom je pokazano da je trahejni sistem dominantno razvijen upravo uz region žlezde sa sekretornom aktivnošću. Raspored traheja se može okarakterisati kao lestvičast (slika 13). Sekret je u vidu krupne, guste kapi koja zauzima distalnu polovinu rezervoara.



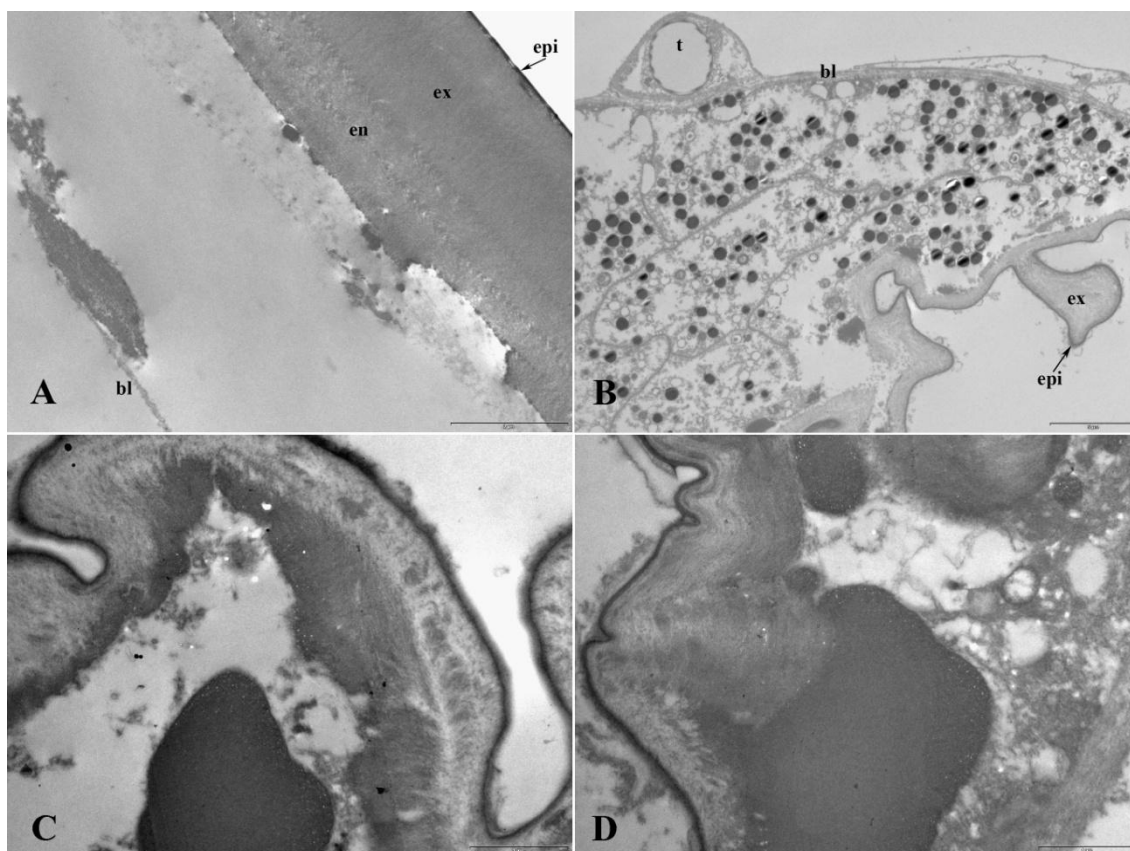
**Slika 12.** Imerzija žlezda u mlečnu kiselinu. Žlezda iz koje je izlučen sekret sa mrežom traheja uz rezervoar (A); žlezda sa sekretom u vidu kapi i trahejama uz rezervoar (B); žlezda sa sekretom i trahejama uz izdvojeni spoljašnji sloj zida rezervoara (C); žlezda sa sekretom, bez traheja (D).



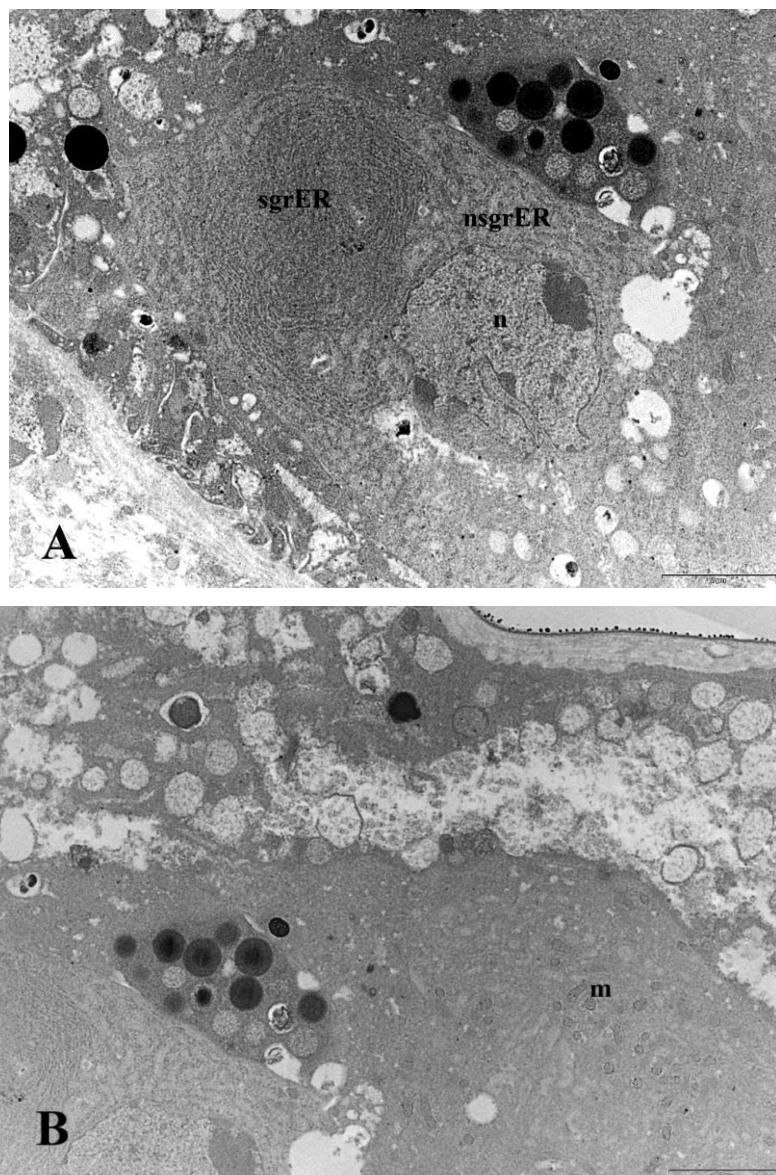
**Slika 13.** SEM ozadene sa lestvičastim rasporedom traheja i traheola uz rezervoar.

#### 4.2.2. Ultrastrukturna analiza odbrambenih žlezda *P. hungaricus*

Kutikulu izvodnog kanala čine površinska epikutikula, ispod koje se nalazi egzokutikula, kao najrazvijeniji sloj, dok se endokutikula nalazi uz bazalnu lamenu (slika 14A, B). Duž intime rezervoara mogu se primetiti osmiofilne citoplazmatske inkuzije koje se postupno sjedinjuju sa lamelama kutikule (slika 14C, D). Egzokutikula i tanak epikutikulinski sloj čini zid sabirnih kanala (slika 19D).



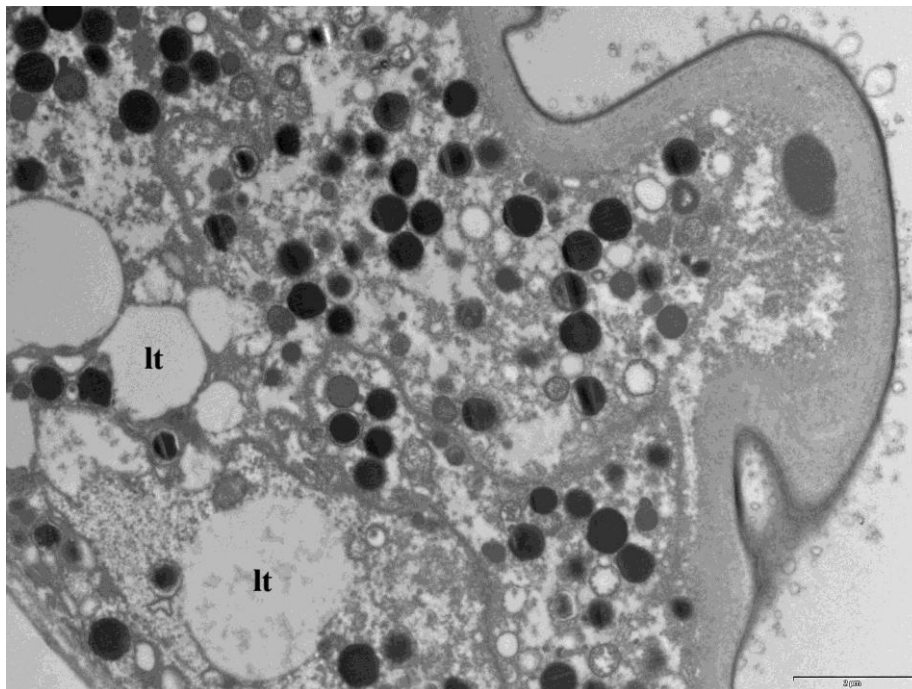
**Slika 14.** Ultratanki preseći ozadene. Izvodni kanal, na kome se razlikuju slojevi epikutikule (epi), egzokutikule (ex), endokutikule (en) i bazalne lamine (bl), x10000 (A); žlezdani region, sa mnogobrojnim granulama unutar ćelija, prekriven egzokutikulom (ex) i epikutikula (epi) sa unutrašnje strane, ka lumenu, x3000 (B); detalj: ugrađivanje vlakana, koja potiču od osmiofilnih citoplazmatskih inkluzija, u kutikulu rezervoara, x17000 (C, D). Skale: A = 2  $\mu$ m, B = 5  $\mu$ m, C, D = 1  $\mu$ m.



**Slika 15.** Čelija sekretornog sloja rezervoara sa jasno vidljivim nukleusom (n), sintetskim i nesintetskim granulisanim endoplazminim retikulumom (sgrER, nsgrER), iznad koga se nalazi grupacija granula, i mitohondrijama (m), x7100 (A, B). Skale: A, B = 2  $\mu$ m.

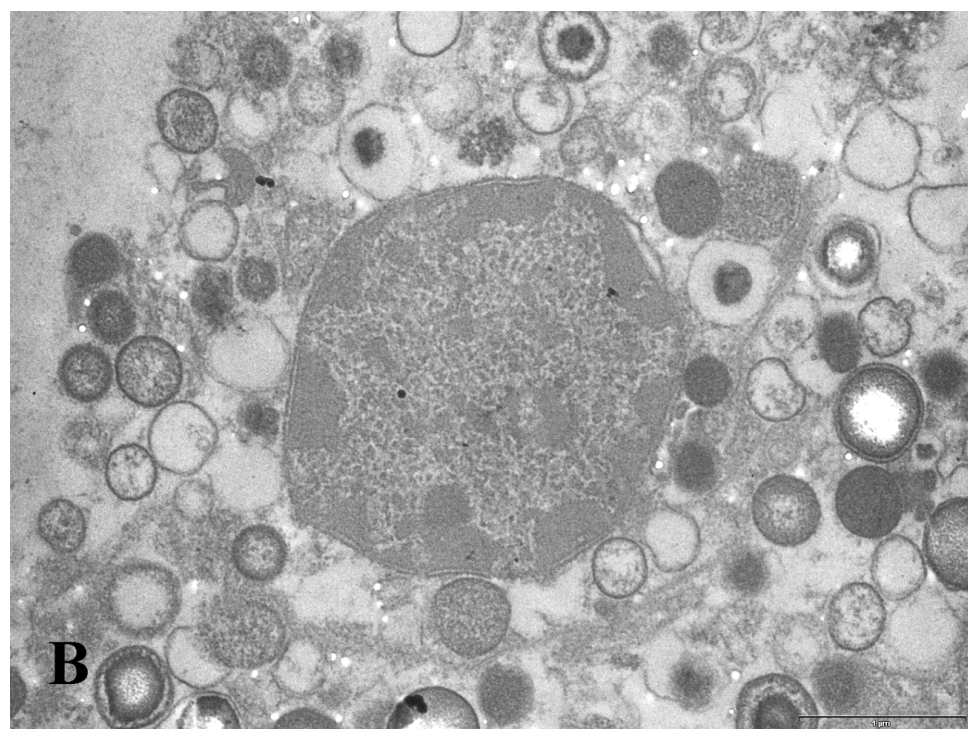
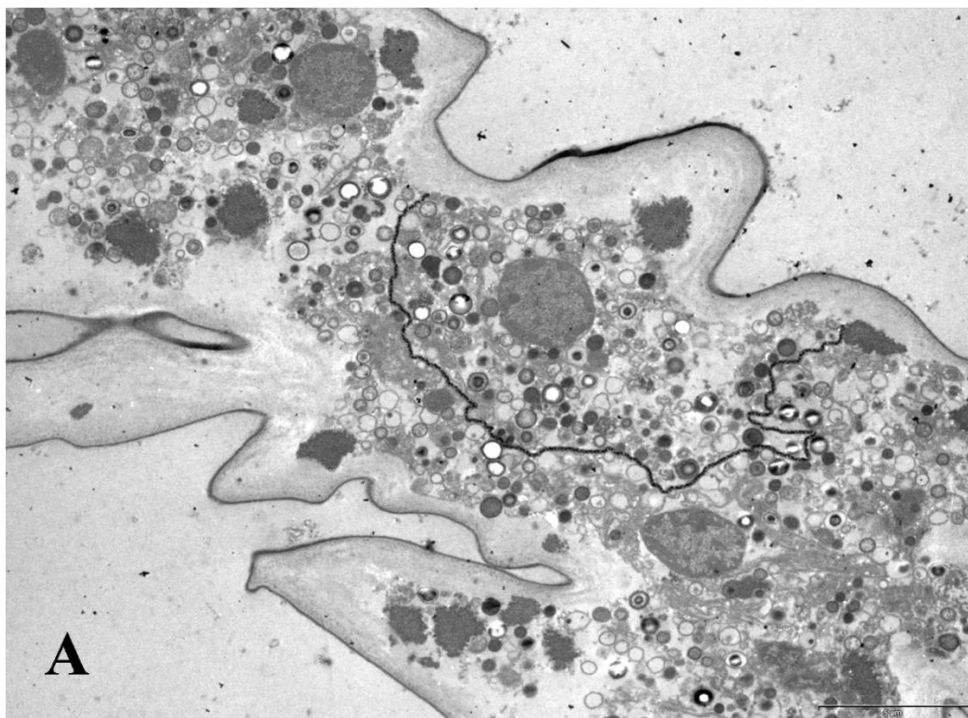
U citoplazmi ćelija sekretornog sloja uočava se nukleus sa heterohromatinom i euhromatinom, sintetski i nesintetski granulisani endoplazmin retikulum, mitohondrije koje mogu biti okruglastog oblika ili izdužene, veliki broj pigmentnih i sekretornih granula (slika 15A, B) i lipidna tela (slika 16). Morfološki, granule se međusobno razlikuju na osnovu elektronske gustine, više ili manje pravilnog okruglastog oblika, prisustva jedne ili dve membrane, prisustva ili odsustva centralnog jezgra (slika 17A,

B). Pretpostavlja se da zapaženi tipovi granula predstavljaju stupnjeve kroz koje sekret postepeno sazreva (tabela 4).



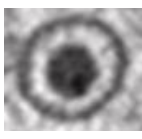
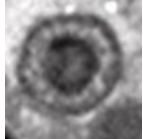
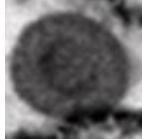
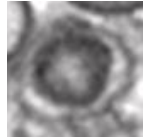
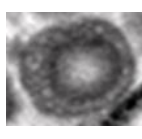
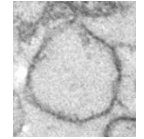
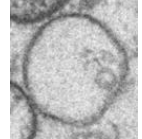
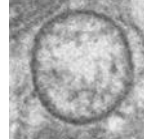
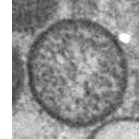
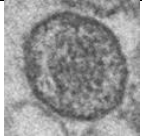
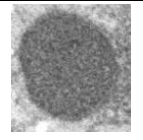
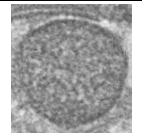
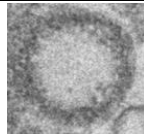
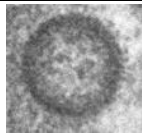
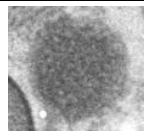
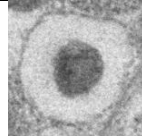
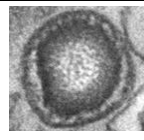

**Slika 16.** Lipidna tela (lt) i mnogobrojne granule ćelija sekretornog sloja rezervoara, x6300 (C). Skala = 2  $\mu\text{m}$ .

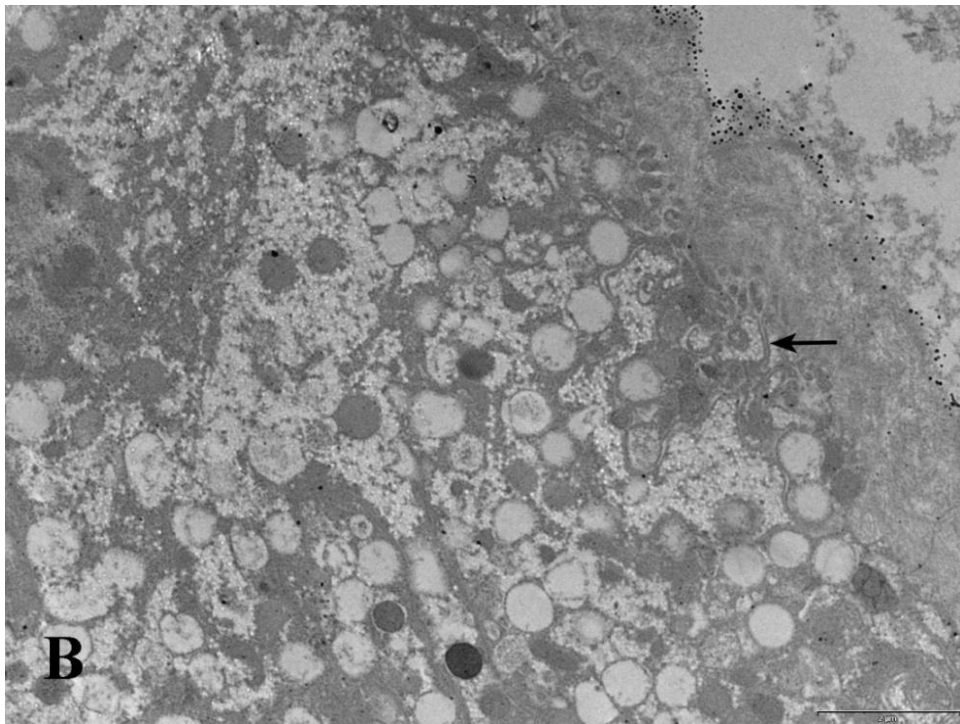
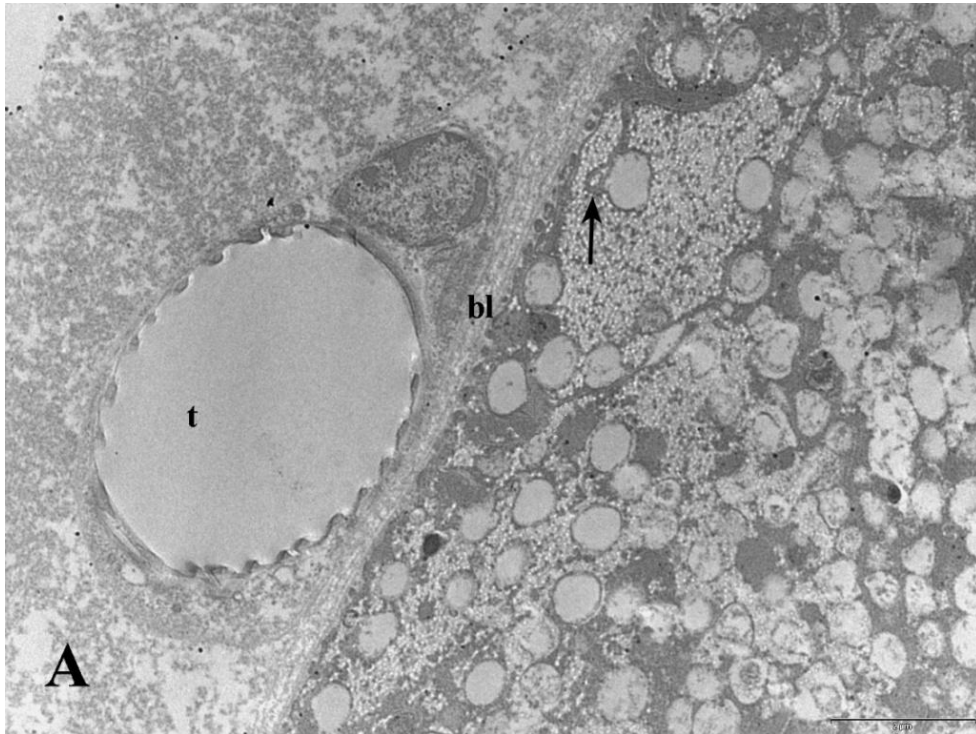




**Slika 17.** Sekretorne ćelije žlezdanog sloja rezervoara sa mnogobrojnim sekretornim i pigmentnim granulama. Membrana sekretorne ćelije istaknuta crnom bojom, x3800 (A). Detalj: nukleus okružen granulama različitog tipa, x17000 (B). Skale: A = 5  $\mu\text{m}$ , B = 1  $\mu\text{m}$ .

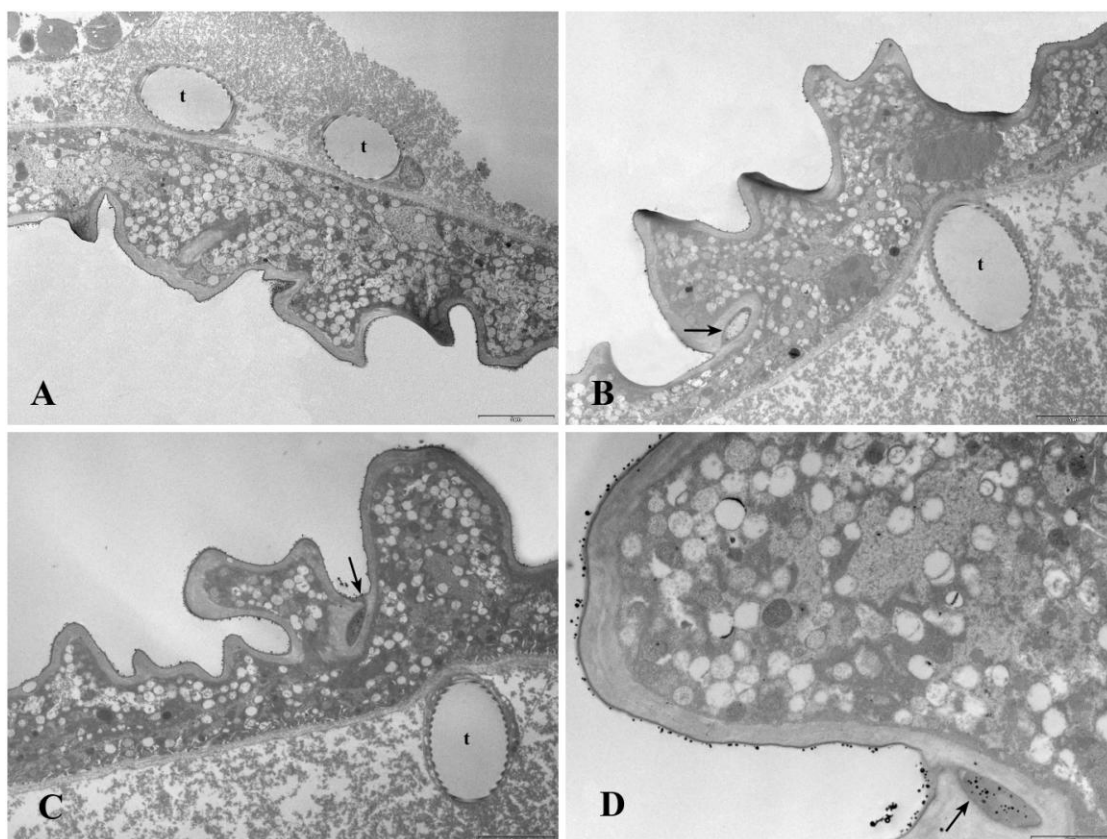
**Tabela 4.** Tipovi granula sekretornih ćelija ozadena vrste *P. hungaricus*.

Tip granule									
Procentualna zastupljenost u ćeliji (%)	~1.20	~2.41	~1.20	~2.41	~1.20	~10.84	~6.02	~7.23	~8.43
Površina granule ( $\mu\text{m}^2$ )	0.244	0.209-0.335	0.334	0.249-0.303	0.442	0.156-0.344	0.146-0.233	0.127-0.216	0.106-0.321
Prečnik granule ( $\mu\text{m}$ )	0.563	0.517-0.662	0.662	0.585-0.653	0.763	0.449-0.653	0.436-0.535	0.360-0.544	0.399-0.690
Tip granule									
Procentualna zastupljenost u ćeliji	~2.41	~14.46	~3.61	~1.20	~7.23	~21.69	~4.82	~3.61	
Površina granule ( $\mu\text{m}^2$ )	0.168	0.101-0.299	0.212-0.310	0.220	0.071-0.225	0.074-0.151	0.201-0.380	0.316-0.396	
Prečnik granule ( $\mu\text{m}$ )	0.436-0.481	0.354-0.635	0.418-0.662	0.535	0.318-0.572	0.236-0.436	0.508-0.714	0.662-0.735	



**Slika 18.** Sekretorne ćelije, sa spoljašnje strane okružene bazalnom laminom (bl) uz koju se nalazi traheja (t), ispunjene granulama i tubulama (strelica), x7100 (A, B). Skale: A, B = 2  $\mu$ m.

Prevažodno u bazalnom delu sekretornih ćelija, između granula, primećuju se sitni kanali, tubule (slika 18A, B). Od jedne sekretorne ćelije može polaziti mnogo tubula kojima se sekret doprema u veće, sabirne kanale (slika 19 A, B, C, D). Sekret dospeva u lumen žlezde izlučivanjem iz sabirnih kanala, a zatim kroz izvodni kanal u spoljašnju sredinu.

