

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milena Ž. Janković-Tomanić

**UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA
VARIJABILNOST KOMPONENTI ADAPTIVNE
VREDNOSTI I FIZIOLOGIJU VARENJA LARVI
GUBARA *Lymantria dispar* L.**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Milena Ž. Janković-Tomanić

**UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA
VARIJABILNOST KOMPONENTI ADAPTIVNE
VREDNOSTI I FIZIOLOGIJU VARENJA LARVI
GUBARA *Lymantria dispar* L.**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Milena Ž. Janković-Tomanić

**EFFECTS OF TEMPERATURE AND FOOD
QUALITY ON VARIABILITY OF FITNESS
COMPONENTS AND PHYSIOLOGY OF
DIGESTION IN THE GYPSY MOTH LARVAE
Lymantria dispar L.**

doctoral dissertation

Belgrade, 2012

Ova doktorska disertacija je urađena u Odeljenju za fiziologiju i biohemiju insekata Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“. Rad je realizovan na projektu 143033 „Fiziološki i evolucionni aspekti stresnog odgovora u prirodnim i laboratorijskim populacijama“ i projektu 173027 „Uticaj magnetnih polja i drugih sredinskih stresora na fiziološke odgovore i ponašanje različitih vrsta“.

Posebnu zahvalnost dugujem dr Jelici Lazarević na pomoći u upućivanju u problematiku istraživanja kao i tokom svih faza rada, počev od eksperimentalne faze, analize podataka i sugestijama tokom pisanja ove teze.

Veliku zahvalnost dugujem dr Biljani Stojković, na konstruktivnim primedbama koje su mi pomogle u razumevanju problematike i značajno poboljšale konačnu verziju ove teze.

Zahvaljujem se dr Darki Šešliji-Jovanović na korisnim sugestijama tokom završnih faza pisanja.

Zahvalna sam svim članovima Odeljenja za fiziologiju i biohemiju insekata, na čelu sa dr Verom Nenadović i dr Vesnom Perić-Mataruga, na velikom razumevanju i podršci tokom rada.

Zahvaljujem se svojim kolegama dr Mariji Mrdaković, dr Larisi Ilijin, mr Dajani Todorović, dr Mileni Vlahović, Dragani Matić i dr Zlatku Proliću na pomoći, prijateljstvu i stručnim savetima.

Zahvalna sam svojoj porodici.

Mentori:

dr Jelica Lazarević, naučni savetnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Stojković, docent, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Darka Šešlija-Jovanović, naučni saradnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA VARIJABILNOST KOMPONENTI ADAPTIVNE VREDNOSTI I FIZIOLOGIJU VARENJA LARVI GUBARA *Lymantria dispar* L.

REZIME

Temperatura i kvalitet hrane utiču na performansu larvi gubara, *Lymantria dispar* L. nezavisno ili u međusobnoj interakciji. Strategije preživljavanja larvi gubara u temperaturno kao i nutritivno heterogenoj sredini obuhvataju različite tipove reverzibilne i ireverzibilne fenotipske plastičnosti, koje preko uticaja na usvajanje i raspodelu resursa utiču na osobine životne istorije i rezistentnost prema ekstremnim uslovima životne sredine.

U cilju ispitivanja efekata temperature i kvaliteta hrane, tj. sadržaja proteina i ugljenih hidrata u hrani na komponente adaptivne vrednosti, kao i ekspresiju genetičke varijabilnosti, larve gubara su izložene delovanju tri različite temperature (suboptimalna, optimalna i supraoptimalna) i 4 kombinacije hranljivog sastava dijeta, koje su se međusobno razlikovale kako u ukupnom sadržaju proteina i ugljenih hidrata, tako i u njihovom međusobnom odnosu. U istim eksperimentalnim uslovima ispitivana je uloga procesa varenja, odnosno aktivnosti digestivnih enzima u usklađivanju odnosa i količine unetih nutienata sa potrebama organizma na različitim temperaturama. Takođe, ispitan je uticaj nutritivne vrednosti i balansiranoosti hrane na senzitivnost gubara prema stresnim temperaturama.

Nepovoljne temperature i nizak sadržaj proteina u hrani, kao i disbalans proteina u odnosu na ugljene hidrate, smanjuju performansu larvi gubara. Uticaji temperature i kvaliteta hrane na komponente adaptivne vrednosti: preživljavanje, trajanje razvića, masu i relativnu brzinu rasta, uglavnom su međusobno nezavisni. Pokazano je da povišena temperatura smanjuje preživljavanje i trajanje razvića larvi ali dovodi do povećanja relativne brzine rasta. Nutritivni sastav hrane nije uticao na preživljavanje, ali je nizak sadržaj proteina u hrani dovodio do produžavanja razvića, smanjenja mase i relativne brzine rasta larvi. Relativna brzina rasta larvi je bila manja i pri visokom sadržaju ugljenih hidrata u hrani, dok

je smanjenje mase larvi na hrani sa niskim sadržajem proteina bilo veće ako je i sadržaj ugljenih hidrata bio nizak.

Ako se larve hrane dijetom sa visokim sadržajem proteina dolazi do smanjenja aktivnosti proteolitičkih enzima, ukupnih proteaza i tripsina, dok se u uslovima niskog sadržaja proteina i visokog sadržaja ugljenih hidrata smanjuje aktivnost karbohidraza, α -amilaze i α -glikozidaze. Temperatura i hrana deluju nezavisno na aktivnost elastaze i tripsina, α -glikozidaze i kiselih fosfataza, dok je za aktivnost ukupnih proteaza, leucin aminopeptidaze, α -amilaze, lipaze i alkalne fosfataze pokazana značajna interakcija temperature i nutritivnog sastava dijetete. Promena aktivnosti ukupnih proteaza sa porastom temperature sastoji se u povećanju aktivnosti na nutritivno najsiromašnijoj i smanjivanju aktivnosti na nutritivno najbogatijoj hrani, dok se promena aktivnosti α -amilaze u odgovoru na povećanje temperature sastoji u povećanju aktivnosti na hrani sa niskim sadržajem ugljenih hidrata. Odgovor lipaze i kiselih fosfataza na nizak sadržaj proteina i visok sadržaj ugljenih hidrata u hrani, kao i nutritivno siromašnu hranu sastoji se u povećanju njihove aktivnosti, dok se aktivnost alkalne fosfataze sa porastom temperature povećava i na hrani sa niskim sadržajem proteina i na hrani sa niskim sadržajem ugljenih hidrata.

U odgovoru na delovanje temperature, pokazan je „obrnut obrazac“ promene aktivnosti između endo i egzopeptidaze (elastaze i leucin aminopeptidaze), između endo i egzokarbohidraze (α -amilaze i α -glikozidaze) i između alkalne i kiselih fosfataza, kao i promena fenotipskih korelacija između pojedinih klasa enzima na nepovoljnim temperaturama i suboptimalnom nutritivnom sadržaju hrane.

Uticaj temperature i kvaliteta hrane uočava se i na nivou promene ekspresije genetičke varijabilnosti trajanja razvića, kao i preko značajne varijabilnosti fenotipske plastičnosti u odgovoru na delovanje temperature. Na optimalnoj temperaturi dolazi do porasta heritabilnosti mase larvi na nutritivno najsiromašnijoj hrani, dok porast temperature smanjuje heritabilnost mase ako je u hrani nizak sadržaj jednog ili oba nutrijenta. Genetičke korelacije između trajanja razvića i mase larvi u nepovoljnim uslovima životne sredine su negativne, tj. larve koje karakteriše duže larveno razviće istovremeno imaju i manju masu, dok u optimalnim uslovima nisu detektovane značajne korelacije između ovih

osobina. Većina genetičkih korelacije između sredina, kako za trajanje razvića, tako i za masu larvi bila je pozitivna, što je očekivan rezultat za vrste generaliste. Sve genetičke korelacije između sredina za trajanje razvića larvi su pozitivne i nisu značajno različite od „1” tako da predstavljaju ograničenje za evoluciju fenotipske plastičnosti. Genetičke korelacije između sredina za masu larvi su pozitivne i značajno različite od „1” i, mada za masu larvi nije ustanovljena varijabilnost fenotipske plastičnosti, evolucija plastičnosti je moguća usled značajnih razlika u heritabilnosti između sredina.

Larve gubara mogu „profitirati“ u nepovoljnim uslovima nutritivno siromašne hrane, jer je rezistentost gubara na temperaturni stres procenjena na osnovu vremena preživljavanja, pokazala najveću vrednost u takvim uslovima. Nasuprot tome, ograničavajući faktori preživljavanja su prethodna aklimacija na (konstantno) povišenu temperaturu tokom ranih stupnjeva larvenog razvića i visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata u hrani. Suboptimalna temperatura gajenja i hrana koju karakteriše najmanji odnos proteina u odnosu na ugljene hidrate, kao i povećanje temperature gajenja na nutritivno najsiromašnijoj hrani, značajno smanjuju sposobnost larvi gubara da se presvlače na stresnoj temperaturi.

Ključne reči: *Lymantria dispar L., temperatura, nutritivni kvalitet hrane, osobine adaptivne vrednosti, specifična aktivnost digestivnih enzima, fenotipska plastičnost, rezistentnost*

Naučna oblast: Evolucija

Uža naučna oblast: Evolucionarna fiziologija insekata

UDK broj : [591.1 : 595.78] : [57.042 : 575.21] : 57.017.3 (043.3)

EFFECTS OF TEMPERATURE AND FOOD QUALITY ON VARIABILITY OF FITNESS COMPONENTS AND PHYSIOLOGY OF DIGESTION IN THE GYPSY MOTH LARVAE
Lymantria dispar L.

ABSTRACT

Temperature and food quality affect the performance of gypsy moth larvae *Lymantria dispar* L. independently or in an interaction with each other. Survival strategies of gypsy moth larvae in temperature and nutritionally heterogeneous environments include various types of reversible and irreversible phenotypic plasticity, which due to the effect of uptake and distribution of resources affect the life-history traits and resistance to extreme environmental conditions.

In order to investigate the direct and interactive effects of temperature and food quality on fitness components, as well as the expression of genetic variation, gypsy moth larvae were exposed to three different temperatures (suboptimal, optimal and supraoptimal) and 4 sets of nutrient composition of the diet, which differed in protein and carbohydrate content. Under the same experimental conditions, the role of digestion and digestive enzyme activity in adjusting nutrient quantity and ratio with organism needs at different temperatures was investigated. Also, it was investigated the effect of nutritional value of the food on sensitivity of gypsy moth larvae to stressful temperatures.

An adverse temperature and low protein content in food, as well as an imbalance of protein compared to carbohydrates, reduced performance of gypsy moth larvae. Effects of temperature and food quality on fitness components - survival, developmental time, larval weight and relative growth rate were mainly independent. It has been shown that elevated temperature reduces survival and duration of development, but leads to an increase of the relative growth rate. Nutritional composition of food had no effect on survival, but the low protein content led to prolonged developmental time, reduced larval weight and relative growth rate of gypsy moth larvae. The relative growth rate of larvae was lower if carbohydrate content in food was high, while larval weight reduction was greater if protein content was low and the carbohydrate content was high.

Diet with high protein content led to the decrease in specific activities of total protease and trypsin, while low protein and high carbohydrate diet decreased specific activities of *carbohydrases*, α -amylase and α -glucosidase of larvae. Temperature and food independently influenced activity of elastase and trypsin, α -glucosidase and acid phosphatase, while total protease, leucine aminopeptidase, lipase and alkaline phosphatase activities were significantly affected by interaction of food and temperature. Change of total protease activity with increasing temperature consisted in its increased activity on nutritionally poorest and reduced activity in the richest food, whereas the changes of α -amylase activity in response to increasing temperatures consisted in increased activities in low carbohydrates food conditions. Responses of lipase and acid phosphatase to low protein and high carbohydrate content in food, i.e. nutritionally poor food, were an increase in their activities, while alkaline phosphatase activity increased with increasing temperature on food that are low in both protein and carbohydrate content.

In response to temperature, "reverse pattern" of activity was demonstrated between the endo and exopeptidase (elastase and leucine aminopeptidase), endo and exocarbohydrase (α -amylase and α -glucosidase) and among alkaline and acid phosphatases, as well as changes in phenotypic correlations between certain classes of digestive enzymes to adverse temperatures and suboptimal nutritional content of food.

The effects of temperature and food quality were also noticeable at the level of expression of the genetic variability of developmental time, as well as by significant variability of phenotypic plasticity in response to temperature. At the optimal temperature there was an increase of heritability of larval weight on nutritionally poorest food, while rise in temperature decreased heritability of larval weight if the food was low in one or both nutrients. Within environments genetic correlations for developmental time and larval weight in adverse environmental conditions are negative, i.e. larvae, which were characterized by longer larval development had lower larval weight but, in optimal conditions did not reveal any significant correlation between these traits. Majority of the across-environment genetic correlations both for developmental time and larval weight

were positive, which was an expected result for generalist species. Across-environments genetic correlations for developmental time were positive and not significantly different from “one”, which represented a constraint for the evolution of optimal phenotypic plasticity. Across-environments genetic correlations for larval weight were positive and significantly different from “1” and although, for larval weight was not found variability of phenotypic plasticity, evolution of plasticity was possible due to the significant difference in heritability between environments.

The larvae of gypsy moth “can benefit” from adverse conditions of nutritionally poor food, because the gypsy moth resistance to temperature stress, which was estimated based on survival time, showed the highest value particularly in such conditions. In contrast, the limiting factor for survival was the previous acclimation to (constant) elevated temperature during early larval stages and high content of protein and carbohydrates in food. Suboptimal temperature and food with the lowest ratio of proteins compared to carbohydrates, as well as an increase in temperature on nutrient-poorest food, significantly reduced the ability of gypsy moth larvae to molt in stressful temperatures.

