



UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Elvira Vukašinović

ANALIZA LIPIDA I MASNIH KISELINA  
NEDIJAPAUZIRAJUĆIH I DIJAPAUZIRAJUĆIH GUSENICA  
KUKURUZNOG PLAMENCA (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.)  
(INSECTA: LEPIDOPTERA)

~ DOKTORSKA DISERTACIJA ~

NOVI SAD, 2014.

*Rad posvećujem svojoj porodici*

# *Zahvalnica*

*Pre svega, koristim priliku da izrazim neizmernu zahvalnost svom mentoru, prof. dr Gordani Grubor-Lajšić, koja mi je omogućila da boravim u Institutu za istraživanje Antarktika „British Antarctic Survey“ u Kembridžu u Velikoj Britaniji, gde sam uradila značajan deo analiza u okviru ove disertacije. Njena neiscrpna želja da pomogne i nesebično angažovanje tokom realizacije ove disertacije, bezgranična podrška, razumevanje, kao i izuzetna savesnost prilikom pregleda rukopisa, doprinela je izradi ove doktorske disertacije. Njena podrška i strpljenje pomogli su mi da savladam prepreke sa kojima sam se susretala. Čast mi je, privilegija i zadovoljstvo što sam deo njenog naučno-istraživačkog tima.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem i svojim saradnicima iz Kembridža, dr Roger Worland i dr David Pond, koji su bili uz mene tokom mog boravka u Institutu za istraživanje Antarktika „British Antarctic Survey“. Dr David Pond omogućio mi je da eksperimentalni deo ove disertacije uradim u njegovoj laboratoriji. Dr Roger Worland mi je nesebičnom podrškom učinio rad i boravak u Kembridžu nezaboravnim.*

*Želim da se zahvalim članovima komisije prof. dr Smiljki Šimić, dr Dušku Blagojeviću i dr Danijeli Kojić na konstruktivnim savetima tokom čitanja ove disertacije.*

*Takođe, želim da se zahvalim mojim dragim kolegama Danijeli, Jeleni, Željku, Anđelki, Edvardu, Sneži, Tanji, Ani i Jovani na spremnosti da u svakom trenutku pomognu, kao i na prijatnoj i veseloj radnoj atmosferi kako u laboratoriji tako i na zajedničkim terenima.*

*Neizmernu zahvalnost dugujem najdražima, svojoj porodici, čija me je ljubav, podrška i strpljenje pratila tokom svih ovih godina.*

*Ostalo je da se zahvalim svom suprugu Miroslavu na velikoj ljubavi, neizmernoj podršci i bezgraničnom strpljenju, kao i svojoj ćerkici Kristini koja mi je svojim dolaskom na svet ulila dodatni elan, snagu i motivaciju da privedem ovaj rad kraju.*

# SADRŽAJ

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Opšti deo</b> .....	4
2.1. Dijapauza kod insekata.....	5
2.2. Otpornost insekata na hladnoću.....	5
2.3. Masno telo.....	7
2.4. Lipidi insekata.....	9
2.4.1. Metabolički lipidi insekata.....	10
2.4.1.1. Lipidne kapljice masnog tela insekata.....	10
2.4.2. Strukturni lipidi insekata.....	13
2.4.2.1. Fenomen homeoviskozne adaptacije.....	17
2.5. Zastupljenost masnih kiselina kod insekata.....	20
2.6. Zastupljenost sterola kod insekata.....	21
2.6.1. Metaboličke transformacije sterola.....	22
2.6.2. Sinteza steroidnih hormona kod insekata.....	22
2.7. Metabolizam lipida kod insekata.....	23
2.8. Mobilizacija energetskog depoa i njena hormonska regulacija.....	26
2.9. Korišćenje lipida kod insekata.....	27
<b>3. Cilj istraživanja</b> .....	32
<b>4. Materijal i metode</b> .....	34
4.1. Eksperimentalne životinje.....	35
4.2. Sakupljanje eksperimentalnih životinja i plan istraživanja.....	36
4.3. Priprema uzoraka.....	39
4.3.1. Priprema homogenata celih gusenica i ekstrakcija ukupnih lipida.....	39
4.3.2. Izolovanje hemolimfe i masnog tela i ekstrakcija ukupnih lipida.....	39
4.4. Metode istraživanja.....	40
4.4.1. Tankoslojna hromatografija (TLC).....	40

4.4.2. Gasno-masene hromatografske analize (GC-MS).....	4 0
4.4.3. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC).....	4 2
4.5. Statistička obrada podataka.....	4 2
<b>5. Rezultati istraživanja.....</b>	<b>4 3</b>
5.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija ukupnih lipida gusenica kukuruznog plamenca <i>O. nubilalis</i> .....	4 4
5.1.1. Temperature faznog prelaza ukupnih lipida nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica u uslovima spoljašnje temperature, tokom različitih faza dijapauze.....	4 4
5.1.2. Temperature faznog prelaza ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica tokom različitih faza dijapauze u uslovima hlađenja.....	4 8
5.2. Analiza masnih kiselina ukupnih lipida gusenica kukuruznog plamenca <i>O. nubilalis</i> .....	5 3
5.2.1. Sastav masnih kiselina polarne (strukturne) i nepolarne (rezervne) frakcije ukupnih lipida nedijapauzirajućih, i dijapauzirajućih gusenica tokom dijapauze.....	5 3
5.2.2. Sastav masnih kiselina polarne (strukturne) i nepolarne (rezervne) frakcije ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica tokom dijapauze, u uslovima hlađenja.....	6 9
5.2.2.1. Uticaj temperature na sastav masnih kiselina polarne frakcije.....	6 9
5.2.2.2. Uticaj temperature na sastav masnih kiselina nepolarne frakcije.....	7 8
5.3. Analiza lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> .....	8 7
5.3.1. Klase lipida hemolimfe i masnog tela.....	8 7
5.3.2. Masne kiseline ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica tokom dijapauze.....	8 9
5.3.3. Masne kiseline ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela dijapauzirajućih gusenica u uslovima hlađenja.....	105
5.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija ukupnih lipida masnog tela gusenica kukuruznog plamenca <i>Ostrinia nubilalis</i> .....	124
5.4.1. Temperature faznog prelaza ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica u uslovima spoljašnje sredine.....	124
5.4.2. Temperature faznog prelaza ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica, u uslovima hlađenja.....	129

<b>6. Diskusija</b> .....	1 3 4
6.1. DSC analiza ukupnih lipida gusenica <i>O. nubilalis</i> .....	1 3 5
6.2. Promene u sastavu masnih kiselina polarne (strukturne) i nepolarne (rezervne) frakcije ukupnih lipida celih gusenica <i>O. nubilalis</i> .....	1 3 8
6.3. Lipidi hemolimfe i masnog tela: klase lipida, sastav masnih kiselina ukupnih lipida i dinamika promena masnih kiselina tokom dijapauze.....	1 4 7
6.4. Promene u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela.....	1 4 8
6.5. Dijapauza indukuje promene u biofizičkim osobinama ukupnih lipida masnog tela gusenica <i>O. nubilalis</i> .....	1 5 2
<b>7. Zaključci</b> .....	1 5 5
<b>8. Literatura</b> .....	1 5 8

## LISTA ŠEMA

Šema 1. Opis i oznake analiziranih grupa gusenica kukuruznog plamenca <i>O. nubilalis</i> ..	3 8
--	-----

## LISTA SLIKA

<b>Slika 1.</b> Šematski prikaz regulacije lipolize u adipoznom tkivu kičmenjaka (A) i insekata (B).....	1 2
<b>Slika 2.</b> Struktura ćelijske membrane (model tečnog mozaika).....	1 4
<b>Slika 3.</b> Zasićena i <i>cis</i> -nezasićena masna kiselina.....	1 6
<b>Slika 4.</b> Šematski prikaz metabolizma lipida kod insekata; od razgradnje lipida u lumenu srednjeg creva, apsorpcije FA preko FATP, njihove transformacije u molekule DAG u enterocitima srednjeg creva, prenošenja DAG iz enterocita srednjeg creva do čestica lipoforina do transporta putem hemolimfe do ćelija masnog tela gde se vrši skladištenje energetske rezerve u formi TAG.....	2 6
<b>Slika 5.</b> Razvojni stadijumi kukuruznog plamenca <i>O. nubilalis</i> , Hbn.....	3 5
<b>Slika 6.</b> DSC termogrami (deo pri zagrevanju) ukupnih lipida celih nedijapauzirajućih (ND), i dijavauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijavauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	4 6
<b>Slika 7.</b> DSC termogrami (deo pri zagrevanju) ukupnih lipida celih dijavauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja (5°C, -3°C i -10°C) tokom dijavauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	4 9
<b>Slika 8. A i B.</b> Sastav masnih kiselina polarne (strukturne) i nepolarne (rezervne) frakcije ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND), i dijavauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom različitih faza dijavauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	5 7
<b>Slika 9.</b> Relativni sadržaj palmitinske masne kiseline C16:0 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijavauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> (efekat stanja) i tokom različitih faza dijavauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	5 8
<b>Slika 10.</b> Relativni sadržaj palmitoleinske masne kiseline C16:1n-7 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijavauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> (efekat stanja), tokom različitih faza dijavauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	5 9
<b>Slika 11.</b> Relativni sadržaj stearinske masne kiseline C18:0 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijavauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> (efekat stanja), tokom različitih faza dijavauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	6 0

<b>Slika 12.</b> Relativni sadržaj oleinske masne kiseline C18:1n-9 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> (efekat stanja), tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	6 1
<b>Slika 13.</b> Relativni sadržaj vakenske masne kiseline C18:1n-7 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida, ekstrahovanih iz nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> (efekat stanja), tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	6 2
<b>Slika 14.</b> Relativni procentualni sadržaj linolne masne kiseline C18:2n-6 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> (efekat stanja), tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	6 3
<b>Slika 15.</b> Relativni sadržaj α-linolenske masne kiseline C18:3n-3 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> (efekat stanja), tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	6 4
<b>Slika 16. A, B, C i D</b> Analiza relativnog sadržaja masnih kiselina polarne (fosfolipidi) i nepolarne (triacilgliceroli) frakcije ukupnih lipida celih nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj), po glavnim komponentama (PC1 i PC2).....	6 5
<b>Slika 17.</b> Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	7 0
<b>Slika 18.</b> Relativni sadržaj palmitoleinske kiseline C16:1n-7, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	7 1
<b>Slika 19.</b> Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	7 2
<b>Slika 20.</b> Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1n-9, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	7 3
<b>Slika 21.</b> Relativni sadržaj vakenske kiseline C18:1n-7, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	7 4
<b>Slika 22.</b> Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom, različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	7 5



<b>Slika 23.</b> Relativni sadržaj $\alpha$ -linolenske kiseline C18:3n-3, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	7 6
<b>Slika 24.</b> Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	7 9
<b>Slika 25.</b> Relativni sadržaj palmitooleinske kiseline C16:1n-7, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	8 0
<b>Slika 26.</b> Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	8 1
<b>Slika 27.</b> Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1n-9, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	8 2
<b>Slika 28.</b> Relativni sadržaj vakenske kiseline C18:1n-7, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	8 3
<b>Slika 29.</b> Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	8 4
<b>Slika 30.</b> Relativni sadržaj $\alpha$ -linolenske kiseline C18:3n-3, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	8 5
<b>Slika 31. A i B</b> Sastav masnih kiselina hemolimfe i masnog tela nedijabauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	9 2
<b>Slika 32.</b> Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0 u hemolimfi i masnom telu nedijabauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	9 3
<b>Slika 33.</b> Relativni sadržaj palmitoleinske kiseline C16:1n-7 u hemolimfi i masnom telu nedijabauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	9 4
<b>Slika 34.</b> Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0 u hemolimfi i masnom telu nedijabauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	9 5

<b>Slika 35.</b> Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1n-9 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	9 6
<b>Slika 36.</b> Relativni sadržaj vakenske kiseline C18:1n-7 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	9 7
<b>Slika 37.</b> Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	9 8
<b>Slika 38.</b> Relativni sadržaj α-linoleinske kiseline C18:3n-3 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	9 9
<b>Slika 39. A i B</b> Promene u sastavu masnih kiselina hemolimfe (A) i masnog tela (B), nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj), prema zasićenosti: zasićene (SFA), mononezasićene (MUFA) i polinezasićene (PUFA) masne kiseline. Prikazane su i promene u stepenu zasićenosti masnih kiselina, kao odnos nezasićenih (suma MUFA i PUFA) i zasićenih masnih kiselina (UFA/SFA).....	1 0 0
<b>Slika 40. A i B</b> Analiza po glavnim komponentama (PC1 i PC2), relativnog sadržaja masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 0 1
<b>Slika 41.</b> Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0, u hemolimfi dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 0 6
<b>Slika 42.</b> Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:1n-7, u hemolimfi dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 0 7
<b>Slika 43.</b> Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0, u hemolimfi dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 0 8
<b>Slika 44.</b> Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1n-9, u hemolimfi dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 0 9
<b>Slika 45.</b> Relativni sadržaj vakenske kiseline C18:1n-7, u hemolimfi dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 1 0
<b>Slika 46.</b> Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6, u hemolimfi dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 1 1

<b>Slika 47.</b> Relativni sadržaj $\alpha$ -linolenske kiseline C18:3n-3, u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 1 2
<b>Slika 48.</b> Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 1 6
<b>Slika 49.</b> Relativni sadržaj palmitoleinske kiseline, C16:1n-7, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom različitih faza dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 1 7
<b>Slika 50.</b> Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 1 8
<b>Slika 51.</b> Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1n-9, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 1 9
<b>Slika 52.</b> Relativni sadržaj vakenske kiseline C18:1n-7, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 2 0
<b>Slika 53.</b> Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 2 1
<b>Slika 54.</b> Relativni sadržaj $\alpha$ -linolenske kiseline C18:3n-3, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 2 2
<b>Slika 55.</b> DSC termogrami (deo pri zagrevanju) ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 2 6
<b>Slika 56.</b> Uporedni DSC termogrami ukupnih lipida (TL) i triacilglicerola (TAG) nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih (D) gusenica <i>O. nubilalis</i> .....	1 2 8
<b>Slika 57.</b> DSC termogrami (deo pri zagrevanju) ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj) u uslovima kontrolisanog hlađenja (5°C, -3°C i -10°C).....	1 3 0

## LISTA TABELA

<b>Tabela 1.</b> Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida celih nedijapauzirajućih (ND), i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	4 7
<b>Tabela 2.</b> Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja na početku dijabauze (D <sub>1</sub> ).....	5 0
<b>Tabela 3.</b> Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja sredinom dijabauze (D <sub>2</sub> ).....	5 1
<b>Tabela 4.</b> Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja krajem dijabauze (D <sub>3</sub> ).....	5 2
<b>Tabela 5. A i B</b> Procentualni udeo pojedinačnih masnih kiselina u pulu masnih kiselina nepolarne i polarne frakcije ukupnih lipida, nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> i D <sub>3</sub> - sredina i D <sub>4</sub> i D <sub>5</sub> - kraj).....	6 6
<b>Tabela 6.</b> Dvofaktorska analiza varijanse procentualnog udela pojedinačnih masnih kiselina u pulu masnih kiselina nepolarne i polarne frakcije (faktor F), ukupnih lipida nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih (faktor S), gusenica <i>O. nubilalis</i> .....	6 7
<b>Tabela 7.</b> Dvofaktorska analiza varijanse procentualnog udela masnih kiselina u pulu masnih kiselina, prema zasićenosti: zasićene - SFA; nezasićene - UFA (mononezasićene - MUFA i polinezasićene - PUFA) u polarnoj i nepolarnoj frakciji (faktor F), ukupnih lipida nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih (faktor S), gusenica <i>O. nubilalis</i> .....	6 8
<b>Tabela 8.</b> Analiza relativne zastupljenosti pojedinačnih masnih kiselina u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> izloženih kontrolisanoj temperaturi (5°C, -3°C i -10°C) tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	7 7
<b>Tabela 9.</b> Analiza relativne zastupljenosti pojedinačnih masnih kiselina u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> izloženih kontrolisanoj temperaturi (5°C, -3°C i -10°C) tokom različitih faza dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	8 6
<b>Tabela 10.</b> Sastav ukupnih lipida (procentualni udeo razdvojenih frakcija) hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	8 8
<b>Tabela 11. A i B</b> Procentualni udeo pojedinačnih masnih kiselina u pulu masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijabauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 0 2

<b>Tabela 12.</b> Dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) statistički značajnih razlika procentualnog udela pojedinačnih masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela (faktor T), nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih (faktor S), gusenica <i>O. nubilalis</i> .....	1 0 3
<b>Tabela 13.</b> Dvofaktorska analiza varijanse procentualnog udela masnih kiselina u pulu masnih kiselina, prema zasićenosti: zasićene - SFA; nezasićene - UFA (mononezasićene - MUFA i polinezasićene - PUFA) ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela (faktor T), nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih (faktor S), gusenica <i>O. nubilalis</i> .....	1 0 4
<b>Tabela 14.</b> Procentualni udeo masnih kiselina u ukupnom pulu masnih kiselina hemolimfe i masnog tela dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 1 3
<b>Tabela 15.</b> Statistička analiza (ANOVA) relativnog sadržaja masnih kiselina hemolimfe dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj) u odnosu na fazu dijapauze (F) i temperaturu (T) kao faktore.....	1 1 4
<b>Tabela 16.</b> Relativni sadržaj masnih kiselina masnog tela dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> , u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa fazom dijapauze (F) i temperaturom (T) kao faktorima.....	1 2 3
<b>Tabela 17.</b> Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (maksimum, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> tokom dijapauze (D <sub>1</sub> - početak, D <sub>2</sub> - sredina i D <sub>3</sub> - kraj).....	1 2 7
<b>Tabela 18.</b> Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja početkom dijapauze (D <sub>1</sub> ).....	1 3 1
<b>Tabela 19.</b> Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja sredinom dijapauze (D <sub>2</sub> ).....	1 3 2
<b>Tabela 20.</b> Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica <i>O. nubilalis</i> izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja krajem dijapauze (D <sub>3</sub> ).....	1 3 3

---

# *1. Uvod*

---

Insekti predstavljaju najbrojniju, najraznovrsniju i najšire rasprostranjenu grupu organizama. Posebno izražena sposobnost adaptacije na promenljive uslove sredine, bazirana na genetičkoj raznovrsnosti, omogućuje im preživljavanje nepovoljnih uslova, što se može ilustrovati njihovom sposobnošću da žive i u izrazito hladnim polarnim predelima, kao što su Arktik, Alpi i Antartik, gde veoma mali broj organizama može da preživi.

Organizmi koji se tokom života suočavaju sa nepovoljnim uslovima sredine koji često ugrožavaju i njihove osnovne životne funkcije, ulaze u stanje mirovanja, hipometabolizma, u kom ostaju sve dok uslovi ponovo ne postanu povoljni za njihovo dalje razviće i reprodukciju. Insekti, da bi preživeli nepovoljne uslove sredine, i uskladili svoj životni ciklus sa ekološkim uslovima staništa, stekli su sposobnost da zaustave svoje ontogenetsko razviće na određenom stadijumu i uđu u stanje hipometabolizma. Ulazak u stanje mirovanja je obično povezano sa spoljašnjim faktorima, kao što su fotoperiod (odnos dužine dana i noći), niska ili visoka temperatura, gustina populacije, raspoloživost i priroda hrane, nedostatak kiseonika ili vode i slično. Kod insekata poznata je pojava dijapauze, koja predstavlja jednu od stečenih strategija preživljavanja, kojom oni usklađuju svoj životni ciklus sa, za život nepovoljnim uslovima sredine.

Dijapauza i otpornost na hladnoću (cold hardiness, *eng.*), kod mnogih insekatskih vrsta često predstavljaju esencijalne, tesno povezane komponente strategije preživljavanja delovanja niske temperature, kao što je to slučaj i kod kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis*, Hbn. Na osnovu načina (stečene strategije) na koji preživljavaju temperature ispod 0°C, insekte možemo podeliti na tri grupe: *a*) insekti koji su otporni na zamrzavanje telesnih tečnosti, odnosno tolerišu ekstracelularno formiranje kristala leda *b*) insekti koji su neotporni na zamrzavanje telesnih tečnosti i moraju da izbegnu formiranje kristala leda pothlađivanjem svojih telesnih tečnosti i *c*) insekti koji preživljavaju temperature ispod 0°C, zahvaljujući gubitku vode kroz permeabilnu kutikulu, što je označeno terminom krioprotektivna dehidratacija. Pored mehanizama za tolerisanje ili izbegavanje formiranja kristala leda u telesnim tečnostima, ovi organizmi se suočavaju i sa gubitkom vode, bilo kroz samo formiranje kristala leda ili izbegavanjem njegovog formiranja. Nezavisno od strategije preživljavanja temperature ispod 0°C, organizmi sintetišu ista biohemijska jedinjenja (krio/anhidroprotektanti, nukleatori kristalizacije i antrifriz proteini) sa jedinstvenom fiziologijom kod svakog vida strategije. Važan mehanizam u odbrani od hladnoće je sinteza i akumulacija velike koncentracije krio/anhidroprotektanata, polihidroksilnih alkohola i šećera. Najčešći krioprotektanti jesu polihidroksilni alkoholi kao što je glicerol, mioinozitol, sorbitol,

ribitol, zatim mono- i disaharidi kao što je glukoza, trehaloza i saharoza, ili amino kiseline kao što je alanin i prolin. Ova jedinjenja štite organizam koligativno, povećanjem osmolarnosti i snižavanjem tačke mržnjenja, dok ne-koligativan efekat ovih jedinjenja je stabilizacija membrana, proteina i drugih molekulskih struktura u ćeliji (hipoteza zamene vode). Molekularni, biohemijski i fiziološki mehanizmi stečenih strategija preživljavanja niskih temperatura u stanju dijapauze, pored sinteze specifičnih biohemijskih jedinjenja, usmereni su i na očuvanje strukturnog i funkcionalnog integriteta biomolekula.

Iako se o osnovnim strukturnim i metaboličkim dešavanjima u dijapauzi insekata već dosta zna, još uvek postoje brojne dileme o ovom vidu preživljavanja insekata u nepovoljnim uslovima, posebno sa aspekta izloženosti niskim zimskim temperaturama i mehanizmima krioprotekcije. Istraživanja u okviru disertacije na insekatskom model organizmu, kukuruznom plamencu *Ostrinia nubilalis* Hbn., usmerena su ka razumevanju očuvanja strukturnog i metaboličkog integriteta važne grupe biomolekula – lipida, u adaptacionom odgovoru vrste, dijapauzi i otpornosti na hladnoću.



---

## *2. Opšti deo*

---

## **2.1. Dijapauza kod insekata**

Insekti sa preko milion opisanih vrsta predstavljaju najbrojniju, najraznovidniju i najširu rasprostranjenu grupu organizama. Naseljavaju veoma raznolika mesta na Zemlji, mada je mali broj vrsta prilagođen životu u moru. Njihova sposobnost adaptacije na promenljive uslove sredine, bazirana na genetičkoj raznovrsnosti, omogućuje im dominaciju već nekoliko stotina miliona godina. Vrste koje naseljavaju umerene i polarne predele stekle su brojne mehanizme adaptacija kojima preživljavaju delovanje niske temperature, što se može ilustrovati njihovom sposobnošću da žive u izrazito hladnim regionima, kao što su Arktik, Alpi i Antartik, zbog čega predstavljaju izuzetan model za istraživanja iz oblasti kriobiologije.

Dijapauza je specifično stanje mirovanja, hipometabolizma (snižen intenzitet fizioloških procesa), kojom insekti usklađuju svoj životni ciklus sa, za život nepovoljnim uslovima sredine (Denlinger, 1991). Najčešće se javlja kod insekata i predstavlja jednu od stečenih strategija preživljavanja mnogih vrsta. Insekti, da bi preživeli nepovoljne uslove sredine, i uskladili svoj životni ciklus sa ekološkim uslovima staništa, moraju steći sposobnost da zaustave svoje ontogenetsko razviće na određenom stadijumu i uđu u dijapauzu, stanje u koje ulaze u različitim stadijumima razvića, zavisno od vrste (Bale i Hayward, 2009). Tako na primer, svilena buba *Bombyx mori*, dijapauzira kao embrion, kukuruzni plamenac *Ostrinia nubilalis*, kao gusenica, muva zlatara *Sarcophaga bercaea* kao lutka, dok krompirova zlatica *Leptinotarsa decemlineata*, kao adult. Dijapauza predstavlja odgovor na promene kod različitih faktora sredine: fotoperiod (odnos dužine dana i noći), sniženje ili povećanje temperature, gustina populacije, raspoloživost i priroda hrane i slično. Kod insekata koji naseljavaju predele sa umerenom klimom odnosno uslovima sezonsko-periodične klime, faktori sa uravnoteženom periodičnošću imaju ulogu signala koji obaveštavaju organizme sa stečenim mehanizmima adaptacije, o nastupajućem nepovoljnom periodu za život. Dijapauza je sa aspekta adaptivnih procesa vrlo dinamično stanje organizma, koje je veoma precizno hormonski regulisano i usklađeno sa uslovima koji karakterišu životnu sredinu vrste.

## **2.2. Otpornost insekata na hladnoću**

Otpornost na hladnoću (cold hardiness, *eng.*) i dijapauza, kod mnogih insekatskih vrsta često predstavljaju esencijalne, tesno povezane komponente strategije preživljavanja delovanja niske temperature (Denlinger, 1991), kao što je to slučaj kod vrste *Ostrinia*

*nubilalis*, Hbn. (Asahina, 1966; Grubor-Lajšić, 1991, 1992), ali i mnogih drugih vrsta *Scharcophaga bullata* i *Sarcophaga crassipalpis* (Adedokun i Denlinger, 1984; Lee i Denlinger, 1985; Lee i sar., 1987), *Bombyx mori* (Chino, 1958), *Hyalophora cecropia* (Wyatt i Meyer, 1959), *Chilio suppressalis* (Izumi i sar., 2005). Otpornost na delovanje niske temperature kod mnogih insekatskih vrsta, ali i drugih ektotermnih organizama koji naseljavaju područja sa umerenom klimom, ima sezonski karakter.

Na osnovu načina na koji preživljavaju temperature ispod 0°C insekte možemo podelite u tri grupe (Bale, 1987; Holmstrup i sar., 2002):

- 1) insekti koji su otporni na zamrzavanje telesnih tečnosti, odnosno tolerišu ekstracelularno formiranje kristala leda,
- 2) insekti koji su neotporni na zamrzavanje telesnih tečnosti, odnosno ekstracelularno formiranje kristala leda; ovi insekti su stekli strategiju pothlađivanja svojih telesnih tečnosti kojom ih održavaju u tečnom stanju i pri temperaturama daleko ispod 0°C,
- 3) insekti koji snižavaju tačku pothlađivanja, održavajući pritisak vodene pare svojih telesnih tečnosti u ravnoteži sa pritiskom vodene pare okolnog leda - što nazivamo krioprotektivna dehidratacija. Zasniva se na gubitku vode kroz permeabilnu kutikulu, zbog razlike u naponu vodene pare okolnog leda i pothlađene telesne tečnosti organizma, pri čemu insekti preživljavaju delovanje niske temperature ispod 0°C, u skoro dehidriranom stanju.

Vrste insekata netolerantne na formiranje kristala leda, stekle su strategiju pothlađivanja telesnih tečnosti, što znači da su sposobne da snize telesnu temperaturu daleko ispod tačke mržnjenja čiste vode, a da pri tome ne dođe do formiranja kristala leda u telesnim tečnostima. Tačka na kojoj počinju da se formiraju kristali leda (tačka mržnjenja) naziva se tačka pothlađivanja (SCP - supercooling point, *eng.*), koja ispoljava sezonski karakter kod ovih vrsta insekata (Zachariassen, 1985; Johnston i Lee, 1990). Sezonski karakter podrazumeva postepeno snižavanje tačke pothlađivanja tokom nastupajućeg hladnog perioda, usled pojačane sinteze krioprotektora (Lee Jr., 1991; Block, 1991). Tačka pothlađivanja (kristalizacije, nukleacije) se može detektovati merenjem oslobođene latentne toplote kristalizacije.

Vrste insekata tolerantne na zamrzavanje, naprotiv, iniciraju formiranje kristala leda nukleatorima kristalizacije, proteinske prirode, sintetišući ih tokom jeseni i početkom zime. Nukleatori kristalizacije indukuju formiranje kristala leda pri relativno visokim

temperaturama hemolimfe, najčešće između  $-5^{\circ}\text{C}$  i  $-10^{\circ}\text{C}$ , a zbog nastalih posledica onemogućeno je unutarćelijsko zamrzavanje. Molekularni i fiziološki mehanizmi obe strategije uključuju intenzivniju sintezu jedinjenja male molekulske mase tzv. krio/anhidroprotektora (Sømme, 1982; Lee Jr., 1991; Storey i Storey, 1991, Grubor-Lajšić i sar., 1991, 1992). Krio/anhidroprotektori su polihidroksilni alkoholi, šećeri i amino kiseline: glicerol, sorbitol, mio-inozitol, manitol, eritrol, sorbitol, etilen-glikol i glukoza, trehaloza, alanin i prolin. Ova jedinjenja štite organizam koligativnim efektom, povećavanjem osmolarnosti telesnih tečnosti i tako snižavanjem tačke mržnjenja (Storey i Storey, 1991), dok se njihova nekologativna zaštita odnosi na stabilizaciju membrana (Williams, 1990), proteina (Crowe i sar., 1983; Storey i Storey, 1988) i drugih molekulskih struktura u ćeliji (hipoteza zamene vode).

Glavna funkcija usporenog metabolizma (hipometabolizma) u dijapauzi tokom nastupajućeg hladnog perioda, pored sinteze krio/anhidroprotektanata (Storey i Storey, 1983; Grubor-Lajšić i sar., 1991, 1992; Ohtsu i sar., 1993; Michaud i Denlinger, 2006) jeste i očuvanje strukturnog i funkcionalnog integriteta biomolekula (Sømme, 1982; Lee Jr., 1991; Storey i Storey, 1991).

### **2.3. Masno telo**

Masno telo je analog jetri i adipoznom tkivu kičmenjaka i jedinstven je za insekte (Law i Wells, 1989). Predstavlja relativno velik organ, protežući se duž celog tela insekta, prvenstveno ispod integumenta, okružujući creva i reproduktivne organe (Dean i sar., 1985). Za razliku od čvrste strukture jetre, masno telo insekata je relativno mekano tkivo. Generalno, organ je organizovan u tanke režnjeve, koji su uronjeni u hemolimfu. Ovakva organizacija je od posebnog značaja u uslovima povećane energetske potrebe, kao što je let insekata, tokom kojeg se metabolizam intenzivira 50-100 puta (Beenackers i sar., 1984). Obzirom da su samo male količine energetskih prekursora prisutne u mišićima koji su odgovorni za let, neophodnu energiju tokom leta pružaju cirkulišući energetski supstrati (lipidi, trehaloza i prolin), koji se obnavljaju od strane masnog tela (Beenackers i sar., 1984). Organizacija masnog tela koja omogućava blizak kontakt sa cirkulišućom hemolimfom, predstavlja pogodan sistem, koji je visoko prilagođen jedinstvenoj fiziologiji insekata (Keeley, 1985). Heterogena struktura masnog tela pokazuje regionalnu diferencijaciju koja se može razlikovati i morfološki. Iako su neke funkcije karakteristične za masno telo u celini, neke su lokalizovane u određenim delovima tkiva (Haunerland i Shirk, 1995; Jensen i Borgesen, 2000). Uloga masnog tela se

menja tokom različitih stadijuma razvića insekata, kada se masno telo čak i citološki drastično izmeni (Anaud i Lorenz, 2008).

*Adipociti* predstavljaju glavnu strukturnu komponentu masnog tela, koji su sposobni da deponuju značajnu količinu energetske rezerve u formi triacilglicerola i glikogena. Triacilgliceroli se deponuju u citosolu, u vidu brojnih lipidnih kapljica. Kod insekata, na kraju perioda aktivnog hranjenja, pored glikogenskih i proteinskih granula, lipidne kapljice zauzimaju najveći deo intracelularnog prostora (Dean i sar., 1985).

Manje zastupljene komponente masnog tela predstavljaju *urociti*, koji su specijalizovani za skladištenje urata. Opisani su u masnom telu bubašvaba i skakavaca, dok kod predstavnika reda Lepidoptera nisu detektovani. Kod leptira adipociti vrše funkciju i skladištenja urata. Oni su stekli sposobnost akumulacije urata na kraju stadijuma gusenice, čiji se sadržaj gubi tokom dalje metamorfoze, do razvoja adulta (Willot i sar., 1988).

Treći tip ćelija masnog tela su *micetociti*, koje su opisane kod bubašvaba, afida i nekih vrsta iz reda Hemiptera. Ove ćelije sadrže mikroorganizme koji žive unutar vakuola u stalnoj simbiozi sa pomenutim vrstama (Dean i sar., 1985). Smatra se da simbionti proizvode esencijalne komponente metabolizma koje se ne unose putem hrane (Dillwith i sar., 1993).

Kod nekih insekata se javljaju i *enociti* ektodermalnog porekla, distribuirani među adipocitima masnog tela mezodermalnog porekla. Enociti su specijalizovane ćelije koje mogu biti povezane ili sa epidermalnim ćelijama ili sa ćelijama masnog tela, sa funkcijom sinteze kutikularnih lipida, proteina i ugljovodonika (Lockey, 1988). Novije studije pokazale su da se neki geni koji su inače neuključeni u metabolizam lipida kičmenjaka, ekspresuju u enocitima vrsta roda *Drosophila*, sa mogućom ulogom u mobilizaciji lipida tokom gladovanja (Gutierrez i sar., 2007).

Masno telo, ima veoma važnu ulogu u životu insekata, jer predstavlja veoma dinamično tkivo sa višestrukim metaboličkim funkcijama. Ćelije masnog tela pored važne uloge u kontrolisanju sinteze i korišćenja energetske rezervi triacilglicerola i glikogena, sintetisuje i velike količine važnih proteina kao na primer; rezervne proteine koji čine depo amino kiselina za procese morfogeneze; lipoforine koji su odgovorni za transport lipida kroz hemolimfu; vitelogenin neophodan za sazrevanje jaja (Keeley, 1985). Takođe se i značajna količina cirkulišućih energetske supstrata- metabolita (lipida, trehaloze i prolina) sintetisuje od strane masnog tela. Kod insekata, većina intermedijarnog metabolizma odigrava se u masnom telu; metabolizam lipida i ugljenih hidrata, sinteza proteina, i metabolizam amino kiselina i

azota. Neki metabolički procesi su karakteristični za određeni stadijum u razviću insekata; sinteza i lučenje rezervnih proteina u hemolimfu vezana je za stadijum larve koji se aktivno hrani, dok je sinteza vitelogenina karakteristična za stadijum adulta (Keeley, 1985; Arrese i Soulages, 2010).

Jedna od najvažnih funkcija masnog tela insekata je skladištenje i oslobađanje energetskih rezervi, što zavisi od energetskih potreba insekata. Masno telo insekata je glavno mesto sinteze i akumulacije lipida u formi triacilglicerola. Kod insekata, metabolizam lipida je od suštinskog značaja za metamorfozu, rast i reprodukciju, ali i za preživljavanje dužeg perioda mirovanja tokom kojeg se insekti ne hrane npr. dijapauze (Canavoso i sar., 2001; Arrese i Soulages, 2010).

#### **2.4. Lipidi insekata**

Lipidi predstavljaju grupu jedinjenja veoma heterogene strukture. Njihova zajednička odlika je nerastvorljivost u vodi i drugim polarnim rastvaračima, te rastvorljivost u nizu nepolarnih organskih rastvarača, poput: heksana, acetona, hloroforma, benzena, dietil-etra i drugih. Ukoliko posmatramo sa biološkog aspekta, lipidi čine važnu grupu biomolekula, obzirom da ulaze u sastav ćelijskih membrana, predstavljaju glavno metaboličko gorivo za mnoga stanja, učestvuju u post-translacionoj modifikaciji, ćelijskom signalingu (hormoni, sekundarni glasnici) kao i u razmeni signala između organizama (feromoni). Heterogenost lipida je razlog njihove multifunkcionalnosti.

Jedna od često korištenih podela lipida je na: triacilglicerole, fosfolipide (koji se dele na glicerofosfolipide i sfingolipide), glikolipide, voskove, terpene, steroide i eikozanoide.

Na osnovu uloge, lipidi se najčešće dele na *metaboličke (rezervne)* i *strukturne (membranske) lipide*, pri čemu triacilgliceroli predstavljaju glavnu klasu rezervnih lipida, dok fosfolipidi predstavljaju glavnu klasu strukturnih lipida. Metabolički lipidi imaju ulogu skladištenja i oslobađanja metaboličke energije, dok su strukturni lipidi glavni gradivni elementi ćelijskih membrana i membrana ćelijskih organela. Neki lipidi, kao na primer steroli (holesterol), su i metabolički i strukturni, jer predstavljaju prekursore za sintezu važnih steroidnih hormona,

hormona presvlačenja kod insekata- ekdizona i njegovih homologa, koji se generalno zovu ekdisteroidi, ali su i esencijalne strukturne komponente ćelijskih membrana.

#### **2.4.1. Metabolički lipidi insekata**

Metabolički lipidi, odnosno lipidi koji služe za skladištenje i oslobađanje metaboličke energije jesu acilgliceroli (mono-, di- i triacilglicerola). Hemijski gledano, acilgliceroli su estri glicerola (trohidroksilnog alkohola) i viših masnih kiselina. Masne kiseline molekula acilglicerola, predstavljaju metaboličko gorivo molekula, odnosno izvor metaboličke energije. Kod većine insekata u ekstraktima ukupnih lipida celih jedinki i tkiva, pre svega masnog tela, triacilgliceroli predstavljaju dominantnu klasu lipida, ~90%, sa ulogom energetske rezerve, iz koje se zavisno od potreba organizma, oslobađaju masne kiseline, čijom se oksidacijom oslobađa energija neophodna za funkcionisanje ćelija ali i organizma u celini (Downer i Matthews, 1976; Canavoso i sar., 2001). Uloga energetske depoa- triacilglicerola je fundamentalna za život insekata koji se odlikuju potpunim razvićem (holometabola). Tokom stadijuma larve koji se aktivno hrani, dolazi do akumulacije energetske rezerve, koje će se koristiti tokom metamorfoze sve do formiranja adulta, jer insekti bez njih nisu u stanju da prežive ovaj energetski veoma zahtevan proces (Mirth i Riddiford, 2007), pri čemu se čak i adulti koji se ne hrane, oslanjaju na deponovane energetske rezerve koje moraju da zadovolje njihove potrebe za život ali i reprodukciju. Količina energetske rezerve deponovanih u masnom telu larvi značajno utiče na sposobnost reprodukcije adulta, jer je pokazano da nedovoljna količina značajno redukuje plodnost istih (Briegel, 1990). Insekti koji se aktivno hrane u stadijumu adulta, održavaju svoje energetske stanje aktivnim unošenjem hranljivih materija, posebno tokom pripreme za reprodukciju. Kod ženki mnogih insekatskih vrsta, formiranja jaja uključuje mobilizaciju značajne količine lipidne rezerve iz masnog tela u jajnike (Shiao i sar., 2008; Arrese i Soulage, 2010).

##### **2.4.1.1. Lipidne kapljice masnog tela insekata**

Energetske rezerve skladište se u formi triacilglicerola intracelularno, u specijalizovanim citoplazmatskim kompartmentima, koji se nazivaju *lipidne kapljice*. Skoro sva tkiva mogu da sintetišu i čuvaju molekule triacilglicerola u malim lipidnim kapljicama, ali su adipociti ćelije specijalizovane za njihovo skladištenje. Sve veći broj studija pokazuje, da lipidne kapljice nisu samo pasivni rezervoari lipida, već da predstavljaju dinamične organele (kompartimente) sa centralnom ulogom u metabolizmu lipida i energije (Bickel i sar., 2009; Olofsson i sar., 2009). Lipidne kapljice se sastoje od jezgra i jednoslojnog omotača koji

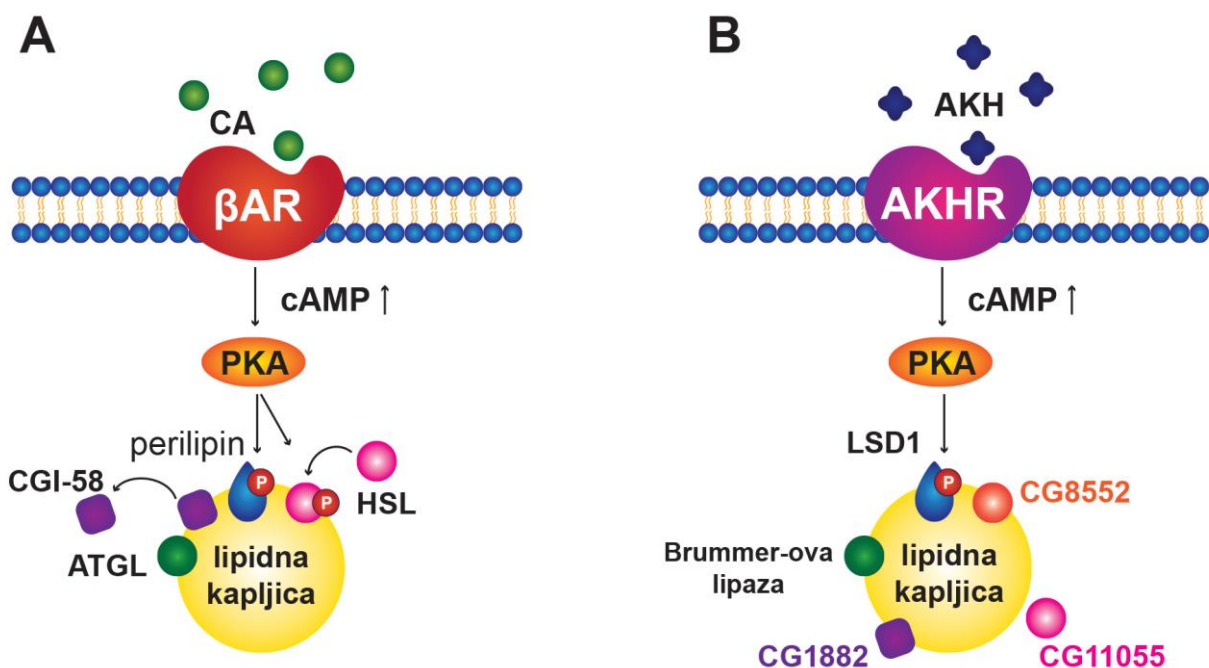
okružuje jezgro. Jezgro je izgrađeno od neutralnih lipida (triacilglicerola i holesterol estara), dok jednoslojni omotač čine fosfolipidi i holesterol. Proteini, integralni i površinski lokalizovani takođe predstavljaju strukturne komponente omotača gde spadaju i proteini iz porodice PAT (proteini lipidnih kapljica) koji imaju sposobnost da se vežu za površinu lipidnih kapljica ili konstitutivno ili kao odgovor na neki metabolički stimulus (Brasaemle, 2007; Bickel i sar., 2009).

Raspoloživost energetske rezerve se ostvaruje preko koordinisanog delovanja enzima lipaza (proces lipolize), na rezerve triacilglicerola. Imajući u vidu slabu rastvorljivost triacilglicerola i njihovu okruženost fosfolipidima, površina lipidnih kapljica predstavlja barijeru za delovanje lipaza, koje moraju doći u kontakt sa neutralnim jezgrom lipidnih kapljica, odnosno molekulima triacilglicerola. Ovo je jedan od primera kako lipidne kapljice igraju važnu ulogu u regulaciji lipolize, jer površina lipidnih kapljica mora biti izmenjena u cilju inicijacije procesa lipolize. Molekularni mehanizam odgovoran za pristup enzima molekulima triacilglicerola smeštenih u jezgru lipidnih kapljica, sve do danas je nepoznat (Arrese i Soulage, 2010). Smatra se da je proces kontrolisan od strane evolutivno konzerviranih proteina koji su označeni kao proteini lipidnih kapljica, koji su sličnih sekvenci i lokalizacije, na površini lipidnih kapljica. Kada su ovi proteini prvi put grupisani u familiju proteina označeni su terminom PAT, koristeći početna slova prva tri opisana proteina (perilipin - P, adipocyte differentiation - related protein - ADRP i tail-interacting protein of 47 kDa - TIP47, *eng.*) Proteini familije PAT regulišu pristup enzima neutralnim lipidima smešteni u jezgru lipidnih kapljica, ali i komuniciraju sa ćelijskim procesima koji su važni za biogenezu lipidnih kapljica (Brasaemle, 2007; Bickel i sar., 2009). Kod kičmenjaka, najbolje okarakterisan protein iz porodice PAT je *perilipin*, koji je važan učesnik u regulaciji lipolize u adipocitima. Signal koji stimuliše hidrolizu triacilglicerola skladištenih unutar lipidnih kapljica adipocita, indukuje se fosforilacijom perilipina (Brasaemle, 2007; Bickel i sar., 2009).

Genom insekata kodira dva proteina koji pripadaju PAT familiji, LSD1 i LSD2 (Gronke i sar., 2003; Bickel i sar., 2009). Saznanja o proteinima LSD1 i LSD2 kod insekata potvrđuju njihovu važnu čak i glavnu ulogu u metabolizmu lipida. Oba proteina se povezuju sa lipidima i sličnih su sekvenci na N-terminalnim krajevima (Arrese i sar., 2008). LSD2 je uključen u proces akumulacije lipida, dok LSD1 u proces aktivacije lipolize. Kod muva, dokazano je da se LSD2 ekspresuje tokom svih razvojnih stadijuma i da je neophodan za normalno skladištenje triacilglicerola (Teixeira i sar., 2003). Prekomerna ekspresija gena LSD2 proteina



kod vrsta roda *Drosophila* dovodi do povećanja sadržaja triacilglicerola, dok njegovo brisanje do smanjenja sadržaja istih (Gronke i sar., 2003, Teixeira i sar., 2003). LSD2 je detektovan u masnom telu a naročito je prisutan u jajnicima (Welte i sar., 1998; Fauny i sar., 2005). Nasuprot očiglednoj funkciji proteina LSD2, koji bi delovao kao vid barijere lipazama, studije sprovedene na vrsti moljca *Manduca sexta* pokazale su da se glavna uloga proteina LSD1 ogleda u aktiviranju lipolize (Patel i sar., 2005; Arrese i sar., 2006; Bickel i sar., 2009). Slično perilipinu kod kičmenjaka, LSD1 predstavlja glavni fosfoprotein lipidnih kapljica nakon hormonske stimulacije lipolize (Patel i sar., 2005; Bickel i sar., 2009).



**Slika 1.** Šematski prikaz regulacije lipolize u adipoznom tkivu kičmenjaka (A) i insekata (B). U oba slučaja, cirkulišući hormoni: CA - kateholamin i AKH - adipokinetički hormon, stimulišu G protein zavisne receptore:  $\beta$ AR -  $\beta$  adrenergički receptor i AKHR - receptor adipokinetičkog hormona koji su smešteni na površini ćelijske membrane adipocita. Vezivanje hormona (primarnog glasnika) za receptor, rezultuje stvaranje sekundarnog glasnika cAMP-a (ciklični adenozin monofosfat). Visok nivo cAMP aktivira PKA (protein kinaza A) koji je odgovoran za fosforilaciju proteina familije PAT lokalizovanih na površini lipidnih kapljica: perilipina i LSD 1. Kod kičmenjaka, fosforilisan perilipin postavlja HSL lipazu na površinu lipidnih kapljica, stimulišući na taj način lipolizu. HSL je meta i PKA. Kod insekata, smatra se da fosforilacija LSD 1 aktivira lipazu CG8552. Funkcija mogućeg ortologa lipaze HSL, CG11055, do danas je nepoznata. Druga grupa lipaza uključena u lipolizu je familija ATGL/Brummer. Kod kičmenjaka, oba protein i perilipin i ATGL iterraguju sa CGI-58 koji su pod uticajem fosforilisanog perilipina; kod insekata, funkcija ortologa CGI-58, CG1882, takođe je još nepoznata, ali je ovaj protein detektovan na površini lipidnih kapljica (preuzeto od Bickel i sar., 2009, modifikovano).

Kod vrste *M. sexta*, fosforilacija proteina LSD 1 odgovorna je za većinu lipolitičkog odgovora, indukovanog adipokinetičkim hormonom (AKH) (Slika 1.). Kod vrste *M. sexta*, LSD 1 lokalizovan je isključivo u lipidnim kapljicama ćelija masnog tela adultnog stadijuma. Kod insekata potvrđeno je da lipidne kapiljice imaju ulogu aktivnih subćelijskih kompartmenta (Patel i sar., 2005; Arrese i sar., 2006; Bickel i sar., 2009).

#### **2.4.2. Strukturni lipidi insekata**

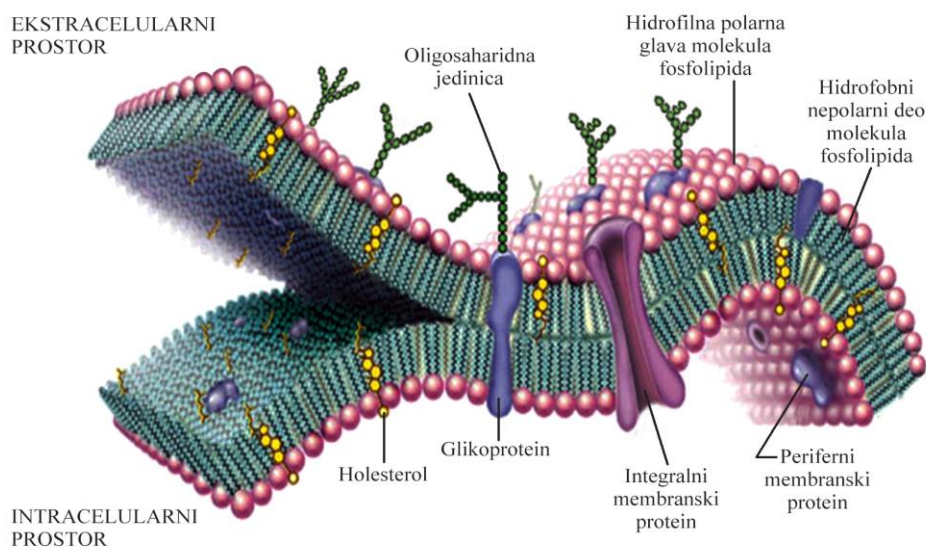
Ćelijska membrana i membrane organela su selektivno propustljive. Imaju ulogu barijere, obezbeđujući individualnost ćelije i njenih organela (kompartmenata), održavajući esencijalnu razliku između citosola i ekstracelularnog prostora. Membrane aktivno učestvuju u transmembranskoj signalnoj transdukciji, i sadrže prekursore sekundarnih glasnika poreklom iz lipida. Membrana predstavlja barijeru procesu difuzije, koja je osnova za uspostavljanje, održavanje i regulisano korišćenje transmembranskog gradijenta rastvora citosola i ekstracelularne tečnosti, koji se koristi za sticanje metaboličkih supstrata i proizvodnju energije. Takođe, membrane učestvuju u unošenju makromolekula iz ekstracelularne tečnosti u unutrašnjost ćelije procesom endocitoze, i u izbacivanju specifičnih proizvoda ćelije, ili nekih drugih materija iz nje, procesom egzocitoze. Funkcije ćelijske membrane su usko zavisne od njenih fizičko-hemijskih osobina, koje su predodređene sastavom lipidnih komponenti (Williams, 1998). Fizičko-hemijske osobine membrana direktno utiču na većinu ćelijskih procesa. Ćelijske membrane ne predstavljaju statičnu barijeru za ćelije, već njenu veoma dinamičnu i funkcionalnu komponentu (Dowhan i Bogdanov, 2002).

Biološke membrane imaju jedinstvenu strukturu. Prema danas opšteprihvaćenom strukturnom modelu, tzv. modelu *tečnog mozaika* (Slika 2.), ćelijska membrana je dinamična fluidna struktura čiji se konstituenti neprekidno kreću i zamenjuju. Izgrađena je od lipidnih (45-50%), proteinskih (45-50%) i ugljenohidratnih (4-8%) molekula. Osnovna strukturna jedinica membrane je lipidni dvosloj (Slika 2.).

Lipidi i proteini koji ulaze u sastav membrane imaju specifičnu lokalizaciju u odnosu na stranu lipidnog dvosloja, pa je zbog toga membrana strukturno i funkcionalno asimetrična. Membranski proteini se prema svojoj lokalizaciji dele na periferne i integralne. Periferni membranski proteini su labavo vezani za membranu nekovalentnim vezama (elektrostatskim interakcijama i vodoničnim vezama), dok su integralni membranski proteini čvrsto vezani za membranu hidrofobnim interakcijama između lipidnog dvosloja i nepolarnih bočnih grupa

amino kiselina ovih proteina. Polipeptidni lanac nekih proteina kao na primer gliceroakvaporina prolazi nekoliko puta kroz membranu, a njihove transmembranske sekvence se sastoje od oko dvadesetak amino kiselina u obliku  $\alpha$ -heliksa. Mnogi membranski proteini sadrže kovalentno vezane oligosaharide različitog stepena kompleksnosti. Glikoproteini plazma membrane su uvek orijentisani tako da se domen sa ugljenohidratnim jedinicama nalazi na ekstracelularnoj strani membrane. Membrana ima sposobnost prijema signala koji dolaze kako iz ekstracelularnog tako i iz intracelularnog prostora, koja omogućuje adekvatan ćelijski odgovor na sve promene, pa samim tim i na promene u temperaturi sredine i dehidraciju.

Fosfolipidi su najzastupljeniji lipidi u animalnoj eukariotskoj ćeliji, dok su u membranama prokariota oni jedini membranski lipidi. Kod prokariota, za razliku od eukariota, holesterol nije strukturna komponenta membrane. Iako postoji nekoliko tipova membrane njihova osnovna, među živim organizmima najzastupljenija i najšire rasprostranjena gradivna komponenta, jeste molekul glicerofosfolipida. Naravno, i druge vrste lipida koji učestvuju u izgradnji membrane važne su strukturne komponente. Njihovo prisustvo i zastupljenost zavisi od organizma i tipa ćelije. Velika varijabilnost membranskih lipida se lako može ilustrovati na primeru bakterije *Escherichia coli*. Ova jednostavna bakterija poseduje samo tri glavne klase fosfolipida sa nekoliko vrsta masnih kiselina. Uprkos ograničenom broju osnovnih gradivnih komponenti, broj međusobnih kombinacija, kreće se u opsegu od stotine različitih molekula. Zato nije iznenađujući podatak da u složenijim eukariotskim organizmima, broj individualnih vrsta fosfolipida dostiže i na hiljade (Dowhan i Bogdanov, 2002).

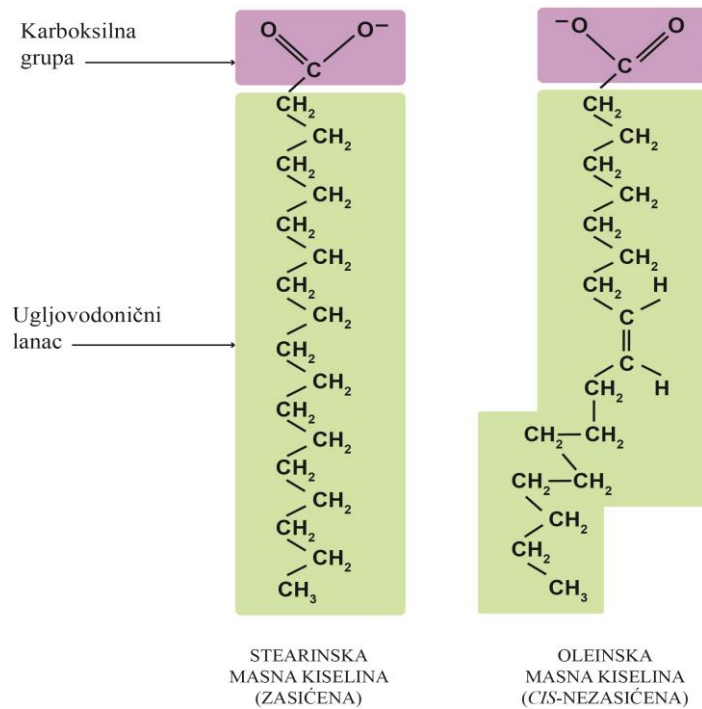


**Slika 2.** Struktura ćelijske membrane (model tečnog mozaika)

U strukturi ćelijske membrane razlikuju se dve grupe fosfolipida: glicerofosfolipidi i sfingolipidi. Glicerofosfolipidi su derivati fosfatidne kiseline i sadrže glicerol, masne kiseline, fosforu kiselinu i azotna jedinjenja. Sfingolipidi umesto glicerola sadrže alkohol sfingozin. Raznolikost lipida zavisi od različitosti masnih kiselina koje ulaze u njihov sastav koje se mogu razlikovati po dužini ugljovodoničnog niza, njegovoj zasićenosti i položaja na molekulu glicerola. Molekuli fosfolipida sastoje se iz polarnog dela (hidrofilna glava) i nepolarnog dela (hidrofobni rep). Zahvaljujući navedenoj strukturi, fosfolipidi su amfipatična jedinjenja (imaju i polarni i nepolarni deo), koja u vodenoj sredini spontano obrazuju dvosloj, koja je i njihova primarna uloga. Lipidni dvosloj se formira tako što se hidrofobni repovi iz dvosloja orijentišu jedan prema drugom, dok su im hidrofilne glave okrenute ka intracelularnom i ekstracelularnom prostoru, odnosno polarnim sredinama (Slika 2.). Hidrofilna glava molekula fosfolipida sastavljena je iz glicerola, fosforne kiseline i aminoalkohola, dok njen hidrofobni rep čine dugački alifatični lanci masnih kiselina. Hidrofobni repovi masnih kiselina zajedno sa steroidnim prstenom holesterola okrenuti prema središtu membrane, stvaraju izrazito hidrofobnu sredinu koja predstavlja nepropustljivu barijeru za polarne i naelektrisane molekule, sprečavajući tako slobodan prolazak vode i jona u ćeliju i van nje, kao i izlazak produkata metabolizma. Fosfolipidne molekule dvosloja i većina uronjenih molekula proteina koji su povezani relativno slabim silama: Van der Waals-ovim, elektrostatičkim i hidrofobnim interakcijama, se neprekidno pomeraju, slobodno klize unutar lipidnog dvosloja (transverzalno kretanje), migriraju iz jednog sloja u drugi (longitudinalno kretanje), mogu menjati mesta u istom sloju i brzo rotirati duže svoje ose. Nedostatak krutih veza, poput kovalentne, veoma je važan za dinamiku membrane, jer su komponente membrane dovoljno slobodne da se okreću i bočno difunduju unutar sloja. Dinamična organizacija membrane je od suštinske važnosti i za njenu funkcionalnost (Hazel, 1995).

Masne kiseline su monokarboksilne kiseline koje predstavljaju važne konstituente prostih i složenih lipida. Njihovu strukturu čine dugi, nerazgranati ugljovodonični lanci. Većina prirodnih masnih kiselina ima paran broj ugljenikovih atoma, jer se sintetišu iz acetyl-CoA, sa dva atoma ugljenika. Mogu biti zasićene ili nezasićene (Slika 3.). Nezasićene masne kiseline imaju jedna ili više dvostrukih, nezasićenih veza unutar ugljovodoničnog niza (Slika 3.). Kod nezasićenih masnih kiselina položaj dvostruke veze ima važan uticaj na njihova biološka svojstva. Po nomenklaturi položaj dvostruke veze se označava sa grčkim slovom  $\Delta$  i brojem C atoma dvostruke veze računajući C atom karboksilne grupe kao prvi. Položaj dvostruke veze se označava i počev od poslednjeg ugljenikovog atoma u lancu ( $\omega$  C atom), pa

govorimo o  $\omega$ -3, 6 ili 9 masnim kiselinama. Dvostruke veze se mogu naći u *cis* ili *trans* konformaciji.



**Slika 3.** Zasićena i *cis*-nezasićena masna kiselina

U prirodi se nezasićene masne kiseline pojavljuju uglavnom u *cis* formi (Slika 3.), sa atomima vodonika na istoj strani dvostruke veze. Kod ove forme izomera lanac se savija, što ograničava sposobnost masne kiseline da se gusto pakuje, što značajno utiče na tačku topljenja lipida membrane (nezasićene masne kiseline imaju niže tačke topljenja). Kod *trans* konformacije, dva susedna atoma vodonika su vezana na suprotnim stranama dvostruke veze. Rezultat toga je formiranje pravog lanca, kao što je lanac zasićenih masnih kiselina. Ove razlike u prostornoj konformaciji između zasićenih i nezasićenih masnih kiselina igraju vrlo značajnu ulogu u izgradnji bioloških struktura (ćelijskih membrana i lipidnih rezervi) kao i u biološkim procesima. Kao deo fosfolipida u lipidnom dvosloju ili triacilglicerola u lipidnim kapljicama, razlika u prostornoj konformaciji masnih kiselina značajno utiče na biofizičke osobine strukture u čiji sastav ulaze. Fizička svojstva masnih kiselina zavise od dužine lanca i stepena nezasićenosti. Sa porastom dužine ugljovodoničnog lanca rastvorljivost masnih kiselina u vodi opada dok tačka topljenja raste.

Holesterol koji je umetnut između molekula fosfolipida, takođe je važna strukturna komponenta ćelijske membrane (Slika 2.). Svojim prisustvom povećava permeabilnost lipidnog dvosloja za molekule koji su rastvorljivi u vodi. Hidrofobne interakcije između holesterola i masnih kiselina fosfolipida stabilizuju dvosloj, ali istovremeno daju i fleksibilnost strukturi membrane. Fluidnost membrane zavisi od temperature, vrste masnih kiselina i sadržaja holesterola u membrani. Sastav lipida u ćeliji je pažljivo regulisan i menja se u skladu sa promenama uslova sredine.

#### **2.4.2.1. Fenomen homeoviskozne adaptacije**

Promena uslova sredine, pre svega temperature, znatno utiče na fizičke osobine membranskih lipida i njihove fazne prelaze, jer značajno smanjenje temperature čini ćelijsku membranu manje fluidnom, odnosno manje funkcionalnom (Cossins i Macdonald, 1989; Hazel i Williams, 1990). Evolutivno stečena osetljivost, ograničava fiziološki opseg temperature u okviru kojeg strukturne komponente membrana efektivno funkcionišu. Poikilotermni organizmi izlaganjem nižim temperaturama od fiziološke, moraju da restruktuišu membrane ćelija, kako bi one poprimile odgovarajuće fizičke osobine koje će odgovarati datim uslovima sredine, i omogućiti njihovo funkcionisanje. Remodelovanje bioloških membrana je najčešći ćelijski odgovor na promene temperature. Tako na primer promena fluidnosti lipidnog dvosloja ćelijske membrane, usled promene ambijentalne temperature je poznat fenomen „homeoviskozne adaptacije“ (Sinensky, 1974; Hazel, 1995). Hipoteza govori da membrane optimalno funkcionišu u ograničenom opsegu fluidnosti (Cossins i Macdonald, 1989). Prema fenomenu o homeoviskoznoj adaptaciji, održavanje fluidnosti membrane na niskim temperaturama povećanjem stepena nezasićenosti masnih kiselina u njihovom sastavu, kompenzuje inhibicioni efekat niskih temperatura kroz solidifikaciju lipida. Fenomen homeoviskozne adaptacije predstavlja osnovni ćelijski odgovor, kako mikroorganizama tako i poikilotermnih organizama (Hazel, 1995).