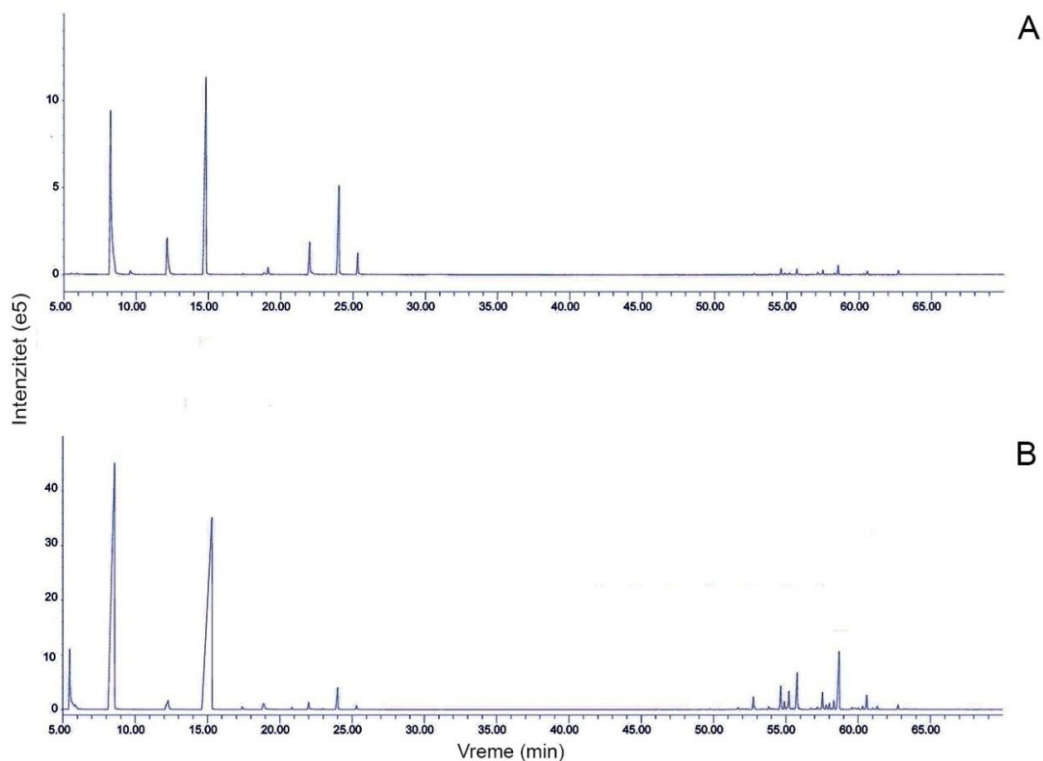


**Slika 19.** Sekretorni sloj, sa trahejama (t) sa spoljašnje strane i tamnim globulama koje predstavljaju izlučen sekret ka lumenu žlezde (A, B, C). Sabirni kanal označen je strelicom, x2650 (B, C, D); Detalj: sabirni kanal ispunjen sekretom (strelica), x7100 (D). Skale: A, B, C = 5  $\mu\text{m}$ , D = 2  $\mu\text{m}$ .

### 4.3. Rezultati semiohemijskih istraživanja

#### 4.3.1. Identifikacija jedinjenja odbrambenog sekreta

Na osnovu GC-FID profila ekstrakta odbrambenog sekreta vrste *P. hungaricus* (slika 20), ukupno je detektovano 44 jedinjenja (tabela 5), koja mogu da se grupišu u: hinone (jedinjenja **1-12**) (slika 21) i pentil i heksil estre zasićenih i nezasićenih masnih kiselina dugog niza (jedinjenja C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub>) (**13-44**) (slika 22). Neidentifikovano je pet hinonskih jedinjenja (**7, 24, 28, 42 i 44**), koja čine 2% sekreta mužjaka i 1.1% sekreta ženki. Relativni udeo hinona kod mužjaka iznosi 94.7%, a estara 5.3%, dok, kod ženki, hinoni čine 87.3%, a estri 12.7% sekreta. Dominantna jedinjenja su 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon) (**2**), sa relativnim udelom od 30.2% kod mužjaka, i 36.8% kod ženki; i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**), sa 36.3% kod mužjaka i 43.1% kod ženki. Preostala jedinjenja hinonske grupe, sem 2-metil-3,4-metilen-dioksifenola (**11**), čiji je udeo 13.4% kod mužjaka, prisutna su u značajno manjem procentu. Upravo relativna zastupljenost jedinjenja **11** predstavlja najistaknutiju kvantitativnu razliku u sastavu sekreta na nivou pola kod *P. hungaricus*, s obzirom da kod ženki čini samo 1.2%, naspram 13.4% kod mužjaka. Druge kvantitativne razlike odnose se na veću zastupljenost *p*-benzohinona (**1**) kod ženki u odnosu na mužjake (4% naspram 0.1%), dok su kod mužjaka u odnosu na ženke zastupljeniji 2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon (**3**) (6.5% naspram 0.9%) i 2-metil-hidrohinon (**9**) (4.6% naspram 0.4%). Razlike u sastavu sekreta na nivou polova ogledaju se u prisustvu neidentifikovanog jedinjenja **7** samo kod mužjaka, dok je 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon (**8**), prisutan samo kod ženki. Jedinjenje 2,3-dimetoksi-1,4-hidrohinon (**10**), prekursor hinona 2,3-dimetoksi-1,4-benzohinona (**8**), zastupljen je sa <0.1%, što se označava kao trag. Pored jedinjenja **12** i **6**, prisutni su i 1,4-benzohinon (**1**), 2-metil-hidrohinon (**9**), prekursor 2-metil-1,4-benzohinona (**2**), i 2-metoksi-1,4-benzohinon (**5**).



**Slika 20.** GC-FID profili odbrambenog sekreta mužjaka (A) i ženki (B) *P. hungaricus* (Karsch, 1881) (Stanković *et al.*, 2016).

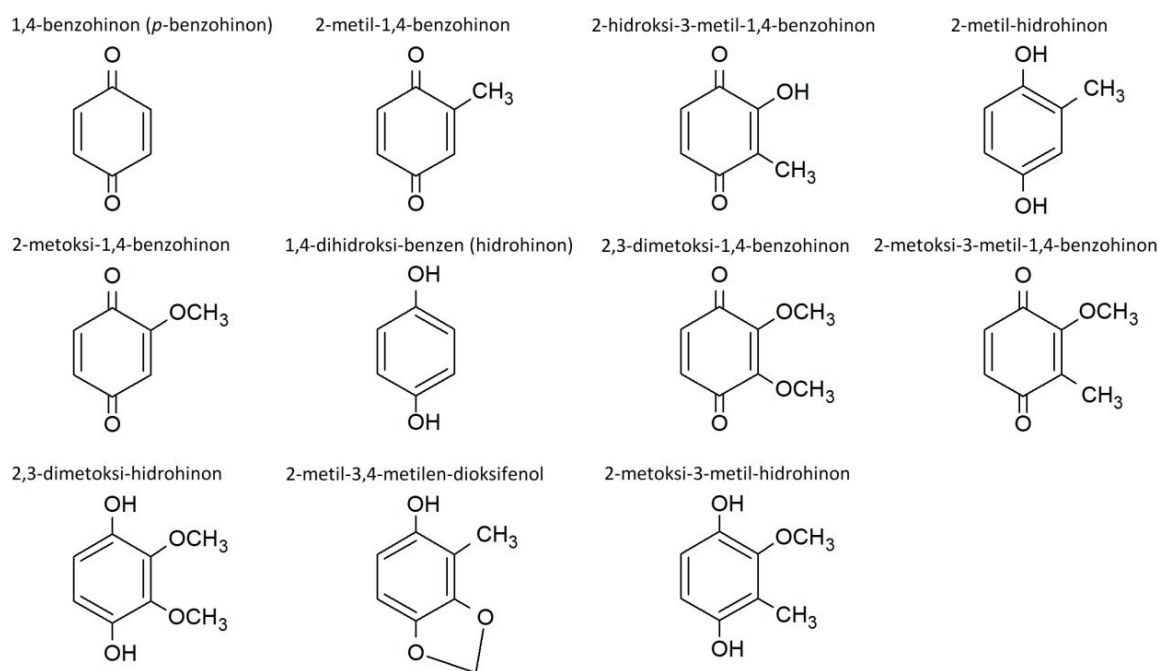
**Tabela 5.** Hemijski profil odbrambenog sekreta vrste *P. hungaricus* (Karsch,1881) (Stanković *et al.*, 2016).

Redni broj	Jedinjenja	Retenciono vreme (min)	Retencioni indeks	Mužjaci (%)	Ženke (%)
1	1,4-benzohinon ( <i>p</i> -benzohinon)	5.47	920	0.1	4.0
2	2-metil-1,4-benzohinon	8.58	1025	30.2	36.8
3	2-hidroksi-3-metil-1,4-benzohinon	12.28	1123	6.5	0.9
4	2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon	15.31	1193	36.3	43.1
5	2-metoksi-1,4-benzohinon	17.41	1240	0.1	0.1
6	1,4-dihidroksi-benzen (hidrohinon)	18.87	1273	0.3	0.5
7	Neidentifikovano jedinjenje	19.12	1280	0.9	-
8	2,3-dimetoksi-1,4-benzohinon	20.84	1318	-	0.1

9	2-metil-hidrohinon	22.00	1345	4.6	0.4
10	2,3- dimetoksi-hidrohinon	23.00	1368	trag	trag
11	2-metil-3,4-metilen-dioksifenol	24.01	1389	13.4	1.2
12	2-metoksi-3-metil-hidrohinon	25.31	1420	2.3	0.2
13	Pentil tetradekanoat	49.75	2087	trag	trag
14	Heksil tetradekanoat <sup>a</sup>	51.59	2149	trag	trag
15	Pentil pentadekanoat <sup>b</sup>	51.70	2153	trag	0.1
16	Pentil pentadekanoat <sup>b</sup>	51.96	2162	trag	trag
17	Heksil pentadekanoat	52.07	2165	trag	trag
18	Heksil tetradekanoat <sup>a</sup>	52.75	2187	0.1	0.6
19	Pentil pentadekanoat <sup>b</sup>	52.83	2191	trag	0.1
20	Heksil pentadekanoat <sup>c</sup>	53.82	2223	0.1	0.1
21	Heksil pentadekanoat <sup>c</sup>	54.65	2251	0.6	1.2
22	Heksil pentadekanoat <sup>c</sup>	54.90	2260	0.2	0.3
23	Heksil pentadekanoat <sup>c</sup>	55.09	2266	trag	0.1
24	Neidentifikovano jedinjenje	55.21	2270	0.2	0.8
25	Heksil pentadekanoat <sup>c</sup>	55.78	2289	0.6	2.1
26	Heksil heksadekanoat <sup>d</sup>	55.95	2294	0.1	0.1
27	Heksil heksadecenoat <sup>e</sup>	56.71	2320	0.1	0.1
28	Neidentifikovano jedinjenje	57.18	2336	0.3	0.1
29	Heksil heksadekanoat <sup>d</sup>	57.54	2348	0.5	0.8
30	Heksil heksadekanoat <sup>d</sup>	57.78	2356	0.1	0.2
31	Heksil heksadecenoat <sup>e</sup>	58.01	2363	trag	0.3
32	Heksil heksadecenoat <sup>e</sup>	58.32	2374	0.2	0.4
33	Heksil heksadekanoat <sup>d</sup>	58.69	2386	1.0	3.9
34	Heksil heptadekanoat <sup>f</sup>	59.52	2418	trag	trag
35	Heksil heptadekanoat <sup>f</sup>	59.59	2418	trag	0.1
36	Heksil heptadecenoat <sup>g</sup>	59.79	2426	trag	trag
37	Heksil heptadecenoat <sup>g</sup>	60.02	2434	trag	0.1
38	Heksil heptadekanoat <sup>f</sup>	60.31	2445	0.1	0.1
39	Heksil heptadekanoat <sup>f</sup>	60.60	2456	0.4	0.7
40	Heksil heptadekanoat <sup>f</sup>	61.01	2472	trag	trag

41	Heksil heptadekanoat <sup>f</sup>	61.32	2482	trag	0.1
42	Neidentifikovano jedinjenje	62.77	2534	0.5	0.2
43	Heksil oktadekanoat jedinjenje	63.96	2582	trag	trag
44	Neidentifikovano	66.85	2685	0.1	trag
<b>Σ</b>				98	98.9

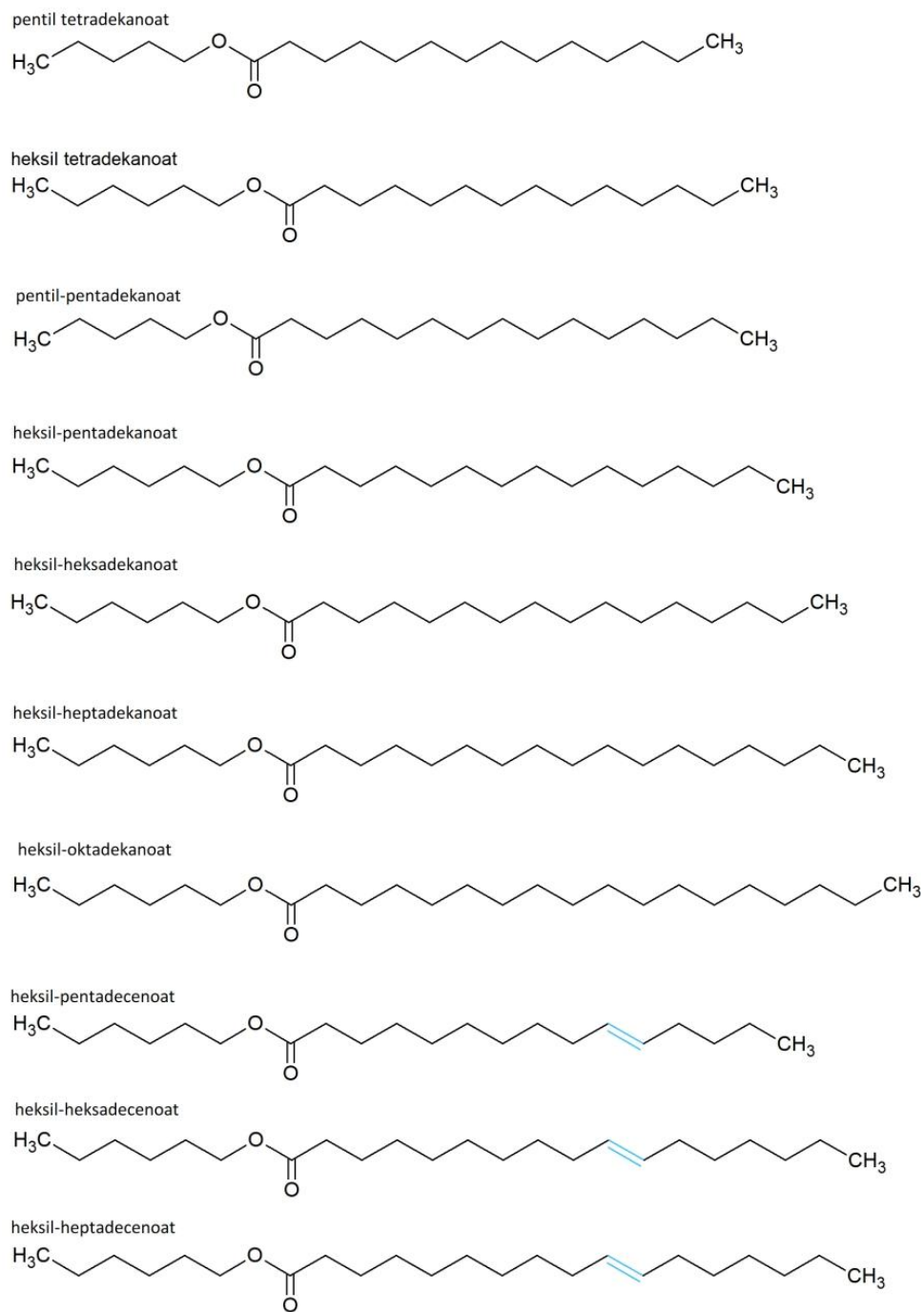
<sup>a</sup> Izomer heksil tetradekanoata, <sup>b</sup> Izomer pentil pentadekanoata, <sup>c</sup> Izomer heksil pentadekanoata, <sup>d</sup> Izomer heksil heksadekanoata, <sup>e</sup> Izomer heksil heksadecenoata, <sup>f</sup> Izomer heksil heptadekanoata, <sup>g</sup> Izomer heksil heptadecenoata.



**Slika 21.** Strukturne formule identifikovanih hinonskih jedinjenja u odbrambenom sekretu vrste *P. hungaricus* (Karsch, 1881).

Pored hinona, detektovan je i veliki broj estara, koji čine 5,3% sekreta kod mužjaka i 12,7% kod ženki. Mnogi od njih su prisutni samo u tragovima (tabela 1). Da bi se utvrdilo da li ova jedinjenja zaista ulaze u sastav sekreta ili su kutikularnog porekla, analiziran je metilen hloridni ekstrakt, dobijen ispiranjem disekovanog prednjeg deo tela sa segmentima u kojima se ne nalaze žlezde, pri čemu nisu detektovani estri. Identifikacija estara je izvedena do nivoa izomera. Sva jedinjenja su izomeri 10 različitih estara (slika 22).





**Slika 22.** Strukturne formule identifikovanih estara u odbrambenom sekretu vrste *P. hungaricus* (Karsch, 1881).

#### 4.3.2. Određivanje antimikrobne aktivnosti difuzionim testom u bunarićima

Antimikrobni potencijal ekstrakta sekreta vrste *P. hungaricus* procenjen je na osnovu inhibitorne zone formirane dejstvom na određene humane oportunističke patogene, Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije, zatim na biljni patogen, *Xanthomonas arboricola*, i na *Bacillus subtilis*, tradicionalni model sistem Gram-pozitivnih bakterija (Borriss *et al.*, 2018). Ekstrakt se pokazao kao potentni antimikrobni agens u odnosu na sve testirane mikroorganizme (tabela 8). Najveća inhibitorna zona, prečnika 25 mm, nastala je delovanjem ekstrakta na Gram-pozitivne bakterije *S. aureus* i *B. subtilis*. Nešto manja zona, prečnika 19 mm, formirana je dejstvom na MRSA i *E. coli*. Najotporniji soj je bio *Pseudomonas aeruginosa*, sa najmanjom zonom inhibicije od 10 mm.

#### 4.3.3. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBC)

Da bi se utvrdile minimalna inhibitorna (MIC) i minimalna baktericidna koncentracija (MBC) odbrambenog sekreta, primenjen je bujon mikrodilucioni metod. Najniža koncentracija, odnosno najveće razblaženje ekstrakta, koja je dovela do vidljivog bakterijskog rasta na čvrstom medijumu, ali nije dovela do promene boje u odabranim bunarićima, definisana je kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Minimalna baktericidna koncentracija je koncentracija ekstrakta koja je dovela do smrti ispitivanih bakterijskih sojeva (MBC). Metanol, rastvarač korišćen kao negativna kontrola, nije imao inhibitorno dejstvo na testirane sojeve. Iako spektrometrijsko očitavanje na specifičnim talasnim dužinama predstavlja objektivniji metod koji je jednostavnije kvantifikovati, ovde je korišćena resazurinska reakcija, s obzirom na intenzivnu obojenost ekstrakta i nemogućnost da se dobiju tačna očitavanja. Resazurinska reakcija predstavlja stopu redukcije resazurina i vidljive konverzije ljubičaste u ružičastu boju, što je direktno proporcionalno koncentraciji živih ćelija u suspenziji (Vega-Avila & Pugsley, 2011)

**Tabela 6.** Antibakterijska aktivnost ekstrakta odbrambenog sekreta vrste *P. hungaricus* (Karsch, 1881) (Stanković *et al.*, 2016).

Vrsta	ATTC broj	Tip	Zona inhibicije (mm) <sup>b</sup>	MIC (mg/ml)	MBC (mg/ml)	MIC rifampicina (mg/ml)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	49140	G-	16	0,20	0.40	0.10
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> <sup>c</sup>	15442	G-	10	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	25922	G-	19	0.60	1.00	0.20
<i>Xanthomonas arboricola</i>	IZB 301 <sup>a</sup>	G-	14	0.40	0.60	0.20
<i>Listeria monocytogenes</i> 1/2a	19111	G+	16	0.20	0.40	0.40
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	G+	25	0.40	0.60	0.20
Meticilin rezistentni						
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	33591	G+	19	0.25	0.50	0.12
<i>Bacillus subtilis</i>	6633	G+	25	0.60	1.00	0.08

<sup>a</sup> Soj *X. arboricola* izolovan iz ploda oraha.

<sup>b</sup> Srednje vrednosti tri eksperimenta, izražene kroz prečnik inhibicione zone u mm, uključujući i prečnik bunarića (5 mm).

Rezultati ukazuju da se testirane bakterije razlikuju u svojoj osetljivosti na dejstvo ekstrakta (tabela 6). Najniža delotvorna inhibitorna koncentracija je 0,20 mg/mL protiv *Aeromonas hydrophila* i *Listeria monocytogenes*. Podložnost MRSA je zabeležena na nešto višim koncentracijama od 0,25 mg/mL. Najviša baktericidna koncentracija iznosi 1 mg/mL. Ekstrakt testirane vrste nije bio efikasniji u inhibiranju rasta patogenih bakterija u poređenju sa komercijalnim antibiotikom rifampicinom. Da bi se postiglo dejstvo antibiotika, upotrebljene su koncentracije ekstrakta jedan do dva puta više u odnosu na koncentracije antibiotika. Za inhibiciju rasta *Bacillus subtilis* bila je neophodna više od sedam puta viša koncentracija ekstrakta u odnosu na koncentraciju antibiotika. Jedino su MIC vrednosti ekstrakta za inhibiciju soja *L. monocytogenes* bile dva puta niže u odnosu na MIC vrednosti antibiotika. MIC vrednosti za Gram-negativne bakterije su bile nešto više u poređenju sa istim vrednostima za Gram-pozitivne bakterije, osim u slučaju *A. hydrophila*.

#### 4.3.4. Određivanje minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) i minimalnih fungicidnih koncentracija (MFC)

Dobijenim rezultatima je pokazano da odbrambeni sekret vrste *P. hungaricus* ispoljava jak antifungalni potencijal. Rast fitopatogenih gljiva je inhibiran niskim koncentracijama, u sličnom opsegu za sve testirane gljive. Vrednosti minimalnih inhibitornih koncentracija (MIC) su u opsegu od 0.10 do iznad 0.35 mg/mL, mada je bila dovoljna koncentracija od približno 0.2 mg/mL da bi se inhibirao rast gljiva (tabela 7).

**Tabela 7.** Antifungalna aktivnost odbrambenog sekreta vrste *P. hungaricus* (Karsch, 1881) (Stanković *et al.*, 2016).

Vrsta	MIC (mg/ml)	MFC (mg/ml)	MIC flukonazola (mg/ml)
<i>Aspergillus flavus</i>	>0.35	>0.35	1.00
<i>Aspergillus niger</i>	0.20	0.25	1.80
<i>Fusarium subglutinans</i>	0.23	0.25	1.60
<i>Fusarium semitectum</i>	0.20	0.23	1.60
<i>Fusarium equiseti</i>	0.10	0.13	1.00
<i>Penicillium sp.</i>	0.28	0.28	1.80
<i>Glocladium roseum</i>	0.13	0.13	2.00

Inhibicija rasta soja *Fusarium equiseti* je zahtevala najnižu koncentraciju, od 0.10 mg/mL, dok koncentracija od 0.35 mg/mL nije bila dovoljna za potpunu inhibiciju rasta soja *Aspergillus flavus*. Toleranciju prema ekstraktu ispoljio je i *Penicillium sp.*, na koga je morala biti primenjena koncentracija od 0.28 mg/mL da bi došlo do inhibicije rasta. Vrednosti minimalnih fungicidnih koncentracija (MFC) su bile ili iste ili blago povišene u odnosu na dobijene MIC vrednosti. Opseg MFC koncentracija je bio između 0.13 mg/mL za *F. equiseti* do iznad 0.35 mg/mL za *A. flavus*. Može da se zaključi, na osnovu dobijenih rezultata, da su gljive bile osetljivije na ispitivani ekstrakt u odnosu na bakterije, na koje bi trebalo primeniti više koncentracije (0.20-0.60 mg/mL) da bi se postigla inhibicija rasta. U poređenju sa flukonazolom, testirani ekstrakt je bio delotvorniji u inhibiranju rasta

patogenih gljiva, jer su koncentracije kojim se inhibitorni efekat postigao bile oko 10 puta niže, u odnosu na inhibitorne koncentracije leka.

#### 4.4. Rezultati etoloških istraživanja

##### 4.4.1. Ponašanje tokom parenja vrste *P. hungaricus*

###### 4.4.1.1. Arena za parenje

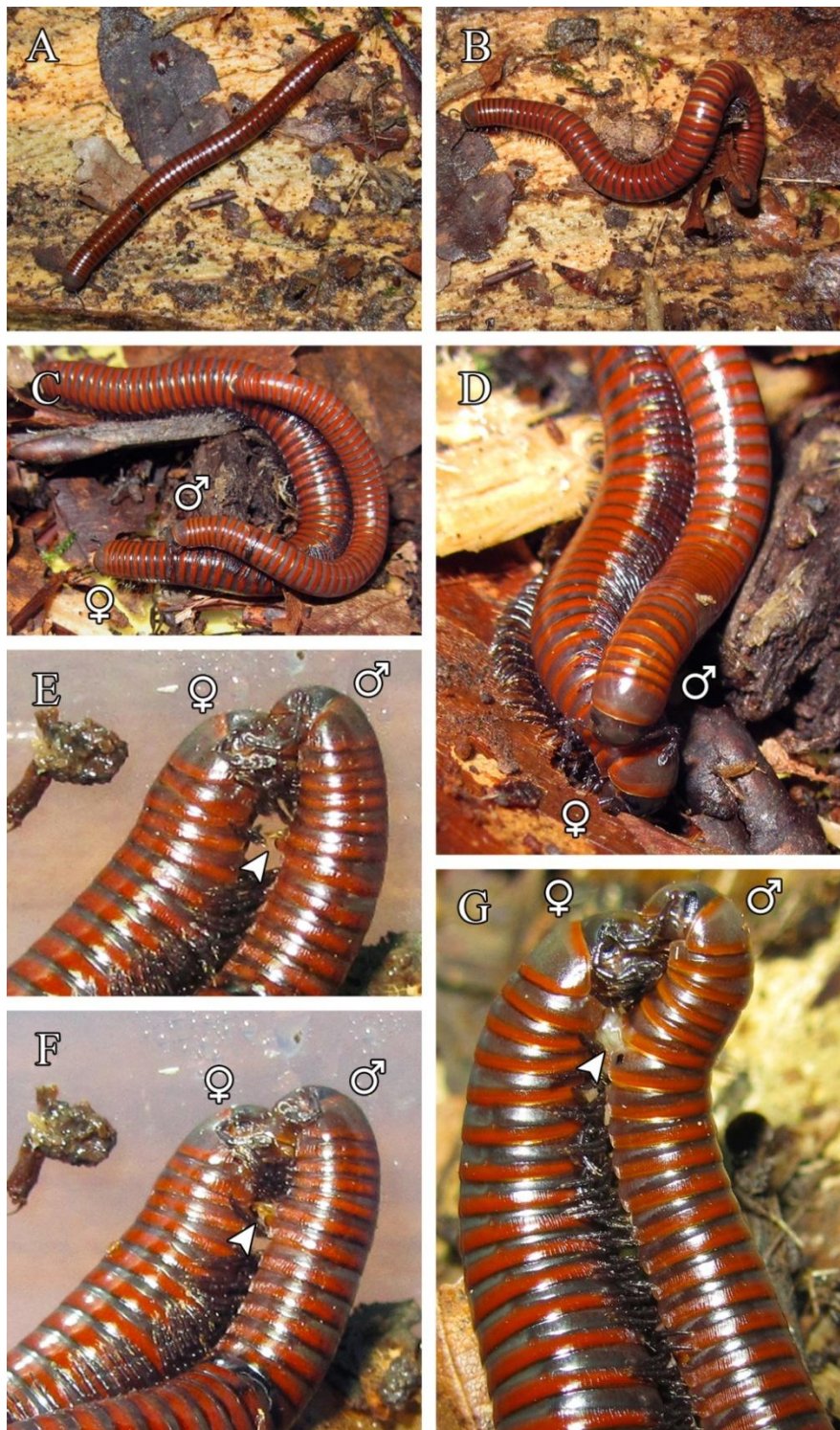
U testu označenom kao „arena za parenje“, 47% kontakata ostvarenih između mužjaka i ženki je rezultiralo kopulacijom, dok 53% kontakata nije dovelo do kopulacije. Deskriptivna statistika posmatranih ponašajnih sekvenci (ML, DC, CC, ECC, ECWC i CWC) je prikazana u tabeli 8. Sekvenca ponašanja koja je najduže trajala je dužina kopulacije (DC), sa minimalnom vrednošću od 3 minuta i maksimalnom od približno 220 minuta. Kontakti koji su rezultirali kopulacijom (CC) su trajali nešto duže u odnosu na kontakte koji se nisu završili kopulacijom (CWC). Prosečno vreme od stavljanja jedinki u kutiju sa steljom do kontakta koji je rezultirao kopulacijom (ECC) nije se značajno razlikovalo od prosečnog vremena od stavljanja jedinki u kutiju sa steljom do kontakta koji nije doveo do kopulacije (ECWC). Od ulaska u „arenu za parenje“ do početka kopulacije (ML) u proseku je proteklo 10 minuta. Najveći broj parenja je registrovan u periodu između 10:00 i 12:00 h (21 kopulacija) i između 14:00 i 16:00 h (10 kopulacija). Pri tom, mužjaci su bili aktivniji pol u potrazi za partnerom za parenje, dok su ženke bile „izbirljiviji“ pol.