Key words: *Lymantria dispar L., temperature, food quality, life-history traits, phenotypic plasticity, digestive enzymes specific activities, resistance*

Scientific field: Evolution

Narrower scientific field: Evolutionary Insect Physiology

UDC number: [591.1 : 595.78] : [57.042 : 575.21] : 57.017.3 (043.3)

SADRŽAJ

REZIME

ABSTRACT

1. UVOD **1**

- 1.1. Odgovori insekata na nepovoljnu temperaturu 1
- 1.2. Odgovori insekata na variranje proteina i ugljenih hidrata u hrani 8
- 1.3. Aklimacija/aklimatizacija i adaptacija na temperaturni i nutritivni stres 12
- 1.4. Evolucija fenotipske plastičnosti u kompleksnim sredinama 18

2. CILJ ISTRAŽIVANJA **23**

3. MATERIJAL I METODE **25**

- 3.1. Eksperimentalna procedura i uslovi gajenja 25
- 3.2. Eksperimentalne grupe 25
- 3.3. Procena komponenti adaptivne vrednosti 26
- 3.4. Biohemijske metode 27
- 3.4.1. Priprema homogenata srednjeg creva 27
- 3.4.2. Određivanje specifične aktivnosti digestivnih enzima 27
- 3.5. Ispitivanje rezistentnosti larvi gubara na visoke temperature 30
- 3.6. Statističke metode 30
- 3.7. Uticaj temperature i kvaliteta hrane na genetičku varijabilnost i korelacije komponenti adaptivne vrednosti 30
- 3.7.1. Heritabilnost u širem smislu 30
- 3.7.2. Varijabilnost fenotipske plastičnosti 31
- 3.7.3. Genetičke i fenotipske korelacije 31

4. REZULTATI **33**

<u>4.1. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA KOMPONENTE ADAPTIVNE VREDNOSTI</u>	33
4.1.1. Uticaj temperature i hrane na preživljavanje larvi gubara do ulaska u IV larveni stupanj	33
4.1.2. Uticaj temperature i hrane na trajanje razvića larvi	35
4.1.3. Uticaj temperature i hrane na masu larvi gubara na početku IV larvenog stupnja	41
4.1.4. Uticaj temperature i hrane na relativnu brzinu rasta larvi gubara tokom tri dana IV larvenog stupnja	41
<u>4.2. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA GENETIČKU VARIJABILNOST I KORELACIJE KOMPONENTI ADAPTIVNE VREDNOSTI</u>	45
4.2.1. Heritabilnost u širem smislu	45
4.2.2. Varijabilnost fenotipske plastičnosti	48
4.2.3. Genetičke korelacije	54
<u>4.3. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA AKTIVNOST DIGESTIVNIH ENZIMA</u>	57
4.3.1. <u>Uticaj temperature i hrane na aktivnost enzima koji vare proteine</u>	57
4.3.2. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost ukupnih proteaza (SPA)	58
4.3.3. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost elastaze (SEA)	58
4.3.4. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost tripsina (STA)	58
4.3.5. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost leucin aminopeptidaze (SLA)	59
4.3.6. <u>Uticaj temperature i hrane na aktivnost enzima koji vare ugljene hidrate</u>	66
4.3.7. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost amilaze (SAA)	66
4.3.8. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost α -glikozidaze (SGA)	67
4.3.9. <u>Uticaj temperature i hrane na aktivnost lipaze</u>	71
4.3.10. <u>Uticaj temperature i hrane na aktivnost fosfataza</u>	74
4.3.11. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost alkalne	

fosfataze (SALP)	74
4.3.12. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost ukupnih kiselih fosfataza (SACP)	74
4.3.13. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost lizosomalne kisele fosfataze (ACP ₁)	75
4.4. <u>Uticaj temperature i hrane na fenotipske korelacije između aktivnosti digestivnih enzima</u>	80
4.5. <u>Fenotipske korelacije između aktivnosti digestivnih enzima i komponenti adaptivne vrednosti</u>	87
4.6. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA REZISTENTNOST PREMA VISOKOJ TEMPERATURI	93
4.6.1. Uticaj temperature i hrane na vreme preživljvanja (VP)	93
4.6.2. Trajanje IV larvenog stupnja larvi izloženih temperaturi 36°C	94
4.6.3. Uticaj hrane i temperature na broj presvlačenja larvi nakon prebacivanja na stresnu temperaturu 36°C	94
5. DISKUSIJA	100
<hr/>	
5.1. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA KOMPONENTE ADAPTIVNE VREDNOSTI	100
Uticaj temperature na komponente adaptivne vrednosti	100
Uticaj kvaliteta hrane na komponente adaptivne vrednosti	105
5.2. PROMENE KVANTITATIVNO–GENETIČKIH PARAMETARA U NUTRITIVNO I TEMPERATURNOM HETEROGENIM SREDINAMA	111
Varijabilnost fenotipske plastičnosti	116
Genetičke korelacije	117
5.3. DIGESTIVNA PLASTIČNOST U ODGOVORU NA NUTRITIVNI I TEMPERATURNI STRES	122
Plastični odgovori digestivnih enzima na nutritivni stres	123
Plastični odgovori digestivnih enzima na temperaturni stres	141
5.4. REZISTENTNOST NA VISOKU TEMPERATURU	148

5.5. INSEKTI I GLOBALNE KLIMATSKE PROMENE	158
<u>ZAKLJUČCI</u>	<u>161</u>
<u>LITERATURA</u>	<u>167</u>
<u>BIOGRAFIJA</u>	<u>231</u>

UVOD

Temperatura i kvalitet hrane imaju centralnu ulogu u rastu, reprodukciji i populacionoj dinamici herbivornih insekata. Uticaj temperature na herbivorne insekte može biti direktan i indirektan preko promene hemijskog sastava njihovih biljaka domaćina i narušavanja sinhronizacije razvića insekata i biljaka. Dnevno i sezonsko variranje temperature i nutritivnog sastava biljaka domaćina je uobičajeno u prirodnim staništima, naročito za insekte koji žive u umerenim regionima (Mattson 1980; Stamp, 1993) tako da se sve više ispituje simultani efekat ova dva faktora, a time i efekat njihove interakcije na individualnu performansu insekata (Lindroth *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2000; Levesque *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2009; Lee & Roh 2010). Nutritivni kvalitet, kao i druga svojstva dijetete kojom se insekt hrani, utiče na njegovu interakciju sa drugim biotičkim i abiotičkim faktorima životne sredine. Od nutritivnog kvaliteta hrane zavisi otpornost na insekticide, CO₂, patogene, gladovanje i nepovoljnu temperaturu. Istraživanja uticaja temperature i kvaliteta hrane na herbivorne insekte su relevantna za sagledavanje uticaja globalnih klimatskih promena kada porast CO₂ u atmosferi dovodi do porasta temperature, a u biljkama do smanjenja sadržaja azota i povećanja sadržaja ugljenih hidrata (Williams *et al.*, 2000).

1.1. Odgovori insekata na nepovoljnu temperaturu

Kao posledica njihove generalno male veličine i ektotermne prirode, insekti su posebno osetljivi na delovanje ekstremnih temperatura i na temperaturna variranja (Chown & Nicolson, 2004) tako da predstavljaju dobar model sistem za ispitivanje različitih odgovora na temperaturni stres (Sorensen *et al.*, 2003; Chown & Nicolson, 2004; Hoffmann *et al.*, 2003). Temperatura životne sredine utiče na ponašanje, metabolizam, ekologiju i evoluciju organizama (Cymborowski, 2000; Woods *et al.*, 2003; McMillan *et al.*, 2005; Khurt *et al.*, 2006). Efekti ekstremnih temperatura zavise od intenziteta stresa i dužine izlaganja stresu (Angilleta, 2009; Lee & Denlinger, 2010). Zavisno od vrste, stupnja u razviću, prethodne

„temperaturne istorije” organizmi mogu da tolerišu različite temperature u određenom temperaturnom opsegu. Akutno izlaganje ekstremno visokim temperaturama dovodi do smrti, dok širok opseg povišenih temperatura, ispod gornje letalne granice, izaziva promene koje se mogu manifestovati tokom kasnijih stupnjeva razvića, dovodeći do manjeg preživljavanja, rasta i reprodukcije (Denlinger & Yocum, 1998). Insekti mogu odgovoriti na ekstremne temperature promenama u ponašanju, morfologiji, fiziologiji i/ili osobinama životne istorije (Hoffmann *et al.*, 2003).

Temperatura utiče na individualnu performansu insekata. Ustanovljeno je da insekti mogu pokazivati značajnu fenotipsku plastičnost, odnosno sredinski zavisnu fenotipsku ekspresiju, u odgovoru na promenu temperature za brojne osobine životne istorije kao što su brzina rasta, trajanje razvića, broj larvenih stupnjeva, veličina tela adulta, fekunditet, dužina života, mortalitet. Temperaturna norma reakcije, kao skup fenotipova koje može da produkuje jedan genotip u različitim uslovima životne sredine, za većinu osobina podrazumeva postojanje optimalne temperature iznad i ispod koje dolazi do smanjenja adaptivne vrednosti organizma (Angilletta, 2006). Povećanje temperature, generalno, dovodi do povećanja brzine rasta, skraćivanja trajanja razvića i smanjenja veličine tela adulta (Atkinson 1994, 2001; Kingsolver & Huey, 2008). Brzina rasta zavisi od fizioloških i bihevioralnih faktora koji su povezani sa usvajanjem i raspodelom resursa uključujući unos hrane, efikasnost varenja i asimilacije i anaboličke procese uključene u somatski rast (Angilletta *et al.*, 2002, 2004). Zavisnost veličine tela od temperature ne sledi uvek obrazac „viša temperatura-manja veličina tela” (Angilletta *et al.*, 2004; Atkinson, 2006; Forster *et al.*, 2011). Odnos između norme reakcije, interakcije genotipa i sredine (G x E) (ukrštene norme reakcije) i genetičkih korelacija osobine između sredina, je povezan sa evolucijom generalizma i specijalizacije u različitim sredinama (Guntrip & Silby, 1998). Jedan od preduslova evolucije specijalizacije su značajane interakcije između genotipa i sredine i/ili negativne genetičke korelacije osobine između sredina (u odsustvu značajnih „G x E” interakcija) (Guntrip & Silby, 1998).

Ektotermni organizami prilagođavaju brzinu rasta različitim mehanizmima koji podrazumevaju uzajamna ograničenja i cenu plastičnosti (Gotthard, 2001). Sposobnost organizma da plastično odovori na variranja životne sredine može biti ograničena cenom održavanja plastičnog odgovora: fiziološkom, ekološkom i genetičkom cenom. Negativne genetičke korelacije (eng. *trade-off*), ukazuju na postojanje uzajamnih ograničenja između osobina koje su povezane sa adaptivnom vrednošću (Roff, 1992; Reznick *et al.*, 2000; Sgro & Hoffmann, 2004) i mogu biti rezultat različite raspodele ograničenih resursa između različitih funkcija. Podaci različitih autora ukazuju da je uzrok povećane brzine rasta na višim temperaturama povećana konzumacija hrane (Reynolds & Nottingham, 1985; Stamp, 1990; Casey, 1993; Kingsolver & Woods, 1997, 1998; Lindroth *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2000; Levesque *et al.*, 2002). Temperatura na kojoj je brzina rasta najveća može biti ograničavajući faktor za preživljavanje (De Block *et al.*, 2008; Reynolds & Nottingham, 1985; Bochdanovits & de Jong, 2003). Temperatura utiče na trajanje razvića (Kingsolver & Woods, 1997, 1998; Lindroth *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2000) i broj larvenih stupnjeva (Wiggelsworth, 1972; Grutenko *et al.*, 2000; Esperk *et al.*, 2007; Kingsolver, 2007), tako da se broj larvenih stupnjeva može povećati i/ili smanjiti u nepovoljnim uslovima životne sredine. Trajanje larvenih stupnjeva se značajno smanjuje sa povećanjem temperature, što uzrokuje veću brzinu rasta na višim temperaturama (Levesque *et al.*, 2002). Izlaganje insekata supraoptimalnim i suboptimalnim temperaturama može imati negativne efekte na fekunditet zavisno od trajanja izlaganja, stupnja u razviću i cene povezane sa reprodukcijom (Rinehart *et al.*, 2000; Dillon *et al.*, 2007; Berger *et al.*, 2008). Povećanje temperature dovodi do povećanja mortaliteta, skraćivanja trajanja razvića i smanjenja veličine jedinki što može imati za posledicu smanjenje broja položenih jaja (Reynolds & Nottingham, 1985; Ochieng-Odero, 1992; Matsuki *et al.*, 1994).

Mnogo je podataka o narušavanju procesa razvića u odgovoru na temperaturni stres (Denlinger & Yocum, 1998). Kod *Drosophila melanogaster* opisane su fenokopije (Mitchell & Lipps, 1978) i sterilitet mužjaka kao posledica delovanja temperaturnog stresa (Krebs & Loeschcke, 1994; Vollmer *et al.*, 2004).

Izlaganje temperaturnom stresu smanjuje fekunditet i fertilitet kod *Ephestia cautella* i *Plodia interpunctella* (Arbogast, 1981). Kod *Cydia pomonella* može dovesti do smanjenja fertiliteta (White, 1981) i prekobrojnih presvlačenja (Neven & Rehfield, 1995). „Materinski efekti” predstavlja oblik međugeneracijske plastičnosti, u kome promene faktora životne sredine, temperature, kvaliteta hrane (resursa), fotoperiod, gustina populacije, kojima su izložene ženke u roditeljskoj generaciji, utiču na fenotip i adaptivnu vrednost njihovih potomaka (Mousseau & Fox, 1998). Kod transgenih sojeva *Drosophila melanogaster* procenat piljenja je smanjen ukoliko su ženke u roditeljskoj generaciji bile izložene toplotnom šoku, što ukazuje da se efekat toplotnog šoka, putem materinskih efekata, može preneti i na sledeću generaciju (Silbermann & Tatar, 2000).

Veliko je individualno variranje u osetljivosti insekata na promene temperature i njihovoj sposobnosti da održe fiziološke funkcije na suboptimalnim temperaturama (Kingsolver *et al.*, 2004b). Fiziološki odgovori na povišenu temperaturu podrazumevaju promene na nivou metabolizma (Irlich *et al.*, 2009) respiracije, nervnog i endokrinog sistema, kao i sintezu proteina temperaturnog šoka (Neven, 2000). Nervni i endokrini sistem su važni u regulaciji odgovora insekta na visoke temperature (Ivanović & Janković-Hladni, 1991; Rauschenbach, 1991; Robertson *et al.*, 2004; Perić-Mataruga *et al.*, 2006; Mrdaković *et al.*, 2007). Direktna efekat temperature na intenzitet metabolizma postavlja limite za brzinu rasta i trajanje razvića (Nylín & Gotthard, 1998). Kod većine insekata važna je uloga ugljenohidratnog metabolizma u uslovima delovanja stresora uključujući i visoku temperaturu, jer ovaj metabolizam obezbeđuje energiju potrebnu za indukciju kompenzatornih mehanizama koji omogućavaju preživljavanje u stresnim uslovima (Ivanović *et al.*, 1992; Đorđević *et al.*, 1995). I umeren toplotni stres, kao i onaj većeg intenziteta, menjaju metabolički “profil” organizma (Malmendal *et al.*, 2006; Michaud *et al.*, 2008) dovodeći do smanjenja koncentracije glikogena i glukoze, do povećanja koncentracije slobodnih amino kiselina, posebno alanina i tirozina (Malmendal *et al.*, 2006), do povećanja koncentracije sorbitola (Wolfe *et al.*, 1998; Salvucci, 2000), kao i smanjenja koncentracije glicerola i serina (Michaud *et al.*, 2008). Preko uticaja na metaboličke

procesu temperatura može dovesti do promene količine ukupnih ugljenih hidrata, lipida i proteina u organizmu (Woods *et al.*, 2003; Sonmez & Gulel, 2008; Kim *et al.*, 2010). Temperatura utiče na nutritivne indekse kao što su unos hrane, efikasnost korišćenja hrane, konverziju unete i svačene hrane u biomasu insekta (Yang & Yoern, 1994; Levesque *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2009). Pokazano je da anoksija čini insekte još osetljivijim na dejstvo visokih temperatura jer je uključena u mehanizme termalne tolerancije i nivo ekspresije Hsp70 (Jedlicka *et al.*, 1997; Mayer & Bukau, 2005).