Na fiziološkim temperaturama, rotacija oko jednostruke veze između dva atoma ugljenika, odvija se slobodno duž ugljovodoničnog lanca masnih kiselina, što rezultuje neuređenom strukturom ćelijske membrane, koja je u tečno-kristalnoj fazi ( $L_{\alpha}$ ). Kod ćelija čija je funkcionalnost u potpunosti očuvana jer je ćelijska membrana u tečno-kristalnoj fazi. Izlaganje nižim temperaturama od fiziološke, prouzrokuje promenu faze ćelijske membrane, odnosno membrana postepeno prelazi iz tečno-kristalne faze ( $L_{\alpha}$ ) u gel fazu ( $L_{\beta}$ ). Fazni prelaz se dešava zbog prelaza ugljovodoničnih lanaca masnih kiselina iz *cis* u *trans* konformaciju,

koja se gusto pakuje i formira uređenu strukturu membrane. Temperatura na kojoj se indukuje fazni prelaz, označava se kao temperatura faznog prelaza (temperatura topljenja) (Huang i sar., 1997). Postoji razlika u fluidnosti središnjeg hidrofobnog dela lipidnog dvosloja kada je u tečno-kristalnoj ili uređenoj gel fazi (Dowhan i Bogdanom, 2002), koja i dovodi do delimičnog gubitka funkcionalnosti ćelijske membrane (Cossins i Raynard, 1987; Hazel, 1995). Kada ćelijska membrana pređe u gel fazu, delovanje bilo kakvog stresora može razoriti njenu strukturu jer se indukuje povezivanje integralnih membranskih proteina, smanjuje aktivnost mnogih membranskih enzima, usporava se bočno kretanje integralnih proteina u membrani čime se redukuje njihova aktivnost, značajno se povećava propustljivost ćelije i dolazi do štetnog usvajanja katjona (jone natrijuma i kalcijuma) i molekula vode, ali i gubitka metabolita i jona iz unutrašnjosti ćelije. Pomenute promene se dešavaju zbog neadekvatnog pakovanja membrane u delovima (domenima) u kojima postoje obe faze, i tečno-kristalna i gel faza. Postojanje takvih domena u ćelijskoj membrani, dešava se zbog različitih fizičkih osobina membranskih lipida, koje imaju različite temperature prelaza usled čega dolazi do razdvajanja faza i formiranja lokalnih domena. Postojanje prekida u strukturi lipidnog dvosloja može biti od značaja za mnoge strukturne organizacije i ćelijske procese kao na primer za smeštanje integralnih proteina u dvosloj, kretanje makromolekula kroz dvosloj i ćelijsku deobu. Potreba za prekidima u membrani (diskontinuitetom) može biti razlog zašto sve membrane sadrže značajnu količinu lipida u membrani koji ne formiraju dvosloj (lipidi koji imaju tendenciju da zauzmu koničan oblik) (Hazel i Williams, 1990; Hazel, 1995) čak i kada je ćelijska membrana u fiziološkim uslovima u tečno-kristalnoj fazi ( $L_{\alpha}$ ). Povećanje sadržaja holesterola u membrani takođe predstavlja mehanizam adaptacije na niske temperature jer značajno menja biofizičke osobine membrane. Povećanje sadržaja holesterola u membrani sprečava fazni prelaz lipida membrane iz tečno-kristalne u gel fazu pri niskim temperaturama.

Kako bi se dinamičke osobine membrane održale tokom delovanja niske temperature, mora se dodatno povećati stepen nezasićenosti masnih kiselina u njenom sastavu (Sinensky, 1974). Kod insekata studije fokusirane na ćelijsku membranu, pokazale su da je povećanje odnosa nezasićenih masnih kiselina prema zasićenim masnim kiselinama (UFA/SFA) važan mehanizam adaptacije na niske temperature, koje obezbeđuje očuvanje njene fluidnosti samim tim i funkcionalnosti na niskim temperaturama (Bennett i Lee, 1997). Evolutivno, prednost je data insektima koji su stekli sposobnost reorganizacije strukture svojih membrana u skladu sa

temperaturom sredine, jer adaptacija membrane je esencijalna komponenta strategije preživljavanja niske temperature svih poikiloternim organizama.

Strukturne promene koje indukuju fiziološke promene i doprinose fenomenu „homeoviskozne adaptacije“ pored promena u masnokiselinskom delu fosfolipida: stepena nezasićenosti masnih kiselina, dužine ugljovodoničnih lanaca kao i položaja nezasićenih masnih kiselina na *sn-1* ili *sn-2* mestu molekula glicerola; su i promene u polarnoj glavi fosfolipida kao i promene u sadržaju sterola inkorporiranih u lipidni dvosloj (Cossins i Raynard, 1987; Hazel, 1995; Hochachka i Somero, 2002; Van Dooremalen i Ellers, 2010). Mnoge studije pokazale su da su sezonske promene otpornosti na hladnoću terestričnih beskičmenjaka uglavnom u vezi sa promenama sastava masnih kiselina fosfolipida (Bennet i sar., 1997; Kostal i Simek, 1998; Slachta i sar., 2002; Kostal i sar., 2003). Promene podrazumevaju povećanje sadržaja *cis*-nezasićenih masnih kiselina na račun zasićenih masnih kiselina. Pokazano je da uvođenje dvostruke veze u zasićen lanac masnih kiselina značajno smanjuje temperaturu topljenja kao što i lokalizacija i broj *cis*-dvostrukih veza u ugljovodoničnom nizu vrši značajan uticaj na temperaturu faznog prelaza iz tečno-kristalne u gel fazu (Huang i sar., 1997).

Značajno povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina fosfolipida kao rezultat povećanja sadržaja polinezasićenih ili mononezasićenih masnih kiselina na račun zasićenih masnih kiselina, dovodi do značajnog smanjenja njihove temperature faznog prelaza odnosno značajno niže tačke topljenja. Nezasićene masne kiseline pored sinteze iz drugih masnih kiselina, unose se i putem hrane (Van Dooremalen i Ellers, 2010). Dužina ugljovodoničnog lanca u molekulu fosfolipida takođe utiče na temperaturu prelaza. Masne kiseline sa dužim ugljovodoničnim nizom imaju više temperature topljenja od istih sa kraćim ugljovodoničnim nizom pri čemu regulacija dužine ugljovodoničnih lanaca masnih kiselina u molekulu pruža drugi vid strategije kontrolisanja fluidnosti membrane. Važna adaptacija ćelijske membrane u preživljavanju niske temperature je i restrukturiranje sastava polarnih glava fosfolipidnih molekula, povećanjem sadržaja fosfatidiletanolamina uz istovremeno smanjenje fosfatidilholina (Hazel, 1995; McCoy, 2003).

Kod mnogih insekatskih vrsta otpornost na hladnoću strogo je povezana sa dijapauzom, tako da do reorganizacije membrane dolazi iniciranjem dijapauze određenim faktorom (Azuma et al., 1989; Michaud i Denlinger, 2006). Prema mnogim autorima kod najvećeg broja vrsta insekata ulaskom u dijapuzu se stepen nezasićenosti masnih kiselina u membrani i depou lipida povećava, obzirom da je povećanje stepena nezasićenosti masnih



kiselina u membrani važna karika u očuvanju njenog integriteta (fluidnosti) i normalnog funkcionisanja ćelija (Azuma i sar., 1989; Shimizu, 1992; Kostal i sar., 2003; Michaud i Denlinger, 2006; Overgaard i sar., 2008), dok u rezervama u čuvanju fluidnost i omogućavanju njihovog neprekidnog korišćenja (Hazel, 1979; Frank 1991; Ohtsu i sar., 1993; Joannis i Storey 1996; Kakela i Hyvarinen, 1996).

## ***2.5. Zastupljenost masnih kiselina kod insekata***

U klasi Insecta, najzastupljenije masne kiseline su: miristinska (C14:0), palmitinska (C16:0) i stearinska (C18:0) od zasićenih, miristoleinska (C14:1n-5), palmitoleinska (C16:1n-7) i oleinska (C18:1n-9) od mononezasićenih masnih kiselina; a linolna (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenska (C18:3n-3) od polinezasićenih masnih kiselina (Fast, 1970; Thompson, 1973; Downer, 1985). U tragovima mogu da se detektuju i mnoge druge masne kiseline. Postojeće vrste insekata svrstane u red Lepidoptera, Hemiptera, Orthoptera, Diptera, Hymenoptera ili Dictyoptera, se razlikuju kvantitativno po sastavu masnih kiselina (Thompson, 1973), pri čemu one mogu imati i taksonomski karakter. Pored par izuzetaka, vrste iz reda Diptera odlikuju se visokim sadržajem palmitoleinske masne kiseline (C16:1n-7), dok se većina familija iz reda Hemiptera odlikuje visokim sadržajem miristinske masne kiseline (C14:0) (Barlow, 1963).

Većina insekata nije sposobna da sintetiše polinezasićene masne kiseline, što objašnjava potrebu za njihovim unošenjem putem hrane. Mnoge studije pokazale su da unošenje linolne (C18:2n-6) ili  $\alpha$ -linolenske masne kiseline (C18:3n-3) putem hrane zadovoljava nutritivne potrebe za ovim esencijalnim masnim kiselinama (Dadd, 1985). Masne kiseline se nakon sinteze ili apsorpcije inkorporiraju u triacilglicerole, fosfolipide i sterol-estre. Ukoliko se esencijalne masne kiseline ne unose hranom, uzrokuju različite deformitete koji se ispoljavaju ili tokom različitih stadijuma razvića insekata, ili tokom reprodukcije adulta (Downer, 1985; Canavoso i sar., 2001).

Potreba za esencijalnim masnim kiselinama se među vrstama značajno razlikuje, a nedostatak različito oslikava na razviće jedinke date vrste. Studije na vrstama iz reda Lepidoptera i Hymenoptera, pokazale su da nedostatak esencijalnih masnih kiselina dovodi do nemogućnosti pravilnog formiranja adulta tokom metamorfoze, bez efekta na razvoj larvi (Dadd, 1985). Pomenuti nedostatak se kod njih značajno ublažava unošenjem isključivo  $\alpha$ -

linolenske masne kiseline čija funkcija u metamorfozi do danas nije razjašnjena. Kod nekih vrsta iz reda Orthoptera, nedostatak esencijalnih masnih kiselina ispoljava se značajno zaostalim rastom nimfi i pojavom deformisanih adulta (Dadd, 1985). Nasuprot pomenutim vrstama, kod vrste bubašvabe *Blatella germanica*, nedostatak esencijalnih masnih kiselina tokom stadijuma larvi, ne izaziva pojavu deformiteta kod adulta, ali ženke usled tog nedostatka tokom stadijuma larvi, formiraju deformisane ooteke (strukture koje pokrivaju jaja nakon polaganja), što će imati značajan uticaj na reprodukciju. Kod ove vrste, promene se mogu uočiti i kasnije, kod druge generacije u vidu slabih kratkoživećih nimfi (Gordon, 1959). Kod nekih vrsta iz reda Coleoptera nedostatak esencijalnih masnih kiselina ispoljava se sporim razvićem larvi i smanjenjem plodnosti adulta (Dadd, 1985).

## 2.6. Zastupljenost sterola kod insekata

Insekti, zajedno sa mnogim beskičmenjacima, nisu sposobni da sintetišu sterole *de novo*, pa ih stoga za normalan rast i razvoj moraju unositi hranom, ili obezbediti pomoću simbiotskih organizama. Premda se steroli po strukturi razlikuju od drugih lipida, svrstani su u ovu grupu biomolekula, jer su nerastvorljivi u vodi. Holesterol je glavni sterol insekata. Predstavlja strukturnu komponentu ćelijskih membrana, prekursor je za sintezu hormona presvlačenja, ekdizona i njegovih homologa- ekdisteroida, sastavni je deo voska kutikule insekata i lipoforina hemolimfe (Grieneisen, 1994; Svoboda, 1999). Kod većine insekata, holesterol je neophodan za normalan razvoj (Friend i Dadd, 1982; Dadd, 1985), zbog čega je stečena sposobnost prevođenja razne vrste sterola iz hrane u holesterol (Svoboda i Feldlaufer, 1991; Svoboda, 1999), dok neke vrste tu sposobnost nisu stekle, zbog čega za normalan razvoj zahtevaju unošenje određenih sterola. Vrste *Drosophila pachea* i *Xyleborus ferrugineus* (Heed i Kircher, 1965; Chu i sar., 1970) zahtevaju unošenje  $\Delta^7$ -sterola putem hrane, dok se skakavci najbolje razvijaju do stadijuma adulta ukoliko hrana sadrži  $\Delta^5$ -sterole (holesterol i sitosterol), a to ne uspevaju na hrani koja sadrži  $\Delta^7$  i/ili  $\Delta^{22}$ -sterole (stigmasterol) (Behmer i sar., 1999). Zanimljivo je da kod pustinjske vrste skakavca *Schistocerca americana*  $\Delta^7$  i/ili  $\Delta^{22}$ -steroli mogu sprečiti normalan razvoj čak i kada je odgovarajući sterol (sitosterol) prisutan (Behmer i Elias, 1999). Kod vrste *Heliothis zea* holesterol je takođe neophodan za normalan rast larvi, jer one umiru kada se hranom unosi ergosterol ili lanosterol (Ness i sar., 1997). Kod domaće muve *Musca domestica*, adulti nisu sposobni da proizvode vijabilna jaja ukoliko hrana sadrži  $\beta$ -sitosterol umesto holesterola ili kampesterola (Kaplanis i sar., 1965).

Jaja insekata sadrže sterole, što omogućava da se prvo presvlačenje odigra nesmetano, dok je za svako naredno presvlačenje obavezno snabdevanje sterolima. Neki vitamini, esencijalne masne kiseline i steroli, mogu se proizvesti od strane simbionata u crevu ili masnom telu.

### **2.6.1. Metaboličke transformacije sterola**

Većina omnivora (svaštojeda) i hematofaga (insekata koji se hrane krvlju) sposobno je da unese dovoljnu količinu holesterola putem hrane (Svoboda i Feldlaufer, 1991). Međutim, vrste insekata koje se hrane hranom biljnog porekla (fitofagi), koriste širok spektar biljnih sterola- fitosterola, C<sub>28</sub> ili C<sub>29</sub> sterole sa dvostrukom vezom na mestu 5 ili 7, i -metil ili -etil grupom na mestu C<sub>24</sub>. U biljkama, fitosteroli su uglavnom esterifikovani sa nekom masnom kiselinom. Korišćenje sterol-estara zavisi od stepena hidrolize u lumenu srednjeg creva. Apsorbovani fitosteroli se mogu prevesti u holesterol, ili neki drugi sterol u enterocitima srednjeg creva, a mogu ostati i nepromenjeni. Nakon usvajanja od strane enterocita oslobađaju se u hemolimfu i prenose lipoforinskim česticama (glavni lipoproteini hemolimfe) do različitih tkiva, gde se koriste ili skladište u slobodnoj ili esterifikovanoj formi. Najčešći metabolički put pretvaranja fitosterola, sterola C<sub>28</sub> ili C<sub>29</sub> poreklom iz hrane u holesterol je dealkilacija metil ili etil grupa na mestu C<sub>24</sub>. Dealkilacija preovlađuje kod većine insekata fitofaga i omnivora, kojoj predhode koraci oksidacije i epoksidacije (Svoboda i Feldlaufer, 1991).

### **2.6.2. Sinteza steroidnih hormona kod insekata**

Glavni steroidni hormoni insekata su hormoni presvlačenja, *ekdizon* ili *20-hidroksiekdizon* koji se sintetišu iz holesterola u protorakalnim žlezdama i drugim steroidogenim organima, kao što su jajnici, testisi i epidermis. Hormoni presvlačenja insekata (ekdizon i njegovi homolizi) generalno se nazivaju ekdisteroidima. U ovom sintetskom putu, citohrom P-450 endoplazmatskog retikuluma (ER) katališe pretvaranje holesterola u 7-dehidroholesterol (Warren i sar., 1988; Grieneisen, 1994), koje je praćeno daljim brzim pretvaranjem u ekdizon od strane enzima hemolimfe, 3-ketosteroid reduktaze (Sakura i sar., 1989). Metabolizam ekdizona u 20-hidroksiekdizon odvija se u nekoliko tkiva, kao na primer masnom telu, Malpigijevim tubulama i srednjem crevu (Mitchell i Smith, 1986). Ovaj korak se katališe od strane ekdizon 20-monooksigenaze (Wheeler i Goldsworthy, 1985; Thompson i sar., 1990). Vrste pčela, medonosna *Apis mellifera* (Svoboda, 1981) i solitarna pčela *Megachile protundata* (Svoboda i Lusby, 1986), ne poseduju sposobnost dealkilacije

fitosterola, zbog čega 24-metilholesterol predstavlja glavni sterol, a C<sub>28</sub> ekdisteroid (makisteron A) hormon presvlačenja. Insekti stvaraju i brojne druge steroidne hormone, kao što su estrogeni, androgeni i mineralokortikoidi, čije su funkcije kod insekata još uvek nepoznate (Grieneisen, 1994).

## **2.7. Metabolizam lipida kod insekata**

Kod većine insekata, lipidi uneti hranom razgrađuju se i apsorbuju u lumenu srednjeg creva, koji predstavlja glavno mesto lučenja digestivnih enzima, varenja hrane i apsorpcije nutrijenata. Digestivni enzimi, lipaze, sekretovane od strane endodermalnih ćelija srednjeg creva, a kod nekih insekata i od strane simbiotskih organizama, hidrolizuju triacilglicerole unete hranom na molekule monoacilglicerola i masnih kiselina (Slika 4.). Kod nekih insekatskih vrsta, posebno kod vrsta iz reda Lepidoptera, koji imaju visok pH u lumenu srednjeg creva, hidroliza se odvija do molekula glicerola i masnih kiselina (Canavoso i sar., 2001).

Lipidi nisu lako dostupni digestivnim enzimima rastvorenim u vodenoj fazi, jer su veoma slabo rastvorljivi, ili nerastvorljivi u vodi, što predstavlja problem pri njihovom varenju. Zbog toga, hidrolizi lipida prethodi proces emulgovanja. Insekti nemaju žučne soli, ali su stekli drugačije strategije za emulgovanje lipida. Emulgujuće materije imaju važnu ulogu jer omogućuju hidrofилnim enzimima- lipazama kontakt sa hidrofobnom površinom triacilglicerola. Prirodne emulgujuće čestice u digestivnom traktu insekata su još uvek dosta neistražene, ali je utvrđeno da aminokiseline i proteini mogu imati emulgujuću ulogu kod nekih vrsta insekata. Takođe i komponente glikokaliksa, koga čine proteini i ugljeni hidrati u vidu viskoznog sekreta, koji oblaže mikrovile srednjeg creva, mogu doprineti procesu emulgovanja lipida (Nation, 2002).

Apsorbovane slobodne masne kiseline i monoacilgliceroli, u enterocitima se procesom esterifikacije prevode u molekule diacilglicerola, triacilglicerola i fosfolipida. Studije na larvama vrste *M. sexta*, pokazale su da se masne kiseline nastale kompletnom hidrolizom triacilglicerola u lumenu srednjeg creva, nakon apsorpcije brzo prevode preko *fasfatidnog puta* u molekule diacilglicerola (Canavoso i Wells, 2000; Arrese i sar., 2001), koji se dalje ili prevode u molekule triacilglicerola ili prelaze u hemolimfu i transportuju do ćelija masnog tela gde se skladište u formi triacilglicerola (Slika 4.). Molekuli triacilglicerola služe kao

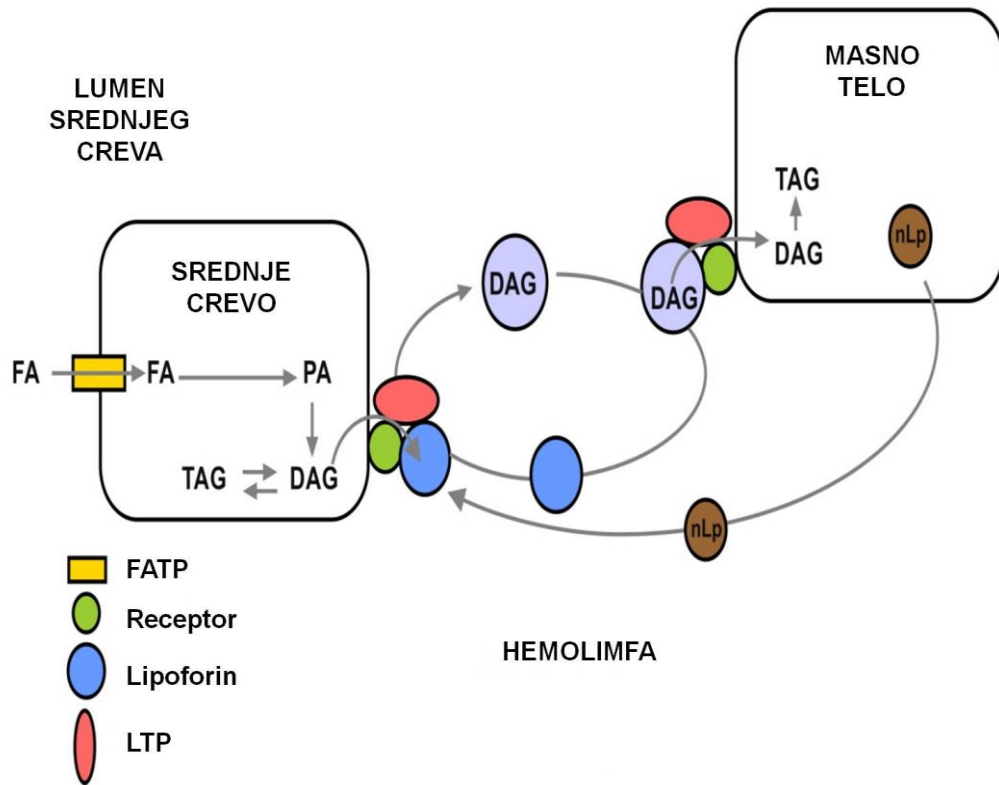
rezervoari apsorbiranih masnih kiselina u enterocitima (Weintraub i Tietz, 1973; Canavoso i sar., 2001). Na ovaj način omogućuje se maksimalna apsorpcija masnih kiselina iz lumena creva, uz istovremeno održavanje niske intracelularne koncentracije masnih kiselina i diacilglicerola, koji mogu biti toksični pri visokim koncentracijama. Smatra se da se apsorpcija masnih kiselina odvija preko transportnih proteina prisutnih na membranama enterocita (FATP), koje su u kontaktu sa lumenom srednjeg creva (Hui i Bernlohr, 1997; Stahl i sar., 1999; Arrese i sar., 2001) (Slika 4.). Masne kiseline i drugi usvojeni lipidi (monoacilgliceroli, steroli i dr.) za sada nepoznatim mehanizmima usmeravaju se ka odgovarajućim metaboličkim putevima.

Molekuli diacilglicerola oslobođeni iz enterocita u hemolimfu vezuju se za lipoproteinske čestice, lipoforine, koji omogućuju transport apsorbiranih lipida kroz vodenu sredinu hemolimfe. Kod insekata oslobađanje molekula diacilglicerola iz enterocita ne zahteva *de novo* sintezu čestica lipoforina, kao što je to slučaj kod kičmenjaka. Iako struktura lipoforina veoma varira, pokazalo se da svi imaju hidrofilnu srž izgrađenu od ugljenih hidrata, središnji sloj od diacilglicerola i površinu od fosfolipida i apolipoproteina (proteinske komponente lipoproteina). Lipoforini cirkulišu između srednjeg creva i masnog tela, pri čemu ne ulaze ni u enterocite, ni u ćelije masnog tela (Tsuchida i Wells, 1988; Soulages i Wells, 1994; Arrese i sar., 2001) (Slika 4.). Nakon što lipoforini izvrše transport lipida do ćelija masnog tela gde se skladište u formi triacilglicerola, nastavljaju dalje da cirkulišu i transportuju naredni molekul diacilglicerola putem hemolimfe (Blacklock i Ryan, 1994; Arrese i sar., 2001). Sposobnost recirkulacije lipoforina hemolimfe predstavlja adaptaciju kod insekata, koja im omogućava brzu mobilizaciju lipida iz srednjeg creva (poreklom iz hrane), ili masnog tela, npr. za potrebe letenja, bez prethodne sinteze novih čestica lipoforina (Blacklock i Ryan, 1994). *In vivo* i *in vitro* studije na vrstama iz nekoliko različitih redova, pokazale su da kod insekata molekuli diacilglicerola predstavljaju glavnu klasu lipida u hemolimfi nakon varenja lipida poreklom iz hrane (Rimoldi i sar., 1985; Tsuchida i Wells, 1988; Bauerfeind i Komnick, 1992; Weer i sar., 1993; Canavoso i Wells, 2000). Pored glavne lipidne komponente hemolimfe diacilglicerola, lipoforini transportuju i fosfolipide i slobodne masne kiseline putem hemolimfe (Soulages i Wells, 1994). Kod vrste *M. sexta* je pokazano da su molekuli diacilglicerola unutar lipoforinskih čestica, poreklom iz hrane, obzirom da je njihov sadržaj u lipoforinskim česticama kod jedinki koje su konzumirale bezmasnu hranu značajno smanjen (Fernando-Warnakulasuriya i sar., 1988). Studije na pomenutoj vrsti su pokazale da je ~90% od obeleženih masnih kiselina trioleina apsorbirano 4 časa nakon

obroka, i da je više od 70% apsorbovanih masnih kiselina nađeno u masnom telu u formi triacilglicerola (Tsuchida i Wells, 1988). U hemolimfi, više od 90% obeleženih masnih kiselina se nalazila u formi diacilglicerola, koji su svi bili u sastavu lipoforinskih čestica (Arrese i sar., 2001; Canavoso i sar., 2001).

Do danas, malo se zna o mehanizmima koji su uključeni u prenošenje lipida iz enterocita srednjeg creva do lipoforina u hemolimfi (Canavoso i sar., 2001). Smatra se da su dva faktora ključna za prenošenje: receptor za koji se vezuju lipoforinske čestice (Van Antwerpen i sar., 1989; Tsuchida i Wells, 1990; Atella i sar., 1995; Aresse i sar., 2001), i čestice koje su odgovorne za prenošenje molekula lipida (LTP- lipid transport particle, *eng.*). Lipoforinske čestice se vezuju za specifično vezno mesto (receptor) na površini enterocita. Proces prenošenja lipida se dešava na površini ćelije bez ulaska lipoforina u enterocite (Tsuchida i Wells, 1988; Bauerfeind i Komnick, 1992; Soulages i Wells, 1994; Aresse i sar., 2001). Vezivanje lipoforina za površinu enterocita dokazan je kod vrste *M. sexta* (Gondim i Wells, 2000) i kod larvalnog stadijuma vrste *Aeschna cyanea* (Bauerfeind i Komnick, 1992).

Čestice koje su odgovorne za prenošenje molekula lipida (LTP) predstavljaju lipoproteine veoma velike gustine (VHDL), koji su izolovani iz hemolimfe kod nekoliko vrsta (Ryan i sar., 1986; Blacklock i Ryan, 1994; Ryan i Van der Horst, 2000). Fiziološka funkcija mu je do danas dosta neistražena, ali se smatra da učestvuje u prenošenju lipida između čestica lipoforina kao i između lipoforina i membrana (Ryan i Van der Horst, 2000; Aresse i sar., 2001). Studije u *in vitro* uslovima pokazuju da se prenos diacilglicerola od srednjeg creva do lipoforina u potpunosti blokira pretretmanom sa anti-LTP antitelom, i da se ponovo uspostavlja tokom ponovnog dodavanja LTP u inkubacioni medijum, što potvrđuje da je LTP neophodan da olakša prenošenje molekula diacilglicerola iz srednjeg creva do lipoforina (Slika 4.) (Arrese i sar., 2001; Canavoso i sar., 2001).



**Slika 4.** Šematski prikaz metabolizma lipida kod insekata; od razgradnje lipida u lumenu srednjeg creva, apsorpcije FA preko FATP, njihove transformacije u molekule DAG u enterocitima srednjeg creva, prenošenja DAG iz enterocita srednjeg creva do čestica lipoforina do transporta putem hemolimfe do ćelija masnog tela gde se vrši skladištenje energetske rezerve u formi TAG. FATP - transportni proteini masnih kiselina, LTP - čestice koje su odgovorne za prenošenje molekula lipida, FA - masna kiselina, DAG - molekul diacilglicerola, TAG - molekul triacilglicerola, R - receptor za koji se vezuju čestice lipoforina, nLp - nascentni molekul lipoforina (preuzeto iz Arrese i sar., 2001 i Canavoso i sar., 2001, modifikovano).

## 2.8. Mobilizacija energetskeg depoa i njena hormonska regulacija

Masne kiseline energetskeg rezervi, skladištene u formi triacilglicerola u lipidnim kapljicama adipocita masnog tela, mobilisu se za podmirivanje fizioloških potreba i stanja organizma, uključujući snabdevanje energijom mišića odgovornih za let insekata u obliku diacilglicerola, snabdevanje jajnika lipidima, održavanje sveukupne metaboličke aktivnosti u periodu mirovanja (dijapauze).

Prvi korak potreban za mobilizaciju masnih kiselina jeste aktivacija triacilglicerol lipaze masnog tela, koja katališe hidrolizu triacilglicerola, forme u kojoj se skladište energetske

rezerve, u lipidnim kapljicama masnog tela. Kod insekata, identifikovane su dve lipaze koje se ekspresuju u masnom telu: adipozna triacilglicerol lipaza insekata- Brumerova lipaza (ATGL- insect adipose triglyceride lipase, *eng.*), i triacilglicerol lipaza (TGL) (Canavoso i sar., 2001; Arrese i Soulages, 2010).

Mobilizacija rezervi lipida podrazumeva lipolizu, triacilglicerol lipazom, kada uglavnom nastaju diacilgliceroli, koji se dalje iz ćelija masnog tela transportuju lipoforinima do ciljnog organa, gde se koriste kao energetska gorivo (Beenackers i sar., 1984; Arrese i sar., 2001; Canavoso i sar., 2001; Arrese i Soulages, 2010). Diacilgliceroli su najzastupljeniji acilgliceroli u hemolimfi, jer predstavljaju njihovu transportnu formu. Mobilizacija lipida iz ćelija masnog tela, pod kontrolom je adipokinetičkog hormona (AKH) peptidne strukture, koji se sintetiše i oslobađa u neurosekretornim ćelijama korpore kardiace (*corpora cardiaca, lat.*).

AKH deluje indirektno (Slika 1.). Vezuje se za receptore na površini ćelija masnog tela aktivirajući adenilat ciklazu koja proizvodi ciklični adenozin monofosfat (cAMP), koji aktivira lipazu, što indukuje brzo oslobađanje diacilglicerola iz ćelija masnog tela u hemolimfu. Stimulus za sekreciju AKH nije u potpunosti razjašnjen, ali je verovatno da je nervna kontrola povezana sa aktivacijom torakalne muskulature. Najpoznatiji uticaj peptida familije AKH jeste stimulacija masnog tela da pretvara rezerve glikogena i triacilglicerola u molekule trehaloze i diacilglicerola hemolimfe. Kod nekih insekata AKH stimuliše sintezu prolina. Receptori AKH su identifikovani kod vrsta *Drosophila melanogaster* i *Bombyx mori*. Srodni su receptoru gonadotropin-oslobađajućeg hormona kod kičmenjaka. Dokaz u korist uloge AKH u energetske metabolizmu pružile su studije na vrsti *Drosophila melanogaster*, kod kojih usled delecije gena koji kodira proteinski receptor AKH, ne postoje receptori za vezivanje AKH i dolazi do nakupljanja lipida u mnogo značajnijoj količini nego kod kontrolne grupe (Canavoso i sar., 2001; Arrese i Soulages, 2010).

## **2.9. Korišćenje lipida kod insekata**

Pregledom studija koje su usmerene na proučavanje mobilizacije i/ili korišćenja lipidnih rezervi za podmirivanje energetske potrebe različitih procesa i/ili stanja; leta, perioda mirovanja (dijapauze), gladovanja, sinteze trehaloze i prolina, kao i embriogeneze i imunog odgovora uočena je mnogobrojna uloga lipida kod insekata.



**Dijapauza:** Kod insekata umerenog klimatskog područja, energija neophodna za preživljavanje niske temperature u stanju dijapauze, razvoj nakon dijapauze i pojavu adulta dobija se iz raznih intermedijarnih metabolita, uključujući i lipide (Downer, 1985; Lee Jr. i Denlinger, 1991), čije se nakupljanje uočava tokom pripreme za ulazak u dijapauzu (Ohtsu i sar., 1993; Joannis i Storey, 1996). Sastav masnih kiselina energetske rezerve se menja sa ciljem očuvanja fluidnosti tokom hladnih perioda, povećavanjem stepena nezasićenosti masnih kiselina u njihovom sastavu. Povećavanje stepena nezasićenosti kod ovih vrsta najčešće se indukuje dijapauzom (Ohtsu i sar., 1993; Bennett i sar., 1997; Joannis i Storey, 1996; Vukašinović i sar., 2013). Adipociti masnog tela su ćelije koje se odlikuju velikom plastičnošću i sposobnošću da skladište velike količine energetske rezerve u formi triacilglicerola (Dean i sar., 1985). Poznato je da insekti umerenog klimatskog područja, koji ulaze u stanje dijapauze kako bi preživeli nepovoljne uslove sredine tokom hladnih zimskih meseci, akumuliraju značajne količine rezerve lipida u ćelijama masnog tela (Downer i Matthews, 1976). Prekomerno deponovanje lipida može dovesti čak i do hipertrofije masnog tela. Ovako atipično skladištenje lipida kod ženki komaraca vrste *Culex pipiens*, predstavlja mehanizam za preživljavanje delovanja niskih temperatura (Mitchell i Briegel, 1989; Bowen, 1992). Ženke koje ulaze u dijapauzu, u fazi pripreme za ulazak u dijapauzu, akumulirajući dva puta više lipidnih rezervi u odnosu na nedijapauzirajuće ženke (Mitchell i Briegel, 1989; Bowen, 1992) a da pri tome dijapauzirajuće ženke ne uzimaju ni krvne obroke. Molekularna mašinerija neophodna za varenje krvnih obroka čak nije ni prisutna (Bowen, 1992; Robich i Denlinger, 2005). Mužjaci ove vrste komarca ne ulaze u dijapauzu pri čemu nisu sposobni da prežive zimu. Lipidne rezerve u masnom telu se u potpunosti stvaraju iz hranljivih materija poreklom iz biljnih sokova bogatih ugljenim hidratima. Intenzivnija lipogeneza koja rezultuje hipertrofijom masnog tela, u pozitivnoj je korelaciji sa povećanom ekspresijom gena enzima sintaza masnih kiselina (Robich i Denlinger, 2005).

S druge strane, adulti nekoliko parazitoidnih vrsta iz reda Himenoptera i Diptera nisu sposobni da skladište lipidne rezerve, iako im se ishrana odlikuje hranom koja je bogata šećerom, oni nisu sposobni da prevedu višak ugljenih hidrata u lipidne rezerve. Fiziološki mehanizam koji je odgovoran za ovaj jedinstveno stanje još uvek je nepoznat (Visser i Ellers, 2008).

**Let:** Migratorne vrste insekata generalno koriste rezerve lipida kao izvor energije kako bi se podržao energetski veoma zahtevan proces leta na duže staze (Beenackers i sar., 1985).

Mobilizacija lipida iz rezervi masnog tela tokom leta, dokazana je kod mnogih insekata (Beenackers i sar., 1985; Ziegler i Schulz, 1986; Gade i Auerswald, 2002; Canavoso i sar., 2003; Kaufmann i Briegel, 2004). Energetske rezerve masnog tela u formi triacilglicerola oslobađaju se u hemolimfu kao diacilgliceroli, koji se transportuju do mišićnog tkiva putem lipoproteina hemolimfe- lipoforina, gde se transformišu u energiju (ATP) (Beenackers i sar., 1985, Soulages i Wells, 1994; Arrese i sar., 2001; Van der Horst i sar., 2002). Kod nekih insekata, lipidi se koriste posredno pored prolina koji je glavni izvor energije mišića koji su odgovorni za let.

**Sinteza trehaloze i prolina:** Sinteza trehaloze u masnom telu je energetski zavistan proces. Studije na vrstama bubašvaba (Wiens i Gilbert, 1965; McDougall i Steele, 1988), pokazale su da procesa sinteze i oslobađanja trehaloze zavise od oksidacije masnih kiselina; odnosno, da inhibicija  $\beta$ -oksidacije masnih kiselina sprečava, adipokinetičkim hormonom (AKH) indukovano oslobađanje trehaloze. Ove studije pokazuju da sinteza trehaloze bar kod ovih vrsta zavisi od mobilizacije i oksidacije masnih kiselina (McDougall i Steele, 1988).

Kod većine insekata, hemolimfa obiluje prolinom. Sintetiše se u masnom telu iz acetyl-CoA i alanina, nakon čega se oslobađa u hemolimfu (Bursell, 1981). Studije rađene na dve insekatske vrste, ce-ce muvi *Glossina morsitans*, i krompirovoj zlati *Leptinotarsa decemlineata*, pokazale su da sinteza prolina, koji kod ovih vrsta predstavlja glavni izvor energije tokom leta, zahteva mobilizaciju masnih kiselina (Bursell, 1981; Gade i Auerswald, 2002). Izuzetna sposobnost pomenutih insekatskih vrsta, da koriste prolin kao izvor energije, moguća je zahvaljujući mitohondrijama mišićnih ćelija, koje imaju enzime potrebne za oksidaciju prolina, ali i malu sposobnost za oksidacijom masnih kiselina i piruvata (Gade i Auerswald, 2002; Giulivi i sar., 2008). Korišćenje prolina kao izvora energije tokom leta praćeno je povećanjem koncentracije alanina u hemolimfi (Gade i Auerswald, 2002). Alanin se ponovo koristi za sintezu prolina u masnom telu, i smatra se da predstavlja transportni šatl acetatnih jedinica, iz masnog tela u mišiće. Nekoliko studija pokazalo je da masne kiseline deponovane u masnom telu u formi triacilglicerola, obezbeđuju acetatne jedinice potrebne za sintezu prolina (Weeda i sar., 1979; Bursell, 1981; Auerswald i sar., 2005). Kod tvrdokrilaca, let i AKH dovode do istovremenog porasta aktivnosti lipaze i sinteze prolina (Auerswald i sar., 2005), i ekstrakti korpore kardiace indukuju i lipolizu i sintezu prolina u masnom telu ce-ce muve (Pimley i Langley, 1982). Kod krompirove zlatice, tokom leta se sadržaj lipida u

hemolimfi povećava. Generalno gledano, za insekate koji tokom leta koriste prolin kao izvor energije, važna je mobilizacija rezervi triacilglicerola i tesno povezana sa upotrebom prolina.

**Gladovanje:** Gladovanje je još jedno stanje u kom dolazi do mobilizacija lipida. Na primer, gladovanje kod vrste *L. migratoria* dovodi do trostrukog povećanja koncentracije lipida u hemolimfi, kao rezultat značajnog povećanja sadržaja diacilglicerola u njoj (Beenackers i sar., 1985). Slična situacija je uočena kod vrste *M. sexta*, kod koje gladovanje izaziva dvostruki porast koncentracije lipida u hemolimfi (Ziegler, 1991). Za razliku od povećanja diacilglicerola u hemolimfi tokom leta, povećanje diacilglicerola u hemolimfi tokom gladovanja ne zavisi od AKH. Signal koji indukuje aktivaciju lipolize tokom gladovanja još uvek je nepoznat. Međutim, kod obe pomenute insekatske vrste, ubrizgavanje trehaloze smanjuje koncentraciju lipida u hemolimfi, ukazujući na postojanje inverznog odnosa između koncentracije lipida i trehaloze u hemolimfi (Beenackers i sar., 1985; Arrese i sar., 1996). Trehaloza ima inhibitorni efekat na lipolitičku aktivnost masnog tela, obzirom da kod vrste *M. sexta* indukuje smanjenje aktivnosti lipaze masnog tela (Arrese i sar., 1996), dok kod jedne vrste skakavca smanjuje stvaranje diacilglicerola od strane masnog tela (Lum i Chino, 1990). Mehanizam koji je odgovoran za pomenuti proces još uvek je nepoznat, ali *in vitro* studije (Lum i Chino, 1990) ukazuju na direktan efekat trehaloze na stopu lipolize.

**Embriogeneza:** Lipidi čine 30-40% suve mase jajnih ćelija kod insekata (Troy i sar., 1975; Briegel, 1990; Van Handel, 1993), i predstavljaju glavni izvor energije za razvoj embriona (Beenackers i sar., 1985; Van Handel, 1993). Tokom njihovog sazrevanja, oocite insekata povećaju sadržaj lipida i do nekoliko puta za veoma kratko vreme, obično za dan-dva. Iako su jajne ćelije sposobne da sintetišu masne kiseline *de novo*, njihov doprinos nije veći od 1% lipidnog sadržaja. Najveći deo lipida jajnih ćelija je poreklom iz masnog tela, odakle se lipoforinima transportuje do jajnika (Ziegler i Ibrahim, 2001; Ziegler i Van Antwerpen, 2006). Akumulaciju lipida u jajnicima istovremeno prati značajno smanjenje sadržaja lipida u masnom telu (Ziegler i Ibrahim, 2001; Lorenz i Anand, 2004). Smatra se da se najveći deo lipida usvaja preko ekstracelularnog mehanizma koji prvo zahteva hidrolizu diacilglicerola pa tek usvajanje nastalih masnih kiselina (Ziegler i Van Antwerpen, 2006). Sadržaj lipida vitelogenina je mnogo niži od sadržaja lipida lipoforina, međutim imajući u vidu količinu vitelogenina usvojenog od strane jajnih ćelija koje su u razvoju, doprinos jajnih ćelija lipidnom sadržaju je značajan. Vitelogenin se proizvodi u masnom telu kao i lipoforini,

izlučuje u hemolimfu i preuzima od strane jajnih ćelija u razvoju, putem endocitoze posredovane receptorom za vitelogenin (Tufail i Takeda, 2009).

**Imuni odgovor:** Mobilizacija lipida u hemolimfu uočena je i tokom imunog odgovora (Dettloff i sar., 2001; Mullen i Goldsworthy, 2003; Cheon i sar., 2006). Studije koje proučavaju interakcije komarca i njegovog parazita (*Plasmodium falciparum* i *Anopheles gambiae*), potvrdile su da zaraženi komarci ispoljavaju povećan nivo transkripcije lipoforinskih proteina (Mendes i sar., 2008). Priroda signala koji pokreće mobilizaciju lipida tokom zaraze i sudbina mobilisanih lipida još uvek nisu poznati. Lipidi bi mogli biti korišćenji kao izvor energije i/ili za stvaranje membrana na mestima infekcije ili u hemocitama.

---

### *3. Cilj istraživanja*

---

## ~Cilj istraživanja~

Iako se o osnovnim strukturnim i metaboličkim dešavanjima u dijapauzi insekata već dosta zna, još uvek postoje brojne dileme o ovom vidu preživljavanja insekata u nepovoljnim uslovima, posebno sa aspekta izloženosti niskim zimskim temperaturama i mehanizmima krioprotekcije. Zato je cilj istraživanja ove doktorske disertacije da se sa aspekta biofizičkih osobina lipida i sastava masnih kiselina:

- odrede biofizičke osobine (temperature faznog prelaza) ukupnih lipida nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica tokom dijapauze (početak, sredina i kraj), kao i u kontrolisanim uslovima hlađenja dijapauzirajućih gusenica
- utvrde promene sastava masnih kiselina strukturne (polarne) i rezervne (nepolarne) frakcije lipida celih gusenica *Ostrinia nubilalis*, Hbn. tokom dijapauze i pod uticajem različitih temperatura u eksperimentalnim uslovima
- odredi zastupljenost pojedinih klasa lipida u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica
- odredi tkivna specifičnost, hemolimfe i masnog tela, masnih kiselina ukupnih lipida i biofizičke osobine ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica tokom dijapauze, kao i u kontrolisanim uslovima hlađenja dijapauzirajućih gusenica.

---

## *4. Materijal i metode*

---

#### 4.1. Eksperimentalne životinje

Kukuruzni plamenac *Ostrinia nubilalis* Hbn. (do 1957. godine *Pyrausta nubilalis* Hbn.) pripada redu leptira Lepidoptera, familiji plamenca Pyralidae. Naziv kukuruzni plamenac je novijeg datuma. Ranije je prema larvenom stadijumu nazivan kukuruzni crv, a prema stadijumu adulta, kukuruzni moljac. Gusenice *O. nubilalis* se najčešće razvijaju i hrane na biljkama kukuruza. Pored kukuruza, ova vrsta moljca hrani se još sa preko 300 različitih biljnih vrsta, krompir, paprika, duvan i dr.

Tokom svog životnog ciklusa, kao holometabolni insekt, kukuruzni plamenac prolazi kroz četiri razvojna stadijuma - jaje, larva (gusenica), lutka i adult (leptir, moljac) (Slika 5).



**Slika 5.** Razvojni stadijumi kukuruznog plamenca *O. nubilalis* Hbn.

Ova četiri stadijuma razvića čine jednu generaciju. Broj generacija kukuruznog plamenca varira od jedne do pet, u zavisnosti od klimatskih uslova. U našim krajevima, sa povećanjem prosečne temperature i navodnjavanjem (povećana vlažnost vazduha) sve većih površina pod kukuruzom, broj letnjih generacija se poslednjih godina povećao na dve generacije.

Zimska generacija kukuruznog plamenca prezimi u ostacima kukuruza na polju (stabljkama) kao odrasla gusenica i veoma dobro podnosi niske temperature, tako da veliki broj gusenica ostane u životu. Nakon ulutkavanja na proleće, leptiri izleću oko sredine maja, što zavisi od temperature i relativna vlažnost vazduha tokom proleća. Kod odraslih insekata kukuruznog plamenca (moljaca) izražen je polni dimorfizam. Ženke su krupnije i svetlije od mužjaka (Slika 5). Leptiri žive 9-12 dana, a ako je relativna vlažnost vazduha niska, mnogo kraće (1-2 dana). Boja tela je svetlo žuta do svetlo smeđa. Posle kopulacije, ženke zimske generacije polažu jaja na naličju listova, u blizini glavnog nerva, u vidu jajnih legala. Jaja su ovalna i spljoštena. Period polaganja jaja traje oko 2 nedelje. Razvoj u jajetu traje 4 – 9 dana, a minimalna temperatura za njihov razvoj je 15°C. Polaganje jaja označava kraj životnog ciklusa zimske generacije.



Iz jaja se izležu letnje gusenice, duge 1,6 mm. Tela su žute boje sa tamno smeđom hitinskom glavenom kapsulom. Gusenica tokom svog razvoja prolazi kroz 5 stupnjeva (instara), pri čemu je prelazak u svaki naredni stupanj praćen presvlačenjem i rastom. Dužina tela odraslih gusenica petog instara iznosi 20-25 mm. Gusenice letnje generacije se preobražavaju u lutku tokom avgusta. Lutka je žućkaste boje, a vremenom postaje smeđa. Lutke mužjaka su dužine oko 14 mm i širine oko 2,5 mm, a ženke su nešto krupnije. Dužina trajanja ovog stadijuma razvića je oko 12 dana, a donja temperaturna granica za razvoj je 13°C. Iz lutke izlaze adulti, leptiri (moljci) sa izraženim polnim dimorfizmom. Polaganjem jaja letnja generacija završava svoj životni ciklus.

Iz tih jaja izležu se gusenice zimske generacije. Skraćanjem dužine dana i smanjenjem temperature, dolazi do aktivacije gena koji utiču na fiziološki razvoj larvalnog stadijuma zimske generacije, te gusenice koje izlaze iz jaja krajem avgusta/septembra, ne ulutkavaju se kada dostignu peti instar (poslednji instar stadijuma gusenice), već ulaze u dijapauzu, i u ovom stanju mirovanja ostaju do proleća (april-maj). U toku dijapauze gusenice se ne hrane, a ukupna metabolička aktivnost je svedena na minimum (hipometabolizam). Dijapauzirajuće gusenice su otporne na niske temperature (cold hardy, *eng.*), a mogu preživeti i do -20°C (Grubor-Lajšić i sar., 1991). Iz tog razloga *O. nubilalis* se u okviru grupe insekata otpornih na hladnoću, svrstava u insekte otporne na zamrzavanje (freeze tolerant, *eng.*). Dijapauza omogućava preživljavanje gusenica tokom hladnog perioda, a završava se početkom proleća, kada se dužina dana poveća, nakon čega se razvojni ciklus nastavlja ulutkavanjem.

Kukuruzni plamenac glavne štete pričinjava u stadijumu gusenice na nadzemnim delovima biljke domaćina. Gusenice letnje generacije najčešće oštećuju lišće i metlicu. Gusenice zimske generacije oštećuju klipove, hrane se zrnom, buše stabljiku koja se lomi i pada, te su one štetnije od prve generacije. Visina šteta zavisi od dužine dana, relativne vlažnosti vazduha, bujnosti useva, zakorovljenosti.

#### **4.2. Sakupljanje eksperimentalnih životinja i plan istraživanja**

Analize su rađene na nedijapauzirajućim i dijapauzirajućim gusenicama kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis* Hbn.

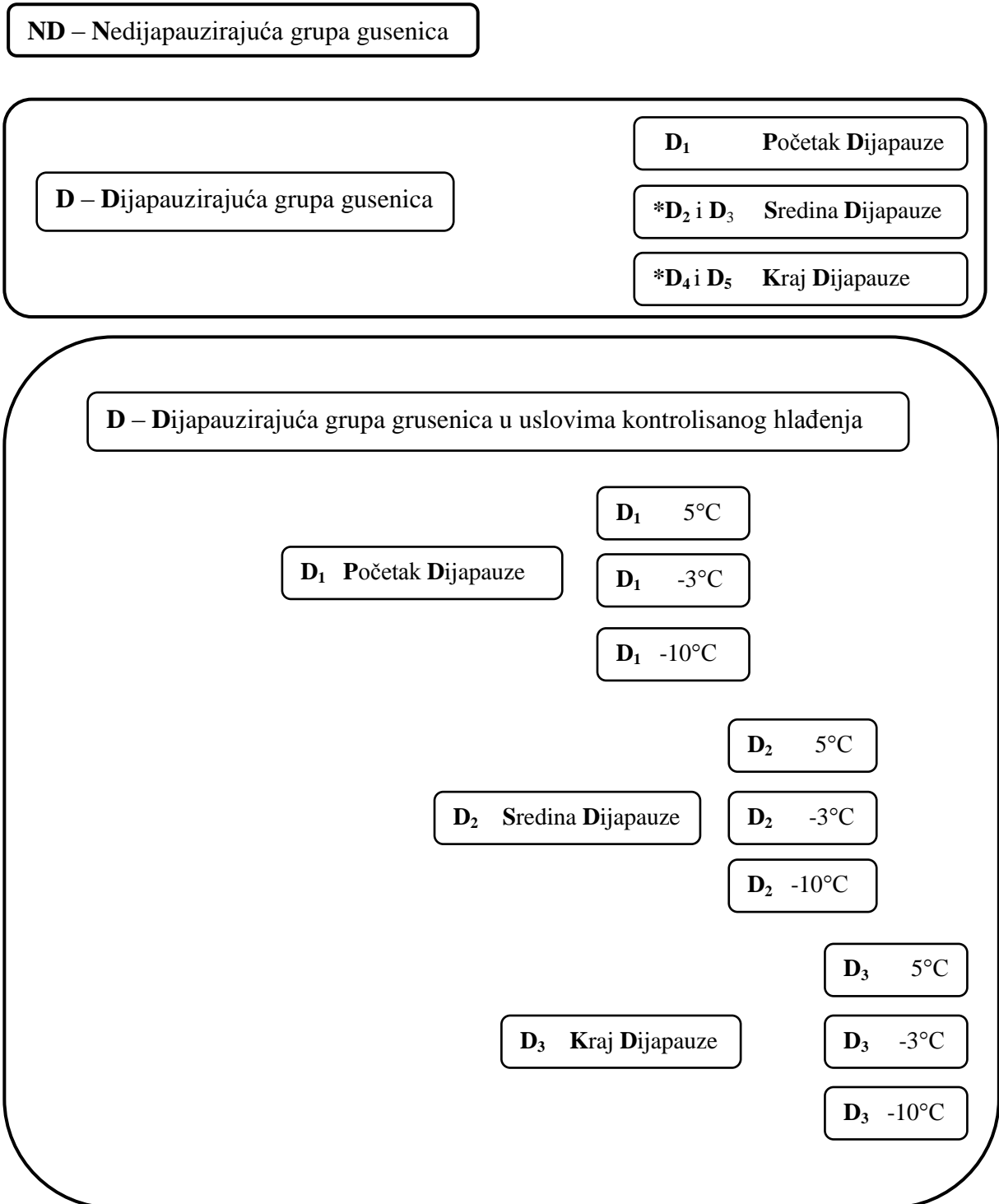
Nedijapauzirajuće gusenice (ND) gajene su iz jajnih legala u kontrolisanim laboratorijskim uslovima. Jajna legla poreklom su od leptira prve letnje generacije gusenica uhvaćenih na svetlosnim klopnama, postavljenim na Institutu za kukuruz „Zemun Polje“ u Zemun Polju.

Leptiri nakon parenja, polažu jaja u vidu jajnih legala, koja se postavljaju na hranljivu podlogu. Nakon piljenja, gusenice se gaje do petog instara (poslednji instar stadijuma gusenice), na hranljivoj podlozi u kontrolisanim uslovima (sobna temperatura, 25°C, vlažnost obezbeđena vlažnim oblogama) prilagođenih životnom ciklusu analizirane vrste. Nedijapauzirajuće gusenice predstavljaju letnju generaciju gusenica.

Dijapauzirajuće gusenice (D) sakupljane su tokom čitave dijapauze uključujući na taj način početak, sredinu i kraj dijapauze, iz stabljika kukuruza koje su izložene uslovima spoljašnje sredine. Do berbe, dijapauzirajuće gusenice vađene su iz stabljika kukuruza na njivi u okolini Novog Sada i šire, a kasnije iz posečenih stabljika skladištenih u uslovima spoljašnje sredine.

U eksperimentu uticaja temperature na gusenice *O. nubilalis*, dijapauzirajuće gusenice su nakon sakupljanja početkom, sredinom i krajem dijapauze inkubirane 10 dana na 5°C (grupa dijapauzirajućih gusenica na 5°C), a zatim izlagane kontrolisanom režimu hlađenja, do -10°C. Dinamika spuštanja temperature je bila po 3°C na svaka 4 dana. Na dostignutih -3°C deo gusenica je držan 10 dana na toj temperaturi (grupa dijapauzirajućih gusenica na -3°C), a sa ostatkom gusenica je nastavljeno hlađenje istom dinamikom do -10°C. Grupa dijapauzirajućih gusenica na -10°C je dobijena nakon 10 dana izloženosti toj temperaturi. Grupe analiziranih gusenica su date u Šemi 1.

Šema 1. Opis i oznake analiziranih grupa gusenica kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis*



\* analiza ukupnih lipida, kao i polarne i nepolarne frakcije ukupnih lipida, urađena je u dve grupe, za sredinu dijapauze (D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub>) i za kraj dijapauze (D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub>)

### **4.3. Priprema uzoraka**

#### **4.3.1. Priprema homogenata celih gusenica i ekstrakcija ukupnih lipida**

Ukupni lipidi ekstrahovani su primenom modifikovane metode po Folch-u (1957) iz gusenica čija je masa izmerena neposredno pre zamrzavanja u tečnom azotu. Homogenizacija celih gusenica je rađena na ledu, pomoću Ultra-Turrax homogenizera (T10 Basic Ultra-Turrax Homogenizer, IKA, Germany) sa ohlađenom smešom organskih rastvarača hloroform/metanol (2:1, v/v), sa odnosom mase uzorka i zapremine ekstrakcione smeše organskih rastvarača od 1:20, u trajanju od 5 minuta. Homogenat se profiltrira kroz Whatman N°1 filter papir. Nakon dodavanja KCl (0.88%, w/v) u filtrat (25% zapremine ekstrakta) uzorci se pre centrifugiranja (1500 rpm 5 minuta) dobro izmešaju (Vortex) kako bi se postiglo što bolje razdvajanje faza. Gornja faza (sloj metanola i vode) je odvojena staklenom Paster-ovom pipetom, dok je donja faza (sloj hloroforma sa ekstrahovanim lipidima) uparena do suva u inertnoj atmosferi azota pomoću N-EVAP sistema za uparavanje (Organomation). Ekstrakti ukupnih lipida resuspendovani u maloj zapremini hloroforma, preneseni su u prethodno izmerene flašice od 2 ml u kojima su upareni do suva. Ekstrakti ukupnih lipida su pre merenja, pola sata držani u vakuum eksikatoru nakon čega su resuspendovani u hloroformu (10 mg ml<sup>-1</sup> finalna koncentracija) i čuvani na -20°C. Analize su rađene u 3 biološka ponavljanja sa po 3 gusenice u svakom ponavljanju.

#### **4.3.2. Izolovanje hemolimfe i masnog tela i ekstrakcija ukupnih lipida**

Hemolimfa gusenica sakupljana je u Ependorf epruvete sa 0,05 % fenil-tiouree-FTU, na hladnom, nakon odsecanja zadnjeg para lažnih nožica. Pul hemolimfe od 5 gusenica čuvan je na -20°C.

Masno telo je izolovano disekcijom gusenica (6 gusenica po uzorku) u ledenom fosfatnom puferu (0.05M, pH 7.0). Sa tkiva je odstranjen višak fosfatnog pufera na filter hartiji, a zatim je pul masnog tela izmeren i čuvan na -20°C. Ukupni lipidi hemolimfe i masnog tela ekstrahovani su na isti način kao i iz celih gusenica. Analize su rađene u 3 bioloških ponavljanja, pri čemu jedno ponavljanje predstavlja pul hemolimfe i masnog tela iz 5 gusenica.

#### **4.4. Metode istraživanja**

U analizi lipida kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis* korišćene su sledeće tehnike:

- tankoslojna hromatografija (TLC) sa skenirajućom denzitometrijom, za razdvajanje i analizu klasa lipida
- gasno-masena hromatografija (GC-MS), za analizu masnih kiselina
- diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC - differential scanning calorimetry, *eng.*), za termalnu analizu ekstrahovanih lipida

##### **4.4.1. Tankoslojna hromatografija (TLC)**

Razdvajanje klasa lipida u ekstraktima ukupnih lipida celih gusenica, hemolimfe i masnog tela rađeno je tankoslojnom hromatografijom (TLC) na sloju silika gela G, primenom smeše rastvarača: n-heksan:dietil-etar:glacijalna sirćetna kiselina (20:5:0.5, v/v/v), a kvalitativna analiza primenom komercijalnih standarda na istoj ploči. Za kvantifikaciju razdvojenih klasa, 15 µg preparata ukupnih lipida je nanešeno na ploču dimenzije 10 x 10 cm prevučenu silika gelom. Vizuelizacija razdvojenih klasa lipida postignuta je bakar-acetatom (3%, w/v) u fosfornoj kiselini (8%, v/v) na ploči zagrevanoj 15 minuta na 160°C dok je kvantifikovanje relativnog udela pojedinih klasa u ekstraktima ukupnih lipida rađeno primenom skenirajuće denzitometrije (Shimadzu CS-930, DR-2 Dual Wavelength TLC Scanner) (Pond i sar., 1995; Pond i sar., 2011).

Tankoslojnom hromatografijom razdvojene su i polarna i nepolarna frakcija ukupnih lipida celih gusenica, za analizu masnih kiselina. Frakcije su razdvojene na ploči dimenzije 20 x 20 cm prevučene silika gelom u sistemu rastvarača n-heksan:dietil-etar:glacijalna sirćetna kiselina (40:10:1, v/v/v). Vizuelizacija je postignuta sa 2',7'- dihlorofluoresceinom rastvorenim u metanolu (0,1%, w/v), pod UV lampom (254 nm). Silika gel se sa razdvojenim frakcijama skida sa ploče u odvojene reakcione viala u kojima se radi postupak hemijske transesterifikacije.

##### **4.4.2. Gasno-masene hromatografske analize (GC-MS)**

Analiza masnih kiselina polarne i nepolarne frakcije ukupnih lipida celih gusenica i masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela urađena je gasno-masenom hromatografijom.

Prevođenje masnih kiselina u metil-estre postignuto je postupkom hemijske transesterifikacije. Transesterifikacija preparata rađena je sa metilacionim reagensom (metanolom u prisustvu kiselog katalizatora, koncentrovane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) i toluena u odnosu 2:1, uz zagrevanje na 50°C u zatvorenom sistemu, 16 sati, nakon što se reakcioni vial dobro promućka (Christie, 1982). Nakon što se smeša ohladi, dodaje se miliQ voda i n-heksan:dietil-etar (1:1, v/v), u odnosu 1:1. Dobro se promućka (Vortex) i centrifugira (1500 rpm, 2 minuta), a zatim se gornja faza prenese u drugu epruvetu i sa donjom fazom ponovi postupak ekstrakcije (samo sa smešom heksan:dietil-etar 1:1, v/v) dok se gornja faza spaja sa prethodnom. U epruvetu sa gornjom organskom fazom dodaje se NaHCO<sub>3</sub> (2%, w/v), dobro promućka (Vortex) i centrifugira (1500 rpm, 2 minuta), nakon čega se donja faza odbacuje pomoću staklene Paster-ove pipete. Uzorci se upare do suva u inertnoj atmosferi azota. Resuspendovani metil-estri masnih kiselina u n-heksanu, prečiste se tankoslojnom hromatografijom na silika gelu, primenom smeše organskih rastvarača n-heksan:dietil-etar:glacijalna sirćetna kiselina (90:10:1, v/v/v). Vizuelizacija metil-estara masnih kiselina postignuta je sa 2',7'-dihlorofluoresceinom rastvorenim u metanolu (0,1%, w/v), pod UV lampom (254 nm). Metil-stri masnih kiselina sa silika gela se ekstrahuju smešom rastvarača n-heksan:dietil-etar (1:1, v/v) i NaHCO<sub>3</sub> (2%, w/v) u odnosu 2:1. Smeša se dobro promućka (Vortex) i centrifugira (1500 rpm, 2 minuta). Sa razdvojenom donjom fazom se ponovi postupak ekstrakcije (samo sa smešom heksan:dietil-etar 1:1, v/v) dok se gornja faza spoji sa prethodnom. Metil-estri se upare do suva u inertnoj atmosferi azota (N-EVAP sistem za uparavnje, Organomation). Uzorci se pre merenja, pola sata drže u vakuum eksikatoru.

Transesterifikacija masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela rađena i prečišćavanje dobijenih metil-estara masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela rađeni su po gore opisanom postupku. Prečišćeni metil-estri masnih kiselina polarne i nepolarne frakcije ukupnih lipida celih gusenica kao i ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela resuspendovani se u heksanu (2 mg ml<sup>-1</sup> finalna koncentracija) i analizirani primenom TRACE 2000, Thermo Electron Gasnog Hromatografa (Thermo Scientific, U.K.), sa masenim detektorom na koloni (0.32 mm i.d. x 30 m). Sadržaj identifikovanih metil-estara masnih kiselina izražen je kao relativni procentualni sadržaj, odnosno kao procenat pojedinačnih masnih kiselina u ukupnom pulu masnih kiselina analiziranih lipida.