Na slikama 23A-G prikazane su sekvence reproduktivnog ponašanja *P. hungaricus* zabeležene tokom testiranja. Mužjak uporno dodiruje antenama dorzalnu stranu ženke, dok se kreće od zadnjeg dela njenog tela ka glavenom regionu. Nakon što dođe do glave, mužjak savija prednji deo svog tela i postavlja se ispod ženke tako da su ventralne strane njihovih tela jedna uz drugu, što se postiže samo ukoliko je ženka receptivna i ukoliko ne savije prednji deo svog tela tako da mužjaku onemogući pristup vulvama. Kada se postigne odgovarajući položaj, mužjak izvlači gonopode, a ženka vulve, i dolazi do njihovog

spajanja. Par u kopulaciji može da zauzme različite pozicije, paralelnu (slika 24A, B), ili se mužjak u različitom stepenu obavija oko ženke (slika 24C).

**Tabela 8.** Deskriptivna statistika ponašajnih sekvenci (merenih u sekundama). Skraćenice: ML - latenca , DC - trajanje kopulacije, CC- vreme od uspostavljanja kontakta između jedinki do početka kopulacije, ECC - vreme od stavljanja jedinki u kutije do uspostavljanja kontakta koji će rezultirati kopulacijom, ECWC - vreme od stavljanja jedinki u kutiju do uspostavljanja kontakta koji nije rezultirao kopulacijom, CWC - trajanje kontakta između jedinki različitog pola koji nije rezultirao kopulacijom, Std. dev. - standardna devijacija (Jovanović *et al.*, 2017).

<b>Osobine ponašanja (s)</b>	<b>N</b>	<b>Min.</b>	<b>Max.</b>	<b>Medijana</b>	<b>Varijansa</b>	<b>Std. dev.</b>
<b>ML</b>	42	180.0	2640.0	600.0	296649	544.6
<b>DC</b>	42	180.0	13270.0	3215.0	5296711	2301.4
<b>CC</b>	42	30.0	1440.0	180.0	68702	262.1
<b>ECC</b>	42	60.0	2520.0	360.0	276715	526.0
<b>ECWC</b>	47	27.0	4260.0	350.0	477057.7	690.7
<b>CWC</b>	47	5.0	1200.0	120.0	75748.7	275.2



**Slika 23.** Sekvence reproduktivnog ponašanja *P. hungaricus*. A – mužjak; B – ženka; C, D – kontakt; E, F – izvučene gonopode (označeno strelicom); G – kopulacija (strelica). Slika: B. Ilić (Jovanović *et al.*, 2017).



**Slika 24.** Položaj jedinki *P. hungaricus* tokom parenja. A – mužjak i ženka u paralelnom položaju; B, C – mužjak obmotan oko ženke. Slika: B. Ilić (Jovanović *et al.*, 2017).

#### 4.4.1.2. Testovi izbora mužjaka i izbora ženki

U testovima izbora ženki, 66% svih kontakata je rezultiralo kopulacijom, od čega je 78% parenja ostvareno sa prethodnim partnerom, a 22% sa novim partnerom. U testovima izbora mužjaka, 54% svih kontakata je rezultiralo parenjem, od čega 64% sa prethodnim partnerom i 36% sa novim partnerom. Rezultati  $\chi^2$  testa su pokazali da su prethodni partneri bili značajno uspješniji u parenju u poređenju sa novim partnerom u oba tipa testa (test izbora mužjaka:  $\chi^2 = 7.44$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ ; test izbora ženki:  $\chi^2 = 30.86$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ ). U testu izbora ženki, 68% svih uočenih kontakata, bez obzira da li su se završili parenjem ili ne, ostvareno je sa prethodnim partnerom, a 32% sa novim partnerom. U testu izbora



mužjaka, 53% svih ostvarenih kontakata, bez obzira na njihov ishod, ostvareno je sa prethodnim, a 47% sa novim partnerom. U odnosu na ukupan broj kontakata, veći procenat kontakata je rezultirao kopulacijom i u testu izbora ženki (71% nasuprot 29%) i izbora mužjaka (69% nasuprot 31%) (tabela 9).

**Tabela 9.** Procenat ostvarenih kontakata između mužjaka i ženki *P. hungaricus* u testovima izbora (Jovanović *et al.*, 2017).

Tip ponašajnog testa	Svi kontakti (sa ili bez ostvarene kopulacije) (%)			
	Prethodni partner	Novi partner	Kontakti završeni kopulacijom	Kontakti koji nisu završeni kopulacijom
Test izbora ženki	68	32	71	29
Test izbora mužjaka	53	47	69	31

Parenja su se, u najvećem procentu (63% u testu izbora ženki i 77% u testu izbora mužjaka) ostvarivala nakon jednog kontakta, a u znatno manjem (19% u testu izbora ženki i 9% u testu izbora mužjaka) nakon dva ili tri kontakta. U testu izbora mužjaka, parenja su se realizovala nakon pet kontakata u svega 5% slučajeva. Broj svih kontakata (onih koji su se završili parenjem i onih koji nisu) u testovima izbora je bio značajno različit samo u testu izbora ženki ( $\chi^2 = 13.58$ ,  $df = 1$ ,  $P < 0.01$ ).

Značajnost razlika u ponašajnim sekvencama između jedinki koje su se parile u oba tipa testa (u testu označenom kao „arena za parenje“ i u testovima izbora) je testirana t-testom. Razlike u DC (trajanju kopulacije) i ECC (vremenu od stavljanja jedinki u kutije do uspostavljanja kontakta koji će rezultirati kopulacijom) nisu bile statistički značajne između testa sprovedenog u „areni za parenje“ i testova izbora, dok je CC (vreme koje protekne od uspostavljanja kontakta između jedinki do početka kopulacije) bilo značajno različito između testa sprovedenog u areni za parenje sa jedne strane i testova izbora sa druge strane (tabela 10).

**Tabela 10.** Poređenje sekvenci parenja u areni i parenja u testovima izbora (vrednosti su izražene u sekundama). Skraćenice: DC - trajanje kopulacije, ECC - vreme od stavljanja jedinki u kutije do uspostavljanja kontakta koji će rezultirati kopulacijom, CC- vreme od uspostavljanja kontakta između jedinki do početka kopulacije (Jovanović *et al.*, 2017).

		mužjaci			ženke			
	N	Arena za parenje	Test izbora mužjaka	P vrednost	N	Arena za parenje	Test izbora ženki	P vrednost
DC	22	3122.54 ± 442.90	3509.23 ± 250.61	0.452	27	3670.93 ± 498.67	3623.00 ± 261.05	0.932
ECC	22	480.04 ± 97.53	835.64 ± 174.88	0.083	27	535.41 ± 106.43	438.07 ± 76.63	0.461
CC	22	221.32 ± 47.36	502.68 ± 102.74	<b>0.017</b>	27	185.11 ± 19.46	492.70 ± 93.06	<b>0.002</b>

#### 4.4.2. Varijabilnost odabranih morfoloških osobina kod *P. hungaricus*

##### 4.4.2.1. Analiza linearnih mera

Rezultati analize nisu pokazali značajne razlike u srednjoj vrednosti nijedne od šest morfoloških osobina između sparenih i nesparenih ženki, kao ni između sparenih i nesparenih mužjaka (tabela 11).

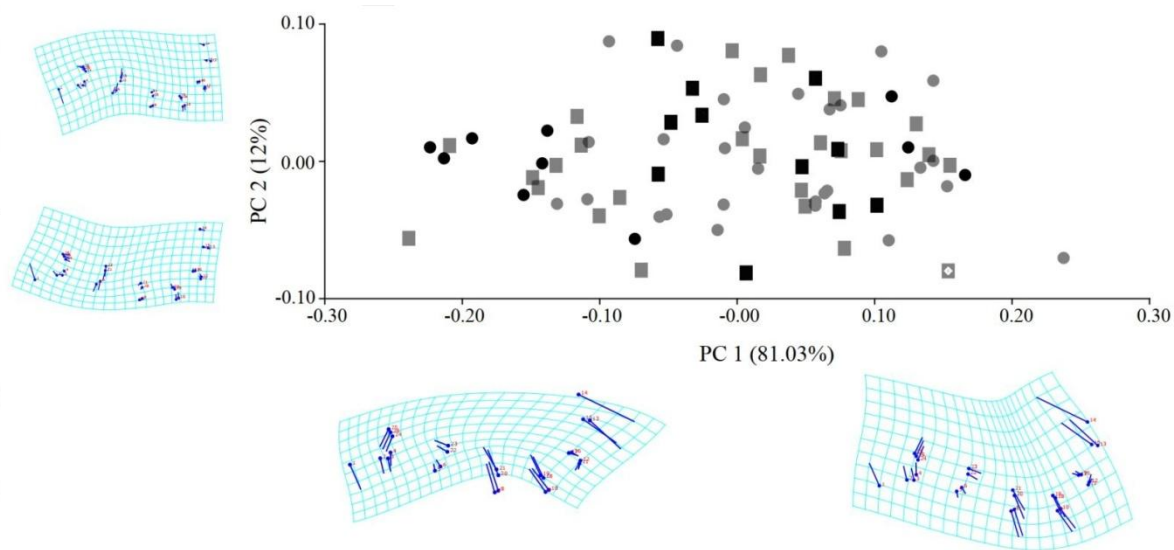
**Tabela 11.** Deskriptivna statistika morfoloških osobina i rezultati t-testova. Podaci su predstavljeni kao srednje vrednosti ( $\pm$  SE); minimalne i maksimalne vrednosti date su u zagradama. Skraćenice: BL - dužina tela, M - masa, AL - dužina antena, TH - visina trupa, TW - širina trupa, LL - dužina nogu, FP - sparene ženke, FN - nesporene ženke, MP - spareni mužjaci, MN - nesporeni mužjaci (Jovanović *et al.*, 2017).

Morfološke osobine	ženke		t / P	mužjaci		t / P
	FP (N = 28)	FN (N = 11)		MP (N = 28)	MN (N = 10)	
<b>BL (mm)</b>	1.968 ± 0.005	1.966 ± 0.008	0.295 /	1.856 ± 0.005	1.833 ± 0.008	0.312 /
	(1.915 – 2.018)	(1.909 – 2.009)	0.770	(1.793 – 1.899)	(1.823 – 1.841)	0.694
<b>M (g)</b>	0.394 ± 0.010	0.369 ± 0.016	1.309 /	0.043 ± 0.010	0.031 ± 0.017	0.588 /
	(0.313 – 0.487)	(0.249 – 0.446)	0.199	(-0.032 – 0.176)	(-0.024 – 0.110)	0.560
<b>AL (mm)</b>	0.712 ± 0.006	0.700 ± 0.006	1.888 /	0.708 ± 0.004	0.702 ± 0.007	1.431 /
	(0.677 – 0.736)	(0.682 – 0.726)	0.070	(0.685 – 0.736)	(0.683 – 0.727)	0.162
<b>TH (mm)</b>	0.802 ± 0.006	0.791 ± 0.007	1.894 /	0.675 ± 0.005	0.685 ± 0.008	0.541 /
	(0.786 – 0.846)	(0.762 – 0.837)	0.066	(0.635 – 0.700)	(0.632 – 0.699)	0.591
<b>TW (mm)</b>	0.792 ± 0.006	0.780 ± 0.007	1.771 /	0.678 ± 0.006	0.687 ± 0.009	0.516 /
		0.007	0.085		0.009	0.608
<b>LL (mm)</b>	0.625 ± 0.007	0.630 ± 0.008	0.521 /	0.604 ± 0.006	0.596 ± 0.010	1.377 /
	(0.580 – 0.679)	(0.608 – 0.664)	0.605	(0.567 – 0.628)	(0.538 – 0.633)	0.177

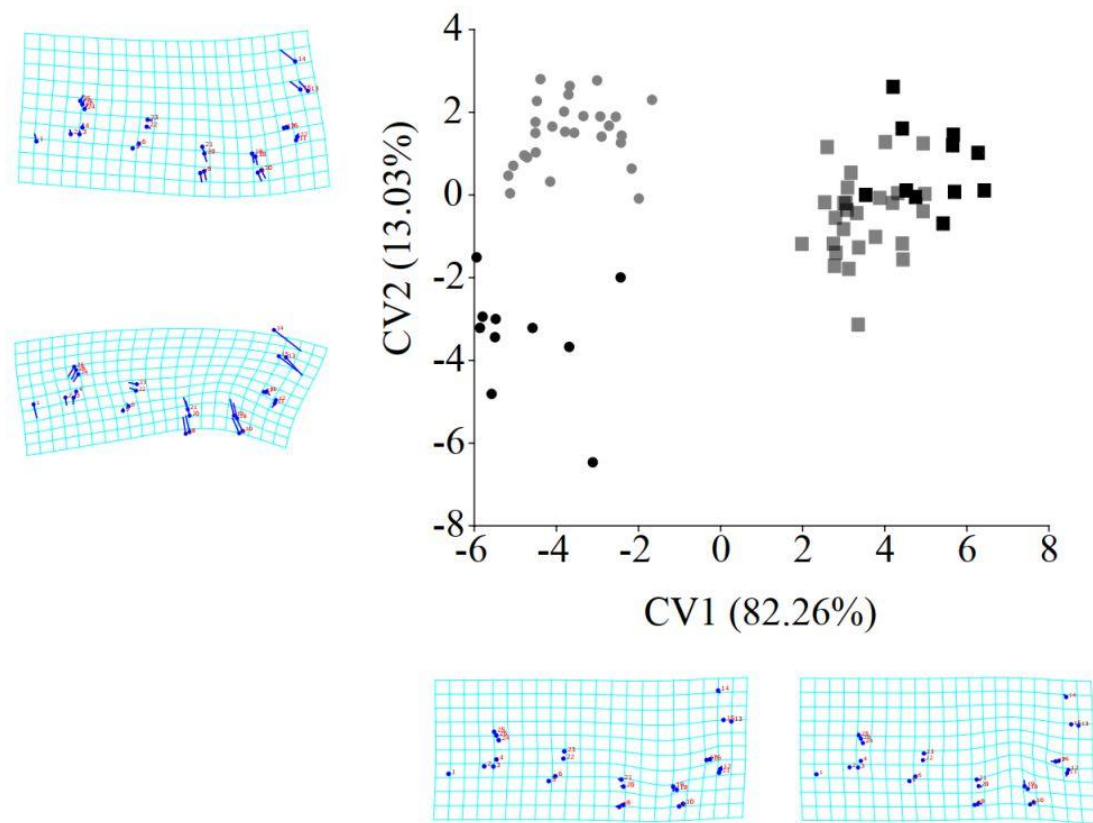
#### 4.4.2.2. Analiza veličine i oblika nogu i gonopoda

Veličina centroida nogu nije bila značajno različita kod jedinki oba pola u odnosu na status parenja ( $F_{3,150} = 1.614$ ,  $P = 0.1885$ ). Prvom glavnom komponentom (PC1) objašnjeno je 81.03% morfološke varijabilnosti veličine i oblika nogu (slika 25).

Kanonijskom varijantnom analizom je utvrđeno da oblik nogu mužjaka značajno varira u odnosu na status parenja (tj. značajno se razlikuje između sparenih i nesparenih mužjaka) ( $P = 0.0174$ ), što nije bio slučaj kod ženki ( $P = 0.7503$ ). Prvom kanonijskom osom objašnjeno je 82.26% variranja u obliku analizirane osobine (slika 26). Stepen deformacije mreže, veličina vektora, kao i njihov pravac ilustruju obrazac variranja oblika nogu kod sparenih i nesparenih jedinki (slike 25 i 26).

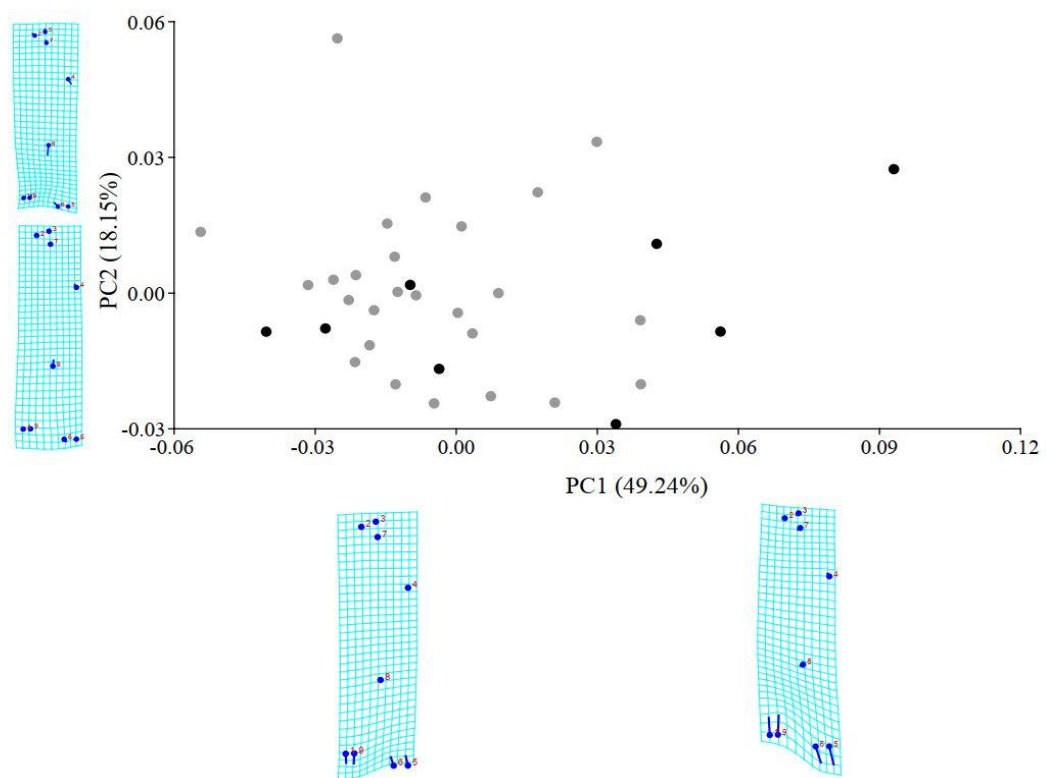


**Slika 25.** Varijabilnost veličine i oblika nogu u odnosu na status parenja (PCA analiza) (kvadrati: crni - ženke koje se nisu parile, sivi - ženke koje su se parile; krugovi: crni - mužjaci koji se nisu parili; sivi - mužjaci koji su se parili) (Jovanović *et al.*, 2017).

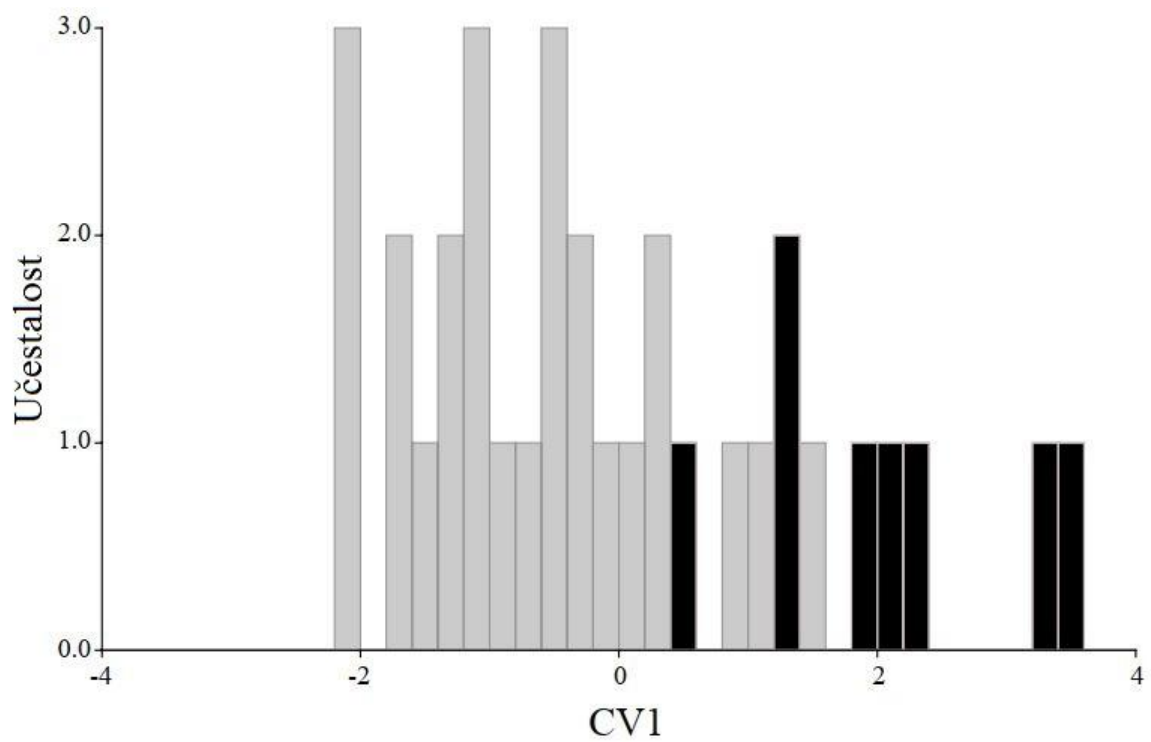


**Slika 26.** Razlike u obliku nogu između sparenih i nesparenih jedinki (CVA analiza) (kvadrati: crni - ženke koje se nisu parile, sivi - ženke koje su se parile; krugovi: crni - mužjaci koji se nisu parili; sivi - mužjaci koji su se parili) (Jovanović *et al.*, 2017).

U slučaju veličine centroida promerita gonopoda nisu utvrđene značajne razlike između sparenih i nesparenih mužjaka ( $F_{1,32} = 1.614$ ,  $P = 0.8043$ ). Sveukupna varijabilnost veličine i oblika promerita sparenih i nesparenih mužjaka prikazana je pomoću analize glavnih komponenti (PCA) (slika 27). Oblik analiziranog dela gonopoda nije se značajno razlikovao između sparenih i nesparenih mužjaka ( $P = 0.0662$ ) (slika 28). Na slici 28 prikazana je učestalost (u procentima) sparenih i nesparenih mužjaka sa određenim oblicima gonopoda u odnosu na prvu kanonijsku osu (CV1). Obrazac variranja oblika promerita između ove dve grupe mužjaka je prikazan deformacionim mrežama (Slika 28).



**Slika 27.** Varijabilnost veličine i oblika gonopoda u odnosu na status parenja (PCA analiza) (krugovi: crni - mužjaci koji se nisu parili; sivi - mužjaci koji su se parili) (Jovanović *et al.*, 2017).



**Slika 28.** Razlike u obliku gonopoda u odnosu na status parenja (CVA analiza) (stubovi: crni - mužjaci koji se nisu parili; sivi - mužjaci koji su se parili) (Jovanović *et al.*, 2017).

## 5. DISKUSIJA

U ovoj disertaciji, vrsta *Pachyiulus hungaricus* ispitivana je od perioda kasne postembriogeneze, preko adultnog perioda kada odbrambeni sistem postaje potpuno funkcionalan, do sticanja polne zrelosti i reprodukcije.

Kod mnogih grupa diplopoda, presvlačenja tokom postembrionalnog razvića rezultiraju rastom, dodavanjem segmenata, kao i postepenim razvojem odbrambenih žlezda i sazrevanjem sekreta (Enghoff *et al.*, 1993; Sekulić, 2014). Hinoni, dominantna jedinjenja u sekretu julida, poseduju antimikrobno dejstvo, što je pokazano kod nekoliko vrsta stonoga (Williams *et al.*, 1997; Stanković *et al.*, 2016; Ilić *et al.*, 2018), kod insekata (Ruther *et al.*, 2001) i kosaca (Rocha *et al.*, 2013). Analize ultrastrukture julidnog tipa žlezda, prisutnog kod *Pachyiulus hungaricus*, mogle bi da ukažu na poreklo i proces nastanka sekreta.

Kod mnogih insekata, hinonska jedinjenja mogu da poseduju feromonsku ulogu (Bergmann *et al.*, 2009) i da budu deo arsenala za privlačenje i/ili procenu partnera, zajedno sa mehaničkim, taktilnim, olfaktornim, gustatornim, auditornim receptorima. Mužjaci i ženke *P. hungaricus* provode određen period vremena u bliskom kontaktu, pre nego što stupe u kopulaciju (Jovanović *et al.*, 2017). Tokom prekopulatornog kontakta, može da dođe do razmene informacija o kvalitetu potencijalnog partnera na šta mogu da ukažu i morfološke osobine (Telford & Dangerfield, 1993a, 1993b, Cooper & Telford, 2000).

### 5.1. Postembrionalno razviće *P. hungaricus*

Anamorfnu razviće Julida odvija se kroz tri perioda (Enghoff *et al.*, 1993). U početnom periodu, stadijumi I, II, III, u nekim slučajevima i IV, karakterišu se stabilnim brojem prstenova sa nogama i parova nogu. Stadijum I odlikuje četiri prstena sa nogama i tri para nogu, stadijum II šest prstenova sa nogama i sedam pari nogu, a stadijum III 11 prstenova sa nogama i 17 pari nogu. Prvi stadijum na kome jedinka počinje da se hrani je stadijum II kod većine julidnih vrsta, dok je kod *Ophiulus pilosus* (Newport, 1842) i *Julus scandinavus* prvi aktivni stadijum III (Enghoff *et al.*, 1993; Kheirallah *et al.*, 2000).



*Pachyiulus flavipes* (C.L. Koch, 1847) i *P. oenologus* (Berlese, 1885) razlikuju se u ranom periodu postembriogeneze od drugih pripadnika julida (Enghoff *et al.*, 1993; Frederiksen *et al.*, 2012). Na stadijumu I, *P. flavipes* poseduje tri reda ocela, 27 pari nogu, a broj prstenova opisuje se formulom  $16+4+T$ , ili  $15+5+T$ . Na stadijumu II, dodaje se još jedan red ocela, prisutno je 35 pari nogu, 20 prstenova sa nogama i tri, četiri ili pet prstenova bez nogu. Parovi nogu ove vrste na stadijumu I, u posteriornom delu trupa, nisu bili potpuno razvijeni. Prva dva stadijuma *P. oenologus* opisana su formulama  $15+5+T$  i  $20+5+T$ . Red ocela na stadijumu I, kod jedinki kod kojih su mogli da se razaznaju, iznosi četiri, kao i na stadijumu II. Ocelarno polje stadijuma III organizovano je u pet redova kod obe vrste.

Tokom narednog perioda, označenog kao period diverzifikacije, koji kod većine julida počinje od stadijuma IV, dodaje se varijabilni broj prstenova u okviru stadijuma. Iz tog razloga, jedinke na različitim stadijumima mogu imati isti broj prstenova. Sa pojavom polnog dimorfizma, na stadijumu VI kod većine julida, postepeno se smanjuje broj novih prstenova u proliferacionoj zoni, što označava poslednju fazu, odnosno period stabilizacije. Kasniji stadijumi nekoliko julidnih vrsta, pred prestanak rasta, poseduju jedan apodni prsten. Jedinke bez apodnih prstenova su retke, od kojih neke imaju samo jedan par nogu na poslednjem prstenu. S obzirom da presvlačenje ovih jedinki do sada nije opisano, pretpostavlja se da su dosegle završni stadijum (Enghoff *et al.*, 1993). Jedinke *P. hungaricus* u analiziranom uzorku koje su polno zrele poseduju dva apodna prstena, što ukazuje da se na registrovanom stadijumu ne završava anamorfnu razviće, odnosno da se nastavlja dodavanje novih segmenata u narednim/narednom presvlačenju.