Visoke temperature izazivaju narušavanje funkcije ćelijske membrane, DNK oštećenja, promene u ćelijskom mikrokruženju i denaturaciju proteina koja može narušiti aktivnost enzima (Chown & Nicholson, 2004). Visoka temperatura dovodi do povećane fluidnosti lipida membrane i veće zastupljenosti zasićenih masnih kiselina (Hazel, 1995; Hochachka & Somero, 2002) što ektotermni organizmi kompenzuju homeoviskoznim adaptacijama (Hazel, 1995; van Dooremalen *et al.*, 2011). Enzimi (proteini) su posebno osetljivi na delovanje temperature i kod njih su detektovane promene strukturnih i funkcionalnih osobina kod vrsta adaptiranih na različite temperature (Hochachka & Somero, 2002; Somero, 2004). Temperaturne promene utiču na konformaciju, a time i na aktivnost različitih klasa enzima, kako enzima intermedijarnog metabolizma tako i digestivnih i detoksifikacionih enzima (Applebaum *et al.*, 1964; Lindroth *et al.*, 1990; Šustr & Block, 1998; Sukhanova *et al.*, 1996; Eguchi, 1995; Rauschenbach *et al.*, 2007; Jia *et al.*, 2011; Nabizadeh & Kumar, 2011). U uslovima temperaturnog stresa pokazane su promene aktivnosti proteaza i amilaze, kao i aktivnosti neurosekretnih neurona kod larvi *Morimus funereus* (Ivanović *et al.*, 1975; Leković *et al.*, 2001). Aktivnost proteaza može da raste (Kingsolver & Woods, 1997; Rajesh *et al.*, 2011) ili da se smanjuje sa porastom temperature (Pan & Gupta, 1979), dok proteaze i lipaze *Periplaneta americana* karakteriše odsustvo adaptivne kompenzacije na dejstvo visokih temperatura (Das & Das, 1982). Pokazano je da niske temperature povećavaju aktivnost lipaze kod *Philosamia ricini* (Pan & Gupta, 1979). Chen i Denlinger (1990) su detektovali povećanu aktivnost glikogen fosforilaze, dok su

Burnell i sar. (1991) uočili povećanje aktivnosti glikolitičkih enzima respiratornog lanca i enzima detoksifikacije pri delovanju povišene temperature.

Akutno izlaganje visokim temperaturama indukuje sintezu proteina termalnog stresa, odnosno hit šok proteina (Hsp) koji štite ćelije i ceo organizam od kasnijeg izlaganja povišenim temperaturama, ali i od drugih stresora (Feder & Hofmann, 1999; Sorensen *et al.*, 2003; Hoffmann *et al.*, 2003). Hit šok proteini (Hsp) funkcionišu kao molekularni pratioci koji se kratkotrajno i nekovalentno vezuju za denaturisane proteine i sprovode ih do lizozoma (Chiang *et al.*, 1994; Feder & Hofmann, 1999; Mayer & Bukau, 2005) ili se vezuju za native proteine i pomažu u uspostavljanju tercijarne strukture nakon vraćanja na optimalnu temperaturu (Parsell & Lindquist, 1994). Pored uloge u odgovoru na toplotni stres, veoma su važne njihove uloge u indukovanoj termotoleranciji i aklimaciji (Bowler, 2005; Sinclair & Roberts, 2005; Loeschcke & Sorensen, 2005) i u apoptozi (Beere, 2004). S tim u vezi, uočene su velike razlike u ekspresiji Hsp kod različito adaptiranih vrsta (Zatsepina *et al.*, 2001; Sorensen *et al.*, 2003; Evgen'ev *et al.*, 2007; Sorensen & Loeschcke, 2007), kao i razlike u tkivnoj specifičnosti i mehanizmima regulacije (Lakhotia *et al.*, 2002; Gong & Golic, 2006; Sharma *et al.*, 2007; Velu *et al.*, 2008) koje jesu posledice različitih evolucionih putanja vrsta. Na osnovu ćelijske lokalizacije, genske sekvence, molekulske mase i uloge u odgovoru na stresore, Hsp se dele na nekoliko grupa: familija malih hit šok proteina (Hsp22, Hsp23, Hsp26 i Hsp27 kDa) koji se sintetišu nakon delovanja ekstremno visokih temperatura (Evgen'ev *et al.*, 1987; Michaud *et al.*, 2002; Morrow *et al.*, 2006), familija Hsp70, koja uključuje konstitutivni Hscp (kodiran genom za Hsp73) i različite inducibilne Hsp (Hsp72, 75, 78) (Kregel, 2002) i familija Hsp velikih molekulske mase (Hsp90, 104/110 kDa) važnih u različitim procesima signalne transdukcije u normalnim i stresnim uslovima (Pratt & Toft, 2003; Chen & Wagner, 2012). Mada su kodirajuće sekvence gena za Hsp visoko evoluciono konzervisane (Gupta & Singh, 1994) opseg, kinetika i temperaturni prag ekspresije Hsp variraju zavisno od temperaturnog režima kojem su izloženi organizmi (Krebs *et al.*, 2001; Lerman & Feder, 2001; Barua & Heckathorn, 2004; Karl *et al.*, 2012). Aktivacija gena za Hsp je pod kontrolom hit-šok transkripcionog faktora (HSF). U odsustvu

stresora HSF je inaktivni monomer, a nakon temperaturnog šoka HSF se transformiše u trimer koji se vezuje za hit-šok elemente i izaziva transkripciju *hsp* gena (Wu, 1995; Tomanek & Somero, 2002).

Abiotički stres je povezan sa promenom ekspresije gena (Cossins *et al.*, 2006; Roelofs *et al.*, 2008). Ekspresija gena se menja u različitim temperaturnim uslovima (Podrabsky & Somero, 2004; Ellers *et al.*, 2008; Roelofs *et al.*, 2010). Fiziološke promene, koje nastaju kao posledica promena u ekspresiji gena povratno utiču na otpornost na stres i osobine životne istorije kao što su fekunditet i dužina života (Feder & Hofmann, 1999; Silbermann & Tatar 2000; Hercus *et al.*, 2003). Kod *Drosophila melanogaster* je identifikovano preko 1000 gena koji su uključeni u odgovor na toplotni šok (Sørensen *et al.*, 2005a). Promena ekspresije gena pod dejstvom temperature predstavlja fiziološku osnovu temperaturne aklimacije (Somero, 2005). Jedna od osnovnih razlika između stenotermnih i euritermih organizama može biti u njihovim fiziološkim kapacitetima da modifikuju transkripciju gena pod delovanjem temperaturnog stresa (Somero, 2010). Prirodna selekcija menja mehanizme koji regulišu ekspresiju gena za Hsp (Sørensen *et al.*, 2005b; Sørensen & Loeschcke, 2007; Sorensen, 2010). Pokazana je negativna regulacija ekspresije gena za Hsp70 kod laboratorijskih populacija *Drosophila* adaptiranih na povišene temperature (Sorensen *et al.*, 2001; Sorensen & Loeschcke 2002), kao i kod mnogih termofilnih i termorezistentnih vrsta (Zatsepina *et al.*, 2000; Evgen'ev *et al.*, 2007; Calabria *et al.*, 2012). Dugotrajno izlaganje različitih laboratorijskih sojeva *Drosophila melanogaster* povišenoj temperaturi vodi isključivanju nekih kopija gena za Hsp70 putem ugradnje mobilnih genetičkih elemenata (Lerman *et al.*, 2003). Kontinuirana ekspresija različitih Hsp može dovesti do smanjenog preživljavanja i fekunditeta, inhibicije rasta i produženog trajanja razvića (Krebs & Loeschcke, 1994; Krebs & Feder, 1998; Silbermann & Tatar, 2000; Huang *et al.*, 2007), tako da nivo ekspresije Hsp predstavlja balans između „cene” i „koristi” za adaptivnu vrednost organizma (Hercus *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2003; Sorensen, 2010).

Za razliku od delovanja visokih temperatura, odgovori insekata na niske temperature podrazumevaju drugačije fiziološke mehanizme. Nakon kratkotrajnog

izlaganja niskim temperaturama, struktura i sastav membranskih fosfolipida se značajno menja, a time i fluidnost membrane što utiče na promenu aktivnosti proteina i enzima vezanih za membranu (Hazel, 1995; Overgaard *et al.*, 2006, 2008; Lee *et al.*, 2006). U odgovoru na niske temperature insekti nagomilavaju krioprotektivne supstance, šećere i poliole (Khani *et al.*, 2007; Khani & Moharramipour, 2010), a pokazana je i sinteza određenih Hsp (Rinehart *et al.*, 2007).

1.2. Odgovori insekata na variranje proteina i ugljenih hidrata u hrani

Međusobni odnos proteina i ugljenih hidrata je ključan faktor za razviće, fekunditet i preživljavanje insekata (Simpson *et al.*, 2004; Raubenheimer *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2005). Larve fitofagnih insekata se najbolje razvijaju na dijetama koje sadrže proteine i ugljene hidrate u skoro podjednakim količinama i/ili na proteinski bogatijim dijetama (Waldbauer *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 2002, 2006; Behmer, 2009). Optimalan balans hranljivih materija zavisi od mnogobrojnih faktora i usaglašen je sa nutritivnim potrebama organizma na određenom stupnju razvića i sa datim ekološkim uslovima. U odnosu na balans hranljivih materija, kod insekata su evoluirale dve glavne nutritivne strategije: specijalisti i generalisti (Simpson & Raubenheimer, 1993). Za razliku od specijalista, generalisti se suočavaju sa velikim variranjima nutritivnog kvaliteta svojih biljaka domaćina, zavisno od vrste, stupnja u razviću i biljnog tkiva koje koriste u ishrani, kao i odgovora biljaka na promene faktora spoljašnje sredine (Mattson, 1980; Yeoh *et al.*, 1992; Bae & Sicher, 2004; Cross *et al.*, 2006).

Larve fitofagnih insekata koje se suočavaju se sa viškom ugljenih hidrata i manjkom proteina svojih biljaka domaćina (Waldbauer *et al.*, 1984; Lee *et al.*, 2002, 2003), razvile su različite mehanizme kojima regulišu unos proteina i ugljenih hidrata u određenoj količini i srazmeri kako bi zadovoljile svoje nutritivne potrebe (Raubenheimer & Simpson, 2004). Regulacija nutritivnog balansa može se vršiti na nivou ponašanja selekcijom biljne hrane određenog hemijskog sastava, kao i na nivou varenja, apsorpcije i korišćenja hranljivih materija (Waldbauer &

Friedman, 1991; Matsson 1980; Awmack & Leather 2002; Raubenheimer & Simpson 2003; Bede *et al.*, 2007). Dakle, regulatorni mehanizmi za postizanje nutritivnog balansa mogu biti bihejvioralni, digestivni (preingestivni, postingestivni), apsorptivni, metabolički i ekskretorni (Yang & Joern 1994; Zanotto *et al.*, 1997; Behmer, 2009). Laboratorijske studije ukazuju na to da su bihejvioralne i digestivne promene važan mehanizam putem kojih se insekti homeostatski prilagođavaju na promene kvaliteta hrane (Simpson & Simpson, 1990). To uključuje i specifičnu modulaciju (osetljivosti) hemoreceptora za amino kiseline i šećere herbivornih insekata na suboptimalnim dijetama (Bernays *et al.*, 2004), kao i moguću uključenost neuromodulatora i učenja (Waldbauer & Friedman, 1991).

Kada se hrane nutritivno siromašnom hranom, larve to kompenzuju povećanjem brzine konzumacije hrane (Simpson & Simpson, 1990, Lee *et al.*, 2004). Povećani (kompenzatorni) unos hrane je primarni mehanizam putem koga larve na hrani sa niskim sadržajem azota održavaju brzinu rasta (Woods, 1999). Kompenzatorno povećanje unosa proteinima siromašne hrane može dodatno narušiti balans unetih proteina i ugljenih hidrata (Mattson, 1980; Karowe & Martin, 1989; Elser *et al.*, 2000). Autoselekcija dijeta predstavlja kontinuiranu regulaciju unosa hrane, koja podrazumeva česte promene vrste hrane da bi se zadovoljio optimalan unos (Waldbauer & Friedman, 1991; Fielding & Defoliart, 2008). Jedan od mogućih preingestivnih mehanizama u regulisanju nutritivnog disbalansa je i lučenje enzima glukoza oksigenaze (GOX), koji katalizuje oksidaciju glukoze na vodonik peroksid i glukonat, koji za insekte predstavlja nesvarljivi oblik ugljenih hidrata (Babić *et al.*, 2008). Pokazano je da se GOX aktivnost u pljuvački larvi *Spodoptera exigua* značajno povećava na veštačkoj dijeti u odnosu na ishranu biljkama domaćinima (Hu *et al.*, 2008), dok se aktivnost GOX *Heliothis zea* ne menja značajno sa promenoma nutritivnog kvaliteta biljaka domaćina (Merckx-Jacques & Bede, 2005; Peiffer & Felton, 2005).

Smanjeni unos hrane je jedan od mehanizama preingestivnog prilagođavanja kada je hrana bogata ugljenim hidratima (Lee *et al.*, 2006). Kada su ugljeni hidrati u višku, različiti postingestivni mehanizmi su uključeni u regulaciju

nutritivnog balansa. Larve mogu odgovoriti povećanjem deponovanja ugljenih hidrata u obliku glikogena u masnom telu, što je proces koji zavisi od temperature (Simpson *et al.*, 2002; Raubenheimer & Simpson, 2003; Lee & Roh, 2010) ili konverzijom u trehalozu. Nivo trehaloze u hemolimfi je uključen u promenu veštačke dijetete ili biljke domaćina tokom razvića (engl. “*switching behavior*”) i zato hrana bogata ugljenim hidratima može dovesti i do prestanka hranjenja (Merck-Jacques *et al.*, 2008). Restrikcija unosa hrane ili umereno gladovanje mogu povećati dužinu života kao i otpornost na toplotni stres (Wenzel, 2006; Smith *et al.*, 2007). Povećana respiracija (Zanotto *et al.*, 1993, 1997) kao i povećano stvaranje toplote (termogeneza) (Zanotto *et al.* 1997; Trier & Mattson, 2003; Jensen & Hessen, 2007) su odgovori na hranu bogatu ugljenim hidratima. Jedan od mehanizama kompenzacije proteinski siromašnih dijeta je korišćenje ugljenih hidrata za sintezu aminokiselina (Thompson *et al.*, 2003). Višak unosa proteina larve kompenzuju smanjenjem apsorpcije aminokiselina i povećanjem ekskrecije azota putem amonijaka ili mokraćne kiseline (Zanotto *et al.*, 1993; 1997; Lee *et al.*, 2004) kao i povećanjem kapaciteta korišćenja amino kiselina kao izvora energije (Thompson, 1998; Raubenheimer & Simpson, 2003). Nutritivni disbalans se teže kompenzuje u odnosu na razblaženje hrane odnosno smanjen sadržaj nutrijenata, jer povećana konzumacija deficitarnog nutrijenta povlači za sobom unos u višku drugog, a podaci govore da insekti imaju ograničen kapacitet da tolerišu nutrijent u višku (Raubenheimer, 1992; Raubenheimer & Simpson, 1997; Raubenheimer & Simpson, 2003).

Pored uticaja na osobine životne istorije jedinki, promena nutritivnog kvaliteta hrane dovodi do promena na nivou populacije (Zehnder & Hunter, 2009; Boersma & Elser, 2006; Merck-Jacques *et al.*, 2008). Odnos proteina i ugljenih hidrata utiče na performansu larvi, preko uticaja na trajanje razvića, broj larvenih stupnjeva, preadultni mortalitet, dužinu života, veličinu adulta, fekunditet i odnos polova (Davidowitz *et al.*, 2004), što se posledično odražava na dinamiku populacija insekata. Larve na dijetama sa visokim sadržajem ugljenih hidrata imaju manje preživljavanje, manju brzinu rasta i produženo trajanje razvića (Raubenheimer *et al.*, 2005; Telang *et al.*, 2002, Lee *et al.*, 2002, 2003, 2004,

Tompson *et al.*, 2005; Merckx-Jacques *et al.*, 2008). Povećanje sadržaja proteina povećava performansu fitofagnih insekata, ali ako povećanje prevazilazi određeni nivo to može imati štetne posledice (Boersma & Elser, 2006; Despland & Noseworthy, 2006; Zehnder & Hunter, 2009; Bin *et al.*, 2011). Ukoliko biljke imaju znatno viši nivo nutrijenata u odnosu na nivo koji zadovoljava optimalne potrebe herbivornih insekata, onda konzumacija takve hrane dovodi do povećane ekskrecije elemenata u višku što je energetski „skupo” i može imati svoju cenu kroz smanjeni rast, reprodukciju i na kraju i manju brzinu rasta populacije (Anderson *et al.*, 2005; Boersma & Elser, 2006). Podaci na *Spodoptera littoralis* pokazali su smanjenje mase lutke na dijeti sa visokim sadržajem proteina (Lee *et al.*, 2002).