Prema nezasićenosti, masne kiseline su klasifikovane kao zasićene (saturated fatty acids, SFA, *eng.*), mononezasićene (monounsaturated fatty acids, MUFA, *eng.*) i polinezasićene masne kiseline (polyunsaturated fatty acids, PUFA, *eng.*). Stepem nezasićenosti masnih

kiselina je dat kao odnos nezasićenih masnih kiselina (unsaturated fatty acids, UFA, *eng.*) i zasićenih masnih kiselina (UFA/SFA), gde se u nezasićene masne kiseline ubrajaju mono i polinezasićene masne kiseline (UFA = MUFA + PUFA).

#### **4.4.3. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC)**

Tehnika se zasniva na registrovanju i merenju protoka toplote pri entalpijskoj promeni u nekom uzorku, u zavisnosti od temperature. Radi se o komparativnoj analizi, jer se upoređuje ispitivani uzorak sa inertnim referentnim uzorkom, pri čemu referentni uzorak ne sme prolaziti kroz fazne promene u merenom temperaturnom intervalu.

U našim istraživanjima korišćen je diferencijalni skenirajući kalorimetar DSK Mettler-Toledo, DSC820. Ekstrakti lipida, resuspendovani u hloroformu, kvantitativno su preneseni u aluminijske posudice (40 $\mu$ l), čija je težina prethodno izmerena. Nakon uparavanja do suva u inertnoj atmosferi azota, uzorci (oko 1,5 mg) su analizirani po sledećem DSC programu: početna temperatura od 25°C spuštala se do - 60°C, stopom od 1 °C/min, a zatim su uzorci grejani do 40°C stopom od 4°C/min. Pre grejanja uzorci su držani 1 minut na - 60°C. Analiza termograma dobijenog DSC rađena je u programu START software (verzija 6). Parametri koji su analizirani su toplota topljenja i temperature faznog prelaza (endoterma): početak, pik, odnosno maksimum i kraj endoterme. Na termogramima se uočavaju egzotermni i endotermni pikovi, pri čemu površine pod pikom odgovaraju entalpijskim promenama u uzorku. Egzotermni efekat, koji se dobija procesom hlađenja smeše, označava proces kristalizacije, a endotermni efekat koji se temperaturski nadovezuje, označava proces topljenja nastalih kristala u uzorku, tokom zagrevanja smeše. U tumačenju rezultata analizirali smo deo termograma koji se odnosi na zagrevanje smeše (proces topljenja). Objašnjenje termograma u Rezultatima (Strana 44).

#### **4.5. Statistička obrada podataka**

Rezultati su statistički obrađeni, primenom različitih statističkih metoda programskog paketa „Statistika 10“. Za obradu rezultata korišćena je deskriptivna statistika, jednofaktorska i dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) i analiza po glavnim komponentama (PC analysis, *eng.*). Za utvrđivanje statistički značajnih razlika, između pojedinačnih grupa, korišćen je Tukey HSD test za nejednak broj uzoraka. S obzirom da su analizirani procenti, podaci su prethodno logaritmovani da bi se raspodela pojedinačnih vrednosti prevela u normalnu.

---

## *5. Rezultati istraživanja*

---



## **5.1. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija ukupnih lipida gusenica kukuruznog plamenca *O. nubilalis***

Primenom ove termoanalitičke tehnike u analizi lipida dobili smo podatke o biofizičkim osobinama, koje su povezane sa njihovom hemijskom strukturom, kao što je sastav masnih kiselina. Primenjena merenja daju kvalitativne i kvantitativne podatke o procesima koji uključuju endotermne ili egzotermne efekte, ili promenu toplotnog kapaciteta uzoraka ekstrahovanih lipida. Opis dela termograma čije smo delove upoređivali dat je na Slici 6. i Tabeli 1.

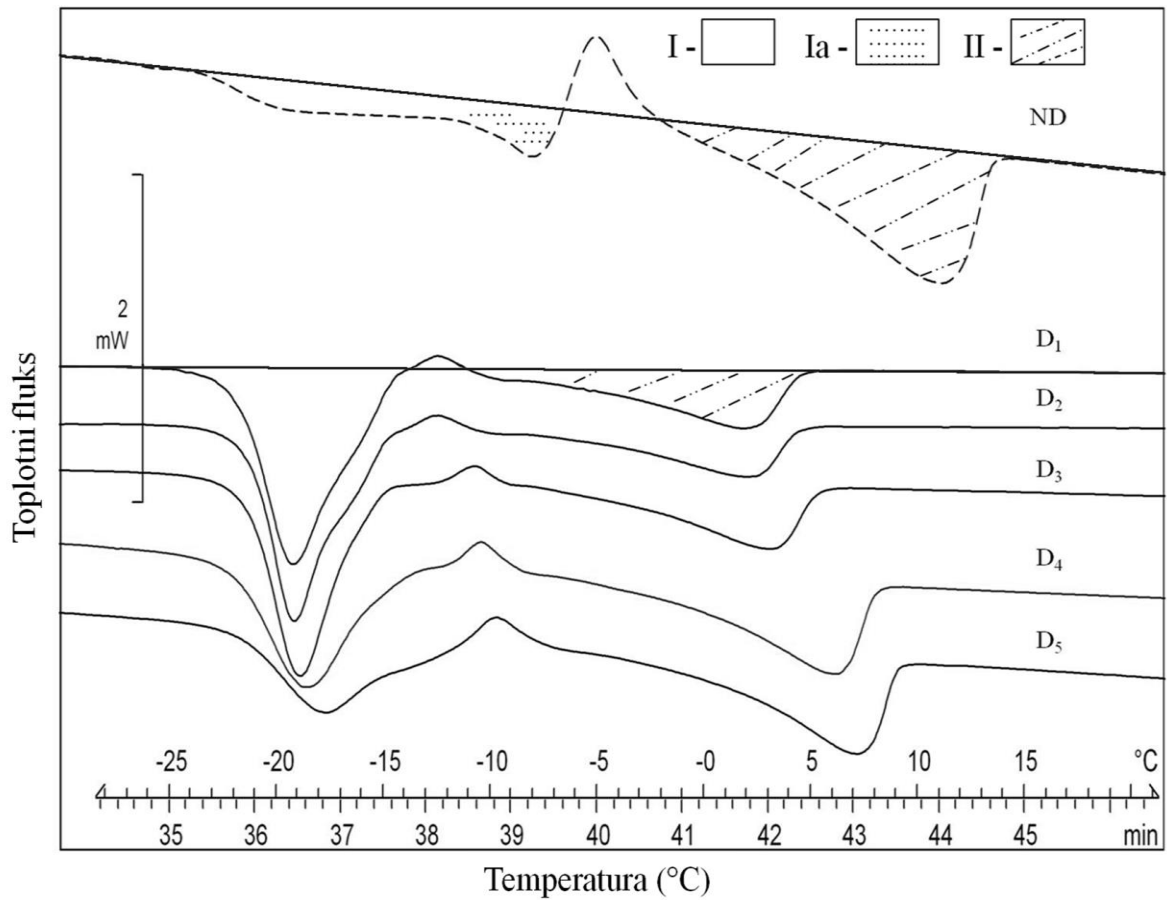
### **5.1.1. Temperature faznog prelaza ukupnih lipida nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica u uslovima spoljašnje temperature, tokom različitih faza dijapauze**

U cilju proučavanja uloge lipida kod gusenica kukuruznog plamenca *O. nubilalis*, u mehanizmima preživljavanja niskih temperatura, diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) analizirali smo temperature faznog prelaza ukupnih lipida ekstrahovanih iz celih nedijapauzirajućih, i dijapauzirajućih gusenica u uslovima spoljašnje sredine, u različitim periodima dijapauze (početak, sredina i kraj). Za tumačenje rezultata odabrali smo deo termograma tokom zagrevanja, pri čemu endotermni pikovi (I, Ia i II) na termogramima predstavljaju karakterističan fazni prelaz (proces topljenja smeše) (Slika 6; Tabela 1).

Termograme ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj), karakterišu dva jasna endotermna pika (pik I i II), dok termogram ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) karakterišu tri endotermna pika (pik I, Ia i II), od kojih su endotermni pikovi I i Ia slabije definisani, dok je pik II jasno definisan (Slika 6). Kod dijapauzirajućih gusenica, tokom svih faza dijapauze, pik endoterme I detektovan je između -18,2/-19,3°C dok je pik endoterme II detektovan između 3,0/7,8°C. Kod nedijapauzirajućih gusenica pik endoterme I detektovan je na -18,3°C dok je pik endoterme II detektovan na 12,0°C (Tabela 1).

Rezultati pokazuju da je endotermni pik I kod gusenica u dijapauzi, u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice, statistički značajno veći obzirom da površina pod pikom predstavlja toplotu topljenja odnosno količinu toplotne energije koja se usvaja od strane smeše ukupnih lipida tokom endoternog procesa topljenja. Endotermni pik I se tokom dijapauze statistički značajno smanjuje, sa -84,4 mJ na -47,1 mJ, s tim da je na kraju

dijapauze još uvek statistički značajno veći u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice, kod kojih je  $-24,1\text{mJ}$  (Slika 6; Tabela1). Nasuprot endotermnom piku I, endotermni pik II je kod dijapauzirajućih gusenica, tokom svih faza dijapauze (početak, sredina i kraj) statistički značajno manji nego kod nedijapauzirajućih gusenica. Endotermni pik II, tokom dijapauze značajno se povećava na kraju dijapauze, sa  $-39,1\text{ mJ}$  na  $-60,3\text{ mJ}$ , ali je i dalje statistički značajno manji nego kod nedijapauzirajućih gusenica, kod kojih je  $-86,0\text{ mJ}$  (Slika 6, Tabela1). Temperature faznog prelaza su statistički značajno niže kod gusenica u dijapauzi (Tabela 1). Pik endoterme I se tokom dijapauze ne menja dok pik endoterme II statistički značajno raste na kraju dijapauze, ali je i tada značajno niži od istih kod nedijapauzirajućih gusenica (Tabela1).



**Slika 6.** DSC termogrammi (deo pri zagrevanju) ukupnih lipida celih nedijapauzirajućih (ND), i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Endotermni pikovi (I, Ia i II) ukazuju na karakteristične temperature faznog prelaza (proces topljenja smeše).

**Tabela 1.** Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida celih nedijapauzirajućih (ND), i dijabauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijabauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj).

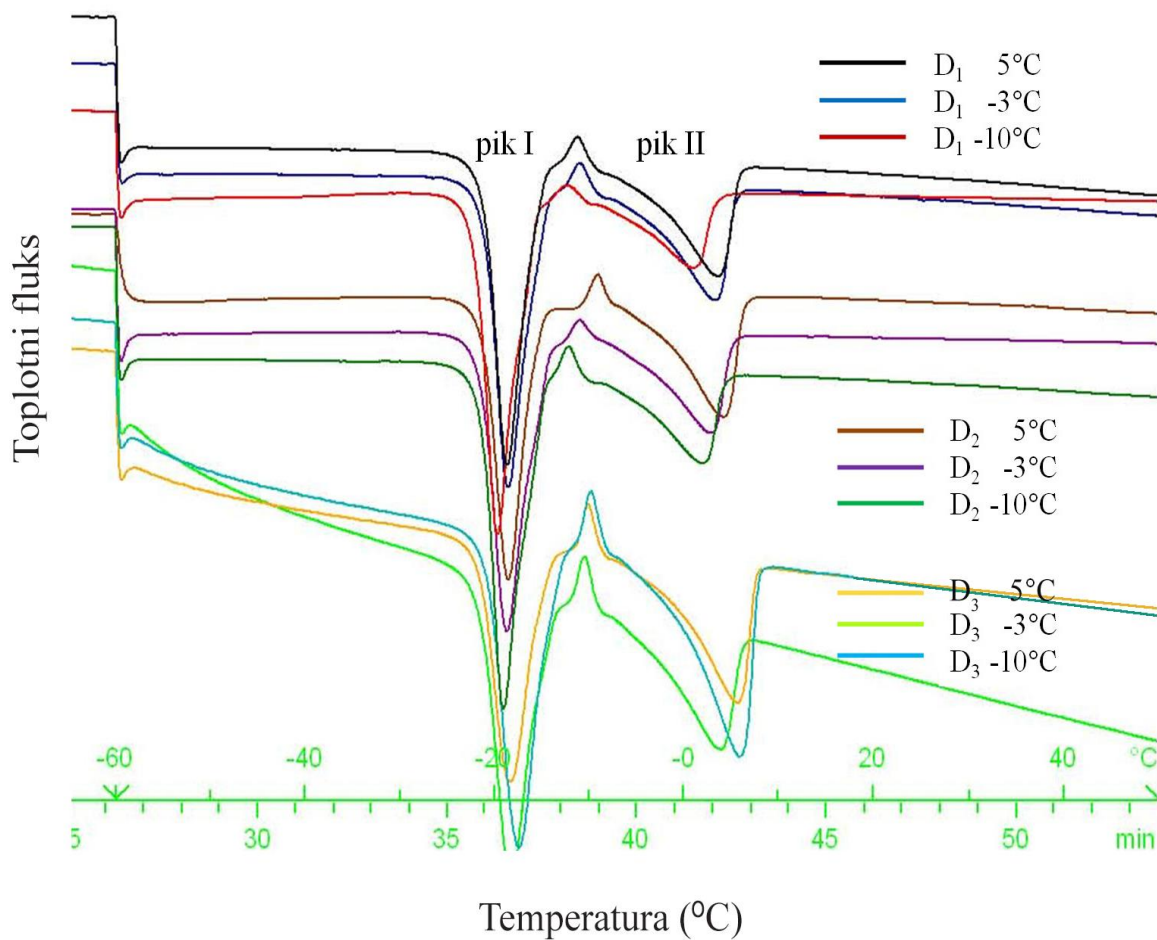
Toplota topljenja [mJ]	ND	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	D <sub>4</sub>	D <sub>5</sub>	ANOVA
<b>I</b>	-24,1±1,4 <sup>a</sup>	-84,4±5,4 <sup>b</sup>	-69,9±2,1 <sup>b</sup>	-66,2±3,4 <sup>b</sup>	-51,3±3,1 <sup>c</sup>	-47,1±0,4 <sup>b</sup>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>Ia</b>	-12,0±1,9	/	/	/	/	/	/
<b>II</b>	-86,0±4,6 <sup>a</sup>	-46,8±2,9 <sup>b</sup>	-38,9±2,3 <sup>b</sup>	-39,1±2,3 <sup>b</sup>	-57,9±0,3 <sup>c</sup>	-60,3±1,1 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Pik endoterme [°C]</b>							
<b>I</b>	-18,3±0,9	-19,2±0,4	-19,3±0,3	-19,0±0,2	-18,5±0,3	-18,2±0,5	<b>NS</b>
<b>Ia</b>	-6,1±0,7	/	/	/	/	/	/
<b>II</b>	12,0±0,1 <sup>a</sup>	3,0±0,1 <sup>b</sup>	3,1±0,2 <sup>b</sup>	3,6±0,3 <sup>b</sup>	7,3±0,3 <sup>c</sup>	7,8±0,6 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Početak endoterme [°C]</b>							
<b>I</b>	-23,2±0,3 <sup>a</sup>	-28,0±1,8 <sup>b</sup>	-26,1±0,5 <sup>a</sup>	-25,2±0,6 <sup>a</sup>	-25,8±0,3 <sup>a</sup>	-27,9±0,6 <sup>b</sup>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>Ia</b>	-9,8±0,8	/	/	/	/	/	/
<b>II</b>	1,06±0,4 <sup>a</sup>	-10,6±0,3 <sup>b</sup>	-10,6±0,3 <sup>b</sup>	-9,8±0,3 <sup>b</sup>	-7,9±0,3 <sup>c</sup>	-6,5±0,6 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>Kraj endoterme [°C]</b>							
<b>I</b>	-11,7±0,6 <sup>a</sup>	-14,6±0,5 <sup>b</sup>	-14,2±0,5 <sup>b</sup>	-14,5±0,4 <sup>b</sup>	-11,8±0,3 <sup>a</sup>	-11,3±0,3 <sup>a</sup>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>Ia</b>	-5,8±0,6	/	/	/	/	/	/
<b>II</b>	-13,7±0,2 <sup>a</sup>	5,6±0,3 <sup>b</sup>	5,6±0,1 <sup>b</sup>	6,3±0,3 <sup>b</sup>	9,1±0,4 <sup>c</sup>	9,9±0,6 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,001</b>

Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 ponavljanja ± standardnu grešku pri čemu ponavljanje predstavlja pul od 3 gusenice. Različita slova u indeksu (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa, dobijenu Tukey`'s HSD post hoc testom, dok ista slova ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike između grupa ( $p \geq 0.05$ ). NS - nije statistički značajna razlika.

**5.1.2. Temperature faznog prelaza ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica tokom različitih faza dijapauze u uslovima hlađenja**

Uticaj temperature sredine na promene koje definišu termalne procese, a koje smo ispitivali DSC, ispitali smo kod dijapauzirajućih gusenica koje su izlagane kontrolisanom hlađenju, do  $-10^{\circ}\text{C}$  i to u različitim fazama dijapauze ( $D_1$  - početak,  $D_2$  - sredina i  $D_3$  - kraj).

Dobijeni rezultati pokazuju termograme karakteristične za dijapauzirajuće gusenice *O. nubilalis* sa dva jasna endotermna pika (pik I i II) (Slika 7; Tabele 2-4). Izlaganje niskoj temperaturi tokom različitih faza dijapauze ( $D_1$  - početak,  $D_2$  - sredina i  $D_3$  - kraj), ne menja značajno toplotu topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida gusenica *O. nubilalis*.



**Slika 7.** DSC termogrammi (deo pri zagrevanju) ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja (5°C, -3°C i -10°C) tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Endotermni pikovi (I i II) ukazuju na karakteristične temperature faznog prelaza (proces topljenja smeše).

**Tabela 2.** Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida celih dijavauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja na početku dijavauze ( $D_1$ ).

	$D_1$ 5°C	$D_1$ -3°C	$D_1$ -10°C	ANOVA
<b>Toplota topljenja [mJ]</b>				
<b>I</b>	-61,65±0,37	-68,31±1,40	-80,36±5,76	<b>NS</b>
<b>II</b>	-44,50±0,43	-39,8±1,91	-37,17±5,42	<b>NS</b>
<b>Pik endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-18,59±0,24	-19,33±0,24	-19,61±0,28	<b>NS</b>
<b>II</b>	4,46±0,08	3,19±0,42	1,64±0,49	<b>NS</b>
<b>Početak endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-25,72±0,19	-26,02±0,33	-25,35±0,87	<b>NS</b>
<b>II</b>	-9,6±0,06	-10,08±0,30	-9,77±0,46	<b>NS</b>
<b>Kraj endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-13,18±0,07 <sup>a</sup>	-13,11±0,26 <sup>a</sup>	-15,65±0,04 <sup>b</sup>	$p < 0,001$
<b>II</b>	6,91±0,05	5,97±0,27	4,35±0,90	<b>NS</b>

Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 ponavljanja  $\pm$  standardnu grešku, pri čemu ponavljanje predstavlja pul od 3 gusenice. Različita slova u indeksu (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa, dobijenu Tukey`s HSD post hoc testom, dok ista slova ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike između grupa ( $p \geq 0.05$ ). NS - nije statistički značajna razlika.

**Tabela 3.** Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida celih dijavauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja na sredini dijavauze (D<sub>2</sub>).

	D <sub>2</sub> 5°C	D <sub>2</sub> -3°C	D <sub>2</sub> -10°C	ANOVA
<b>Toplota topljenja [mJ]</b>				
<b>I</b>	-59,64±0,58 <sup>a</sup>	-65,98±0,76 <sup>b</sup>	-69,35±1,53 <sup>b</sup>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>II</b>	-47,69±0,58	-41,30±2,80	36,29±0,95	<b>NS</b>
<b>Pik endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-18,65±0,58	-19,19±0,36	-19,01±0,06	<b>NS</b>
<b>II</b>	4,70±0,58	3,63±0,31	2,96±0,29	<b>NS</b>
<b>Početak endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-26,93±0,58 <sup>a</sup>	-24,29±0,64 <sup>b</sup>	-25,01±0,16 <sup>a</sup>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>II</b>	-8,91±0,58	-9,16±0,02	-9,13±0,36	<b>NS</b>
<b>Kraj endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-11,83±0,58 <sup>a</sup>	-14,78±0,08 <sup>b</sup>	-13,16±0,33 <sup>a</sup>	<b>p&lt;0,01</b>
<b>II</b>	6,74±0,58	5,92±0,44	5,72±0,24	<b>NS</b>

Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 ponavljanja ± standardnu grešku, pri čemu ponavljanje predstavlja pul od 3 gusenice. Različita slova u indeksu (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa, dobijenu Tukey`'s HSD post hoc testom, dok ista slova ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike između grupa ( $p \geq 0.05$ ). NS - nije statistički značajna razlika.



**Tabela 4.** Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida celih dijavapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja na kraju dijavapauze (D<sub>3</sub>).

	D <sub>3</sub> 5°C	D <sub>3</sub> -3°C	D <sub>3</sub> -1 °C	ANOVA
<b>Toplota topljenja [mJ]</b>				
<b>I</b>	-61,99±0,49 <sup>a</sup>	-70,09±3,20 <sup>a</sup>	-82,07±0,58 <sup>b</sup>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>II</b>	-47,95±2,56 <sup>a</sup>	-49,40±1,00 <sup>a</sup>	-73,35±0,57 <sup>b</sup>	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Pik endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-18,26±0,28	-19,08±0,08	-18,09±0,58	<b>NS</b>
<b>II</b>	5,98±0,14 <sup>a</sup>	4,83±0,26 <sup>a</sup>	6,54±0,59 <sup>b</sup>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>Početak endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-25,69±2,63	-26,21±0,08	-32,57±0,56	<b>NS</b>
<b>II</b>	-7,07±0,88	-9,05±0,16	-8,34±0,6	<b>NS</b>
<b>Kraj endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-12,26±0,28	-11,84±0,09	-11,42±0,55	<b>NS</b>
<b>II</b>	7,55±0,40	7,22±0,29	8,81±0,54	<b>NS</b>

Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 ponavljanja ± standardnu grešku, pri čemu ponavljanje predstavlja pul od 3 gusenice. Različita slova u indeksu (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa, dobijenu Tukey`s HSD post hoc testom, dok ista slova ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike između grupa ( $p \geq 0.05$ ). NS - nije statistički značajna razlika.

## **5.2. Analiza masnih kiselina ukupnih lipida gusenica kukuruznog plamenca**

### ***Ostrinia nubilalis***

Gasno-hromatografskom analizom određen je relativni sastav metil-estara masnih kiselina u preparatima polarne i nepolarne frakcije ukupnih lipida celih gusenica kao i u preparatima ukupnih lipida masnog tela i hemolimfe nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica tokom različitih faza dijapauze, u uslovima spoljašnje sredine i u uslovima kontrolisanog hlađenja. Polarnu frakciju uglavnom čine strukturni fosfolipidi ćelijske membrane (strukturni lipidi), dok nepolarna frakcija sadrži lipide energetske rezervi, pre svega triacilgliceroli (rezervni lipidi). Pored kvalitativne i kvantitativne analize masnih kiselina, rezultati su sagledani i sa aspekta zasićenosti masnih kiselina, kao odnos nezasićenih masnih kiselina (UFA) i zasićenih masnih kiselina (SFA), gde se u nezasićene masne kiseline ubrajaju mono i polinezasićene masne kiseline (UFA = MUFA + PUFA).

#### **5.2.1. Sastav masnih kiselina polarne (strukturne) i nepolarne (rezervne) frakcije ukupnih lipida nedijapauzirajućih, i dijapauzirajućih gusenica tokom dijapauze**

Kako bi utvrdili da li su promene biofizičkih osobina ukupnih lipida celih gusenica *Ostrinia nubilalis* posledica promena u sastavu masnih kiselina, kako polarne (fosfolipidi) tako i nepolarne (triacilgliceroli) frakcije, analizirali smo njihov sastav kod nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Rezultati su prikazani na Slikama 8-16, a broježane vrednosti date u Tabeli 5 A, a prema zasićenosti masnih kiselina u Tabeli 5 B.

Statistička značajnost razlika u sadržaju pojedinačnih masnih kiselina sumarno je data u Tabeli 6, a statistička značajnost razlika u sadržaju glavnih strukturnih klasa masnih kiselina prema zasićenosti u Tabeli 7.

Kvalitativno gledano, sastav masnih kiselina u polarnoj i nepolarnoj frakciji nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze, je sličan, sačinjen od 7 masnih kiselina sa 16 i 18 ugljenikovih atoma: palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1n-7), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1n-9), vakenska (C18:1n-7), linolna (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenska (C18:3n-3) (Slika 8 A i B).

Kvantitativna analiza je pokazala da su najzastupljenije masne kiseline u nepolarnoj frakciji palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1n-7) i oleinska masna kiselina (C18:1n-9), čineći više od 80% ukupnog sastava masnih kiselina nedijapauzirajućih i 90% ukupnog sastava masnih kiselina dijapauzirajućih gusenica (Slika 8 B; Tabela 5). Palmitooleinska masna kiselina (C16:1n-7) predstavlja dominantnu komponentu pula masnih kiselina nepolarne frakcije kako kod nedijapauzirajućih tako i kod dijapauzirajućih gusenica tokom svih faza dijapauze, čineći čak više od 50% pula kod dijapauzirajućih gusenica (Slika 8 B; Tabela 5). Zajedno sa manje dominantnom, linolnom masnom kiselinom (C18:2n-6), pomenute masne kiseline čine više od 95% pula masnih kiselina dijapauzirajućih gusenica i 90% pula nedijapauzirajućih gusenica (Slika 8 B; Tabela 5). Relativni procentualni sadržaj stearinske (C18:0), vakenske (C18:1n-7) i  $\alpha$ -linolenske masne kiseline (C18:3n-3) pojedinačno čini značajno manji deo pula masnih kiselina nepolarne frakcije (<2.5%), pri čemu je  $\alpha$ -linolenska masna kiselina (C18:3n-3) kod dijapauzirajućih gusenica zastupljena samo u tragovima (<0.5%) (Slika 8 B; Tabela 5).

Sastav masnih kiselina polarne frakcije je uniformniji, bez jasne dominacije sadržaja pojedinačne masne kiseline (Slika 8 A; Tabela 5). Polinezasićene masne kiseline, linolna i  $\alpha$ -linolenska (C18:2n-6 i C18:3n-3) su zastupljenije u ovoj frakciji nego u nepolarnoj frakciji lipida gusenica *O. nubilalis* (Slika 8 A; Tabela 5).

Analizom relativnog sadržaja masnih kiselina nepolarne i polarne frakcije (triacilglicerola i fosfolipida), potvrđena je značajna razlika u njihovom pojedinačnom sadržaju (Slike 9-15; Tabela 6). U odnosu na fiziološko stanje u kom se gusenice nalaze, pokazano je da postoji statistički značajna razlika u sadržaju masnih kiselina između dijapauzirajućih i nedijapauzirajućih gusenica (Slike 9-15; Tabela 6). Pored razlike između dijapauzirajućih gusenica tokom svih faza dijapauze u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice, utvrđena je razlika u sadržaju i dinamici promena masnih kiselina analiziranih frakcija ukupnih lipida celih gusenica i tokom različitih faza dijapauze (Slike 9-15; Tabela 6).

U odnosu na zasićenost masnih kiselina, dvofaktorskom analizom varijanse analizirano prisustvo zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) u nepolarnoj i polarnoj frakciji lipida, pokazano je da gusenice tokom svih faza dijapauze u odnosu na nedijapauzirajuće, imaju višestruko veći sadržaj mononezasićenih masnih kiselina, a statistički značajno manji sadržaj zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina (Tabela 7). To je rezultovalo statistički značajnim povećanjem stepena nezasićenosti

masnih kiselina (UFA/SFA) obe frakcije dijapauzirajućih gusenica, koji je izraženiji u nepolarnoj u odnosu na polarnu frakciju (Tabela 7).

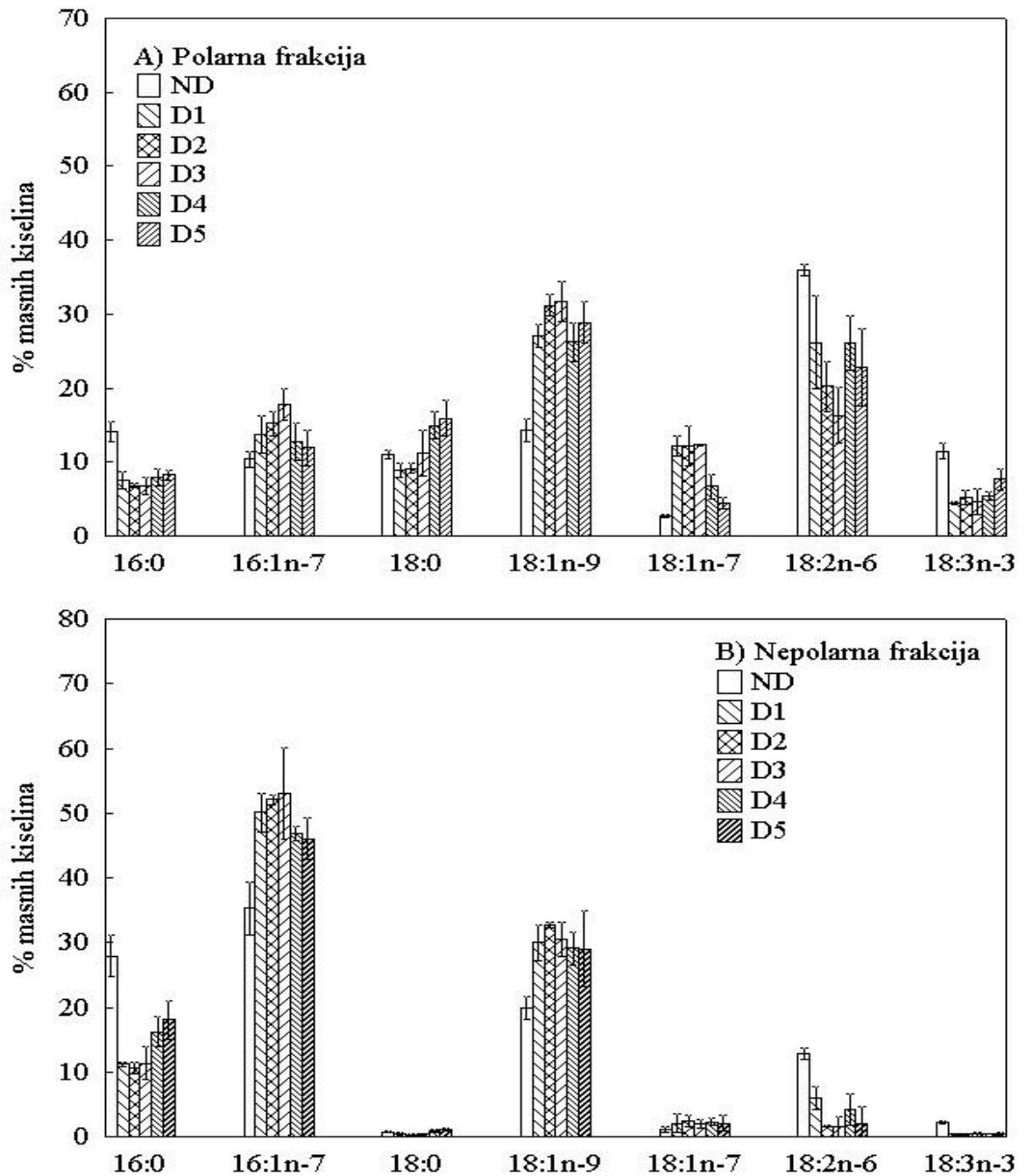
Značajno povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina nepolarane frakcije ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica, rezultat je statistički značajnog povećanja sadržaja palmitoleinske (C16:1n-7) i oleinske (C18:1n-9) kiseline, od mononezasićenih masnih kiselina (Slike 10 i 12; Tabele 6 i 7) i statistički značajnog smanjenja sadržaja palmitinske kiseline (C16:0), od zasićenih masnih kiselina (Slika 9; Tabele 6 i 7), mada je sadržaj linolne kiseline (C18:2n-6), kao polinezasićene masne kiseline, takođe smanjen (Slika 14, Tabele 6 i 7).

U polarnoj, fosfolipidnoj, frakciji ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica, pokazan je isti trend promena u sastavu glavnih strukturnih klasa masnih kiselina, ali sa uniformnijim udelom prisutnih masnih kiselina; statistički značajno se povećava sadržaj svih mononezasićenih masnih kiselina, palmitoleinske (C16:1n-7), oleinske (C18:1n-9) i vakenske (C18:1n-7), uz statistički značajno smanjenje sadržaj zasićenih, palmitinske (C16:0) i stearinske (C18:0) kiseline i polinezasićenih masnih kiselina, linolne (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenske (C18:3n-3) (Slike 9-15; Tabele 6 i 7), što rezultuje značajno većim stepenom nezasićenosti ove frakcije (Tabela 7).

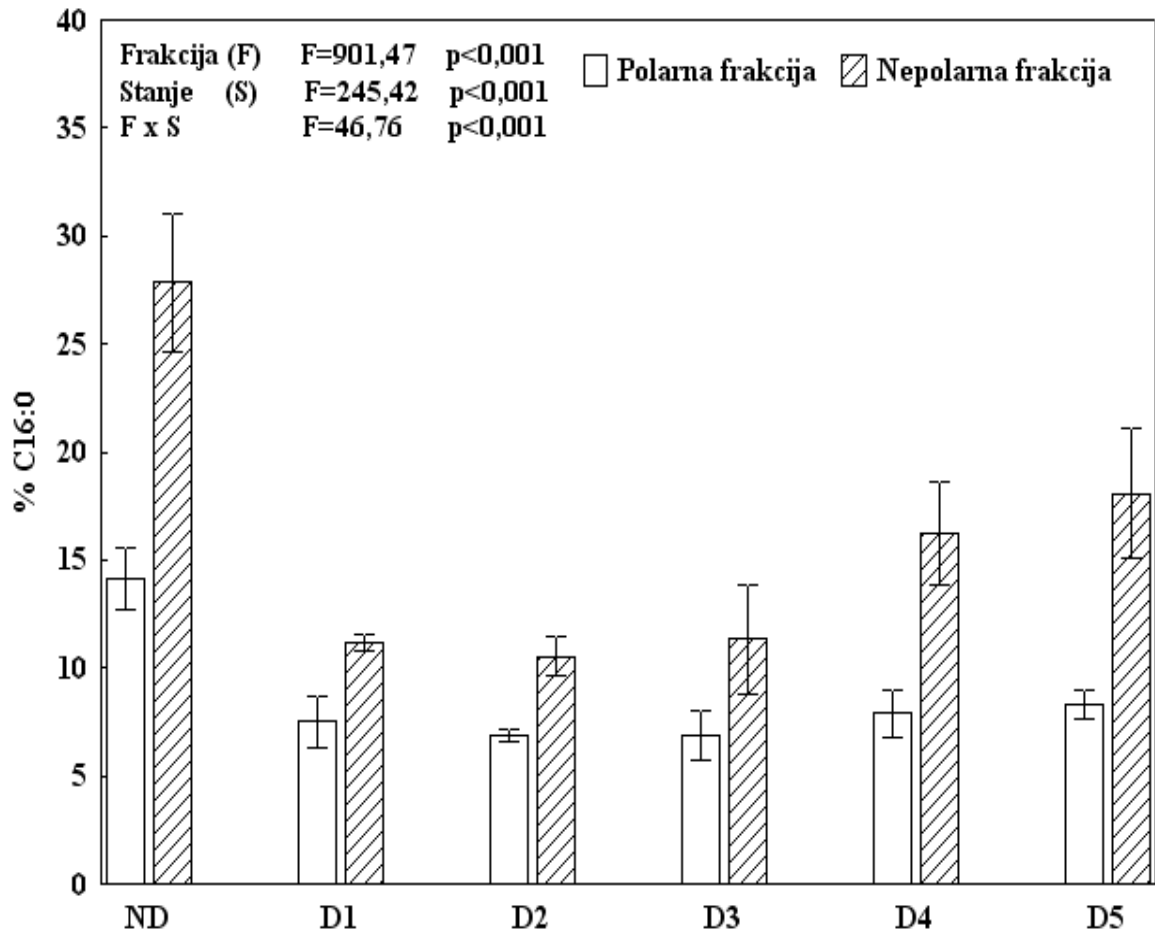
Sastav masnih kiselina nepolarne i polarne frakcije ukupnih lipida celih nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina, D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj), analiziran je i multivarijatom statistikom po glavnim komponentama (Principal Component Analysis – PCA, *eng.*) (Slika 16 A, B, C i D). PCA prevodi skup promenljivih koje opisuju analiziran uzorak u skup novih promenljivih koje se označavaju kao glavne komponente, koje nisu međusobno korelisane i koje sukcesivno opisuju maksimalni mogući procenat varijabilnosti unutar analiziranih grupa.

Najveći deo varijabilnosti u sastavu masnih kiselina nepolarne i polarne frakcije ukupnih lipida opisuje prva glavna komponenta (PC1) dok druga glavna komponenta (PC2) opisuje manji deo varijabilnosti unutar grupa. Prve dve glavne komponente PC1 i PC2 opisuju 95,2% varijabilnosti unutar analiziranih grupa na osnovu sastava masnih kiselina nepolarne frakcije i 94,9% varijabilnosti unutar grupa na osnovu sastava masnih kiselina polarne frakcije. Prva glavna komponenta (PC1) opisuje 84,47% varijabilnosti unutar grupa na osnovu sastava masnih kiselina nepolarne frakcije i 78,62% unutar grupa na osnovu sastava masnih kiselina polarne frakcije dok druga glavna komponenta (PC2) opisuje 11,71% i

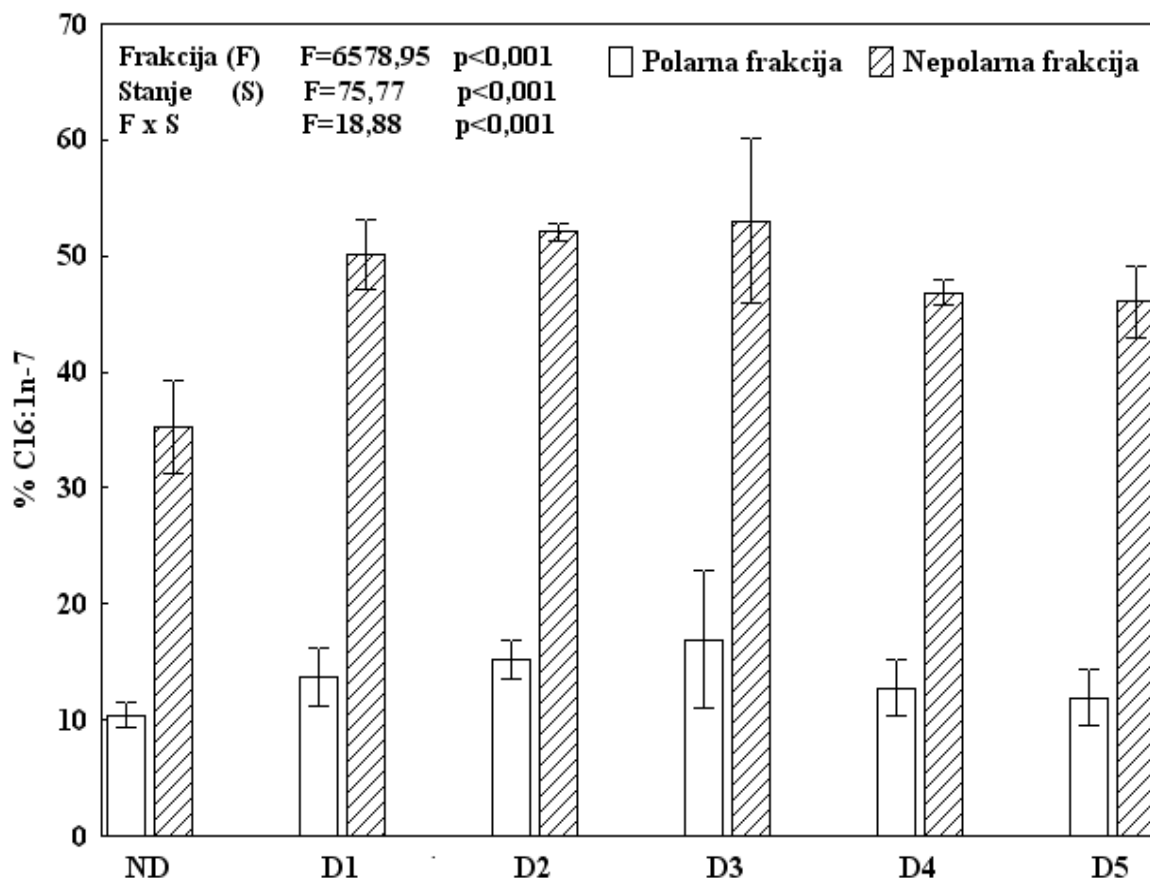
16,24% varijabilnosti (Slika 16 A, B, C i D). Jasno izraženo grupisanje mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) sa jedne strane i zasićenih (SFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) sa druge strane prve glavne komponente (PC1), rezultuje grupisanjem nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih grupa gusenica (tokom svih faza dijapauze) na suprotnim stranama prve glavne komponente (PC1) (Slika 16 A, B, C i D). Analizom glavne komponente je potvrđeno da je u gusenicama dijapauzirajuće grupe sadržaj mononezasićenih masnih kiselina veći, nasuprot manjeg sadržaja zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina nedijapauzirajućih gusenica (Slika 16 A i B). PC1 je u pozitivnoj korelaciji sa palmitooleinskom (C16:1n-7), oleinskom (C18:1n-9) i vakenskom kiselinom (C18:1n-7), u odnosu na negativnu korelaciju sa linolnom (C18:2n-6),  $\alpha$ -linolenskom (C18:3n-3), palmitinskom (C16:0) i stearinskom kiselinom (C18:0) (Slika 16 A i B). Nastala promena na početku dijapauze karakteriše ceo tok dijapauze, što se vidi na osnovu grupisanja svih grupa dijapauzirajućih gusenica sa iste strane prve glavne komponente (PC1) (Slika 16 B i C).



**Slika 8 A i B.** Sastav masnih kiselina polarne (strukturne) i nepolarne (rezervne) frakcije ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND), i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE (brojčane vrednosti su date u Tabeli 5 A i B). Statistička značajnost razlika data je u Tabeli 6.

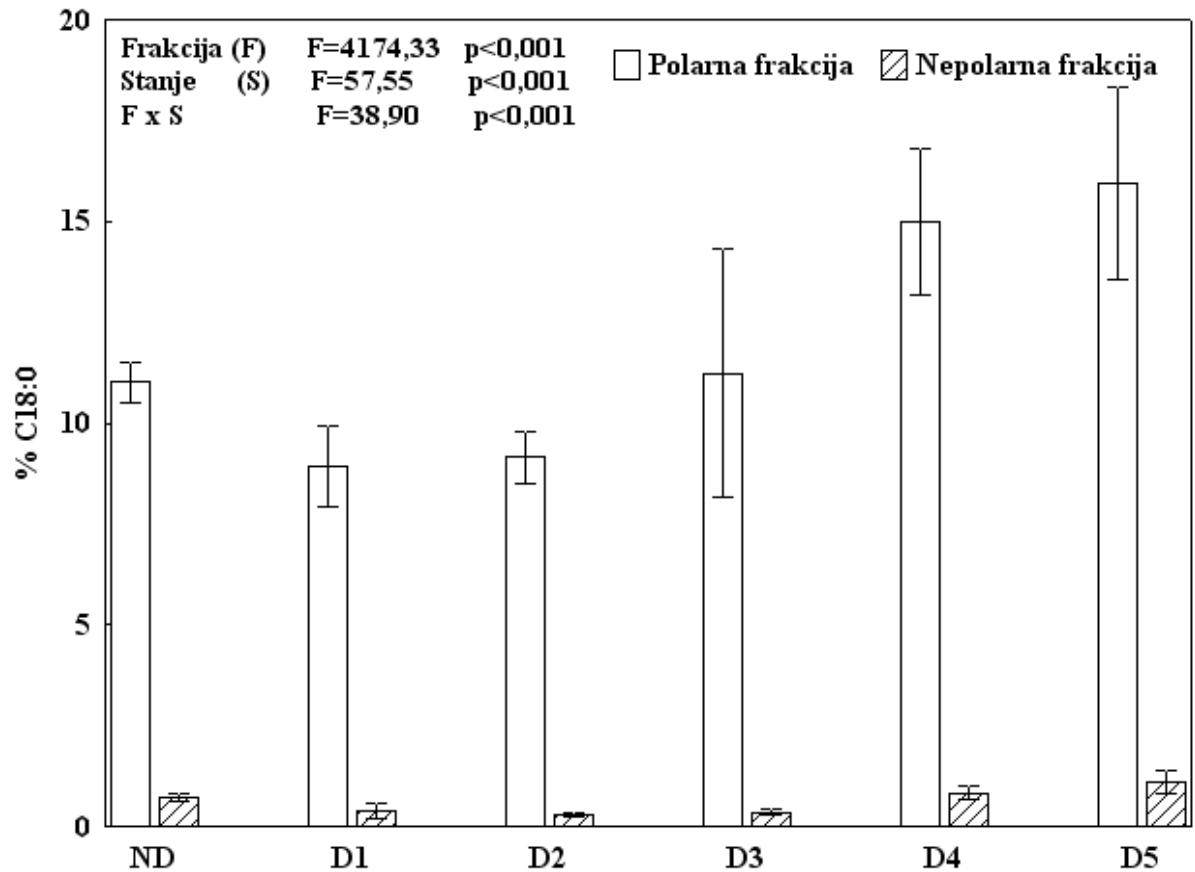


**Slika 9.** Relativni sadržaj palmitinske masne kiseline C16:0 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (efekat stanja) i tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat frakcije, S - efekat stanja, F x S - efekat interakcije, F - faktor.

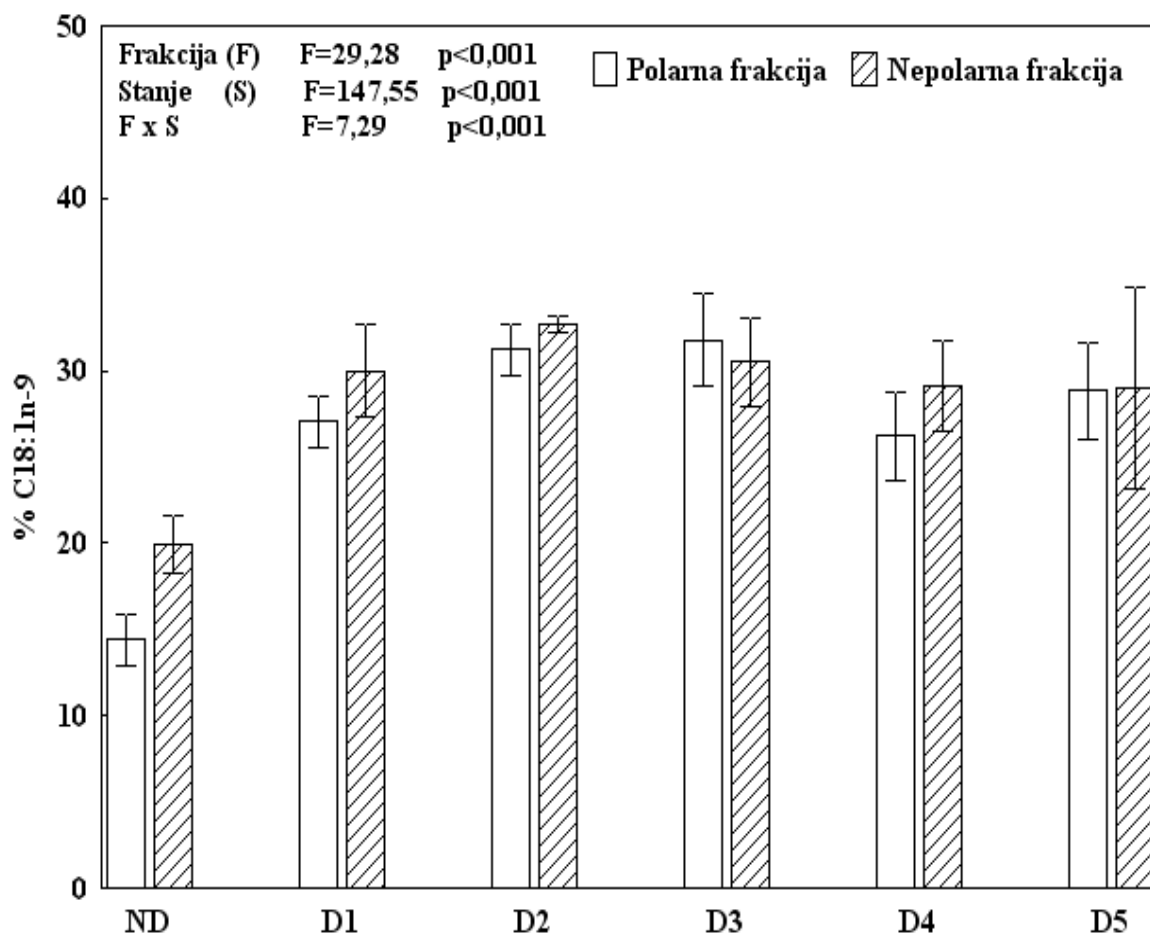


**Slika 10.** Relativni sadržaj palmitoleinske masne kiseline C16:1n-7 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (efekat stanja), tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat frakcije, S - efekat stanja, F x S - efekat interakcije, F - faktor.

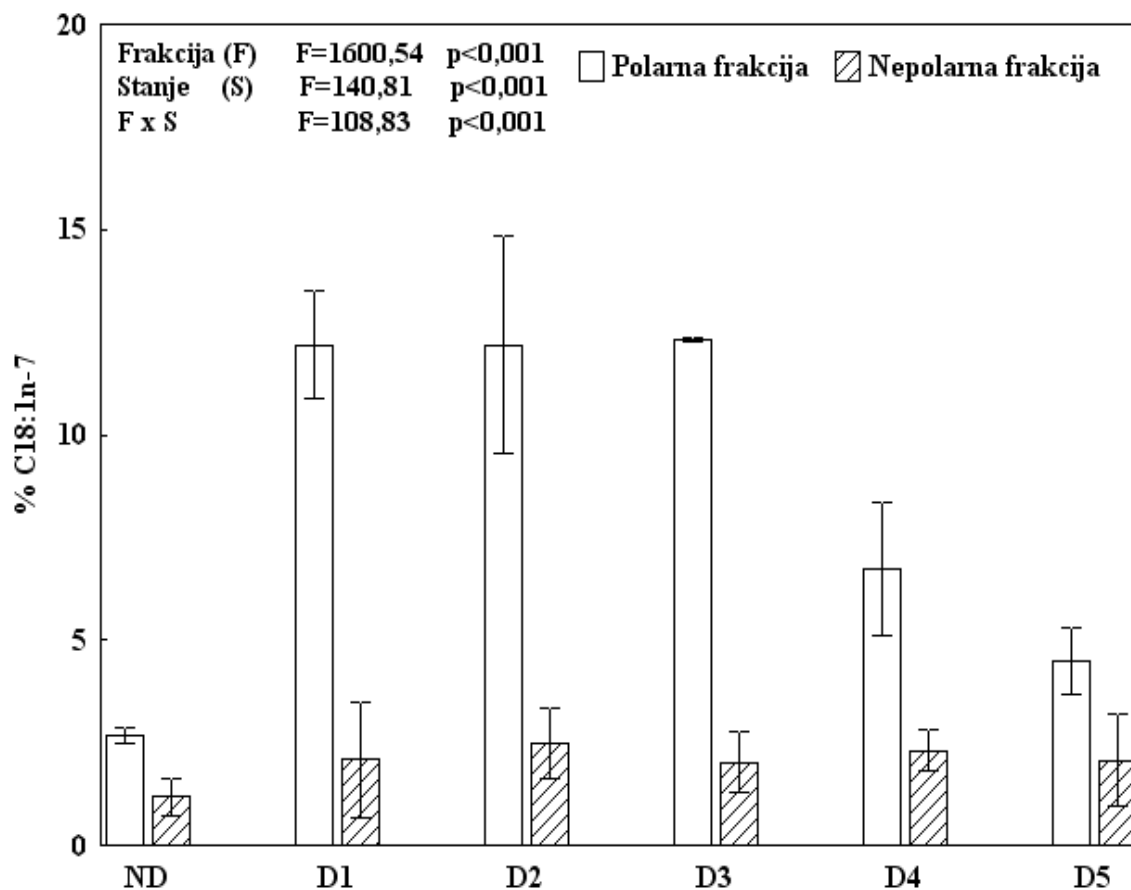




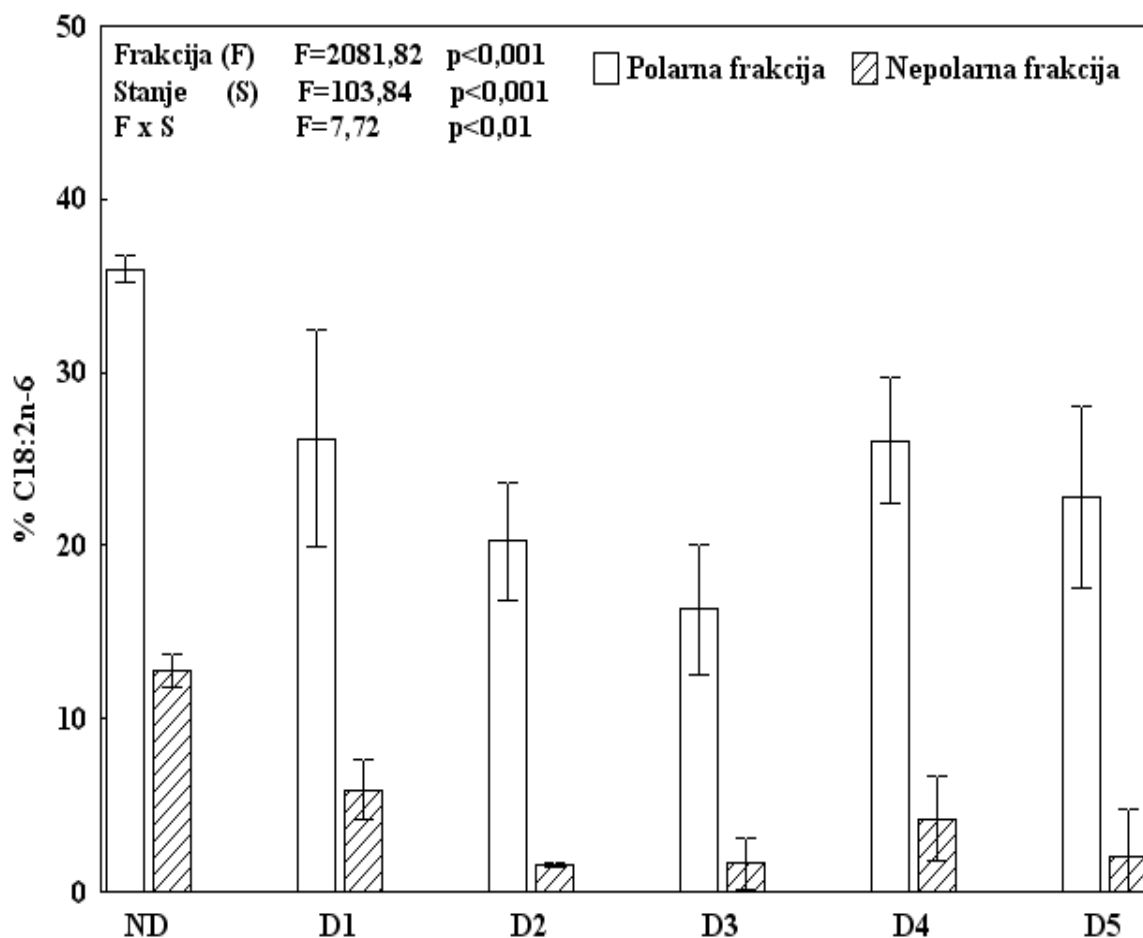
**Slika 11.** Relativni sadržaj stearinske masne kiseline C18:0 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (efekat stanja), tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat frakcije, S - efekat stanja, F x S - efekat interakcije, F - faktor.



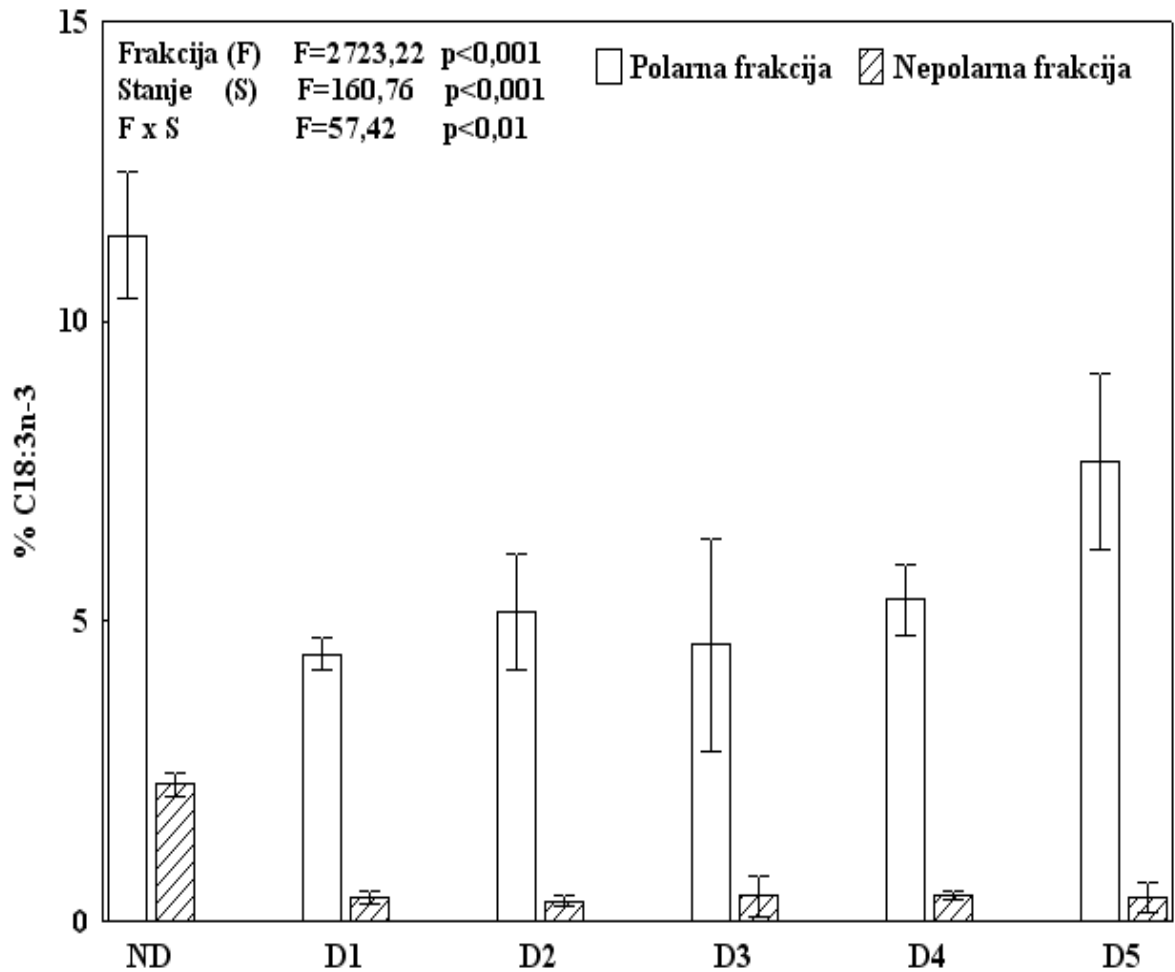
**Slika 12.** Relativni sadržaj oleinske masne kiseline C18:1n-9 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (efekat stanja), tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat frakcije, S - efekat stanja, F x S - efekat interakcije, F - faktor.



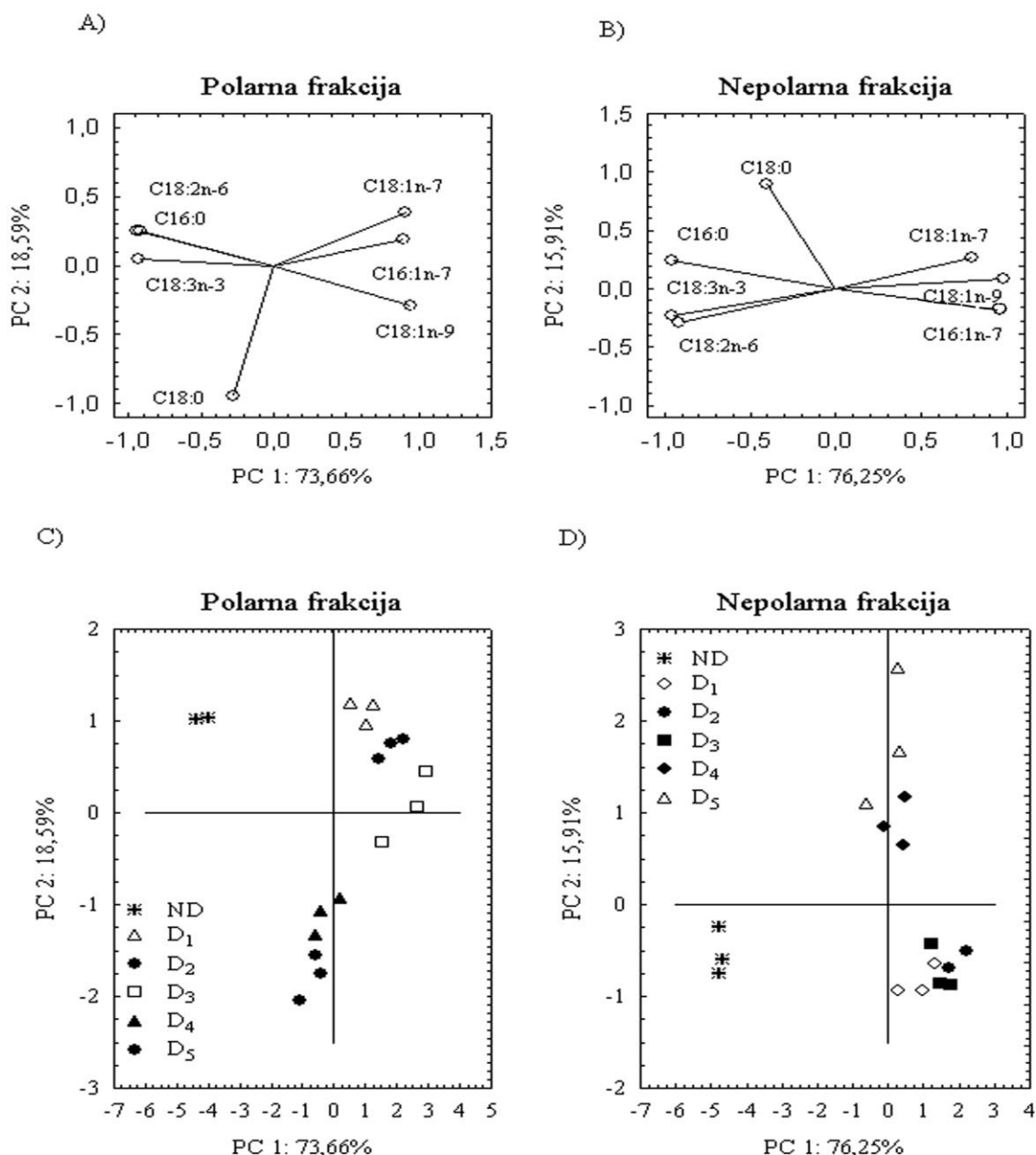
**Slika 13.** Relativni sadržaj vakenske masne kiseline C18:1n-7 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida, ekstrahovanih iz nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (efekat stanja), tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat frakcije, S - efekat stanja, F x S - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 14.** Relativni procentualni sadržaj linolne masne kiseline C18:2n-6 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (efekat stanja), tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat frakcije, S - efekat stanja, F x S - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 15.** Relativni sadržaj  $\alpha$ -linolenske masne kiseline C18:3n-3 polarne i nepolarne frakcije (efekat frakcije) ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica (ND i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (efekat stanja), tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat frakcije, S - efekat stanja, F x S - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 16. A, B, C i D** Analiza relativnog sadržaja masnih kiselina polarne (fosfolipidi) i nepolarne (triacilgliceroli) frakcije ukupnih lipida celih nedijapauzirajućih (ND) i dijaupauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom različitih faza dijaupauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj), po glavnim komponentama (PC1 i PC2).