Najveći broj segmentnih formula opisan je na stadijumu VIII kod ženki *P. hungaricus*, kome pripada sedam jedinki, i na stadijum XI kod mužjaka, kome pripada 26 jedinki, što je i najveći broj jedinki na istom stadijumu. Sukcesivni niz segmentnih formula kroz stadijume nije zabeležen, pa se može pretpostaviti, a naročito uzimajući u obzir veličinu uzorka, da postoji više formula na tim stadijumima nego što je određeno u ovoj analizi. U analiziranom uzorku *P. hungaricus*, jedinke nisu pripadale samo različitim populacijama, već su prikupljane i u različitom periodu godine. Jedinke sa Goča sakupljane su tokom septembra, nakon izleganja u prolećnom periodu, zbog čega se u uzorku nalazio

veći broj jedinki ranijih stadijuma (VII, VIII kod ženki i VIII, IX kod mužjaka). Usled toga, nekoliko segmentnih formula nisu zabeležene kod jedinki sa Avale koje su sakupljane uglavnom tokom proleća i verovatno su se izlegle prethodne godine.

Razlikovanje polova zasniva se na gubitku VIII i IX para nogu na segmentu VII kod mužjaka, koje će biti zamenjene rudimentima gonopoda (Koch, 2015a). Razvoj gonopoda podrazumeva transformacije ograničene na VII segment, označene kao nesistemska metamorfoza (Drago *et al.*, 2008, 2011). Lokalizacija ove promene upućuje na postojanje pozicionog markera, uspostavljenog tokom ranog razvića, koji će se aktivirati mesecima ili godinama kasnije i dovesti do velikih anatomskih promena i pojave gonopoda (Drago *et al.*, 2011). U segmentu u okviru koga nastaju gonopode, dolazi do dorzalnog izmeštanja ventralne nervne cevi i digestivnog trakta, s obzirom na to da je veliki deo segmenta zauzet gonopodama i pridruženim mišićima. Na nivou celog tela, sa sticanjem polne zrelosti, nastaje promena u prečniku segmenata, tako da zreli mužjaci poseduju uže segmente i tanji trup ne samo u odnosu na ženke, već i u odnosu na juvenilne jedinke ili subadulte istog stadijuma (Enghoff, 1982; Akkari & Enghoff, 2011b).

Među prikupljenim jedinkama *P. hungaricus*, sa lokaliteta na Goču, na stadijumu XI, jedan mužjak poseduje razvijene gonopode i modifikovani prvi par nogu. Preostale jedinke na istom stadijumu poseduju nediferencirane gonopode i trouglasti sternum na segmentu VII. Na narednom stadijumu XII, uzorkovana su samo dva mužjaka, i oba poseduju nerazvijene gonopode, i nemodifikovani prvi par nogu. Može da se pretpostavi da stadijum XI nije jedini na kome su mužjaci ove vrste polno zreli, i da zrelost mužjaci dostižu i na stadijumu XII. I kod drugih, do sada proučavanih julida, zabeleženi su polno zreli mužjaci na različitim stadijumima Mužjaci *Leptoiulus saltuvagus* (Verhoeff, 1898) polnu zrelost dostižu na stadijumima IX, X, ili XI (Meyer, 1985), *Ophiulus pilosus* (Newport, 1842) na stadijumima IX ili X (Enghoff *et al.*, 1993), *Julus scandinavus* Latzel, 1884 na stadijumima IX, X ili XI (Blower, 1970), *Tachypodoilus niger* (Leach, 1814) uglavnom na stadijumu VIII, ali i na stadijumima VII i IX (Blower & Fairhurst, 1968). Varijabilnost stadijuma na kome će se dostići polna zrelost zavisi od pola, populacije i sredinskih uslova (Minelli, 2015). Ženke Julida obično dostižu polnu zrelost stadijum kasnije u odnosu na mužjake (Blower, 1985; Enghoff *et al.*, 1993). Kod *P. hungaricus*

funkcionalne vulve i gonopode su prvi put uočene na stadijumu XI. S obzirom da u našem uzorku nema ženki na stadijumu X, moguće je da se potpuno razvijene vulve javljaju prvi put na ovom stadijumu. Pretpostavlja se da je uzrok dimorfizma u sazrevanju gonopoda i vulvi u reproduktivnoj optimizaciji koja nastupa zbog energetske ulaganja u razvoj ovarijuma, ili u ubrzanju razvoja mužjaka da bi se osigurala inseminacija zrelih ženki (Pinheiro *et al.*, 2009). Kod julida, neophodno je da jedinka prođe kroz tri presvlačenja, a često i više, da bi dostigla polnu zrelost (Enghoff *et al.*, 1993). U analiziranom uzorku *P. hungaricus*, gonopode su razvijale kroz pet stadijuma, kao i vulve. Rudimenti gonopoda postepeno rastu, a sternum poprima oblik trougla. Međutim, razlika u diferenciranosti gonopoda između subadultnog i adultnog stadijuma je daleko izraženija u odnosu na neznatnu razliku u razvijenosti gonopoda između sukcesivnih subadultnih stadijuma. Tokom presvlačenja između subadultnog i adultnog stadijuma, gonopode podležu najvećem stepenu modifikacija i stižu svoj konačan oblik i veličinu.

Kod većine proučavanih julida, stadijum I je bez ocela. Stadijum II poseduje jednu ocelu, od koje se, na narednim stadijumima formira ocelarno polje dodavanjem po jednog reda sa jednom ocelom više u odnosu na prethodni red. Tako će stadijum III imati dva reda ocela, jedan sa jednom ocelom nastalom u stadijumu II, i drugi sa dve novonastale ocele. Isti princip organizacije polja prisutan je i na ostalim stadijumima, iz čega se zaključuje da je broj redova ocela za jedan niži u odnosu na broj postembrionalnih stadijuma. Ocelarno polje mnogih Julida je približno jednakostraničnom trouglu na ranijim stadijumima, čije sve tri strane čini jednak broj ocela. Na kasnijim stadijumima dolazi do modifikacija polja usled blizine osnove antena, zbog čega su najmanje ocele one koje su uz antene. Time ocelarno polje često poprima oblik trapezoida. Kod *P. hungaricus* primećeno je da, kod 33 od ukupno 71 analizirane jedinke, broj ocela nije isti sa leve i desne strane glavene kapsule, što je prisutno kod svih registrovanih stadijuma kasne postembriogeneze. Razlike se kod većine jedinki svode na jednu ocelu, mada mogu da iznose i dve, tri ili četiri ocele kod samo jedne jedinke, i odnose se na broj ocela koje se nalaze neposredno uz bazu antena i koje podležu najvećem stepenu modifikacije. Svaki naredni stadijum *P. hungaricus* poseduje veći broj redova i ukupan broj ocela, ali i pored toga zabeleženo je preklapanje u broju ocela samo leve ili desne strane između stadijuma X i XI kod mužjaka. Tokom

razvoja, može se desi da se ocele ne razviju, ili da se dve ocele pojave kao rezultat jednog presvlačenja (Peitsalmi & Pajunen, 1991, 1992). Od interesa je pomenuti da je slični fenomen registrovan kod vrste *Ommatoiulus sabulosus*, gde su zabeležena presvlačenja tokom kojih nisu dodate ocele na jednoj strani ili na obe strane glavene kapsule. Posledica prvog slučaja je različit broj redova sa leve i desne strane (Enghoff *et al.*, 1993). Julida *Dolichoilulus axeli* Enghoff, 1992 odlikuje se, počevši od stadijuma II, povećanim brojem ocela sa bar jedne strane glavene kapsule (Enghoff *et al.*, 1993). Razlike u broju ocela sa leve i desne strane glavene kapsule, kao i isti broj ocela sa leve ili desne strane kod jedinki uzastopnih stadijuma *P. hungaricus* upućuju na nezavisnost pojedinačnih ocela i njihovo odsustvo u pojedinim redovima tokom presvlačenja. Varijabilnost broja ocela u okviru istog stadijuma, prisutna kod ispitivanih jedinki *P. hungaricus*, zabeležen je i kod vrste *Cylindroiulus truncorum* (Silvestri, 1896), dok broj nizova ocela ostaje stabilna osobina na odgovarajućim stadijumima (Harzsch *et al.*, 2007).

Postembrionalno razviće drugog juliformnog reda sa euanamornim predstavnicima, Spirostreptida, deli sličnosti sa anamorfozom Julida. Prva dva stadijuma euanamornih Spirostreptida poseduju tri i sedam parova nogu, kao kod većine Julida. Takođe, sa svakim presvlačenjem, dodaje se po jedan red ocela. Adulti većine vrsta poseduju barem jedan apodni prsten. Specifičnost juvenilnih jedinki nekih predstavnika Cambalidea ogleda se u prisustvu 10-13 ili 19 prstenova sa samo jednim parom nogu. Na narednom stadijumu, ovi prstenovi stižu po dva para nogu i postaju diplopodni (Enghoff, 1993). *Archispirostreptus syriacus* (DeSaussure, 1859) [= *Archispirostreptus tumuliporus judaicus* (Attems, 1927)], koja pripada hemianamornom podredu Spirostreptidea, na stadijumu I i II poseduje tri, odnosno sedam pari nogu (Crawford *et al.*, 1987). Adultni, odnosno polno zreli mužjaci prisutni su od stadijuma XI i XII. Polno zrele ženke nađene su u okviru stadijuma XII ili XIII. Broj prstenova u okviru stadijuma je veći nego kod *P. hungaricus*, i većine drugih julida (Enghoff *et al.*, 1993). Varijabilnost u broju prstenova u okviru stadijuma je zajednička karakteristika Spirostreptida i Julida.

Pripadnici trećeg reda nadreda Juliformia, reda Spirobolida razvijaju se hemianamornfo. Nizovi ocela za određivanje postembrionalnih stadijuma prvi put su upotrebljeni prilikom proučavanja spirobolide *Pachybolus ligulatus* (Voges, 1878)

(Vachon, 1947). Za razliku od Julida, kod kojih na stadijumu I nema ocela, stadijum I Spirobolida poseduje jednu ocelu, tako da je broj stadijuma jednak broju nizova ocela (Enghoff *et al.*, 1993). Kod vrste *Epibolus pulchripes* (Gerstäcker, 1873), opisan je konstantan broj ocela u okviru svakog stadijuma I-VI, dok se od stadijuma VII dodaje varijabilan broj ocela (Dhaenens & VandenSpiegel, 2006). Takođe, stadijumi I-VI karakterišu se po jednom segmentnom formulom, dok su na stadijumima VII i VIII zabeležene dve formule. Kao i kod nekih Spirostreptida, polnu zrelost mužjaci i ženke dostižu na istom stadijumu, XI, a polove je moguće razlikovati od stadijuma IV. Slično nekim predstavnicima Spirostreptida, ali i Callipodida, Spirobolida poseduju veliki broj apodnih prstenova na stadijumu II, tako da se uočava veliki porast u broju prstenova sa nogama na narednom stadijumu III. Segmentna formula stadijuma II kod *E. pulchripes* je 6+14+T, a kod većine Julida 6+5+T. Nakon stadijuma II, kod Spirobolida se smanjuje broj apodnih prstenova dok jedinke ne dostignu epimorfne stadijume, IX i X kod *E. pulchripes*, na kojima ne poseduju apodne prstenove. Najveći broj apodnih prstenova u našem uzorku, sedam, javlja se na stadijumu VIII kod ženki, a šest apodnih prstenova nalazi se u okviru stadijuma VIII kod mužjaka i stadijuma VII, VIII, IX kod ženki.

Postembrionalni stadijumi kasne postembriogeneze *P. hungaricus* definišu se prevashodno brojem nizova ocela, dok preklapanja između stadijuma postoje u svim ostalim osobinama. Mužjaci i ženke *P. hungaricus* razlikuju se na prvom stadijumu nakon završetka diverzifikacije, stadijumu VII. Naredni stadijumi, uključujući i stadijum VII, analizirani u ovoj disertaciji pripadaju periodu stabilizacije postembrionalnog razvoja čija je odlika postepeno smanjenje broja novih segmenata po stadijumima, što je zabeleženo i kod *P. hungaricus*.

## **5.2. Funkciona morfologija i ultrastruktura odbrambenih žlezda *P. hungaricus***

Izlučivanje sekreta nastupa nakon uznemiravanja ili stimulisanja stonoge. Kontraksije integumentnih mišića dovode do povećanja pritiska hemocela, što dovodi do protoka sekret iz rezervoara kroz region kutikularnih navoja do kanala. Kutikularnim navojima, prethodno opisanim i kod juliformne vrste reda Spirobolida, *A. arboreus*

(Woodring & Blum, 1965) koji izgledom podsećaju na oprugu, reguliše se tok sekreta kod *P. hungaricus*. Kanal žlezde *P. hungaricus* karakteriše se invaginacijom sa ventralne strane kanala, na kojoj inserira mišić retraktor (Makarov *et al.*, 2014). Otvaranje kanala regulisano je konusnim čepom povezanim sa mišićem (Makarov *et al.*, 2014), što je detektovano skening elektronskom mikroskopijom i u ovoj studiji. Slična struktura opisana je kod *A. arboreus* kao „jezik“ (Woodring & Blum, 1965). Ležište čepa Tichy (1974) označava kao *camera odorifera*, a sam otvor kanala kao *foramen repugnatorium*. Kontrakcija mišića retraktora povlači čep, kanal se otvara i sekret, iz kanala, ističe kroz ozoporu. Kod *P. hungaricus* sekret ističe kroz ozoporu, ali je u jednom slučaju primećeno i izlučivanje sekreta u vidu mlaza na razdaljini od 10-15 cm. Da bi se postiglo raspršivanje sekreta pod velikim pritiskom, opisano kod spirobolida, neophodno je da se kontrakcija i relaksacija dve grupe mišića, koji inseriraju na kanalu na čepu, odnosno „jeziku“, a udružuju nedaleko od mesta insercije, odvija po tačno određenom obrascu (Woodring & Blum, 1965). Može da se pretpostavi da, u slučaju *P. hungaricus*, dolazi do istovremene kontrakcije svih mišićnih vlakana, što rezultira isticanjem sekreta kroz ozoporu, ali da može doći i do naizmenične kontrakcije mišićnih vlakana, što bi dovelo do izlučivanja u vidu mlaza.

Odbrambene žlezde različitih grupa zglavkara poseduju istu osnovnu građu. Bazalna lamina sa spoljašnje strane okružuje sloj sekretornih ćelija, koji je ka lumenu rezervoara prekriven kutikularnim slojevima (intimom), čija je funkcija da štiti lumen žlezde od dejstva sekreta. Uz žlezde je dobro razvijen trahejni sistem, opisan i kod *Pachyiulus sp.* (Tichy, 1974), kosaca (Clawson, 1988), dok se kod vrste tvrdokrilaca *Carabus lefebvrei* Dejean, 1826 zapaža grupisanje žlezdanih jedinica odbrambenih abdominalnih žlezda uz traheje, i prisustvo traheola između sekretornih ćelija (Giglio *et al.*, 2009).

Kutikula kanala žlezde *P. hungaricus* izgrađena je od egzo- i endokutikule. Ova dva sloja, koja zajedno čine prokutikulu, sadrže hitinska mikrovlakna i lamelarne su strukture (Makarov, 2015). Građa endokutikule u vidu dve lamele opisana je i kod nekih insekata (Locke, 1961). S obzirom da se lamelarni raspored vlakana ne zapaža u intimi rezervoara, pretpostavlja se da nju čine egzokutikula prekrivena epikutikulinskim slojevima. Izražena osmiofilnost i homogeni izgled egzokutikule izvodnog kanala potiče od gusto raspoređenih

vlakana koji obezbeđuju rigidnost. Egzokutikula rezervoara je svetlija u odnosu na egzokutikulu kanala, što ukazuje na raspoređenost vlakana u cilju fleksibilnosti rezervoara koji podleže promenama oblika tokom izlučivanja sekreta kod *P. hungaricus*.

Sekretorne ćelije odbrambenih žlezda različitih grupa zglavkara, u zavisnosti od sastava sekreta, pored sekretornih granula, odnosno vezikula različite elektronske gustine, mogu sadržati i organele poput Goldži kompleksa, glatkog i granulisanog endoplazminog retikuluma, mitohondrija, granula glikogena, lipidnih tela, slobodnih ribozoma i heterolizozoma (Tichy, 1974; Clawson, 1988; Whitman *et al.*, 1991; Giglio *et al.*, 2009; Schierling & Dettner, 2013). Sakule Goldži kompleksa detektovane su u žlezdama *Pachyiulus sp.* (Tichy, 1974), ali ne kod *P. hungaricus*, što ne isključuje njihovo postojanje. Pretpostavlja se da sekretorne granule vode poreklo od Goldži kompleksa. Vezikule kompleksa, koje bi bile prekursori sekretornih granula, različitog su oblika i veličine, svetlo obojene unutrašnjosti okružene membranom. Sa sazrevanjem sekreta, sadržaj vezikula koje se međusobno sjedinjavaju, postaje taman, bez vidljive membrane (Tichy, 1974). Pretpostavljeni proces nastanka granula rezultirao bi velikim brojem prelaznih tipova granula uočenih u sekretornim ćelijama *P. hungaricus*. Kod *Pachyiulus sp.*, u regionima dobro razvijenog retikuluma zapaža se mali broj sekretornih vezikula, čija brojnost raste u oblastima u kojima endoplazmin retikulum nije zastupljen, na osnovu čega se pretpostavlja potencijalna uloga vezikula granulisanog endoplazminog retikuluma u formiranju sekretornih granula (Tichy, 1974). U ovoj studiji slična pravilnost detektovana je na nivou jedne ćelije, u sekretornom sloju, u kojoj se, pored sintetskog i nesintetskog granulisanog endoplazminog retikuluma zapaža mali broj granula. Funkciona asocijacija granulisanog endoplazminog retikuluma i Goldži kompleksa u žlezdanim ćelijama opisana je kod tvrdokrilca *C. lefebvrei*, što ukazuje na proteinsku komponentu odbrambenog sekreta (Giglio *et al.*, 2009). Sadržaj vezikula koje proizvode retikulum modifikuju se u Goldži kompleksu. Glatki endoplazmin retikulum može biti dobro razvijen u sekretornim ćelijama, što je slučaj kod dva roda potporodice Steninae, reda Coleoptera, *Stenus* Latreille, 1796 i *Dianous* Leach, 1819 (Schierling & Dettner, 2013), kao i kod skakavca *Romalea guttata* (Stoll, 1813) (Whitman *et al.*, 1991). Odbrambeni sekret pripadnika proučavanih grupa ne sadrži proteinsku komponentu, tako da bi se njegova sinteza obavljala u glatkom

endoplazminom retikulumu i Goldži kompleksu. Prisustvo glatkog oblika retikuluma, za sada, nije utvrđeno kod *P. hungaricus*, ni u našim analizama, ni u analizama neidentifikovane vrste roda *Pachyiulus* (Tichy, 1974). S obzirom da kao rezultat aktivnosti glatkog endoplazminog retikuluma nastaju i lipidna tela (Murphy, 2012), koja su prisutna u značajnom broju u sekretornim ćelijama *P. hungaricus* u ovoj studiji, može da se očekuje detektovanje i ovog oblika retikuluma tokom daljih analiza.

Mitohondrije su u sekretornim ćelijama odbrambenih žlezda često raspoređene uz određene domene. Kod proučavanih kosaca roda *Leiobunum* C. L. Koch, 1839, uočavaju se uz kanalikle, od kojih se sekret transportuje kroz kanal do lumena rezervoara (Clawson, 1988). U dominantno terpenskom sekretu *C. lefebvrei*, mitohondrije imaju važnu funkciju u sintezi izoprenoidnih derivata. Krupne, izdužene mitohondrije se često mogu naći uz svetlo obojene granule (Giglio *et al.*, 2009). Lokalizacija mitohondrija unutar i oko prstolika izraštaja membrane uz kanal koji prima sekretorne produkte i sprovodi ih do sabirnog kanala, odlika je odbrambenog sistema potporodice Steninae (Schierling & Dettner, 2013). Kod *Pachyiulus sp.* mitohondrije se nalaze oko sekretornih granula, kao i oko drugih struktura u citoplazmi sekretornih ćelija (Tichy, 1974). Kod *P. hungaricus*, mnogobrojne mitohondrije različitog oblika detektovane su u ćeliji sekretornog sloja, u kojoj se nalaze dobro razvijeni granulisani endoplazmin retikulum i grupacija malobrojnih granula.

Da bi se detektovali enzimi koji učestvuju u reakciji nastanka sekreta, primenjena je metoda DAB obeležavanja katalaze. Enzimi koji učestvuju u reakciji nastanka hinona određeni su kod dve vrste tvrdokrilaca porodice Tenebrionidae, *Eleodes longicollis* LeConte, 1851 i *Tribolium castaneum* (Herbst, 1797), i pripadaju glukozidazama, oksidazama i peroksidazama (Happ, 1968). Biosintetski put podrazumeva reakciju nastanka slobodnih difenola od fenol glukozida, a zatim oksidaciju do hinona. Hinonski sekret buba bombardera različitih potporodica (Coleoptera), koji se izlučuje u vidu spreja, nastaje oksidacijom prekursorske smeše hidrohinona i vodonik peroksida koja se u momentu izlučivanja izlaže dejstvu enzima katalaze i peroksidaze u reakcionoj komori (Eisner *et al.*, 1977). Međutim, prisustvo katalaze nije detektovano u ćelijama žlezde kod *P. hungaricus*. Negativan rezultat može da bude posledica nespecificnosti antitela koja se koriste u standardnom postupku DAB metode.



Izvodne strukture, tubule i kanali proučavanih vrsta zglavkara smeštene su u posebnim, kanalnim ćelijama, što je odlika III klase žlezdanih ćelija. Kod *Pachyiulus sp.*, sekretorna tubula polazi iz sekretornog aparata i kroz kanalnu ćeliju izlučuje sadržaj u lumen (Tichy, 1974). Struktura opisana kao srpasta ploča kod vrste *U. canadensis* (Weatherston & Percy, 1969), u kojoj se susstiču tubule iz sekretornih ćelija, nije detektovana ni kod *P. hungaricus* u analizi predstavljenoj u ovoj disertaciji, niti u studiji ozadena kod *Pachyiulus sp.* (Tichy, 1974). Tretiranjem žlezda rastvorom KOH, pokazano je prisustvo unutarćelijskih kutikularnih kanala i kod spirobolide *Narceus sp.*, kalipodide *Abacion magnum* (Loomis, 1943) i polidezmidie *Apheloria corrugata* (Wood, 1864) [= *Apheloria virginienensis corrugate* Wood, 1864] (Eisner *et al.*, 1978). U odbrambenim žlezdama spirobolide *A. arboreus* nisu uočene kutikularne tubule, što navodi na pretpostavku da se sekret oslobađa holokrino (Woodring & Blum, 1965). Kod *P. hungaricus*, uočavaju se dva tipa izvodnih struktura, tubule i sabirni kanali, što je odlika i odbrambenog sistema koleoptera (Giglio *et al.*, 2009; Schierling & Dettner, 2013). Ovakav nalaz upućuje na merokrini način sekrecije kod *P. hungaricus*, pri čemu se sekret preko tubula doprema u sabirne kanale, a iz njih izlučuje u lumen žlezde. Kutikula sabirnog kanala *P. hungaricus* je slične strukture kao i intima, ali je epikutikularni sloj kanala tanji u odnosu na intimu.

### **5.3. Sastav i antimikrobna svojstva odbrambenog sekreta *P. hungaricus***

#### **5.3.1. Sastav odbrambenog sekreta *P. hungaricus***

*Pachyiulus hungaricus* je jedina vrsta iz roda *Pachyiulus* analiziranog odbrambenog sekreta i određenog hemoprofila. Prethodno, u sekretu ove vrste determinisano je devet hinonskih jedinjenja, dok je nehinonska komponenta predstavljena heksil estrima zasićenih i nezasićenih kiselina niza C<sub>14</sub>-C<sub>20</sub> (Sekulić, 2014). U analizi prikazanoj u ovoj tezi, ukupno je detektovano 12 hinona, od kojih je 11 identifikovano, i određen je kvantitativni sastav nehinoske komponente, koja pored heksil estara, sadrži i pentil estre. Razlike između polova *P. hungaricus*, prvi put su analizirane u studiji predstavljenoj u ovoj tezi. Jedinjenja

2-metil-1,4-benzohinon (**2**) i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon (**4**) najviše su zastupljena ne samo u sekretu *P. hungaricus*, već i mnogih drugih, do sada proučavanih, julida (Huth, 2000; Vujisić *et al.*, 2011; Vujisić, 2013; Sekulić, 2014; Sekulić *et al.*, 2014; Kania *et al.*, 2016). Jedinjenje **4** je detektovano kod svih julida, sem *U. canadensis*, mada njegov nedostatak može da bude posledica nedovoljne osetljivosti opreme koja je bila dostupna u vreme analize sekreta ove vrste (Weatherston & Percy, 1969). Nalazi se i u sekretu proučavanih vrsta druga dva juliformna reda, Spirobolida i Spirostreptida, ali ne predstavlja univerzalni deo odbrambenog hemijskog arsenala ovih redova (Arab *et al.*, 2003; Makarov, 2015). Jedinjenje **2** je prisutno kod mnogih juliformnih vrsta, mada i ovde postoje izuzeci (Kuwahara *et al.*, 2002; Bodner & Rasputnig, 2012; Makarov, 2015). Oksidativnom ciklodehidrogenacijom jedinjenja **4** nastaju 2-metil-3,4-metilen-dioksifenol (**11**) i 2-metoksi-3-metil-hidrohion (**12**) (Wu *et al.*, 2007). Relativna zastupljenost jedinjenja **11** (13.4%) kod mužjaka *P. hungaricus* je značajno veća u odnosu na udeo u sekretu drugih vrsta kod kojih je detektovano, *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847), *Megaphyllum bosniense* (Verhoeff, 1897) i *M. unilineatum* (C. L. Koch, 1838) (Vujisić *et al.*, 2011; Sekulić, 2014; Ilić *et al.*, 2018). Međutim, u sekretu *Leptoiulus trilineatus* (C. L. Koch, 1847), ovo jedinjenje je prisutno u procentu sličnom kao kod *P. hungaricus* (Vujisić *et al.*, 2011), a u značajno većem kod kavernikolnih vrsta roda *Typhloiulus* Latzel, 1884 (Sekulić, 2014). Kod ženki *P. hungaricus*, jedinjenje **12** prisutno je u malom procentu, kao i kod drugih analiziranih vrsta (*C. boleti*, *L. trilineatus*, *M. bosniense* i *M. unilineatum*) (Vujisić *et al.*, 2011), međutim, veći procenat detektovan je kod mužjaka *P. hungaricus*. Jedinjenje **10** identifikovano je kod *C. boleti*, *M. bosniense* i *M. unilineatum* (Ilić *et al.*, 2018) u procentima malo iznad traga kod oba pola, dok je kod *P. hungaricus* prisutno u tragu. Kod kavernikolne vrste roda *Typhloiulus* nalazi se među zastupljenijim komponentama (Sekulić, 2014). Jedinjenje **9**, je za razliku od drugih vrsta kod kojih je identifikovano (*M. bosniense*, *C. boleti*, *L. trilineatus*, *U. transsilvanicus*, kavernikolne vrste rodova *Serboiulus* Strasser, 1962 i *Typhloiulus*) i kod kojih je prisutno u malom procentu ili u tragu (Vujisić *et al.*, 2011; Sekulić, 2014; Ilić *et al.*, 2018), znatno zastupljenije kod mužjaka *P. hungaricus*. U ranijim istraživanjima sekreta julide *M. unilineatum*, ovo jedinjenje je identifikovano kao deo hemoprofila vrste (Vujisić, 2013), ali ne i po novijim istraživanjima (Ilić *et al.*, 2018).