Nepredvidljive promene u kvantitetu i kvalitetu hrane, dovode kod insekata do niza odgovora, među kojima su i odgovori na molekularnom nivou. Sastav dijete ima značajan uticaj na obrazac ekspresije gena kod insekata (Zinke *et al.*, 2002; Zudaire *et al.*, 2004; Yocum *et al.*, 2006). Menjanje optimalnog odnosa proteina i ugljenih hidrata u dijeti izaziva smanjenje ekspresije jedarnog antigena za ćelijsku proliferaciju (eng. PCNA-*proliferating cell nuclear antigen*) u digestivnom traktu *Locusta migratoria* (Zudaire *et al.*, 2004). Gladovanje ili dijeta sa visokim sadržajem ugljenih hidrata indukuje aktivnost specifičnog seta gena kod larvi *Drosophila melanogaster* (Zinke *et al.*, 2002). Kod larvi *D. melanogaster* koje su gladovale ili su hranjenje dijetom sa visokim sadržajem ugljenih hidrata, identifikovano je tri kategorije dijetom regulisanih gena, a u okviru svake kategorije postojali su rani i kasni geni, u odnosu na njihovu ekspresiju tokom individualnog razvića (Zinke *et al.*, 2002). Gen Lip3, koji kodira kiselu lipazu, inhibiran je u odgovoru na povećanje koncentracije ugljenih hidrata u dijeti, dok je njegova aktivnost povećana tokom gladovanja (Zinke *et al.*, 1999). Četiri dijetom regulisana gena su izolovana kod *Perillus biomaculatus*, među kojima su TH (gen za tirozin-3-monooksigenazu) i Gasp gen (hitin vezujući protein). Pokazana je pozitivna korelacija između nivoa ekspresije pojedinih gena i broja generacija insekata hranjenih na veštačkoj dijeti, kao i da uticaj nutritivnog kvaliteta hrane na ekspresiju gena nije konstantan tokom razvića (Yocum *et al.*, 2006). Ovaj odgovor može ukazivati na adaptaciju na hranu koja je deficitarna u nekim esencijalnim

nutrijentima i/ili sadrži štetne količine drugih (Coudron & Kim, 2004). Pokazan je veliki diverzitet i različita ekspresija gena za aminopeptidaze lepidoptera zavisno od prisustva različitih proteaznih inhibitora biljaka (Vila *et al.*, 2005; Angelucci *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Crava *et al.*, 2010). Mada je poznavanje nutrigenomike insekata još uvek nepotpuno, jasno je da je odgovor insekatskog genoma ima sposobnost finog podešavanja u odgovoru na dijetu (Yocum *et al.*, 2006).

Nutritivni kvalitet kao i druga svojstava dijetu kojom se insekt hrani utiču na njegovu interakciju sa drugim biotičkim i abiotičkim faktorima životne sredine. Od nje zavise imunološke funkcije insekata (Lee *et al.*, 2008), kao što su otpornost na insekticide (Wu & Wang, 2003), patogene i parazite (Lee *et al.*, 2006; Freitag *et al.*, 2009), biljne alelohemikalije, proteazne inhibitore (Bown *et al.*, 2004; Zhu-Salzman *et al.*, 2003), rezistentnost na gladovanje (Stockoff, 1991) i nepovoljnu temperaturu (Andersen *et al.*, 2010; Verdu' *et al.*, 2010). Nutritivni kvalitet hrane tokom larvenog perioda ima značajan uticaj na sposobnost organizma adulta da odgovori na različite vrste stresora, kao i da optimalan sastav hrane varira u zavisnosti od vrste stresa (Andersen *et al.*, 2010).

1.3. Aklimacija/aklimatizacija i adaptacija na temperaturni i nutritivni stres

Strategije preživljavanja u temperaturno heterogenoj sredini podrazumevaju različite tipove reverzibilne i ireverzibilne fenotipske plastičnosti (Angiletta, 2009). Aklimacija/aklimatizacija uključujući i kratkotrajnu aklimaciju na stres velikog intenziteta (engl. *hardening*) može se obuhvatiti pojmom fenotipske plastičnosti (Chown & Terblanche, 2007), odnosno sposobnosti organizma (genotipa) da na stimulse iz životne sredine odgovori promenom fenotipa (Pigliucci, 2001, 2005; West-Eberhard, 2003; Whitman, 2009). Adaptivna fenotipska plastičnost predstavlja složen i efikasan mehanizam usaglašavanja organizma sa variranjem životne sredine (Nylin & Gotthard, 1998).

Bihevioralno prilagođavanje je prva linija odbrane od nepovoljnih temperatura i zavisi od osobina mikrostaništa (Khurt *et al.*, 2006). Ukoliko nepovoljne temperature duže traju, fiziološki mehanizmi su presudni u

obezbedjivanju preživljavanja. Kratkotrajno izlaganje umereno visokim temperaturama, koje štiti organizam od kasnijeg oštećenja izazvanog stresom većeg intenziteta, odnosi se na temperaturnu toleranciju i u njenoj osnovi nalazi se sinteza Hsp (Yocum & Denlinger, 1992; Hoffmann *et al.*, 2003). Aklimacija se definiše kao fiziološki, biohemijski ili anatomske odgovor individualnog organizma koji nastaje kao rezultat hroničnog izlaganja eksperimentalno izazvanim uslovima (Randall *et al.*, 2000). Možemo razlikovati bazalnu i inducibilnu termotoleranciju (Kregel, 2002; Hoffmann *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2003; Chown & Terblanche, 2007). Fiziološku osnovu bazalne termotolerancije čine konstitutivna ekspresija Hsp, prisustvo osmolita i promene sastava ćelijskih membrana i promene u alozimima i njihovim relativnim odnosima (Hochachka & Somero, 2002). Termotolerancija smanjuje negativne efekte delovanja temperature na komponente adaptivne vrednosti organizma, dok se rezistentnost odnosi na osobine koje smanjuju nastanak oštećenja i/ili ograničavaju njihov obim (Roy & Kirchner, 2000). Termotolerancija se može povećati aklimacijom/aklimatizacijom (Loeschcke & Sørensen, 2005; Bowler, 2005; Sinclair & Roberts, 2005), kratkotrajnom aklimacijom (*hardening*) (Sejerkilde *et al.*, 2003; Nyamukondiwa & Terblanche, 2010; Chidawanyika & Terblanche, 2011a) i različitim bihejvioralnim, fiziološkim i molekularnim mehanizmima (Hoffmann *et al.*, 2003; Woods *et al.*, 2003; Evgenev *et al.*, 2007). Sve ove promene su reverzibilne, ograničenog trajanja i na vremenskoj skali mogu biti u trajanju od nekoliko časova, dana ili meseci (dijapauza) (Fischer & Karl, 2010b). Bowler (2005) ukazuje na to da se aklimacija uspostavlja nakon dugotrajnog izlaganja blagim stresnim uslovima, dok se *hardening* odnosi na kratkotrajna izlaganja i odgovore na „oštrije” stresne uslove (Sinclair & Roberts, 2005; Loeschcke & Sorensen, 2005), dok Willmer postavlja jasnu razliku između aklimacije i razvojne plastičnosti (Willmer, 2000; Wilson & Franklin, 2002). Aklimacije su reverzibilne promene, za razliku od razvojne plastičnosti, koja (najčešće) predstavlja kaskadu ne-reverzibilnih fenotipskih promena usled promena faktora životne sredine tokom razvića (Willmer *et al.*, 2000; Kingsolver *et al.*, 2004a; Brakefield, 2007) koji mogu uticati na različite osobine rezistentnosti na stres (Fischer & Karl, 2010a). Novija istraživanja ukazuju

da razvojna plastičnost ipak može biti reverzibilna (Fisher *et al.*, 2006; Terblanche & Chown, 2006). Hipoteza o pozitivnom efektu aklimacije (engl. *beneficial acclimation hypothesis*) (Leroi *et al.*, 1994) definiše aklimaciju kao prednost, dok hipoteza o štetnosti aklimacije (engl. *detrimental acclimation hypothesis*) (Loeschcke & Hoffmann, 2002; Wilson & Franklin, 2002; Woods & Harrison, 2002) predviđa značajno smanjenje performanse organizama izloženih ekstremnim uslovima. Preživljavanje letalnih temperatura i/ili gornjih maksimalnih i donjih minimalnih kritičnih temperatura (CT_{max} i CT_{min}), može biti značajno poboljšano prethodnim izlaganjem subletalnim temperaturama, što može biti glavni mehanizam koji insekti koriste u odgovoru na ciklične (Kelty & Lee, 2001; Overgaard & Sorensen, 2008; Nyamukondiwa & Terblanche, 2010) i sezonske promene temperature (Terblanche *et al.*, 2006; Fisher & Karl, 2010b; Fisher *et al.*, 2012). Generalno, više temperature tokom razvića, aklimacije i/ili kratkotrajnog izlaganja mogu dovesti do povećanja tolerancije na toplotni stres i obrnuto, i takvi odgovori su prisutni kod većine insekata (Hoffmann *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2005b; Bublly & Loeschke, 2005; Chown & Terblanche, 2007; Huang *et al.*, 2007; Overgaard *et al.*, 2008; Nyamukondiwa & Terblanche, 2010; Fisher *et al.*, 2010a, 2012). Ispitivanje ukrštene tolerancije na visoku i nisku temperaturu *Cydia pomonella* su pokazala da pre-tretman niskim temperaturama ne poboljšava preživljavanje na visokim temperaturama, dok pre-tretman visokim temperaturama poboljšava preživljavanje niskih temperatura (Chidawanyika & Terblanche, 2011a). U eksperimentu ukrštene tolerancije na *Drosophila melanogaster* je pokazano uglavnom odsustvo korelisanog odgovora, što ukazuje da je u uslovima delovanja više stresora evolucija zajedničkog plastičnog odgovora ograničena (Bublly *et al.*, 2012). Aklimatorni odgovor na brze, dnevne promene temperature zahteva različite promene u ekspresiji gena od onih koji su karakteristični za dugotrajne, sezonske promene temperature (Somero 2005, 2010).

Mehanizmi termotolerancije se brzo uključuju i isključuju jer su energetski skupi (Angilletta, 2009; Karl *et al.*, 2012), mada je štetni efekat ekspresije Hsp manji pod delovanjem umereno povišenih temperatura (Sørensen *et al.*, 2008). U okviru vrste, temperaturna tolerancija se značajno menja zavisno od stupnja u

razviću (Chen *et al.* 1991; Bowler & Terblanche, 2008; Marais *et al.*, 2009), kvaliteta hrane (Hall *et al.*, 2000; Andersen *et al.*, 2010; Fisher *et al.*, 2010a; Verdu'*et al.*, 2010), međugeneracijske plastičnosti (materinski efekat) (Mousseau & Fox, 1998), fotoperioda (Fisher *et al.*, 2012), imuniteta, uticaja patogena i parazita (Thomson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006b). Sposobnost organizma da se aklimatizuje povećava preživljavanje (Yocum & Denlinger, 1992; Beckett & Evans, 1997; Hoffmann *et al.*, 2003; Zhao & Jones, 2012), poboljšava reproduktivni potencijal (Rinehart *et al.*, 2008), kretanje (Deere & Chown, 2006) i menja osobine rezistentnosti na stres (Sorensen *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2005; Sorensen & Loeschcke, 2007, Terblanche *et al.*, 2010; Weldon *et al.*, 2011).

Prostorno i/ili vremensko variranje temperature tokom dužeg vremenskog perioda može dovesti do evolucije adaptacija. Adaptacije mogu biti na nivou proteina, odnosno enzima (Somero, 2004), membrana i metabolizma, kao i na nivou ekspresije gena za Hsp (Zatsepina *et al.*, 2000; Sorensen *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2005; Sorensen & Loeschcke 2007; Sorensen, 2010). Ukoliko se evolucija odvija u konstantnim uslovima životne sredine, tj. ukoliko selekcija iz generacije u generaciju favorizuje iste fenotipove, očekuje se da će se razvojne norme reakcija sužavati, odnosno da će proces razvića voditi formiranju uskog opsega adaptiranih fenotipova. U molekularno-biološkoj osnovi sužavanja razvojne norme reakcije nalaze se brojni mehanizmi koji učestvuju u stabilizaciji i kanalisanju razvića, a u kojima veoma važnu ulogu imaju i različiti Hsp molekuli. Budući da je fenotipska plastičnost skupo svojstvo (što je iskazano kroz koncepciju cene plastičnosti i brojnih potencijalnih razloga za smanjenje adaptivne vrednosti plastičnih genotipova) u stabilnim sredinskim uslovima selekcija će, umesto plastičnih genotipova, voditi fiksaciji onih neplastičnih. Tako, evolucija adaptacija može dovesti do narušavanja DNK (eng. *DNA decay*), regulatornih funkcija gena i odsustva fizioloških odgovora (kao što je odgovor na toplotni stres) kod ekstremno stenotermnih organizama (Somero, 2010).

Fiziološki mehanizmi adaptacija omogućavaju preživljavanje na ekstremnim temperaturama i odvijanje uobičajenih aktivnosti, kao što su hranjenje i parenje uprkos nepovoljnim uslovima, te stoga povećavaju adaptivnu

vrednost organizma (Lee & Denlinger, 2010). Sposobnost adaptacije na ekstremne temperature je od velikog značaja za temperaturnu tolerantnost i preživljavanje vrsta u uslovima globalnih klimatskih promena (Angilletta, 2009; Chown *et al.*, 2010).

Kod herbivornih insekata je prisutna velika različitost i plastičnost aktivnosti različitih klasa digestivnih enzima kao i enzima intermedijarnog metabolizma u odgovoru na nutritivni stres. Nutritivni stres, pored disbalansa makronutrienata u hrani, podrazumeva prisustvo biljnih alelohemikalija, ksenobiotika, reducenata svarljivosti, prisustvo proteaznih i amilaznih inhibitora, lektina. Digestivne proteaze lepidoptera pokazuju ogroman strukturni i funkcionalni diverzitet što, zajedno sa signalnim mehanizmima, daje polifagnim larvama mogućnost da prilagođavaju sastav digestivnih proteaza u odnosu na promene nutritivnog kvaliteta hrane i/ili antinutritivne komponente hrane (Srinivasan *et al.*, 2006). Mnoge vrste lepidoptera pokazuju veliku fleksibilnost u adaptaciji na različite biljke domaćine (polifagija), menjanjem specifičnosti svojih digestivnih proteaza u odgovoru na kvalitativne promene proteina u hrani i kada postojeće proteaze nisu efikasne i/ili su nedovoljne za varenje proteina (Patanakar *et al.*, 2001), kao i otpornošću na različite proteazne inhibitore (PIs) biljaka i lektine (Bown *et al.*, 2004). Pokazan je veliki diverzitet insekatskih aminopeptidaza u odgovoru na ishranu različitim povoljnim i nepovoljnim biljkama domaćinima, kao i različita ekspresija gena u odgovoru na proteazne inhibitore (Angellucci *et al.*, 2008; Crava *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009). Kod *Helicoverpa armigera* i *Cillio suppressalis* pokazano je značajno povećanje aktivnosti aminopeptidaza na nepovoljnim biljkama domaćinima i smanjenje aktivnosti serinskih proteaza (tripsina i himotripsina), što može omogućiti izbegavanje toksičnih efekata usled nutritivnog disbalansa i regulaciju nivoa enzima u zavisnosti od sastava dijetete (Vila *et al.*, 2005; Lomate & Hivrale, 2011).