**Tabela 5. A i B** Procentualni udeo pojedinačnih masnih kiselina u pulu masnih kiselina nepolarne i polarne frakcije ukupnih lipida, nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj); A) prema vrsti masnih kiselina i B) prema zasićenosti masnih kiselina: zasićene - SFA; nezasićene - UFA (mononezasićene - MUFA i polinezasićene - PUFA).

A)

Nepolarna frakcija	C16:0	C16:1n-7	C18:0	C18:1n-9	C18:1n-7	C18:2n-6	C18:3n-3
ND	27.86±0.74	35.27±0.94	0.71±0.02	19.90±0.39	1.18±0.11	12.81±0.22	2.27±0.04
D <sub>1</sub>	11.18±0.08	50.07±0.70	0.38±0.04	29.99±0.63	2.08±0.32	5.90±0.40	0.40±0.02
D <sub>2</sub>	10.55±0.21	52.06±0.18	0.31±0.01	32.67±0.11	2.49±0.20	1.59±0.02	0.34±0.02
D <sub>3</sub>	11.33±0.59	53.02±1.66	0.36±0.02	30.53±0.60	2.03±0.17	2.33±1.06	0.41±0.08
D <sub>4</sub>	16.24±0.56	46.86±0.26	0.83±0.04	29.11±0.60	2.32±0.12	4.20±0.57	0.44±0.02
D <sub>5</sub>	18.07±0.70	46.06±0.73	1.10±0.07	29.03±1.36	2.08±0.26	3.28±1.87	0.40±0.06
<b>Polarna frakcija</b>							
ND	14.13±0.33	10.39±0.25	11.02±0.12	14.39±0.36	2.68±0.05	35.97±0.18	11.43±0.25
D <sub>1</sub>	7.50±0.28	13.73±0.58	8.93±0.24	27.04±0.35	12.19±0.31	26.15±1.45	4.45±0.06
D <sub>2</sub>	6.84±0.07	15.21±0.38	9.15±0.15	31.23±0.35	12.18±0.62	20.24±0.80	5.15±0.23
D <sub>3</sub>	6.85±0.27	16.90±1.37	11.24±0.72	31.80±0.63	12.30±0.01	16.31±0.88	4.61±0.41
D <sub>4</sub>	7.90±0.26	12.75±0.57	14.99±0.42	26.21±0.59	6.73±0.38	26.06±0.85	5.36±0.14
D <sub>5</sub>	8.29±0.16	11.93±0.57	15.94±0.55	28.86±0.65	4.49±0.18	22.82±1.23	7.67±0.34

B)

Nepolarna frakcija	SFA	UFA	UFA/SFA	MUFA	PUFA
ND	28.57±0.76	71.43±0.76	2.51±0.09	56.35±0.51	15.08±0.26
D <sub>1</sub>	11.56±0.08	88.44±0.08	7.65±0.06	82.14±0.45	6.30±0.43
D <sub>2</sub>	10.86±0.22	89.14±0.22	8.22±0.18	87.22±0.27	1.93±0.04
D <sub>3</sub>	11.69±0.61	88.31±0.61	7.60±0.45	85.57±1.71	1.62±0.12
D <sub>4</sub>	17.07±0.59	82.93±0.59	4.87±0.21	78.29±0.74	4.64±0.59
D <sub>5</sub>	19.16±0.77	80.84±0.77	4.23±0.20	77.16±1.48	2.39±0.64
<b>Polarna frakcija</b>					
ND	25.15±0.43	74.85±0.43	2.98±0.07	27.45±0.45	47.40±0.09
D <sub>1</sub>	16.44±0.23	83.56±0.23	5.09±0.09	52.96±1.18	30.60±1.42
D <sub>2</sub>	15.99±0.17	84.01±0.17	5.26±0.07	58.62±1.18	25.39±1.02
D <sub>3</sub>	18.09±0.96	81.91±0.96	4.56±0.31	61.00±1.98	20.92±1.27
D <sub>4</sub>	22.89±0.56	77.11±0.56	3.37±0.11	45.69±1.38	31.42±0.82
D <sub>5</sub>	24.23±0.60	75.77±0.60	3.13±0.10	45.27±1.33	30.49±1.05

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ponavljanja ± standardna greška.

**Tabela 6.** Dvofaktorska analiza varijanse procentualnog udela pojedinačnih masnih kiselina u pulu masnih kiselina nepolarne i polarne frakcije (faktor F), ukupnih lipida nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih (faktor S), gusenica *O. nubilalis*

Masna kiselina		Frakcija (F)	Stanje (S)	F x S	Greška
<b>C16:0</b>	<b>Df</b>	1	5	5	24
	<b>MS</b>	477.87	130.1	24.78	0.53
	<b>F</b>	<b>901.47 ***</b>	<b>245.42 ***</b>	<b>46.76 ***</b>	
<b>C16:1n-7</b>	<b>Df</b>	1	5	5	24
	<b>MS</b>	10243.60	111.68	30.23	1.96
	<b>F</b>	<b>5233.76 ***</b>	<b>57.06 ***</b>	<b>15.44 ***</b>	
<b>C18:0</b>	<b>Df</b>	1	5	5	24
	<b>MS</b>	1142.15	15.75	10.64	0.27
	<b>F</b>	<b>4174.33 ***</b>	<b>57.55 ***</b>	<b>38.90 ***</b>	
<b>C18:1n-9</b>	<b>Df</b>	1	5	5	24
	<b>MS</b>	34.20	172.32	8.52	1.17
	<b>F</b>	<b>29.28 ***</b>	<b>147.55 ***</b>	<b>7.29 ***</b>	
<b>C18:1n-7</b>	<b>Df</b>	1	5	5	24
	<b>MS</b>	368.44	32.41	25.05	0.23
	<b>F</b>	<b>1600.54 ***</b>	<b>140.81 ***</b>	<b>108.83 ***</b>	
<b>C18:2n-6</b>	<b>Df</b>	1	5	5	24
	<b>MS</b>	3448.45	170.07	15.19	2.74
	<b>F</b>	<b>1258.72 ***</b>	<b>62.08 ***</b>	<b>5.54 **</b>	
<b>C18:3n-3</b>	<b>Df</b>	1	5	5	24
	<b>MS</b>	295.97	17.47	6.24	0.11
	<b>F</b>	<b>2723.22 ***</b>	<b>160.76 ***</b>	<b>57.42 ***</b>	

MS - srednja vrednost kvadrata (mean square, eng.), df - stepeni slobode (degree of freedom, eng.), F - faktor; \*\*\* -  $p < 0.001$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \* -  $p < 0.05$ , NS - nije statistički značajno.



**Tabela 7.** Dvofaktorska analiza varijanse procentualnog udela masnih kiselina u pulu masnih kiselina, prema zasićenosti: zasićene - SFA; nezasićene - UFA (mononezasićene - MUFA i polinezasićene - PUFA) u polarnoj i nepolarnoj frakciji (faktor F), ukupnih lipida nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih (faktor S), gusenica *O. nubilalis*

Parametri		Frakcija (F)	Stanje (S)	F x S	Greška
SFA	Df	1	5	5	24
	MS	0.61	2.451	0.057	0.003
	F	<b>206***</b>	<b>165.8***</b>	<b>19.4***</b>	
UFA	Df	1	5	5	24
	MS	0.0193	0.0268	0.003	0.0002
	F	<b>121***</b>	<b>169***</b>	<b>19***</b>	
UFA/SFA	Df	1	5	5	24
	MS	0.844	0.744	0.085	0.0044
	F	<b>191***</b>	<b>169***</b>	<b>19.2***</b>	
MUFA	Df	1	5	5	24
	MS	1.888	0.204	0.0104	0.018
	F	<b>104***</b>	<b>11.26***</b>	<b>0.57</b>	
PUFA	Df	1	5	5	24
	MS	32.53	1.185	0.537	0.144
	F	<b>225***</b>	<b>8.21***</b>	<b>3.72*</b>	

MS - srednja vrednost kvadrata (mean square, eng.), df - stepeni slobode (degree of freedom, eng.), F - faktor; \*\*\* -  $p < 0.001$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \* -  $p < 0.05$ , NS - nije statistički značajno.

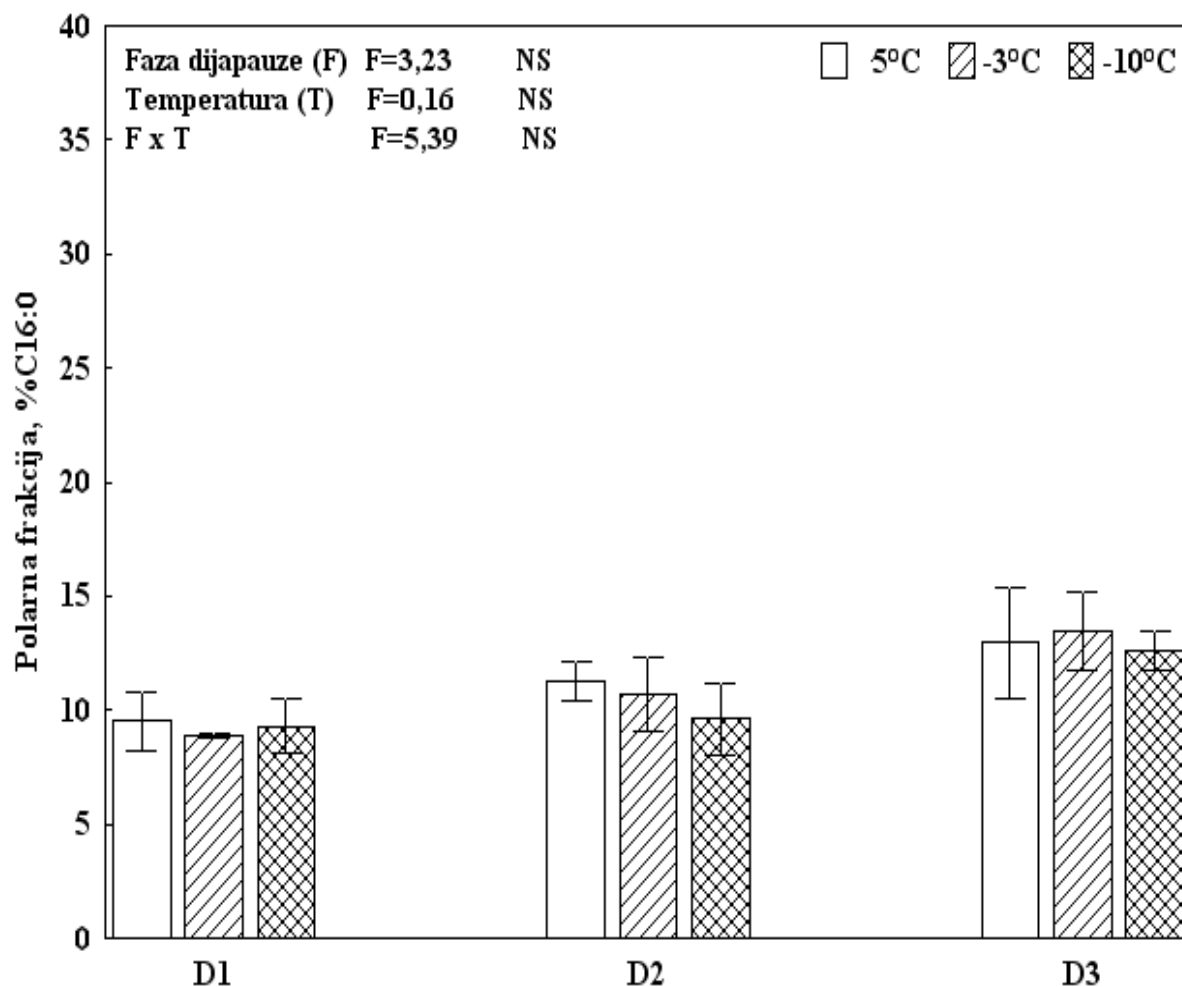
### **5.2.2. Sastav masnih kiselina polarne (strukturne) i nepolarne (rezervne) frakcije ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica tokom dijapauze, u uslovima hlađenja**

Kako bi potvrdili predstavljaju li promene u sastavu masnih kiselina deo programa dijapauze ili su pod direktnim uticajem temperature sredine tokom dijapauze, analizirali smo sastav masnih kiselina polarne (strukturne) i nepolarne (rezervne) frakcije ukupnih lipida celih gusenica *O. nubilalis* tokom različitih faza dijapauze (početak, sredina i kraj) u uslovima kontrolisanog hlađenja, do  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $5^{\circ}\text{C}$ ,  $-3^{\circ}\text{C}$  i  $-10^{\circ}\text{C}$ ).

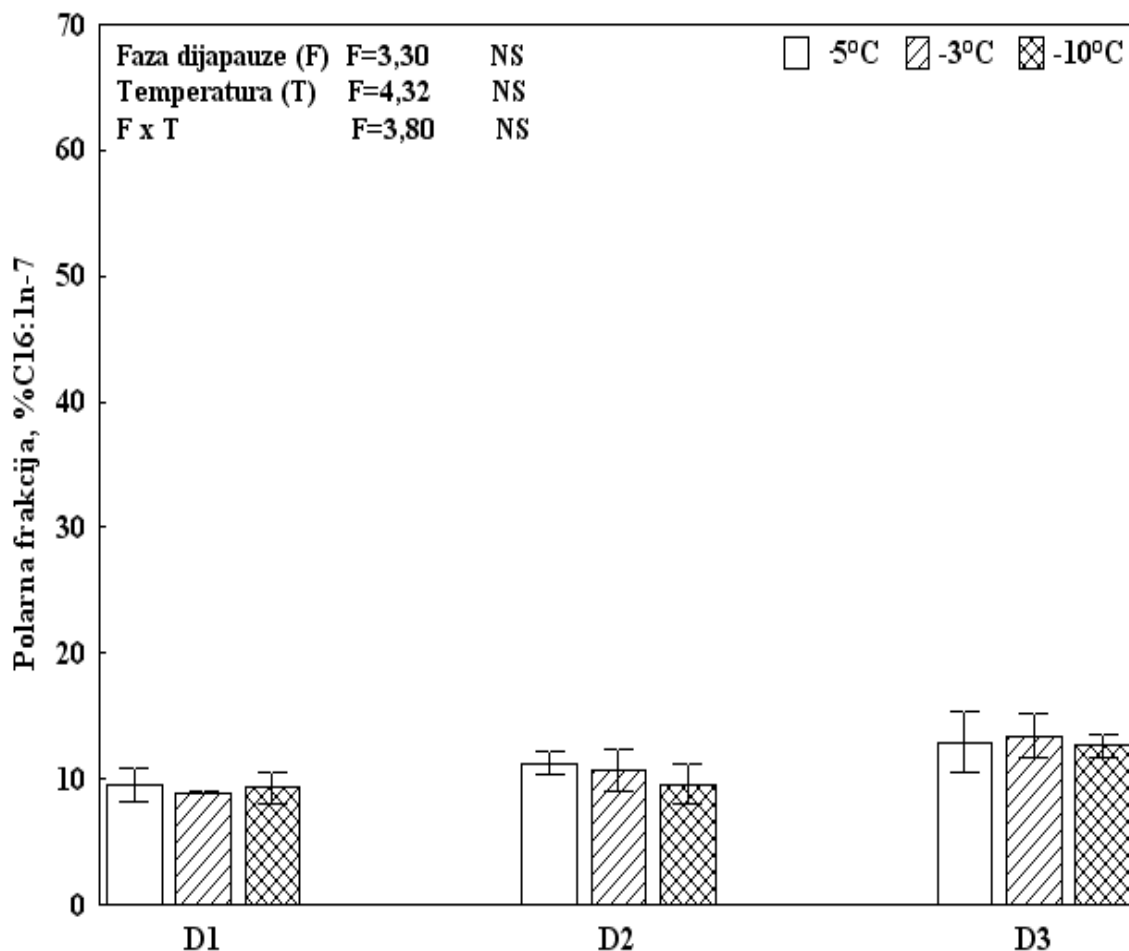
#### **5.2.2.1. Uticaj temperature na sastav masnih kiselina polarne frakcije**

Sastav masnih kiselina polarne frakcije ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom različitih faza dijapauze ( $D_1$  - početak,  $D_2$  - sredina i  $D_3$  - kraj) u uslovima izloženosti različitoj temperaturi ( $5^{\circ}\text{C}$ ,  $-3^{\circ}\text{C}$  i  $-10^{\circ}\text{C}$ ) prikazani su na Slikama 17-23. Statistički značajne razlike analizirane dvofaktorskom analizom varijanse, sa fazom dijapauze – F i temperaturom - T, kao faktorima, prikazane su na Slikama 17-23, dok su rezultati sumirani u Tabeli 8.

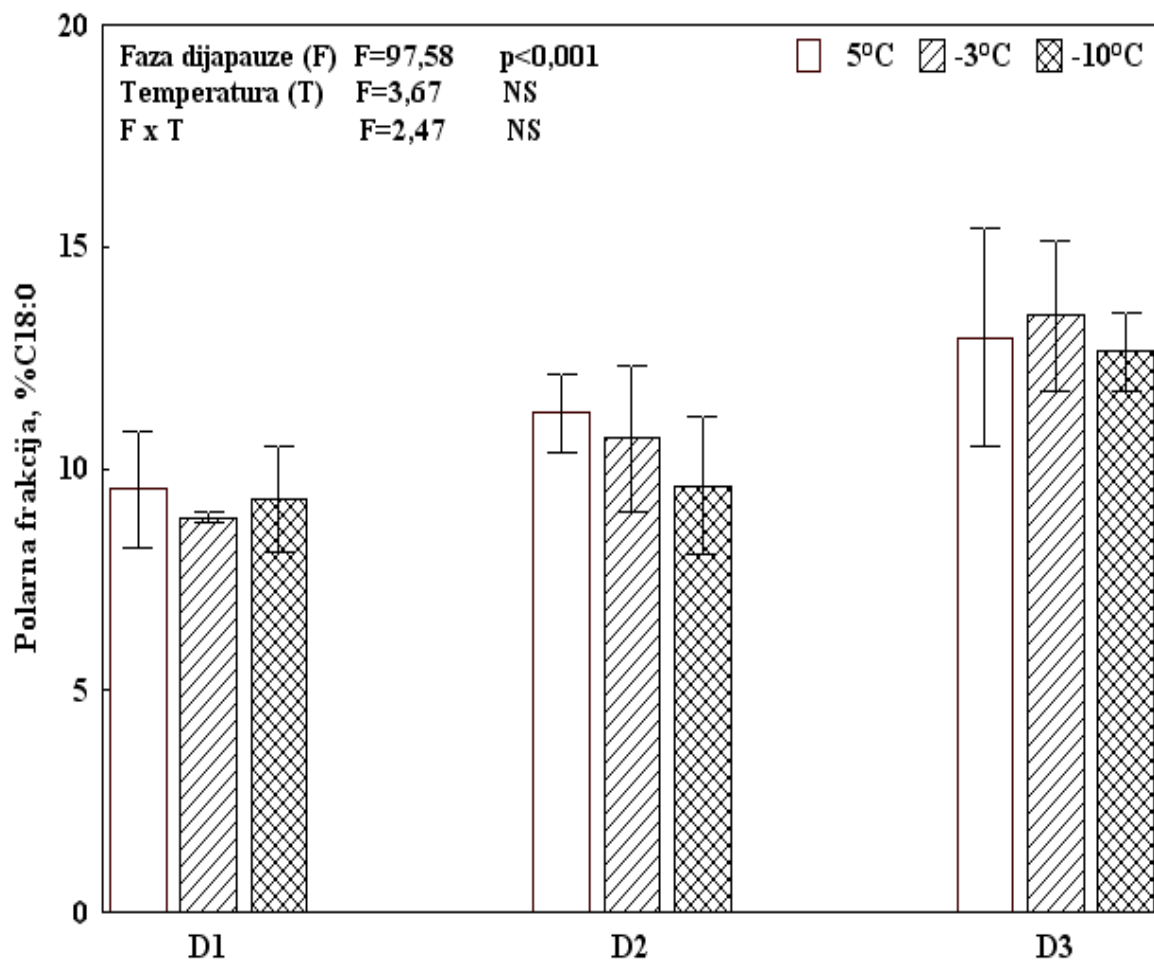
U polarnoj frakciji tokom dijapauze značajno se povećava udeo stearinske kiseline (C18:0) ( $p < 0.001$ ), Slika 19, Tabela 8), dok se udeo vakenske masne kiseline (C18:1n-7) smanjuje ( $p < 0.001$ ), Slika 21, Tabela 8). Rezultati generalno pokazuju da je sastav masnih kiselina promenljiv tokom dijapauze, a da spoljašnja temperatura u polarnoj frakciji jedino statistički značajno menja udeo vakenske (C18:1n-7) i linolne kiseline (C18:2n-6) (Slike 21 i 22, Tabela 8). Tokom svake faze dijapauze ( $D_1$  - početak,  $D_2$  - sredina i  $D_3$  - kraj) izlaganje niskoj temperaturi povećava sadržaj vakenske masne kiseline (C18:1n-7), pri čemu je najveći efekat temperature od  $-10^{\circ}\text{C}$  ( $p < 0.001$ ), Slika 21, Tabela 8). Izlaganje niskoj temperaturi povećava sadržaj i linolne masne kiseline (C18:2n-6) u ukupnom pulu masnih kiselina polarne frakcije ukupnih lipida, ali su promene zavisne od faze dijapauze ( $p > 0.001$ ), Slika 22, Tabela 8): na početku ( $D_1$ ) i na kraju dijapauze ( $D_3$ ) efekat ima temperatura od  $-3^{\circ}\text{C}$ , dok je u sredini dijapauze ( $D_2$ ) to  $-10^{\circ}\text{C}$ .



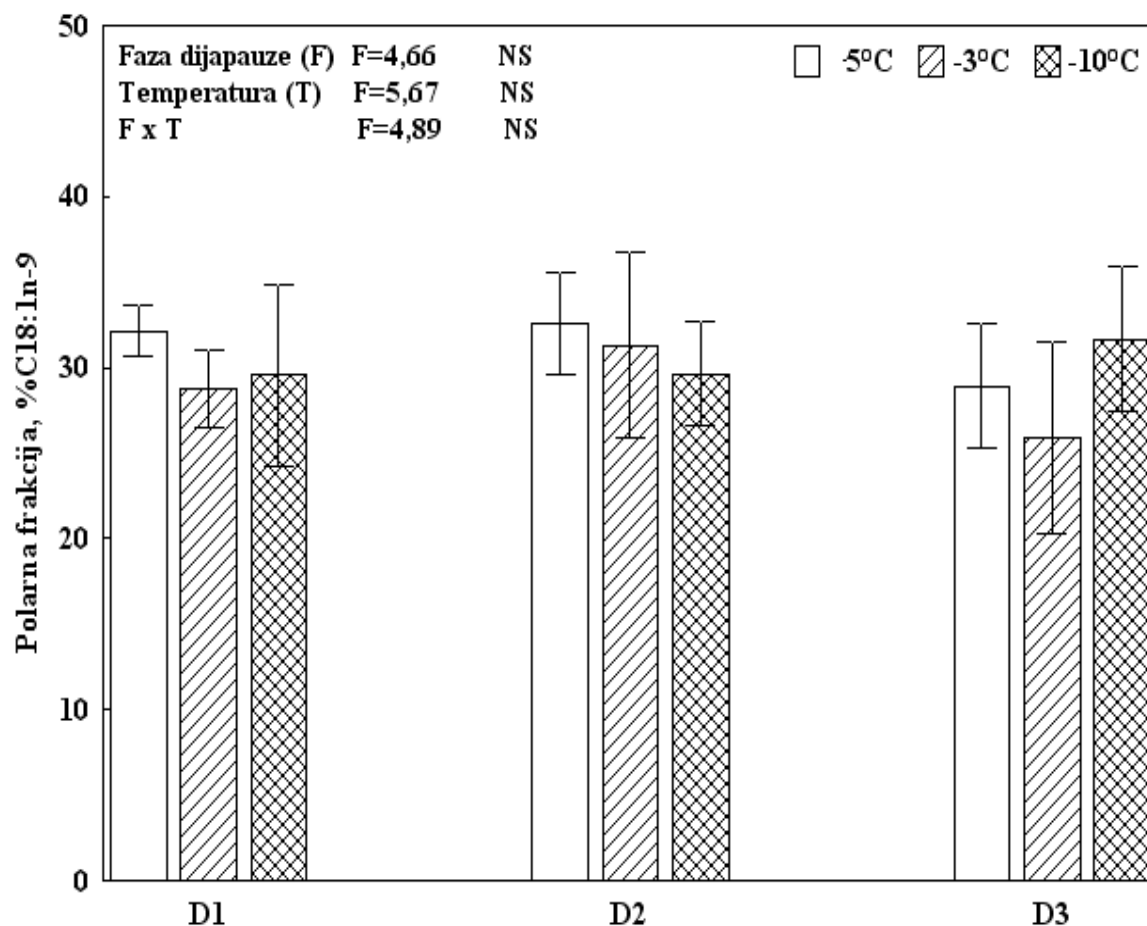
**Slika 17.** Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



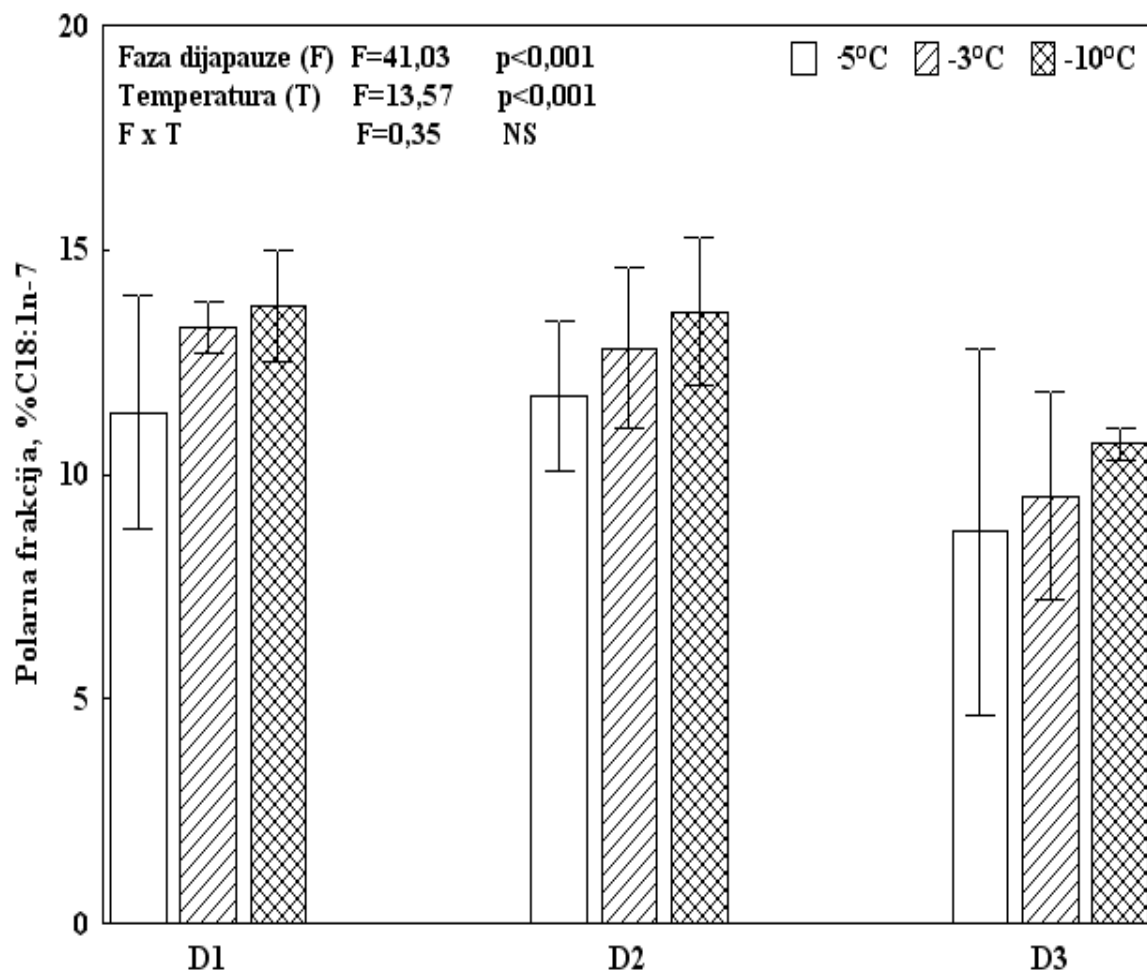
**Slika 18.** Relativni sadržaj palmitoleinske kiseline C16:1n-7, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



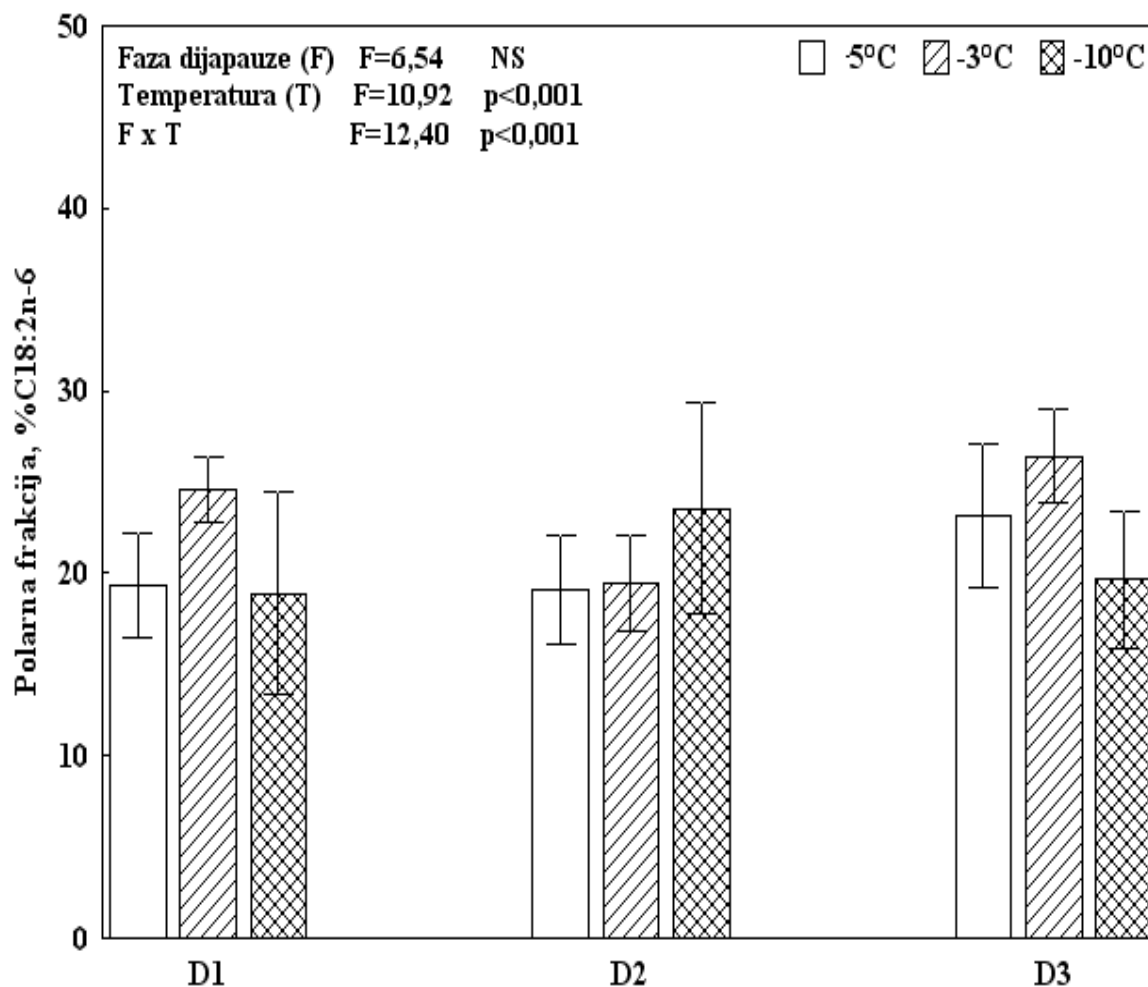
**Slika 19.** Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 20.** Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1n-9, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.

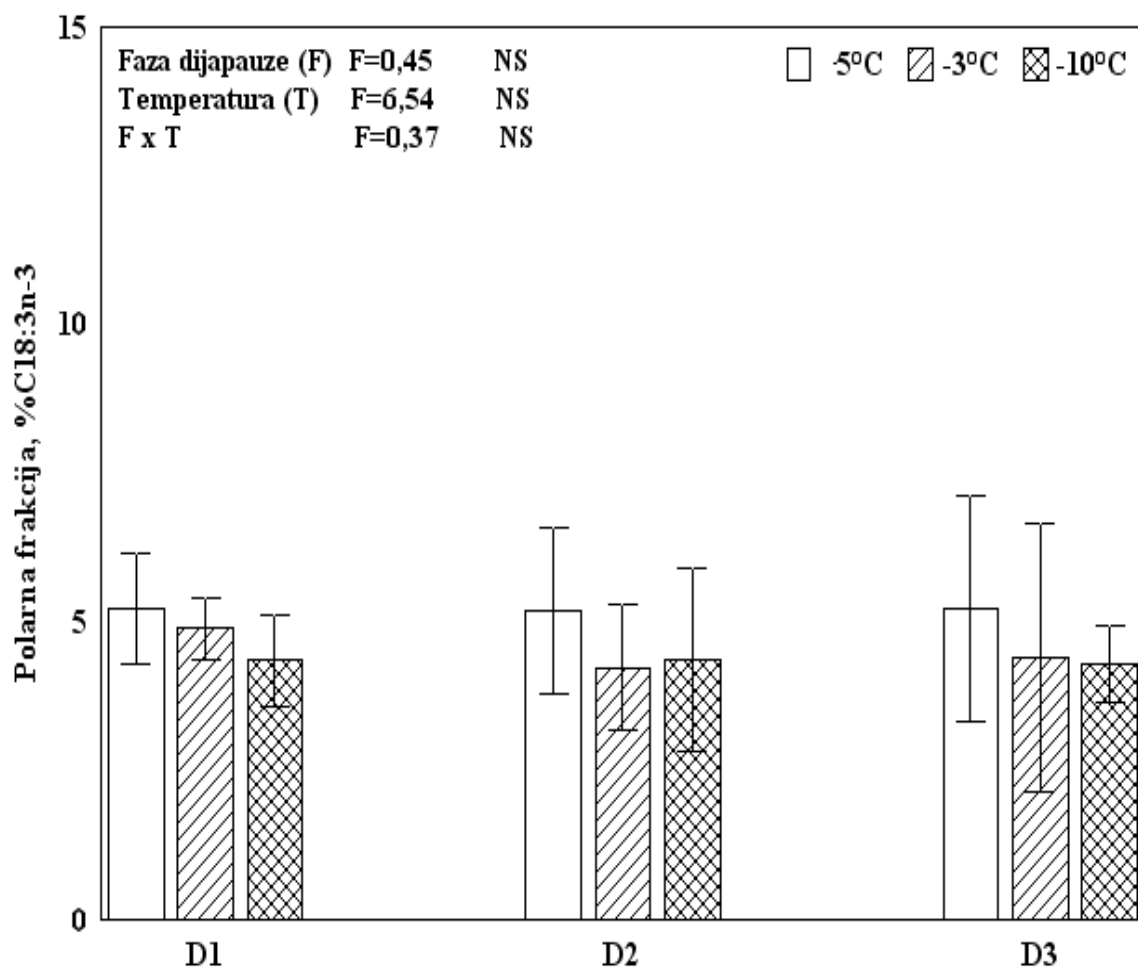


**Slika 21.** Relativni sadržaj vakerske kiseline C18:1n-7, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 22.** Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.





**Slika 23.** Relativni sadržaj  $\alpha$ -linolenske kiseline C18:3n-3, u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.

**Tabela 8.** Analiza relativne zastupljenosti pojedinačnih masnih kiselina u polarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izloženih kontrolisanoj temperaturi (5°C, -3°C i -10°C), tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), sa fazom dijapauze – F i temperaturom –T, kao faktorima.

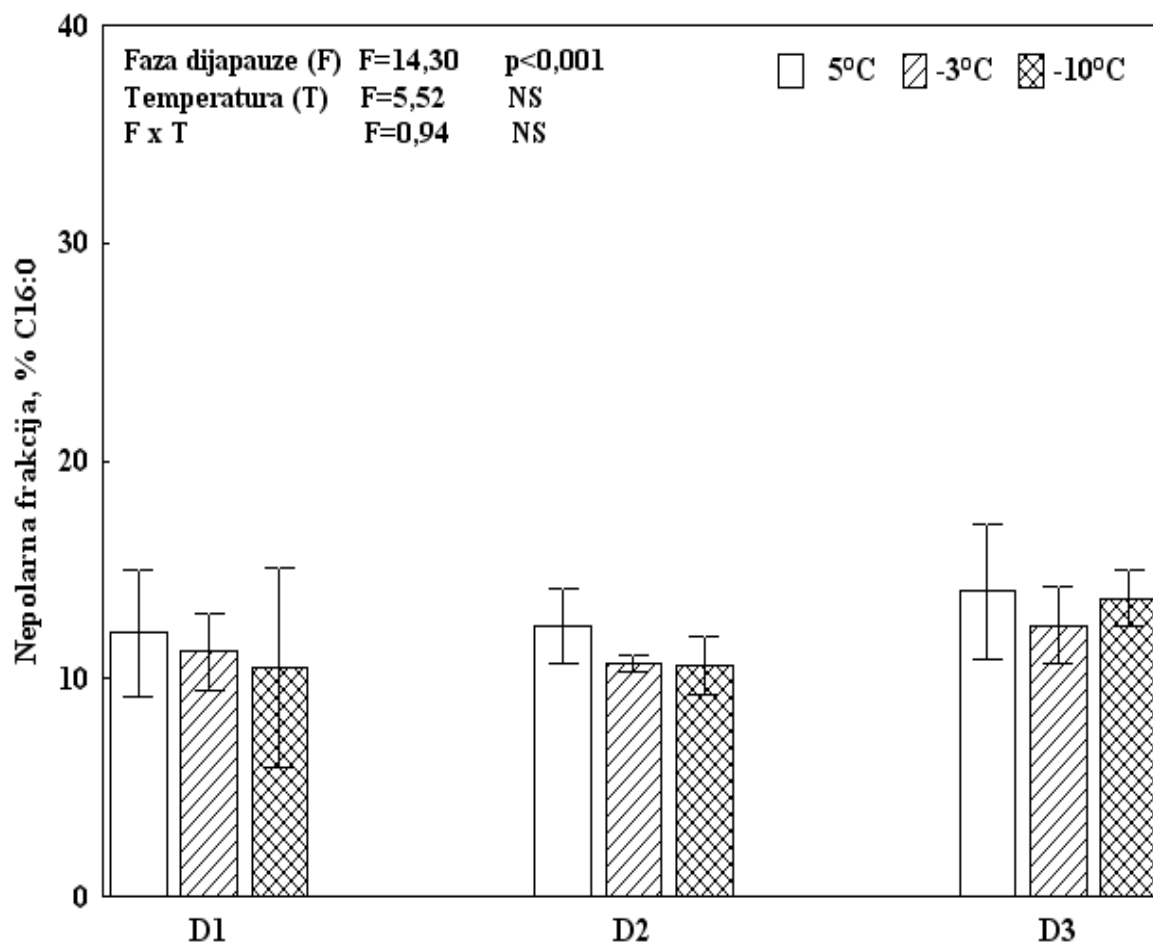
Masna kiselina		Faza (F)	Temperatura (T)	F x T	Greška
<b>C16:0</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	0,59	0,03	0,99	0,18
	<b>F</b>	<b>3,23 NS</b>	<b>0,16 NS</b>	<b>5,39 NS</b>	
<b>C16:1n-7</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	4,03	5,28	4,65	1,22
	<b>F</b>	<b>3,30 NS</b>	<b>4,32 NS</b>	<b>3,80 NS</b>	
<b>C18:0</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	32,93	1,24	0,83	0,34
	<b>F</b>	<b>97,58 ***</b>	<b>3,67 NS</b>	<b>2,47 NS</b>	
<b>C18:1n-9</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	12,27	14,95	12,89	2,63
	<b>F</b>	<b>4,66 NS</b>	<b>5,67 NS</b>	<b>4,89 NS</b>	
<b>C18:1n-7</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	29,32	9,70	0,25	0,71
	<b>F</b>	<b>41,03 ***</b>	<b>13,57 ***</b>	<b>0,35 NS</b>	
<b>C18:2n-6</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	15,04	25,13	28,54	2,30
	<b>F</b>	<b>6,54 NS</b>	<b>10,92 ***</b>	<b>12,40 ***</b>	
<b>C18:3n-3</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	0,13	1,93	0,11	0,29
	<b>F</b>	<b>0,45 NS</b>	<b>6,54 NS</b>	<b>0,37 NS</b>	

MS - srednja vrednost kvadrata (mean square, *eng.*), df - stepeni slobode (degree of freedom, *eng.*), F - faktor; \*\*\* - p<0.001, \*\* - p<0.01, \* - p<0.05, NS - nije statistički značajno.

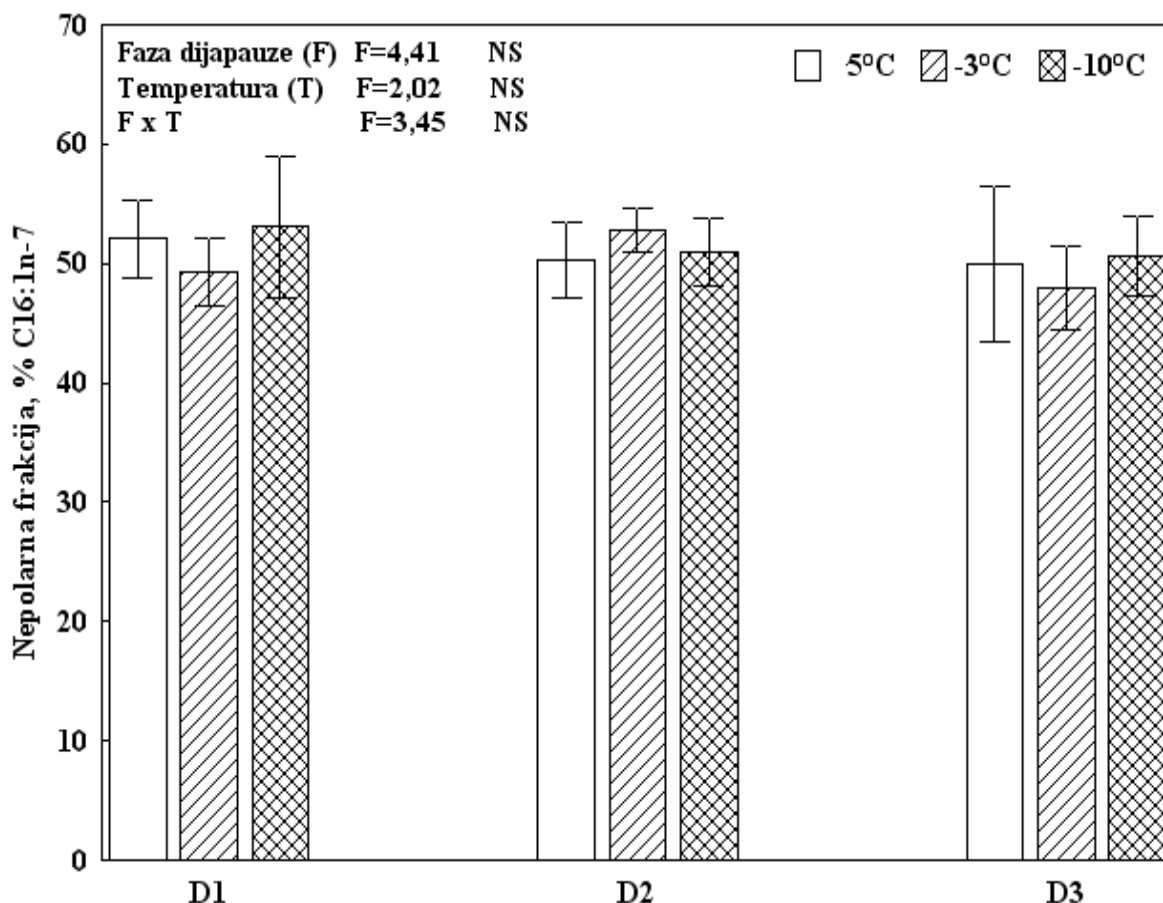
#### **5.2.2.2. Uticaj temperature na sastav masnih kiselina nepolarne frakcije**

Sastav masnih kiselina nepolarne frakcije ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj), u uslovima izloženosti različitoj temperaturi (5°C, -3°C i -10°C) prikazani su na Slikama 24-30. Statistički značajne razlike analizirane dvofaktorskom analizom varijanse, sa fazom dijapauze – F i temperaturom - T, kao faktorima, prikazane su na Slikama 24-30, dok su rezultati sumarno prikazani u Tabeli 9.

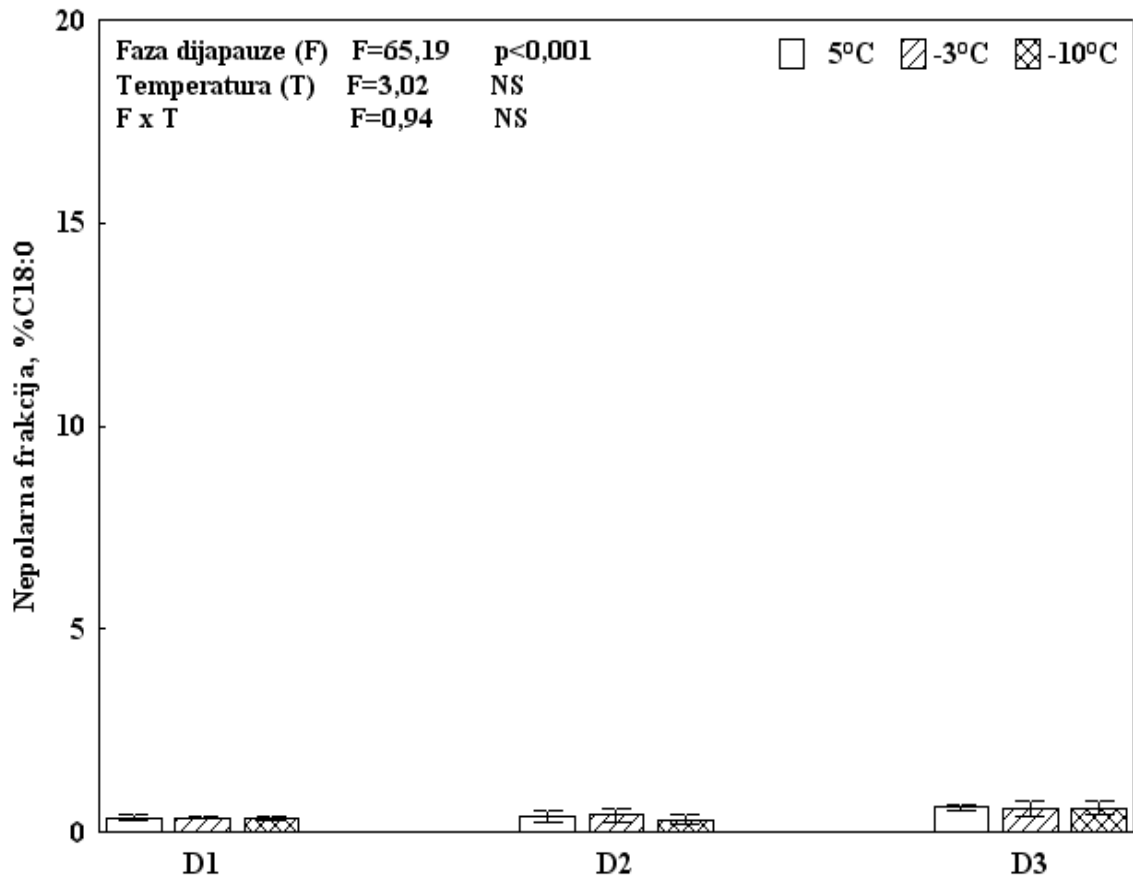
U nepolarnoj frakciji se povećava sadržaj palmitinske (C16:0) i stearinske kiseline (C18:0) na kraju dijapauze (p<0.001), Slike 24 i 26; Tabela 9). Izlaganje niskoj temperaturi tokom različitih faza dijapauze nije indukovalo dodatne promene u sadržaju masnih kiselina nepolarne frakcije ukupnih lipida celih gusenica *O. nubilalis* (Slike 24-30; Tabela 9).



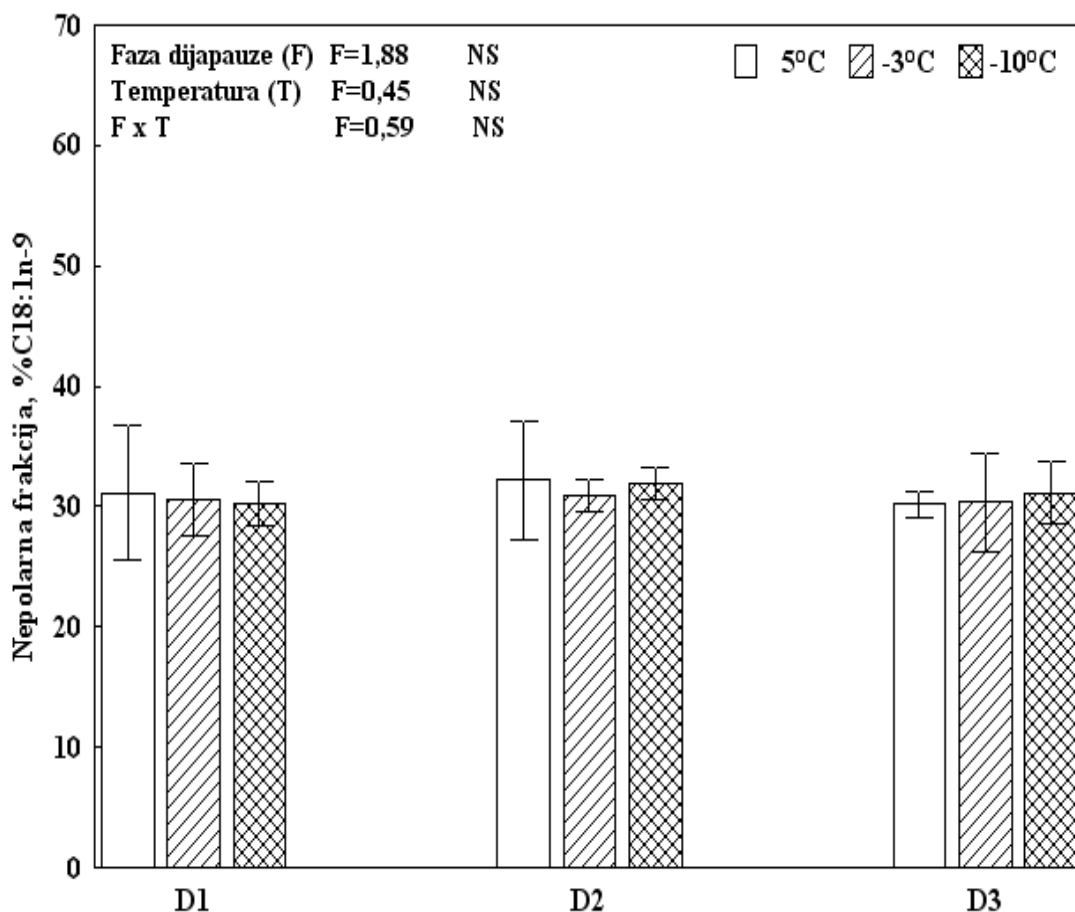
**Slika 24.** Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F – efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F – faktor.



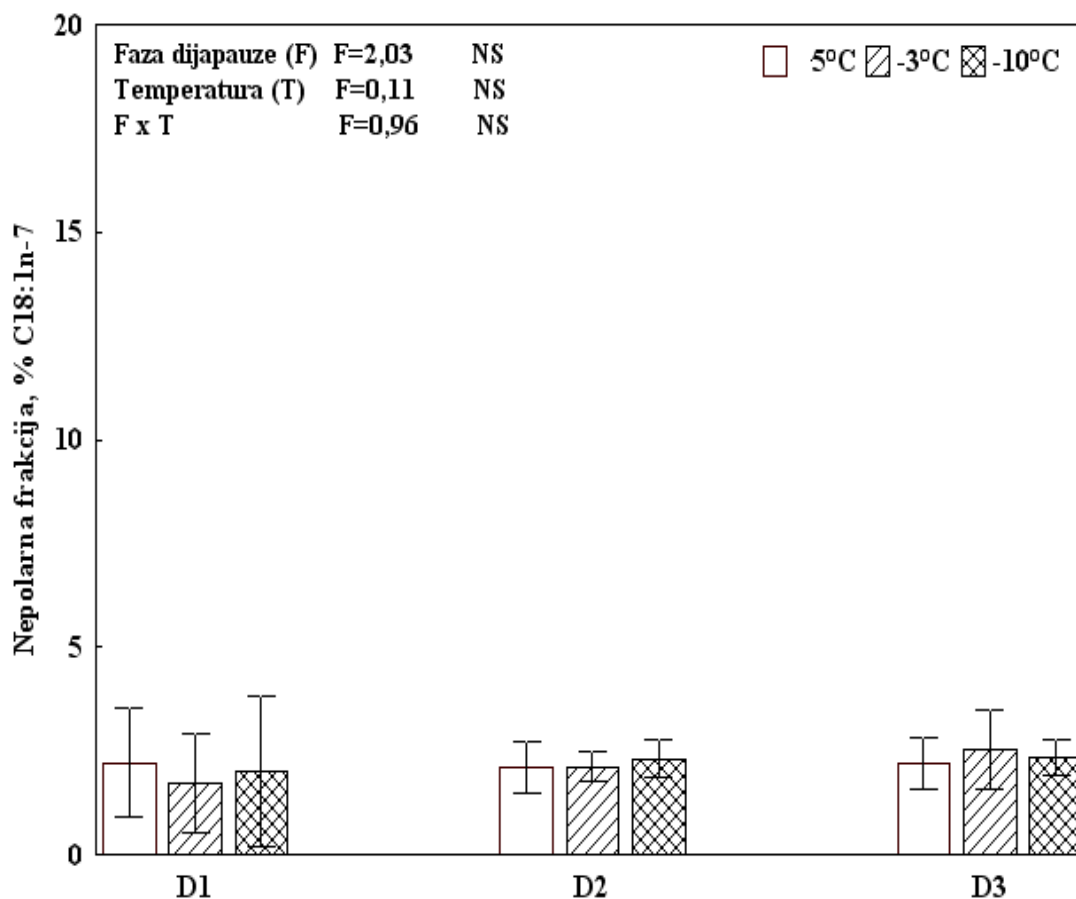
**Slika 25.** Relativni sadržaj palmitooleinske kiseline C16:1n-7, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F – efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 26.** Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F – efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.

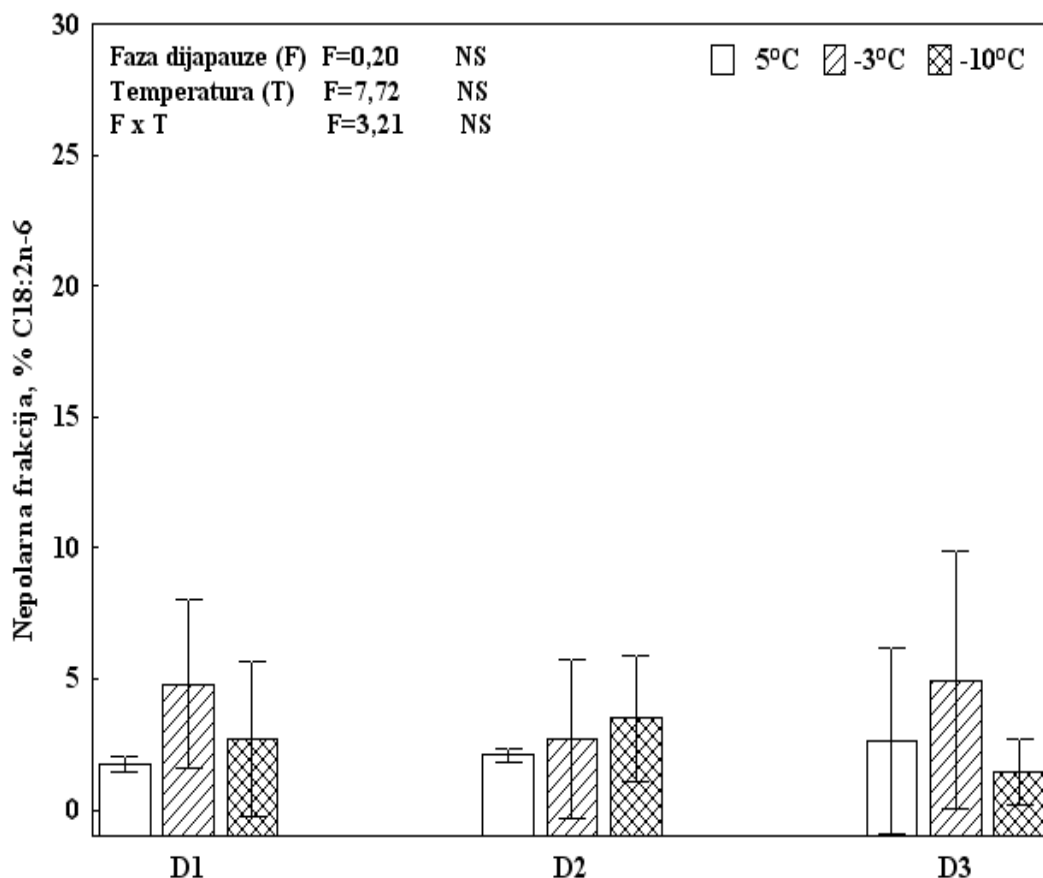


**Slika 27.** Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1n-9, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F – efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.

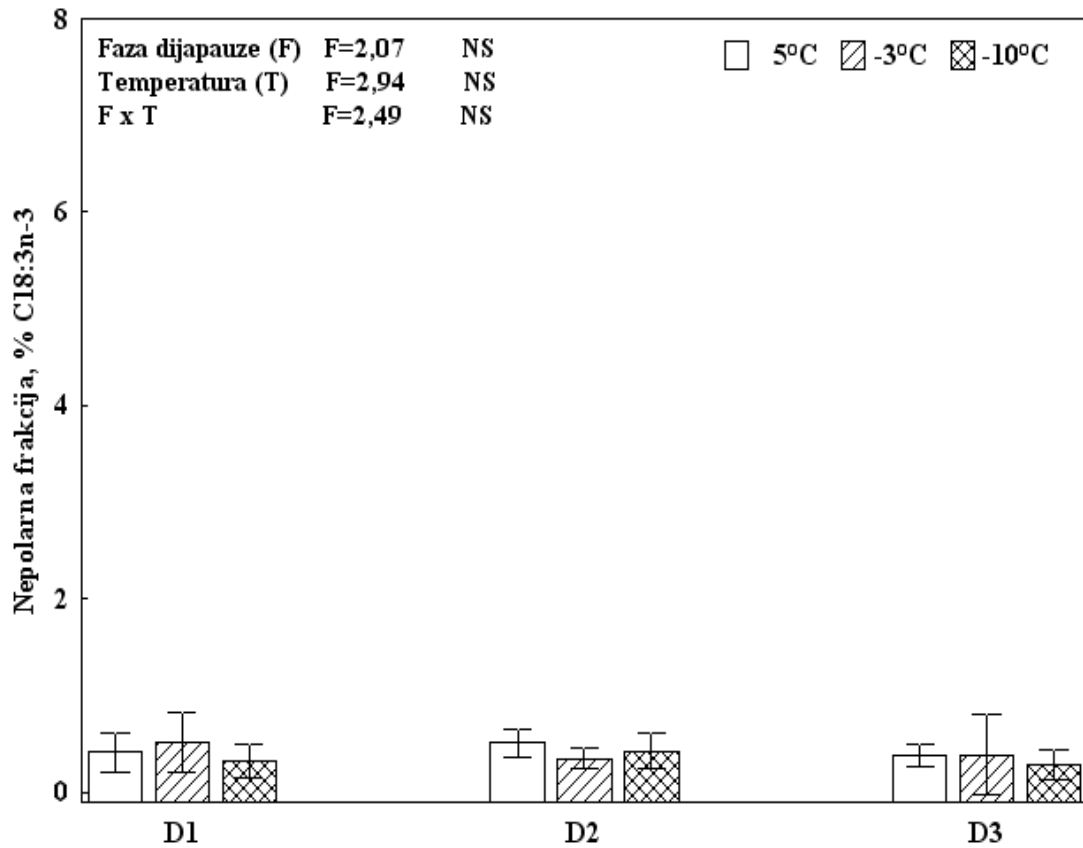


**Slika 28.** Relativni sadržaj vakenske kiseline C18:1n-7, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F – efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.





**Slika 29.** Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F – efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 30.** Relativni sadržaj  $\alpha$ -linolenske kiseline C18:3n-3, u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F – efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.

**Tabela 9.** Analiza relativne zastupljenosti pojedinačnih masnih kiselina u nepolarnoj frakciji ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izloženih kontrolisanoj temperaturi (5°C, -3°C i -10°C) tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), sa fazom dijapauze - F i temperaturom -T, kao faktorima.