Slična situacija je i sa jedinjenjima **1** i **3** kod vrste *M. unilineatum*. Objašnjenje se može naći u pripadnosti analiziranih jedinki ovih studija različitim populacijama, s obzirom da je kod diplopoda zabeleženo postojanje razlika u odbrambenom sekretu na međupopulacionom nivou (Taira *et al.*, 2003). Ženke *P. hungaricus* poseduju, u tragu jedinjenje **8**, koje je detektovano kod oba pola *C. boleti*, *M. bosniense*, *M. austriacum* Latzel, 1884, *L. trilineatus* u sličnom udelu, i u nekoliko puta većem procentu kod oba pola *M. unilineatum* (Vujisić *et al.*, 2011; Vujisić, 2013; Ilić *et al.*, 2018). Hidrohinon (**6**) je detektovan tek po drugi put u redu Julida, nakon što je identifikovan u odbrambenom sekretu vrste *Unciger transsilvanicus* (Verhoeff, 1899) (Sekulić *et al.*, 2014). Jedinjenje **5** detektovano je kod nekoliko julidnih vrsta (Makarov, 2015), sa značajnom zastupljenošću kod *U. transsilvanicus* (Sekulić *et al.*, 2014). Kod kavernikolne vrste *Serboiulus kresnik* Strasser, 1962, udeo u sekretu je znatno manji (Sekulić, 2014), a kod *P. hungaricus* ovo jedinjenje je prisutno u graničnom procentu traga. Četvrto jedinjenje po zastupljenosti u sekretu mužjaka i ženki *P. hungaricus*, mada u različitom udelu, jedinjenje **3**, nalazi se u većem procentu kod vrste *U. transsilvanicus*, a u značajnijem procentu kod kavernikolnih vrsta roda *Typhloiulus* (Sekulić, 2014). Jedinjenje **1**, *p*-benzohinon, , prisutno je u sekretu *U. transsilvanicus* i *M. bosniense* u procentu manjem u odnosu na ženke *P. hungaricus* (Sekulić, 2014; Vujisić *et al.*, 2011; Vujisić, 2013; Ilić *et al.*, 2018).

Sva hinonska jedinjenja identifikovana u sekretu vrste *P. hungaricus*, detektovana su i kod drugih analiziranih julida. Uzimajući u obzir i da su dva jedinjenja, 2-metil-1,4-benzohinon i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon dominantna kod većine julida, odbrambeni sekret julida može da se označi kao generalno hinonski. Međutim, hinoni nisu deo hemoprofila kod svih julida. Kod vrste *Megaphyllum fagorum* (Attems, 1951) hinoni odsustvuju iz fenolnog odbrambenog sekreta (Bodner *et al.*, 2016). Za sad, nisu zabeležena dva identična hinonska hemoprofila među julidama (Vujisić *et al.*, 2011; Bodner & Raspotnig, 2012; Sekulić, 2014). Prema raspoloživim literaturnim podacima, hemoprofilu kod nekih julidnih taksona mogu da se koriste u diskriminaciji vrsta. Hinonska jedinjenja koja, za razliku od nekoliko univerzalnih i dominantnih hinona, imaju manji udeo u sekretu, određuju specifičnost sekreta svake vrste (Huth, 2000; Vujisić, 2013; Sekulić, 2014). Ipak, razlike u hinonskim hemoprofilima nekih vrsta koji pripadaju različitim rodovima nisu

uvek dovoljne da bi imale veći hemotaksonomski značaj, kao što je slučaj kod *C. boleti*, *M. bosniense* i *L. trilineatus*, kod kojih se značajne razlike sastoje samo u prisustvu p-benzohinona i udelu 2-metil-3,4-metilen-dioksifenola u sekretu (Vujisić *et al.*, 2011).

U nehinonskoj grupi jedinjenja sekreta *P. hungaricus*, najzastupljeniji zasićeni estri su heksil pentadekanoat i heksil heksadekanoat, i kod mužjaka i kod ženki, dok je najzastupljeniji nezasićeni estar heksil heksadecenoat. Izraženije razlike u estarskoj komponenti među polovima *P. hungaricus* detektovane su kod jednog od izomera heksil-heksadekanoata i heksil pentadekanoata, sa većim udelom ovih jedinjenja kod ženki u odnosu na mužjake. Prethodno, heksil estri su detektovani kod julidnih vrsta *Julus scandinavus* Latzel, 1884, *Leptoiulus proximus* (Nemec, 1896), *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus, 1758), *Tachypodoiulus niger* (Leach, 1814), *Enantiulus nanus* (Latzel, 1884), *Cylindroiulus punctatus* (Leach, 1815) i *C. meinerti* (Verhoeff, 1891) (Huth, 2000). Kod neidentifikovane vrste roda *Anaulaciulus* Pocock, 1895, n-heksil estri čine najveći procenat estarske komponente (Shimizu *et al.*, 2012). Izopentil estri identifikovani su kod *U. transsilvanicus* (Sekulić *et al.*, 2014). Heksil estri su dominantna komponenta kavernikolne vrste roda *Typhloiulus* (Sekulić, 2014), kao i vrste *M. bosniense* (Ilić *et al.*, 2018).

Kvantitativne razlike odbrambenog sekreta između polova *P. hungaricus* mogu da upute na funkciju odbrambenog sekreta u intraspecijskoj komunikaciji. Najistaknutije su razlike u udelu dominantnih hinonskih komponenti, 2-metil-1,4-benzohinona i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinona kod *P. hungaricus*, kao i kod *Megaphyllum bosniense*, *M. unilineatum*, *C. boleti*, *Cylindroiulus punctatus* i *C. caerulocinctus*, ali se javljaju i u udelu manje zastupljenih hinona, kao i estara (Huth, 2000; Ilić *et al.*, 2018). Ženka neidentifikovane vrste roda *Leptoiulus* Verhoeff, 1894 izlučila je odbrambeni sekret ka mužjaku kada nije bila spremna za parenje (Haacker, 1974). U našem eksperimentu, jedinke *P. hungaricus* nisu ispoljile takvo ponašanje. Hemijski signal, možda sadržan u odbrambenom sekretu može da omogući prepoznavanje polova, tokom antenalnog kontakta mužjaka sa trupom i glavenim regionom ženke (Haacker, 1974; Carey & Bull, 1986). U prilog ovakve pretpostavke može da posluži nalaz da estri koji se nalaze u sekretu *Anaulaciulus sp.* funkcionišu kao signal za prepoznavanje vrsta i afrodizijak kod dve vrste leptira (Shimizu *et al.*, 2012).

Fenoli se u sekretu julida mogu naći u manjem udelu u odbrambenom sekretu, poput fenola kod *U. transsilvanicus* i *p*-krezola i *p*-etilfenola kod vrsta *T. serborum* (Sekulić, 2014). Međutim, fenolna jedinjenja mogu biti i dominantna i u odbrambenom sekretu julida, kao što je slučaj kod nekih vrsta roda *Styrioulus* Verhoeff, 1928 i kod vrste *M. fagorum* gde je sadržaj *p*-krezola iznad 90% (Bodner *et al.*, 2016). Odbrambeni sekret Callipodida čine fenolna jedinjenja, a i među redovima Polydesmida i Stemmiulida nalaze se vrste u čijem odbrambenom sekretu ima fenolnih jedinjenja (Shear *et al.*, 2007; Shear *et al.*, 2010; Shear, 2015). Prisustvo fenola u odbrambenom sekretu smatra se simpleziomorfnom osobinom navedenih redova (Bodner *et al.*, 2016). Produkcija fenola započeta je pre oko 315 miliona godina, kada su Callipodida i Chordeumatida divergirale od preostalih Eugnatha (Polydesmida, nadreda Nematophora i Juliformia), ili zasebno kod Callipodida i kod poslednjeg zajedničkog pretka Juliformia, Stemmiulida i Polydesmida, pre oko 275 miliona godina (Rodriguez *et al.*, 2018). Biosintetski put koji vodi od fenola ka hinonima podrazumeva *p*-oksidaciju fenola koja rezultira nastankom hidrohinona, čijom daljom oksidacijom nastaju alkilovani benzohinoni (Raspotnig *et al.*, 2015). Dominantno prisustvo fenola u odbrambenom sekretu nekih julida bi, stoga, bilo rezultat regresije, odnosno gubitka koraka *p*-oksidacije koji vodi ka benzohinonima, što hinonski sekret *P. hungaricus*, bez prisustva fenola čini izvedenom osobinom (Bodner *et al.*, 2016). Promene u biosintetskom putu koje su dovele do nastanka novih odbrambenih supstanci, čijom efikasnošću je omogućena diverzifikacija Juliformia i Polydesmida, redova sa približno 75% svih vrsta diplopoda, verovatno su favorizovane kao odgovor na predatore koji su se adaptirali na fenolnu odbranu (Bodner & Raspotnig, 2012; Rodriguez *et al.*, 2018).

### 5.3.2. Antimikrobna svojstva odbrambenog sekreta *P. hungaricus*

Stonoge, kao i drugi beskičmenjaci koji žive u zemljištu, izložene su mnogim patogenim organizmima (Loker *et al.*, 2004). Kod kosaca je pokazano da je benzohinonski odbrambeni sekret odlika grupa koji žive u površinskim slojevima zemljišta, dok grupe koje nastanjuju vegetaciju poseduju druga jedinjenja kao hemijsku odbranu (Rocha *et al.*, 2013). *P*-benzohinon, odnosno 1,4-benzohinon je u osnovi strukture hinonskih jedinjenja

(Abraham *et al.*, 2011). Hinoni su široko zastupljeni u različitim biološkim sistemima jer funkcionišu kao agensi transfera elektrona u procesima fotosinteze i ćelijske respiracije (Jacini, 1985; Nohl *et al.*, 1986; Monks *et al.*, 1992; Abraham *et al.*, 2011). Fiziološki i toksikološki efekti hinona su mnogobrojni, prevashodno usled njihovog elektrofilnog karaktera što ih čini podložnim nukleofilnom napadu, i njihovog učešća u reverzibilnim oksido-redukcionim reakcijama (El-Najjar *et al.*, 2011). U dosadašnjim istraživanjima, derivati 1,4-benzohinona su ispoljili antimikrobno, antitumorsko, antineoplastično, antimalarijalno, antikoagulantno, insekticidno i herbicidno dejstvo (Martínez & Benito, 2005; Abraham *et al.*, 2011; Mans, 2017; Ilić *et al.*, 2018).

Repelentno, deterentno i antimikrobno dejstvo sekreta čini stonoge „hemijskim donorima“ za nekoliko vrsta primata koji mehanički stresiraju stonoge i nanose sekret po svom telu (Birkinshaw, 1999; Valderrama *et al.*, 2000; Weldon *et al.*, 2003; Weldon, 2004; Zito *et al.*, 2003; Carroll *et al.*, 2005). Korišćenje „hemijskih donora“, koji mogu da budu ne samo stonoge, već i mravi ili drugi socijalni insekti, kao i biljke, primećeno je i kod drugih grupa sisara, i kod ptica, i označava se kao zoo-farmakognozija (Ngbolua *et al.*, 2014). Benzohinonski sekret omogućava primatima kontrolu ektoparazita, deluje kao dezinfektant, pomaže u tretiranju kožnih bolesti i doprinosi poboljšanoj olfaktornoj komunikaciji (Birkinshaw, 1999; Valderrama *et al.*, 2000). Benzohinoni imaju i niz štetnih efekata na kičmenjake, međutim, pretpostavlja se da su potencijalni rizici umanjeni ograničenom dostupnošću stonoga primatima samo tokom kišne sezone, i nadmašeni zaštitom od komaraca i ektoparazita koju obezbeđuje nanošenje sekreta (Valderrama *et al.*, 2000).

U eksperimentima predstavljenim u ovoj tezi, sekret vrste *P. hungaricus* pokazao se najdelotvornijim protiv Gram-pozitivnih bakterija, *Staphylococcus aureus* i *Bacillus subtilis*. Veća podložnost Gram-pozitivnih bakterija pokazana je i u drugim istraživanjima antimikrobnog dejstva sekreta juliformnih stonoga (Billah *et al.*, 2015; Ilić *et al.*, 2018). Gram-negativne bakterije mogu da budu i potpuno otporne na dejstvo sekreta stonoga. Sekret spirostretide *Ophistreptus guineensis* (Silvestri, 1897) i spirobolide *Pachybolus ligulatus* (Voges, 1878) ispoljio je inhibitorno i baktericidno dejstvo protiv testirane Gram-pozitivne *S. aureus*, dok na Gram-negativne bakterije *Klebsiella pneumoniae*,

*Pseudomonas aeruginosa*, i *Escherichia coli* nije bilo dejstva (Billah *et al.*, 2015). Sekreti vrsta *Cylindroiulus boleti*, *Megaphyllum unilineatum* i *M. bosniense* takođe nisu delovali baktericidno na *E. coli*, ali jesu inhibirali njen rast (Ilić *et al.*, 2018), dok je sekret *P. hungaricus* ispoljio i baktericidno dejstvo. U poređenju sa *C. boleti* i *M. bosniense*, *P. hungaricus* je bolji inhibitor *E. coli*, ali je najdelotvorniji sekret vrste *M. unilineatum* (Stanković *et al.*, 2016; Ilić *et al.*, 2018). Efikasnost sekreta može da zavisi od udela hinonskih jedinjenja u sekretu, i od zastupljenosti dimetoksi-*p*-benzohinona (Ilić *et al.*, 2018). Dimetoksi grupa pojačava antibakterijski potencijal *p*-benzohinona (Lana *et al.*, 2006). *P. hungaricus* i *M. unilineatum* imaju veći udeo hinona u sekretu od druge dve julidne vrste. Jedinjenja sa dimetoksi grupama su brojnija kod tri julidne vrste nego kod *P. hungaricus*, što može da bude razlog njihovog izraženijeg inhibitornog i baktericidnog dejstva na Gram-pozitivne bakterije, *B. subtilis* i *S. aureus*.

Gljive su podložnije dejstvu sekreta *P. hungaricus* u odnosu na bakterije. Koncentracije neophodne da se postigne inhibicija rasta i fungicidno dejstvo su bile niže u poređenju sa koncentracijama neophodnim da se postigne antibakterijski efekat, što je slučaj i kod *C. boleti*, *M. bosniense* i *M. unilineatum* (Ilić *et al.*, 2018). *Aspergillus flavus* je jedina testirana gljivica na koju sekret *P. hungaricus* nije imao fungicidno dejstvo, za razliku od sekreta *C. boleti*, *M. bosniense* i *M. unilineatum*. Takođe, hinoni kosaca porodice Gonyleptidae, 2-metil-1,4-benzohinon i 2,5-dimetil-1,4-benzohinon, ispoljavaju veći inhibitorni potencijal prema gljivama nego prema bakterijama (Rocha *et al.*, 2013). Međutim, primenom hinonskog sekreta spirobolide *Orthoporus antillanus* (Pocock, 1894) [= *Orthoporus cavicollis* (Karsch, 1881)] postignuta je inhibicija gljiva *C. albicans* i *Microsporum gypseum* na višim koncentracijama od onih na kojima je inhibiran rast Gram-negativne bakterije *Xanthomonas campestris* (Williams *et al.*, 1997). Sva identifikovana jedinjenja u sekretu ove vrste su hinonska, pri čemu dva najzastupljenija hinona u sekretu julida, 2-metil-1,4-benzohinon i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon čine 96% sekreta.

Odbrambeni sekret je složena smeša hinona, ali i drugih jedinjenja, i njegovu efikasnost mogu da određuju pojedinačne komponente, njihova zastupljenost, kao i sadejstvo (Huth, 2000). Do sada je potvrđeno antimikrobno dejstvo nekoliko hinonskih jedinjenja. Kod kosaca je pokazano da su minorne hinonske komponente 2,5-dimetil-

benzohinon i 2,3,5-trimetil-benzohinon više doprinele bakteriostatičkom dejstvu sekreta u odnosu na glavnu komponentu (Fieser & Ardao, 1956). Toluhinon, odnosno 2-metil-1,4-benzohinon, izolovan iz sekreta kosaca, ispoljio je umereno dejstvo na dve Gram-pozitivne bakterije i na gljivicu *Candida albicans*. Isto jedinjenje, izolovano iz sekreta tvrdokrilca *Melolontha hippocastani* Fabricius, 1801 delovalo je inhibitorno i na Gram-negativnu *E. coli*, na *Saccharomyces cerevisiae* i dve vrste entomopatogenih gljiva (Ruther *et al.*, 2001). Jedinjenje 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon, jedno od dominantnih hinona odbrambenog sekreta većine julida, pa i *P. hungaricus* ulazi u sastav antibiotika mimosamicina (González *et al.*, 2006).

Na ispoljavanje antimikrobnog potencijala može da utiče i način pripreme sekreta za testiranje. U studiji antibakterijskog dejstva sekreta spirostreptide i spirobolide, u kojoj nije došlo do inhibicije Gram-negativnih bakterija, ekstrakt sekreta pripremljen je rastvaranjem praha dobijenog mlevenjem isušenih celih tela stonoga (Billah *et al.*, 2015), dok je u studiji julidnih vrsta (Stanković *et al.*, 2016; Ilić *et al.*, 2018) korišćen ekstrakt odbrambenog sekreta, prikupljen nakon uznemiravanja stonoge.

S obzirom da je u sastavu sekreta *P. hungaricus* i drugih proučavanih julidnih vrsta prisutna i estarska komponenta, može da se pretpostavi da i oni dopinose antimikrobnom dejstvu. Masne kiseline C<sub>10</sub>-C<sub>12</sub> su ispoljile antifungalno dejstvo prema *C. albicans*, ali ne i metil i etil estri masnih kiselina srednjeg i dugog niza, jer je -OH funkcionalna grupa neophodna za biološku aktivnost (Souza *et al.*, 2014). Međutim, etil estri n-6, n-7 i n-9 masnih kiselina inhibirali su rast *C. albicans*, dok su metil estri ovih kiselina postigli inhibiciju rasta bakterija (Huang *et al.*, 2010). S obzirom da *M. bosniense* ispoljava antimikrobno dejstvo u opsegu koncentracija koje su slične delotvornim koncentracijama sekreta drugih julida sa dominacijom hinona, i na procentualnu zastupljenost estara od preko 80% i 90% u odbrambenom sekretu ove vrste (Ilić *et al.*, 2018), može da se pretpostavi da i sami estri poseduju antimikrobna svojstva. Estri mogu i posrednim putem da ispoljavaju antimikrobno dejstvo, pospešujući dejstvo hinona i drugih komponenti, a time i antimikrobni potencijal (Shimizu *et al.*, 2012).

Razlika u podložnosti Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija zasnovana je na razlikama u strukturi ćelijskog zida. Ćelijski zid Gram-pozitivnih bakterija, izgrađen od



poroznih peptidoglikanskih slojeva, permeabilan je za hidrofobne molekule koji mogu da imaju dejstvo na ćelijsku membranu, zid i unutrašnjost citoplazme (Ristivojević *et al.*, 2016, Kashef *et al.*, 2017). Gram-negativne bakterije poseduju spoljašnju ćelijsku membranu, izgrađenu od fosfolipidnog dvosloja sa lipopolisaharidima koji su okrenuti ka vanćelijskoj sredini. Između spoljašnje i unutrašnje membrane, nalazi se periplazmatski prostor, sa tankim slojem peptidoglikana. Obe membrane su povezane preko periplazmatskog prostora transmembranskim proteinskim kompleksima (Chatterjee & Chaudhuri, 2012). Periplazma je uključena u mnoge procese, poput proteinskog transporta, proteinske oskidacije, sekvestracije enzima koji mogu da budu toksični u citoplazmi. Veličina periplazmatskog prostora, odnosno međumembranska razdaljina ima biološki značaj i od kritične je važnosti za procenu oštećenja spoljašnje membrane i za određivanje dužine flagelnog periplazmičkog rotora, koji kontroliše pokretljivost (Miller & Salama, 2018). Spoljašnja membrana, koja je verovatno evoluirala sa funkcijom sprečavanja prodora antibiotičkih supstanci produkovanih u multispecijskim mikrobijalnim zajednicama, omogućava i unos rastvorljivih nutrijenata kroz proteinske kanale, porine (Miller, 2016). Prolaz hidrofobnim molekulima je onemogućen ili usporen kroz hidrofilne transmembranske porinske kanale (Nazzaro *et al.*, 2013). Strukturna specifičnost i složenost ćelijskog zida Gram-negativnih bakterija podržava sticanje mnogobrojnih funkcija koje su osnova njihove otpornosti.

Pored zaštitne barijere u vidu ćelijskog zida, obe grupe bakterija poseduju i efluksne pumpe, mada su supstrati na koje deluju, priroda transportera i regulacija pumpi bolje proučene kod Gram-negativnih bakterija (Baranova & Elkins, 2016). Efluksne pumpe su membranski transportni proteini koji izbacuju supstance iz ćelije, preko spoljašnje membrane, i mogu biti specifični za određeni supstrat ili delovati na strukturno različita jedinjenja (Chitsaz & Brown, 2017). Delotvornost efluksnih pumpi je potvrđena u eksperimentu u kome je biološka aktivnost biljnih antimikrobnih supstanci pojačana nakon inhibiranja dejstva pumpi (Tegos *et al.*, 2002). Aktivni efluks i minimiziran pasivni unos, infleks, supstanci omogućen složenim ćelijskim zidom, predstavljaju efikasne mehanizme za razvoj otpornosti na različite antibiotičke supstance (Nikaido & Pagés, 2012). Pretpostavlja se da su ove barijerne osobine bakterija i građa ćelijskog zida osnova i

njihove izraženije otpornosti u odnosu na gljive. Mehanizmi na kojima je zasnovano antifungalno dejstvo sekreta *C. boleti*, *M. bosniense* i *M. unilineatum* podrazumevaju inhibiciju sporulacije i sinteze melanina, koji učestvuje u procesima stvaranja otpornosti i nastanka imunog odgovora (Ilić *et al.*, 2018), što se može reći i za analizirani model sistem Benzoeva kiselina i benzoil cijanid odbrambenog sekreta Polydesmida deluju tako što inhibiraju germinaciju spora (Roncadori *et al.*, 1985).

Antimikrobni efekat zavisi od velikog broja faktora, kao što su sastav odbrambenog sekreta, dominantna jedinjenja, kvalitativna i kvantitativna zastupljenost jedinjenja u sekretu, ali i vrste bakterija i gljiva (Roncadori *et al.*, 1985; Ilić *et al.*, 2018). Odbrambena jedinjenja mnogih vrsta artropoda ispoljavaju antimikrobno dejstvo uporedivo sa komercijalnim medicinskim sredstvima, što čini opravdanim dalja istraživanja u pravcu njihove identifikacije, izolovanja i testiranja biološke aktivnosti.

#### **5.4. Povezanost ponašanja i morfoloških osobina sa uspešnošću u parenju kod vrste *P. hungaricus***

Sekvence prekopulatornog ponašanja uočene kod vrste *P. hungaricus* opisane su i kod nekoliko drugih, do sada proučavanih, juliformnih vrsta: julida *Cylindroiulus puctatus* (Leach, 1815) (Haacker & Fuchs, 1970), *Ommatoiulus moreletii* (Lucas, 1860) (Carey & Bull, 1986) i *Aniulus bollmani* Causey, 1952 (Mathews & Bultman, 1993), zatim, kod spirostreptide *Alloporus uncinatus* Attems, 1914 (Telford & Dangerfield, 1993a; Barnett *et al.*, 1995), šest tropskih vrsta spirostreptida (Telford & Dangerfield, 1993b) i spirobolide *Centrobolus sp.* (Cook, 1897) (Cooper & Telford, 2000). Takođe, i druge grupe diplopoda koje poseduju gonopode kao intromitentne organe ispoljavaju slično ponašanje prilikom iniciranja parenja, kao što je slučaj kod hordeumatide *Craspedosoma sp.* Leach, 1814 (Tadler, 1993) i polidezmidida *Parafontaria sp.* Verhoeff, 1936 (Tanabe & Sota, 2008) i *Cladethosoma clarum* (Chamberlin, 1920) (Rowe, 2010).

Da bi mužjaci julida mogli da održe svoju poziciju na glatkoj površini tela ženke, na femuru i tibiji nogu nalaze se jastučasta ispučenja (Minelli & Michalik, 2015). Kada se mužjak pozicionira prema ventralnoj strani tela ženke, pričvršćuje se svojim

modifikovanim prvim parom nogu kukastog oblika za njen usni region. Receptivna ženka će izvući svoje vulve iz vulvalnih kesa, što ih čini dostupnim gonopodama mužjaka. Mada mužjak inicira kontakt, naš eksperiment je pokazao da ženka može da ga prekine u bilo kom momentu tokom prekopulatornog ponašanja. Naime, spiralnim uvijanjem tela, ženka onemogućava mužjaku da se kreće po dorzalnoj strani njenog tela, a savijanjem glave, onemogućava pristup ventralnoj strani. Takođe, može da se desi da, i nakon okretanja ventralne strane tela ka mužjaku, ne dođe do izvlačenja vulvi iz kesa.

Kretanje mužjaka po dorzalnoj strani tela ženke nije deo prekopulatornog ponašanja svih julidnih vrsta. Mužjak vrste *Julus scandinavus* Latzel, 1884 uzdiže prednji, ventralni deo tela, izlažući izraštaje koksi II para nogu kroz koje se luči sekret koksalnih žlezda (Haacker, 1969b). Ženka se hrani sekretom mužjaka, podižući prednji deo svog tela, čime je omogućena kopulacija. Sličan prekopulatorni proces zabeležen je i kod hordeumatide *Chordeuma sylvestre* C. L. Koch, 1847 (Haacker, 1974). Mužjak ove vrste poseduje žlezde duž dorzalnog hipodermisa. Ženka usnim aparatom preuzima sekret i zauzima položaj koji omogućava mužjaku pristup njenim vulvama. Post-telopodalne žlezde (čiji se otvori nalaze između telopoda i analnog otvora) mužjaka nekih glomerida takođe luče sekret koga ženka detektuje gustatornim receptorima usnih delova, dok mužjak inserira telopode u vulve (Haacker, 1974). Sekret može da se luči tokom parenja, kao što je slučaj kod spirobolide *Centrobolus sp.*, pri čemu mužjak luči sekret iz mandibularnog regiona, koji curi preko glavenog regiona dela ženke (Cooper & Telford, 2000). Pored toga, formiranje „genitalne ogrlice“ može da se smatra sekvencom prekopulatornog ponašanja mužjaka (Cooper & Telford, 2000). „Genitalna ogrlica“, koja nastaje na mestu genitalnog kontakta izvrtanjem i uvećanjem kutikularnih slojeva segmenta VII sa gonopodama, pokreće se u hidropneumatičnom ritmu tokom kopulacije. U testovima parenja vrste *P. hungaricus* nije detektovano prisustvo sekreta ili drugih specifičnosti koje bi imale funkciju privlačenja ženke.

Strategija koju mužjaci stonoga koriste u kompeticiji za partnere je opisana kao aktivna potraga za partnerom (Telford & Dangerfield, 1993a; Rowe, 2010; Holwell *et al.*, 2016). U ovom slučaju, uspešnost mužjaka u parenju zavisi od njegove sposobnosti da locira ženku, što ga čini aktivnijim polom (Kokko *et al.*, 2014; Foley *et al.*, 2018).

Posmatranjem dnevne aktivnosti vrste stonoge *Zephronia cf. viridescens* Attems, 1936, utvrđeno je da su tokom dana mužjaci provodili najviše vremena u kretanju, dok su ženke više vremena provodile hraneći se (Wongthamwanich *et al.*, 2012).

Dihotomija između mužjaka i ženki u dominantnim aktivnostima tokom dana detektovana je i kod polidezmidne *C. clarum* (Rowe, 2010). Ženke ove polidezmidne vrste, krupnije u odnosu na mužjake, provode i duži period u ishrani u odnosu na suprotan pol. S druge strane, mužjaci poseduju duže noge od ženki, što im omogućava veću brzinu prilikom kretanja (Manton, 1973). Ova morfološka osobina je važna za sam način života vrsta reda Polydesmida, koje se često skrivaju u pukotinama, i čije se široko, ravno telo povlači unapred upravo dugim, snažnim nogama (Hopkin & Read, 1992; Golovatch & Kime, 2009; Koch, 2015b). Brzina kretanja i kratko trajanje parenja (svega nekoliko minuta), su komponente reproduktivne strategije mužjaka vrste *C. clarum*, koja se zasniva na povećavanju verovatnoće susreta sa većim brojem ženki.