Podaci na različitim vrstama insekata pokazuju različitu aktivnost digestivnih amilaza i postojanje multipnih izoformi na različitim biljkama, veštačkim dijetama i različitim stupnjevima u razviću (Silva *et al.*, 2001; Mendiola-Olaya *et al.*, 2000; Kotkar *et al.*, 2009; Dojnov *et al.*, 2010). Kod *Helicoverpa*

armigera su pokazane kvalitativne i kvantitativne razlike u aktivnosti amilaze gajenih na različitim biljkama i na veštačkoj dijeti. Larve na veštačkoj dijeti imaju u proseku višu aktivnost i različite izoforme u poređenju sa aktivnošću na različitim biljkama, a korelacije između aktivnosti amilaze i proteaza sa sadržajem proteina i ugljenih hidrata u dijeti, ukazuju na regulaciju nivoa digestivnih enzima u odnosu na makromolekulski sastav dijete i na značaj nutritivnog balansa u ishrani insekata (Kotkar *et al.*, 2009). Žižci (*Sitophilus* sp.) imaju visok nivo amilazne aktivnosti što im omogućava da prevaziđu dejstvo amilaznih inhibitora u svojoj ishrani (Baker & Woo, 1985). Aktivnost galaktolipaze i fosfolipaze je visoka kod folivornih lepidoptera, dok je aktivnost triacil glicerol lipaze (TAG) niska, što je prilagođeno visokom sadržaju galaktolipida u lišću (Christeller *et al.*, 2011; Horne *et al.*, 2009). Korelacija između aktivnosti lipaze i amilaze može ukazati na adaptacije insekata na različite dijete (Lwlababa *et al.*, 2010).

Kao odgovor na variranje nutritivnog sadržaja dijete, pored promena aktivnosti digestivnih enzima, pokazana je promena aktivnosti različitih detoksifikacionih enzima (Lindroth *et al.*, 1990, 1991; Bin *et al.*, 2011). Variranje (povećanje) sadržaja proteina i ugljenih hidrata u dijeti dovodi do povećanja aktivnosti AChE (acetil holin esteraze), dok aktivnost CarE (karboksil esteraze) nije značajno promenjena kod *Spodoptera exigua* (Bin *et al.*, 2011). Takođe je pokazana tendencija povećanja aktivnosti detoksifikacionih enzima (esteraze i karbonil reduktaze) i smanjenje aktivnosti glutation transferaze kao odgovor na deficit proteina u dijeti kod larvi gubara (Lindroth *et al.*, 1990, 1991).

Nutritivni sastav dijete utiče na sekreciju digestivnih enzima (Lwalaba *et al.* 2010). Bazalni nivo sekrecije digestivnih enzima prisutan je kod mnogih insekatskih vrsta, ali prisustvo hrane dovodi do povećanog oslobađanja i povećanja količine enzima u lumenu creva (Applebaum, 1985; Woodring *et al.*, 2009). Prvi nivo postingestivnog usaglašavanja odnosa nutrienata je gastrointestinalni trakt (Clissold *et al.*, 2010; Sørensen *et al.*, 2010). Sekrecija digestivnih enzima može biti pozitivno korelisana sa koncentracijom supstrata (mehanizam sekretagoge) ili u uslovima nutritivnog disbalansa dolazi do homeostatske sekrecije digestivnih enzima (Clissold *et al.*, 2010). Kontrola oslobađanja enzima u odgovoru na

nutritivni sastav hrane može biti modulirana neurohormonima. Poslednjih godina pokazano je da članovi nekoliko familija insekatskih neuropeptida, uključujući alatostatine (AS) i alatotropine (AT), tahikine, CCAP (ljudski kardioaktivni peptid), FLRFamide i biogene amine (Fuse *et al.*, 1999; Harshini *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2004; Hill & Orchard 2005), kontrolišu oslobađanje digestivnih enzima i u isto vreme modulišu aktivnost glatkih mišića, jonski transport i ponašanje vezano za ishranu (*foraging*) (Fuse *et al.*, 1999; Harshini *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2006; Hill & Orchard, 2005). Pokazano je da alatostatini inhibiraju oslobađanje amilaze i tripsina, dok alatoropini imaju stimulatorni efekat na *Spodoptera frugiperda* (Lwalaba *et al.*, 2011). Organizmi koji su ograničeni na određenu vrstu hrane mogu imati veću kompenzatornu plastičnost aktivnosti digestivnih enzima u odnosu na one koji vrše selekciju unosa hrane da bi postigli optimalan nutritivni balans.

1.4. Evolucija fenotipske plastičnosti u kompleksnim sredinama

Odgovori na selekciju zavise od raspoložive genetičke varijabilnosti koja može da se menja u zavisnosti od faktora životne sredine (Falconer & Mackay, 1996; Roff, 1997). Stresni uslovi životne sredine menjaju fenotipsku i/ili genetičku varijabilnost kvantitativnih osobina, naročito onih koje su povezane sa adaptivnom vrednošću (Parsons 1987, 1989; Hoffmann & Parsons, 1991). Promena uslova spoljašnje sredine i izlaganje organizama novim sredinama, menja genetičku varijabilnost osobina životne istorije kao i genetičke korelacije između osobina (Service & Rose, 1985; Holloway *et al.*, 1990). Kvantitativno-genetičke studije pokazuju značajnu heritabilnost i genetičku varijabilnost normi reakcija za različite osobine životne istorije (Scheiner & Lyman, 1989; Steigenga *et al.*, 2005). Interakcije „genotip × sredina“ predstavljaju variranje odgovora na promene faktora životne sredine u funkciji genotipa (Falconer & Macay, 1996) i dovode do razlika u heritabilnosti osobina u različitim životnim uslovima. Heritabilnost u užem smislu (h^2) procenjuje doprinos genotipa fenotipskom variranju određene osobine, pri čemu se ovim parametrom procenjuje uticaj gena sa aditivnim efektom (aditivna genetička varijansa- V_A) na totalnu fenotipsku varijansu u populaciji. Takođe, h^2 daje uvid u kapacitet populacije da odgovori na selekciju u

promenjenim uslovima životne sredine (Falconer & Macay, 1996; Lynch & Walsh, 1998). Heritabilnost u širem smislu (H^2) obuhvata doprinos ukupne genetičke varijanse fenotipskoj varijabilnosti (aditivne, dominantne, epistatičke genetičke komponente), uzimajući u obzir da, pored uticaja gena, fenotipska varijansa nastaje i pod uticajima efekata životne sredine i epigenetičke uticaje roditeljske generacije. Postoje različiti i često oprečni podaci koji se odnose na to kako se menja heritabilnost različitih osobina u povoljnim i nepovoljnim uslovima životne sredine, kod laboratorijskih i populacija u prirodnim uslovima, kao i pod delovanjem različitih stresora. Holloway i sar. (1990) su dali hipotezu da se aditivna genetička varijansa povećava u novim sredinama nezavisno od toga da li su one povoljne ili nepovoljne, dok Hoffmann i Merilä (1999) ukazuju na faktore koji dovode do smanjenja ili povećanja heritabilnosti u nepovoljnim uslovima. Heritabilnost u laboratorijskim uslovima (*Drosophila sp.*) je veća u odnosu na prirodne uslove prevashodno zbog smanjenja sredinske varijanse (Hoffmann, 2000). Kod ne-domestifikovanih vrsta i populacija u prirodnim uslovima, heritabilnost je veća u povoljnim u odnosu na nepovoljne uslove, naročito za morfometrijske osobine (Charmantier & Garant, 2005). Ako su uslovi relativno stabilni i predvidivi, pretpostavlja se da je heritabilnost osobina životne istorije, koje su povezane sa adaptivnom vrednošću, u proseku niža nego heritabilnost morfometrijskih osobina što se smatra posledicom dugoročne selekcije ovih osobina u stabilnim uslovima (Mousseau & Roff, 1987; Falconer & Mackay, 1996). I veličina tela i osobine životne istorije su kontrolisane većim brojem gena, što povećava udeo dominantne i epistatičke varijanse u ukupnoj genetičkoj varijansi (Blows & Sokolowski, 1995; De Jong & Imasheva, 2001) i ograničava moguće pravce evolucije njihovih kombinacija. Pokazana je visoka ekspresija dominantne i epistatičke genetičke varijabilnosti trajanja razvića u stresnim uslovima kod *Drosophila* (Blows & Sokolowski, 1995).

Kako niska tako i visoka temperatura povećavaju aditivnu genetičku varijansu i/ili heritabilnost i dovode do značajnih promena fenotipske varijabilnosti morfometrijskih osobina, kao i osobina životne istorije (Imasheva *et al.*, 1997, 1998; Loeschcke *et al.*, 1999; Bublly & Loeschcke, 2001; Sisodia & Singh,

2009). Podaci na *Drosophila* ukazuju i na povećanje i na smanjenje genetičke varijabilnosti različitih osobina u stresnim uslovima (niska i visoka temperatura, nutritivni stres, povećana gustina gajenja) (Höffmann & Parsons, 1988; Imasheva *et al.*, 1998; Bublik *et al.*, 2001). Ukupna genetička varijabilnost morfometrijskih i seksualnih karakteristika se može povećati kao posledica delovanja stresnih temperatura (Sisodia & Singh, 2009). Ova heterogena zapažanja se, u evolucionim teorijskim modelima, dovode u vezu sa promenama puteva signalne transdukcije i posledičnih plastičnih promena u regulaciji ekspresije gena u različitim životnim uslovima. Ukoliko se menja pul aktivnih gena koji na različite načine učestvuju u razviću osobine, očekivano je da će se promeniti kako fenotipska tako i genetička varijabilnost osobine, tj. njena heritabilnost. Zavisno od osobine, genetičkih karakteristika populacije i konkretnih faktora sredine, te promene mogu ili povećati ili smanjiti procenjenu varijabilnost.

Iz istih navedenih razloga, tj. promene obrazaca ekspresije različitih osobina, norme reakcije pojedinačnih osobina i genetičke korelacije između osobina, mogu se menjati sa promenom životnih uslova. Karan i sar. (2000) su pokazali smanjenje genetičkih korelacija između sredina i promenu oblika normi reakcije, sa udaljavanjem od optimalne temperature i zavisno od pola (Karan *et al.*, 2000). Genetička varijabilnost trajanja razvića i veličine tela imaju različit obrazac u različitim uslovima i zbog toga genetičke korelacije između ovih osobina menjaju znak (-/+) zavisno od temperature. Značajna genetička varijabilnost trajanja razvića uglavnom je prisutna na visokim, dok je genetička varijabilnost veličine tela prisutna na niskim temperaturama (De Jong & Imasheva, 2001). Pokazan je značajan udeo dominantnih efekata i epistatičkih interakcija gena u ukupnoj genetičkoj varijabilnosti na graničnim temperaturama, kao i u osetljivosti na ekstremne temperature kod *Drosophila* (De Jong & Imasheva, 2001). Heritabilnost u užem smislu za veličinu tela kod *Culex quinquefasciatus* se povećava sa porastom temperature i pokazana je jaka interakcija „genotip × sredina“ koja je u saglasnosti sa niskim genetičkim korelacijama između sredina (Gunay *et al.*, 2011). Povećanje genetičke varijanse sa povećanjem temperature može biti posledica oslobađanja „skrivenih“ genetičkih promena gena koji utiču na veličinu tela usled dekanalisanja

razvića (engl. *decanalization*) (Gibson & Dworkin, 2004). Mitchell & Hoffmann (2010) su pokazali da ne postoji značajna heritabilnost u užem smislu za rezistentnost na toplotni stres kod *Drosophila melanogaster* u uslovima postepenog povećanja temperature (engl. *ramping*), ali je važno imati na umu da je u tim uslovima veća promena sredinske varijanse (V_E). Aditivna genetička varijansa je veća kada su larve izložene konstantnom delovanju povišene temperature (Mitchell & Hoffmann, 2010). Za razliku od morfoloških osobina, osobine rezistentnosti na toplotni stres imaju pre tendenciju smanjenja nego povećanja genetičke varijabilnosti kod sojeva *Drosophila* rezistentnih na visoku temperaturu (Noory *et al.*, 2008).

Promene faktora životne sredine koje menjaju kvalitet resursa dovode do promena heritabilnosti (Bubliy *et al.*, 2000b, 2001; Lee *et al.*, 2008; Valtonen *et al.*, 2011) i genetičkih korelacija između osobina životne istorije (Reznick *et al.*, 2000; Messina & Fry, 2003). Kod folivornih insekata, sezonske promene kvaliteta hrane menjaju genetičke korelacije između trajanja razvića i mase larvi (Kause *et al.*, 2001), kao i između veličine tela i trajanja razvića, od pozitivnih i statistički značajnih do negativnih na hrani lošeg kvaliteta (Kause & Morin, 2001). U predvidivim i povoljnim uslovima genetičke korelacije između mase i trajanja razvića su visoke, dok loš kvalitet hrane uzrokuje negativne korelacije između osobina i smanjenu ekspresiju genetičke varijabilnosti (Kause *et al.*, 2001). Analiza lokusa za kvantitativne osobine (QTL) kod *D. melanogaster* je pokazala da promene temperature i hrane menjaju interakciju između genotipa i sredine i/ili i pola kod 17 QTL lokusa za dužinu života (Vieira *et al.*, 2000). Kellerman i sar. (2009) su pokazali da su razlike u rasprostranjenju *Drosophila melanogaster*, zajedno sa tolerancijom na hladnoću, tesno povezane sa raspoloživom genetičkom varijabilnošću za rezistentnost na isušivanje. Tolerantnije vrste (generalisti) imaju višu heritabilnost i veće rasprostranjenje (Kellerman *et al.*, 2009).

Kod Lepidoptera je pokazano da interakcija temperature i kvaliteta hrane menja genetičku varijansu unutar sredina i kovarijansu rasta između sredina, a značajno je variranje kako plastičnosti u odgovoru na kvalitet hrane tako i temperaturnih normi reakcije između različitih genotipova (Kingsolver *et al.*,

2006). Varijansa brzine rasta između različitih biljaka domaćina se povećava sa porastom temperature (Stillwell *et al.*, 2007). Heritabilnost mase, brzine rasta i fekunditeta *Callosobruchus maculatus* ne zavisi od interakcije između temperature i biljke domaćina, kao ni genetičke korelacije, što ukazuje na relativno stabilnu genetičku arhitekturu u nutritivno heterogenoj sredini (Stillwell *et al.*, 2007).

Temperaturne norme reakcije za rast i veličinu tela herbivornih insekata u velikoj meri zavise od nutritivnog kvaliteta hrane (Kingsolver *et al.*, 2006) i prisustva sekundarnih biljnih hemikalija (Stamp, 1990, Stamp *et al.*, 1994). Pošto norme reakcije predstavljaju krajnji rezultat različitih genetičkih i sredinskih uticaja (Angilleta, 2009) temperaturne norme reakcije za rast i veličinu tela mogu biti različitog nagiba kada je kvalitet resursa (kvalitet biljke domaćina) nepovoljan (Diamond & Kingsolver, 2010, 2012). Promena kvaliteta hrane može dovesti do oslobađanja „skrivenih“ (engl. *cryptic*) genetičke varijabilnosti. Skrivena genetička varijabilnost se fenotipski eksprimira pod određenim uslovima, kao što su izlaganje organizma i/ili populacije novim dijetama (Ledon-Retting *et al.*, 2010).