Masna kiselina		Faza (F)	Temperatura (T)	F x T	Greška
<b>C16:0</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	13,49	5,21	0,89	0,94
	<b>F</b>	<b>14,30 ***</b>	<b>5,52 NS</b>	<b>0,94 NS</b>	
<b>C16:1n-7</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	11,11	5,08	8,71	2,52
	<b>F</b>	<b>4,41 NS</b>	<b>2,02 NS</b>	<b>3,45 NS</b>	
<b>C18:0</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	0,16	0,01	0,00	0,00
	<b>F</b>	<b>65,19 ***</b>	<b>3,02 NS</b>	<b>0,94 NS</b>	
<b>C18:1n-9</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	3,29	0,79	1,03	1,75
	<b>F</b>	<b>1,88 NS</b>	<b>0,45 NS</b>	<b>0,59 NS</b>	
<b>C18:1n-7</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	0,31	0,02	0,15	0,15
	<b>F</b>	<b>2,03 NS</b>	<b>0,11 NS</b>	<b>0,96 NS</b>	
<b>C18:2n-6</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	0,27	10,15	4,22	1,31
	<b>F</b>	<b>0,20 NS</b>	<b>7,72 NS</b>	<b>3,21 NS</b>	
<b>C18:3n-3</b>	<b>Df</b>	2	2	4	18
	<b>MS</b>	0,02	0,02	0,02	0,01
	<b>F</b>	<b>2,07 NS</b>	<b>2,94 NS</b>	<b>2,49 NS</b>	

MS - srednja vrednost kvadrata (mean square, *eng.*), df - stepeni slobode (degree of freedom, *eng.*), F - faktor; \*\*\* - p<0.001, \*\* - p<0.01, \* - p<0.05, NS - nije statistički značajno.

### **5.3. Analiza lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih gusenica *Ostrinia nubilalis***

U cilju ispitivanja uloge pojedinih tkiva u metabolizmu lipida sa aspekta dijabauze i otpornosti na niske temperature, analizirali smo lipide hemolimfe i masnog tela gusenica *O. nubilalis*. Odredili smo prisustvo pojedinih klasa lipida u hemolimfi i masnom telu i analizirali sastav masnih kiselina ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih gusenica tokom dijabauze, kao i dijabauzirajućih gusenica izloženih kontrolisanim temperaturama.

#### **5.3.1. Klase lipida hemolimfe i masnog tela**

Analizom ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela gusenica *O. nubilalis*, detektovane su sledeće frakcije: polarni lipidi (PL), diacilgliceroli (DAG), steroli (ST), slobodne masne kiseline (FFA), triacilgliceroli (TAG) i frakcija ugljovodonika (H) (Tabela 10).

Utvrđeno je da postoji kvalitativna i kvantitativna razlika između nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih gusenica (Tabela 10). U hemolimfi, relativni procenat diacilglicerola i slobodnih masnih kiselina je značajno manji kod dijabauzirajućih gusenica tokom svih faza dijabauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj), nego kod nedijapauzirajućih gusenica (ND), dok je sadržaj triacilglicerola značajno veći kod dijabauzirajućih gusenica početkom i sredinom dijabauze (D<sub>1</sub> i D<sub>2</sub>) od nedijapauzirajućih gusenica (Tabela 10.). Krajem dijabauze (D<sub>3</sub>), uočeno je značajno smanjenje sadržaja triacilglicerola (Tabela 10). Iako je udeo sterola i polarnih lipida u hemolimfi značajan, razlika u njihovom sadržaju kako između nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih gusenica tako i tokom dijabauze, nije značajna (Tabela 10).

U masnom telu dominantnu frakciju lipida čini frakcija triacilglicerola, kako kod nedijapauzirajućih tako i kod dijabauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (Tabela 10). Kod dijabauzirajućih gusenica nisu detektovane slobodne masne kiseline i ugljovodonici, dok je kod nedijapauzirajućih gusenica utvrđeno prisustvo slobodnih masnih kiselina, ali ne i ugljovodonika (Tabela 10).

**Tabela 10.** Sastav ukupnih lipida (procentualni udeo razdvojenih frakcija) hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijavauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijavauze (D<sub>1</sub>- početak, D<sub>2</sub>- sredina i D<sub>3</sub>- kraj)

<b>Hemolimfa</b>					
	<b>ND</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>ANOVA</b>
<b>% PL</b>	16.24±0.29 <sup>a</sup>	18.77±0.99 <sup>a</sup>	23.47±1.43 <sup>b</sup>	22.47±0.38 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0.05
<b>% DAG</b>	17.83±0.11 <sup>a</sup>	13.60±0.78 <sup>b</sup>	14.10±1.10 <sup>b</sup>	14.40±0.99 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0.05
<b>% ST</b>	27.66±2.94	24.70±1.30	26.43±1.24	27.30±1.10	NS
<b>% FFA</b>	12.34±1.76 <sup>a</sup>	5.37±0.72 <sup>b</sup>	2.40±0.45 <sup>b</sup>	3.20±0.42 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0.01
<b>% TAG</b>	8.31±1.44 <sup>a</sup>	21.37±6.63 <sup>b</sup>	11.97±1.10 <sup>b</sup>	7.20±1.53 <sup>c</sup>	<i>p</i> < 0.05
<b>% H</b>	17.62±1.18	21.17±3.24	20.73±2.40	24.37±1.17	NS

<b>Masno telo</b>					
	<b>ND</b>	<b>D1</b>	<b>D2</b>	<b>D3</b>	<b>ANOVA</b>
<b>% PL</b>	4.97±0.55	4.63±0.34	5.30±0.11	3.50±0.29	NS
<b>% DAG</b>	1.90±0.18 <sup>a</sup>	1.53±0.57 <sup>a</sup>	0.30±0.06 <sup>b</sup>	1.2±0.06 <sup>a</sup>	<i>p</i> < 0.05
<b>% ST</b>	3.81±0.09 <sup>a</sup>	2.90±0.60 <sup>a</sup>	1.40±0.00 <sup>b</sup>	1.40±0.46 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0.05
<b>% FFA</b>	3.20±0.24	nd	nd	nd	/
<b>% TAG</b>	86.12±1.01 <sup>a</sup>	90.07±1.42 <sup>b</sup>	92.47±0.53 <sup>b</sup>	89.97±0.64 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0.05
<b>% H</b>	nd	nd	nd	nd	/

Rezultati predstavljaju srednje vrednosti 3 ponavljanja ± standardna greška, u pulu hemolimfe i masnog tela od 5 gusenica. Frakcije lipida: PL - polarni lipidi, DAG - diacilgliceroli, ST - steroli, FFA - slobodne masne kiseline, TAG - triacilgliceroli, H - ugljovodoni. nd - nije detektovano. Različita slova u indeksu (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa, dobijenu Tukey`'s HSD post hoc testom, dok ista slova ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike između grupa (*p* ≥ 0.05). Nivoi značajnosti između grupa su: \*\*\* *p* < 0.001, \*\* *p* < 0.01 i \* *p* < 0.05. NS - nije statistički značajna razlika.

### 5.3.2. Masne kiseline ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih gusenica tokom dijabauze

U cilju razumevanja uloge lipida u dijabauzi kukuruznog plamenca *O. nubilalis* i otpornosti na hladnoću, analiziran je sadržaj masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijabauzirajućih gusenica tokom dijabauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani na Slikama 31-40. Relativni udeo svake masne kiseline u ukupnim lipidima i odnos zasićenih (SFA), mononezasićenih (MUFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) prikazan je u Tabeli 11.

Kvalitativno, sastav masnih kiselina oba tkiva, hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih gusenica tokom različitih faza dijabauze je sličan, sačinjen od 7 masnih kiselina sa 16 i 18 ugljenikovih atoma: palmitinske (C16:0), palmitooleinske (C16:1n-7), stearinske (C18:0), oleinske (C18:1n-9), vakenske (C18:1n-7), linolne (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenske (C18:3n-3) kiseline (Slika 31 A i B; Tabela 11). Najzastupljenije masne kiseline ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela su palmitinska (C16:0), palmitooleinska (C16:1n-7) i oleinska (C18:1n-9) kiselina (Slika 31 A i B; Tabela 11). Tako, u hemolimfi one čine više od 65% masnih kiselina ukupnih lipida nedijapauzirajućih i 80% dijabauzirajućih gusenica tokom svih faza dijabauze (Slika 31 A; Tabela 11). Palmitooleinska (C16:1n-7) i oleinska kiselina (C18:1n-9) su dominantne komponente pula masnih kiselina hemolimfe dijabauzirajućih gusenica, tokom svih faza dijabauze (Slika 31 A; Tabela 11), a kod nedijapauzirajućih gusenica u značajnom procentu je prisutna i linolna kiselina (C18:2n-6) sa 19.30%. Ostale masne kiseline, stearinska (C18:0), vakenska (C18:1n-7), linolna (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenska masna kiselina (C18:3n-3) su zastupljene sa manje od 7% u ukupnim lipidima hemolimfe (Slika 31 A; Tabela 11).

U masnom telu, najzastupljenije masne kiseline ukupnih lipida su palmitinska (C16:0), palmitooleinska (C16:1n-7) i oleinska (C18:1n-9) i zajedno čine 80% pula masnih kiselina nedijapauzirajućih i više od 90% pula masnih kiselina dijabauzirajućih gusenica (Slika 31 B; Tabela 11). Palmitooleinska masna kiselina (C16:1n-7) je dominantna komponenta ukupnih lipida masnog tela, kako nedijapauzirajućih tako i dijabauzirajućih gusenica, čineći više od 50% svih masnih kiselina ukupnih lipida dijabauzirajućih gusenica (Slika 31 B; Tabela 11). Linolna (C18:2n-6), vakenska (C18:1n-7), stearinska (C18:0) i  $\alpha$ -linolenska kiselina (C18:3n-3) su značajno manje prisutne (<7%) i u masnom telu, osim linolne (C18:2n-6) kod nedijapauzirajućih gusenica čineći 15.84% pula masnih kiselina ukupnih lipida masnog tela

(Slika 31 B; Tabela 11) dok je  $\alpha$ -linolenska masna kiselina (C18:3n-3) kod dijapauzirajućih gusenica zastupljena samo u tragovima (<0.5%) (Slika 31 B; Tabela 11).

Statistička značajnost razlika u sadržaju pojedinačnih masnih kiselina hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom različitih faza dijapauze, prikazane su na Slikama 32-38, dok su rezultati sumarno prikazani u Tabeli 12. Iako je sastav masnih kiselina ispitivanih tkiva, hemolimfe i masnog tela, kvalitativno sličan, postoji statistički značajna razlika u relativnom sadržaju pojedinačnih masnih kiselina, kako između analiziranih tkiva, tako i između nedijapauzirajuće i dijapauzirajuće grupe gusenica (Slike 32-38; Tabela 12).

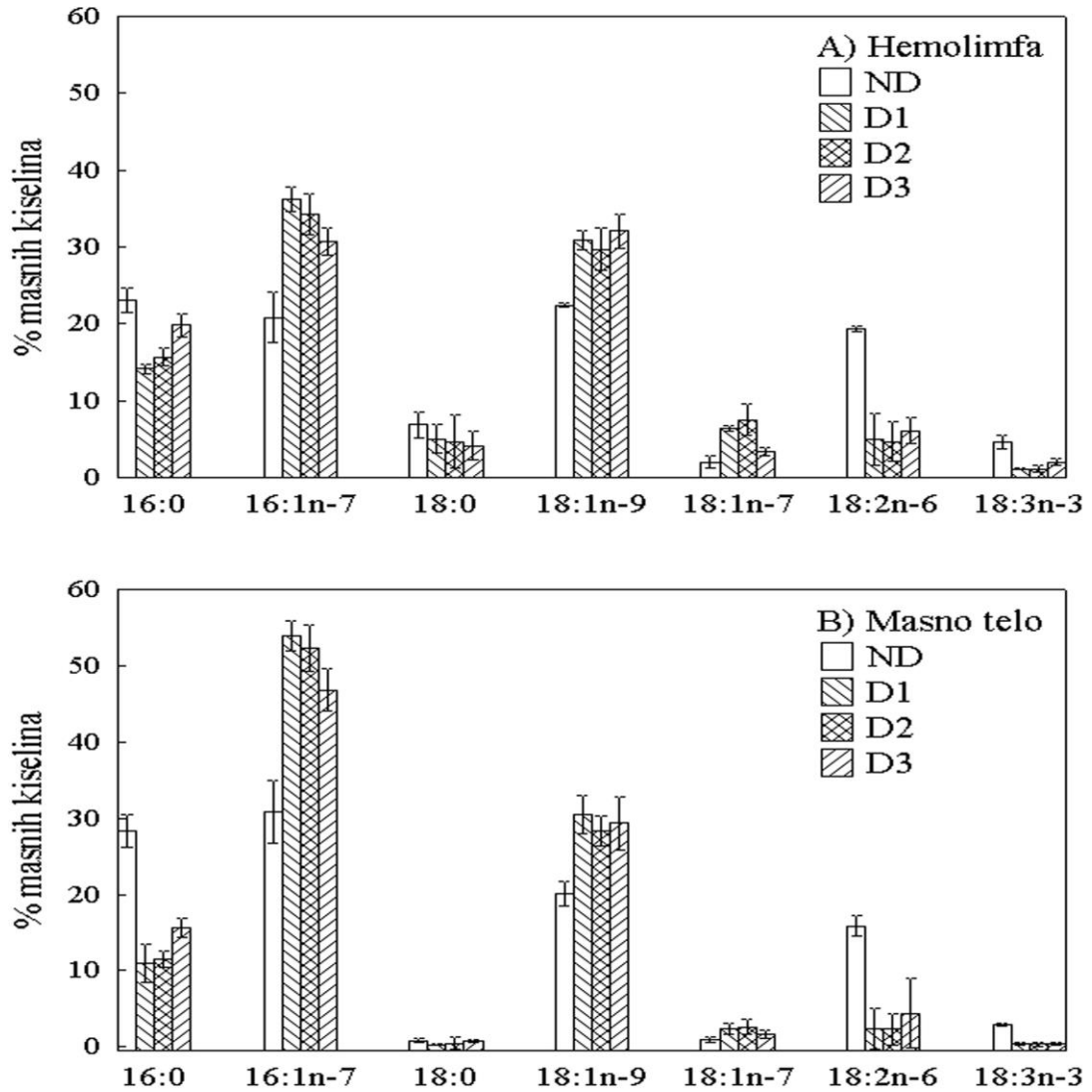
Tako je utvrđeno da su sve detektovane masne kiseline statistički značajno više zastupljene u hemolimfi u odnosu na masno telo, izuzev palmitoleinske kiseline (C16:1n-7) i palmitinske kiseline (C16:0), ali samo u nedijapauzirajućoj grupi gusenica (Slike 32 i 33; Tabela 12). Sadržaj palmitoleinske kiseline (C16:1n-7) je višestruko veći u masnom telu u odnosu na hemolimfu kod obe grupe, nedijapauzirajuće i dijapauzirajuće grupe gusenica *O. nubilalis* (Slika 33; Tabela 12).

Promene u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela prema stepenu nezasićenosti prikazane su na Slici 39 A i B; i Tabelama 11 i 13). Statistička analiza je pokazala da u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice, dijapauzirajuće gusenice tokom svih faza dijapauze imaju značajno veći stepen nezasićenosti masnih kiselina koji je izražen preko odnosa ukupnih nezasićenih i ukupnih zasićenih masnih kiselina (UFA/SFA) ( $p > 0.001$ ; Tabela 13), pri čemu je taj odnos višestruko veći u masnom telu nego u hemolimfi. Statistički značajno povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina u oba tkiva početkom dijapauze (D<sub>1</sub>) u odnosu na nedijapauzu, rezultat je značajnog povećanja sadržaja svih mononezasićenih masnih kiselina (MUFA): palmitoleinske (C16:1n-7), oleinske (C18:1n-9) i vakenske (C18:1n-7), uz istovremeno smanjenje sadržaja zasićenih (SFA), palmitinske (C16:0) i stearinske (C18:0), dok su polinezasićene masne kiseline (PUFA), linolna (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenska (C18:3n-3) takođe smanjene (Slike 32-38; Tabele 12 i 13).

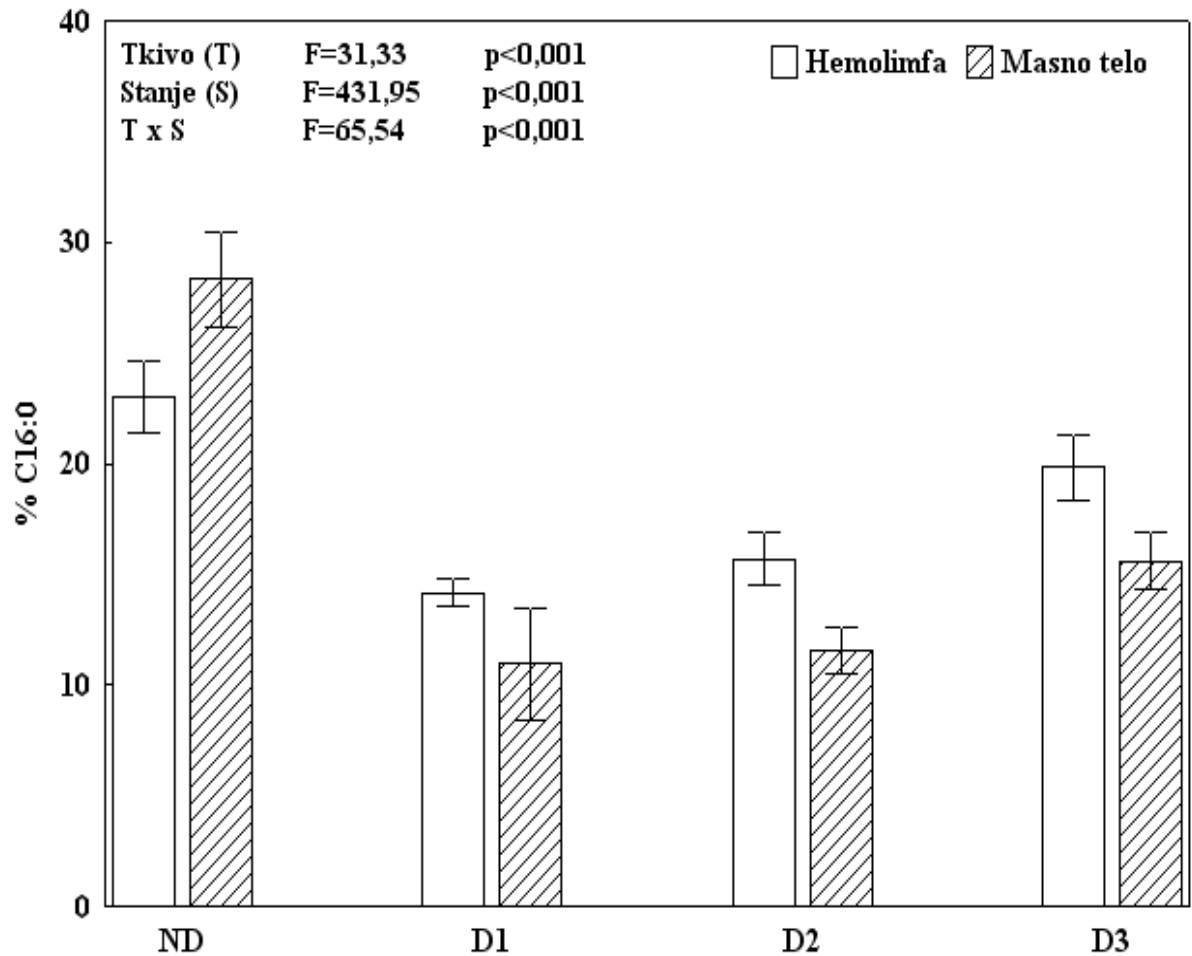
Kako bi procenili da li detektovane promene u sastavu masnih kiselina, predstavljaju potvrđeni trend promena u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub>- početka, D<sub>2</sub>- sredine i D<sub>3</sub>- kraja), dobijeni rezultati su analizirani po glavnim komponentama (PCA) (Slika 40. A i B). Prve dve glavne komponente PC1 i PC2, opisuju

89,9% varijabilnosti unutar grupa, na osnovu promena u sastavu masnih kiselina tkiva, hemolimfe i masnog tela. Prva glavna komponenta (PC1), opisuje najveći deo ukupne varijabilnosti (63,17%), dok druga glavna komponenta (PC2) opisuje preostali, manji deo ukupne varijabilnosti (26,80%) (Slika 40. A i B). PC1 je u pozitivnoj korelaciji sa palmitooleinskom (C16:1n-7), oleinskom (C18:1n-9) i vakenskom masnom kiselinom (C18:1n-7) u poređenju sa negativnom korelacijom sa palmitinskom (C16:0), stearinskom (C18:0), linolnom (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenskom masnom kiselinom (C18:3n-3) (Slika 40. A). Položaj pojedinačnih vrednosti u prostoru definisanom PC1, grupiše ih na osnovu fiziološkog stanja, odnosno na osnovu toga da li su gusenice u stanju dijapauze ili nedijapauze, obzirom da razdvaja dijapauzirajuće (pozitivne vrednosti) od nedijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (negativne vrednosti) (Slika 40. B). PC2 iako manje značajno, objašnjava 26,80% od ukupne varijabilnosti, razdvaja rezultate na osnovu varijabilnosti unutar analiziranih tkiva, uzorke hemolimfe od uzoraka masnog tela (Slika 40 B). PC2 je u pozitivnoj korelaciji sa palmitooleinskom (C16:1n-7), dok je u negativnoj korelaciji sa stearinskom (C18:0), vakenskom (C18:1n-7) i oleinskom kiselinom (C18:1n-9) (Slika 40 A). Dobijene vrednosti za PC1 su značajno veće kod dijapauzirajućih nego kod nedijapauzirajućih gusenica, dok su vrednosti za PC2 značajno veće u masnom telu nego u hemolimfi (Slika 40 A, B). Na Slici 40 A je veoma jasno izraženo grupisanje mononezasićenih masnih kiselina (MUFA) sa jedne strane, a zasićenih (SFA) i polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) sa druge strane glavne komponente PC1, što se vidi u izraženom, na suprotnim stranama, grupisanju uzoraka dijapauzirajućih gusenica tokom različitih faza (D<sub>1</sub>- početka, D<sub>2</sub>- sredine i D<sub>3</sub>-kraja) dijapauze i nedijapauzirajućih gusenica (ND).

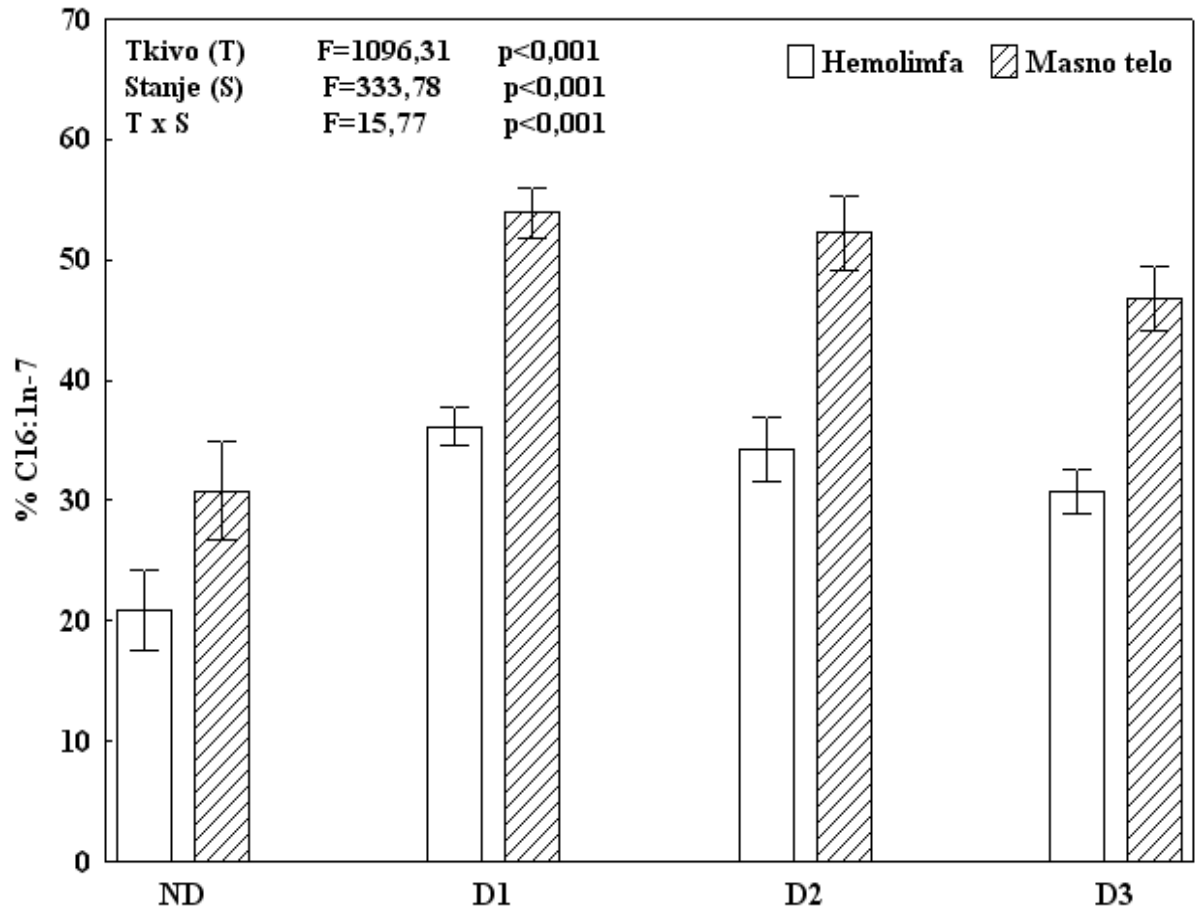




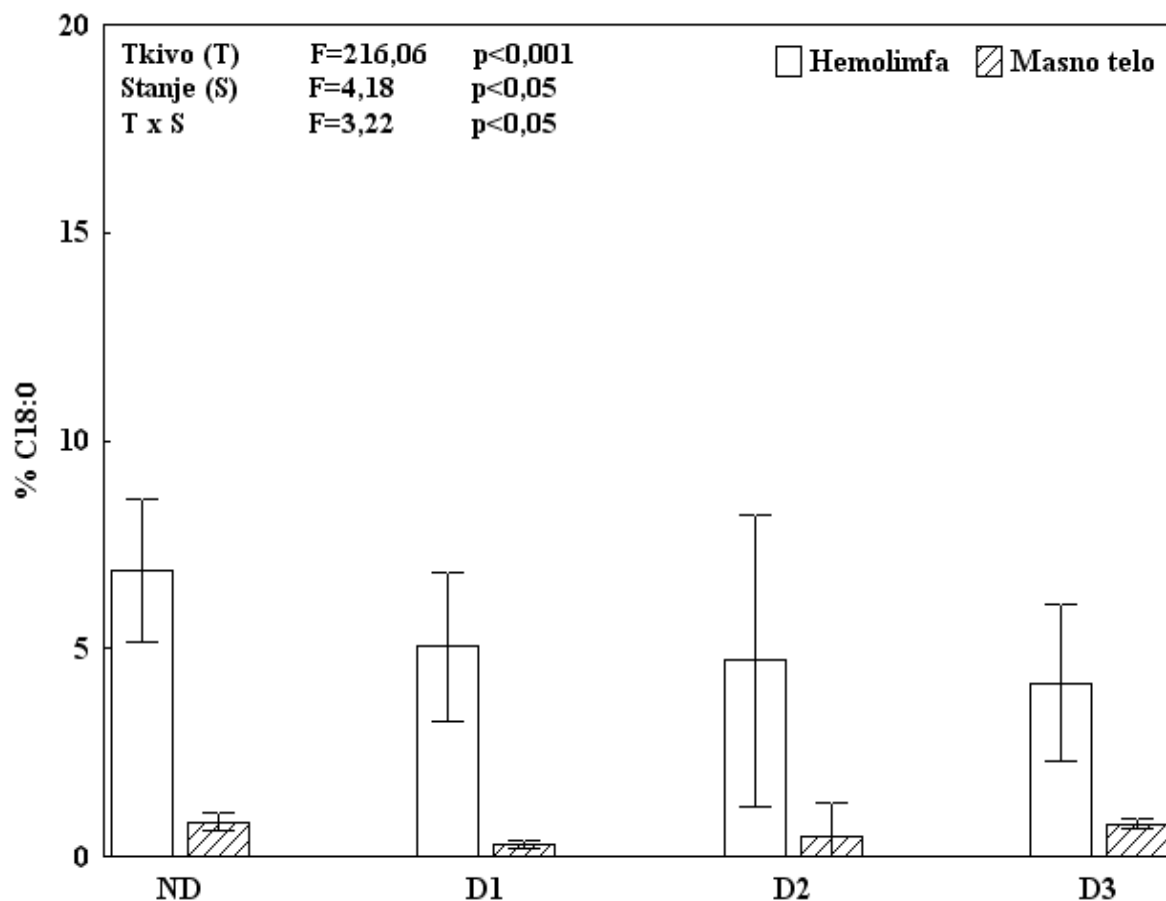
**Slika 31. A i B** Sastav masnih kiselina hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj).



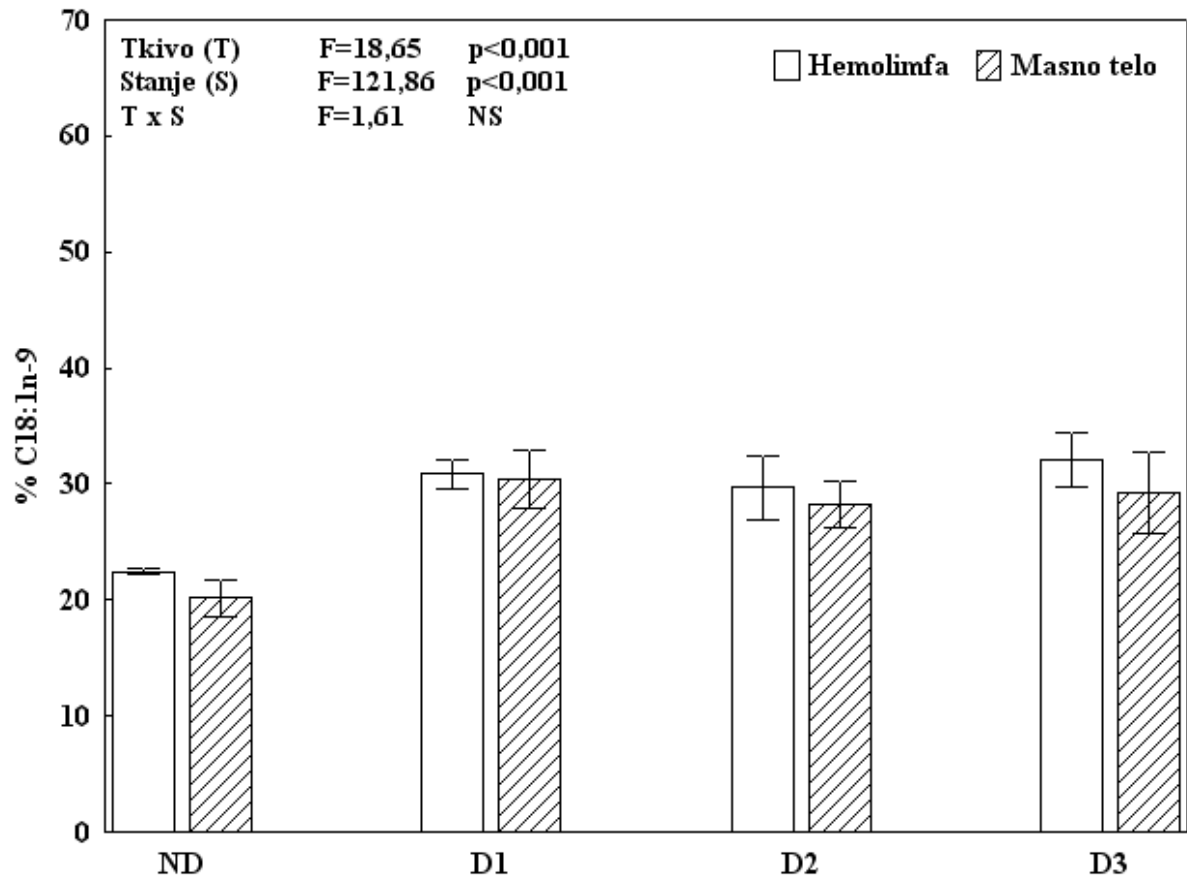
**Slika 32.** Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), T - efekat tkiva, S - efekat stanja, T x S - efekat interakcije, F - faktor.



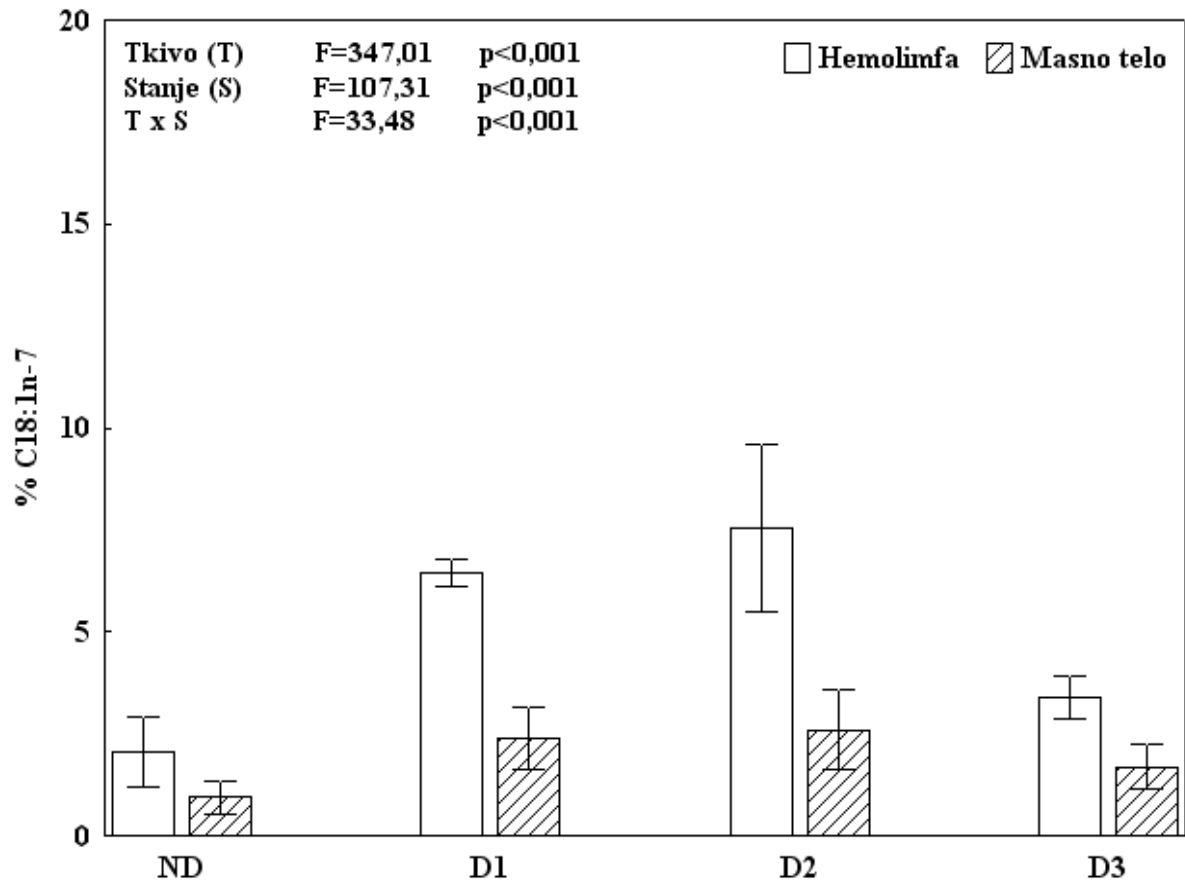
**Slika 33.** Relativni sadržaj palmitoleinske kiseline C16:1n-7 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), T - efekat tkiva, S - efekat stanja, T x S - efekat interakcije, F - faktor.



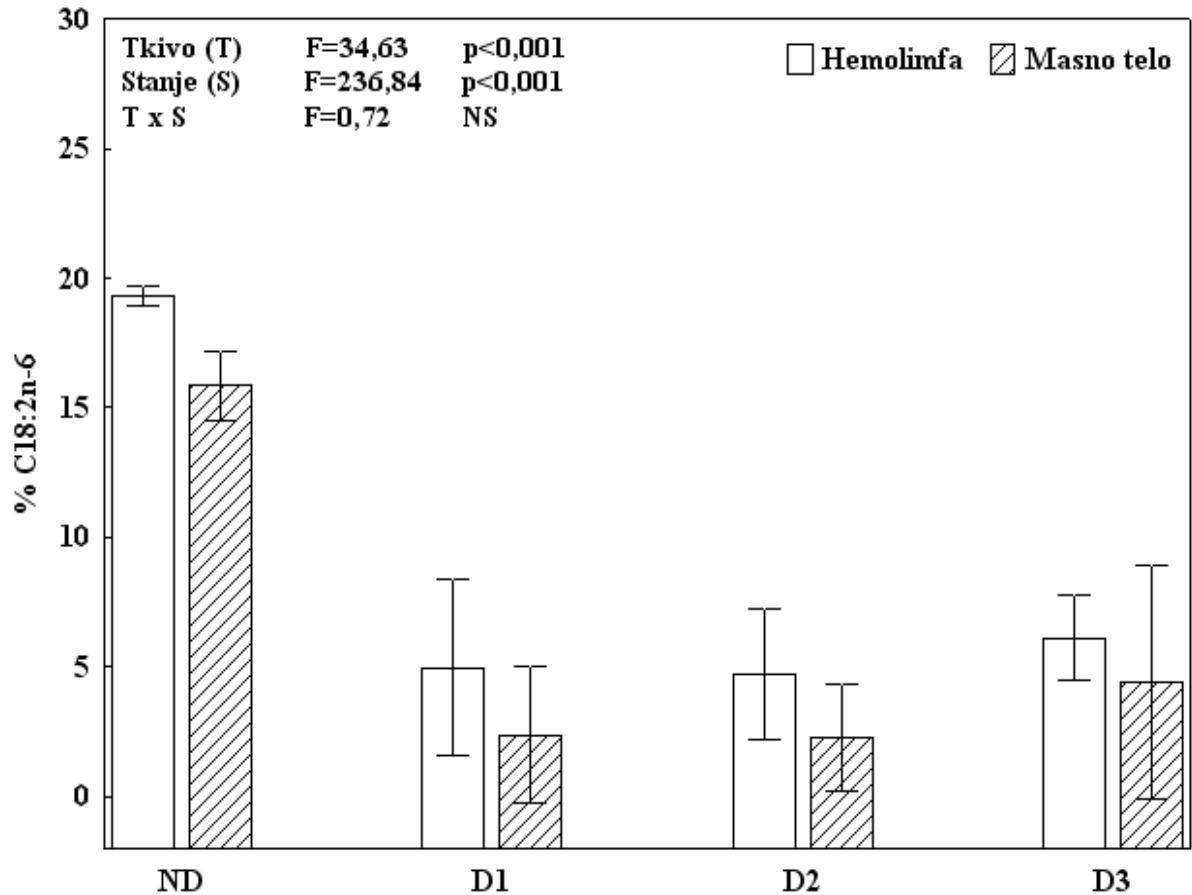
**Slika 34.** Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), T - efekat tkiva, S - efekat stanja, T x S - efekat interakcije, F - faktor.



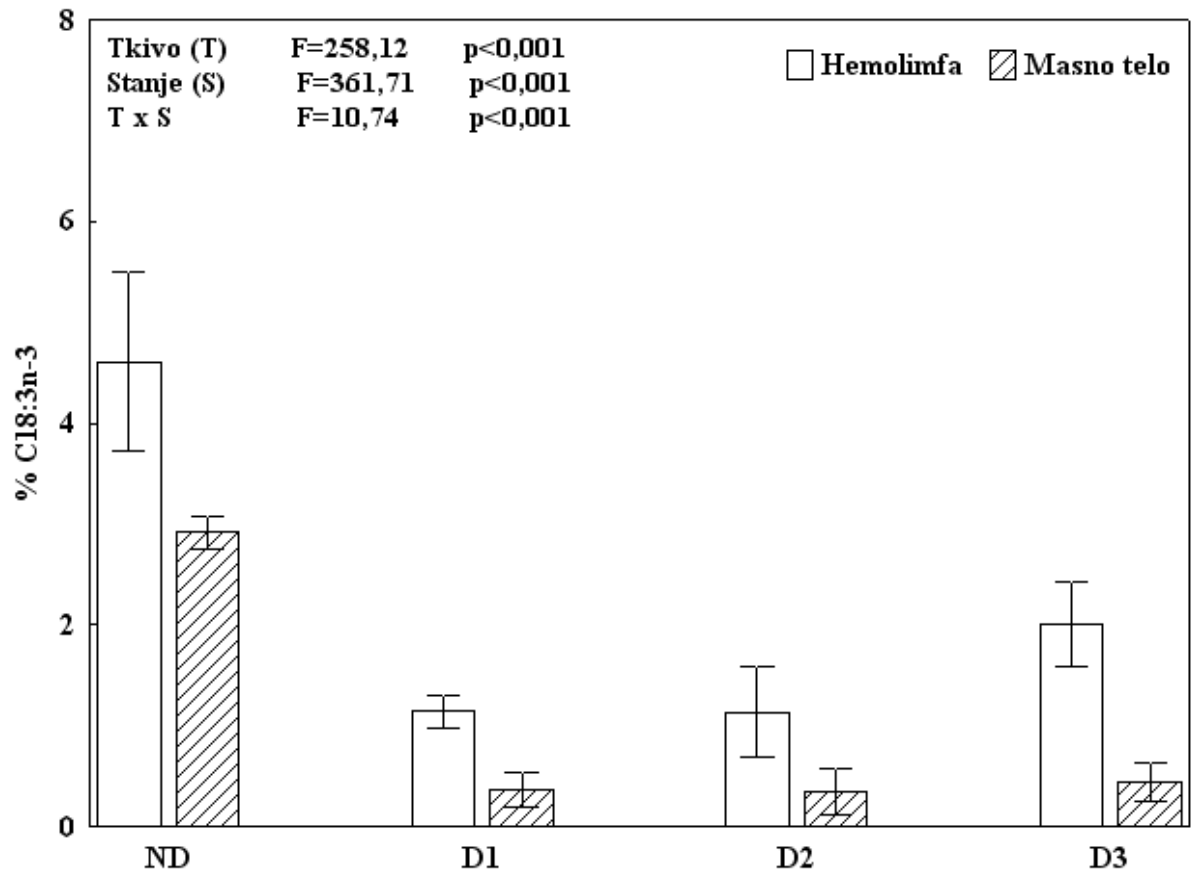
**Slika 35.** Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1(n-9) u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), T - efekat tkiva, S - efekat stanja, T x S - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 36.** Relativni sadržaj vakenske kiseline C18:1n-7 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), T - efekat tkiva, S - efekat stanja, T x S - efekat interakcije, F - faktor.

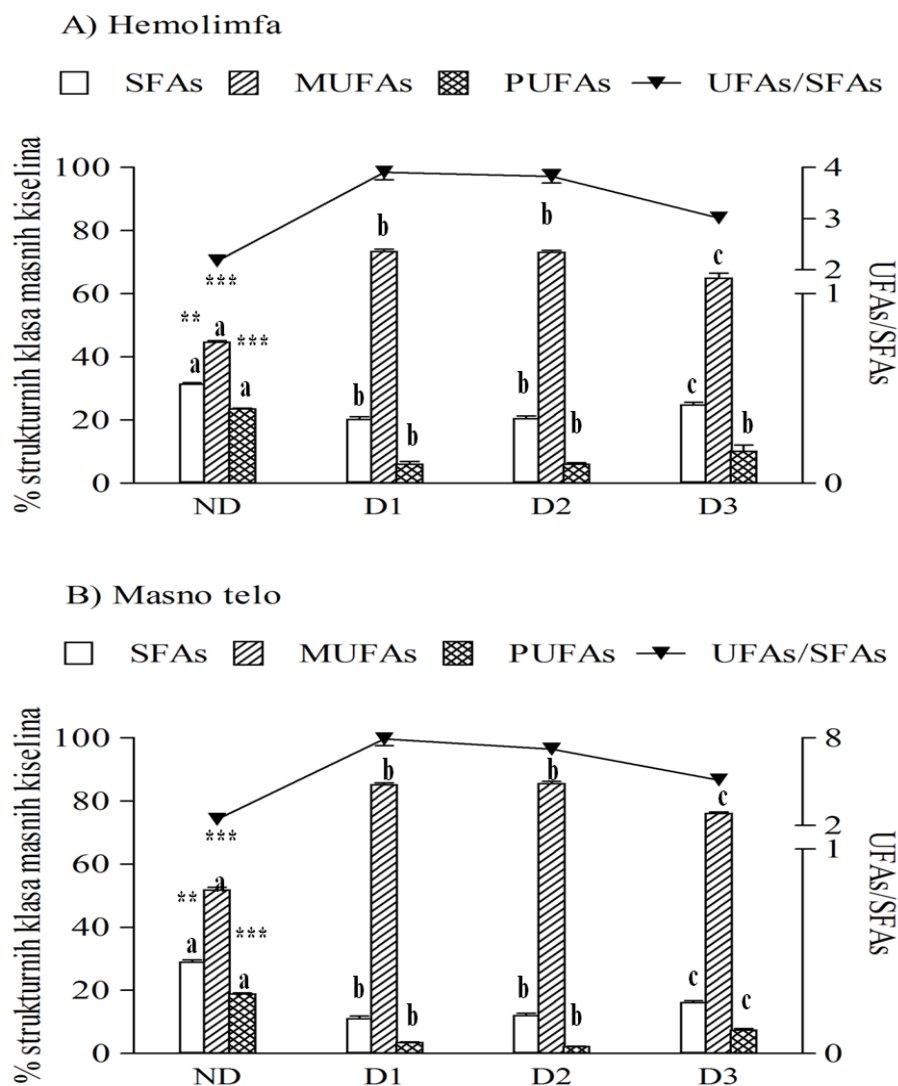


**Slika 37.** Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), T - efekat tkiva, S - efekat stanja, T x S - efekat interakcije, F - faktor.

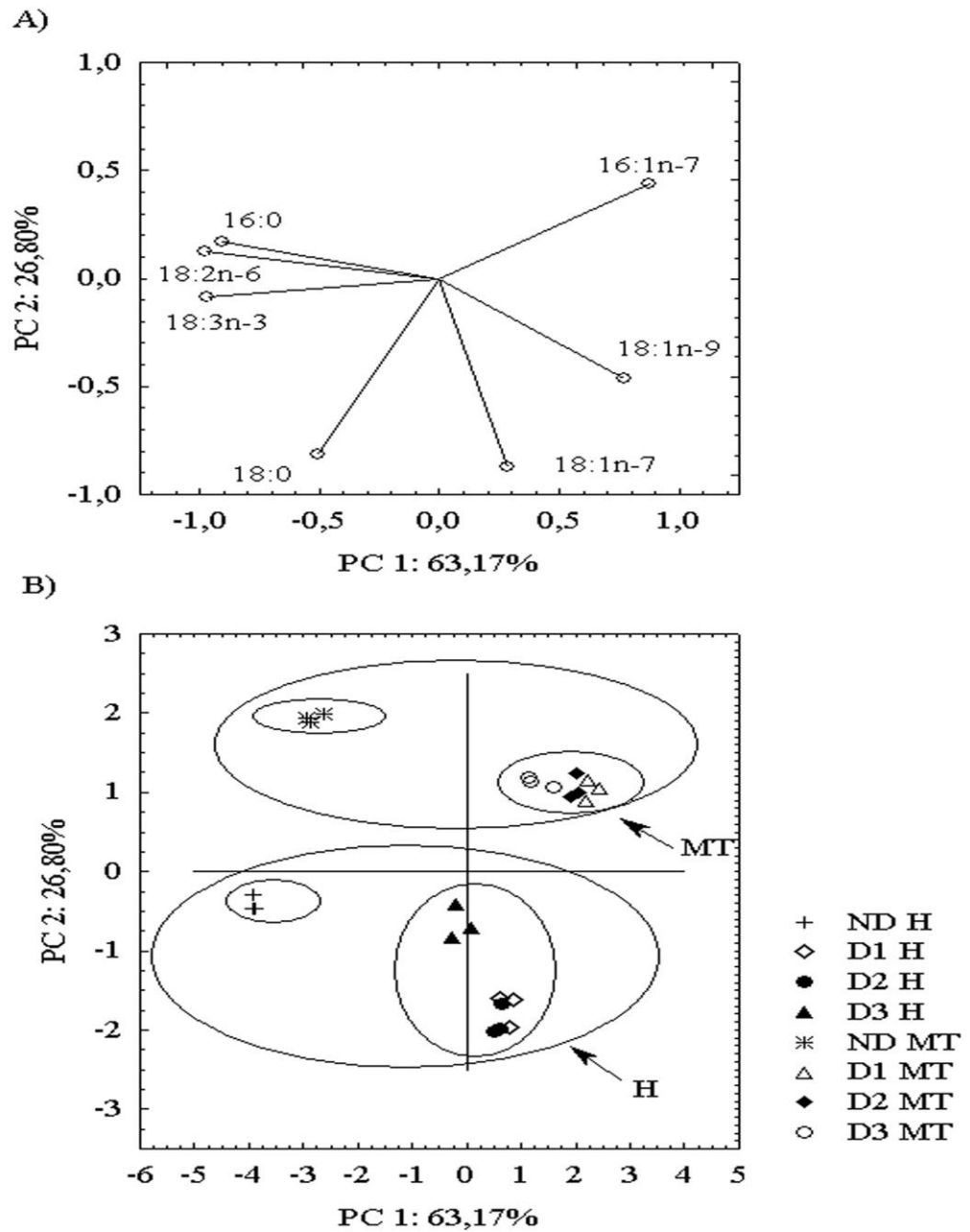


**Slika 38.** Relativni sadržaj  $\alpha$ -linoleinske kiseline C18:3n-3 u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), T - efekat tkiva, S - efekat stanja, T x S - efekat interakcije, F - faktor.





**Slika 39. A i B** Promene u sastavu masnih kiselina hemolimfe (A) i masnog tela (B), nedijapauzirajućih (ND) i dijaupauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijaupauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj), prema zasićenosti: zasićene (SFA), mononezasićene (MUFA) i polinezasićene (PUFA) masne kiseline. Prikazane su i promene u stepenu zasićenosti masnih kiselina, kao odnos nezasićenih (suma MUFA i PUFA) i zasićenih masnih kiselina (UFA/SFA). Stubići predstavljaju srednju vrednost ± standardnu grešku tri biološka ponavljanja (pul tkiva od 6 gusenica). Različita slova iznad stubića (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa (Tukey's HSD post hoc test). Nivoi značajnosti između grupa su: \*\*\* p < 0.001, \*\* p < 0.01 i \* p < 0.05.



**Slika 40. A i B** Analiza po glavnim komponentama (PC1 i PC2), relativnog sadržaja masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj).

**Tabela 11. A i B** Procentualni udeo pojedinačnih masnih kiselina u pulu masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). A) prema vrsti masnih kiselina i B) prema zasićenosti masnih kiselina: zasićene - SFA; nezasićene - UFA (mononezasićene - MUFA i polinezasićene - PUFA).

A)

Hemolimfa	C16:0	C16:1n-7	C18:0	C18:1n-9	C18:1n-7	C18:2n-6	C18:3n-3
ND	23.03±0.38	20.85±0.77	6.89±0.40	22.44±0.05	2.04±0.20	19.30±0.09	4.61±0.21
D <sub>1</sub>	14.17±0.14	36.14±0.37	5.05±0.42	30.89±0.29	6.43±0.08	4.99±0.79	1.14±0.04
D <sub>2</sub>	15.69±0.27	34.23±0.62	4.71±0.82	29.72±0.64	7.54±0.47	4.71±0.58	1.14±0.10
D <sub>3</sub>	19.84±0.46	30.72±0.58	4.17±0.59	32.08±0.71	3.39±0.17	6.12±0.51	2.01±0.13
Masno telo	C16:0	C16:1n-7	C18:0	C18:1n-9	C18:1n-7	C18:2n-6	C18:3n-3
ND	28.33±0.50	30.82±0.94	0.83±0.05	20.15±0.37	0.94±0.10	15.84±0.30	2.92±0.04
D <sub>1</sub>	10.96±0.59	53.90±0.47	0.30±0.02	30.43±0.58	2.39±0.18	2.38±0.61	0.37±0.04
D <sub>2</sub>	11.54±0.24	52.28±0.72	0.47±0.19	28.27±0.47	2.60±0.23	2.28±0.49	0.35±0.05
D <sub>3</sub>	15.60±0.30	46.79±0.64	0.77±0.03	29.31±0.81	1.69±0.13	4.42±1.05	0.44±0.04

B)

Hemolimfa	SFA	UFA	UFA/SFA	MUFA	PUFA
ND	31.56±0.24	68.55±0.35	2.20±0.05	45.33±0.92	23.91±0.12
D <sub>1</sub>	20.41±0.62	79.60±0.62	3.91±0.15	73.46±0.64	6.13±0.76
D <sub>2</sub>	20.12±0.84	76.82±1.19	3.69±0.24	71.41±0.46	5.9±0.57
D <sub>3</sub>	24.93±0.51	75.08±0.51	3.02±0.08	65.39±1.18	9.69±1.48
Masno telo	SFA	UFA	UFA/SFA	MUFA	PUFA
ND	29.21±0.54	70.79±0.54	2.43±0.06	51.90±0.76	18.89±0.32
D <sub>1</sub>	11.25±0.60	88.75±0.60	7.94±0.48	85.83±0.94	3.59±0.03
D <sub>2</sub>	12.21±0.59	87.79±0.59	7.23±0.39	84.14±1.18	2.23±0.13
D <sub>3</sub>	16.37±0.32	83.63±0.32	5.11±0.12	77.79±1.33	7.64±0.48

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ponavljanja ± standardna greška.

**Tabela 12.** Dvofaktorska analiza varijanse procentualnog udela pojedinačnih masnih kiselina u pulu masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela (faktor T), nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih (faktor S), gusenica *O. nubilalis*

Masna kiselina		Tkivo (T)	Stanje (S)	T x S	Greška
<b>C16:0</b>	<b>Df</b>	1	3	3	17
	<b>MS</b>	15.43	212.77	32.28	0.49
	<b>F</b>	<b>31.33 ***</b>	<b>431.95 ***</b>	<b>65.54 ***</b>	
<b>C16:1n-7</b>	<b>Df</b>	1	3	3	17
	<b>MS</b>	1480.55	450.76	21.30	1.35
	<b>F</b>	<b>1096.31 ***</b>	<b>333.78 ***</b>	<b>15.77 ***</b>	
<b>C18:0</b>	<b>Df</b>	1	3	3	17
	<b>MS</b>	131.64	2.55	1.96	0.61
	<b>F</b>	<b>216.06 ***</b>	<b>4.18 *</b>	<b>3.22 *</b>	
<b>C18:1n-9</b>	<b>Df</b>	1	3	3	17
	<b>MS</b>	18.77	122.63	1.62	1.01
	<b>F</b>	<b>18.65 ***</b>	<b>121.86 ***</b>	<b>1.61 NS</b>	
<b>C18:1n-7</b>	<b>Df</b>	1	3	3	17
	<b>MS</b>	53.63	16.58	5.17	0.15
	<b>F</b>	<b>347.01 ***</b>	<b>107.31 ***</b>	<b>33.48 ***</b>	
<b>C18:2n-6</b>	<b>Df</b>	1	3	3	17
	<b>MS</b>	40.27	275.39	0.84	1.16
	<b>F</b>	<b>34.63 ***</b>	<b>236.84 ***</b>	<b>0.72 NS</b>	
<b>C18:3n-3</b>	<b>Df</b>	1	3	3	17
	<b>MS</b>	8.97	12.58	0.37	0.03
	<b>F</b>	<b>258.12 ***</b>	<b>361.71 ***</b>	<b>10.74 ***</b>	

MS - srednja vrednost kvadrata (mean square, *eng.*), df - stepeni slobode (degree of freedom, *eng.*), F - faktor; \*\*\* -  $p < 0.001$ , \*\* -  $p < 0.01$ , \* -  $p < 0.05$ , NS - nije statistički značajno.

**Tabela 13.** Dvofaktorska analiza varijanse procentualnog udela masnih kiselina u pulu masnih kiselina, prema zasićenosti: zasićene - SFA; nezasićene - UFA (mononezasićene - MUFA i polinezasićene - PUFA) ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela (faktor T), nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih (faktor S), gusenica *O. nubilalis*

Parametri		Tkivo (T)	Stanje (S)	T x S	Greška
	<b>Df</b>	1	3	3	17
<b>SFA</b>	<b>MS</b>	302.94	275.92	14.93	0.98
	<b>F</b>	<b>307.72 ***</b>	<b>280.28 ***</b>	<b>15.17 ***</b>	
	<b>Df</b>	1	3	3	17
<b>UFA</b>	<b>MS</b>	370.0	249.6	21.7	1.3
	<b>F</b>	<b>295.4 ***</b>	<b>199.3 ***</b>	<b>17.3 ***</b>	
	<b>Df</b>	1	3	3	17
<b>UFA/SFA</b>	<b>MS</b>	1.56	0.95	0.117	0.0056
	<b>F</b>	<b>278 ***</b>	<b>170 ***</b>	<b>20.9 ***</b>	
	<b>Df</b>	1	3	3	17
<b>MUFA</b>	<b>MS</b>	752.1	1224.9	13.4	3.1
	<b>F</b>	<b>239.49 ***</b>	<b>390.04 ***</b>	<b>4.26 *</b>	
	<b>Df</b>	1	3	3	17
<b>PUFA</b>	<b>MS</b>	68.22	386.49	2.73	2.00
	<b>F</b>	<b>34.13 ***</b>	<b>193.36 ***</b>	<b>1.36 NS</b>	
	<b>Df</b>	1	3	3	17

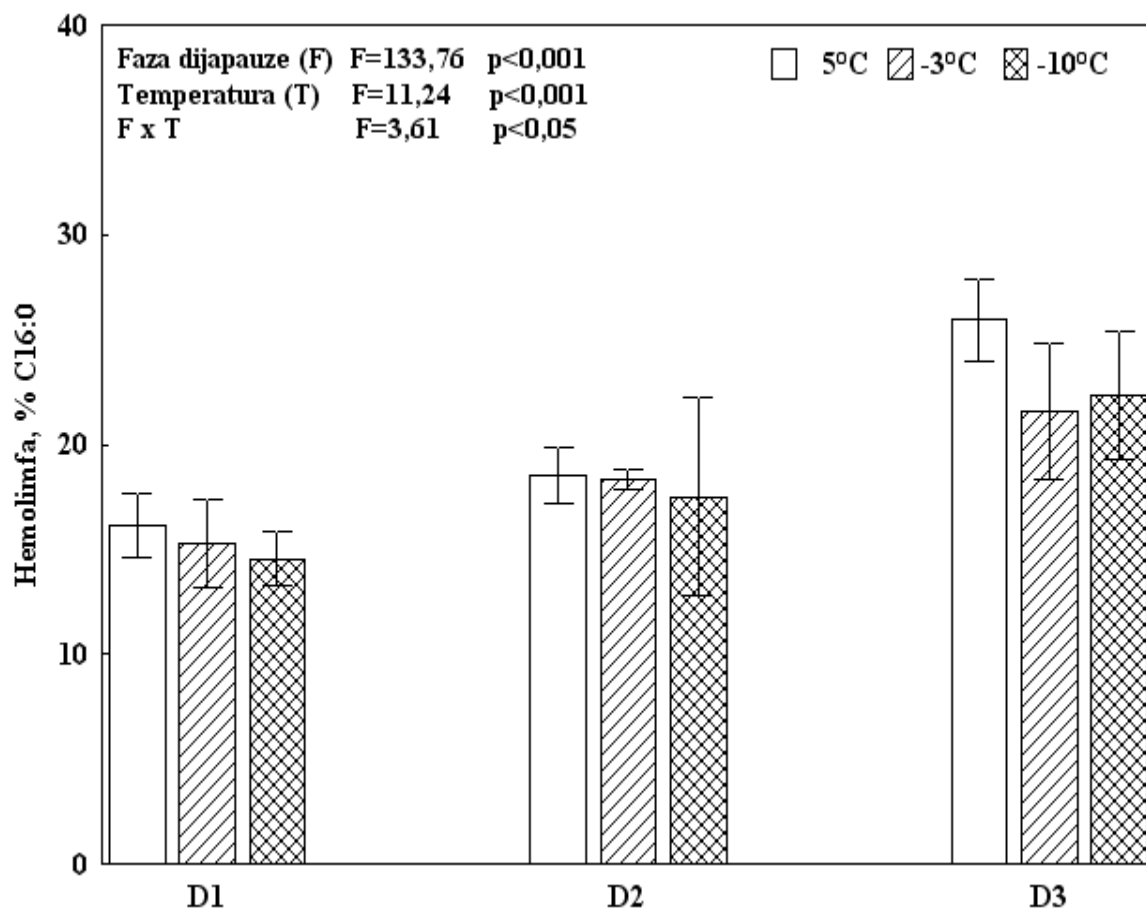
MS - srednja vrednost kvadrata (mean square, eng.), df - stepeni slobode (degree of freedom, eng.), F - faktor; \*\*\* p<0.001; \*\* p<0.01; \* p<0.05

### **5.3.3. Masne kiseline ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela dijapauzirajućih gusenica u uslovima hlađenja**

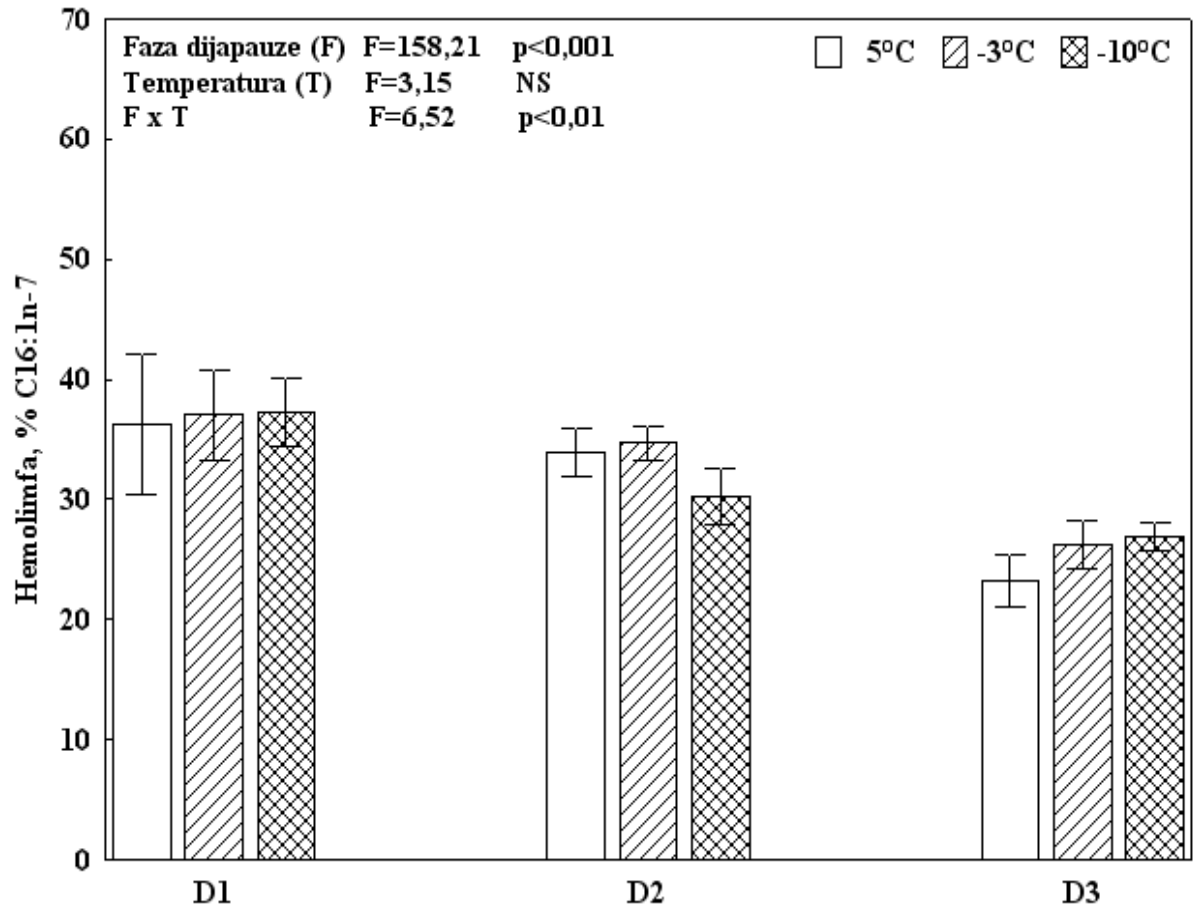
Da li su razlike u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida, hemolimfe i masnog tela nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica, samo karakteristika dijapauze ili su adaptivni odgovor na temperaturu sredine, ispitali smo analizom masnih kiselina hemolimfe i masnog tela dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* u uslovima kontrolisanog hlađenja.