Mušjaci nekoliko vrsta Juliformia mogu da produže trajanje kopulacije, što je deo reproduktivne strategije kojom se obezbeđuje prednost poslednjeg mužjaka u procesu spermalne kompeticije (Telford & Dangerfield, 1990; Telford & Dangerfield, 1993a; Alcock, 1994). U našem eksperimentu je utvrđeno da prosečna vrednost trajanja parenja iznosi oko 60 min, sa maksimalnom vrednošću od 225 min. Mušnjaci spirostreptide *Alloporus uncinatus* produžavaju trajanje parenja u zavisnosti od operacionalnog odnosa polova, tj. u prisustvu većeg broja mužjaka (Telford & Dangerfield, 1990). Operacionalni odnos polova predstavlja odnos broja polno zrelih mužjaka prema prema broju ženki koje su dostupne za parenje u određenom periodu i na određenoj lokaciji (Kokko *et al.*, 2014). Ukoliko ovaj odnos ukaže na veći broj pripadnika jednog pola spremnih za parenje u odnosu na pripadnike drugog pola, može doći do izraženije kompeticije unutar zastupljenijeg pola (Aronsen *et al.*, 2013).

Tokom kopulacije, mužjaci *A. uncinatus* manipulišu svojom spermom, postavljajući je u distalni deo spermateke, gde se uspostavlja veza sa oviduktom, što će im obezbediti prednost u spermalnoj kompeticiji (Barnett & Telford, 1994). Da bi mužjak mogao da izmešta spermom drugih mužjaka i postavlja svoju spermom u reproduktivni trakt ženke, na mestu gde je najveća verovatnoća da će se oploditi jaja, neophodno je da na gonopodama

postoje izraštaji različitih oblika koji će im to omogućiti, kao i da postoji podudarnost veličine i oblika genitalnih struktura ženke i mužjaka (Barnett *et al.*, 1993; Tanabe & Sota, 2008; Wojcieszek & Simmons, 2011). Međutim, i ženke diplopoda mogu da posreduju u procesu manipulacije spermom (Barnett *et al.*, 1995). Ukoliko se, kod *A. uncinatus*, dva parenja odvijaju sukcesivno jedno za drugim, ejakulati oba mužjaka će biti uskladišteni u istoj zapremini unutar spermateke, ali kada između dva parenja protekne 24 h, značajno se smanjuje zapremina ejakulata poreklom od prvog mužjaka. U tom slučaju, ženke apsorpcijom i/ili odbacivanjem ejakulata utiču na uspeh mužjaka u ostavljanju potomstva (Barnett *et al.*, 1995).

*Pachyiulus hungaricus* pripada izvedenoj grupi u okviru porodice Julidae, koja pored promerita i opistomerita, poseduje i mezomerit kao apomorfnu karakteristiku (Tadler, 1996). Kod *Cylindroiulus boleti* (C. L. Koch, 1847) i *Unciger foetidus* (C. L. Koch, 1838) promerit i mezomerit formiraju strukture kojima se vulve izvlače iz vulvalnih kesa. Smatra se da promerit ne učestvuje direktno u transferu sperme, već se njime povlači operkulum, nabor burze vulve koji pokriva gonoporu sa anteriorne strane (Tadler, 1996; Koch, 2015a). U našem eksperimentu, veličina i oblik promerita gonopoda između sparenih i nesparenih mužjaka *P. hungaricus* nisu se značajno razlikovali, što bi moglo da dovede do zaključka da ova struktura nije pod dejstvom selekcije. Međutim, kod vrste *Megaphyllum bosniense* (Verhoeff, 1897) razlika u obliku promerita gonopoda između sparenih i nesparenih mužjaka je bila značajna (Vujić *et al.*, 2018).

U testovima izbora (kako mužjaka, tako i ženki), utvrđena je prednost partnera koji se prethodno pario sa istom jedinkom, kako po broju iniciranih kontakata, tako i po broju ostvarenih parenja. „Novi“ mužjaci *P. hungaricus* inicirali su približno trećinu svih kontakata. Preferenca prema prvobitnim partnerima utvrđena je i kod ženki *A. uncinatus* (Telford & Dangerfield, 1993a), kao i kod mužjaka i ženki julide *M. bosniense* (Vujić *et al.*, 2018).

Kod vrsta kod kojih ženke primaju „hranjive poklone“ od mužjaka tokom procesa udvaranja, prvi partner može da bude u prednosti u odnosu na novog, ukoliko može više puta da obezbedi kvalitetne resurse u odgovarajućim količinama (Tuni & Bilde, 2010). Ukoliko se više puta pare sa istom ženkom, mužjaci pauka *Pisaura mirabilis* (Clerck, 1757)

povećavaju verovatnoću da ostave potomstvo, jer se višestrukim parenjima povećava količina ejakulata u receptakulumu (Tuni & Bilde, 2010). S druge strane, parenjem sa različitim mužjacima, obezbeđuje se genetička varijabilnost (Tuni & Bilde, 2010). Preferenca prema „novim“ partnerima (različitim od onih iz prvog i/ili prethodnih parenja) utvrđena je kod različitih artropoda (Bateman, 1998; Zeh *et al.*, 1998; Archer & Elgar, 1999; Ivy *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2014).

Kod različitih vrsta, izbor partnera zavisi od različitih kriterijuma. Kod spirostreptide *A. uncinatus*, mužjaci krupnog tela su učestvovali u približno 60% parenja (Telford & Dangerfield, 1993a). Veličina tela je uticala na uspeh u parenju oba pola kod polidezmiđe *Nyssodesmus python* (Peters, 1864), pri čemu su krupnije jedinke ostvarile značajno više kopulacija u odnosu na sitnije (Burns, 2005). U našem eksperimentu nisu utvrđene značajne razlike u analiziranim linearnim merama veličine tela, nogu ili antena između sparenih i nesparenih jedinki, odnosno, ove osobine nisu bile korelisane sa uspehom u parenju. Međutim, kod julide *M. bosniense*, ženke koje su se parile bile su duže, veće telesne mase i imale su veće vrednosti veličine centroida glave u odnosu na ženke koje se nisu parile (Vujić *et al.*, 2018). Kod *P. hungaricus*, u ovom eksperimentu, pod uticajem prekopulatorne seksualne selekcije je bio samo oblik nogu. Ovakav rezultat može da bude objašnjen činjenicom da, pored dodirivanja antenama, taktilni stimuli jastučića nogu mogu da budu važni u prenošenju informacija tokom kretanja mužjaka po dorzalnoj strani tela ženke (Haacker, 1974).

Prilikom prepoznavanja partnera sa kojim je ostvareno prethodno parenje, mogu da se koriste i hemijski signali. Ženke pseudoskorprije *Cordylochernes scorpioides* (Linnaeus, 1758) ostavljaju hemijske „markere“ na telu mužjaka sa kojima su se parile i odbijaju ih 1.5 h nakon parenja, ali ne i nakon 48 h, verovatno usled njihovog razlaganja (Zeh *et al.*, 1998). Hemosenzorna identifikacija mužjaka sa kojima je ostvareno prethodno parenje detektovana je i kod ženki *Grylloides sigillatus* (Walker, 1869), a zasnovana je verovatno na varijabilnosti u kutikularnim ugljovodonicima (Ivy *et al.*, 2005). Kod julide *Ommatoiulus moreleti* neophodno je da jedinke uspostave kontakt, da bi se ispoljila „zainteresovanost“ i tipično prekopulatorno ponašanje, što upućuje da signal može poteći od jedinjenja kutikule ženki (Carey & Bull, 1986). U tom smislu, prekopulatorna

informacija o statusu parenja, kao i o kvalitetu i/ili kompatibilnosti partnera za parenje može da bude sadržana u različitim tipovima signala, koji mogu da budu olfaktorne, gustatorne, akustične, mehaničke ili taktilne prirode. Da bi se odredilo na koji način se vrši diskriminacija između prethodnog i novog partnera kod *P. hungaricus*, opisana u ovoj studiji, neophodno je da se ispituju različiti potencijalni stimuli tokom reproduktivnog ponašanja, poput olfaktornih/gustatornih profila i mehaničke/akustične/taktilne stimulacije.

## 6. ZAKLJUČCI

Na osnovu rezultata istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji mogu da se rezimiraju sledeći zaključci:

- Kod vrste *P. hungaricus* je utvrđeno da je tip postembrionalnog razvića euanamorfoza;
- Identifikovani su i opisani stadijumi kasne postembriogeneze kod analizirane vrste. Ovaj period euanamorfoze obuhvata četiri ili pet stadijuma do dostizanja polne zrelosti;
- Rudimenti gonopoda se javljaju na stadijumu VIII, a vulvi na stadijumu VII. Polna zrelost kod ženki se javlja na stadijumu XI. Mužjaci mogu da dostignu polnu zrelost na istom ili kasnijim stadijumima. U zavisnosti od toga, kasna postembriogeneza kod *P. hungaricus* obuhvata četiri ili više stadijuma;
- U distinkciji postembrionalnih stadijuma tokom kasne postembriogeneze, osobina sa najvećim informacionim značajem je broj nizova ocela. Registrovana je značajna varijabilnost u navedenom periodu anamorfoze u pogledu dodavanja segmenata sa nogama i bez nogu, nogu za hodanje, ali i linearnim merama, te navedene osobine nemaju relevantnost u razdvajanju stadijuma, kako je pokazano kod nekih drugih julidnih taksona;
- Utvrđene su segmentne formule za oba pola tokom kasne postembriogeneze. Najveća varijabilnost segmentnih formula registrovana je kod ženki na stadijumu VIII (6 segmentnih formula), a kod mužjaka na stadijumu XI (7 segmentnih formula);
- Odbrambene žlezde kod *P. hungaricus* pripadaju julidnom tipu i sastoje se od tri morfološke celine: rezervoara koji se sužava u region kutikularnih navoja i nastavlja u izvodni kanal, koji se otvara ozoporom ka spoljašnjoj sredini;
- Zid žlezde čine: bazalna lamina sa spoljašnje strane, višćelijski sekretorni sloj i kutikularni slojevi ka lumenu žlezde;



- U zidu rezervoara detektovane su tubule, kao i veći kanali koji verovatno predstavljaju sabirne kanale, u koje tubule ulivaju svoj sadržaj. Iz većih kanala sekret dospeva u lumen rezervoara, što upućuje na merokrini način sekrecije;
- U višćelijskom sekretornom sloju identifikovani su mnogobrojni tipovi sekretornih i pigmentnih granula, koji verovatno predstavljaju stupnjeve sazrevanja sekreta;
- Hemijski profil odbrambenog sekreta analizirane vrste čine dominantni hinoni i estri zasićenih i nezasićenih masnih kiselina dugog niza. Relativni udeo hinona kod mužjaka iznosi 94.7%, a estara 5.3%, dok, kod ženki, hinoni čine 87.3%, a estri 12.7% sekreta;
- Dominantna jedinjenja kod oba pola su 2-metil-1,4-benzohinon (toluhinon), sa relativnim udelom od 30.2% kod mužjaka, i 36.8% kod ženki; i 2-metoksi-3-metil-1,4-benzohinon, sa 36.3% kod mužjaka i 43.1% kod ženki. Registrovane razlike među polovima ogledaju se uglavnom u razlikama u procentualnoj zastupljenosti identifikovanih hinonskih i estarskih komponenti sekreta;
- Odsustvo fenola u sekretu analizirane vrste ukazuje na apomorfnost sastava sekreta.
- Hemoprofil kod *P. hungaricus* je specifičan za vrstu i razlikuje se od svih do sada opisanih profila juliformnih stonoga, što je u skladu sa dosadašnjim istraživanjima sekreta Juliformia u kojima je pokazano da ne postoje identični hemoprofil odbrambenih sekreta;
- Utvrđeno je da su dejstvu odbrambenog sekreta analizirane vrste podložnije gljive u odnosu na bakterije;
- Ekstrakt odbrambenog sekreta deluje inhibitorno na rast testiranih bakterijskih sojeva, kao i baktericidno. Bakterije se razlikuju u odnosu na podložnost dejstvu sekreta, pri čemu su Gram-negativni sojevi otporniji u poređenju sa Gram-pozitivnim sojevima. Komercijalni antibiotik rifampicin je delotovorniji u inhibiciji rasta patogenih bakterija u odnosu na ekstrakt sekreta, sem u slučaju soja *Listeria monocytogenes*;
- Inhibicija rasta i fungicidno dejstvo ekstrakta sekreta je postignuto nižim koncentracijama u odnosu na komercijalni fungicid flukonazol. Gljive, kao i bakterije, iskazuju različit stepen osetljivosti na dejstvo sekreta, pri čemu su

najotpornije *Aspergillus flavus*, *Penicillium sp.*, a najpodložnije *Fusarium equiseti* i *Gliocladium roseum*;

- Prekopulatorno ponašanje vrste *P. hungaricus* sastoji se od nekoliko jasno definisanih etapa. U testovima izbora mužjaka i ženki, utvrđena je preferenca jedinki oba pola prema partneru sa kojim su se jedinke prethodno parile u testu označenom kao arena za parenje;
- Vreme proteklo od uspostavljanja kontakta između jedinki i početka parenja se značajno razlikovalo između testa „arena za parenje“ i testa izbora mužjaka, kao i između testa „arena za parenje“ i testa izbora ženki. U oba testa izbora, bilo je neophodno više vremena kako bi kontakt uspostavljen između jedinki doveo do parenja u poređenju sa testom označenim kao arena za parenje;
- Utvrđena je značajna razlika u obliku nogu između sparenih i nesparenih mužjaka, dok razlika u obliku promerita gonopoda nije bila značajna. Oblik nogu bi mogao da bude povezan sa delotvornijom taktilnom stimulacijom ženke tokom prekopulatornog procesa.

## 7. LITERATURA

- Abraham, I., Joshi, R., Pardasani, P., Pardasani, R. T. (2011) Recent advances in 1, 4-benzoquinone chemistry. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 22(3), 385–421.
- Abràmoff, M. D., Magalhães, P. J., Ram, S. J. (2004) Image processing with ImageJ. *Biophotonics International*, 11(7), 36–42.
- Akkari, N., Enghoff, H. (2011a) On some surface structures of potential taxonomic importance in families of the suborders Polydesmidea and Dalodesmidea (Polydesmida, Diplopoda). *ZooKeys*, 156, 1–24.
- Akkari, N., Enghoff, H. (2011b) Copulatory-copulatory male succession and male slenderness in *Ommatoiulus sempervirilis* n. sp., a new insular millipede from Tunisia (Diplopoda: Julida: Julidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 49(4), 285–291.
- Alcock, J. (1994) Postinsemination associations between males and females in insects: the mate-guarding hypothesis. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 1–21.
- Ambarish, C. N., Sridhar, K. R. (2014) Moulting behaviour of the giant pill-millipedes (Sphaerotheriida: Arthrosphaera) of the Western Ghats of India: an ex situ study. *Lepcey-The Journal of Tropical Asian Entomology*, 3(1), 12–22.
- Amos, W., Worthington Wilmer, J., Fullard, K., Burg, T. M., Croxall, J. P., Bloch, D., Coulson, T. (2001) The influence of parental relatedness on reproductive success. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1480), 2021–2027.
- Andersson, J., Borg-Karlson, A. K., Wiklund, C. (2000) Sexual cooperation and conflict in butterflies: a male-transferred anti-aphrodisiac reduces harassment of recently mated females. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267(1450), 1271–1275.
- Andrés, J. A., Rivera, A. C. (2000) Copulation duration and fertilization success in a damselfly: an example of cryptic female choice? *Animal Behaviour*, 59(4), 695–703.

- Arab, A., Zacarin, G. G., Fontanetti, C. S., Camargo-Mathias, M. I., Dos Santos, M. G., Cabrera, A. C. (2003) Composition of the defensive secretion of the Neotropical millipede *Rhinocricus padbergi* Verhoeff 1938 (Diplopoda: Spirobolida: Rhinocricidae). *Entomotropica*, 18(2), 79–82.
- Archer, M. S., Elgar, M. A. (1999) Female preference for multiple partners: sperm competition in the hide beetle, *Dermestes maculatus* (DeGeer). *Animal Behaviour*, 58(3), 669–675.
- Arnqvist, G., Rowe, L. (1995) Sexual conflict and arms races between the sexes: a morphological adaptation for control of mating in a female insect. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 261(1360), 123–127.
- Arnqvist G, Danielsson I (1999). Copulatory behavior, genital morphology, and male fertilization success in water striders. *Evolution*, 53(1), 147–156.
- Arnqvist, G., Nilsson, T. (2000) The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, 60(2), 145–164.
- Aronsen, T., Mobley, K. B., Berglund, A., Sundin, J., Billing, A. M., Rosenqvist, G. (2013) The operational sex ratio and density influence spatial relationships between breeding pipefish. *Behavioral Ecology*, 24(4), 888–897.
- Attygalle, A. B., Xu, S. C., Meinwald, J., Eisner, T. (1993) Defensive secretion of the millipede *Floridobolus penneri*. *Journal of Natural Products*, 56(10), 1700–1706.
- Baranova, N., & Elkins, C. A. (2016) Antimicrobial Drug Efflux Pumps in Other Gram-Positive Bacteria. In: Li, X-Z, Elkins, C. A., Zgurskaya, H. I. (Eds.), *Efflux-mediated antimicrobial resistance in bacteria*. Basel: Springer Nature, pp. 197–218.
- Barbosa, F. (2011) Copulation duration in the soldier fly: the roles of cryptic male choice and sperm competition risk. *Behavioral Ecology*, 22(6), 1332–1336.
- Barnett, M., Telford, S. R., de Villiers, C. J. (1993) Sperm displacement in a millipede? An investigation into the genital morphology of the southern African spirostreptid millipede *Orthoporus pyrhocephalus*. *Journal of Zoology*, 231(3), 511–522.
- Barnett, M., Telford, S. R. (1994) The timing of insemination and its implications for sperm competition in a millipede with prolonged copulation. *Animal Behaviour*, 48(2), 482–484.

- Barnett, M., Telford, S. R., Tibbles, B. J. (1995) Female mediation of sperm competition in the millipede *Alloporus uncinatus* (Diplopoda: Spirostreptidae). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 36(6), 413–419.
- Barnett, M., Telford, S. R. (1996) Sperm competition and the evolution of millipede genitalia. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*, 169, 331–339.
- Bateman, P. W. (1998) Mate preference for novel partners in the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Ecological Entomology*, 23(4), 473–475.
- Béhal, A., Phisalix, M. C. (1900) La quinone, principe actif du vénéin du *Julus terrestris*. *Comptes Rendus de la Société de Biologie, Paris*, 52, 1036–1038.
- Bensch, S., Hasselquist, D., Nielsen, B., Hansson, B. (1998) Higher fitness for philopatric than for immigrant males in a semi-isolated population of great reed warblers. *Evolution*, 52(3), 877–883.
- Bergmann, J., González, A., Zarbin, P. H. (2009) Insect pheromone research in South America. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(7), 1206–1219.
- Billah, M. K., Kwang, D., Adofo, C., Olu-Taiwo, M. A., Pesewu, G. A. (2015) Antibacterial activities of millipede extracts against selected bacterial pathogens. *Journal of Microbiology and Antimicrobial Agents*, (2), 30–35.
- Billen, J. (2011) Exocrine glands and their key function in the communication system of social insects. *Formosan Entomologist*, 31(2), 75–84.
- Birkinshaw, C. R. (1999) Use of millipedes by black lemurs to anoint their bodies. *Folia Primatologica*, 70(3), 170–171.
- Blanke, A., Wesener, T. (2014) Revival of forgotten characters and modern imaging techniques help to produce a robust phylogeny of the Diplopoda (Arthropoda, Myriapoda). *Arthropod Structure & Development*, 43(1), 63–75.
- Blower, J. G., Fairhurst, C. P. (1968) Notes on the life-history and ecology of *Tachypodoiulus niger* (Diplopoda, Iulidae) in Britain. *Journal of Zoology*, 156(2), 257–271.
- Blower, J. G. (1970) The millipedes of a Cheshire wood. *Journal of Zoology*, 160(4), 455–496.

- Blower, J. G. (1974) The distribution of British millipedes as known up to 1970. *Symposia of the Zoological Society of London*, 32, 603–609.
- Blower, J. G., Miller, P. F. (1977) The life-history of the julid millipede *Cylindroiulus nitidus* in a Derbyshire wood. *Journal of Zoology*, 183(3), 339–351.
- Blower, J. G. (1985) *Millipedes: Keys and Notes for the Identification of the Species. Volume 35*. The Linnean Society of London and the Estuarine and Brackish – Water Sciences Association. London: E. J. Brill/Dr. W. Backhuys.
- Blum, M. S. (1981) *Chemical Defenses of Arthropods*. London, New York: Academic Press.
- Blums, P., Clark, R. G. (2004) Correlates of lifetime reproductive success in three species of European ducks. *Oecologia*, 140(1), 61–67.
- Bodner, M., Raspotnig, G. (2012) Millipedes that smell like bugs: (E)-alkenals in the defensive secretion of the julid diplopod *Allajulus dicentrus*. *Journal of Chemical Ecology*, 38(5), 547–556.
- Bodner, M., Vagalinski, B., Makarov, S. E., Antić, D. Ž., Vujisić, L. V., Leis, H. J., Raspotnig, G. (2016) “Quinone millipedes” reconsidered: evidence for a mosaic-like taxonomic distribution of phenol-based secretions across the Julidae. *Journal of Chemical Ecology*, 42(3), 249–258.
- Borrell, B. J. (2004) Mechanical properties of calcified exoskeleton from the neotropical millipede, *Nyssodesmus python*. *Journal of Insect Physiology*, 50(12), 1121–1126.
- Borriss, R., Danchin, A., Harwood, C. R., Medigue, C., Rocha, E. P., Sekowska, A., Vallenet, D. (2018) *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement. *Microbial biotechnology*, 1(1), 3–17.
- Brewer, M. S., Bond, J. E. (2013) Ordinal-level phylogenomics of the arthropod class Diplopoda (millipedes) based on an analysis of 221 nuclear protein-coding loci generated using next-generation sequence analyses. *PLoS ONE*, 8(11), e79935.
- Buch, A. C., Sisunno, C. L. S., Correia, M. E. F., Silva-Filho, E. V. (2018) Food preference and ecotoxicological tests with millipedes in litter contaminated with mercury. *The Science of the Total Environment*, 633, 1173–1182.

- Buden, D. W., Attygalle, A., Wu, X. (2004) Distribution of the Chuuk Islands giant millipede, *Acladocricus setigerus* (Spirobolida: Rhinocricidae), and identification of its defensive compounds. *Pacific Science*, 58(4), 625–636.
- Burns, M. (2005) The role of size and defensive compounds in mate choice by *Nyssodesmus python* (Polydesmida: Platyrrhacidae). Report. Tampa, FL, USA: University of South Florida. <http://digital.lib.usf.edu/SFS0001374/00001>.
- Carrel, J. E. (1984) Defensive secretion of the pill millipede *Glomeris marginata*. *Journal of Chemical Ecology*, 10(1), 41–51.
- Carrel, J. E., Eisner, T. (1984) Spider sedation induced by defensive chemicals of millipede prey. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(3), 806–810.
- Carey, C. J., Bull, C. M. (1986) Recognition of mates in the Portuguese millipede, *Ommatoiulus moreletii*. *Australian Journal of Zoology*, 34(6), 837–842.
- Carroll, J. F., Kramer, M., Weldon, P. J., Robbins, R. G. (2005) Anointing chemicals and ectoparasites: effects of benzoquinones from millipedes on the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Journal of Chemical Ecology*, 31(1), 63–75.
- Cator, L. J., Zanti, Z. (2016) Size, sounds and sex: interactions between body size and harmonic convergence signals determine mating success in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, 9(1), 622.
- Chapman, R. F. (1998) *The Insects: Structure and Function: Fourth Edition*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Charpentier, M., Setchell, J. M., Prugnolle, F., Knapp, L. A., Wickings, E. J., Peignot, P., Hossaert-McKey, M. (2005) Genetic diversity and reproductive success in mandrills (*Mandrillus sphinx*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(46), 16723–16728.
- Chatterjee, S. N. & Chaudhuri, K. (2012) *Outer Membrane Vesicles of Bacteria*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Cheong, S. P., Huang, J., Bendena, W. G., Tobe, S. S., Hui, J. H. (2015) Evolution of ecdysis and metamorphosis in arthropods: the rise of regulation of juvenile hormone. *Integrative and Comparative Biology*, 55(5), 878–890.

- Chitsaz, M., & Brown, M. H. (2017) The role played by drug efflux pumps in bacterial multidrug resistance. *Essays in Biochemistry*, 61(1), 127–139.
- Clawson, R. C. (1988) Morphology of defense glands of the opilionids (daddy longlegs) *Leiobunum vittatum* and *L. flavum* (Arachnida: Opiliones: Palpatores: Phalangiidae). *Journal of Morphology*, 196(3), 363–381.
- Cook, O. F. (1900) Camphor secreted by an animal (*Polyzonium*). *Science*, 12(301), 516–521.
- Compère, P., Defize, S., Goffinet, G. (1996) Cytochemistry of the tergite epicuticle of *Glomeris marginata* (Villers) (Myriapoda, Diplopoda): preliminary experimental results. *Mémoires du Muséum d'Histoire Naturelle (Paris)-Acta Myriapodologica*, 169, 395–401.
- Cooper, M. I., Telford, S. R. (2000) Copulatory sequences and sexual struggles in millipedes. *Journal of Insect Behavior*, 13(2), 217–230.
- Crawford, C. S. (1974) The role of *Orthoporus ornatus* millipedes in a desert ecosystem. *Reports of 1973 Progress*, 3 (Research Memorandum 73–31).
- Crawford, C. S., Bercovitz, K., Warburg, M. R. (1987) Regional environments, life-history patterns, and habitat use of spirostreptid millipedes in arid regions. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 89(1), 63–88.
- Dadashipour, M., Ishida, Y., Yamamoto, K., Asano, Y. (2015) Discovery and molecular and biocatalytic properties of hydroxynitrile lyase from an invasive millipede, *Chamberlinius hualienensis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(34), 10605–10610.
- Danielsson, I. (2001) Antagonistic pre- and post-copulatory sexual selection on male body size in a water strider (*Gerris lacustris*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1462), 77–81.
- Daouk, R. K., Dagher, S. M., Sattout, E. J. (1995) Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, 58(10), 1147–1149.
- Darwin, C.R. (1871) *The descent of man, and selection in relation to sex. Volume 1.* London: John Murray.



- Da Silva, M., Noll, F.B., Billen, J. (2014) Morphology of Richards' gland in the swarm-founding wasp *Protonectarina sylveirae* (Hymenoptera, Vespidae). *Acta Zoologica*, 96(4), 530–533.
- David, J.-F. (2015) Diplopoda – ecology. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp. 303–327.
- David, J.-F., Coulis, M. (2015) Millipedes faced with drought: the life cycle of a Mediterranean population of *Ommatoiulus sabulosus* (Linnaeus) (Diplopoda, Julida, Julidae). *ZooKeys*, 510, 115–124.
- De Kesel, A. Haelewaters, D., Gerstmans, C. (2013) Two interesting species of *Rickia* (Laboulbeniales) from coastal habitats in Belgium and the Netherlands. *Sterbeekia*, 32, 6–10.
- Dettner, K. (2015) Toxins, defensive compounds and drugs from insects. In: Hoffman, K. H. (Ed.), *Insect Molecular Biology and Ecology*. Boca Raton: Taylor & Francis, pp. 39–93.
- Di Giulio, A., Muzzi, M., Romani, R. (2015) Functional anatomy of the explosive defensive system of bombardier beetles (Coleoptera, Carabidae, Brachininae). *Arthropod Structure & Development*, 44(5), 468–490.
- Dimkić, I., Živković, S., Berić, T., Ivanović, Ž., Gavrilović, V., Stanković, S., Fira, D. (2013) Characterization and evaluation of two *Bacillus* strains, SS-12.6 and SS-13.1, as potential agents for the control of phytopathogenic bacteria and fungi. *Biological Control*, 65(3), 312–321.
- Dimkić, I., Berić, T., Stević, T., Pavlović, S., Šavikin, K., Fira, D., Stanković, S. (2015) Additive and synergistic effects of *Bacillus spp.* isolates and essential oils on the control of phytopathogenic and saprophytic fungi from medicinal plants and marigold seeds. *Biological Control*, 87, 6–13.
- Dhaenens, M., VandenSpiegel, D. (2006) Contribution to the study of the post-embryonic development and reproduction of the African millipede *Epibolus pulchripes* (Gerstaecker, 1873) (Diplopoda, Pachybolidae). *Belgian Journal of Zoology*, 136(1), 43–51.