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Eksperimenti u ovom radu odnose se na uporedno ispitivanje efekata različitih temperatura (19, 23 i 28°C) i različitih dijeta u kojima se varira sadržaj proteina i skroba, na individualnu performansu larvi gubara *Lymantria dispar* (L.). Nekoliko konkretnih zadataka ovog istraživanja omogućiće bolje razumevanje procesa varenja u usklađivanju odnosa i količine unetih nutrienata sa potrebama organizma na različitim temperaturama, kao i strategije preživljavanja gubara i pravaca evolucije populacija u temperaturno i nutritivno heterogenim sredinama:

1. Analiza direktnih i interaktivnih efekata temperature i kvaliteta hrane, tj. sadržaja proteina i ugljenih hidrata u hrani, na komponente adaptivne vrednosti (preživljavanje, trajanje razvića, masu i relativnu brzinu rasta) larvi gubara *Lymantria dispar* (L.).
2. Razumevanje uloge procesa varenja u usklađivanju odnosa i količine unetih nutrienata sa potrebama organizma na različitim temperaturama, preko analize delovanja temperature i kvaliteta hrane na aktivnost digestivnih enzima larvi.
3. Analiza efekata temperature i nutritivnog sastava dijetete na rezistentnost larvi gubara u uslovima temperaturnog stresa.
4. Procena uzajamnih ograničenja između rasta larvi u optimalnim uslovima i preživljavanja u uslovima stresa, kao i značaja ovih ograničenja za održavanje varijabilnosti u prirodnim populacijama.

Obzirom da je gubar izraziti generalista koji se hrani sa više od 500 biljnih vrsta i ima širok areal rasprostranjenja u šumama Evrope, Azije, severne Amerike i severne Afrike, kao i da je ekonomski važna štetočina koja tokom prenamnoženja

dovodi do golobresta šuma i voćnjaka, proučavanje efekata interakcije temperature i kvaliteta hrane na rast i fiziološka svojstva gubara ima kako fundamentalni (razumevanje mehanizama tolerantnosti na stres i potencijala evolucije plastičnosti stresnih odgovora) tako i aplikativni značaj (predviđanje promene areala rasprostranjenja i pojave prenamnoženja).

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Eksperimentalna procedura i uslovi gajenja

U eksperimentalnom radu korišćena su legla gubara iz topolove šume, doneta sa lokaliteta Opovo, 30 km udaljenom od Beograda. Legla su po sakupljanju držana u frižideru na +4°C, do piljenja. Nakon uklanjanja dlačica, jaja su površinski sterilisana u 0.1% natrijum hipohloritu. Jaja su iz jajnih legala prebačena u uslove pogodne za piljenje, na temperaturu od 23°C i fotoperiod 12 sati svetlost : 12 sati tama.

Larve prvog stupnja prebačene su na veštačku dijetu predviđenu za gajenje gusenica gubara u laboratorijskim uslovima (O`Dell *et al.* 1985), uz modifikacije povezane sa variranjem sadržaja proteina i ugljenih hidrata (Lindroth *et al.*, 1997; Stockhoff, 1991). Eksperimenti na larvama hranjenim veštačkim dijetama dozvoljavaju manipulaciju odnosa proteina i ugljenih hidrata (P:C) i isključivanje faktora kao što su fizičke osobine lišća, odbrambene komponente biljaka, alelohemikalije, deterenti, reducenti svarljivosti.

Larve su gajene u Petri kutijama (p=9cm) na gustini 5 larvi po kutiji do ulaska u IV stupanj. Po ulasku u IV stupanj larve su gajene pojedinačno u Petri kutijama.

3.2. Eksperimentalne grupe

U eksperimentu je korišćeno 19 legala (full-sib familija) i formirano je 12 eksperimentalnih grupa radi uporednog ispitivanja delovanja tri različite temperature (19°, 23° i 28°C) i četiri različite dijetete u kojima je variran sadržaj proteina i skroba (4 kombinacije visokog ili niskog sadržaja proteina i ugljenih hidrata). Za procenu delovanja temperature i kvaliteta hrane na aktivnost digestivnih enzima, korišćena je po jedna larva po leglu, za procenu komponenti

adaptivne vrednosti (preživljavanje, trajanje razvića, masa) 3-5 larvi po leglu, a za ispitivanje rezistentnosti na visoku temperaturu između 1 i 3 larve po leglu. Dijete se razlikuju ne samo po međusobnom odnosu proteina i ugljenih hidrata već i po ukupnom sadržaju hranljivih materija tj. kalorijskoj vrednosti. Primenjene su dve koncentracije kazeina (visoka -15.3% i niska - 0% u odnosu na suhu težinu hrane) i dve koncentracije skroba (visoka - 17% i niska - 2% u odnosu na suhu težinu hrane)

Analiziran je efekat sledećih dijeta:

Hrana 1 - visok sadržaj proteina (kazein) / visok sadržaj ugljenih hidrata (skrob)

Hrana 2 - visok sadržaj proteina / nizak sadržaj ugljenih hidrata

Hrana 3 - nizak sadržaj proteina / visok sadržaj ugljenih hidrata

Hrana 4 - nizak sadržaj proteina / nizak sadržaj ugljenih hidrata

3.3. Procena komponenti adaptivne vrednosti

Da bi se ispitaio uticaj temperature i hrane na individualnu performansu larvi gubara ispitivane su sledeće komponentne adaptivne vrednosti:

- Preživljavanje larvi od piljenja do ulaska u IV larveni stupanj
- Trajanje I larvenog stupnja
- Trajanje razvića do ulaska u III larveni stupanj
- Ukupno trajanje razvića do ulaska u IV larveni stupanj
- Masa larvi na početku IV larvenog stupnja
- Relativna brzina rasta larvi tokom 3 dana IV larvenog stupnja (RGR)

Mortalitet i presvlačenje larvi su praćeni svakodnevno.

3.4. Biohemijske metode

3.4.1. Priprema homogenata srednjeg creva

Larve su žrtvovane trećeg dana po presvlačenju u četvrti larveni stupanj. Disekcija je vršena na ledu, na filter papiru ovlaženom destilovanom vodom. Nakon dekapitovanja larve su preseccane iza zadnjeg para „nožica”, abdomen je sečen uzdužno i izolovano je celo crevo. Crevo je očišćeno od masnog tela, a zatim je odstranjeno prednje i zadnje crevo. Srednje crevo je više puta ispirano hladnim fiziološkim rastvorom (0.9% NaCl), izmerena je masa creva, a zatim je čuvano na -20°C, do pravljenja homogenata. Homogenizovanje je vršeno u 0.9% rastvoru NaCl na ledu, homogenizerom (Ika-Werk Ultra turrax, 20000 Upm) u trajanju od 15 sekundi i brzini 20000 obrtaja/min. Koncentracija tkiva u homogenatu je bila 100 mg creva/1mL 0.9% NaCl. Nakon homogenizovanja je vršeno sonifikovanje (3 puta po 15 sec. sa pauzom od 10 sec.). Homogenati su zatim centrifugirani u Eppendorf centrifugi u trajanju od 20 min., t=4°C i brzini 15000g. Nakon centrifugiranja dobijeni supernatant predstavlja grubi ekstrakt srednjeg creva koji je čuvan na -20°C do određivanja aktivnosti digestivnih enzima.

3. 4. 2. Određivanje specifične aktivnosti digestivnih enzima

U cilju analize veličine i adaptivnog značaja plastičnih odgovora aktivnosti enzima na delovanje temperature i kvaliteta hrane, ispitivana je aktivnost digestivnih enzima larvi gubara koji vare proteine:

- Ukupnih proteaza (SPA),
- Tripsina (STA),
- Leucin aminopeptidaze (SLA) i
- Elastaze (SEA)
- Aktivnost digestivnih enzima koji vare ugljene hidrate:

- α -amilaze (SAA) i
- α -glikozidaze (SGA)

Aktivnost digestivnih lipaza (SLIP) i

Aktivnosti digestivnih fosfataza:

- ukupne alkalne fosfataze (SALP),
- ukupnih kiselih fosfataza (SACP) i
- lizosomalne kisele fosfataze (SACP_i).

Specifična aktivnost ukupnih proteaza srednjeg creva (SPA) određivana je po Kunitz-ovoj metodi (Kunitz, 1947), merenjem apsorpcije na $\lambda=280\text{nm}$, čiji intenzitet zavisi od količine aromatičnih aminokiselina (Trp, Tyr) oslobođenih razgradnjom supstrata kazeina. Specifična aktivnosti tripsina (STA) i leucin aminopeptidaze (SLA) određena je po metodi Erlanger-a (1961), prilagođenoj manjim količinama uzorka za korišćenje mikrotitar ploče, uz korišćenje sintetičkih supstrata N-benzoil-DL arginin *p*-nitroanilida (BapNA) i L-leucin *p*-nitroanilida (LpNA). Princip metode se zasniva na oslobađanju *p*-nitroanilina iz veštačkog supstrata koji se apsorbuje na $\lambda=405\text{ nm}$. Specifična aktivnost elastaze (SEA) je takođe određivana po metodi Erlanger-a (1961), koja se zasniva na oslobađanju *p*-nitroanilina iz supstrata N-Succinyl-Ala-Ala-Pro-leucine-*p*-nitroanilide (SA₂PLpNA). ApSORpcija je merena na spektrofotometru za mikrotitar ploče „Thermo-Multiskan Spectrum 2.2” (MSS).

Aktivnost amilaze je određena po metodi Bernfelda (Bernfeld, 1955), modifikovano po Doanu (Doane, 1967), u optimalnim uslovima za amilazu gubara (Lazarević *et al.*, 1998). Princip metode se zasniva na učešću produkta reakcije maltoze u redukciji 3,5-dinitrosalicilne kiseline koja zatim nakon zagrevanja na 100°C daje crvenomrku boju čija se apSORpcija meri na $\lambda=550\text{ nm}$. Aktivnost α -glikozidaze je određena metodom Baker-a (Baker, 1991). Princip metode se

zasniva na oslobađanju p-nitrofenola (koji daje žutu boju) iz supstrata p-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside, pod dejstvom enzima.

Za određivanje specifične aktivnosti lipaze korišćena je modifikovana metoda Arreguin-Espinoza i sar. (2000), prilagođena za lipazu gubara (Mrdaković *et al.*, 2008). Kao supstrat je korišćen p-nitrophenyl caprilat (pNPC). Aktivnost enzima je merena na temperaturi od 37°C i pH 8.2 (50mM Tris/HCl pufer), kontinuiranim praćenjem oslobađanja p-nitrofenola na 410nm u trajanju od tri minuta. Jedinica enzimske aktivnosti je određena kao količina enzima koja oslobadja 1 μ mol p-nitrofenola u minuti.

Specifična aktivnost ukupne alkalne fosfataze je određena po metodi Terra i sar., (1979), a kisele (SACP) i lizozomalne fosfataze (SACP_i) po metodi Nemeč & Socha (1988). Princip metode se zasniva na oslobađanju p-nitrofenola iz veštačkog supstrata dinitrophenyl-phosphate-dinatrium hexahidrate. Za alkalne fosfataze (SALP) je korišćen 100 mM Tris/HCl pufer pH 8.6, trajanje reakcije je 20 minuta, a za kisele fosfataze je korišćen 100 mM citratni pufer pH 5.6, trajanje reakcije 60 minuta na temperaturi od 30°C. Aktivnost lizozomalnih fosfataza je ispitivana primenom specifičnog inhibitora NaF. Protokoli metoda za određivanje aktivnosti digestivnih fosfataza su prilagođeni za korišćenje u mikrotitar pločama. Jedinica enzimske aktivnosti je određena kao količina enzima koja oslobadja 1 μ mol p-nitrofenola u minutu.

Specifične aktivnosti enzima izražene su kao aktivnosti enzima u odnosu na koncentraciju proteina. Koncentracija proteina je određena metodom po Bradfordu (Bradford, 1976) uz korišćenje govedjeg serum albumina kao standarda. Količina proteina je izražena u μ g/mg tkiva.

3.5. Ispitivanje rezistentnosti larvi gubara na visoke temperature

U cilju ispitivanja uticaja temperature i kvaliteta hrane na rezistentnost larvi gubara na visoke temperature, larve trećeg dana IV stupnja su izlagane temperaturi od 36°C, na kojoj gubar ne može da završi razviće, a kao mera

rezistentnosti određivano je vreme preživljavanja i broj presvlačenja. Za svako od 19 legala korišćeno je oko 1-3 larve po leglu za svaki od 12 tretmana (4 hrane x 3 temperature).

3.6. Statističke metode

Za ispitivanje značajnosti efekata delovanja temperature i kvaliteta hrane na ispitivane osobine (komponente adaptivne vrednosti i specifične aktivnosti digestivnih enzima) korišćena je dvofaktorska i trofaktorska analiza varijanse i Šifov test multipnih rangova. Analiza varijanse je rađena na log-transformisanim vrednostima ispitivanih osobina, a za preživljavanje je primenjena *arcsin* transformacija.

3.7. Uticaj temperature i hrane na genetičku varijabilnost i korelacije komponenti adaptivne vrednosti

3.7.1. Heritabilnost u širem smislu

Heritabilnost u širem smislu (H^2) je određena na osnovu jednofaktorske analize varijanse. Heritabilnost u širem smislu određuje (predstavlja) ukupan doprinos genotipa fenotipskoj varijansi (uključujući aditivne, dominantne i epistatičke efekte) kao i uticaj roditeljske generacije (materinski efekti). Komponente fenotipske varijanse, genetička i sredinska varijansa, procenjene su na osnovu srednje vrednosti kvadrata odstupanja (MS) unutar legala i između legala (ful-sib familija), korišćenjem formule za nebalansirani ful-sib dizajn (Becker, 1984). Značajnost heritabilnosti određena je t- testom ($t=h^2/SE$) a poredjenje heritabilnosti između grupa (tretmana) je izvršeno z-testom.

3.7.2. Varijabilnost fenotipske plastičnosti

Varijabilnost fenotipske plastičnosti je određena trofaktorskom i četvorofaktorskom analizom varijanse na log-transformisanim vrednostima ispitivanih osobina (trajanje razvića i mase larvi). U trofaktorskoj analizi varijanse temperatura i hrana su fiksirani faktori a legla su slučajan faktor, a u četvorofaktorskoj analizi varijanse temperatura, sadržaj proteina i sadržaj ugljenih hidrata su fiksirani faktori a legla su slučajan faktor. Značajna interakcija „genotip (leglo) x sredina (tretmani)“ ukazuje na postojanje varijabilnosti fenotipske plastičnosti u populaciji.

3.7.3. Genetičke i fenotipske korelacije

Genetičke korelacije između trajanja razvića i mase larvi unutar sredina (tretmana) kao i genetičke korelacije za trajanje razvića i masu larvi između sredina (tretmana) određene su preko Pirsonovog proizvoda momenata srednjih vrednosti ispitivanih osobina za svaki od genotipa (legla), odnosno između srednjih vrednosti osobina po leglima. Značajnost razlika korelacija masa – trajanje razvića između sredina određena je z-testom (Sokal & Rohlf, 1981).

Fenotipske korelacije između aktivnosti digestivnih enzima, kao i fenotipske korelacije između aktivnosti digestivnih enzima i komponenti adaptivne vrednosti procenjene su preko Pirsonovog proizvoda momenata ispitivanih osobina a za poređenje značajnosti razlika je korišćen z-test.