Rezultati analize sastava masnih kiselina hemolimfe i masnog tela dijapauzirajućih gusenica izloženih različitoj temperaturi (5°C, -3°C i -10°C) početkom (D<sub>1</sub>), sredinom (D<sub>2</sub>) i krajem (D<sub>3</sub>) dijapauze, prikazani su grafički na Slikama 41-54, a brojčane vrednosti u Tabeli 14.

U hemolimfi je utvrđeno prisustvo sedam masnih kiselina, sa 16 i 18 ugljenikovih atoma: palmitinska (C16:0), palmitooleinska (C16:1n-7), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1n-9), vakenska (C18:1n-7), linolna (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenska (C18:3n-3) kiselina. Njihova procentualna zastupljenost u ukupnim lipidima hemolimfe, statistički analizirana u odnosu na fazu dijapauze i temperaturu, data je na Slikama 41-47 i zbirno u Tabeli 15. Statistička značajnost u odnosu na temperaturu utvrđena je za palmitinsku (C16:0) i linolnu kiselinu (C18:2n-6), a u odnosu na fazu dijapauze za sve ostale masne kiseline, osim stearinske kiseline (C18:0).

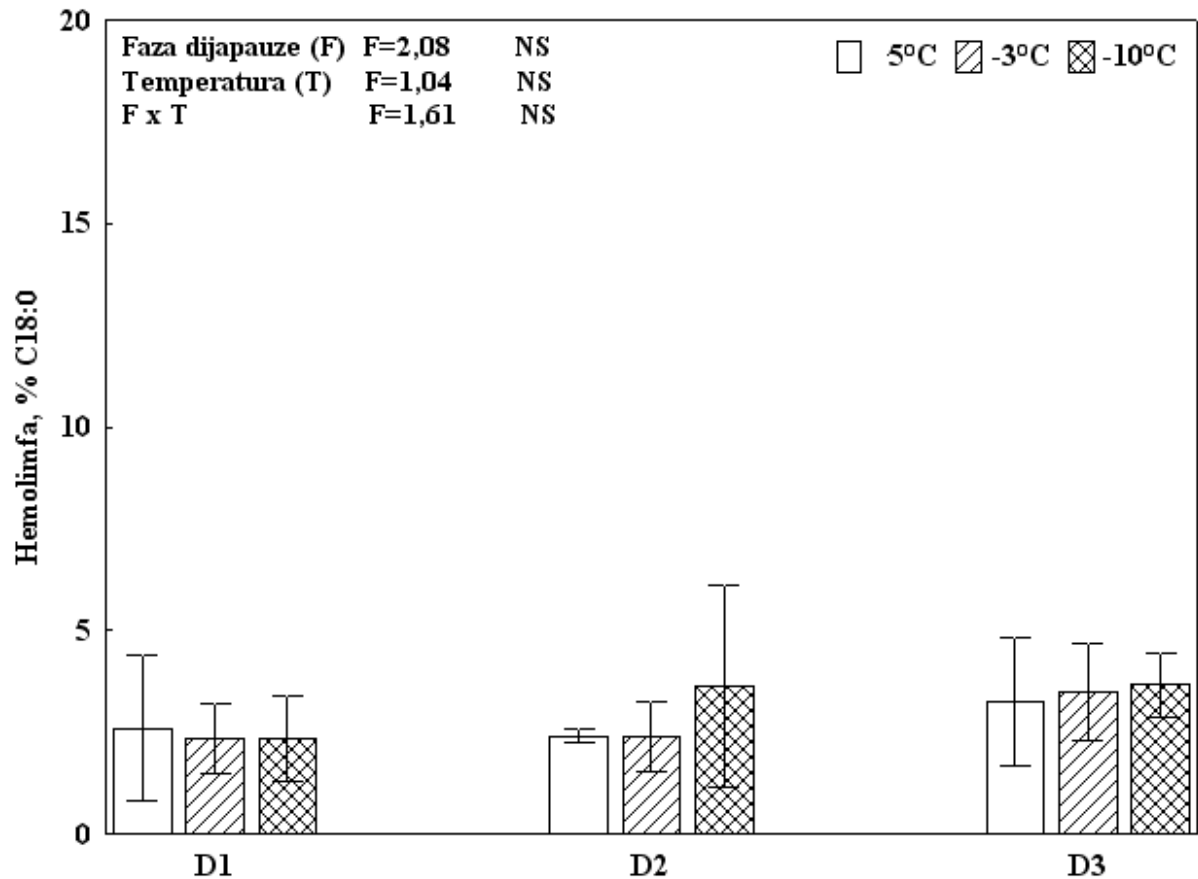


**Slika 41.** Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0, u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.

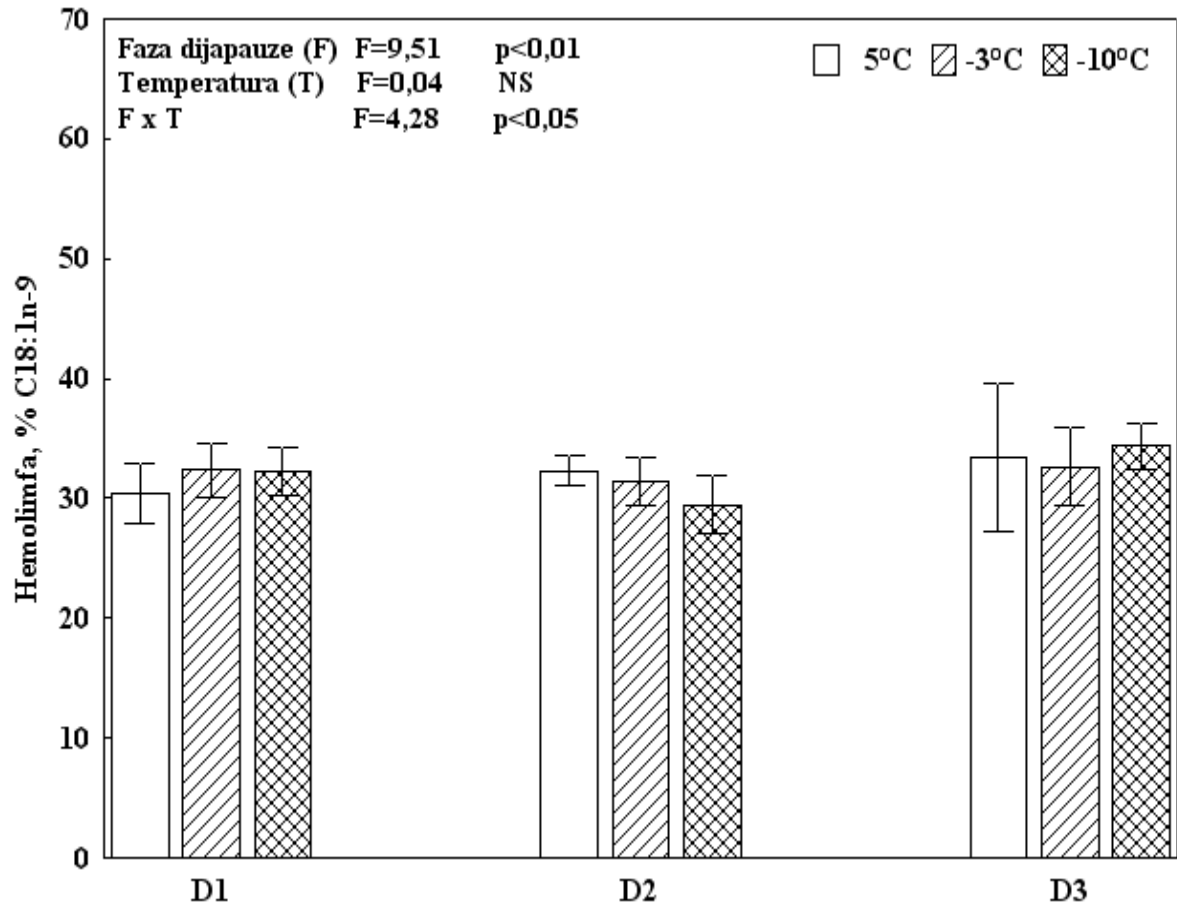


**Slika 42.** Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:1n-7, u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.

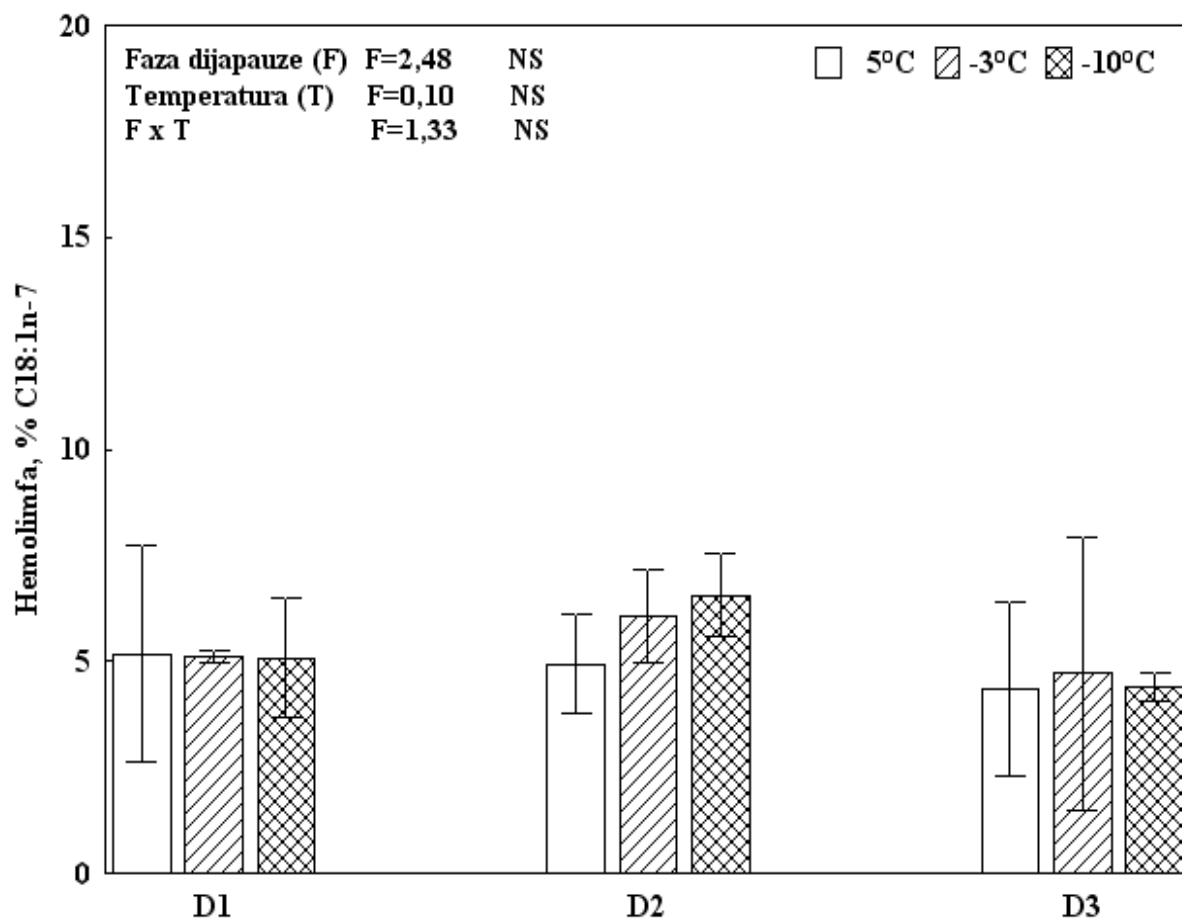




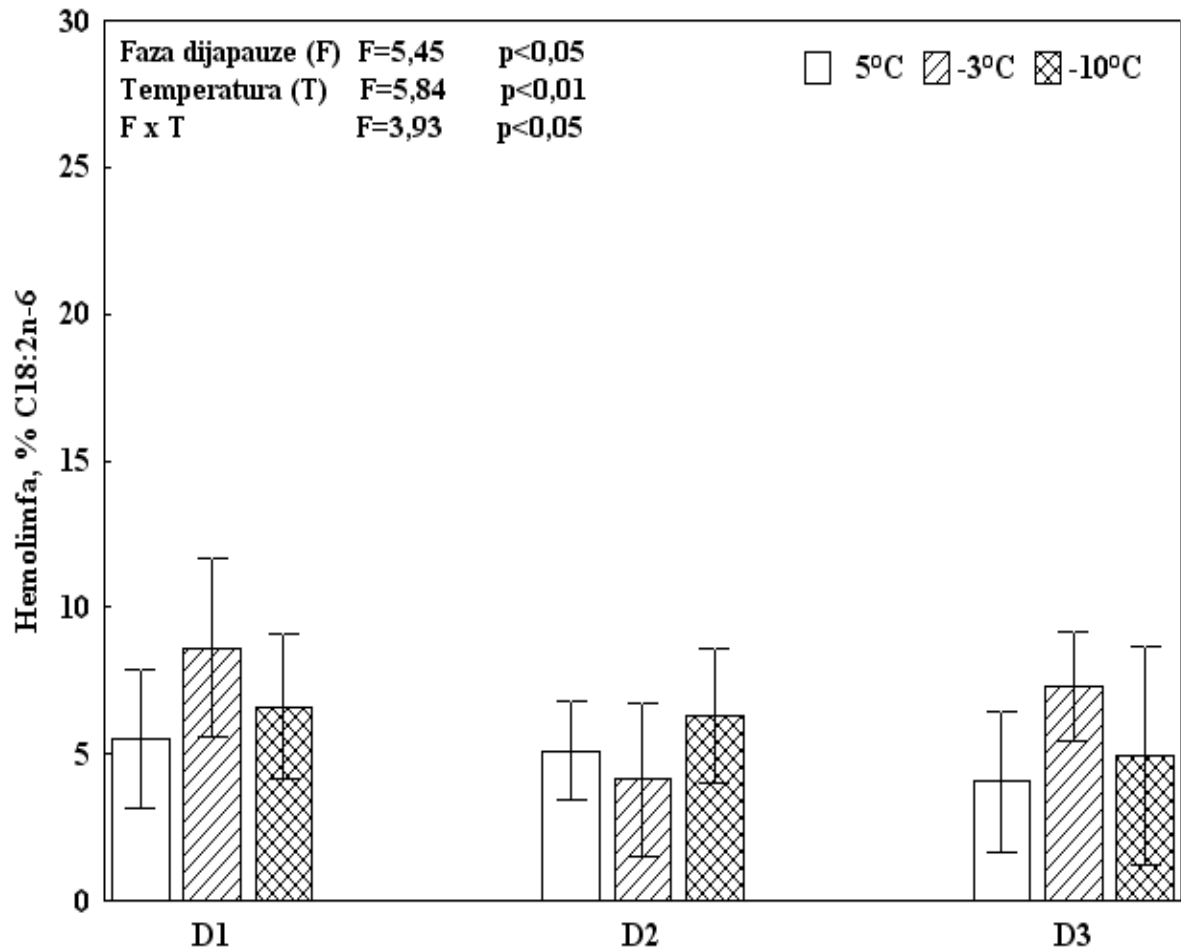
**Slika 43.** Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0, u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



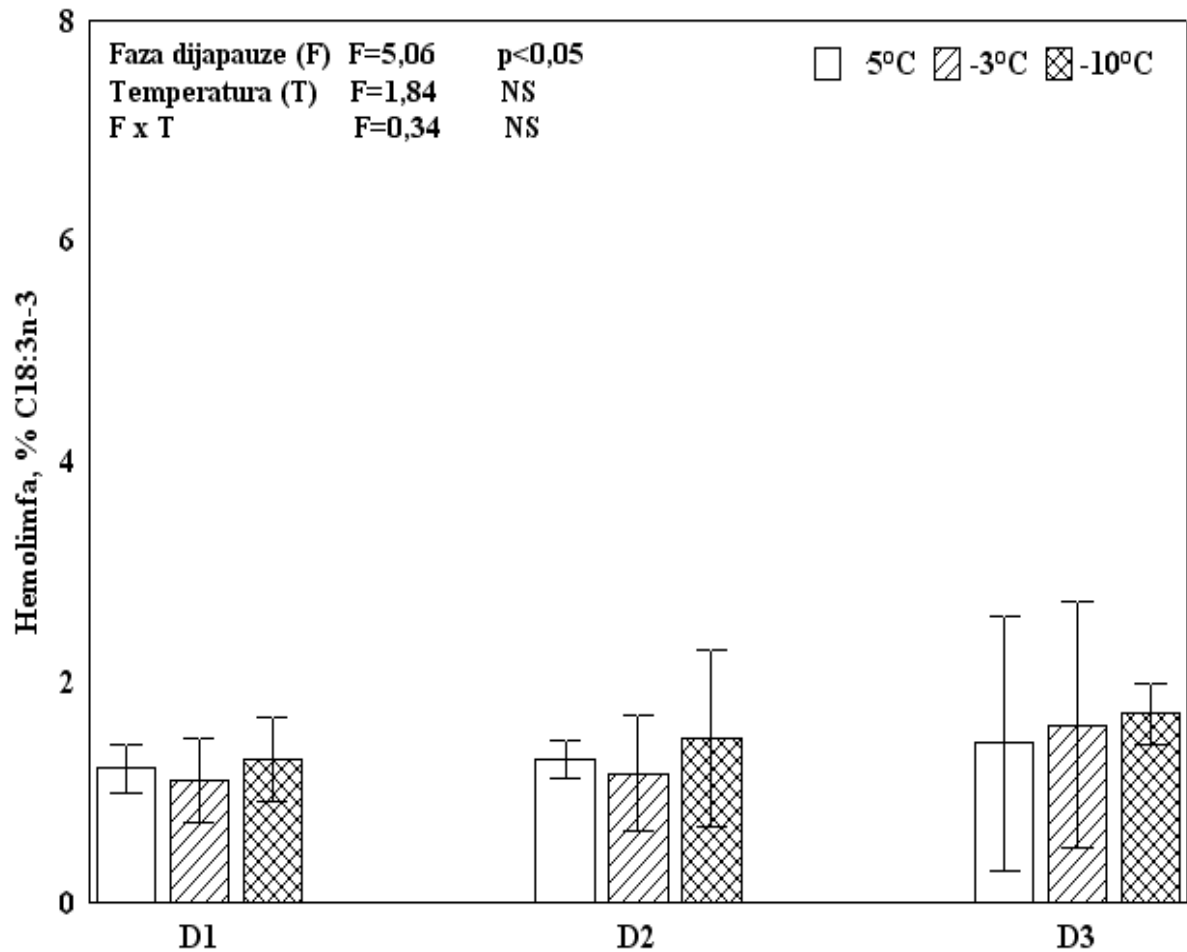
**Slika 44.** Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1n-9, u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 45.** Relativni sadržaj vakenske kiseline C18:1n-7, u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 46.** Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6, u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 47.** Relativni sadržaj  $\alpha$ -linolenske kiseline C18:3n-3, u hemolimfi dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.

**Tabela 14.** Procentualni udeo masnih kiselina u ukupnom pulu masnih kiselina hemolimfe i masnog tela dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj).

Hemolimfa	C16:0	C16:1n-7	C18:0	C18:1n-9	C18:1n-7	C18:2n-6	C18:3n-3
D <sub>1</sub> 5°C	16.14±0.35	36.24±1.35	3.42±1.24	30.43±0.58	5.18±0.59	5.52±0.55	1.21±0.05
D <sub>1</sub> -3°C	15.32±0.49	37.02±0.89	2.35±0.20	32.41±0.52	5.11±0.03	8.63±0.71	1.10±0.09
D <sub>1</sub> -10°C	14.55±0.39	37.24±0.90	2.57±0.29	32.22±0.62	5.08±0.44	6.61±0.77	1.30±0.12
D <sub>2</sub> 5°C	18.55±0.49	33.88±0.72	2.40±0.06	32.25±0.45	4.94±0.43	5.10±0.61	1.29±0.06
D <sub>2</sub> -3°C	18.34±0.12	34.72±0.32	2.39±0.20	31.43±0.45	6.07±0.25	4.14±0.61	1.17±0.12
D <sub>2</sub> -10°C	17.52±1.10	30.25±0.53	3.63±0.58	29.49±0.54	6.56±0.23	6.3±0.53	1.50±0.19
D <sub>3</sub> 5°C	25.93±0.45	23.19±0.52	3.25±0.37	33.36±1.43	5.30±1.42	3.28±1.24	1.44±0.27
D <sub>3</sub> -3°C	21.58±0.76	26.23±0.46	3.48±0.27	32.63±0.75	4.71±0.75	7.29±0.44	1.60±0.26
D <sub>3</sub> -10°C	22.34±0.71	26.92±0.27	3.67±0.18	34.37±0.44	4.40±0.07	4.95±0.87	1.71±0.07

Masno telo	C16:0	C16:1n-7	C18:0	C18:1n-9	C18:1n-7	C18:2n-6	C18:3n-3
D <sub>1</sub> 5°C	12.05±0.46	51.79±1.28	0.38±0.07	30.60±0.99	1.81±0.20	3.39±0.83	0.44±0.03
D <sub>1</sub> -3°C	11.02±0.52	53.29±0.93	0.32±0.03	29.75±0.85	2.32±0.14	5.13±0.66	0.36±0.06
D <sub>1</sub> -10°C	11.00±0.44	51.86±1.12	0.33±0.01	30.47±0.78	2.25±0.13	4.23±0.52	0.39±0.07
D <sub>2</sub> 5°C	13.13±0.40	51.46±0.27	0.45±0.01	29.53±0.92	2.36±0.25	2.57±0.65	0.39±0.07
D <sub>2</sub> -3°C	12.25±0.31	53.03±1.03	0.36±0.01	29.11±0.86	2.66±0.19	2.17±0.85	0.36±0.02
D <sub>2</sub> -10°C	12.35±0.45	52.38±0.29	0.38±0.02	29.06±0.31	2.79±0.08	2.59±0.05	0.38±0.01
D <sub>3</sub> 5°C	15.78±0.47	48.18±0.62	0.77±0.04	28.10±1.14	2.31±0.13	3.78±1.13	0.51±0.07
D <sub>3</sub> -3°C	15.34±0.27	47.61±1.41	0.99±0.38	27.75±0.34	2.34±0.26	4.57±0.71	0.55±0.10
D <sub>3</sub> -10°C	14.59±0.36	49.72±0.79	0.67±0.02	29.36±0.59	2.46±0.14	2.73±0.62	0.39±0.03

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri ponavljanja ± standardna greška.

**Tabela 15.** Statistička analiza (ANOVA) relativnog sadržaja masnih kiselina hemolimfe dijavauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijavauze ( $D_1$  - početak,  $D_2$  - sredina i  $D_3$  - kraj) u odnosu na fazu dijavauze (F) i temperaturu (T) kao faktore.

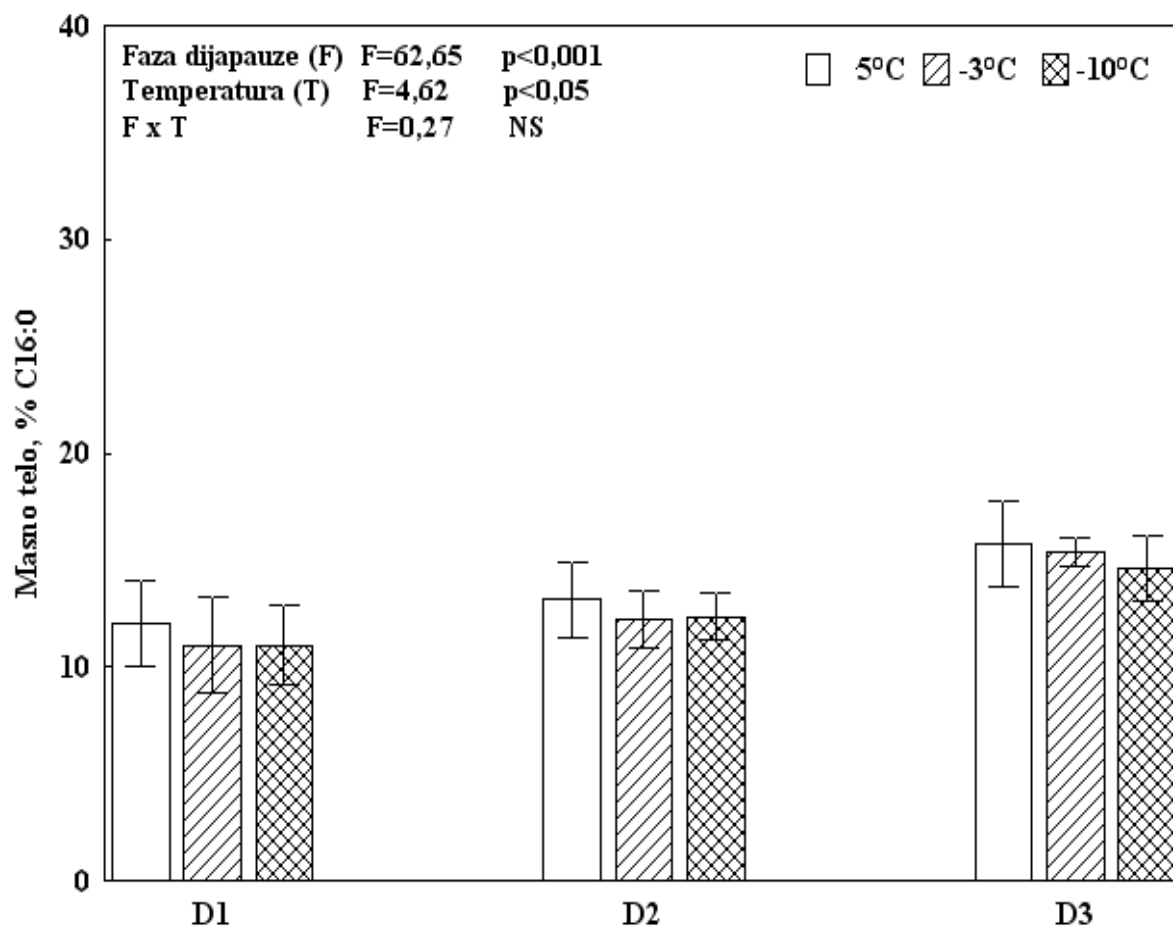
Parametri		Faza (F)	Temperatura (T)	F x T	Greška
<b>C16:0</b>	<b>Df</b>	2	2	4	21
	<b>MS</b>	151.45	12.73	4.09	1.13
	<b>F</b>	<b>133.76 ***</b>	<b>11.24 ***</b>	<b>3.61 *</b>	
<b>C16:1n-7</b>	<b>Df</b>	2	2	4	21
	<b>MS</b>	312.63	6.23	12.87	1.98
	<b>F</b>	<b>158.21 ***</b>	<b>3.15 NS</b>	<b>6.52 **</b>	
<b>C18:0</b>	<b>Df</b>	2	2	4	21
	<b>MS</b>	1.41	0.71	1.09	0.68
	<b>F</b>	<b>2.08 NS</b>	<b>1.04 NS</b>	<b>1.61 NS</b>	
<b>C18:1n-9</b>	<b>Df</b>	2	2	4	21
	<b>MS</b>	14.63	0.06	6.58	1.54
	<b>F</b>	<b>9.51 **</b>	<b>0.04 NS</b>	<b>4.28 *</b>	
<b>C18:1n-7</b>	<b>Df</b>	2	2	4	21
	<b>MS</b>	2.86	0.11	1.54	1.15
	<b>F</b>	<b>2.48 NS</b>	<b>0.10 NS</b>	<b>1.33 NS</b>	
<b>C18:2n-6</b>	<b>Df</b>	2	2	4	21
	<b>MS</b>	9.91	10.62	7.15	1.82
	<b>F</b>	<b>5.45 *</b>	<b>5.84 **</b>	<b>3.93 *</b>	
<b>C18:3n-3</b>	<b>Df</b>	2	2	4	21
	<b>MS</b>	0.35	0.13	0.02	0.07
	<b>F</b>	<b>5.06 *</b>	<b>1.84 NS</b>	<b>0.34 NS</b>	

MS - srednja vrednost kvadrata (mean square, *eng.*), df - stepeni slobode (degree of freedom, *eng.*), F - faktor; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , NS - razlika nije statistički značajna.

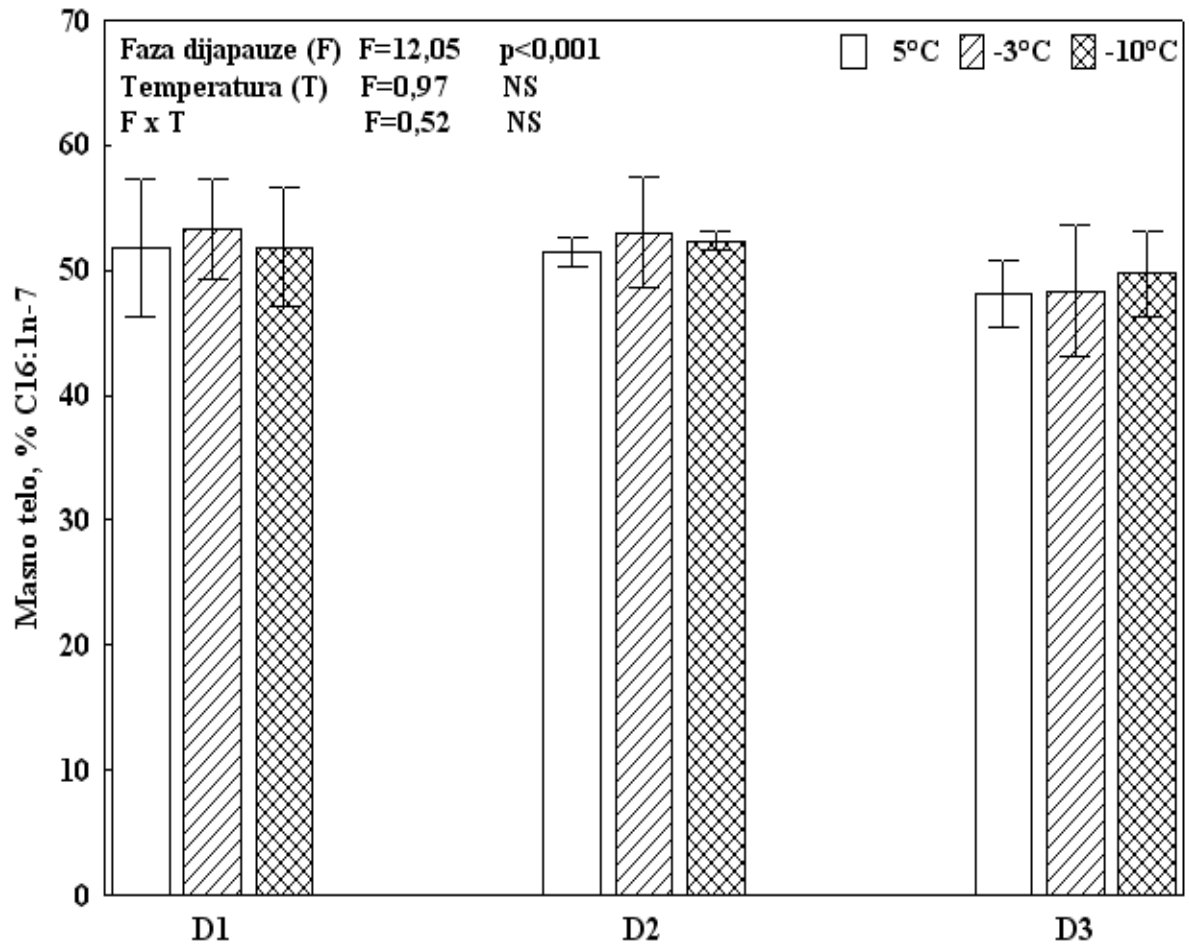
U masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izloženih hlađenju tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj), utvrđeno je prisustvo sedam masnih kiselina, sa 16 i 18 ugljenikovih atoma: palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1n-7), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1n-9), vakenska (C18:1n-7), linolna (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenska (C18:3n-3) kiselina. Njihova procentualna zastupljenost u ukupnom pulu masnih kiselina masnog tela, statistički analizirana u odnosu na fazu dijapauze i temperaturu, data je na Slikama 48-54, a brožčane vrednosti u Tabeli 14. Najzastupljenija je palmitoleinska kiselina (C16:1n-7), zatim oleinska (C18:1n-9) i palmitinska (C16:0), dok su ostale prisutne u manjem procentu (Tabela 14).

Statistička značajnost u odnosu na temperaturu i fazu dijapauze data je u Tabeli 16. Tako se, u masnom telu tokom dijapauze značajno povećava udeo palmitinske (C16:0), stearinske (C18:0) i vakenske kiseline (C18:1n-7), dok se udeo palmitoleinske kiseline (C16:1n-6) smanjuje tokom dijapauze (efekat faze dijapauze). Promene sadržaja oleinske (C18:1n-9), linolne (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenske kiseline (C18:3n-3) tokom dijapauze nisu statistički značajne. Izlaganje niskoj temperaturi signifikantno smanjuje sadržaj palmitinske kiseline (C16:0) ( $p < 0.05$ ), nezavisno od faze dijapauze, što je utvrđeno i za statistički nesignifikantne promene u sadržaju masnih kiselina tokom izlaganja kontrolisanim uslovima hlađenja (Tabela 16).

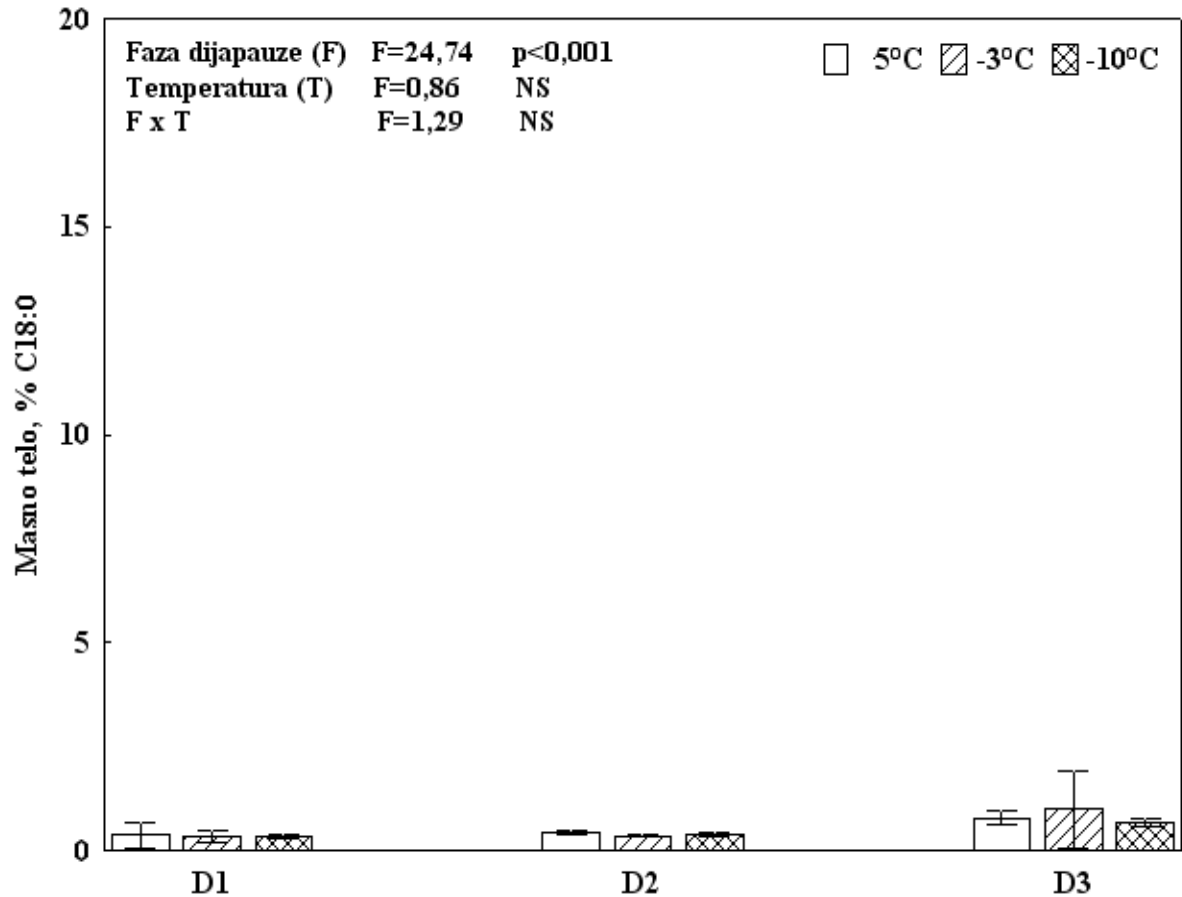




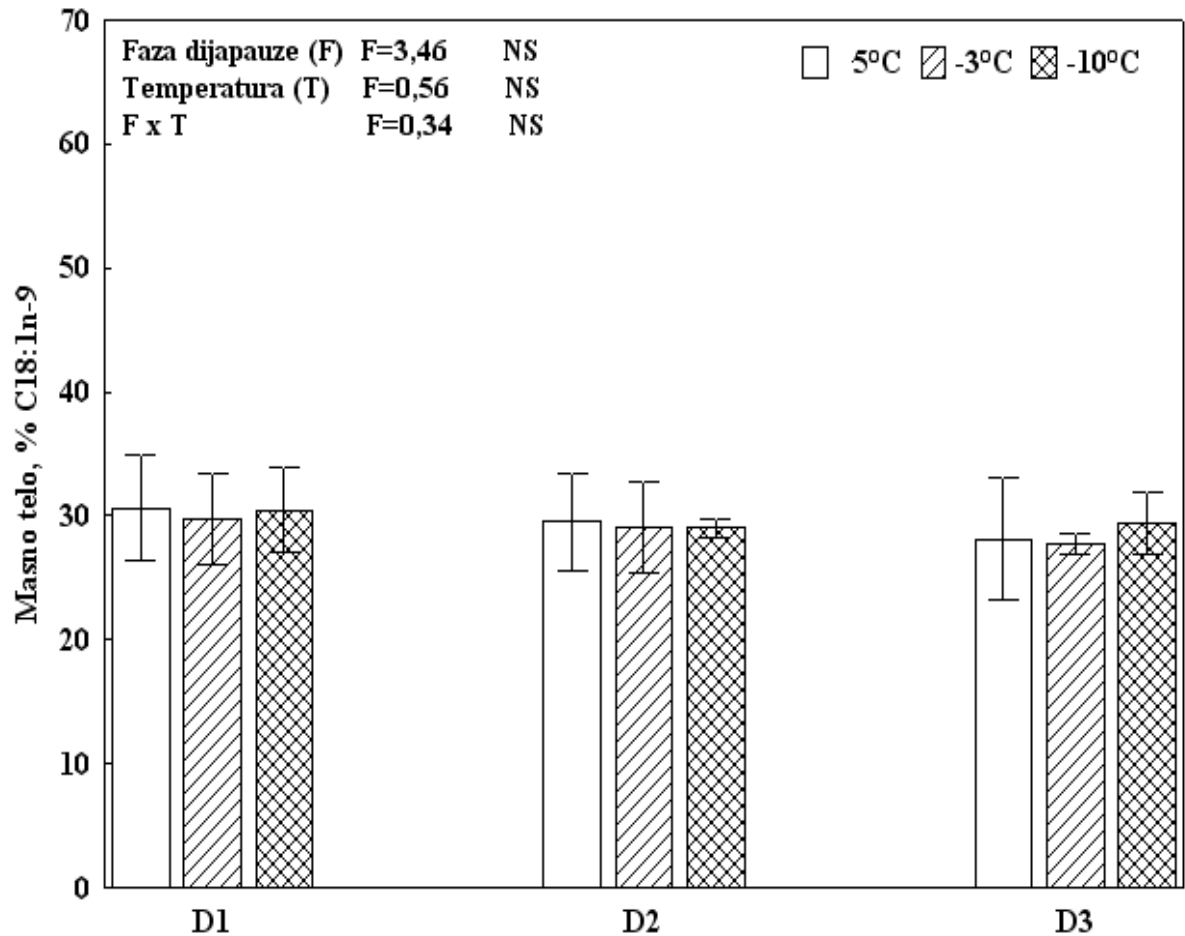
**Slika 48.** Relativni sadržaj palmitinske kiseline C16:0, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



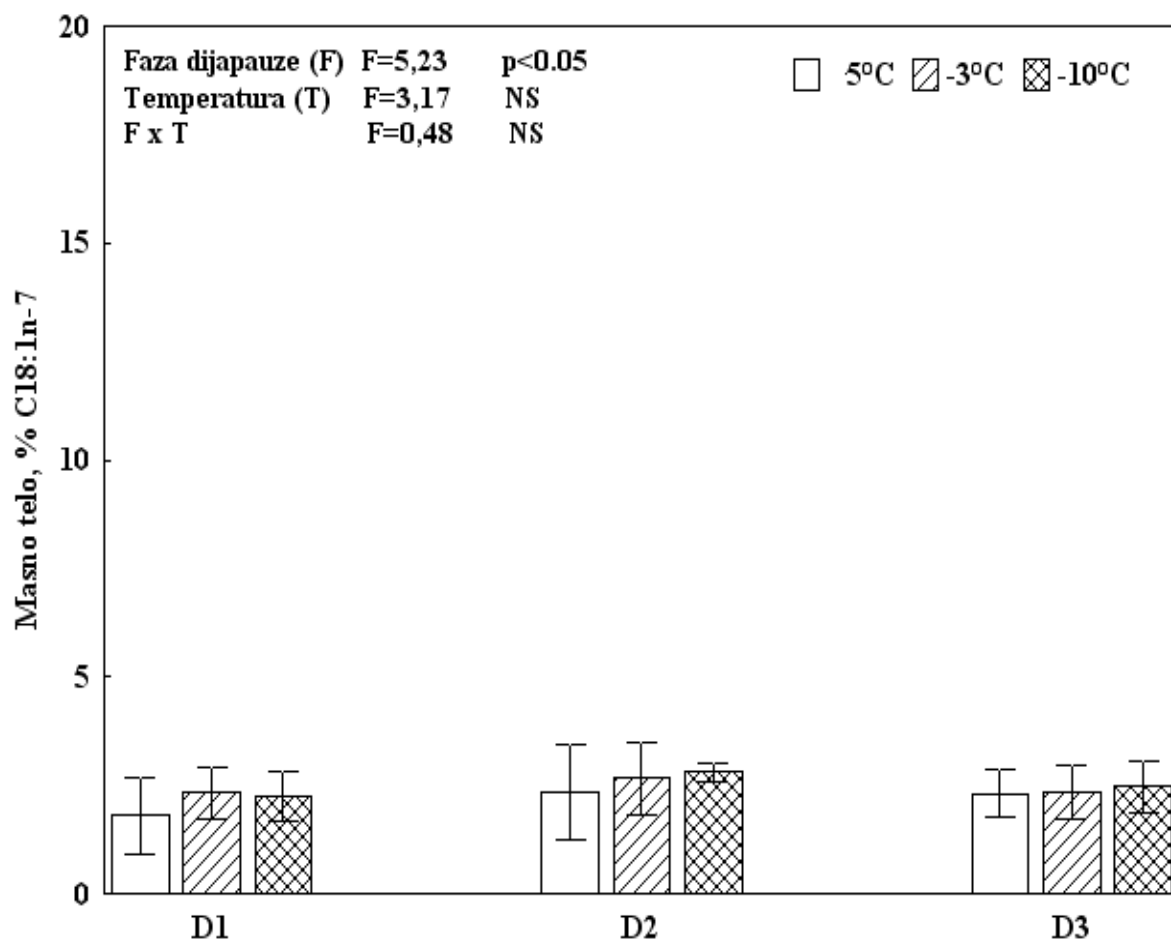
**Slika 49.** Relativni sadržaj palmitoleinske kiseline C16:1n-7, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom različitih faza dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



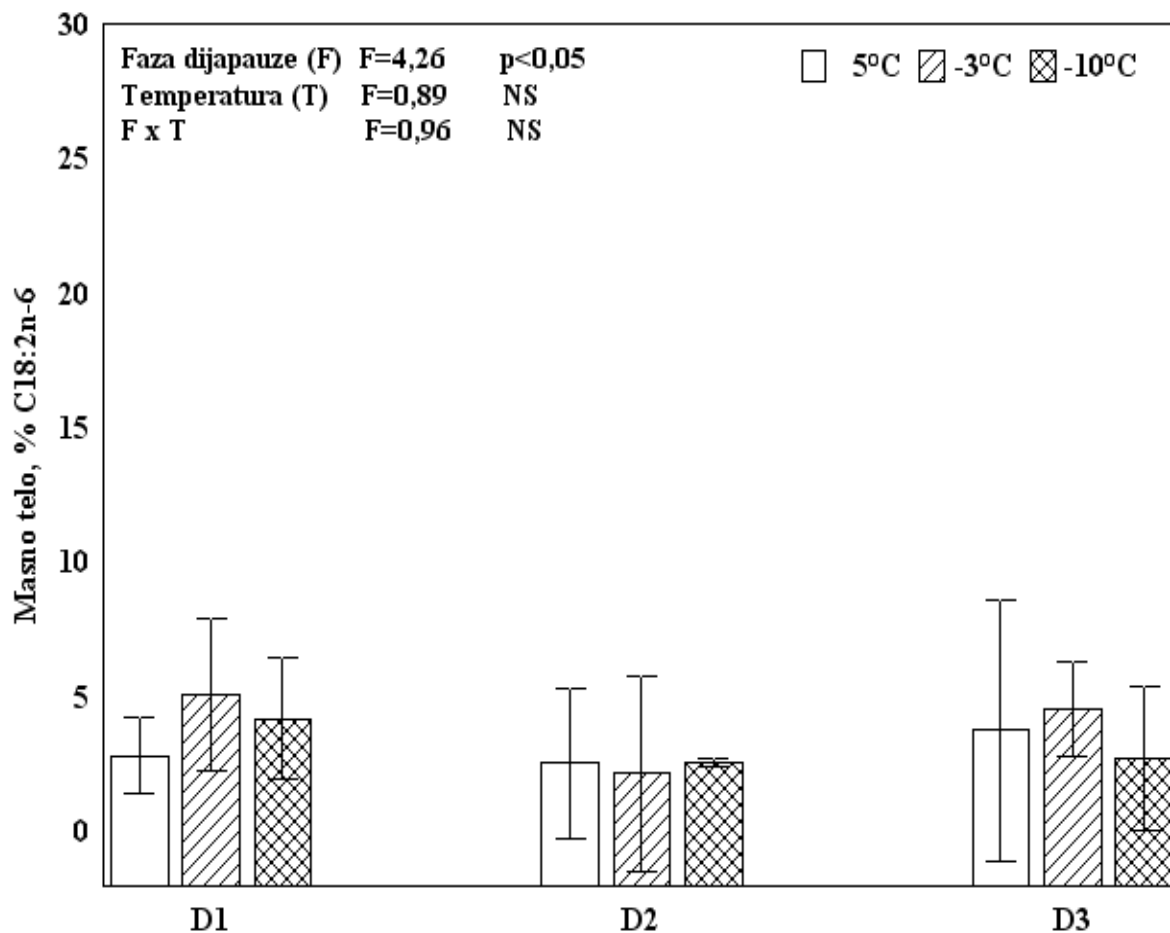
**Slika 50.** Relativni sadržaj stearinske kiseline C18:0, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



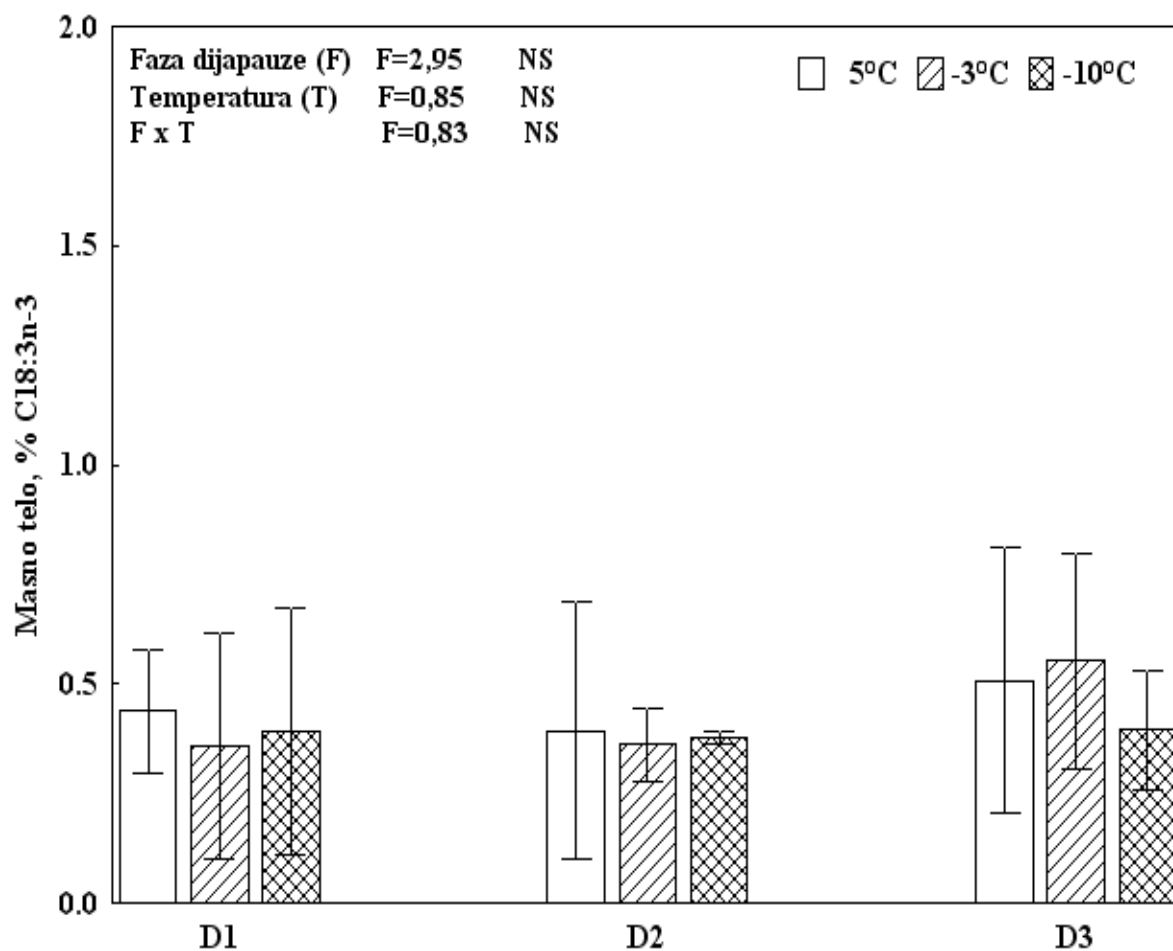
**Slika 51.** Relativni sadržaj oleinske kiseline C18:1n-9, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 52.** Relativni sadržaj vakenske kiseline C18:1n-7, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 53.** Relativni sadržaj linolne kiseline C18:2n-6, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost ± SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.



**Slika 54.** Relativni sadržaj  $\alpha$ -linolenske kiseline C18:3n-3, u masnom telu dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost  $\pm$  SE. Statistička značajnost razlika analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), F - efekat faze dijapauze, T - efekat temperature, F x T - efekat interakcije, F - faktor.

**Tabela 16.** Relativni sadržaj masnih kiselina masnog tela dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima kontrolisanog hlađenja, tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Statistički značajne razlike su analizirane dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) sa fazom dijapauze (F) i temperaturom (T), kao faktorima.

Masna kiselina		Faza (F)	Temperatura (T)	F x T	Greška
<b>C16:0</b>	<b>Df</b>	2	2	4	16
	<b>MS</b>	32.16	2.37	0.14	0.51
	<b>F</b>	<b>62.65 ***</b>	<b>4.62 *</b>	<b>0.27 NS</b>	
<b>C16:1n-7</b>	<b>Df</b>	2	2	4	16
	<b>MS</b>	33.51	2.70	1.44	2.78
	<b>F</b>	<b>12.05 ***</b>	<b>0.97 NS</b>	<b>0.52 NS</b>	
<b>C18:0</b>	<b>Df</b>	2	2	4	16
	<b>MS</b>	0.53	0.02	0.03	0.02
	<b>F</b>	<b>24.74 ***</b>	<b>0.86 NS</b>	<b>1.29 NS</b>	
<b>C18:1n-9</b>	<b>Df</b>	2	2	4	16
	<b>MS</b>	7.30	1.18	0.71	2.11
	<b>F</b>	<b>3.46 NS</b>	<b>0.56 NS</b>	<b>0.34 NS</b>	
<b>C18:1n-7</b>	<b>Df</b>	2	2	4	16
	<b>MS</b>	0.47	0.29	0.04	0.09
	<b>F</b>	<b>5.23 *</b>	<b>3.17 NS</b>	<b>0.48 NS</b>	
<b>C18:2n-6</b>	<b>Df</b>	2	2	4	16
	<b>MS</b>	6.96	1.46	1.57	1.64
	<b>F</b>	<b>3.26 NS</b>	<b>0.89 NS</b>	<b>0.96 NS</b>	
<b>C18:3n-3</b>	<b>Df</b>	2	2	4	16
	<b>MS</b>	0.03	0.01	0.01	0.01
	<b>F</b>	<b>2.95 NS</b>	<b>0.85 NS</b>	<b>0.83 NS</b>	

MS - srednja vrednost kvadrata (mean square, *eng.*), df - stepeni slobode (degree of freedom, *eng.*), F - faktor; \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ , NS - razlika nije statistički značajna.



#### **5.4. Diferencijalna skenirajuća kalorimetrija ukupnih lipida masnog tela gusenica kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis***

Da li sastav masnih kiselina utiče na biofizičke osobine lipida, ispitali smo analizom temperature faznih prelaza ukupnih lipida masnog tela, diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC). Kako je analizom masnih kiselina masnog tela dijapauzirajućih i nedijapauzirajućih gusenica, utvrđena razlika, kako u odnosu na stadijum gusenica, tako i na period dijapauze, ispitali smo uticaj tih razlika, kao i uticaj temperature kojoj su izložene gusenice, na parametre termalne analize.

##### **5.4.1. Temperature faznog prelaza ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica u uslovima spoljašnje sredine**

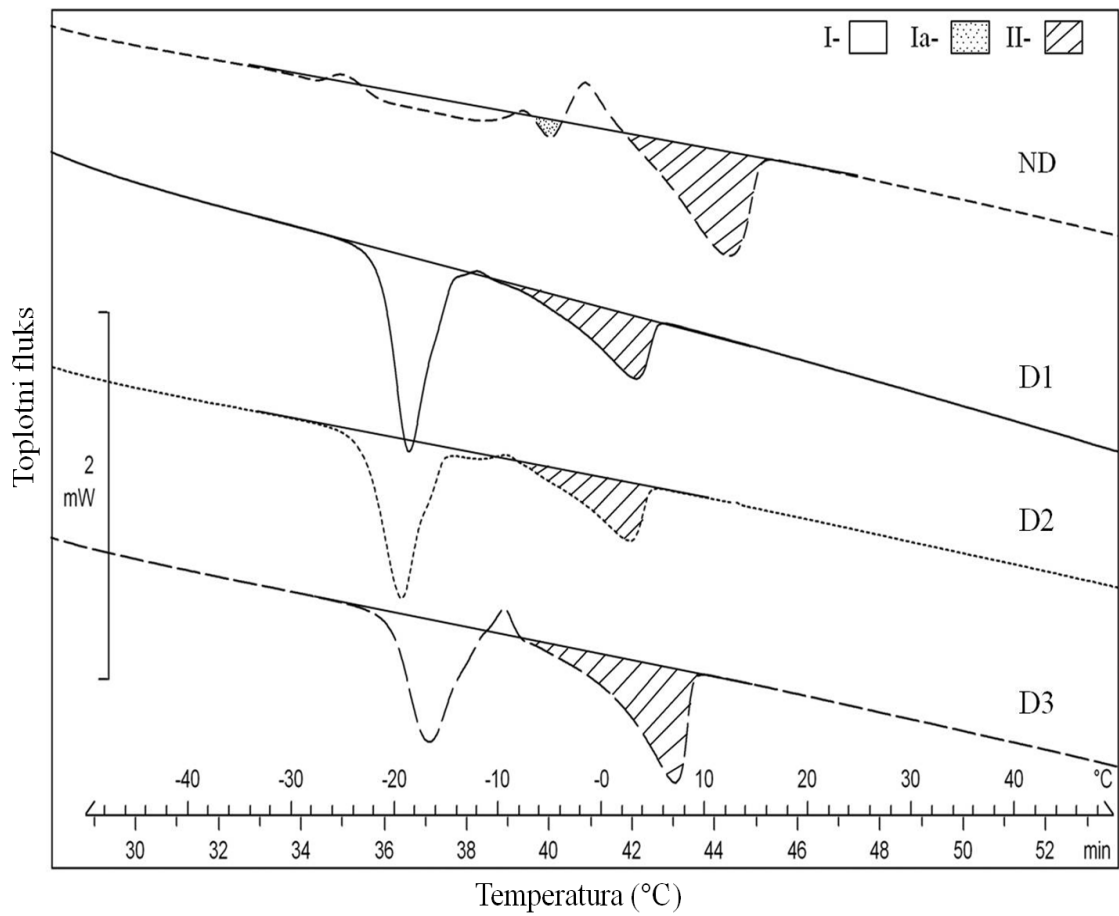
Rezultati analize temperatura faznih prelaza ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj), prikazani su na Slici 55 i Tabeli 17. Termograme dijapauzirajućih gusenica, tokom različitih faza dijapauze, karakterišu dva jasna endotermna pika, pik I i II, dok termograme nedijapauzirajućih gusenica karakterišu 3 endotermna pika, pik I, Ia (sa blažim prelazima) i jasno izražen pik II (Slika 55). Uočljivo je jasno pomeranje pika endoterme I kod dijapauzirajućih gusenica u odnosu na nedijapauzirajuće, što je još naglašenije kod pika endoterme II (Slika 55). Tako je, kod dijapauzirajućih gusenica pik I detektovan između -16.8/-19.2°C (kod nedijapauzirajućih na -14.7°C), a pik II između 3.6/7.3°C (kod nedijapauzirajućih - 12.4°C) (Slika 55; Tabela 17).

U odnosu na količinu toplotne energije, koja se usvaja od strane smeše ukupnih lipida tokom endotermnog procesa topljenja (površina ispod pika), takođe su utvrđene jasne razlike između nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica. Endotermni pik I kod gusenica u dijapauzi je statistički značajno veći, u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice. Takođe je utvrđeno da se pik I tokom dijapauze statistički značajno smanjuje, sa -64,0 mJ na -49,6 mJ, s tim da je na kraju dijapauze još uvek statistički značajno veći nego kod nedijapauzirajućih gusenica, kod kojih je -14,1mJ (Tabela 17). Nasuprot endotermnom pik I, endotermni pik II je kod dijapauzirajućih gusenica tokom svih faza dijapauze statistički značajno manji u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice. Ipak, pik II tokom dijapauze značajno raste, od - 34,9 mJ na početku dijapauze, dostiže - 56,1 mJ, na kraju dijapauze, ali je i dalje manji nego kod nedijapauzirajućih gusenica (-59,9 mJ) (Tabela 17). I temperature faznog prelaza (početak,

~Rezultati istraživanja~

pik i kraj) endoterme I i II su statistički značajno niže kod gusenica u dijapauzi, iako se pik endoterme II značajno povećava na kraju dijapauze, ostaje značajno niži u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice (Tabela 17).

Komparativnom analizom termograma ukupnih lipida i frakcije triacilglicerola (Slika 56), dobili smo visok stepen sličnosti, što ukazuje, da su promene uočene analizom ukupnih lipida celih gusenica, promene u njihovoj nepolarnoj frakciji (frakciji triacilglicerola).

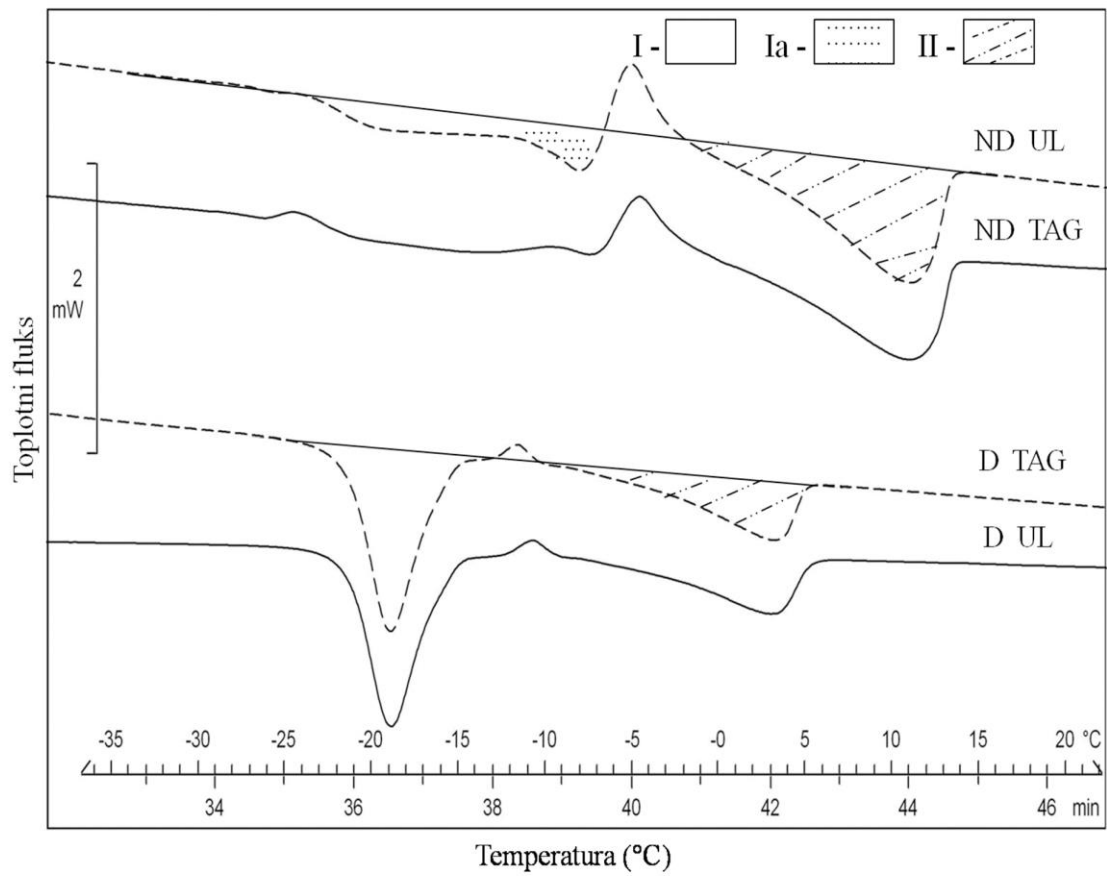


**Slika 55.** DSC termogrammi (deo pri zagrevanju) ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj). Endotermni pikovi (I, Ia i II) ukazuju na karakteristične temperature faznog prelaza.