- Drago, L., Fusco, G., Minelli, A. (2008) Non-systemic metamorphosis in male millipede appendages: long delayed, reversible effect of an early localized positional marker? *Frontiers in Zoology*, 5(1), 5.
- Drago, L., Fusco, G., Garollo, E., Minelli, A. (2011) Structural aspects of leg-to-gonopod metamorphosis in male helminthomorph millipedes (Diplopoda). *Frontiers in Zoology*, 8(1), 19.
- Drake, A. G., Klingenberg, C. P. (2008) The pace of morphological change: historical transformation of skull shape in St Bernard dogs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1630), 71–76.
- Duffey, S. S., Blum, M. S., Fales, H. M., Evans, S. L., Roncadori, R. W., Tiemann, D. L., Nakagawa, Y. (1977) Benzoyl cyanide and mandelonitrile benzoate in the defensive secretions of millipedes. *Journal of Chemical Ecology*, 3(1), 101–113.
- Duffey, S. S., Towers, G. H. N. (1978) On the biochemical basis of HCN production in the millipede *Harpaphe haydeniana* (Xystodesmidae: Polydesmida). *Canadian Journal of Zoology*, 56(1), 7–16.
- Duffey, S. S. (1981) Cyanide and arthropods. In: Vennessland, B., Conn, E. E., Knowles, C. J., Wissing, J. (Eds.), *Cyanide in biology*. London, New York: Academic Press, pp. 385–414.
- Eberhard, W. G. (1985). *Sexual Selection and Animal Genitalia*. Cambridge: Harvard University Press.
- Edgecombe, G. D. (2015) Diplopoda – phylogenetic relationships. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp. 353–362.
- Edward, D. A., Stockley, P., Hosken, D. J. (2015) Sexual conflict and sperm competition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(4), a017707.
- Eisner, T., Eisner, H. E., Hurst, J. J., Kafatos, F. C., Meinwald, J. (1963) Cyanogenic glandular apparatus of a millipede. *Science*, 139(3560), 1218–1220.
- Eisner, T., Davis, J. A. (1967). Mongoose throwing and smashing millipedes. *Science*, 155 (3762), 577–579.

- Eisner, T., Jones, T. H., Aneshansley, D. J., Tschinkel, W. R., Silberglied, R. E., Meinwald, J. (1977) Chemistry of defensive secretions of bombardier beetles (Brachinini, Metriini, Ozaenini, Paussini). *Journal of Insect Physiology*, 23(11–12), 1383–1386.
- Eisner, T., Alsop, D., Hicks, K., Meinwald, J. (1978) Defensive secretions of millipedes. In: Bettini, S. (Ed.), *Arthropod venoms, handbook of experimental pharmacology. Volume 48*. Berlin, Heidelberg: Springer–Verlag, pp. 41–72.
- Eisner, T., Eisner, M., Deyrup, M. (1996) Millipede defense: use of detachable bristles to entangle ants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(20), 10848–10851.
- Eisner, T., Aneshansley, D. J., Eisner, M., Attygalle, A. B., Alsop, D. W., Meinwald, J. (2000) Spray mechanism of the most primitive bombardier beetle (*Metrius contractus*). *Journal of Experimental Biology*, 203(8), 1265–1275.
- Eisner, T., Rossini, C., González, A., Eisner, M. (2004) Chemical defense of an opilionid (*Acanthopachylus aculeatus*). *Journal of Experimental Biology*, 207 (8), 1313–1321.
- El-Najjar, N., Gali-Muhtasib, H., Ketola, R. A., Vuorela, P., Urtti, A., Vuorela, H. (2011) The chemical and biological activities of quinones: overview and implications in analytical detection. *Phytochemistry Reviews*, 10(3), 353–370.
- Enghoff, H. (1978) Parthenogenesis and spanandry in millipedes. *Abhandlungen und Verhandlungendes Naturwissenschaftlichen (N. F.)*, 21/22, 73–85.
- Enghoff, H. (1982) The millipede genus *Cylindroiulus* on Madeira-an insular species swarm (Diplopoda, Julida, Julidae). *Entomologica Scandinavica, Supplement*, 1–142.
- Enghoff, H. (1984) Phylogeny of millipedes – a cladistic analysis. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 22(1), 8–26.
- Enghoff, H. (1992) The size of a millipede. *Berichte des Naturwissenschaftlich-medizinischen Vereins in Innsbruck, Supplement*, 10, S47–S56.

- Enghoff, H., Dohle, W., Blower, J. G. (1993) Anamorphosis in millipedes (Diplopoda) – the present state of knowledge with some developmental and phylogenetic considerations. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 109(2), 103–234.
- Enghoff, H., Sutcharit, C., Panha, S. (2007) The shocking pink dragon millipede, *Desmoxytes purpurosea*, a colourful new species from Thailand (Diplopoda: Polydesmida: Paradoxosomatidae). *Zootaxa*, 1563(1), 31–36.
- Enghoff, H. (2011) Trans-segmental serial colour patterns in millipedes and their developmental interpretation (Diplopoda). *International Journal of Myriapodology*, 6, 1–27.
- Enghoff, H., Akkari, N. (2011) A callipodidan cocoon (Diplopoda, Callipodida, Schizopetalidae). *International Journal of Myriapodology*, 5, 49–53.
- Enghoff, H. (2015) Diplopoda – geographical distribution. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp. 329–336.
- Enghoff, H., Golovatch, S., Short, M., Stoev, P., Wesener, T. (2015) Diplopoda – taxonomic overview. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp. 363–453.
- Evans, M. E. G., Blower, J. G. (1973) A jumping millipede. *Nature*, 246(5433), 427–428.
- Fieser, L. F., Ardao, M. I. (1956) Investigation of the chemical nature of gonyleptidine. *Journal of the American Chemical Society*, 78 (4), 774–781.
- Firman, R. C., Simmons, L. W. (2008) Polyandry facilitates postcopulatory inbreeding avoidance in house mice. *Evolution*, 62(3), 603–611.
- Foley, A. M., Hewitt, D. G., DeYoung, R. W., Schnupp, M. J., Hellickson, M. W., Lockwood, M. A. (2018) Reproductive effort and success of males in scramble-competition polygyny: Evidence for trade-offs between foraging and mate search. *Journal of Animal Ecology*, 87(6), 1600–1614.
- Frederiksen, S. B., Petersen, G., Enghoff, H. (2012) How many species are there of *Pachyiulus*? A contribution to the taxonomy of Europe's largest millipedes (Diplopoda: Julida: Julidae). *Journal of Natural History*, 46(9–10), 599–611.

- Frederiksen, S. B., Enghoff, H. (2015) East African odontopygid millipedes 4: A restricted redefinition of the genus *Rhamphidarpoidea* Kraus, 1960, a related new genus, five new species, and notes on solenomere function (Diplopoda; Spirostreptida; Odontopygidae). *Zootaxa*, 3926(1), 541-560.
- Fricke, C., Adler, M. I., Brooks, R. C., Bonduriansky, R. (2015) The complexity of male reproductive success: effects of nutrition, morphology, and experience. *Behavioral Ecology*, 26(2), 617–624.
- Fujiyama, S., Yoshida, T. (1984) The effects of low temperature on the induction of reproduction in *Parafontaria laminata armigera* Verhoeff (Diplopoda). *Edaphologia*, 30, 17–21.
- Fusco, G. (2005) Trunk segment numbers and sequential segmentation in myriapods. *Evolution & Development*, 7(6), 608–617.
- Giglio, A., Brandmayr, P., Dalpozzo, R., Sindona, G., Tagarelli, A., Talarico, F., Brandmayr, T. Z., Ferrero, E. A. (2009) The defensive secretion of *Carabus lefebvrei* Dejean 1826 pupa (Coleoptera, Carabidae): gland ultrastructure and chemical identification. *Microscopy Research and Technique*, 72(5), 351–361.
- Giglio, A., Brandmayr, P., Talarico, F., Brandmayr, T.Z. (2011) Current knowledge on exocrine glands in carabid beetles: structure, function and chemical compounds. *ZooKeys*, 100, 193–201.
- Golovatch, S. I. (2003) A review of the volvatory Polydesmida, with special reference to the patterns of volvation (Diplopoda). *African Invertebrates*, 44(1), 39–60.
- Golovatch, S. I., Kime, R. D. (2009) Millipede (Diplopoda) distributions: A review. *Soil Organisms*, 81(3), 565–597.
- Golovatch, S. I., Li, Y., Liu, W., Geoffroy, J. J. (2012) Three new cavernicolous species of dragon millipedes, genus *Desmoxytes* Chamberlin, 1923, from southern China, with notes on a formal congener from the Philippines (Diplopoda, Polydesmida, Paradoxosomatidae). *ZooKeys*, 185, 1–17.
- Golovatch, S. I. (2013) A reclassification of the millipede superfamily Trichopolydesmoidea, with descriptions of two new species from the Aegean region (Diplopoda, Polydesmida). *ZooKeys*, 340, 63–78.

- Golovatch, S. I., Geoffroy, J. J., VandenSpiegel, D. (2014) Review of the millipede family Trichopolydesmidae in the Oriental realm (Diplopoda, Polydesmida), with descriptions of new genera and species. *ZooKeys*, 414, 19–65.
- González, R. R., Gambarotti, C., Liguori, L., Bjørsvik, H. R. (2006) Efficient and green telescoped process to 2-methoxy-3-methyl-[1, 4] benzoquinone. *The Journal of Organic Chemistry*, 71 (4), 1703–1706.
- Gnaspini, P., Hara, M.R. (2007) Defense mechanisms. In: Pinto-da-Rocha, R., Machado, G., Giribet, G. (Eds.), *Harvestmen: The Biology of Opiliones*. Cambridge, Massachusetts; London, England: Harvard University Press, pp. 374–399.
- Gruner, H.-E., Moritz, M., Dunger, W. (1993) Arthropoda (ohne Insecta). In: H.-E. Gruner (Ed.), *Band I. Wirbellose Tiere, in Kaestner, A. (founder) Lehrbuch der Speziellen Zoologie. Volume 4*. Jena, Germany; Stuttgart, Germany; New York, NY: Gustav Fischer Verlag, pp. 1–1279.
- Haacker, U. (1969a) Spermaübertragung von *Glomeris* (Diplopoda). *Naturwissenschaften*, 56(9), 467–467.
- Haacker, U. (1969b) An attractive secretion in the mating behaviour of a millipede. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 26(8), 988–990.
- Haacker, U., Fuchs, S. (1970) Das Paarungsverhalten von *Cylindroiulus punctatus* Leach. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, 27(6), 641–648.
- Haacker, U. (1974) Patterns of communication in courtship and mating behaviour of millipedes (Diplopoda). *Symposia of the Zoological Society of London*, 32, 317–328.
- Happ, G. M. (1968) Quinone and hydrocarbon production in the defensive glands of *Eleodes longicollis* and *Tribolium castaneum* (Coleoptera, Tenebrionidae). *Journal of Insect Physiology*, 14(12), 1821–1837.
- Harari, A. R., Handler, A. M., Landolt, P. J. (1999) Size-assortative mating, male choice and female choice in the curculionid beetle *Diaprepes abbreviatus*. *Animal Behaviour*, 58(6), 1191–1200.

- Harvey, M. S., Shear, W. A., Hoch, H. (2000) Onychophora, Arachnida, Myriapods and Insecta. In: Wilkens, H, Culver, D. C., Humphreys, W.F. (Eds.), *Subterranean Ecosystems*. Amsterdam: Elsevier, pp. 79–94.
- Hagler, J. R., Jackson, C. G. (2001) Methods for marking insects: current techniques and future prospects. *Annual Review of Entomology*, 46(1), 511–543.
- Harris, L. J., Daeschel, M. A., Stiles, M. E., Klaenhammer, T. R. (1989) Antimicrobial Activity of lactic acid bacteria Against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 52(6), 384–387.
- Harzsch, S., Melzer, R. R., Müller, C. H. (2007) Mechanisms of eye development and evolution of the arthropod visual system: the lateral eyes of Myriapoda are not modified insect ommatidia. *Organisms Diversity & Evolution*, 7(1), 20–32.
- Hash, J. M., Millar, J. G., Heraty, J. M., Harwood, J. F., Brown, B. V. (2017) Millipede defensive compounds are a double-edged sword: Natural history of the millipede-parasitic genus *Myriophora* Brown (Diptera: Phoridae). *Journal of Chemical Ecology*, 43(2), 198–206.
- Hebets, E. A., Stafstrom, J. A., Rodriguez, R. L., Wilgers, D. J. (2011) Enigmatic ornamentation eases male reliance on courtship performance for mating success. *Animal Behaviour*, 81(5), 963–972.
- Helinski, M. E., Harrington, L. C. (2011) Male mating history and body size influence female fecundity and longevity of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Journal of Medical Entomology*, 48(2), 202–211.
- Herbert, D. G. (2000) Dining on diplopods: remarkable feeding behaviour in chlamydephorid slugs (Mollusca: Gastropoda). *Journal of Zoology*, 251(1), 1–5.
- Hilken, G., Sombke, A., Müller, C. H. G. Rosenberg, J. (2015) Diplopoda–tracheal system. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp. 129–152.
- Hoffman, R. L., Payne, J. A. (1969) Diplopods as carnivores. *Ecology*, 50(6), 1096–1098.
- Hoffman, R. L., Golovatch, S. I., Adis, J., de Morais, J. W. (2002) Diplopoda. In: Adis, J. (Ed.), *Amazonian Arachnida and Myriapoda: Identification Keys to All Classes*,

- Orders, Families, Some Genera, and List of Known Terrestrial Species*. Sofia: Pensoft Publishers, pp. 505–533.
- Holwell, G. I., Allen, P. J. D., Goudie, F., Duckett, P. E., Painting, C. J. (2016) Male density influences mate searching speed and copulation duration in millipedes (Polydesmida: *Gigantowales chisholmi*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 70(8), 1381–1388.
- Hopkin, S. P., Read, H. J. (1992) *The Biology of Millipedes*. Oxford: Oxford University Press.
- Hornung, E., Vajda, Z. (1988) Age determination of *Megaphyllum unilineatum* (CL Koch) (Diplopoda: Julidae). *Acta Biologica Szeged*, 34, 173–176.
- Hosken, D. J., Garner, T. W. J., Ward, P. I. (2001) Sexual conflict selects for male and female reproductive characters. *Current Biology*, 11(7), 489–493.
- Huang, C. B., George, B., Ebersole, J. L. (2010) Antimicrobial activity of n-6, n-7 and n-9 fatty acids and their esters for oral microorganisms. *Archives of Oral Biology*, 55(8), 555–560.
- Hunt, J., Sakaluk, S. K. (2014) Mate choice. In: Shuker, D., Simmons, L. (Eds.), *The Evolution of Insect Mating Systems*. Oxford: Oxford University Press, pp. 129–158.
- Huth, A. (2000) Defensive secretions of millipedes: more than just a product of melting point decrease? *Fragmenta Faunistica, Supplement*, 43, 191–200.
- Ilić, B., Dimkić, I., Unković, N., Grbić, M. L., Vukojević, J., Vujisić, Lj., Tešević, V., Stanković, S., Makarov, S., Lučić, L. (2018) Millipedes vs. pathogens: Defensive secretions of some julids (Diplopoda: Julida) as potential antimicrobial agents. *Journal of Applied Entomology*, 142(8), 775–791.
- Ivy, T. M., Weddle, C. B., Sakaluk, S. K. (2005) Females use self-referent cues to avoid mating with previous mates. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1580), 2475–2478.
- Jacini, G. (1985) Ubiquinones and other bioquinones. *Fette, Seifen, Anstrichmittel*, 87(2), 57–60.
- Janssen, R. (2011) Diplosegmentation in the pill millipede *Glomeris marginata* is the result of dorsal fusion. *Evolution & Development*, 13(5), 477–487.



- Jennions, M. D., Petrie, M. (2000) Why do females mate multiply? A review of the genetic benefits. *Biological Reviews*, 75(1), 21–64.
- Jensen, H., Saether, B. E., Ringsby, T. H., Tufto, J., Griffith, S. C., Ellegren, H. (2004) Lifetime reproductive success in relation to morphology in the house sparrow *Passer domesticus*. *Journal of Animal Ecology*, 73(4), 599–611.
- Jojić, V., Nenadović, J., Blagojević, J., Paunović, M., Cvetković, D., Vujošević, M. (2012) Phenetic relationships among four *Apodemus* species (Rodentia, Muridae) inferred from skull variation. *Zoologischer Anzeiger – A Journal of Comparative Zoology*, 251(1), 26–37.
- Jovanović, Z. S., Antić, D. Ž., Tomić, V. T. (2016) First report of the millipede *Oxidus Gracilis* (Diplopoda, Polydesmida, Paradoxosomatidae) in Serbia. *Kragujevac Journal of Science*, 38, 173–176.
- Jovanović, Z., Pavković-Lučić, S., Ilić, B., Vujić, V., Dudić, B., Makarov, S., Lučić, L., Tomić, V. (2017) Mating behaviour and its relationship with morphological features in the millipede *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) (Myriapoda, Diplopoda, Julida). *Turkish Journal of Zoology*, 41(6), 1010–1023.
- Kaneko, N. (1999) Effect of millipede *Parafontaria tonominea* Attems (Diplopoda: Xystodesmidae) adults on soil biological activities: A microcosm experiment. *Ecological Research*, 14(3), 271–279.
- Kania, G., Kowalski, R., Pietraś, R. (2016) Defensive secretions in millipede species of the order Julida (Diplopoda). *Acta Societatis Zoologicae Bohemicae*, 80, 17–20.
- Kashef, N., & Hamblin, M. R. (2017) Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? *Drug Resistance Updates*, 31, 31–42.
- Kheirallah, A. M. (1978) The consumption and utilization of two different species of leaf litter by a laboratory population of *Orthomorpha gracilis* (Diplopoda: Polydesmoidea). *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 23(1), 14–19.
- Kheirallah, A. M. (1979) Behavioural preference of *Julus scandinavicus* (Myriapoda) to different species of leaf litter. *Oikos*, 33(3), 466–471.

- Kheirallah, A. M., Aly, A. N. H., Abdel-Wahed, N. Y. (2000) Anamorphosis and life-history of the millipede *Nopoiulus kochii* (Gervais, 1847), new for Egypt. *Zoology in the Middle East*, 21(1), 159–168.
- Kime, R. D., Enghoff, H. (2017) Atlas of European millipedes 2: Order Julida (Class Diplopoda). *European Journal of Taxonomy*, 346, 1–399.
- King, W. J., Festa-Bianchet, M., Hatfield, S. E. (1991) Determinants of reproductive success in female Columbian ground squirrels. *Oecologia*, 86(4), 528–534.
- Klingenberg, C. P. (2011) MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2), 353–357.
- Koch, M. (2015a) Diplopoda – general morphology. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp. 7–67.
- Koch, M. (2015b). Diplopoda – skeletomuscular system and locomotion. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp.101–107.
- Kokko, H., Jennions, M. D., Brooks, R. (2006) Unifying and testing models of sexual selection. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37, 43–66.
- Kokko, H., Klug, H., Jennions, M. D. (2014) Mating systems. In: Shuker, D., Simmons, L. (Eds.), *The Evolution of Insect Mating Systems*. Oxford: Oxford University Press, pp. 42–58.
- Kuwahara, Y., Ômura, H., Tanabe, T. (2002) 2-Nitroethenylbenzenes as natural products in millipede defense secretions. *Naturwissenschaften*, 89(7), 308–310.
- Kuwahara, Y., Mori, N., Tanabe, T. (2007) Detection of a neotropical frog alkaloid spiropyrrrolizidine 236 from a Japanese polyzoniid millipede *Kiusiozonium okai* as a major defense component together with polyzonimine and nitropolyzonamine. *Japanese Journal of Environmental Entomology and Zoology*, 18 (2), 91–95.
- Kuwahara, Y., Shimizu, N., Tanabe, T. (2011) Release of hydrogen cyanide via a post-secretion Schotten-Baumann reaction in defensive fluids of polydesmoid millipedes. *Journal of Chemical Ecology*, 37(3), 232–238.

- Kuwahara, Y., Ichiki, Y., Morita, M., Tanabe, T., Asano, Y. (2018) Biosynthesis of (2-nitroethyl) benzene and (Z)-and (E)-(2-nitroethenyl) benzenes from (Z)-and (E)-phenylacetaldoximes and phenylacetonitrile; defense allomone of *Eutrichodesmus elegans* and *Eutrichodesmus armatus* (Polydesmida: Haplodesmidae). *Journal of Pesticide Science*, 43(4), 240–247.
- Lana, E. J., Carazza, F., & Takahashi, J. A. (2006) Antibacterial evaluation of 1, 4-benzoquinone derivatives. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(6), 2053–2056.
- Lazić, M. M., Carretero, M. A., Crnobrnja-Isailović, J., Kaliontzopoulou, A. (2015) Effects of environmental disturbance on phenotypic variation: an integrated assessment of canalization, developmental stability, modularity, and allometry in lizard head shape. *The American Naturalist*, 185(1), 44–58.
- Li, Y. Y., Yu, J. F., Lu, Q., Xu, J., Ye, H. (2014) Female and male moths display different reproductive behavior when facing new versus previous mates. *PloS ONE*, 9(10), e109564.
- Liu, W., Golovatch, S. I., Tian, M. (2014) A review of the dragon millipede genus *Desmoxytes* Chamberlin, 1923 in China, with descriptions of four new species (Diplopoda, Polydesmida, Paradoxosomatidae). *ZooKeys*, 448, 9–26.
- Liu, W., Golovatch, S., Tian, M. (2016) Six new species of dragon millipedes, genus *Desmoxytes* Chamberlin, 1923, mostly from caves in China (Diplopoda, Polydesmida, Paradoxosomatidae). *ZooKeys*, 577, 1–24.
- Locke, M. (1961) Pore canals and related structures in insect cuticle. *The Journal of Cell Biology*, 10(4), 589–618.
- Loker, E. S., Adema, C. M., Zhang, S. M., Kepler, T. B. (2004) Invertebrate immune systems – not homogeneous, not simple, not well understood. *Immunological reviews*, 198(1), 10–24.
- Machado, G., Carrera, P. C., Pomini, A. M., Marsaioli, A. J. (2005) Chemical defense in harvestmen (Arachnida, Opiliones): do benzoquinone secretions deter invertebrate and vertebrate predators?. *Journal of Chemical Ecology*, 31(11), 2519–2539.

- Makarov, S. E., Ćurčić, B. P., Tešević, V. V., Jadranin, M. B., Vujisić, L. V., Ćurčić, S. B., Mandić, B. M., Sekulić, T. L., Mitić, B. M. (2010) Defensive secretions in three species of polydesmids (Diplopoda, Polydesmida, Polydesmidae). *Journal of Chemical Ecology*, 36(9), 978–982.
- Makarov, S. E., Dimkić, I. Z., Antić, D. Ž., Vujisić, Lj. V., Stević, T. R., Mitić, B. M., Tomić, V. T., Ilić, B. S., Ćurčić, B. P. M., Stanković, S. M. (2014) *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) (Myriapoda, Diplopoda, Julidae) – a model system for semiochemical analysis and antimicrobial testing. In Tuf, I. H., Tajovský, K. (Eds.), *16<sup>th</sup> International Congress of Myriapodology. Book of Abstracts*. Olomouc: Institute of Soil Biology, BC ASCR & Faculty of Science, Palacký University, pp. 51.
- Makarov, S. E. (2015) Diplopoda – integument. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp. 69–99.
- Makarov, S. E., Bodner, M., Reineke, D., Vujisić, L. V., Todosijević, M. M., Antić, D. Ž., Vagalinski, B., Lučić, L. R., Mitić, B. M., Mitov, P., Anđelković, B. D., Pavković-Lučić, S., Vajs, V., Tomić, V. T., Raspotnig, G. (2017). Chemical ecology of cave-dwelling millipedes: defensive secretions of the Typhloiulini (Diplopoda, Julida, Julidae). *Journal of Chemical Ecology*, 43(4), 317–326.
- Maklakov, A. A., Bilde, T., Lubin, Y. (2005) Sexual conflict in the wild: elevated mating rate reduces female lifetime reproductive success. *The American Naturalist*, 165(S5), S38–S45.
- Mans, D. R. (2017) Exploring the global animal biodiversity in the search for new drugs—spiders, scorpions, horseshoe crabs, sea spiders, centipedes, and millipedes. *Journal of Translational Science*, 3, 1–18.
- Manton, S. M. (1958) The evolution of arthropodan locomotory mechanisms. Part 6. Habits and evolution of the Lysiopetaloidea (Diplopoda), some principles of the leg design in Diplopoda and Chilopoda, and limb structure in Diplopoda. *Journal of the Linnean Society of London*, 43(293), 487–557.
- Manton, S. M. (1973) The evolution of arthropodan locomotory mechanisms. Part 11. Habits, morphology and evolution of the Uniramia (Onychophora, Myriapoda,

- Hexapoda) and comparisons with the Arachnida, together with a functional review of uniramian musculature. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 53(4), 257–375.
- Manton, S. M. (1977) *The Arthropoda: Habits, Functional Morphology and Evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Marek, P. E., Bond, J. E. (2009) A Müllerian mimicry ring in Appalachian millipedes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(24), 9755–9760.
- Marek, P., Papaj, D., Yeager, J., Molina, S., Moore, W. (2011) Bioluminescent aposematism in millipedes. *Current Biology*, 21(18), R680–R681.
- Marek, P. E., Shear, W. A., Bond, J. E. (2012) A redescription of the leggiest animal, the millipede *Illacme plenipes*, with notes on its natural history and biogeography (Diplopoda, Siphonophorida, Siphonorhinidae). *ZooKeys*, 241, 77–112.
- Martínez, M. J. A., Benito, P. B. (2005) Biological activity of quinones. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 303–366.
- Martínez-Torres, S. D., Daza, Á. E. F., Linares-Castillo, E. L. (2011) Meeting between kingdoms: discovery of a close association between Diplopoda and Bryophyta in a transitional Andean-Pacific forest in Colombia. *International Journal of Myriapodology*, 6, 29–36.
- Mathews, P. L., Bultman, T. L. (1993) Mating behavior of a parajulid millipede, *Aniulus bollmani*. *Canadian Journal of Zoology*, 71(11), 2297–2300.
- McNeil, J.N., Millar, J.G. (2013) Chemical communication: pheromones and allelochemicals. In: Simpson, S.J., Douglas, A.E. (Eds.), *The Insects: Structure and Function – 5th edition*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 857–900.
- Meinwald, Y.C., Meinwald, J., Eisner, T., (1966) 1,2-dialkyl-4(3H)-quinazolinones in the defensive secretions of a millipede (*Glomeris marginata*). *Science*, 154 (3747), 390–391.
- Meinwald, J., Smolanoff, J., McPhail, A. T., Miller, R. W., Eisner, T., Hicks, K. (1975) Nitropolyzonamine: a spirocyclic nitro compound from the defensive glands of a millipede (*Polyzonium rosalbum*). *Tetrahedron Letters*, 16(28), 2367–2370.