Mantelov test se koristi za poređenje ukupne korelacione strukture (Mantel, 1967). Mantelov test je korišćen za poređenje obrazaca korelisanosti ispitivanih osobina (aktivnosti digestivnih enzima i aktivnosti digestivnih enzima sa komponentama adaptivne vrednosti) između različitih tretmana. Polazna hipoteza Mantelovog testa je da između matrica koje se porede nema sličnosti. Koeficijenti korelacije u ovom testu mogu imati vrednosti od „-1“ do „+1“. Vrednosti $r=0$ ili bliske „0“ ukazuju da postoje značajne razlike između matrica koje se porede, dok

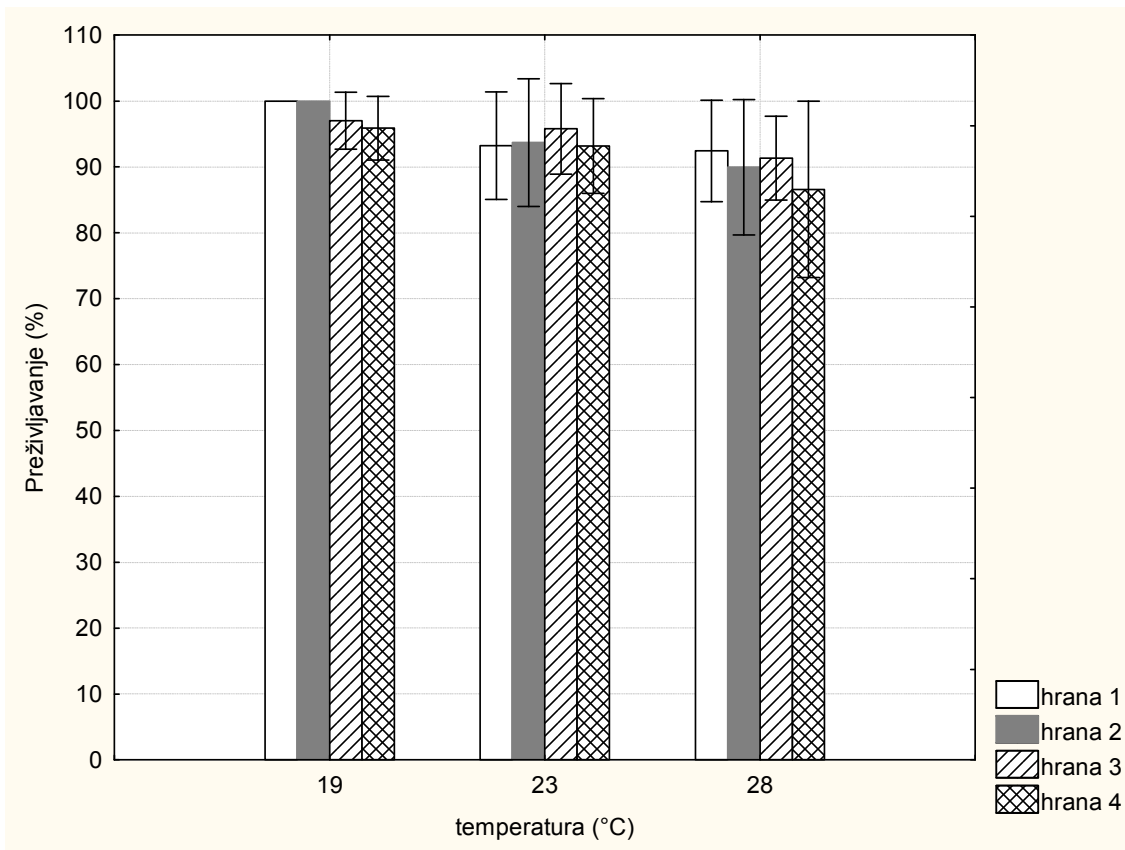
visoke pozitivne vrednosti ($r=+1$) ukazuju na odsustvo značajnih razlika između ispitivanih matrica, odnosno korelacione strukture su međusobno slične.

4. REZULTATI

4.1. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA KOMPONENTE ADAPTIVNE VREDNOSTI

4.1.1. Uticaj temperature i hrane na preživljavanje larvi gubara do ulaska u IV larveni stupanj

Preživljavanje larvi gubara do ulaska u IV larveni stupanj zavisi od temperature, dok sadržaj proteina i ugljenih hidrata u dijeti ne pokazuje značajan efekat. Preživljavanje larvi je u proseku veće na temperaturama 19 i 23°C u odnosu na temperaturu od 28°C (**Slika 1, Tabela 1**).



Slika 1. Uticaj temperature i hrane na PREŽIVLJAVANJE ($X \pm SE$) larvi gubara do ulaska u IV larveni stupanj. hrana 1 – visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata; hrana 2 – visok sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata; hrana 3 - nizak sadržaj proteina, visok sadržaj ugljenih hidrata, hrana 4 - nizak sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata.

Tabela 1. Zbir i prosek kvadrata odstupanja od srednje vrednosti PREŽIVLJAVANJA dobijen analizom varijanse u kojoj su ispitani efekti temperature i hrane na preživljavanje larvi gubara do ulaska u IV larveni stupanj. Poređenje preživljavanja između različitih temperatura je urađeno Scheffe-ovim testom multipnih rangova. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane.

Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
temperatura	0.707	2	0.353	6.1	0.0027	(19 = 23) > 28
hrana	0.092	3	0.031	0.5	0.6624	
Error	12.329	212	0.058			

4.1.2. Uticaj temperature i hrane na trajanje razvića larvi

I temperaturni režim i nutritivni kvalitet hrane imaju značajan efekat na trajanje razvića larvi. Analiza varijanse nije otkrila značajnu interakciju između ova dva faktora sredine ukazujući na to da su efekti promene temperature nezavisni od primenjenog nutritivnog tretmana i obratno (**Slike 2, 3 i 4, Tabele 2 i 3**).

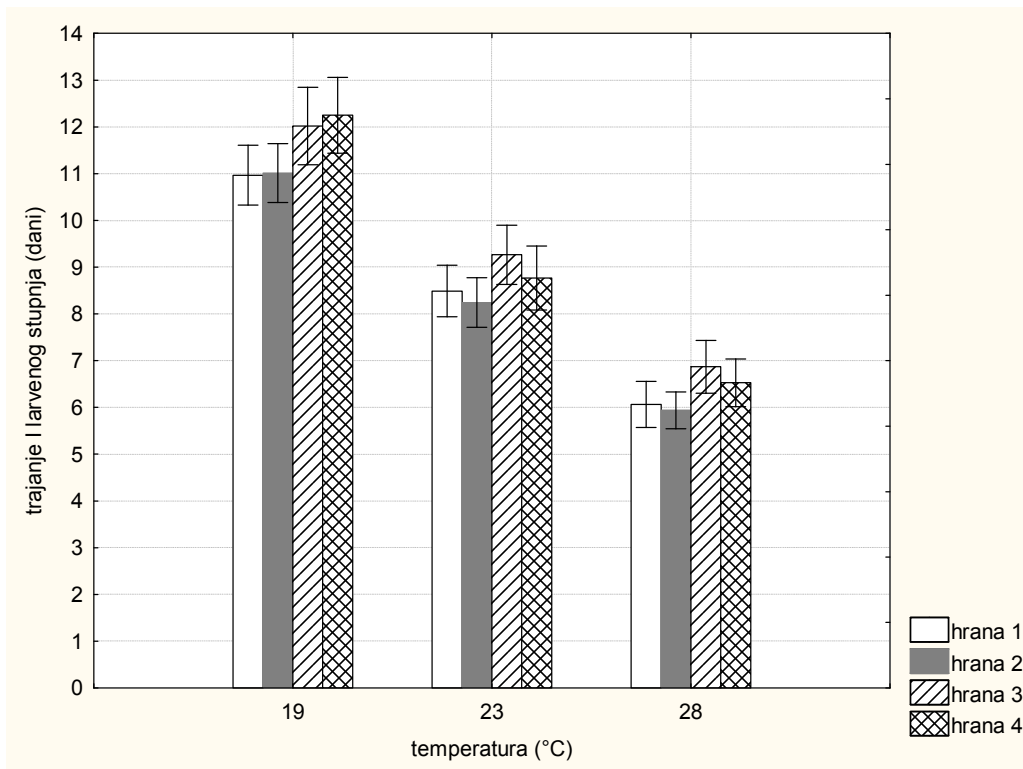
Prvi larveni stupanj najduže traje na temperaturi 19°C i to na dijetama koje su siromašne proteinima (hrane 3 i 4) (**Tabela 2**). Sa porastom temperature dolazi do skraćivanja trajanja prvog larvenog stupnja - 11-13 dana na 19°C, više od 8-9 dana na 23°C i 6-7 dana na 28°C (**Slika 2**).

Trajanje razvića do ulaska u III larveni stupanj pokazuje isti trend kao i kod trajanja prvog larvenog stupnja, odnosno dolazi do skraćivanja trajanja razvića sa porastom temperature (**Slika 3, Tabela 2**). Trajanje je značajno duže na hrani sa niskim sadržajem proteina (hrane 3 i 4) u odnosu na hranu sa visokim sadržajem proteina (hrane 1 i 2).

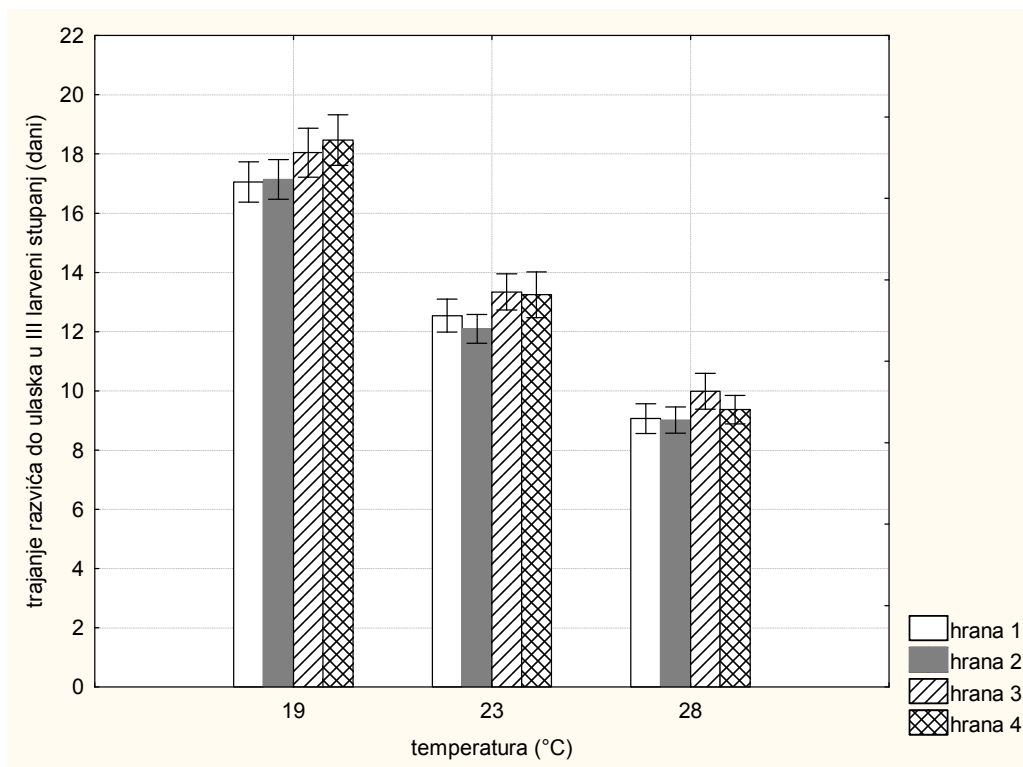
Ukupno trajanje razvića do ulaska u IV stupanj je najduže na 19°C i traje u proseku oko 25 dana, dok je na temperaturi od 28°C prosečno trajanje razvića skoro duplo kraće i iznosi 12-13 dana (**Slika 4**). Larve se u proseku brže razvijaju na visokoproteinskoj hrani (hrane 1 i 2) u odnosu na hranu sa niskim sadržajem proteina (hrane 3 i 4) (**Tabela 2**).

Trofaktorska analiza varijanse nam daje uvid kako količina proteina i ugljenih hidrata utiču na trajanje razvića (**Tabela 3**). Niska temperatura i nizak

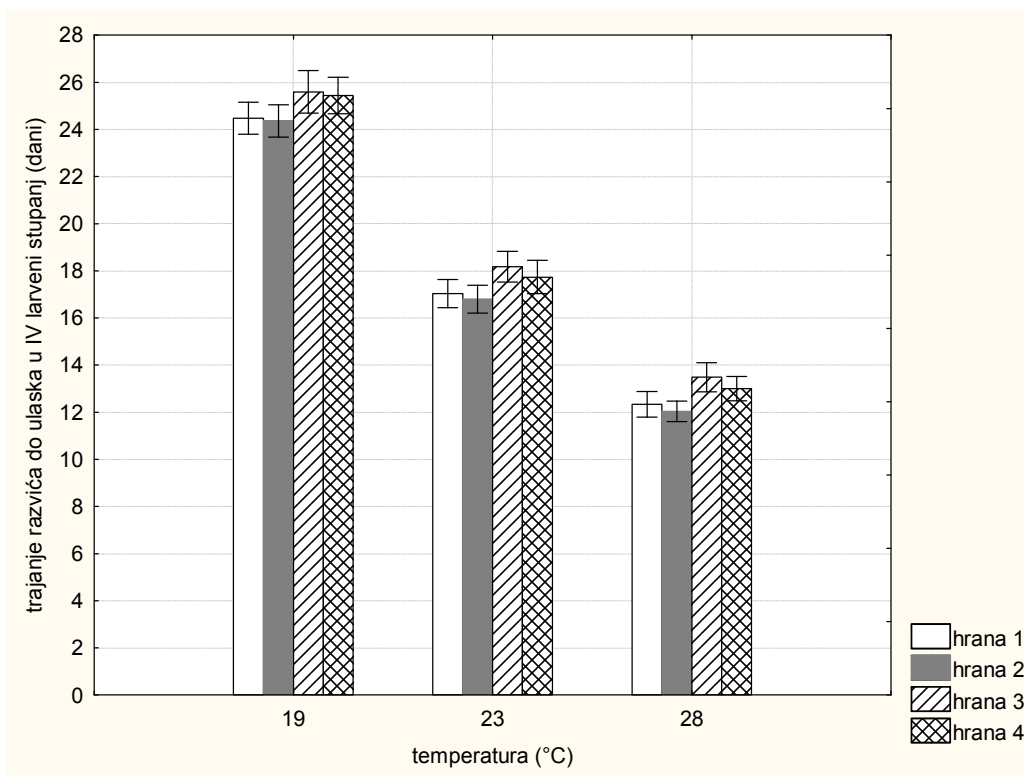
sadržaj proteina u hrani značajno produžavaju trajanje prvog stupnja kao i trajanje razvića do ulaska u III i u IV stupanj. Sadržaj ugljenih hidrata u hrani nije statistički značajno uticao na trajanje larvenog razvića, ali se može uočiti trend ($p < 0.1$) skraćanja trajanja razvića do ulaska u IV stupanj kod larvi hranjenih dijetom sa niskim sadržajem ugljenih hidrata (hrane 2 i 4) (**Slika 4, Tabela 3**). Temperatura, sadržaj proteina i sadržaj ugljenih hidrata u dijeti utiču na trajanje razvića nezavisno, odnosno nisu uočene značajne interakcije između ovih faktora (**Tabela 3**).



Slika 2. Uticaj temperature i hrane na TRAJANJE PRVOG LARVENOG STUPNJA ($\bar{X} \pm SE$).



Slika 3. Uticaj temperature i hrane na TRAJANJE RAZVIĆA DO ULASKA U III larveni stupanj ($X \pm SE$).



Slika 4. Uticaj temperature i hrane na TRAJANJE RAZVIĆA DO ULASKA U IV larveni stupanj ($X \pm SE$).