**Tabela 17.** Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (maksimum, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih (ND) i dijavauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijavauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj).

	ND	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>	ANOVA
<b>Toplota topljenja [mJ]</b>					
<b>I</b>	-14,1±1,08 <sup>a</sup>	-61,0±2,33 <sup>b</sup>	-64,0±5,10 <sup>b</sup>	-49,6±0,62 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,05</b>
<b>Ia</b>	-3,0±0,47	/	/	/	/
<b>II</b>	-59,9±0,29 <sup>a</sup>	-34,9±0,68 <sup>b</sup>	-35,0±4,02 <sup>b</sup>	-56,1±2,51 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Pik endoterme [°C]</b>					
<b>I</b>	-14,7±0,14 <sup>a</sup>	-18,7±0,24 <sup>b</sup>	-19,2±0,30 <sup>b</sup>	-16,8±0,83 <sup>b</sup>	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Ia</b>	-5,2±0,39	/	/	/	/
<b>II</b>	12,9±0,16 <sup>a</sup>	3,8±0,20 <sup>b</sup>	3,9±0,33 <sup>b</sup>	7,3±0,16 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,001</b>
<b>Početak endoterm [°C]</b>					
<b>I</b>	-23,1±0,15 <sup>a</sup>	-27,5±1,05 <sup>b</sup>	-25,7±0,51 <sup>a</sup>	-24,6±0,76 <sup>a</sup>	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Ia</b>	-7,4±0,69	/	/	/	/
<b>II</b>	1,8±0,79 <sup>a</sup>	-10,4±0,02 <sup>b</sup>	-7,3±0,30 <sup>c</sup>	-7,9±0,14 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Kraj endoterme [°C]</b>					
<b>I</b>	8,8±0,23 <sup>a</sup>	-13,4±0,33 <sup>b</sup>	-10,6±0,23 <sup>c</sup>	-11,7±0,15 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,01</b>
<b>Ia</b>	-4,2±0,52	/	/	/	/
<b>II</b>	15,3±0,29 <sup>a</sup>	5,7±0,18 <sup>b</sup>	6,1±0,48 <sup>b</sup>	9,0±0,39 <sup>c</sup>	<b>p&lt;0,01</b>

Rezultati predstavljaju srednju vrednostu 3 ponavljanja ± standardnu grešku. Ponavljanje predstavlja pul masnog tela od šest gusenica. Različita slova u indeksu (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa, dobijenu Tukey`s HSD post hoc testom, dok ista slova ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike između grupa ( $p \geq 0.05$ ). NS - nije statistički značajna razlika.

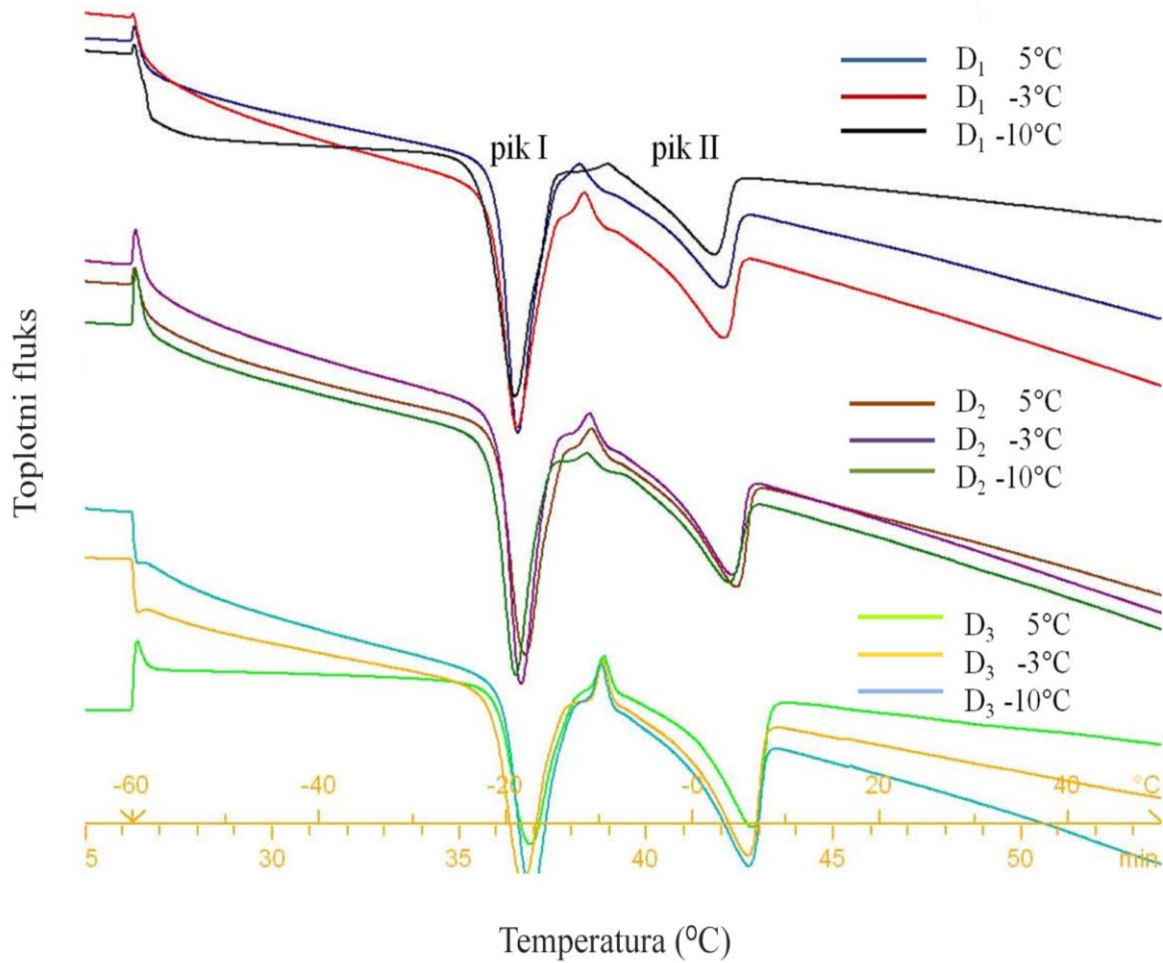


**Slika 56.** Uporedni DSC termogrami ukupnih lipida (TL) i triacilglicerola (TAG) nedijapauzirajućih (ND) i dijapauzirajućih (D) gusenica *O. nubilalis*. Endotermni pikovi (I, Ia i II) ukazuju na karakteristične temperature faznog prelaza.

#### **5.4.2. Temperature faznog prelaza ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica, u uslovima hlađenja**

Da bi utvrdili da li su promene u biofizičkim osobinama lipida indukovane dijapauzom, ili su pod direktnim uticajem temperature tokom dijapauze, diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom (DSC) odredili smo toplotu topljenja i temperature faznog prelaza ukupnih lipida masnog tela gusenica *O. nubilalis*, tokom dijapauze u uslovima kontrolisanog hlađenja (5°C, -3°C i -10°C). Dobijeni rezultati prikazani su na Slici 57 i Tabelama 18-20.

Termograme ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica u uslovima kontrolisanog hlađenja tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj) karakterišu dva jasno izražena endotermna pika (pik I i II) (Slika 57). Pik endoterme I je između -18.05/-19.03°C, dok je pik endoterme II između 3.26/7.27°C (Slika 57; Tabele 18-20). Uticaj temperature kojoj su gusenice bile izložene ne menja značajno toplotu topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida masnog tela (Tabele 18.-20.).



**Slika 57.** DSC termogrami (deo pri zagrevanju) ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom dijapauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> - sredina i D<sub>3</sub> - kraj) u uslovima kontrolisanog hlađenja (5°C, -3°C i -10°C). Endotermni pikovi (I i II) ukazuju na karakteristične temperature faznog prelaza.

**Tabela 18.** Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja na početku dijapauze ( $D_1$ ).

	$D_1$ 5°C	$D_1$ -3°C	$D_1$ -10°C	ANOVA
<b>Toplota topljenja [mJ]</b>				
<b>I</b>	-57,45±1,69	-63,08±1,68	-64,98±1,04	<b>NS</b>
<b>II</b>	-36,39±1,72	36,06±1,41	-33,23±0,84	<b>NS</b>
<b>Pik endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-18,97±0,23	-19,25±0,05	-18,60±0,28	<b>NS</b>
<b>II</b>	4,04±0,20	3,62±0,10	3,26±0,25	<b>NS</b>
<b>Početak endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-25,33±0,33	-26,06±0,25	-26,19±0,26	<b>NS</b>
<b>II</b>	-9,68±0,43	-8,92±0,76	-7,55±0,64	<b>NS</b>
<b>Kraj endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-13,42±0,27	-14,06±0,46	-14,46±0,31	<b>NS</b>
<b>II</b>	6,08±0,31	5,8±0,18	5,94±0,33	<b>NS</b>

Rezultati predstavljaju srednju vrednostu 3 ponavljanja  $\pm$  standardnu grešku. Ponavljanje predstavlja pul masnog tela od šest gusenica. Različita slova u indeksu (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa, dobijenu Tukey`s HSD post hoc testom, dok ista slova ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike između grupa ( $p \geq 0.05$ ). NS - nije statistički značajna razlika.



**Tabela 19.** Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja na sredini dijapauze (D<sub>2</sub>).

	D <sub>2</sub> 5°C	D <sub>2</sub> -3°C	D <sub>2</sub> -10°C	ANOVA
<b>Toplota topljenja [mJ]</b>				
<b>I</b>	-55,89±1,99	-59,3±2,64	-51,13±0,68	<b>NS</b>
<b>II</b>	-44,92±1,37	-40,05±1,46	37,65±1,45	<b>NS</b>
<b>Pik endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-18,80±0,20	-18,57±0,18	19,04±0,10	<b>NS</b>
<b>II</b>	5,25±0,35	4,7±0,11	4,63±0,10	<b>NS</b>
<b>Početak endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-25,66±0,36	-24,99±0,94	-24,95±0,80	<b>NS</b>
<b>II</b>	-8,46±0,75	-8,26±1,08	-6,52±0,10	<b>NS</b>
<b>Kraj endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-14,25±0,17	-13,25±0,60	-14,57±0,41	<b>NS</b>
<b>II</b>	7,17±0,33	6,66±0,13	6,88±0,13	<b>NS</b>

Rezultati predstavljaju srednju vrednostu 3 ponavljanja ± standardnu grešku. Ponavljanje predstavlja pul masnog tela od šest gusenica. Različita slova u indeksu (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa, dobijenu Tukey`s HSD post hoc testom, dok ista slova ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike između grupa ( $p \geq 0.05$ ). NS - nije statistički značajna razlika.

**Tabela 20.** Toplota topljenja i temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* izlaganih kontrolisanim uslovima hlađenja na kraju dijapauze (D<sub>3</sub>).

	D <sub>3</sub> 5°C	D <sub>3</sub> -3°C	D <sub>3</sub> -10°C	ANOVA
<b>Toplota topljenja [mJ]</b>				
<b>I</b>	-45,36±1,19	-53,42±1,04	-59,23±4,54	<b>NS</b>
<b>II</b>	-56,66±2,50	-53,05±1,95	-59,15±5,81	<b>NS</b>
<b>Pik endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-18,36±0,72	18,53±0,11	18,05±0,23	<b>NS</b>
<b>II</b>	7,27±0,37	6,43±0,07	6,30±0,21	<b>NS</b>
<b>Početak endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-26,04±0,85	-25,50±0,51	-24,98±1,07	<b>NS</b>
<b>II</b>	-7,64±0,27	-8,18±0,15	-8,28±0,06	<b>NS</b>
<b>Kraj endoterme [°C]</b>				
<b>I</b>	-12,36±0,54	-12,12±0,36	-11,84±0,37	<b>NS</b>
<b>II</b>	9,30±0,32	8,57±0,08	8,76±0,06	<b>NS</b>

Rezultati predstavljaju srednju vrednostu 3 ponavljanja ± standardnu grešku. Ponavljanje predstavlja pul masnog tela od šest gusenica. Različita slova u indeksu (a, b, c), ukazuju na statistički značajnu razliku između grupa, dobijenu Tukey`s HSD post hoc testom, dok ista slova ukazuju na nepostojanje statistički značajne razlike između grupa ( $p \geq 0.05$ ). NS - nije statistički značajna razlika.

---

## *6. Diskusija*

---

Istraživanja u okviru ove disertacije sprovedena su na kukuruznom plamencu *Ostrinia nubilalis* Hbn., kao model organizmu, sa ciljem da se sagleda uloga lipida u dijapauzi i otpornosti na hladnoću. Dijapauza predstavlja specifično stanje mirovanja, kojom mnogi insekti umerenog klimatskog područja usklađuju svoj životni ciklus sa nepovoljnim uslovima sredine, u funkciji preživljavanja (Denlinger, 1991; Leather i sar., 1993). Insekti umerenog klimatskog područja prezimljuju u raznim stadijumima razvića, tokom kojih neki stiču otpornost na hladnoću (cold hardiness, *eng.*), kako bi preživeli delovanje niskih temperatura kojima su izloženi duži period tokom zime. Kod mnogih vrsta, dijapauza i otpornost na hladnoću predstavljaju esencijalne komponente preživljavanja niskih temperatura, kao što je to slučaj i kod kukuruznog plamenca *O. nubilalis* Hbn., koji ulazi u dijapauzu u stadijumu gusenice, razvija otpornost na delovanje niske temperature i postaje otporan na ekstracelularno zamrzavanje telesnih tečnosti (freeze tolerant, *eng.*). Neophodnu energiju za preživljavanje niskih temperatura u stanju dijapauze, kao i za razvoj nakon dijapauze i reprodukciju adulta, obezbeđuju razni metaboliti, uključujući i lipide (Downer, 1985; Lee i Denlinger, 1991; Ohtsu i sar., 1993). Lipidi predstavljaju važnu grupu biomolekula, ali su i deo adaptivnih mehanizama, koji obezbeđuju strukturni i funkcionalni integritet organizma izloženog nepovoljnim uslovima za život. Lipidi pored funkcije metaboličkog goriva, čine i strukturnu komponentu ćelijskih membrana, imaju važnu ulogu u post-translacionoj modifikaciji, u ćelijskom signalingu i mnogim drugim procesima.

### **6.1. DSC analiza ukupnih lipida gusenica *O. nubilalis***

Sa ciljem razumevanja uloge lipida kod gusenica *O. nubilalis* u dijapauzi i mehanizmima otpornosti na niske temperature, primenom diferencijalne skenirajuće kalorimetrije (DSC), pratili smo razlike i promene u biofizičkim osobinama lipida, određujući toplotu topljenja i temperature faznog prelaza ukupnih lipida celih gusenica u dva različita fiziološka stanja, stanju dijapauze i nedijapauze. Primena DSC u analizi lipida celih jedinki, tkiva ili pojedinačnih lipidnih frakcija, predstavlja noviji trend u oblasti kriobiologije. Tumačenje rezultata u biološkim sistemima je često veoma otežano, zbog kompleksnosti smeše. Uobičajeno je da se za interpretaciju DSC termograma analizira deo termograma tokom zagrevanja smeše (topljenje smeše), jer je relevantniji pokazatelj fizičkog stanja lipida u prirodnim uslovima. Deo termograma tokom hlađenja (mržnjenje smeše) pod uticajem je

pothlađivanja, odnosno tačke kristalizacije, što značajno otežava njihovo tumačenje (Ohtsu i sar., 1993, 1998; Pond i Tarling, 2011).

Termograme ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom svih faza dijapauze (početak, sredina i kraj) karakterišu dva jasno izražena endotermna procesa (pik I i pik II), dok termogram ukupnih lipida nedijapauzirajućih gusenica karakterišu tri endotermna pika (pik I, Ia i II) pri čemu su pikovi I i Ia slabije izraženi dok je pik II jasno definisan (Slika 6). Kod dijapauzirajućih gusenica pikovi endotermi I i II detektovani su između  $-18,2/-19,3^{\circ}\text{C}$  (pik I) i  $3,0/7,8^{\circ}\text{C}$  (pik II), dok kod nedijapauzirajućih gusenica na  $-18,3^{\circ}\text{C}$  (pik I) i  $12,0^{\circ}\text{C}$  (pik II) (Slika 6; Tabela 1).

Dobijeni rezultati, pokazali su da se temperature faznog prelaza (početak, pik i kraj endoterme) ukupnih lipida celih dijapauzirajućih gusenica i nedijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* značajno razlikuju (Slika 6; Tabela 1). Kod dijapauzirajućih gusenica, u uslovima spoljašnje sredine, temperature faznog prelaza su značajno niže, tokom dijapauze u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice. To ukazuju na moguću uzrok razlike u biofizičkim osobinama lipida; veći stepen njihove nezasićenosti, što je najčešće rezultat promena u sastavu masnih kiselina (Ohtsu i sar., 1993; Patel i sar., 2001; Pond i Tarling, 2011).

Na osnovu DSC termograma dijapauzirajućih gusenica može se zaključiti da je promena biofizičkih osobina lipida indukovana samim ulaskom u dijapauzu ( $D_1$  - druga polovina oktobra), odnosno u periodu kada je temperatura u spoljašnjoj sredini još uvek iznad nule. Na to ukazuje i sličnost termograma lipida iz kasnijih faza dijapauze, kada se temperatura sredine postepeno smanjuje i pada daleko ispod nule tokom zime. Pretpostavljamo da se promene u sastavu ukupnih lipida celih gusenica indukuju programom dijapauze, odnosno signalima koji indukuju dijapauzu (fotoperiod je jedan od signala), a ne direktnim uticajem niskih temperatura tokom dijapauze. Tako da su promene u lipidima gusenica *O. nubilalis* ulaskom u dijapauzu, važna karika stečene strategije preživljavanja i verovatno neophodan preduslov za uspešnu realizaciju dijapauze, kao i razvijanje otpornosti na hladnoću.

Naši rezultati su u saglasnosti sa DSC podacima u radu Ohtsu i sar. (1993) u kom su praćene temperature prelaza dominantne klase ukupnih lipida triacilglicerola, kod dijapauzirajućih i nedijapauzirajućih adulta različitih vrsta roda *Drosophila*. Rezultati pomenutih istraživanja jasno ukazuju da su temperature faznog prelaza glavnog metaboličkog

goriva - triacilglicerola, značajno niže kod dijavauzirajućih nego kod reproduktivno aktivnih nedijavauzirajućih adulta. Niže temperature prelaza triacilglicerola dijavauzirajućih adulta mogu biti posledica povećanja stepena nezasićenosti masnih kiselina triacilglicerola, što je i dokazano od strane pomenutih autora. Triacilgliceroli dijavauzirajućih adulta odlikuju se većim sadržajem polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i nižim sadržajem zasićenih (SFA) i mononezasićenih masnih kiselina (MUFA), što rezultuje sveukupno većim stepenom nezasićenosti (UFA/SFA) glavnog metaboličkog goriva - triacilglicerola. Karakteristične temperature faznog prelaza u vidu dva jasno izražena endotermna pika, registrovane su na temperaturama 3°C i -30°C. Tumačenjem dobijenih rezultata, pomenuti autori pretpostavljaju da se veći deo glavnog metaboličkog goriva nalazi u tečnom stanju čak i na temperaturama daleko ispod 0°C (i na -30°C), omogućavajući tako njihovu neprekidnu mobilizaciju tokom dijavauze (Ohtsu i sar., 1993).

Kako bi proverili pretpostavku o prirodi indukcije promena biofizičkih osobina ukupnih lipida celih gusenica *O. nubilalis*, analizirali smo toplotu topljenja i temperature faznog prelaza ukupnih lipida celih gusenica nakon izlaganja uslovima kontrolisanog hlađenja, do -10°C, tokom različitih faza dijavauze (D<sub>1</sub> - početkom, D<sub>2</sub> - sredinom i D<sub>3</sub> - krajem). Termograme ukupnih lipida dijavauzirajućih gusenica *O. nubilalis* karakterišu dva jasna endotermna pika (pik I i pik II) (Slika 7). Pik endoterme I detektovan je između -18,09/-19,60°C dok je pik endoterme II detektovan između 1,64/6,54°C, i u saglasnosti su sa temperaturama prelaza ukupnih lipida dijavauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, u uslovima spoljašnje sredine.

Dobijeni rezultati potvrdili su pretpostavku da se promene u biofizičkim osobinama ukupnih lipida celih gusenica indukuju dijavauzom, a ne direktnim uticajem niskih temperatura tokom dijavauze, obzirom da dodatni uslovi kontrolisanog hlađenja dijavauzirajućih gusenica tokom različitih faza dijavauze, nisu statistički značajno menjali toplotu topljenja i temperature faznog prelaza ukupnih lipida celih gusenica *O. nubilalis* (Slike 6 i 7, Tabele 1-4).

Kod gusenica *O. nubilalis*, promene biofizičkih osobina indukovane dijavauzom, predstavljaju važan preduslov za razvijanje otpornosti na niske temperature, jer se tokom prezimljavanja tim promenama deo ukupnih lipida održava u tečnom stanju i na temperaturama daleko ispod nule, što je neophodno za održavanje fluidnosti lipida odnosno funkcionalnosti organizma u celini.

## **6.2. Promene u sastavu masnih kiselina polarne (strukturne) i nepolarne (rezervne) frakcije ukupnih lipida celih gusenica *O. nubilalis***

Sa ciljem proučavanja mogućeg uzroka promena, koje su u osnovi značajne razlike u temperaturama faznog prelaza ukupnih lipida celih dijabauzirajućih i nedijapauzirajućih gusenica, analizirali smo sastav masnih kiselina nepolarne i polarne frakcije lipida, nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih gusenica tokom različitih faza dijabauze (D<sub>1</sub> - početak, D<sub>2</sub> i D<sub>3</sub> - sredina i D<sub>4</sub> i D<sub>5</sub> - kraj) (Slika 8 A i B). Analizirane su i promene u sastavu masnih kiselina tokom različitih faza dijabauze, ali u uslovima kontrolisanog hlađenja, do -10°C, da bi se ispitao uticaj temperature na sastav masnih kiselina polarne i nepolarne frakcije lipida dijabauzirajućih gusenica.

Kvalitativno gledano, sastav masnih kiselina analiziranih frakcija nedijapauzirajućih i dijabauzirajućih gusenica *O. nubilalis* je sličan, sačinjen od 7 masnih kiselina sa 16 i 18 ugljenikovih atoma; palmitinske (C16:0), palmitooleinske (C16:1n-7), stearinske (C18:0), oleinske (C18:1n-9), vakenske (C18:1n-7), linolne (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenske (C18:3n-3) masne kiseline (Slika 8 A i B). Dobijeni rezultati o kvalitativnom sastavu masnih kiselina u saglasnosti su sa saznanjima i drugih autora kod drugih vrsta insekata (Strong, 1963; Barlow, 1963; Fast 1970; Thompson, 1973; Khani i sar., 2007; Atapour i sar., 2007).

Najzastupljenije masne kiseline u nepolarnoj frakciji (frakciji triacilglicerola) su: palmitinska (C16:0), palmitooleinska (C16:1n-7) i oleinska (C18:1n-9) masna kiselina, čineći zajedno više od 80% ukupnog pula masnih kiselina nedijapauzirajućih, i 90% ukupnog pula masnih kiselina dijabauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (Slika 8). Palmitoleinska kiselina (C16:1n-7) predstavlja dominantnu komponentu, kako kod nedijapauzirajućih gusenica tako i kod dijabauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom svih faza dijabauze (Slika 8 B; Tabela 5).

Sastav masnih kiselina polarne frakcije (strukturne) je ujednačeniji, bez jasne dominacije pojedinačne masne kiseline u pulu, kao što je to slučaj kod nepolarne frakcije (frakcije triacilglicerola) (Slika 8 A).

Od pojedinačnih masnih kiselina, palmitooleinska kiselina (C16:1n-7) predstavlja dominantnu komponentu pula nepolarne frakcije, kako kod nedijapauzirajućih, tako i kod dijabauzirajućih gusenica, tokom svih faza dijabauze. Sadržaj ove masne kiseline je statistički značajno veći u obe lipidne frakcije tokom stanja dijabauze u odnosu na nedijapauzu (dvofaktorska analiza varijanse, efekat stanja - S, Slika 10; Tabela 6). Interesantno je da je u obe analizirane frakcije ukupnih lipida gusenica kukuruznog plamenca *O. nubilalis* sadržaj

palmitooleinske kiseline (C16:1n-7) visok i čini više od 15% ukupnih masnih kiselina, s obzirom da je to izuzetak za vrste iz reda Lepidoptera, kojoj *O. nubilalis* pripada. Naime, visok sadržaj palmitooleinske kiseline je odlika vrsta iz reda Diptera (Barlow, 1963; Fast, 1970; Thompson, 1973; Downer, 1985), a postoje i predlozi da se ovaj podatak uvede kao moguća taksonomska karakteristika vrsta ovog reda. Međutim, Bracken i Harris (1969) su ipak ukazali na nekonzistentnost ovakvog podatka za Diptere, jer su detektovali visok sadržaj palmitoleinske masne kiseline (C16:1n-7) i kod nekih vrsta iz reda Lepidoptera, kao i nizak sadržaj kod nekih vrsta iz reda Diptera. Obzirom da je visok sadržaj palmitooleinske kiseline (C16:1n-7) detektovan kod vrsta iz reda Lepidoptera koje su otporne na hladnoću u stadijumu gusenice, pomenuti autori su predložili palmitoleinsku kiselinu za važan marker otpornosti na niske temperature, kod leptira koji prezimljuju u stadijumu gusenice.

Naši rezultati u potpunosti odgovaraju ovoj pretpostavci Bracken-a i Harris-a (1969) s obzirom da kukuruzni plamenac *O. nubilalis* predstavlja vrstu koja je otporna na hladnoću i to jedino u stadijumu dijapauzirajuće gusenice (Grubor-Lajšić i sar., 1991, 1992). Relativno visok sadržaj palmitooleinske kiseline i kod nedijapauzirajućih gusenica, više od 15% u ukupnom pulu masnih kiselina, ukazuje na postojanje metaboličkog puta sinteze ove masne kiseline, što može da bude odlika ove vrste i deo adaptivnog mehanizma tokom dijapauze. Na to upućuju i naši rezultati značajnog povećanja ove masne kiseline kod gusenica u dijapauzi, čineći skoro 50% pula masnih kiselina. Imajući u vidu da palmitooleinska kiselina ne vodi poreklo iz hrane, jer je kukuruzni plamenac u stadijumu gusenice štetočina pre svega kukuruznih polja i hrani se biljnim tkivom, u kom je nizak sadržaj ove kiseline (<5%), postojanje metaboličkog puta sinteze ove masne kiseline je najverovatniji. Pretpostavljamo da je to rezultat evolutivne adaptacije vrste na preživljavanje niskih temperatura. Palmitoleinska kiselina (C16:1n-7) takođe je dominantna masna kiselina ukupnih lipida celih gusenica vrste *Chilo suppressalis* iz reda Lepidoptera, koja je takođe otporna na hladnoću u stadijumu gusenice (Atapour i sar., 2007), čak je i otporna na zamrzavanje telesnih tečnosti kao što je i vrsta *O. nubilalis*.

Oleinska masna kiselina (C18:1n-9), koja je približno isto zastupljena u obe frakcije ukupnih lipida gusenica *O. nubilalis*, u polarnoj frakciji predstavlja dominantnu mononezasićenu masnu kiselinu, kako kod dijapauzirajućih gusenica tako i kod nedijapauzirajućih gusenica (Slika 8 A i B). Njen sadržaj je statistički značajno veći tokom svih faza dijapauze u odnosu na nedijapauzu (dvofaktorska analiza varijanse, efekat stadijuma - S, Slika 12; Tabela 6).



Oleinska kiselina svojim prisustvom obezbeđuje najbolju sredinu za funkcionisanje mnogih važnih membranskih proteina, tako na primer za optimalno funkcionisanje enzima ATPaze, neophodno je prisustvo značajne količine oleinske masne kiseline (C18:1n-9) u ćelijskoj membrani (Starling i sar., 1993). Povećanje sadržaja oleinske kiseline u membrani, ili kao direktan odgovor na delovanje niskih temperatura, ili tokom pripreme za njihovo nastupanje (nakon iniciranja dijapauze), može obezbediti potrebnu fluidnost membrane i sačuvati neophodnu ravnotežu, koja obezbeđuje funkcionalnost membrane (Starling i sar., 1993; Michaud i Denlinger, 2006). Bennet i sar. (1997) smatraju da je povećanje sadržaja dominantne oleinske masne kiseline (C18:1n-9) u frakciji fosfolipida, ali i frakciji triacilglicerola ukupnih lipida masnog tela larve *Eurosta solidaginis* iz reda Diptera, važan preduslov otpornosti na zamrzavanje, kako masnog tela tako i larve u celini. Pomenuti autori smatraju da dominacija oleinske kiseline u frakciji triacilglicerola, koja predstavlja najveći deo ukupnih lipida masnog tela (~90%), može biti od ključne važnosti za sprečavanje intracelularnog formiranja leda u ćelijama masnog tela. Kod dve vrste iz reda Hemiptera, Basham i Cakmak (2005) su detektovali značajno veći sadržaj oleinske kiseline (C18:1n-9) kod dijapauzirajućih gusenica u odnosu na nedijapauzirajuće. Michaud i Denlinger (2006) su takođe detektovali pomenutu promenu u frakciji fosfolipida kod vrste *Sarcophaga crassipalpis* u stadijumu lutke. Kako je to stadijum u kome je ova vrsta u dijapauzi, verovatnije je da je oleinska kiselina značajna za mehanizam otpornosti na hladnoću nezavisno od stadijuma u kom je vrsta u dijapauzi.

Naši rezultati prisustva oleinske kiseline kod kukuruznog plamenca *O. nubilalis* su u saglasnosti sa navedenim podacima. Tako je značajno prisustvo oleinske kiseline u pulu masnih kiselina ne samo dijapauzirajućih, već i nedijapauzirajućih gusenica (Slika 12; Tabela 6). Kod nedijapauzirajućih gusenica ova masna kiselina je važna za optimalno funkcionisanje važnih membranskih proteina, dok značajno povećanje ulaskom u dijapauzu, tokom koje se kod gusenica *O. nubilalis* razvija otpornost na hladnoću, doprinosi i održavanju fluidnosti membrane na niskim temperaturama, kojima su izložene tokom dijapauze. Generalno, dominacija *cis*-mononezasićenih masnih kiselina u pulu masnih kiselina, kao što su palmitooleinska (C16:1n-7) i oleinska masna kiselina (C18:1n-9), obezbeđuje fluidnost lipida u širokom opsegu temperature, zbog najpovoljnijeg položaja dvostruke veze u sredini ugljovodoničnog lanca. Centralna lokacija dvostruke veze *cis*-mononezasićenih masnih kiselina, obezbeđuje maksimalno bočno pomeranje krajeva lanca, odnosno savijanje ugljovodoničnog lanca, što doprinosi „rastresitijem“ pakovanju masnih kiselina samim tim i

većoj fluidnosti (Barton i Gunstone, 1975). Povećanje sadržaja oleinske kiseline (C18:1n-9) ulaskom u dijapauzu za održavanje fluidnosti, pre svega je energetski isplativije od sintetisanja linolne kiseline (C18:2n-6), jer ima jednu dvostruku vezu manje, tako da insekti koji povećavaju sadržaj oleinske (generalno sadržaja mononezasićenih masnih kiselina) umesto linolne kiseline tokom dijapauze troše manje metaboličke energije. Dominacija mononezasićenih masnih kiselina, omogućava održavanje fluidnosti (tečno-kristalne faze lipida) u širem temperaturnom opsegu odnosno čak i ukoliko dođe do naglog povećanja temperature u spoljašnjoj sredini tokom zime, ili naglog pada temperature tokom proleća, što se često dešava na područjima sa umerenom klimom (Michaud i Denlinger, 2006). Kod insekata koji naseljavaju umerana klimatska područja, kao što je to slučaj sa kukuruznim plamencem *O. nubilalis*, mehanizam održavanja fluidnosti lipida povećavanjem sadržaja mononezasićenih masnih kiselina daje im energetsku prednost, jer ne moraju da troše metaboličku energiju za reorganizaciju sastava masnih kiselina lipida kako bi održavali fluidnost lipida tokom karakterističnih temperaturnih fluktuacija.

Kod gusenica *O. nubilalis* polinezasićene masne kiseline, linolna (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenska masna kiselina (C18:3n-3), statistički su značajnije zastupljene u polarnoj frakciji (frakciji fosfolipida), nego u nepolarnoj frakciji (frakciji triacilglicerola) (Slike 14 i 15).  $\alpha$ -Linolenska kiselina (C18:3n-3), za razliku od polarne frakcije, u nepolarnoj frakciji dijapauzirajućih gusenica prisutna je samo u tragovima (<0,5%) (Slika 15). U sastavu masnih kiselina energetskih rezervi (frakcija triacilglicerola) insekata pre svega dominiraju zasićene i mononezasićene masne kiseline, dok se polinezasićene masne kiseline prvenstveno javljaju u frakciji fosfolipida, nezavisno od stadijuma razvića (Stanley-Samuelson i Dadd, 1983; Cripps i sar., 1986; Stanley-Samuelson i sar., 1990; Hodkova i sar., 1999; Basham i sar., 2002; Buckner i Hagen, 2003; Bozkus, 2003; Khani sar., 2007).

Naši rezultati pokazuju da je sadržaj polinezasićenih masnih kiselina, linolne i  $\alpha$ -linolenske (C18:2n-6 i C18:3n-3), statistički značajno veći u pulu masnih kiselina obe lipidne frakcije, kod nedijapauzirajućih gusenica, koje se aktivno hrane i razvijaju, u odnosu na dijapauzirajuće gusenice, koje razvijaju otpornost na hladnoću (dvofaktorska analiza varijanse, efekat stadijuma - S, Slike 14 i 15; Tabela 6). Na osnovu dobijenih rezultata pretpostavili smo, da kod gusenica *O. nubilalis* polinezasićene masne kiseline ne igraju važnu ulogu u sticanju otpornosti na hladnoću tokom dijapauze.

Mogući razlog značajno nižeg sadržaja polinezasićenih masnih kiselina (C18:2n-6 i C18:3n-3) kod dijapauzirajućih gusenica, može biti nemogućnost njihovog sintetisanja *de*

*novo*. Većina insekatskih vrsta nije sposobna da sintetiše polinezasićene masne kiseline *de novo*, tako da one predstavljaju esencijalne komponente lipida koje se moraju unositi hranom (Canavoso i sar., 2001). Manji broj vrsta, kao npr. američka bubašvaba (*Periplaneta americana*), kućni zrikavac (*Acheta domesticus*), kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum*), je sposobno da sintetiše linolnu kiselinu *de novo* (Blomquist i sar., 1991; Buckner i Hagen, 2003). Razlog favorizacije ove masne kiseline može biti aktivacija enzima  $\Delta 12$  desaturaze, koji uvodi dvostruku vezu u ugljovodinični niz mononezasićene oleinske masne kiseline (C18:1n-9) i na taj način formira polinezasićenu linolnu masnu kiselinu (C18:2n-6) (Dwyer i Blomquist, 1981; Cripps i sar., 1986; Renobales i sar., 1987; Blomquist i sar., 1991). Cripps i sar. (1986) detektovali su pomenuti enzim samo kod 14 vrsta od 40 analiziranih, na osnovu čega su zaključili da polinezasićene masne kiseline za veliku većinu insekata predstavljaju esencijalne masne kiseline.

Za razliku od *O. nubilalis* kod nekih insekatskih vrsta utvrđeno je povećanje sadržaja linolne masne kiseline (C18:2n-6) u frakciji fosfolipida (membranski lipidi), tokom dijapauze i aklimatizacije na niske temperature (Hodkova i sar., 1999; Kostal i sar., 2003; Overgaard i sar., 2005). Kako bi održali fluidnost fosfolipida tokom izlaganja niskim temperaturama, insekti koji nemaju gen za  $\Delta 12$  desaturazu (ili ne mogu da regulišu njegovu ekspresiju), umesto polinezasićenih masnih kiselina povećavaju sadržaj mononezasićenih masnih kiselina delovanjem enzima  $\Delta 9$  desaturaze. Merenjem nivoa genske ekspresije  $\Delta 9$  i  $\Delta 12$  desaturaze i njihove aktivnosti, moguće je potvrditi razlog favorizovanja određenih masnih kiselina u pulu tokom zimske dijapauze (Michaud i Denlinger, 2006).

Sastav masnih kiselina ukupnih lipida celih jedinki, pojedinačnih tkiva ili određenih lipidnih frakcija, često je predmet istraživanja koja su usmerena na dijapauzu i preživljavanje u uslovima delovanja niskih temperatura. Od strane mnogih autora potvrđeno je da se sastav masnih kiselina glavnih lipidnih frakcija triacilglicerola i fosfolipida menja prelaskom iz reproduktivno aktivnog nedijapauzirajućeg stanja u stanje dijapauze, tokom koje se kod nekih od njih razvija i otpornost na hladnoću, tako što se povećava stepen nezasićenosti, nezavisno od stadijuma razvića u kom je određena vrsta u dijapauzi. Povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina kod gusenica *O. nubilalis*, kao i mnogih drugih ispitivanih vrsta, rezultat je kvantitativnih promena u sadržaju, kod nedijapauzirajućih gusenica već prisutnih masnih kiselina, a ne pojave *de novo* sintetisanih masnih kiselina tokom pripreme za ulazak u dijapauzu (Bennet i sar., 1997; Kostal i Simek, 1998; Basham i Cakmak, 2005; Michaud i Denlinger, 2006; Khani i sar., 2007; Vukašinović i sar., 2013).

Mnogi insekti se adaptiraju na niske temperature povećavajući nezasićenost masnih kiselina strukturnih i rezervnih komponenti lipida, kao rezultat povećanja sadržaja nezasićenih masnih kiselina, uz istovremeno smanjenje sadržaja zasićenih masnih kiselina (Ohtsu i sar., 1993; Joanie i Storey, 1996; Bennet i sar., 1997; Kostal i Simek, 1998; Michaud i Denlinger, 2006; Khani i sar., 2007). Kod *O. nubilalis*, dobijeni rezultati pokazali su da je stepen nezasićenosti masnih kiselina, izražen kao odnos ukupnih nezasićenih prema ukupnim zasićenim masnim kiselinama (UFA/SFA), statistički značajno veći kod dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice u obe lipidne frakcije. Taj odnos je zraženiji u rezervnim lipidima (nepolarnoj frakciji), gde se povećava 3 puta u odnosu na membranske lipide (polarna frakcija), gde se povećava 1,7 puta (Tabele 5 i 6). Stepem nezasićenosti održao se na visokom nivou tokom cele dijapauze (Tabela 5 i 6).

U nepolarnoj frakciji (frakciji triacilglicerola) značajno povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica, rezultat je promena u sadržaju dominantnih masnih kiselina, odnosno statistički značajnog povećanja sadržaja pre svega palmitooleinske (C16:1n-7) i oleinske (C18:1n-9) od mononezasićenih masnih kiselina (Slike 10 i 12; Tabela 6), uz istovremeno značajno smanjenje sadržaja palmitinske masne kiseline (C16:0), od zasićenih (Slika 9; Tabela 6) i linolne masne kiseline (C18:2n-6) od polinezasićenih masnih kiselina (Slika 14; Tabela 6), što je potvrđeno i analizom glavnih komponenti (PCA) (Slika 16 B i D).

U polarnoj frakciji (frakcija fosfolipida) ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica sa ujednačenijim udelom prisutnih masnih kiselina, pokazan je isti trend promena u sastavu masnih kiselina; povećava se sadržaj mononezasićenih masnih kiselina, palmitoleinske (C16:1n-7), oleinske (C18:1n-9) i vakenske (C18:1n-7) (Slike 10, 12, 13; Tabela 6), uz istovremeno smanjenje sadržaja zasićenih, palmitinske (C16:0) i stearinske (C18:0) (Slike 9 i 11; Tabela 6) i polinezasićenih masnih kiselina, linolne (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenske (C18:3n-3) (Slike 14 i 15; Tabela 6) što je takođe potvrđeno i analizom glavnih komponenti (PCA) (Slika 16 A i C). Rezultati analize glavnih komponenti (PCA) potvrdili su trend promena u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida celih dijapauzirajućih i nedijapauzirajućih gusenica, u obe frakcije.

Dobijeni rezultati pokazuju da uslovi kontrolisanog hlađenja kod dijapauzirajućih gusenica nisu indukovali dodatne značajne promene u sastavu masnih kiselina polarne i

nepolarne frakcije ukupnih lipida (dvofaktorska analiza varijanse, efekat temperature - T, Tabele 8 i 9).

Generalno, promene u sastavu masnih kiselina lipidnih frakcija gusenica *O. nubilalis* indukovane su dijapauzom, a ne direktnim delovanjem niske temperature. To je dokazano statistički značajnim povećanjem stepena nezasićenosti masnih kiselina lipidnih frakcija već na početku dijapauze (D<sub>1</sub>), kada je temperatura u spoljašnjoj sredini bila iznad nule. Takođe, dodatno izlaganje gusenica kontrolisanim uslovima hlađenja, nije indukovalo značajne promene u sastavu lipidnih frakcija tokom različitih faza dijapauze.

Naši rezultati su u saglasnosti sa podacima za mnoge druge vrste insekata. Tako je kod vrste *Sarcophaga crassipalpis*, koja zaustavlja svoje ontogenetsko razviće i ulazi u dijapauzu u stadijumu lutke, zabeležen značajan rast stepena nezasićenosti masnih kiselina membranskih lipida, koji zajedno sa sintezom značajne količine glicerola i antifriz proteina obezbeđuje vrsti otpornost na hladnoću u ovom stadijumu razvića (Michaud i Denlinger, 2006). Kod vrsta roda *Drosophila*, sastav masnih kiselina triacilglicerola dijapauzirajućih adulta, odlikuje se većim sadržajem polinezasićenih masnih kiselina i nižim sadržajem zasićenih i mononezasićenih masnih kiselina, što rezultuje sveukupno većim stepenom nezasićenosti glavnog metaboličkog goriva kod ove vrste tokom dijapauze (Ohtsu i sar., 1993). Kod vrste *Eurosta solidaginis* otporne na zamrzavanje, uočeno je povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina u obe lipidne frakcije (triacilglicerola i fosfolipida) ukupnih lipida masnog tela (Bennet i sar., 1997). Pored navedenih i mnogi drugi autori pokazali su postojanje jasne veze između inicijacije dijapauze i povećanja stepena nezasićenosti masnih kiselina lipida (Kuthiala i Chipendale, 1989; Shimizu, 1992; Kostal i Simek, 1998; Hodkova i sar., 1999; Kostal i sar., 2003; Bashan i Cakmak, 2005; Tang i Pikal, 2005; Overgaard i sar., 2008). Arktička kolembola *Megaphorura arctica*, Tullberg (raniji naziv vrste *Onychiurus arcticus*) stekla je poseban vid strategije preživljavanja niskih temperatura, koji je označen terminom krioprotektivna dehidratacija. Ova strategija preživljavanja nije indukovala jasan obrazac promena u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida celih jedinki, ali jeste u sastavu masnih kiselina glavnih lipidnih frakcija, nepolarne frakcije (frakcije triacilglicerola) i polarne frakcije (frakcije fosfolipida) u vidu relokalizacije masnih kiselina između frakcija, pri čemu se stepen nezasićenosti masnih kiselina u nepolarnoj frakcija značajno smanjio, dok se u polarnoj povećao, tokom hlađenja (Purać i sar. 2011). Ovaj vid promena je energetski manje zahtevan od *de novo* sinteze masnih kiselina, tako da može dati metaboličku prednost insektima koji u stanju hipometabolizma preživljavaju niske temperature.

Mnoge insekatske vrste, koje su otporne na hladnoću, stekle su sposobnost da menjaju sastav masnih kiselina lipida, sa ciljem očuvanja njihove funkcionalnosti odnosno fluidnosti, povećavajući stepen nezasićenosti masnih kiselina lipida ulaskom u dijapauzu, kada se organizam izlaže uticaju niskih temperatura. Promena stepena nezasićenosti masnih kiselina se odražava na temperature faznog prelaza lipida (Ohtsu i sar., 1993; Hochachka i Somero, 2002; Haubert i sar., 2008; Van Dooremalen i Ellers, 2010; Goto i Katagiri, 2011). Povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina lipida snižava temperature prelaza lipida.

Povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina lipida, kako strukturnih tako i rezervnih, esencijalna je komponenta preživljavanja niskih temperatura, jer obezbeđuje funkcionalnu strukturnu organizaciju i dinamičke osobine membranama tokom niskih temperatura, dok kod rezervnih lipida obezbeđujući fluidnost i omogućava njihovo neprekidno korišćenje. Rezervni lipidi (masne kiseline triacilglicerola) bez povećanja nezasićenosti masnih kiselina pri niskim temperaturama, ne bi mogli da se koriste kao energetska gorivo, zbog mogućeg prelaska iz tečno kristalne u gel fazu, kada očvršćavaju i postaju neodgovarajući supstrat za lipaze, a na taj način i neodgovarajući izvor energije; kao što bi i membranski lipidi zbog istog razloga postali nefunkcionalni (Ohtsu i sar., 1993, 1998; Hazel, 1995; Joannis i Storey 1996; Bennet i sar., 1997; Kakela i Hyvarinen, 1996; Kostal i Simek, 1998; Van Dooremalen i sar., 2011). Evolutivno, prednost je data insektima koji su stekli sposobnost da reorganizuju sastav masnih kiselina strukturnih i rezervnih lipida, u skladu sa temperaturom spoljašnje sredine. Kako je kod mnogih insekatskih vrsta otpornost na hladnoću jasno povezana sa dijapauzom, do reorganizacije masnih kiselina lipida najčešće dolazi iniciranjem dijapauze određenim faktorima (Azuma i sar., 1989; Michaud i Denlinger, 2006; Ohtsu i sar., 1993; Vukašinović i sar., 2013).

Promena fluidnosti lipidnog dvosloja ćelijske membrane usled promene ambijentalne temperature je poznat fenomen „homeoviskozne adaptacije“ (HVA) (Hazel, 1995; Sinensky, 1974). Naime, ćelijska membrana koja funkcioniše kao selektivna barijera između intraćelijskog i ekstraćelijskog prostora, pri optimalnoj temperaturi organizma je u tečno-kristalnoj fazi. Kada je izložena nižim temperaturama, iz tečno-kristalne faze postepeno prelazi u gel fazu, usled čega delimično gubi i svoja selektivna svojstva (Cossins i Raynard, 1987; Hazel, 1995). Jedan od načina da se postigne HVA jeste povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina membrane, kako bi se nadoknadio negativan uticaj niske temperature. Veći stepen nezasićenosti masnih kiselina membrane, postiže se povećanjem sadržaja mononezasićenih ili polinezasićenih masnih kiselina sa dugim lancem, koji svojim

prisustvom postižu veću neuređenost strukture lipidnog dvosloja, koja će sa takvom strukturom sa manjom verovatnoćom podleći faznom prelazu, tokom niskih temperatura (Lee i Chapman, 1987; Hazel, 1995; Hochachka i Somero, 2002). Pored povećanja stepena nezasićenosti masnih kiselina membrane, izmene koje doprinose HVA su: modifikacije polarnih glava fosfolipida u membrani, promene sadržaja holesterola kao i položaj nezasićenih masnih kiselina na molekulu glicerola (Cossins i Raynard, 1987; Hazel, 1995; Hochachka i Somero, 2002). Sve je veći broj studija koje predlažu da se tumačenje fenomena „homeoviskozne adaptacije“ (HVA) proširi na lipide generalno, jer održavanje fluidnosti rezervnih lipida takođe se pokazalo da je adaptivnog karaktera, kao što je i održavanje fluidnosti membranskih lipida (Hochachka i Somero, 2002; Van Dooremalen i Ellers, 2010; Van Dooremalen i sar., 2011).

Pomenuti fazni prelaz (iz tečno-kristalne u gel fazu) membranskih lipida može dovesti do smanjenja aktivnosti mnogih enzima vezanih za membranu i do povećanja propustljivosti membrane za natrijumove i kalcijumove jone kao i molekule vode (Watson i Morris, 1987; Hazel, 1995). Održavanjem adekvatne fluidnosti membrane obezbeđuje potreban stepen difuzije/stopu metaboličkih procesa, za pravilno funkcionisanje organizma u celini (Lee i Chapman, 1987). Mnogi autori su potvrdili da su sezonske promene u otpornosti na hladnoću insekata povezane sa promenama u sastavu masnih kiselina membrana (Bennet i Lee, 1997; Kostal i Simek, 1998; Ohtsu i sar., 1993, 1998; Michaud i Denlinger, 2006).

Dobijeni rezultati potvrdili su pretpostavku da su promene u biofizičkim osobinama ukupnih lipida celih gusenica rezultat promena u sastavu masnih kiselina glavnih lipidnih frakcija ukupnih lipida gusenica *O. nubilalis* i da se one indukuju dijapauzom, a ne direktnim uticajem niskih temperatura tokom dijapauze. Povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina glavnih lipidnih frakcija predstavlja važan preduslov za razvijanje otpornosti na niske temperature kod *O. nubilalis*, jer snižava temperature prelaza ukupnih lipida i na taj način ih održava u tečnom stanju čak i na temperaturama daleko ispod 0°C, što je neophodno za održavanje fluidnosti lipida odnosno funkcionalnosti organizma u celini.

### **6.3. Lipidi hemolimfe i masnog tela: klase lipida, sastav masnih kiselina ukupnih lipida i dinamika promena masnih kiselina tokom dijapauze**

Sastav lipida masnog tela, kao glavnog depoa rezervnih lipida, kao i hemolimfe, glavnog cirkulišućeg tkiva, određen je analizom ukupnih lipida i zastupljenosti pojedinačnih klasa lipida. Ukupne lipide kukuruznog plamenca *O. nubilalis* kao i većine insekata, karakterišu sledeće frakcije lipida: polarni lipidi (PL), diacilgliceroli (DAG), steroli (ST), slobodne masne kiseline (FFA), triacilgliceroli (TAG) i frakcija ugljovodonika (H) (Tabela 10).

Utvrđeno je da u masnom telu kukuruznog plamenca *O. nubilalis*, najveći procenat zauzima frakcija triacilglicerola ~90%, kako kod dijapauzirajućih, tako i kod nedijapauzirajućih gusenica, dok su u ukupnim lipidima hemolimfe zastupljene ujednačeno sve frakcije lipida, bez jasne dominacije pojedinačne frakcije (Tabela 10).

Između nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* postoji i kvalitativna i kvantitativna razlika u sastavu ukupnih lipida masnog tela i hemolimfe (Tabela 10). U hemolimfi, relativni procenat diacilglicerola (DAG) i slobodnih masnih kiselina (FFA) je značajno manji kod dijapauzirajućih nego kod nedijapauzirajućih gusenica, dok je sadržaj triacilglicerola (TAG) značajno veći kod dijapauzirajućih gusenica, nego nedijapauzirajućih gusenica (Tabela 10). Krajem dijapauze uočeno je značajno smanjenje sadržaja frakcije triacilglicerola (TAG). Kod hemolimfe, frakcije sterola (ST) i polarnih lipida (PL) predstavljaju značajan udeo lipida, ali bez značajne promene u njihovom sadržaju, kako između nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica tako ni tokom različitih faza dijapauze (Tabela 10).

Kod *O. nubilalis*, dominantnu frakciju ukupnih lipida masnog tela čini frakcija triacilglicerola (TAG) ~80-90%, kako kod nedijapauzirajućih tako i kod dijapauzirajućih gusenica (Tabela 10), što ukazuje da je masno telo glavno mesto sinteze i deponovanja ove energetske rezerve, što je u saglasnosti sa rezultatima i drugih autora (Downer, 1985; Keeley, 1985; Buckner i Hagen, 2003; Vukašinović i sar., 2013). Frakcija slobodnih masnih kiselina (FFA) i ugljovodonika (H) nije detektovana u sastavu ukupnih lipida dijapauzirajućih gusenica; frakcija ugljovodonika (H) nije detektovana ni u nedijapauzirajućim gusenicama (Tabela 10).

Kod insekata, dominantnu klasu lipida čine triacilgliceroli, sa ulogom energetske rezerve, iz koje se zavisno od potreba organizma, oslobađaju masne kiseline, čijom se



oksidacijom dobija neophodna energija. Kako bi obezbedile energetske potrebe tokom dijapauze, razvića i reprodukcije nakon dijapauze (Arrese i Soulages, 2010), insekti značajno povećavaju sadržaj triacilglicerola tokom faze pripreme za ulazak u dijapauzu. Insekti, zajedno sa mnogim beskičmenjacima, nisu sposobni da sintetišu sterole *de novo*, pa ih za normaran rast i razvoj, moraju unositi hranom, ili obezbediti pomoću simbiotskih organizama. Holesterol predstavlja glavni sterol insekata koji im je neophodan jer predstavlja strukturnu komponentu ćelijskih membrana, prekursor je za sintezu hormona presvlačenja, ekdizona i njegovih homologa poput 20-hidroksiekdizona (Svoboda, 1999; Canavoso i sar., 2001).

#### **6.4. Promene u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela**

Kvalitativno, sastav masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela je isti, sačinjen od 7 masnih kiselina sa 16 i 18 ugljenikovih atoma; palmitinske (C16:0), palmitoleinske (C16:1n-7), stearinske (C18:0), oleinske (C18:1n-9), vakenske (C18:1n-7), linolne (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenske (C18:3n-3) masne kiseline. Napolarna frakcija ukupnih lipida gusenica kukuruznog plamenca *O. nubilalis*, koja čini više od 80% lipida masnog tela, odlikuje se istim sastavom i dinamikom promena u sastavu masnih kiselina tokom dijapauze kao i ukupni lipidi njenog glavnog depoa- masnog tela (Vukašinović i sar., 2013).

Kako bi utvrdili da li je trend promena u sastavu masnih kiselina tkiva, hemolimfe i masnog tela isti kao i kod glavnih lipidnih frakcija, odnosno da li se one indukuju dijapauzom, a ne direktnim delovanjem niskih temperatura, analizirali smo sastav masnih kiselina ukupnih lipida tkiva gusenica, hemolimfe i masnog tela tokom različitih faza dijapauze (početkom, sredinom i krajem) u odnosu na nedijapazu, u uslovima spoljašnje sredine i tokom različitih faza dijapauze, u uslovima kontrolisanog hlađenja, do -10°C.

Dominantne masne kiseline ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela gusenica *O. nubilalis* su: palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1n-7), oleinska (C18:1n-9) i linolna (C18:2n-6) masna kiselina (Slika 31 A i B). Značajna dominacija sadržaja palmitoleinske masne kiseline (C16:1n-7) u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida masnog tela, čineći čak ~50% pula kod dijapauzirajućih gusenica, je u saglasnosti sa našim prethodnim saznanjima o dominaciji pomenute masne kiseline u nepolarnoj frakciji (frakciji triacilglicerola) ukupnih

lipida celih gusenica *O. nubilalis*, čiji glavni depo predstavlja upravo masno telo (Slika 33; Tabela 11). Saznanja o dominaciji sadržaja palmitoleinske masne kiseline (C16:1n-7) u nedijapauzirajućim i dijapauzirajućim gusenicama, potvrdila su našu pretpostavku o tome da ona predstavlja metaboličku odliku vrste *O. nubilalis*, koja je čini izuzetkom među velikom većinom vrsta pripadnika reda Lepitoptera (Buckner i Hagen, 2003). Dominacija pomenute masne kiseline uočena je još kod jedne vrste iz reda Lepidoptera, vrste *Chilo suppressalis*, koja dijapauzira u stadijumu gusenice, kada je takođe i otporna na zamrzavanje telesnih tečnosti, kao što je i *O. nubilalis* (Grubor-Lajsic i sar., 1991, 1992; Atapour i sar., 2007). Dominacija ove mononezasićene masne kiseline, koja je inače karakteristična za vrste iz reda Diptera može ukazati na moguću ulogu u sticanju otpornosti na zamrzavanje telesnih tečnosti (Atapour i sar., 2007).

Komparativnom analizom sadržaja masnih kiselina tkiva nedijapauzirajuće i dijapauzirajuće grupe gusenica *O. nubilalis*, pokazali smo da u oba tkiva postoji statistički značajna razlika između dva analizirana fiziološka stanja, dijapauze i nedijapauze (Tabela 12). Od strane mnogih autora potvrđeno je da se sastav masnih kiselina ukupnih lipida celih jedinki, tkiva ili pojedinačnih lipidnih frakcija menja, prelaskom iz reproduktivno aktivnog nedijapauzirajućeg stanja u stanje dijapauze, tokom koje se kod nekih od njih razvija i otpornost na niske temperature, tako što se povećava stepen njihove nezasićenosti, nezavisno od stadijuma razvića u kom vrsta dijapauzira. Povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina kod gusenica *O. nubilalis*, kao i mnogih drugih ispitivanih vrsta, rezultat je kvantitativnih promena u sadržaju kod nedijapauzirajućih gusenica već prisutnih masnih kiselina, a ne pojave *de novo* sintetisanih masnih kiselina tokom pripreme za ulazak u dijapauzu (Ikan i sar., 1970; Azuma i sar., 1989; Bennet i sar., 1997; Kostal i Simek, 1998; Hodkova i sar., 1999; Basham i Cakmak, 2005; Michaud i Denlinger, 2006; Khani i sar., 2007). Mnogi insekti se adaptiraju na niske temperature povećavajući nezasićenost masnih kiselina svojih tkiva, kao rezultat povećanja sadržaja nezasićenih masnih kiselina uz istovremeno smanjenje zasićenih masnih kiselina (Ohtsu i sar., 1993; Joanise i Storey, 1996; Bennet i sar., 1997; Kostal i Simek, 1998; Michaud i Denlinger, 2006; Khani i sar., 2007; Vukašinović i sar., 2013). Pokazano je da postoji razlika između različitih tkiva istog organizma u stepenu promena u sastavu masnih kiselina (Kostal i Simek, 1998).

Ulaskom u dijapauzu, promene u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida tkiva rezultovale su značajnim povećanjem stepena nezasićenosti masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela, zbog značajnog povećanja sadržaja mononezasićenih masnih

kiselina, palmitoleinske (C16:1n-7), oleinske (C18:1n-9) i vakenske (C18:1n-7), uz istovremeno smanjenje sadržaja zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina, palmitinske (C16:0), stearinske (C18:0), linolne (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenske (C18:3n-3) (dvofaktorska analiza varijanse, efekat stanja - S, Tabele 11 i 12) što je potvrđeno i analizom glavnih komponenti (PCA) (Slika 40. A, B).

Generalno, kontrolisano hlađenje gusenica tokom različitih faza dijapauze nije indukovalo dodatne značajne promene u sastavu masnih kiselina hemolimfe i masnog tela dijapauzirajućih gusenica (Tabele 15 i 16).

Obzirom da se promene u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida hemolimfe i masnog tela javljaju na početku dijapauze (druga polovina oktobra), kada gusenice *O. nubilalis* još nisu bile izložene uticaju niskih temperatura u životnoj sredini, i da dodatno hlađenje gusenica tokom različitih faza dijapauze nije indukovalo značajne promene u sastavu masnih kiselina tkiva, zaključili smo da su promene u sastavu masnih kiselina lipida, generalno kod *O. nubilalis* indukovane dijapauzom, odnosno istim faktorom koji indukuje i dijapauzu, a ne direktnim uticajem niske temperature spoljašnje sredine tokom zimskih meseci kao što je to slučaj sa sintezom glicerola, glavnog krio/anhidroprotektora i menadžmentom telesne vode kod dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* (Grubor-Lajsic G., 1991, 1992; Stanic i sar., 2004; Kojić i sar., 2010).

Kod insekata, koji naseljavaju umerena klimatska područja, koja se odlikuju veoma nepredvidivim temperaturnim promenama, sposobnost remodelovanja sastava masnih kiselina lipida, neophodna je komponenta preživljavanja niskih temperatura (Michaud i Denlinger, 2006). Kod insekata otpornih na hladnoću, koji naseljavaju umerena klimatska područja kao i *O. nubilalis*, dominacija mononezasićenih masnih kiselina (MUFA), palmitoleinske (C16:1n-7) i oleinske (C18:1n-9) daje im prednost, održavajući fluidnost u širokom opsegu temperature. Dominacijom pomenutih masnih kiselina, održavanje tečno-kristalne faze lipida membrane je omogućeno čak i kada se temperatura sredine neočekivano poveća tokom zime ili smanji tokom proleća, bez dodatnog utroška metaboličke energije. Naša saznanja (Vukašinović i sar., 2013) u saglasnosti su sa saznanjima drugih autora (Ohtsu i sar., 1993; Michaud i Denlinger, 2006; Atapour i sar., 2007).

Razlog zbog kojih insekti umerenog klimatskog područja otporni na hladnoću mogu imati prednost, ukoliko u sastavu masnih kiselina dominiraju pomenute mononezasićene masne kiseline, obezbeđuje njihova struktura. Palmitoleinska (C16:1n-7) i oleinska masna

kiselina (C18:1n-9) imaju najpovoljniju lokalizaciju odnosno položaj dvostruke veze koju mononezasićene masne kiseline mogu da imaju, u sredini ugljovodoničnog lanca. Centralna lokalizacija dvostruke veze kod mononezasićenih masnih kiselina, obezbeđuje maksimalno bočno pomeranje krajeva lanca, odnosno savijanje ugljovodoničnog lanca, što doprinosi rastresitijem pakovanju masnih kiselina u sastavu lipida, rastresitijem pakovanju odnosno većoj fluidnosti lipida (Barton i Gunstone, 1975). Položaj mononezasićene masne kiseline na molekulu glicerolu dodatno može da utiče na pakovanje masnih kiselina, samim tim i na fluidnost. Nezasićena masna kiselina na položaju *sn-2* značajnije doprinosi rastresitosti samim tim i fluidnosti lipida, nego ista na položaju *sn-1* (Kostal i sar., 2003).