- Menezes, B. F., Vigoder, F. M., Peixoto, A. A., Varaldi, J., Bitner-Mathé, B. C. (2013) The influence of male wing shape on mating success in *Drosophila melanogaster*. *Animal Behaviour*, 85(6), 1217–1223.
- Mesibov, R. (2008) The millipede genera *Gephyrodesmus* Jeekel, 1983 and *Orthorhachis* Jeekel, 1985 in southeastern Australia, a new *Lissodesmus* Chamberlin, 1920 from Victoria, and observations on male leg setae, spinnerets and metatergite sculpture (Diplopoda: Polydesmida: Dalodesmidae) *Zootaxa*, 1790, 1–52.
- Meyer, E. (1985) Distribution, activity, life-history and standing crop of Julidae (Diplopoda, Myriapoda) in the Central High Alps (Tyrol, Austria). *Ecography*, 8(2), 141–150.
- Miller, C. W. (2013) Sexual selection: male-male competition. In: Losos, J. B., Baum, D. A., Futuyma, D. J., Hoekstra, H. E., Lenksi, R. E., Moore, A. J. (Eds.), *The Princeton Guide to Evolution*. Princeton: Princeton University Press, pp. 641–646.
- Miller, S. I. (2016) Antibiotic resistance and regulation of the gram-negative bacterial outer membrane barrier by host innate immune molecules. *MBio*, 7(5), e01541–16.
- Miller, S. I., & Salama, N. R. (2018) The gram-negative bacterial periplasm: Size matters. *PLoS Biology*, 16(1), e2004935.
- Minelli, A. (2003) *The Development of Animal Form: Ontogeny, Morphology, and Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Minelli, A. (2009) *Perspectives in Animal Phylogeny and Evolution*. Oxford: Oxford University Press.
- Minelli, A., Fusco, G. (2013) Arthropod post-embryonic development. In: Minelli, A., Boxshall, G., Fusco, G. (Eds.), *Arthropod Biology and Evolution. Molecules, Development, Morphology*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, pp. 91–122.
- Minelli, A. (2015) Diplopoda – development. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp. 267–302.
- Minelli, A., Michalik, P. (2015) Diplopoda – reproduction. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden:

- Brill,  
pp. 237–265.
- Miyazawa, H., Ueda, C., Yahata, K., Su, Z. H. (2014) Molecular phylogeny of Myriapoda provides insights into evolutionary patterns of the mode in post-embryonic development. *Scientific Reports*, 4, 4127.
- Monks, T. J., Hanzlik, R. P., Cohen, G. M., Ross, D., Graham, D. G. (1992) Quinone chemistry and toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 112(1), 2–16.
- Müller, C. H. G. & Sombke, A. (2015) Diplopoda – sense organs. In: Minelli, A. (Ed.), *Treatise on Zoology – Anatomy, Taxonomy, Biology. The Myriapoda. Volume 2*. Leiden: Brill, pp. 181–236.
- Murphy, D. J. (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*, 249(3), 541–585.
- Nazzaro, F., Fratianni, F., De Martino, L., Coppola, R., De Feo, V. (2013) Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, 6(12), 1451–1474.
- Newcomer, S. D., Zeh, J. A., Zeh, D. W. (1999) Genetic benefits enhance the reproductive success of polyandrous females. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(18), 10236–10241.
- Ngbolua, K. N., Ngunde-te-Ngunde, S., Tshidibi, D. J., Lengbiye, M. E., Mpiana, T. P., Ekutsu, E. G., Munene Mayi Mbimbi J. J., Gbolo, Z. B., Bongo, N. G., Nzemu, G. (2014) Anti-sickling and antibacterial activities of extracts from a Congolese Diplopod (*Tachypodoiulus sp.*, Arthropoda). *Journal of Advanced Botany and Zoology*, 1(3), 1–5.
- Nikaido, H., & Pagès, J. M. (2012) Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(2), 340–363.
- Noirot, C., Quenedey, A. (1974) Fine structure of insect epidermal glands. *Annual Review of Entomology*, 19(1), 61–80.
- Nohl, H., Jordan, W., & Youngman, R. J. (1986) Quinones in biology: functions in electron transfer and oxygen activation. *Advances in Free Radical Biology & Medicine*, 2(1), 211–279.

- O'Neill, R. V. (1969) Adaptive responses to desiccation in the millipede, *Narceus americanus* (Beauvois). *American Midland Naturalist*, 81(2), 578–583.
- Ômura, H., Kuwahara, Y., Tanabe, T. (2002) 1-Octen-3-ol together with geosmin: new secretion compounds from a polydesmid millipede, *Niponia nodulosa*. *Journal of Chemical Ecology*, 28(12), 2601–2612.
- Parker, G. A. (1970) Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects. *Biological Reviews*, 45(4), 525–567.
- Pavković-Lučić, S., Kekić, V., Čvoro, A. (2009) Larger male mating advantage depends on the sex ratio in *Drosophila melanogaster*. *Ethology Ecology & Evolution*, 21(2), 155–160.
- Pavković-Lučić, S., Kekić, V. (2013) Developmental temperature, body size and male mating success in fruit flies, *Drosophila melanogaster* (Diptera: Drosophilidae). *European Journal of Entomology*, 110(1), 31–37.
- Peitsalmi, M., Pajunen, V. I. (1991) Mapping the ocular field in *Proteroiulus fuscus* (Am Stein) (Diplopoda, Blaniulidae). *Annales Zoologici Fennici*, 28, 31–39.
- Peitsalmi, M., Pajunen, V. I. (1992) Eye growth in *Choneiulus palmatus* (Němec) and *Nopoiulus kochii* (Gervais) (Diplopoda, Blaniulidae). *Annales Zoologici Fennici*, 29, 39–46.
- Pinheiro, T. G., Marques, M. I., Battirola, L. D. (2009) Life cycle of *Poratia salvator* (Diplopoda: Polydesmida: Pyrgodesmidae). *Zoologia*, 26(4), 658–662.
- Puurttinen, M., Ketola, T., Kotiaho, J. S. (2009) The good-genes and compatible-genes benefits of mate choice. *The American Naturalist*, 174(5), 741–752.
- Raspotnig, G., Bodner, M., Schäffer, S., Koblmüller, S., Schönhofer, A., Karaman, I. (2015) Chemosystematics in the Opiliones (Arachnida): a comment on the evolutionary history of alkylphenols and benzoquinones in the scent gland secretions of Laniatores. *Cladistics*, 31(2), 202–209.
- Ristivojević, P., Dimkić, I., Trifković, J., Berić, T., Vovk, I., Milojković-Opsenica, D., Stanković, S. (2016) Antimicrobial activity of Serbian propolis evaluated by means of MIC, HPTLC, bioautography and chemometrics. *PloS ONE*, 11(6), e0157097.



- Rocha, D., Wouters, F., Zampieri, D., Brocksom, T., Machado, G., Marsaioli, A. (2013) Harvestman phenols and benzoquinones: characterisation and biosynthetic pathway. *Molecules*, 18(9), 11429–11451.
- Rodriguez, J., Jones, T. H., Sierwald, P., Marek, P. E., Shear, W. A., Brewer, M. S., Kocot, K., Bond, J. E. (2018) Step-wise evolution of complex chemical defenses in millipedes: a phylogenomic approach. *Scientific Reports*, 8(1), 3209.
- Rohlf, F. J. (2008). TpsDig, Version 2.12. Stony Brook, NY, USA: SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-dataacq.html>.
- Roncadori, R. W., Duffey, S. S., Blum, M. S. (1985) Antifungal activity of defensive secretions of certain millipedes. *Mycologia*, 77(2), 185–191.
- Rowe, M. (2010) Copulation, mating system and sexual dimorphism in an Australian millipede, *Cladethosoma clarum*. *Australian Journal of Zoology*, 58(2), 127–132.
- Rowe, L., Arnqvist, G. (2011) Sexual selection and the evolution of genital shape and complexity in water striders. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 66(1), 40–54.
- Ruan, Y., Li, Y., Zhang, M., Chen, X., Liu, Z., Wang, S., Jiang, S. (2018) Visualisation of insect tracheal systems by lactic acid immersion. *Journal of Microscopy*, 271(2), 230–236.
- Ruther, J., Podsiadlowski, L., Hilker, M. (2001) Quinones in cockchafer: additional function of a sex attractant as an antimicrobial agent. *Chemoecology*, 11(4), 225–229.
- Sahli, F. (1969) Contribution à l'étude du développement post-embryonnaire des diplopodes Iulides. *Annales Universitatis Saraviensis* 7,1–154.
- Santamaría, S., Enghoff, H., Reboleira, A. S. P. (2014) Laboulbeniales on millipedes: the genera *Diplopodomycetes* and *Troglomyces*. *Mycologia*, 106(5), 1027–1038.
- Santamaría, S., Enghoff, H., Reboleira, A. S. (2016) Hidden biodiversity revealed by collections-based research – *Laboulbeniales* in millipedes: genus *Rickia*. *Phytotaxa*, 243 (2), 101–127.

- Santamaría, S., Enghoff, H., Reboleira, A. S. P. (2018) New species of *Troglomyces* and *Diplopodomycetes* (Laboulbeniales, Ascomycota) from millipedes (Diplopoda). *European Journal of Taxonomy*, 429.
- Saporito, R. A., Donnelly, M. A., Hoffman, R. L., Garraffo, H. M., Daly, J. W. (2003) A siphonotid millipede (*Rhinotus*) as the source of spiropyrrolizidine oximes of dendrobatid frogs. *Journal of Chemical Ecology*, 29(12), 2781–2786.
- Sarker, S. D., Nahar, L., Kumarasamy, Y. (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42(4), 321–324.
- Schierling, A., Dettner, K. (2013) The pygidial defense gland system of the Steninae (Coleoptera, Staphylinidae): morphology, ultrastructure and evolution. *Arthropod Structure & Development*, 42(3), 197–208.
- Schildknecht, H., Wenneis, W., Weis, K., Maschwitz, U. (1966) Glomerin, ein neues Arthropoden-Alkaloid. *Zeitschrift für Naturforschung*, 21B(2), 121–127.
- Schildknecht, H., Maschwitz, U., Wenneis, W. (1967) Neue Stoffe aus dem Wehrsekret der Diplopodengattung *Glomeris* – Über Arthropoden-Abwehrstoffe. XXIV. *Naturwissenschaften*, 54(8), 196–197.
- Schildknecht, H., Wenneis, W. (1967) Über Arthropoden-Abwehrstoffe. XX. Structuraufklärung des Glomerins. *Zeitschrift für Naturforschung*, C21, 552–556.
- Sekulić, T. (2014) Ontogenetska, specijska i generička karakterizacija odbrambenih supstanci kod nekih predstavnika familije Julidae Leach, 1814 (Myriapoda, Diplopoda, Julida) iz Srbije. Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet.
- Sekulić, T. L., Vujisić, L. V., Ćurčić, B. P. M., Mandić, B., Antić, D. Ž., Trifunović, S. S., Godevac, D., Vajs, V., Tomić, V. T., Makarov, S. E. (2014) Quinones and non-quinones from the defensive secretion of *Unciger transsilvanicus* (Verhoeff, 1899) (Diplopoda, Julida, Julidae), from Serbia. *Archives of Biological Sciences*, 66(1), 385–391.

- Serrano-Meneses, M. A., Córdoba-Aguilar, A., Méndez, V., Layen, S. J., Székely, T. (2007) Sexual size dimorphism in the American rubyspot: male body size predicts male competition and mating success. *Animal Behaviour*, 73(6), 987–997.
- Shear, W. A., Jones, T. H., Miras, H. M. (2007) A possible phylogenetic signal in milliped chemical defenses: The polydesmidan milliped *Leonardesmus injucundus* Shelley & Shear secretes p-cresol and lacks a cyanogenic defense (Diplopoda, Polydesmida, Nearctodesmidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 35(12), 838–842.
- Shear, W. (2008) Spinnerets in the milliped order Polydesmida, and the phylogenetic significance of spinnerets in millipedes (Diplopoda). *International Journal of Myriapodology*, 1(2), 123–146.
- Shear, W. A., Edgecombe, G. D. (2010) The geological record and phylogeny of the Myriapoda. *Arthropod Structure & Development*, 39(2–3), 174–190.
- Shear, W., Jones, T., Wesener, T. (2011) Glomerin and homoglomerin from the North American pill millipede *Onomeris sinuata* (Loomis, 1943) (Diplopoda, Pentazonia, Glomeridae). *International Journal of Myriapodology*, 4, 1–10.
- Shear, W. A., Krejca, J. K. (2011) Cave millipeds of the United States. IX. A new species of the genus *Taiyutyla* (Diplopoda, Chordeumatida, Conotylidae) from caves in Sequoia and Yosemite National Parks, California, USA. *Journal of Cave and Karst Studies*, 73(2), 93–98.
- Shear, W. A. (2015) The chemical defenses of millipedes (Diplopoda): biochemistry, physiology and ecology. *Biochemical Systematics and Ecology*, 61 (4), 78–117.
- Sheets, H. D. (2003) IMP: Integrated Morphometrics Package. Buffalo, NY, USA: Department of Physics, Canisius College. <http://www3.canisius.edu/~sheets/morphsoft.html>.
- Sherratt, E., Gower, D. J., Klingenberg, C. P., Wilkinson, M. (2014) Evolution of cranial shape in caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Evolutionary Biology*, 41(4), 528–545.

- Shimizu, N., Kuwahara, Y., Yakumar, R., Tanabe, T. (2012) n-Hexyl laurate and fourteen related fatty acid esters: new secretory compounds from the julid millipede, *Anaulaciulus* sp. *Journal of chemical ecology*, 38(1), 23–28.
- Shuster, S. M., Wade, M. J. (2003) *Mating Systems and Strategies*. Princeton: Princeton University Press.
- Sierwald, P., Shear, W. A., Shelley, R. M., Bond, J. E. (2003) Millipede phylogeny revisited in the light of the enigmatic order Siphoniulida. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 41(2), 87–99.
- Sierwald, P., Bond, J. E. (2007) Current status of the myriapod class Diplopoda (millipedes): taxonomic diversity and phylogeny. *Annual Review of Entomology*, 52(1), 401–420.
- Simmons, L. W. (2014). Sexual selection and genital evolution. *Austral Entomology*, 53(1), 1–17.
- Siva-Jothy, M. T., Tsubaki, Y., Hooper, R. E. (1998) Decreased immune response as a proximate cost of copulation and oviposition in a damselfly. *Physiological Entomology*, 23(3), 274–277.
- Smit, A. M., Van Aarde, R. J. (2001) The influence of millipedes on selected soil elements: a microcosm study on three species occurring on coastal sand dunes. *Functional Ecology*, 15(1), 51–59.
- Souza, J. L., da Silva, A. F., Carvalho, P. H., Pacheco, B. S., Pereira, C. M., Lund, R. G. (2014). Aliphatic fatty acids and esters: inhibition of growth and exoenzyme production of *Candida*, and their cytotoxicity in vitro: anti-*Candida* effect and cytotoxicity of fatty acids and esters. *Archives of Oral Biology*, 59(9), 880–886.
- Spong, G. F., Hodge, S. J., Young, A. J., Clutton-Brock, T. H. (2008) Factors affecting the reproductive success of dominant male meerkats. *Molecular Ecology*, 17(9), 2287–2299.
- Stanković, S., Dimkić, I., Vujisić, L., Pavković-Lučić, S., Jovanović, Z., Stević, T., Sofrenić, I., Mitić, B., Tomić, V. (2016) Chemical defence in a millipede: evaluation and characterization of antimicrobial activity of the defensive secretion

- from *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) (Diplopoda, Julida, Julidae). *PLoS ONE*, 11(12), e0167249.
- Stević, T., Pavlović, S., Stanković, S., Šavikin, K. (2012) Pathogenic microorganisms of medicinal herbal drugs. *Archives of Biological Sciences*, 64(1), 49–58.
- Suarez, S. E., Brookfield, M. E., Catlos, E. J., Stöckli, D. F. (2017) A U-Pb zircon age constraint on the oldest-recorded air-breathing land animal. *PloS ONE*, 12(6), e0179262.
- Šobotník, J., Kotalová, K., Vytisková, B., Roisin, Y., Bourguignon, T. (2014) Age-dependent changes in ultrastructure of the defensive glands of *Neocapritermes taracua* workers (Isoptera, Termitidae). *Arthropod Structure & Development*, 43(20), 205–210.
- Tadler, A. (1993) Genitalia fitting, mating behaviour and possible hybridization in millipedes of the genus *Craspedosoma* (Diplopoda, Chordeumatida, Craspedosomatidae). *Acta Zoologica*, 74(3), 215–225.
- Tadler, A. (1996) Functional morphology of genitalia of four species of julidan millipedes (Diplopoda: Nemasomatidae; Julidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 118(1), 83–97.
- Taira, J., Nakamura, K., Higa, Y. (2003) Identification of secretory compounds from the millipede, *Oxidus gracilis* CL Koch (Polydesmida: Paradoxosomatidae) and their variation in different habitats. *Applied Entomology and Zoology*, 38 (3), 401–404.
- Tanabe, T., Sota, T. (2008) Complex copulatory behavior and the proximate effect of genital and body size differences on mechanical reproductive isolation in the millipede genus *Parafontaria*. *The American Naturalist*, 171(5), 692–699.
- Tegos, G., Stermitz, F. R., Lomovskaya, O., Lewis, K. (2002) Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3133–3141.
- Telford, S. R., Dangerfield, J. M. (1990) Manipulation of the sex ratio and duration of copulation in the tropical millipede *Alloporus uncinatus*: A test of the copulatory guarding hypothesis. *Animal Behaviour*, 40(5), 984–986.

- Telford, S. R., Dangerfield, J. M. (1993a) Mating tactics in the tropical millipede *Alloporus uncinatus* (Diplopoda: Spirostreptidae). *Behaviour*, 124(1–2), 45–56.
- Telford, S. R., Dangerfield, J. M. (1993b) Mating behaviour and mate choice experiments in some tropical millipedes (Diplopoda: Spirostreptidae). *African Zoology*, 28(3), 155–160.
- Terzić T, Anđelković M, Stamenković-Radak M (1994) Effect of fluorescent dust, as a marker, on the frequency of mating in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*, 75, 164–165.
- Tichy, H.(1974) Über den Feinbau der Wehrdrüsen von Tausendfüsslern. *Zoologischer Anzeiger*, 192, 289–302.
- Tucić, N. (2003) *Evoluciona biologija*. Beograd: NNK – International.
- Tuni, C., Bilde, T. (2010) No preference for novel mating partners in the polyandrous nuptial-feeding spider *Pisaura mirabilis* (Araneae: Pisauridae). *Animal Behaviour*, 80(3), 435–442.
- Vachon, M. (1947) Contribution à l'étude du développement post-embryonnaire de *Pachybolus ligulatus* Voges. Les étapes de la croissance. *Annales de Sciences Naturelles, Zoologie*, 11 (9,) 109–121.
- Valderrama, X., Robinson, J. G., Attygalle, A. B., Eisner, T. (2000) Seasonal anointment with millipedes in a wild primate: a chemical defense against insects? *Journal of Chemical Ecology*, 26(12), 2781–2790.
- Vane-Wright, R. I. (1980) On the definition of mimicry. *Biological Journal of the Linnean Society*, 13(1), 1–6.
- Vega-Avila, E., Pugsley, M. K. (2011) An overview of colorimetric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proceeding of the Western Pharmacology Society*, 54, 4–10.
- Vujić, V., Ilić, B., Jovanović, Z., Pavković-Lučić, S., Selaković, S., Tomić, V., Lučić, L. (2018) Sexual behaviour and morphological variation in the millipede *Megaphyllum bosniense* (Verhoeff, 1897). *Contributions to Zoology*, 87(3), 133–148.
- Vujisić, L. V., Makarov, S. E., Ćurčić, B. P., Ilić, B. S., Tešević, V. V., Godevac, D. M., Vučković, I. M., Ćurčić, S. B., Mitić, B. M. (2011) Composition of the defensive

- secretion in three species of European millipedes. *Journal of Chemical Ecology*, 37(12), 1358–1364.
- Vujisić, Lj., (2013) Identifikacija odbrambenih supstanci odabranih vrsta stonoga iz klasa Diplopoda i Chilopoda (Arthropoda, Myriapoda). Doktorska disertacija. Univerzitet u Beogradu - Hemijski fakultet.
- Ward, H. L., Ransome, R. D., Jones, G., Rossiter, S. J. (2014) Determinants and patterns of reproductive success in the Greater Horseshoe bat during a population recovery. *PloS ONE*, 9(2), e87199.
- Weatherston, J., Percy, J. (1969) Studies of physiologically active arthropod secretions. III. Chemical, morphological, and histological studies of the defence mechanism of *Uroblaniulus canadensis* (Say) (Diplopoda: Julida). *Canadian Journal of Zoology*, 47(6), 1389–1394.
- Weldon, P. J., Aldrich, J. R., Klun, J. A., Oliver, J. E., Debboun, M. (2003) Benzoquinones from millipedes deter mosquitoes and elicit self-anointing in capuchin monkeys (*Cebus spp.*). *Naturwissenschaften*, 90(7), 301–304.
- Weldon, P. J. (2004) Defensive anointing: extended chemical phenotype and unorthodox ecology. *Chemoecology*, 14(1), 1–4.
- Wenninger, E. J., Averill, A. L. (2006) Influence of body and genital morphology on relative male fertilization success in oriental beetle. *Behavioral Ecology*, 17(4), 656–663.
- Wesener, T., Sierwald, P. (2005) The giant pill-millipedes of Madagascar: Revision of the Genus *Sphaeromimus*, with a Review of the Morphological Terminology (Diplopoda, Sphaerotheriida, Sphaerotheriidae). *Proceedings of the California Academy of Sciences, Fourth Series*, 56(29), 557–599.
- Wesener, T., Enghoff, H., Sierwald, P. (2009) Review of the Spirobolida on Madagascar, with descriptions of twelve new genera, including three "fire millipedes" (Diplopoda). *Zookeys*, 19, 1–128.
- Whitman, D. W., Billen, J. P., Alsop, D., Blum, M. S. (1991) Anatomy, ultrastructure, and functional morphology of the metathoracic tracheal defensive glands of the grasshopper *Romalea guttata*. *Canadian Journal of Zoology*, 69 (8), 2100–2108.

- Widemo, F., Sæther, S. A. (1999) Beauty is in the eye of the beholder: causes and consequences of variation in mating preferences. *Trends in Ecology & Evolution*, 14(1), 26–31.
- Wigglesworth, V. B. (1990) The distribution, function and nature of "cuticulin" in the insect cuticle. *Journal of Insect Physiology*, 36(5), 307–313.
- Williams, L. A., Singh, P. D. A., Caleb-Williams, L. S. (1997) Biology and biological action of the defensive secretion from a Jamaican millipede. *Naturwissenschaften*, 84 (4), 143–144.
- Wilson, H. M., Anderson, L. I. (2004) Morphology and taxonomy of paleozoic millipedes (Diplopoda: Chilognatha: Archipolypoda) from Scotland. *Journal of Paleontology*, 78(1), 169–184.
- Wilson, H. M. (2006) Juliformian millipedes from the Lower Devonian of Euramerica: implications for the timing of millipede cladogenesis in the Paleozoic. *Journal of Paleontology*, 80(4), 638–649.
- Wojcieszek, J. M., Simmons, L. W. (2011) Male genital morphology influences paternity success in the millipede *Antichiropus variabilis*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65(10), 1843–1856.
- Wongthamwanich, N., Panha, S., Sitthicharoenchai, D., Pradatsundarasar, A. O., Seelanan, T., Enghoff, H., Thirakhupt, K. (2012) Daily activities of the giant pill-millipede *Zephronia cf. viridescens* Attems, 1936 (Diplopoda: Sphaerotheriida: Zephroniidae) in a deciduous forest in northern Thailand. *Zoological Studies*, 51(7), 913–926.
- Wood, W. F., Hanke, F. J., Kubo, I., Carroll, J. A., Crews, P. (2000) Buzonamine, a new alkaloid from the defensive secretion of the millipede, *Buzonium crassipes*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 28 (4), 305–312.
- Woodring, J., Blum, M. (1963) The anatomy and physiology of the repugnatorial glands of *Pachydesmus crassicutus*. *Annals of the Entomological Society of America*, 56(4), 448–453.



- Woodring, J., Blum, M (1965) The anatomy, physiology and comparative aspects of the repugnatorial glands of *Orthocricus arboreus* (Diplopoda: Spirobolidae). *Journal of Morphology*, 116(1), 99–108.
- Wu, X., Buden, D. W., Attygalle, A. B. (2007) Hydroquinones from defensive secretion of a giant Pacific millipede, *Acladocricus setigerus* (Diplopoda: Spirobolida). *Chemoecology*, 17(3), 131–138.
- Yamaguchi, T., Kuwahara, Y., Asano, Y. (2017) A novel cytochrome P450, CYP3201B1, is involved in (R)-mandelonitrile biosynthesis in a cyanogenic millipede. *FEBS Open Bio*, 7(3), 335–347.
- Young, A. J., Bennett, N. C. (2013) Intra-sexual selection in cooperative mammals and birds: why are females not bigger and better armed? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 368(1631), 20130075.
- Youngsteadt, N. W. (2008) Laboratory observations on the behavior of two troglobitic millipede species in the genus *Causeyella* (Chordeumatida: Trichopetalidae) from the southern Ozarks. *Transactions of the Kansas Academy of Science*, 111(1), 136–140.
- Zeh, J. A., Newcomer, S. D., Zeh, D. W. (1998) Polyandrous females discriminate against previous mates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(23), 13732–13736.
- Zito, M., Evans, S., Weldon, P. J. (2003) Owl monkeys (*Aotus spp.*) self-anoint with plants and millipedes. *Folia Primatologica*, 74(3), 159–161.

## **Biografija autora**

Jovanović S. Zvezdana, diplomirani biolog-master ekolog, rođena je 15.8.1989. godine u Beogradu. Osnovne studije na Biološkom fakultetu - Univerziteta u Beogradu upisala je 2008. godine, na studijskoj grupi ekologija i zaštita životne sredine, a diplomirala 2012. godine. Master studije, na modulu ekologija zemljišta, završila je 2013. godine. Iste godine upisuje doktorske studije na modulu biologija razvića životinja. Bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja u periodu od 2014. do 2017. godine. U zvanje istraživač-saradnik na Katedri za dinamiku razvića životinja Instituta za zoologiju Univerziteta u Beogradu - Biološkog fakulteta izabrana je 2018. godine u okviru projekta „Ontogenetska karakterizacija filogenije bioraznovrsnosti” (OI 173038). Član je Entomološkog društva Srbije.

Autor i koautor je tri naučna rada objavljena u vrhunskim međunarodnim časopisima kategorije M21, dva rada objavljena u istaknutim međunarodnim časopisima kategorije M22, jednog rada u međunarodnom časopisu kategorije M23, dva rada u časopisu nacionalnog značaja kategorije M53 i nekoliko saopštenja sa nacionalnih i međunarodnih skupova.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а            Јовановић Звездана

број индекса            Б3008/2013

### Изјављујем

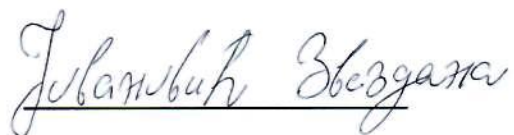
да је докторска дисертација под насловом

Онтогенетска, хистолошка, семиохемијска и етолошка истраживања врсте  
*Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) (Diplopoda, Julida, Julidae)

- 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.

Потпис докторанда

У Београду, 17.10.2019.



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора	Јовановић Звездана
Број индекса	Б3008/2013
Студијски програм	Биологија
Наслов рада	Онтогенетска, хистолошка, семиохемијска и етолошка истраживања врсте <i>Pachyiulus hungaricus</i> (Karsch, 1881) (Diplopoda, Julida, Julidae)
Ментор	проф. др Слободан Макаров и проф. др Лука Лучић
Потписани/а	Јовановић Звездана

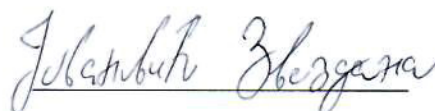
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, 17.10.2019.



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Онтогенетска, хистолошка, семиохемијска и етолошка истраживања врсте *Pachyiulus hungaricus* (Karsch, 1881) (Diplopoda, Julida, Julidae)

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, 17.10.2019.



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.