Za razliku od kukuruznog plamenca *O. nubilalis*, mnoge insekatske vrste tokom zimske dijapauze održavaju fluidnost lipida, membrane i depoa, povećavajući sadržaj oleinske i neke polinezasićene masne kiseline, najčešće linolne masne kiseline (C18:2n-6) (Hodkova i sar., 1999; Kostal i sar., 2003; Overgaard i sar., 2005, Khani i sar., 2007). Kod *O. nubilalis*, polinezasićene masne kiseline (C18:2n-6 i C18:3n-3) ne igraju ključnu ulogu u mehanizmima otpornosti na niske temperature, jer se njihov sadržaj u sastavu masnih kiselina tkiva, hemolimfe i masnog tela, kao i glavnih lipidnih frakcija celih gusenica statistički značajno smanjuje ulaskom u dijapauzu, kada ova vrsta stiče otpornost na hladnoću (Vukašinović i sar., 2013). Polinezasićene masne kiseline (C18:2n-6 i C18:3n-3), nisu ključne za sticanje otpornosti na hladnoću jer gusenice *O. nubilalis* najverovatnije nisu sposobne da ih sintetišu *de novo*, već ih moraju unositi putem hrane u periodu kada se aktivno hrane. Kako, gusenice kukuruznog plamenca prestaju da se hrane tokom jeseni, kada završe sa fazom pripreme za dijapauzu, promene koje su detektovane kod dijapuzirajućih gusenica tokom različitih faza dijapauze nisu pod uticajem hrane, već su rezultat endogene sinteze masnih kiselina kao što je to slučaj i kod mnogih drugih insektaskih vrsta (Stanley-Samuelson i sar., 1988; Joannis i Storey, 1996).

Možemo zaključiti da promene u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida oba tkiva indukovane su programom dijapauze i da predstavljaju važnu komponentu strategije preživljavanja niskih temperatura kod gusenica *O. nubilalis*.

### **6.5. Dijapauza indukuje promene u biofizičkim osobinama ukupnih lipida masnog tela gusenica *O. nubilalis***

Kako bi se procenio uticaj promena u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih, i dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom različitih faza dijapauze, pratili smo uticaj temperature na ukupne lipide masnog tela, primenom termoanalitičke tehnike diferencijalne skenirajuće kalorimetrije, određujući toplotu topljenja i temperature faznog prelaza ukupnih lipida masnog tela gusenica *O. nubilalis*.

Dobijeni rezultati pokazali su da su temperature faznog prelaza ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, značajno niže kod dijapauzirajućih gusenica tokom svih faza dijapauze u odnosu na temperature faznog prelaza ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih gusenica. Kod dijapauzirajućih gusenica, pik endoterme I detektovan je između  $-16.8/-19.2^{\circ}\text{C}$ , dok je pik endoterme II detektovan između  $3.6/7.3^{\circ}\text{C}$ . Kod nedijapauzirajućih gusenica pik endoterme I detektovan je na  $-14.7^{\circ}\text{C}$ , dok je pik endoterme II detektovan na  $12.4^{\circ}\text{C}$  (Slika 55; Tabela 17).

Kako bi utvrdili da li su promene biofizičkih osobina indukovane dijapauzom, ili su pod direktnim uticajem temperature, analizirali smo ukupne lipide masnog tela dijapauzirajućih gusenica koje su izlagane kontrolisanim uslovima hlađenja, do  $-10^{\circ}\text{C}$ , tokom različitih faza dijapauze (početkom, sredinom i krajem). Pikovi endoterme I i II, ukupnih lipida masnog tela dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, detektovani su između  $-18.05/-19.03^{\circ}\text{C}$  (pik I) i  $3.26/7.27^{\circ}\text{C}$  (pik II) (Slika 56; Tabele 18-20).

Analiziranjem sastava masnih kiselina ukupnih lipida masnog tela, došli smo do saznanja da se stepen nezasićenosti masnih kiselina masnog tela značajno veći kod dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* tokom svih faza dijapauze u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice (Vukašinović i sar., 2013). Dobijeni rezultati na diferencijalnom skenirajućem kalorimetru, potvrdili su da se promene u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida masnog tela gusenica *O. nubilalis* odlikavaju na promene biofizičkih osobina lipida datog tkiva.

Poznato je da promene u stepenu nezasićenosti masnih kiselina lipida utiču na biofizičke osobine lipida, oslikavajući se na njihove temperature faznog prelaza (Patel i sar., 2001; Pond i Tarling, 2011). Sastav masnih kiselina menja se tokom direktnog izlaganja niskim temperaturama ili tokom pripreme za njeno nastupanje i predstavlja važnu kariku u mehanizmima adaptacije na niske temperature. U funkciji je održavanja fluidnosti lipida, kako strukturnih tako i rezervnih lipida.

Kod dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, ukupni lipidi masnog tela imaju značajnije niže temperature faznog prelaza (pik, početak i kraj endoterme) nego lipidi masnog tela nedijapauzirajućih gusenica zbog značajnije većeg stepena nezasićenosti masnih kiselina ukupnih lipida masnog tela, što je rezultat povećanja sadržaja mononezasićenih masnih kiselina uz istovremeno smanjenje sadržaja zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina (Vukašinović i sar., 2013). Kod dijapauzirajućih gusenica, pikovi faznog prelaza u vidu dva jasno izražena endotermna pika, registrovani su na temperaturama između  $-18.05/-19.03^{\circ}\text{C}$  (pik I) i na temperaturama oko  $3.26/7.27^{\circ}\text{C}$  (pik II) (Slika 55). Dobijeni rezultati ukazuju da se deo lipida masnog tela nalazi u tečnom stanju i na temperaturama daleko ispod nule, što omogućava njihovo korišćenje i tokom dijapauze, kada temperatura sredine pada i daleko ispod nule (Vukašinović i sar., 2013). Pri tome, temperature faznog prelaza, pik, početak i kraj endoterme I i II, su statistički značajno niže kod gusenica u dijapauzi (Tabela 17) Na kraju dijapauze dolazi do smanjenja stepena nezasićenosti masnih kiselina masnog tela (sadržaja masnih kiselina koje menjaju nezasićenost), što se odražava i na biofizičke osobine lipida masnog tela, obzirom da pik endoterme II značajno raste na kraju dijapauze, ali je i dalje značajno niži u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice (Tabela 17).

Komparativnom analizom termograma ukupnih lipida celih gusenica i frakcije triacilglicerola, dobili smo visok stepen sličnosti između njih što ukazuje na to da se promene uočene analiziranjem ukupnih lipida celih gusenica mogu pretežno pripisati promenama u njihovoj nepolarnoj frakciji (frakciji triacilglicerola), koja čini njihov najveći deo ~80% (Vukašinović i sar., 2013) sa malim udelom uticaja ostalih frakcija lipida na proces topljenja (Slika 56).

Naša saznanja u saglasnosti su sa dobijenim rezultatima u radu Ohtsu i sar. (1993), u kom su praćene temperature prelaza dominantne klase ukupnih lipida triacilglicerola, kod dijapauzirajućih i nedijapauzirajućih adulta različitih vrsta roda *Drosophila*. Rezultati pomenutih istraživanja jasno ukazuju da su temperature prelaza glavnog metaboličkog goriva - triacilglicerola, značajno niže kod dijapauzirajućih adulta nego reproduktivno aktivnih

nedijapauzirajućih adulta (Ohtsu i sar., 1993). Niže temperature prelaza dijapauzirajućih adulta mogu biti razlog značajnog povećanja stepena nezasićenosti masnih kiselina klase triacilglicerola, što je i dokazano od strane pomenutih autora. Triacilgliceroli dijapauzirajućih adulta kod pomenutih vrsta odlikuju se većim sadržajem polinezasićenih masnih kiselina (PUFA) i nižim sadržajem zasićenih (SFA) i mononezasićenih masnih kiselina (MUFA), što rezultuje sveukupno većim stepenom nezasićenosti (UFA/SFA) glavnog metaboličkog goriva. Karakteristične temperature prelaza u vidu dva jasno izražena endotermna pika, registrovane su na temperaturama 3°C i -30°C. Na osnovu dobijenih rezultata pomenuti autori pretpostavljaju da se deo glavnog metaboličkog goriva triacilglicerola nalazi u tečnom stanju čak i na temperaturama ispod 0°C, omogućujući tako njihovu neprekidnu mobilizaciju tokom dijapauze (Ohtsu i sar., 1993). Na osnovu iznetog se može videti da promene sadržaja masnih kiselina lipida koje su odgovorne za povećanja stepena zasićenosti može biti različit, ali je ishod isti, promena biofizičkih osobina sa ciljem održavanja fluidnosti (Ohtsu i sar., 1993; Vukašinović i sar., 2013).

Dobijeni rezultati potvrdili su pretpostavku da su promene u biofizičkim osobinama ukupnih lipida masnog tela rezultat promena u sastavu masnih kiselina ukupnih lipida masnog tela gusenica *O. nubilalis* koje se indukuju dijapauzom, a ne direktnim uticajem niskih temperatura tokom dijapauze. Kod *O. nubilalis* kao i ostalih insekata dominantnu klasu lipida čine triacilgliceroli sa ulogom energetskog depoa iz kojeg se, zavisno od potreba organizma, oslobađaju masne kiseline, čijom se oksidacijom dobija neophodna energija. Glavno mesto nakupljanja i čuvanja ove energetske rezerve i kod *O. nubilalis* predstavlja masno telo, obzirom da 80-90% ukupnih lipida masnog tela čine triacilgliceroli, što je u saglasnosti sa saznanjima drugih autora (Downer, 1985; Keeley, 1985; Buckner i Hagen, 2003; Vukašinović i sar., 2013). Rezervni lipidi (masne kiseline triacilglicerola) bez povećanja nezasićenosti masnih kiselina pri niskim temperaturama, ne bi se mogli koristiti uvek kao energetsko gorivo zbog mogućeg prelaska u gel fazu, kada očvršćavaju i postajaju neodgovarajući substrat za lipaze, a na taj način i neodgovarajući izvor energije (Ohtsu i sar., 1993; Hazel, 1995; Joannis i Storey 1996; Bennet i sar., 1997; Kakela i Hyvarinen, 1996; Kostal i Simek, 1998).

Povećanje stepena nezasićenosti masnih kiselina ukupnih lipida predstavlja važan mehanizam za razvijanje otpornosti na niske temperature kod *O. nubilalis*, jer snižava temperature faznog prelaza ukupnih lipida i na taj način ih održava u tečnom stanju čak i na temperaturama daleko ispod 0°C (Vukašinović i sar., 2013).

---

## *7. Zaključci*

---



## ~Zaključci~

Uloga lipida u dijapauzi insekata sa aspekta otpornosti na niske temperature, proučavana je kod gusenica kukuruznog plamenca, *O. nubilalis* Hbn. Na osnovu rezultata biofizičkih osobina lipida i sastava masnih kiselina mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Analiza biofizičkih osobina ekstrahovanih lipida dijapauzirajućih, u odnosu na nedijapauzirajuće gusenice *O. nubilalis*, diferencijalnom skenirajućom kalorimetrijom, pokazala je značajno niže temperature faznog prelaza lipida dijapauzirajućih gusenica. To ukazuje na prirodu adaptivnih promena, koje imaju za cilj da se lipidi održavaju u tečnom stanju, čak i na temperaturama daleko ispod 0°C, što je neophodan preduslov funkcionalnosti i membranskih i rezervnih lipida
- Sličnost termograma lipida dijapauzirajućih gusenica, nezavisno od perioda dijapauze (početak, sredina i kraj) i temperature (spoljašnje sredine ili eksperimentalne), ukazuje na činjenicu da su promene u sastavu lipida neophodan preduslov za uspešnu realizaciju dijapauze, kao i razvijanje otpornosti na hladnoću
- U osnovi adaptivnih promena lipida su promene u sastavu masnih kiselina, koje su indukovane dijapauzom, a ne direktnim uticajem niske temperature. To je utvrđeno analizom sastava masnih kiselina nepolarne i polarne frakcije ukupnih lipida, kao i ukupnih lipida masnog tela i hemolimfe dijapauzirajućih i nedijapauzirajućih gusenica
- Od masnih kiselina najzastupljenije su palmitinska (C16:0), palmitoleinska (C16:1n-7), stearinska (C18:0), oleinska (C18:1n-9), vakenska (C18:1n-7), linolna (C18:2n-6) i  $\alpha$ -linolenske (C18:3n-3), kako kod dijapauzirajućih tako i kod nedijapauzirajućih gusenica. Visok sadržaj palmitooleinske kiseline (C16:1n-7) predstavlja metaboličku odliku vrste *O. nubilalis*
- Promene u sastavu masnih kiselina lipida dijapauzirajućih gusenica su u povećanom stepenu nezasićenosti, kao rezultat povećanog udela mononezasićenih, a smanjenog zasićenih masnih kiselina. Interesantno je da se zajedno sa zasićenim masnim kiselinama smanjuje i sadržaj polinezasićenih masnih kiselina

~Zaključci~

- Polinezasićene masne kiseline linolna kiselina C18:2n-6 i  $\alpha$ -linolenska kiselina C18:3n-3, kod gusenica *O. nubilalis* ne igraju ključnu ulogu u sticanju otpornosti na hladnoću tokom dijapauze.
- Povećanje nezasićenosti masnih kiselina lipida ulaskom u dijapauzu snižava temperature faznog prelaza lipida gusenica *O. nubilalis*.

Promene u sastavu masnih kiselina lipida indukovane dijapauzom važna su komponenta preživljavanja u uslovima niskih temperatura kukuruznog plamenca, *Ostrinia nubilalis* Hbn.

---

## *8. Literatura*

---

- Adedokun, T.A., Denlinger, D.L., 1984. Cold hardiness: a component of the diapause syndrome in pupae of the flesh flies, *Sarcophaga crassipalpis* and *S. bullata*. *Physiological Entomology* 9, 361-364.
- Anand, A.N., Lorenz, M.W., 2008. Age-dependent changes of fat body stores and the regulation of fat body lipid synthesis and mobilisation by adipokinetic hormone in the last larval instar of the cricket, *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* 54, 1404–1412.
- Arrese, E.L., Soulages, J.L., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annual Review of Entomology* 55, 207-225.
- Arrese, E.L., Mirza, S., Rivera, L., Howard, A.D., Chetty, P.S., Soulages, J.L., 2008. Expression of lipid storage droplet protein-1 may define the role of AKH as a lipid mobilizing hormone in *Manduca sexta*. *Insect Biochem Mol Biol.* 38, 993–1000.
- Arrese, E.L., Rivera, L., Hamada, M., Soulages, J.L., 2008. Purification and characterization of recombinant lipid storage protein-2 from *Drosophila melanogaster*. *Protein Pept Lett.* 15, 1027–32.
- Arrese, E.L., Patel, R.T., Soulages, J.L., 2006. The main triglyceride-lipase from the insect fat body is an active phospholipase A(1): identification and characterization. *J. Lipid Res.* 47, 2656–67.
- Arrese, E.L., Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Pennington, J.E., Tsuchida, K., Wells, M.A., 2001. Lipoprotein metabolism in insects: current status and future directions. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 7–17.
- Arrese, E.L., Rojas-Rivas, B.I., Wells, M.A., 1996. The use of decapitated insects to study lipid mobilization in adult *Manduca sexta*: effects of adipokinetic hormone and trehalose on fat body lipase activity. *Insect Biochem Mol Biol.* 26, 775–782.
- Asahina, E., 1966. Freezing and frost resistance in insects. In Meryman, H.T. (ed): *Cryobiology*. Academic Press, New York, pp. 451–486.
- Atapour, M., Moharramipour, S., Barzegar, M., 2007. Seasonal changes of fatty acid composition in overwintering larvae of Rice Stem Borer, *Chilio suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Asia-Pacific Entomolog* 10, 33-38.
- Atella, G.C., Gondim, K.C., Masuda, H., 1995. Loading of lipophorin particles with phospholipids at the midgut of *Rhodnius prolixus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 30, 337–350.
- Auerswald, L., Siegert, K.J., Gade, G., 2005. Activation of triacylglycerol lipase in the fat body of a beetle by adipokinetic hormone. *Insect Biochem Mol Biol.* 35, 461–70.
- Azuma, M., Yoshimi, Y., Furusawa, T., 1989. Fatty acid compositions in phosphoglycerides related to egg diapause of the silkworm, *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Applied Entomology and Zoology* 24, 180-185.
- Bale, J.S., Hayward, S.A.L., 2009. Insect overwintering in a changing climate. *J. Exp. Biol.* 213, 980-994.

- Bale, J.S., 1987. Insect cold hardiness: freezing and supercooling - and ecophysiological perspective. *J. Insect Physiol.* 33, 899-908.
- Barlow, J.S., 1963. Fatty acid characteristics of some insect taxa. *Nature*, Lond. 197, 311.
- Barton, P.G., Gunstone, F.D., 1975. Hydrocarbon chain packing and molecular motion in phospholipid bilayers formed from unsaturated lecithins. Synthesis and properties of sixteen positional isomers of 1,2-dioctadecenoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine *Journal of Biological Chemistry* 250, 4470-4476.
- Bashan, M., Cakmak, O., 2005. Changes in phospholipid and triacylglycerol fatty acids prepared from prediapausing and diapausing individuals of *Dolycoris baccarum* and *Piezodorus lituratus* (Heteroptera: Pentatomidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 98, 575-579.
- Bashan, M., Akbas, H., Yurdakoc, K., 2002. Phospholipid and triacylglycerol fatty acid composition of major life stages of sunn pest, *Eurygaster integriceps* (Heteroptera: Scutelleridae). *Comp. Biochem. Physiol. B* 132, 375-380.
- Batcabe, J.P., Howell, J.D., Blomquist, G.J., Borgeson, C.E., 2000. Effects of developmental age, ambient temperature, and dietary alterations on  $\Delta^{12}$  desaturase activity in the house cricket, *Acheta domesticus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 44, 112-119.
- Bauerfeind, R., Komnick, H., 1992. Immunocytochemical localization of lipophorin in the fat body of dragonfly larvae, *Aeshna cyanea*. *J. Insect Physiol.* 38, 185-198.
- Beenackers, A.M., Van der Horst, D.J., Van Marrewijk, W.J., 1985. Insect lipids and lipoproteins, and their role in physiological processes. *Prog Lipid Res.* 24, 19-67.
- Beenackers, A.M.T., Van der Horst, D.J., Van Marrewijk, J.A. 1984. Insect flight muscle metabolism. *Insect Biochem.* 14, 243-260.
- Behmer, S.T., Elias, D.O., 1999. The nutritional significance of sterol metabolic constraints in the generalist grasshopper *Schistocerca americana*. *J. Insect Physiol.* 45, 339-48.
- Behmer, S.T., Elias, D.O., Grebenok, R.J., 1999. Phytosterol metabolism and absorption in the generalist grasshopper, *Schistocerca americana* (Orthoptera: Acrididae). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 42, 13-25.
- Bennett, V.A., Lee, R.E., 1997. Modeling seasonal changes in intracellular freeze-tolerance of fat body cells of the gall fly *Eurosta solidaginis* (Diptera: Tephritidae). *Journal of Experimental Biology* 200, 185-192.
- Bennett, V.A., Pruitt, N.L., Lee, R.E., 1997. Seasonal changes in fatty acid composition associated with cold-hardening in third instar larvae of *Eurosta solidaginis*. *Journal of Comparative Physiology B* 167, 249-255.

- Bickel, P.E., Tansey, J.T., Welte, M.A., 2009. PAT proteins, an ancient family of lipid droplet proteins that regulate cellular lipid stores. *Biochim Biophys Acta* 1791, 419–440.
- Blacklock, B.J., Ryan, R.O., 1994. Hemolymph lipid transport. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 855–873.
- Blacklock, B.J., Ryan, R.O., 1994. Hemolymph lipid transport. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 855–873.
- Block, W., 1991. To freeze or not to freeze? Invertebrate survival of sub-zero temperatures. *Functional Ecology* 5, 284–290.
- Blomquist, G., Borgeson, C., Vundla, M., 1991. Polyunsaturated fatty acids and eicosanoids in insects. *Insect Biochemistry* 21, 99–106.
- Bowen, M.F., 1992. Patterns of sugar feeding in diapausing and nondiapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) females. *J. Med. Entomol.* 29, 843–49.
- Bozkus, K., 2003. Phospholipid and triacylglycerol fatty acid compositions from various development stages of *Melanogryllus Desertus* Pall. (Orthoptera: Gryllidae). *Turk. J. Biol.* 27, 73–78.
- Bracken, G.K., Harris, P., 1969. High palmitoleic acid in Lepidoptera. *Nature*, Lond. 224, 84–88.
- Brasaemle, D.L., 2007. Thematic review series: adipocyte biology. The perilipin family of structural lipid droplet proteins: stabilization of lipid droplets and control of lipolysis. *J Lipid Res* 48, 2547–2559.
- Briegel, H., 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 36, 165–172.
- Buckner, J.S., Hagen, M.M., 2003. Triacylglycerol and phospholipid fatty acids of the silver leaf whitefly: composition and biosynthesis. *Archives of Insect Biochemistry and Physiol.* 53, 66–79.
- Bursell, E., 1981. The role of proline in energy metabolism. In: Downer R, editor. Energy Metabolism in Insects. New York: Plenum, pp 135–154.
- Canavoso, L.E., Stariolo, R., Rubiolo, E.R., 2003. Flight metabolism in *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae): the role of carbohydrates and lipids. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98, 909–914.
- Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Karnas, K.J., Pennington, J.E., Wells, M.A., 2001. Fat metabolism in insects. *Annu Rev Nutr.* 21, 23–46.
- Canavoso, L.E., Wells, M.A., 2000. Metabolic pathways for diacylglycerol biosynthesis and release in the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 1173–1180.

- Cheon, H.M., Shin, S.W., Bian, G., Park, J.H., Raikhel, A.S., 2006. Regulation of lipid metabolism genes, lipid carrier protein lipophorin, and its receptor during immune challenge in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Biol Chem.* 281, 8426–35.
- Chino, H., 1958. Carbohydrate metabolism in the diapause egg of the silkworm, *Bombyx mori*-II conversion of glycogen into sorbitol and glycerol during diapause. *Journal of Insect Physiology* 2, 1-12.
- Chu, H.M., Norris, D.M., Kok, L.T., 1970. Pupation requirement of the beetle, *Xyleborus ferrugineus*: sterols other than cholesterol. *J. Insect Physiol.* 16, 1379–1387.
- Cossins, A.R., Raynard, R.S., 1987. Adaptive responses of cell membranes to temperature. In *Temperature and Animal Cells*, 41 (ed. Bowler, K. and Fuller, B.J.), Cambridge: Company of Biologists Ltd., 95–111.
- Cossins, A.R., Macdonald, A.G., 1989. The adaptation of biological membranes to temperature and pressure: Fish from the deep and cold. *J Bioenerget Biomemb* 21, 115-135.
- Cripps, C., Blomquist, G.J., Renobales, D.M., 1986. De novo biosynthesis of linoleic acid in insects. *Biochimica et Biophysica Acta* 876, 572-580.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M., Mouradian, R., 1983. Stabilization of biological membranes at low water activities. *Cryobiology* 20, 346-356.
- Dadd, R.H., 1985. Nutrition: Organisms In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Oxford. National Academy Press, Washington, DC. Vol. 4, 313-390.
- Dean, R.L., Collins, J.V., Locke, M., 1985. Structure of the fat body. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I., editors. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*. New York: Pergamon, pp. 155–210.
- Denlinger, D.L., 1991. Relationship between cold-hardiness and diapause. In: Lee RE and Denlinger DL. (Eds.). *Insects at Low Temperature*. New York: Chapman and Hall, 174-198.
- Dettloff, M., Wittwer, D., Weise, C., Wiesner, A., 2001. Lipophorin of lower density is formed during immune responses in the lepidopteran insect *Galleria mellonella*. *Cell Tissue Res.* 306, 449–458.
- Dillwith, J.W., Neese, P.A., Brigham, D.L., 1993. Lipid biochemistry in aphids. In: Stanley-Samuelson DW, Nelson DR, editors. *Insect Lipids: Chemistry, Biochemistry, and Biology*. Lincoln: Univ. Neb. Press, pp. 389–434.
- Dowhan, W., Bogdanov, M., 2002. Functional Roles of Lipid Membranes. Anonymous. *New Comprehensive Biochemistry - Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes* 36, 1-36.
- Downer, R.G.H., 1985. Lipid metabolism. In: Kerkut GA, Gilbert LI, (Eds.), *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon Press, Oxford, 77-113.

- Downer, R.G.H., Matthews, J.R., 1976. Patterns of lipid distribution and utilization in insects. *Am Zool* 16, 733–745.
- Dwyer, L.A., Blomquist, G.J., 1981. Biosynthesis of linoleic acid in the American cockroach. *Progress in Lipid Research* 20, 215–218.
- Fast, P.G., 1970. Insect lipids. In: Holman RT, editor. *Progress in the chemistry of fats and other lipids*. 11. Pergamon Press, Oxford, 181–242.
- Fauny, J.D., Silber, J., Zider, A., 2005. Drosophila lipid storage droplet 2 gene (Lsd-2) is expressed and controls lipid storage in wing imaginal discs. *Dev Dyn*. 232, 725–32.
- Fernando-Warnakulasuriya, G.J.P., Tsuchida, K., Wells, M.A., 1988. Effect of dietary lipid content on lipid transport and storage during larval development of *Manduca sexta*. *Insect Biochem.* 18, 211–214.
- Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G.H, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry* 226, 497–509.
- Frank, C.L., 1991. Adaptations for hibernation in the depot fats of a ground squirrel (*Spermophilus beldingi*). *Can Jour Zool* 69, 2707–2711.
- Friend, W.G., Dadd, R.H., 1982. Insect nutrition. In *Advances in Nutritional Research*, ed. HH Draper, New York: Plenum, 205–247.
- Gade, G., Auerswald, L., 2002. Beetles' choice—proline for energy output: control by AKHs. *Comp Biochem Physiol B* 132, 117–29.
- Giulivi, C., Ross-Inta, C., Horton, A.A., Luckhart, S., 2008. Metabolic pathways in *Anopheles stephensi* mitochondria. *Biochem J.* 415, 309–16.
- Gondim, K.C., Wells, M.A., 2000. Characterization of lipophorin binding to the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 405–413.
- Gordon, H.T., 1959. Minimum nutritional requirements of the German roach, *Blattella germanica*. *Ann. NY Acad. Sci.* 77, 290–351.
- Goto, S.G., Katagiri, C., 2011. Effects of acclimation temperature on membrane phospholipids in the flesh fly *Sarcophaga similis*. *Entomological Science*, 14, 224–229.
- Grieneisen, M.L., 1994. Recent advances in our knowledge of ecdysteroid biosynthesis in insects and crustaceans. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 115–132.
- Gronke, S., Beller, M., Fellert, S., Ramakrishnan, H., Jackle, H., Kuhnlein, R.P., 2003. Control of fat storage by a Drosophila PAT domain protein. *Curr Biol.* 13, 603–6.
- Grubor-Lajsic, G., Block, W., Palanacki, V., Glumac, S., 1991. Cold hardiness parameters of overwintering diapause larvae of *Ostrinia nubilalis* in Vojvodina, Yugoslavia. *Cryo-Letters* 12, 177–182.



- Grubor-Lajsic, G., Block, W., Worland, R., 1992. Comparison of the cold hardiness of two larval Lepidoptera (Noctuidae). *Physiol. Entomol.* 17, 148-152.
- Gutierrez, E., Wiggins, D., Fielding, B., Gould, A.P., 2007. Specialized hepatocyte-like cells regulate Drosophila lipid metabolism. *Nature.* 445, 275–80.
- Haubert, D., Haggblom, M.M., Scheu, S., Ruess, L., 2008. Effects of temperature and life stage on the fatty acid composition of Collembola. *European Journal of Soil Biology*, 44, 213–219.
- Hauerland, N.H., Shirk, P.D., 1995. Regional and functional differentiation in the insect fat body. *Annu Rev Entomol.* 40, 121–145.
- Hazel, J.R., 1995. Thermal Adaptation in Biological-Membranes - Is Homeoviscous Adaptation the Explanation. *Annual Review of Physiology* 57, 19-42.
- Hazel, J.R., Williams, E.E., 1990. The role of alterations in membrane lipid-composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical-environment. *Progress in Lipid Research* 29, 167-227.
- Hazel, J.R., 1979. The influence of temperature adaptation on the composition of the neutral lipid fraction of rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *J. Exp. Zool.* 207, 33-42.
- Hinkle, E.D., Wiersma, W., Jurs, G.S., 1994. Applied Statistics for Behavioral Sciences. 3rd edn. Houghton Mifflin Company, Boston, pp. 712.
- Hochachka, P.W., Somero, G.N., 2002. Biochemical Adaptation: Mechanism and Process in Physiological Evolution. Oxford University Press, Oxford, 560.
- Hodková, M., Simek, P., Ckova, H.Z., Nováková O., 1999. Seasonal changes in the phospholipids composition in thoracic muscles of a heteropteran, *Pyrrhocoris apterus* *Insect Biochem. Mol. Biol.* 4, 367–376.
- Holmstrup, M., Bayley M., Ramlov H., 2002. Supercool or dehydrate? An experimental analysis of overwintering strategies in small permeable arctic invertebrates. *Proceedings of the National Academe of Science USA* 99, 5716-5720.
- Hsieh, S.L., Kuo, C.-M., 2005. Stearoly-CoA desaturase expression and fatty acid composition in milkfish (*Chanos chanos*) and grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during cold acclimation. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 141, 95–101.
- Hui, T.Y., Bernlohr, D.A., 1997. Fatty acid transporters in animal cells. *Front. Biosci.* 2, 222–231.
- Ikan, R., Stani, V., Cohen, E. and Shulov, A., 1970. The function of fatty acids in the diapause of the khapra beetle *Trogoderma granarium* everts. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 37, 205-214.
- Izumi, Y., Sonoda, S., Yoshida, H., Tsumuki, H., 2005. Identification of tissues showing the lowest tolerance to freezing in larvae of the rice stem borer, *Chilo suppressalis*. *Physiological Entomology* 30, 324-331.

- Jensen, P.V., Borgesen, L.W., 2000. Regional and functional differentiation in the fat body of pharaoh's ant queens, *Monomorium pharaonis* (L.) *Arthropod Struct Dev.* 29, 171–84.
- Joanisse, D.R., Storey, K.B., 1996. Fatty acid content and enzymes of fatty acid metabolism in overwintering cold-hardy gall insects. *Physiol. Zool.* 69, 1079-1095.
- Johnston, S.L., Lee, R.E., 1990. Regulation of supercooling and nucleation in a freeze intolerant beetle (*Tenebrio molitor*). *Cryobiology* 27, 562-568.
- Kakela, R., Hyvarinen, H., 1996. Site-specific fatty acid composition in adipose tissues of several northern aquatic and terrestrial mammals. *Comp. Biochem. Physiol. B* 115, 501-514.
- Kaplanis, N.J., Robbins, W.E., Monroe, R.E., Shortino, T.J., Thompson, M.J., 1965. The utilization and the fate of  $\beta$ -sitosterol in the larva of the housefly, *Musca domestica* L. *J. Insect Physiol.* 11, 251–58.
- Kaufmann, C., Briegel, H., 2004. Flight performance of the malaria vectors *Anopheles gambiae* and *Anopheles atroparvus*. *J Vector Ecol.* 29, 140–53.
- Keeley, L.L., 1985. Biochemistry and physiology of the insect fat body. In: Kerkut GA, Gilbert LI, editors. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Vol. 3. New York: Pergamon, 211–228.
- Khani, A., Moharramipour, S., Barzegar, M., Manesh-Naderi, H., 2007. Comparison of fatty acid composition in total lipid of diapause and non-diapause larvae of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *Insect Science* 14, 125-131.
- Kojić, D., Purać, J., Popović, Ž. D., Vukašinović, E., Grubor-Lajšić, G., 2010. Importance of the body water management for winter cold survival of the European corn borer *Ostrinia nubilalis* Hübn. (Lepidoptera: Pyralidae). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, Diagnosis Press 24, 648-654.
- Kostal, V., Berkova, P., Simek, P., 2003. Remodelling of membrane phospholipids during transition to diapause and cold-acclimation in the larvae of *Chymomyza costata* (Drosophilidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 135, 407-419.
- Kostal, V., Simek, P., 1998. Changes in fatty acid composition of phospholipids and triacylglycerides after cold acclimation of an aestivating insect prepupa. *Journal of Comparative Physiology B* 168, 453-460.
- Kuthiala, A., Chippendale, G.M., 1989. Relationship between the fatty acids of fat body triacylglycerol and lipophorin diacylglycerol of non-diapause and diapause larvae of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. *Arch Insect Biochem. Physiol.* 12, 123-131.
- Law, J.H., Wells, M.A., 1989. Insects as biochemical models. *J Biol Chem.* 264, 16335–38.
- Leather, S.R., Walters K.F.A., Bale, J.S., 1993. *The ecology of Insect Overwintering*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Lee Jr., R.E., Denlinger, D.L., 1991. Insects at Low Temperature. Chapman & Hall, New York.
- Lee Jr., R.E., 1991. Principles of insect low temperature tolerance. In: Lee, Jr., R.E., Delinger, D.L. (Eds.), Insects at Low Temperature. Chapman & Hall, London, pp. 17-46.
- Lee Jr., R.E., Chen, C.-P., Meacham, M.H., Denlinger, D.L., 1987. Ontogenic patterns of cold hardiness and glycerol production in *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiological Entomology* 10, 309-315.
- Lee, D.C., Chapman, D., 1987. The effects of temperature on biological membranes and their models. In: Bowler, K., Fuller, B.J. (Eds.), Temperature and Animal Cell. The Company of Biologist Limited, Cambridge, 35-52.
- Lee Jr., R.E., Denlinger, D.L., 1985. Cold Tolerance in diapausing and non-diapausing stages of flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiological Entomology* 10, 309-315.
- Lockey, K.H., 1988. Lipids of the insect cuticle-origin, composition and function. *Comp Biochem Physiol B*. 89, 595–645.
- Lorenz, M.W., Anand, A.N., 2004. Changes in the biochemical composition of fat body stores during adult development of female crickets, *Gryllus bimaculatus*. *Arch Insect Biochem Physiol*. 56, 110–19.
- Lum, P.Y., Chino, H., 1990. Trehalose, the insect blood sugar, inhibits loading of diacylglycerol by lipophorin from the fat body in locusts. *Biochem Biophys Res Commun*. 172, 588–94.
- Macartney, A., Maresca, B., Cossins, A.R., 1994. Acyl-CoA desaturases and the adaptive regulation of membrane lipid composition, A.R. Cossins (Ed.), Temperature Adaptation of Biological Membranes, Portland Press, London, 129–139.
- McCoy, T., 2003. Changes in phospholipid class composition with the onset of freeze tolerance in the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *Colgate University Journal of Sciences* 1, 1–8.
- McDougall, G.E., Steele, J.E., 1988. Free fatty acids as a source of energy for trehalose synthesis in the fat body of the American cockroach (*Periplaneta americana*). *Insect Biochem*. 18, 591–97.
- Michaud, M.R., Denlinger, D.L., 2006. Oleic acid is elevated in cell membrane during rapid cold-hardening and pupal diapause in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Journal of Insect Physiology* 52, 1073-1082.
- Mirth, C.K., Riddiford, L.M., 2007. Size assessment and growth control: how adult size is determined in insects. *Bio Essays*. 29, 344–55.
- Mitchell, C.J., Briegel, H., 1989. Inability of diapausing *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to use blood for producing lipid reserves for overwinter survival. *J Med Entomol*. 26, 318–326.

- Mitchell, M.J., Smith, S.L., 1986. Characterization of ecdysone 20-monoxygenase activity in wandering stage larvae of *Drosophila melanogaster*. Evidence of mitochondrial and microsomal cytochrome P-450 dependent systems. *Insect Biochem.* 16, 525–37.
- Mullen, L., Goldsworthy, G., 2003. Changes in lipophorins are related to the activation of phenoloxidase in the haemolymph of *Locusta migratoria* in response to injection of immunogens. *Insect Biochem Mol Biol.* 33, 661–70.
- Nation, J.L., 2002. *Insect physiology and biochemistry*. CRC press, Florida.
- Ness, W.D., Lopez, M., Zhou, W., Guo, D., Dowd, P.F., Northon, R.A., 1997. Sterol utilization and metabolism in *Heliothis zea*. *Lipids* 32, 1317–1323.
- Ohtsu, T., Kimura, M. T., Katagiri, C., 1998. How *Drosophila* species acquire cold tolerance: qualitative changes of phospholipids. *European Journal of Biochemistry* 252, 608-611.
- Ohtsu, T., Katagiri, C., Kimura, T., Hori, S., 1993. Cold adaptations in *Drosophila*. Qualitative changes of triacylglycerols with relation to overwintering. *Journal of Biological Chemistry* 268, 1830-1834.
- Olofsson, S-O., Boström, P., Andersson, L., Rurberg, M., Perman, J., Borén, J., 2009. Lipid droplets as dynamic organelles connecting storage and efflux of lipids. *Biochim Biophys Acta.* 1791, 448–8.
- Overgaard, J., Tomčala, A., Sørensen, J.G., Holmstrup, M., Krogh, P.H., Šimek, P., Košťál, V., 2008. Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 54, 619-629.
- Overgaard, J., Sorensen, J.G., Petersen, S.O., Loeschcke, V., Holmstrup, M., 2005. Changes in membrane lipid composition following rapid cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Insect Physiology* 51, 1173–1182.
- Patel, R., Soulages, J.L., Wells, M.A., Arrese, E.L., 2004. CAMP-dependent protein kinase of *Manduca sexta* phosphorylates but does not activate the fat body triglyceride lipase. *Insect Biochem Mol Biol.* 34, 1269–79.
- Patel, R.T., Soulages, J.L., Hariharasundaram, B., Arrese, E.L., 2005. Activation of the lipid droplet controls the rate of lipolysis of triglycerides in the insect fat body. *J Biol Chem.* 280, 22624–31.
- Patel, S., Nelson, D.R., Gibbs, A.G., 2001. Chemical and physical analyses of wax ester properties. *Journal of Insect Science* 1.4.
- Pimley, R.W., Langley, P.A., 1982. Hormone stimulated lipolysis and proline synthesis in the fat body of the adult tsetse fly, *Glossina morsitans*. *J Insect Physiol.* 28, 781–89.
- Pond, D., Watkins, J., Priddle, J., Sargent, J., 1995. Variation in the lipid content and composition of Antarctic krill *Euphausia superba* at South Georgia. *Marine Ecology Progress Series* 117, 49-57.

- Pond, D.W., Tarling, G.A., 2011. Phase transitions of wax esters adjust buoyancy in diapausing *Calanoides acutus*. *Limnol. Oceanogr.* 56, 1310-1318.
- Purać, J., Pond W.D., Grubor-Lajšić, G., Kojić, D., Blagojević, P.D., Worland R., M., Clark, S.M., 2011. Cold hardening induces transfer of fatty acids between polar and nonpolar lipid pools in the Arctic collembollan *Megaphorura arctica*. *Physiological Entomology* 36, 135-140.
- Renobales, D.M., Crippsa, C., Stanley-Samuelson, D.W., Jurenkaa, R.A., Blomquist, G.J., 1987. Biosynthesis of linoleic acid in insects. *Trends in Biochemical Sciences* 12, 364-366.
- Rimoldi, O.M., Peluffo, R.O., Gonzalez, S.M., Brenner, R.R., 1985. Lipid digestion, absorption and transport in *Triatoma infestans*. *Comp. Biochem. Physiol. B*, 82, 187-190.
- Robich, R.M., Denlinger, D.L., 2005. Diapause in the mosquito *Culex pipiens* evokes a metabolic switch from blood feeding to sugar gluttony. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102, 15912-17.
- Ryan, R.O., Van der Horst, D.J., 2000. Lipid transport biochemistry and its role in energy metabolism. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 233-60.
- Ryan, R.O., Wells, M.A., Law, J.H., 1986. Lipid transfer protein from *Manduca sexta* hemolymph. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136, 260-265.
- Sakura, S., Warren, T.J., Gilbert, L.I., 1989. Mediation of ecdysone synthesis in *Manduca sexta* by a hemolymph enzyme. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 10, 179-197.
- Shiao, S.H., Hansen, I.A., Zhu, J., Sieglaff, D.H., Raikhel, A.S., 2008. Juvenile hormone connects larval nutrition with target of rapamycin signaling in the mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* 54, 231-39.
- Shimizu, I., 1992. Comparison of fatty acid compositions in lipids of diapause and non-diapause eggs of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 102, 713-716.
- Shimizu, I., 1992. Comparison of fatty acid compositions in lipids of diapause and non-diapause eggs of *Bombyx mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Comparative Biochemistry and Physiology B* 102, 713-716.
- Sinensky, M., 1974. Homeoviscous Adaptation-A Homeostatic Process that Regulates the Viscosity of Membrane Lipids in *Escherichia coli*. *Proc Nat Acad Sci USA* 71, 522-525.
- Slachta, M., Berkova, P., Vambera, J., Kostal, V., 2002. Physiology of cold-acclimation in non-diapausing adults of *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera). *European Journal of Entomology* 99, 181-187.

- Sømme, L., 1982. Supercooling and winter survival in terrestrial arthropods. *Comparative Biochemistry and Physiology* 73, 519-543.
- Soulages, J.L., Wells, M.A., 1994. Lipophorin: the structure of an insect lipoprotein and its role in lipid transport in insects. *Adv Protein Chem.* 45, 371-415.
- Soulages, J.L., Wells, M.A., 1994. Metabolic fate and turnover rate of hemolymph free fatty acids in adult *Manduca sexta*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 79-86.
- Stahl, A., Hirsch, D.J., Gimeno, R.E., Punreddy, S., Ge, P., et al. 1999. Identification of the major intestinal fatty acid transport protein. *Mol. Cell* 4, 299-308.
- Stanic, B., Jovanovic-Galovic, A., Blagojevic, D.P., Grubor-Lajsic, G., Worland, R., Spasic, M.B., 2004. Cold hardiness in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Glycerol content, hexose monophosphate shunt activity, and antioxidative defense system. *Eur. J. Entomol.* 101, 459-466.
- Stanley-Samuels, D.W., Dadd, R.H., 1983. Long-chain polyunsaturated fatty acids: patterns of occurrence in insects. *Insect Biochem.* 13., 549-558.
- Stanley-Samuels, D.W., Howard, R.W., Toolson, E.C., 1990. Phospholipid fatty acid composition and arachidonic acid uptake and metabolism by the cicada *Tibicen dealbatus* (Homoptera: Cicadidae). *Comp. Biochem. Physiol. B* 97, 285-289.
- Stanley-Samuels, D.W., Jurenka, R.A., Cripps, C., Blomquist, G.J., deRenobales, M., 1988. Fatty acids in insects: composition, metabolism, and biological significance. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* 9, 1-33.
- Starling, A.P., East, J.M., Lee, A.G., 1993. Effects of phosphatidylcholine fatty acyl chain length on calcium binding and other functions of the (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase. *Biochemistry* 32, 1593-1600.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1991. Biochemistry of cryoprotectants. In: Lee Jr., R.E., Delinger, D.L. (Eds.), *Insects at Low Temperature*. Chapman & Hall, New York, 64-93.
- Storey, K.B., Storey, J.M., 1988. Freez tolerance in animals. *Physiological Reviews* 68, 27-84.
- Storey, J.M., Storey, K.B., 1983. Regulation of cryoprotectant metabolism in the overwintering gall fly larva, *Eurosta solidaginis*: Temperature control of glycerol and sorbitol levels. *Journal of Comparative Physiology* 149, 495-502.
- Strong, F.E., 1963. Studies on lipids in some homopterous insects. *Hilgardia* 34, 43-61.
- Svoboda, J.A., 1999. Variability of metabolism and function of sterols in insects. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 34, 49-57.
- Tang, X., Pikal, M.J., 2005. The effects of stabilizers and denaturants on the cold denaturation temperatures of proteins and implications for freeze-drying. *Pharmaceutical Research (Dordrecht)* 22, 1167-1175.

- Teixeira, L., Rabouille, C., Rorth, P., Ephrussi, A., Vanzo, N.F., 2003. *Drosophila* perilipin/ADRP homologue Lsd2 regulates lipid metabolism. *Mech Dev.* 120, 1071–81.
- Thompson, M.J., Weirich, G.F., Svoboda, J.A., 1990. Metabolism of insect molting hormone: bioconversion and titer regulation. In *Morphogenetic Hormones of Arthropods: Discovery, Synthesis, Metabolism, Evolution, Modes of Action, and Technique*, ed. AP Gupta, New Brunswick, NJ: Rutgers Univ. Press, 325–360.
- Thompson, S.N., 1973. A review and comparative characterization of the fatty acid compositions of seven insect orders. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 45, 467–482.
- Troy, S., Anderson, W.A., Spielman, A., 1975. Lipid content of maturing ovaries of *Aedes aegypti* mosquitoes. *Comp Biochem Physiol B.* 50, 457–461.
- Tsuchida, K., Wells, M.A., 1988. Digestion, absorption, transport and storage of fat during the last larval stadium of *Manduca sexta*. Changes in the role of lipophorin in the delivery of dietary lipid to the fat body. *Insect Biochem.* 18, 263–268.
- Tsuchida, K., Wells, M.A., 1990. Isolation and characterization of a lipoprotein receptor from the fat body of an insect, *Manduca sexta*. *J. Biol. Chem.* 265, 5761–5767.
- Tufail, M., Takeda, M., 2009. Insect vitellogenin/lipophorin receptors: molecular structures, role in oogenesis, and regulatory mechanisms. *J Insect Physiol.* 55, 87–103.
- Van Antwerpen, R., Linnemans, W.A.M., Van der Horst, D.J., Beenackers, A.M.T., 1989. Binding of lipophorin to the fat body of the migratory locust. *Insect Biochem.* 19, 809–814.
- Van der Horst, D.J., van Hoof, D., van Marrewijk, W.J., Rodenburg, K.W., 2002. Alternative lipid mobilization: the insect shuttle system. *Mol Cell Biochem.* 239, 113–19.
- Van Dooremalen, C., Ellers, J., 2010. A moderate change in temperature induces changes in fatty acid composition of storage and membrane lipids in a soil arthropod. *Journal of Insect Physiology* 56, 178–184.
- Van Dooremalen, C., Koekkoek, J., Ellers, J., 2011. Temperature-induces plasticity in membrane and storage lipid composition: Thermal reaction norms across five different temperatures. *Journal of Insect Physiology* 57, 285–291.
- Van Handel, E., 1993. Fuel metabolism of the mosquito (*Culex quinquefasciatus*) embryo. *J. Insect Physiol.* 39, 831–833.
- Visser, B., Ellers, J., 2008. Lack of lipogenesis in parasitoids: a review of physiological mechanisms and evolutionary implications. *J Insect Physiol.* 54, 1315–22.

- Vukašinović, E., Pond, W.D., Worland, M.R., Kojić, D., Purać J., Blagojević, P.D., Grubor-Lajšić, G., 2013. Diapause induces changes in the composition and biophysical properties of lipids in larvae of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* 165, 219-225.
- Warren, J.T., Sakurai, S., Rountree, D.B., Gilbert, L.I., 1988. Synthesis and secretion of ecdysteroids by the prothoracic glands of *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 34, 571–76.
- Watson, P.F., Morris, G.J., 1987. Cold shock injury in animals, K. Bowler, B.J. Fuller (Eds.), *Temperature and Animal Cells*, The Company of Biologist Limited, Cambridge, 311–340.
- Weer, P.M.M., Van Marrewijk, W.J.A., Beenakker, A.M.T., Van der Horst, D.J., 1993. Biosynthesis of locust lipophorin. Apolipophorins I and II originate from a common precursor. *J. Biol. Chem.* 268, 4300–4303.
- Weintrab, H., Tietz, A., 1973. Triglyceride digestion and absorption in the locust, *Locusta migratoria*. *Biochim. Biophys. Acta* 306, 31–41.
- Welte, M.A., Gross, S.P., Postner, M., Block, S.M., Wieschaus, E.F., 1998. Developmental regulation of vesicle transport in *Drosophila* embryos: forces and kinetics. *Cell.* 92, 547–57.
- Wheeler, C.H., Goldsworthy, G.J., 1985. Specificity and localization of lipoprotein lipase in the flight muscles of *Locusta migratoria*. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 366, 1071–1077.
- Wiens, A.W., Gilbert, L.I., 1965. Regulation of cockroach fat-body metabolism by the corpus cardiacum in vitro. *Science* 150, 614–16.
- William, E.E., 1998. Membrane Lipids: What Membrane Physical Properties Are Conserved during Physiochemically-Induced Membrane Restructuring?. *Integrative and Comparative Biology* 38, 280-290.
- Williams, W.P., 1990. Cold-induced lipid phase transition. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B* 326, 555-570.
- Willott, E., Bew, L.K., Nagle, R.B., Wells, M.A., 1988. Sequential structural changes in the fat body of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, during the fifth larval stadium. *Tissue Cell* 20, 635.
- Wodtke, E., Cossins, A.R. 1991. Rapid cold-induced changes of membrane order and  $\Delta^9$ -desaturase activity in endoplasmic reticulum of carp liver: a time course study of thermal acclimation. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1064, 343–350.
- Wyatt, G.R., Meyer, W.L., 1959. The chemistry of insect hemolymph III. Glycerol. *Journal of General Physiology* 42, 1005-1011.
- Zachariassen, K.E., 1985. Physiology of cold tolerance in insects. *Physiol. Rev.* 65, 799-832.



~Literatura~

- Ziegler, R., Van Antwerpen, R., 2006. Lipid uptake by insect oocytes. *Insect Biochem Mol Biol.* 36, 264–72.
- Ziegler, R., Ibrahim, M.M., 2001. Formation of lipid reserves in fat body and eggs of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 47, 623–27.
- Ziegler, R., Schulz, M., 1986. Regulation of lipid-metabolism during flight in *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 32, 903–8.
- Ziegler, R., 1991. Changes in lipid and carbohydrate metabolism during starvation in adult *Manduca sexta*. *J. Comp. Physiol. B* 161, 125-31.

---

## BIOGRAFIJA



Elvira Vukašinić rođena je 1982. godine u Zrenjaninu, gde je završila osnovnu i srednju školu. Osnovne studije upisala je 2001. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, smer Diplomirani biolog. Diplomirala je u septembru 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,21. Diplomski rad pod naslovom “Dejstvo antitoksičnog nutritiva (ATN) na biohemijsko-fiziološke parametre klijanja i rasta kukuruza (*Zea mays* L.)” odbranila je sa ocenom 10. Diplomске akademske studije-master upisala je 2006. godine na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, smer Funkcionalna biologija. Završni rad na temu: “Biohemijske osnove dehidratacije- uloga trehaloze”, pod mentorstvom prof. dr Gordana Grubor-Lajšić, odbranila je 28. decembra 2007. godine, ocenom 10.

2006. godine bila je stipendista projekta: “Putujmo u Evropu“ koji je organizovan od strane Evropskog pokreta Srbije, Euroinicijative, Ambasade Austrije i Ministarstva prosvete Republike Srbije za 200 najboljih studenata završne godine studija, dok je 2007. godine bila stipendista projekta Ministarstva za obrazovanje, nauku i kulturu Republike Austrije pod naslovom “One month visit“. Stipendija podržana od strane Austrijske rektorske konferencije, Austrijske službe za razmenu (ÖAD) i WUS Austria pokrivala je jednodomesečni istraživački boravak u Institutu za biohemiju Univerziteta u Insbriku, (Austrija).

Od 2007/2008. školske godine učestvuje u izvođenju praktične nastave na predmetu Biohemija, na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu.

Od 2007. do 2010. godine kao stipendista Ministarstva nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije, bila je angažovana na projektu: “Uloga redoks aktivnih supstanci u procesima homeostaze živih sistema”, broj projekta 143034., dok je od januara 2011. godine angažovana na radnom mestu istraživača-saradnika za užu naučnu oblast Biohemija, na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta u Novom Sadu, u okviru projekta Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije iz osnovnih istraživanja pod naslovom: "Molekularni mehanizmi redoks signalinga u homeostazi, adaptaciji i patološkim procesima", broj projekta OI 173014.

2011. godine u trajanju od 3 meseca boravila je u Institutu za istraživanje Antarktiku (British Antarctic Survey - BAS, *eng.*) u Kembridžu, (Velika Britanija), gde je uradila veliki deo analiza eksperimentalnog dela doktorske disertacije.

Do sada je kao prvi autor ili koautor objavila 5 naučnih radova u međunarodnim časopisima. 1 rad u vrhunskom međunarodnom časopisu (M21), 1 rad u istaknutom međunarodnom časopisu (M22), i 4 rada u međunarodnim časopisima (M23). Učestvovala na više skupova od međunarodnog i nacionalnog značaja.

Novi Sad, 2014.

Elvira Vukašinić

---

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET  
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU  
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

**Redni broj:**  
**RDB**

**Identifikacioni broj:**  
**IBR**

**Tip dokumentacije:** Monografska publikacija  
**TD**

**Tip zapisa:** Tekstualni štampani materijal  
**TZ**

**Vrsta rada:** Doktorska disertacija  
**VR**

**Autor:** Elvira Vukašinović  
**AU**

**Mentor:** dr Gordana Grubor-Lajšić, redovni profesor na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu  
**MN**

**Naslov rada:** Analiza lipida i masnih kiselina nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica kukuruznog plamenca (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.) (Insecta: Lepidoptera)

**NR**

**Jezik (i pismo) publikacije:** srpski (latinica)  
**JP**

**Jezik izvoda:** srpski/engleski  
**JI**

**Zemlja publikovanja:** Republika Srbija  
**ZP**

**Uže geografsko područje:** Vojvodina  
**UGP**

**Godina:** 2014.

**GO**

**Izdavač:** Autorski reprint

**IZ**

**Mesto i adresa:** Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Srbija

**MA**

**Fizički opis rada:** poglavlja (8), strana (172), slika (57), tabela (20), literaturnih navoda (188)

**FO**

**Naučna oblast:** Biologija

**NO**

**Naučna disciplina:** Biohemija

**ND**

**Ključne reči:** insekti, *Ostrinia nubilalis*, dijapauza, otpornost na hladnoću, lipidi, masne kiseline, fazni prelaz

**KR**

**Univerzalna decimalna klasifikacija:**

**UDK**

**Čuva se:** U biblioteci Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Srbija

**ČU**

**Važna napomena:** nema

**VN**

**Izvod:**

Kukuruzni plamenca (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.) je vrsta umerenog klimatskog područja koja niske zimske temperature preživljava ulaskom u dijapauzu u stadijumu gusenice. Dijapauza i otpornost na hladnoću (cold hardiness, *eng.*), kod mnogih insekatskih vrsta često predstavljaju esencijalne, tesno povezane komponente strategije preživljavanja delovanja niske temperature, kao što je to slučaj i kod kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis*, Hbn. U okviru grupe insekata otpornih na hladnoću, svrstava se u insekte otporne na zamrzavanje (freeze tolerant, *eng.*) jer su sposobne da prežive ekstracelularno zamrzavanje telesnih tečnosti.

Iako se o osnovnim strukturnim i metaboličkim dešavanjima u dijapauzi insekata već dosta zna, još uvek postoje brojne dileme o ovom vidu preživljavanja insekata u nepovoljnim uslovima sredine, posebno sa aspekta izloženosti niskim zimskim temperaturama i mehanizmima krioprotekcije. Zbog toga je cilj ove doktorske disertacije bio da se sa aspekta biofizičkih osobina lipida i sastava masnih kiselina: odrede biofizičke osobine (temperature faznog prelaza) ukupnih lipida nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica tokom dijapauze (početak, sredina i kraj), kao i u kontrolisanim uslovima hlađenja dijapauzirajućih gusenica; zatim da se odredi zastupljenost pojedinih klasa lipida u hemolimfi i masnom telu nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica; da se utvrde promene sastava masnih kiselina strukturne (polarne) i rezervne (nepolarne) frakcije lipida celih gusenica tokom dijapauze i pod uticajem različitih temperatura u eksperimentalnim uslovima; kao i da se odredi tkivna specifičnost, hemolimfe i masnog tela, masnih kiselina ukupnih lipida i biofizičke osobine ukupnih lipida masnog tela nedijapauzirajućih i dijapauzirajućih gusenica tokom dijapauze, kao i u kontrolisanim uslovima hlađenja dijapauzirajućih gusenica.

U analizi lipida kukuruznog plamenca *Ostrinia nubilalis*, Hbn. korišćene su sledeće tehnike: tankoslojna hromatografija (TLC) sa skenirajućom denzitometrijom, za razdvajanje i analizu klasa lipida; zatim gasno-masena hromatografija (GC-MS), za analizu masnih kiselina kao i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (DSC – differential scanning calorimetry, *eng.*), za termalnu analizu ekstrahovanih lipida.

Kod gusenica *Ostrinia nubilalis* sastav masnih kiselina ukupnih lipida analiziranih tkiva i lipidnih frakcija značajno se razlikuje između ova dva fiziološka stanja, stanja dijapauze i nedijapauze. Dijapauza indukuje značajno povećanje sadržaja mononezasićenih masnih kiselina, pre svega palmitoleinske (16:1n-7) i oleinske masne kiseline (18:1n-9) uz istovremeno smanjenje sadržaja zasićenih i polinezasićenih masnih kiselina, pre svega palmitinske (16:0) i linolne masne kiseline (18:2n-6). Temperature faznog prelaza ukupnih lipida celih gusenica i masnog tela značajno su niže kod dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis*, usled značajnog povećanja stepena nezasićenosti masnih kiselina u njihovom sastavu. Značajno niže temperature faznog prelaza lipida dijapauzirajućih gusenica *O. nubilalis* rezultat su povećanja stepena nezasićenosti njihovih masnih kiselina. Možemo zaključiti da su promene u sastavu masnih kiselina lipida indukovane dijapauzom važna komponenta preživljavanja niskih temperatura kod *O. nubilalis* Hbn. jer se veliki deo lipida održava u tečnom stanju čak i na temperaturama daleko ispod 0°C, što je neophodno za održavanje njihove fluidnosti odnosno funkcionalnosti.

**IZ**

**Datum prihvatanja teme od strane NN veća:** 21. septembra 2012. godine

**DP**

**Datum odbrane:**

**DO**

**Članovi komisije:**

**KO**

**Predsednik:** dr Smiljka Šimić, redovni profesor u penziji, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

**Član:** dr Gordana Grubor-Lajšić, redovni profesor, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, mentor

**Član:** dr Duško Blagojević, naučni savetnik, Institut za Biološka Istraživanja “Siniša Stanković”, Univerzitet u Beogradu

**Član:** dr Danijela Kojić, docent, Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

**UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES  
KEY WORDS DOCUMENTATION**

**Accession number:**

**ANO**

**Identification number:**

**INO**

**Document type:** Monograph type

**DT**

**Type of record:** Printed text

**TR**

**Content Code:** PhD Thesis

**CC**

**Author:** Elvira Vukašinović

**AU**

**Mentor:** dr Gordana Grubor-Lajšić, Full Professor, Department of Biology and Ecology,  
Faculty of Sciences, University of Novi Sad

**MN**

**Title:** Analysis of lipids and fatty acids of non-diapausing and diapausing larvae of European  
corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.) (Insecta: Lepidoptera)

**TI**

**Language of text:** Serbian

**LT**

**Language of abstract:** Serbian/English

**LA**

**Country of publication:** Republic of Serbia

**CP**

**Locality of publication:** Vojvodina

**LP**

**Publication year:** 2014.

**PY**

**Publisher:** Author's reprint

**PU**

**Publ. place:** Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad

**PP**

**Physical description:** chapters (8), pages (172), figures (57), tables (20), references (188)

**PD**

**Scientific field:** Biology

**SF**

**Scientific discipline:** Biochemistry

**SD**

**Key words:** insects, *Ostrinia nubilalis*, diapause, cold hardiness, lipids, fatty acids, phase transition

**KW**

**Universal decimal classification:**

**UDC**

**Holding data:** The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad, Serbia

**HD**

**Note:** No

**N**

**Abstract:**

European corn borer (*Ostrinia nubilalis*, Hbn.) inhabiting temperate regions that survive low winter temperatures as a diapausing fifth instar larva. Diapausing larvae are cold hardy and freeze tolerant as they are able to survive the extracellular formation of ice crystals. Winter survival for many insect species living in seasonally cold environments includes a radical remodeling of metabolism. This implies entry into a developmentally arrested, hypometabolic state of winter diapause, which in *O. nubilalis* and many other insect species of these habitats is closely related to their cold hardiness.

Although the basic structural and metabolic events consider insect diapause is already known, there are still many doubts about the survival of insects in an unfavorable environment, particularly in terms of exposure to low winter temperatures and mechanisms of cryoprotection. Therefore, the aim of this thesis in terms of biophysical properties of lipids and fatty acid compositions, was to: i) to determine the biophysical properties (phase transition temperatures) of the total lipids of non-diapausing larvae and diapausing larvae during diapause (early diapause, mid diapause and termination of diapause), as well as under controlled cooling conditions during different phases of diapause; ii) to determine the fatty acid compositions of structural (polar) and storage (non-polar) total lipid fractions of non-diapausing larvae and diapausing larvae, as well as under the influence of different temperatures during diapause in the controlled experimental conditions; iii) to determine the lipid classes composition of total lipids extracted from the haemolymph and fat body of non-diapausing and diapausing larvae; iv) to determine the haemolymph and fat body total lipid fatty acid compositions as well as the biophysical properties of the fat body total lipids of non-diapausing larvae and diapausing larvae during diapause as well as in terms of controlled

cooling conditions. Thus, our research was focused on the non-diapausing (ND) as well as the diapausing larvae (D) that were exposed to low temperatures during different phases of diapause.

During analysis of European corn borer *O. nubilalis* lipids, the following techniques were used: thin layer chromatography (TLC) with scanning densitometry, for the separation and quantification of lipid classes; gas-mass chromatography (GC-MS) for the analysis of the fatty acid composition of lipids and the differential scanning calorimetry (DSC), for the thermal analysis of the extracted lipids.

The fatty acid compositions and biophysical properties of lipids differed markedly between non-diapausing and diapausing larvae of *O. nubilalis*. Diapause was associated with a dramatic increase mainly in the proportions of palmitoleic acid (16:1n-7) and oleic acid (18:1n-9), with concurrent reductions in palmitic acid (16:0) and linoleic acid (18:2n-6). The increase in the level of unsaturation of lipids, which caused a marked shift in their phase transitions to lower temperatures, was triggered by diapause rather than low temperatures. Adjustments of fatty acid compositions are likely to be an important component of winter diapause mechanisms, possibly maintaining the fluidity of cell membranes, and the functionality of the organism during lower winter temperatures. We conclude that *O. nubilalis* undergoes remodeling of fatty acid profiles of lipids as an element of its overwintering physiology which may improve the ability to harden during diapause.

**AB**

**Accepted by Scientific Board on:** 21.09.2012.

**ASB**

**Defended:**

**DE**

**Thesis defend board:**

**DB**

**President:** dr Smiljka Šimić, Full Professor (retired), Faculty of Sciences, University of Novi Sad

**Member:** dr Gordana Grubor-Lajšić, Full Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, mentor of the thesis

**Member:** dr Duško Blagojević, Principal Research Fellow, Institute for Biological Research, "Siniša Stanković", University of Belgrade

**Member:** dr Danijela Kojić, Assistant Professor, Faculty of Sciences, University of Novi Sad