Tabela 2. Dvofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima trajanja larvenog razvića (I, I+II i I+II+III larveni stupanj). Temperatura i hrana su fiksirani faktori. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane; Oznake 1, 2, 3 i 4 odnose se na nutritivne tretmane. 1 - visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata; 2 - visok sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata; 3 - nizak sadržaj proteina, visok sadržaj ugljenih hidrata, 4 - nizak sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
I stupanj	temperatura	11.931	2	5.965	339.9	0.0000	19 > 23 > 28
	hrana	0.364	3	0.121	6.9	0.0001	(1 = 2) < (3 = 4)
	temperatura×hrana	0.051	6	0.009	0.5	0.8180	
	Greška	17.7010	1009	0.018			
I+II stupanj	temperatura	12.861	2	6.431	792.7	0.0000	19 > 23 > 28
	hrana	0.206	3	0.069	8.5	0.0000	(1 = 2) < (3 = 4)
	temperatura×hrana	0.031	6	0.005	0.6	0.6943	
	Greška	8.047	992	0.008			
I+II+III stupanj	temperatura	14.572	2	7.286	1534.1	0.0000	19 > 23 > 28
	hrana	0.185	3	0.062	13.0	0.0000	(1 = 2) < (3 = 4)
	temperatura×hrana	0.018	6	0.003	0.6	0.7147	
	Greška	4.726	995	0.005			

Tabela 3. Trofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima trajanja larvenog razvića (I, I+II i I+II+III larveni stupanj). Temperatura, sadržaj proteina (Pr) i sadržaj ugljenih hidrata (Ug) u hrani su fiksirani faktori. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane; Oznake n i v odnose se na nutritivne tretmane: n – nizak sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani, v – visok sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
I stupanj	temperatura	11.930	2	5.965	339.9	0.0000	19 > 23 >28
	Pr	0.339	1	0.339	19.3	0.0000	n > v
	Ug	0.018	1	0.018	1.0	0.3104	
	temperatura×Pr	0.013	2	0.007	0.4	0.6893	
	temperatura×Ug	0.030	2	0.015	0.95	0.4261	
	Pr×Ug	0.004	1	0.0047	0.2	0.6458	
	temperatura×Pr×Ug	0.009	2	0.004	0.3	0.7802	
	Error	17.710	1009	0.018			
I+II stupanj	temperatura	12.861	2	6.43	792.7	0.0000	19 > 23 >28
	Pr	0.196	1	0.200	24.2	0.0000	n > v
	Ug	0.008	1	0.008	1.0	0.3204	
	temperatura×Pr	0.001	2	0.000	0.0	0.9583	
	temperatura×Ug	0.019	2	0.009	1.2	0.3123	
	Pr×Ug	0.000	1	0.000	0.0	0.8357	
	temperatura×Pr×Ug	0.012	2	0.006	0.8	0.4726	
	Error	8.047	992	0.008			
I+II+III stupanj	temperatura	14.572	2	7.286	1534.1	0.0000	19 > 23 >28
	Pr	0.170	1	0.170	35.9	0.0000	n > v
	UG	0.013	1	0.013	2.8	0.0922	
	temperatura×Pr	0.013	2	0.006	1.3	0.2608	
	temperatura×Ug	0.004	2	0.002	0.4	0.6404	
	Pr×Ug	0.001	1	0.001	0.2	0.6946	
	temperatura×Pr×Ug	0.001	2	0.000	0.1	0.9377	
	Error	4.726	995	0.005			

4.1.3. Uticaj temperature i hrane na masu larvi gubara na početku IV larvenog stupnja

I temperatura i hrana imaju značajan efekat na masu larvi na početku četvrtog larvenog stupnja (**Slika 5, Tabela 4**). Masa larvi na ulasku u IV larveni stupanj je u proseku najveća na temperaturi od 23°C u odnosu na temperature 19 i 28° C između kojih nema statistički značajnih razlika. Masa larvi je u proseku veća na hrani sa visokim sadržajem proteina (hrane 1 i 2) u odnosu na hranu sa niskim sadržajem proteina (hrane 3 i 4) (**Tabela 4**), a u okviru hrane sa visokim sadržajem proteina nešto je veća masa larvi na hrani 2, koja pored većeg sadržaja proteina ima manju količinu ugljenih hidrata (**Slika 5**). Nije ustanovljena statistički značajna interakcija „temperatura × hrana” za masu larvi (**Tabela 4**).

Sadržaj proteina u hrani značajno utiče na masu larvi na početku četvrtog larvenog stupnja. Masa larvi u proseku je najveća na hrani sa visokim sadržajem proteina u odnosu na masu larvi na hrani sa niskim sadržajem proteina (**Tabela 5, Slika 5**). Sadržaj ugljenih hidrata nema značajan uticaj na masu, ali postoji značajna interakcija „proteini × ugljeni hidrati” (**Tabela 5**). Na hrani sa niskim sadržajem ugljenih hidrata pad mase u odgovoru na nizak sadržaj proteina je veći ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata nizak.

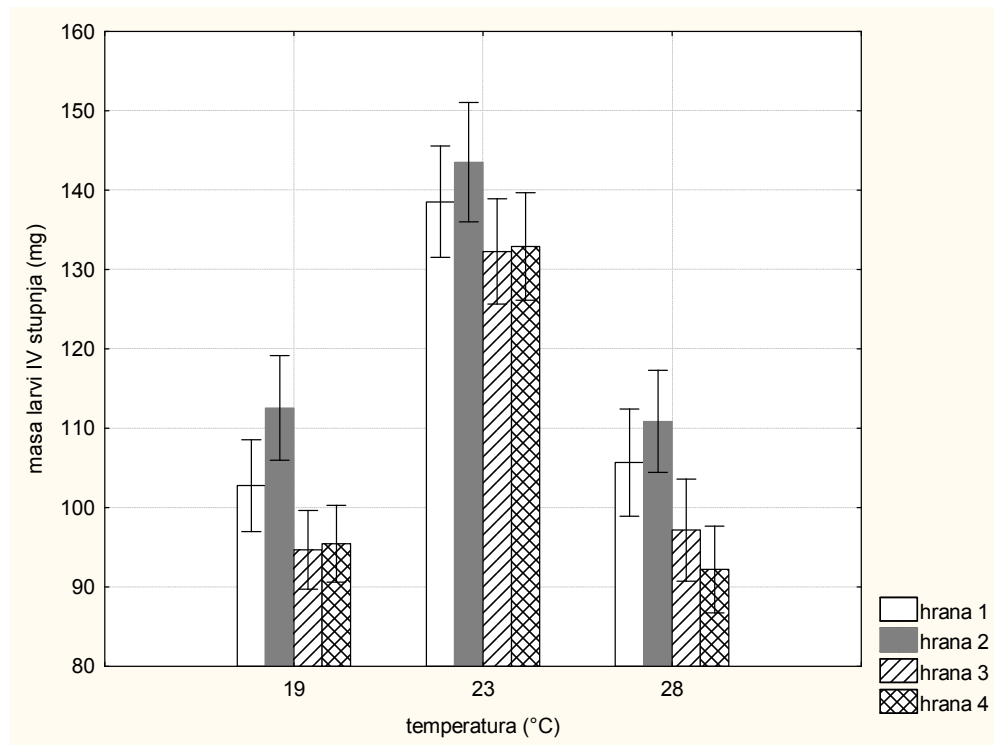
4.1.4. Uticaj temperature i hrane na relativnu brzinu rasta larvi tokom tri dana IV larvenog stupnja (RGR)

Relativna brzina rasta larvi (RGR) tokom 3 dana IV larvenog stupnja povećava se značajno sa povećanjem temperature i zavisi od nutritivnog sastava hrane (**Slika 6, Tabela 4**). Brzina rasta larvi je u proseku najveća na temperaturi od 28°C kod larvi koje su se hranile visokoproteinskom dijetom (hrane 1 i 2).

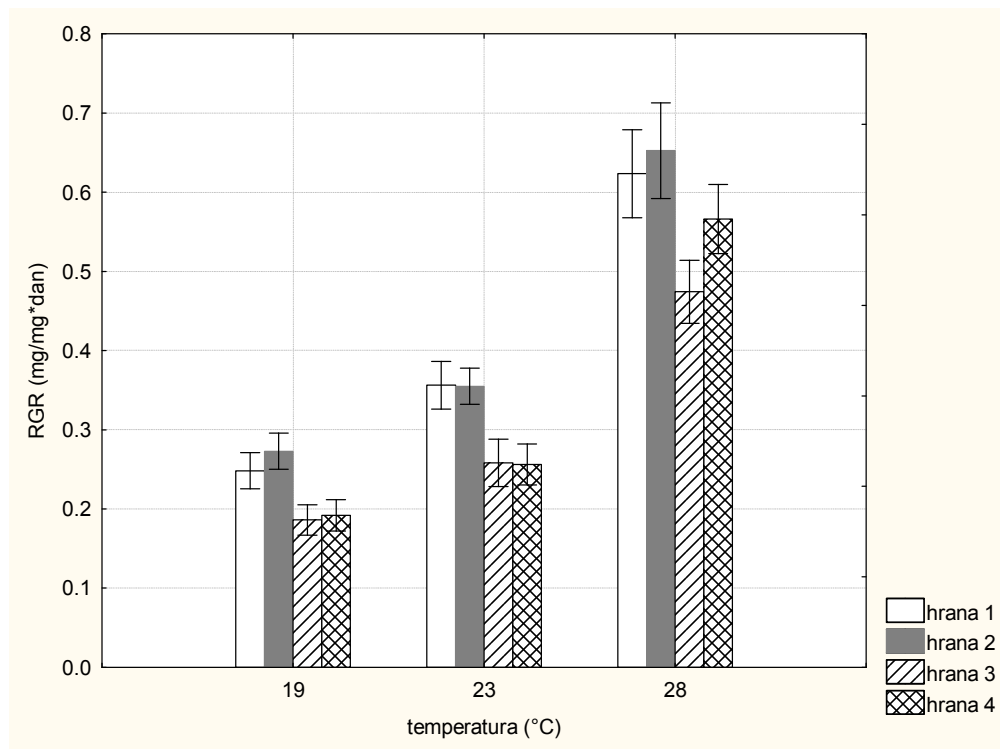
Za razliku od mase larvi na čiju promenu ne utiče količina ugljenih hidrata, RGR zavisi od količine ugljenih hidrata u dijeti. Brzina rasta je veća na dijeti koja je siromašna ugljenim hidratima (hrane 2 i 4) (**Tabela 5**).

Efekat temperature na relativnu brzinu rasta tokom 3 dana IV larvenog stupnja zavisi od količine proteina u hrani (marginalno signifikantna interakcija

„temperatura × proteini”, **Tabela 5**). Relativna brzina rasta je osetljivija na nizak sadržaj proteina u hrani ako se larve gaje na temperaturi 28°C u odnosu na temperature gajenja 19°C i 23°C. Dok je smanjenje RGR u odgovoru na nizak sadržaj proteina u hrani oko 10% na temperaturama 19°C i 23°C, na temperaturi od 28°C iznosi oko 5%.



Slika 5. Uticaj temperature i kvaliteta hrane na MASU larvi gubara na početku četvrtog stupnja ($X \pm SE$).



Slika 6. Uticaj temperature i kvaliteta hrane na RELATIVNU BRZINU RASTA (RGR) larvi tokom 3 dana četvrtog larvenog stupnja ($\bar{X} \pm SE$).

Tabela 4. Dvofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima MASE i RGR larvi četvrtog stupnja. Temperatura i hrana su fiksirani faktori. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane; Oznake 1, 2, 3 i 4 odnose se na nutritivne tretmane. 1 – visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata; 2 – visok sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata; 3 - nizak sadržaj proteina, visok sadržaj ugljenih hidrata, 4 - nizak sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
masa	temperatura	4.032	2	2.016	170.2	0.0000	23 > (19 = 28)
	hrana	0.580	3	0.193	16.3	0.0000	(1 = 2) > (3 = 4)
	temperatura×hrana	0.065	6	0.011	0.9	0.4859	
	Greška	11.784	995	0.012			
RGR	temperatura	13.137	2	6.569	387.6	0.0000	19 < 23 < 28
	hrana	1.912	3	0.637	37.6	0.0000	(1 = 2) > (3 = 4)
	temperatura×hrana	0.178	6	0.030	1.8	0.1068	
	Greška	7.372	435	0.017			

Tabela 5. Trofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima MASE i RGR larvi četvrtog stupnja. Temperatura, sadržaj proteina (Pr) i sadržaj ugljenih hidrata (Ug) u hrani su fiksirani faktori. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane; Oznake n i v odnose se na nutritivne tretmane. n – nizak sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani, v – visok sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
masa	temperatura	4.032	2	2.016	170.2	0.0000	23 > (19 = 28)
	Pr	0.499	1	0.499	42.2	0.0000	n < v
	UG	0.028	1	0.028	2.3	0.1271	
	temperatura×Pr	0.041	2	0.021	1.7	0.1774	
	temperatura×UG	0.015	2	0.008	0.6	0.5233	
	Pr×UG	0.054	1	0.054	4.6	0.0322	
	temperatura×Pr×UG	0.009	2	0.005	0.4	0.6785	
	Greška	11.784	995	0.012			
RGR	temperatura	13.137	2	6.569	387.59	0.0000	19 < 23 < 28
	Pr	1.836	1	1.836	108.36	0.0000	n < v
	Ug	0.082	1	0.082	4.83	0.0285	n > v
	temperatura×Pr	0.098	2	0.049	2.91	0.0558	
	temperatura×UG	0.035	2	0.018	1.03	0.3561	
	Pr×UG	0.002	1	0.002	0.11	0.7353	
	temperatura×Pr×UG	0.043	2	0.021	1.26	0.2843	
	Greška	7.372	435	0.017			

4.2. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA GENETIČKU VARIJABILNOST I KORELACIJE KOMPONENTI ADAPTIVNE VREDNOSTI

4.2.1. Heritabilnost u širem smislu

Vrednosti heritabilnosti u širem smislu (h^2) za trajanje prvog larvenog stupnja, trajanje razvića do ulaska u III larveni stupanj i ukupno trajanje razvića do ulaska u IV larveni stupanj kod larvi gubara gajenih na temperaturama 19, 23 i 28°C i na četiri različite dijete prikazane su u **Tabelama 6, 7 i 8**. Heritabilnost za trajanje razvića je pokazala visoke i srednje vrednosti.

Heritabilnost u širem smislu za trajanje prvog larvenog stupnja je značajna na svim temperaturama i na svakoj od četiri ispitivane dijete (**Tabela 6**). Poređenjem heritabilnosti I stupnja nisu pokazane značajne razlike između tretmana ($P > 0.05$).

Trajanje razvića do ulaska u III larveni stupanj takođe pokazuje značajnu heritabilnost na temperaturama 19, i 23 i 28°C i na svim dijetama. Izuzetak je grupa larvi gajena na temperaturi 28°C i nutritivno najsiromašnijoj hrani (hrana 4) (**Tabela 7**). Poređenjem heritabilnosti za trajanje razvića do ulaska u III stupanj nisu pokazane značajne razlike između različitih uslova gajenja.

Heritabilnost za trajanje razvića do ulaska u IV larveni stupanj takođe je značajna na svim temperaturama osim na temperaturi 23°C i nutritivno najsiromašnijoj hrani (**Tabela 8**). Poređenjem heritabilnosti za trajanje razvića do ulaska u IV larveni stupanj nisu dobijene statistički značajne razlike između tretmana.

Heritabilnost u širem smislu za masu larvi merenu na početku četvrtog larvenog stupnja je značajna na temperaturi 19°C na svim hranama osim na nutritivno najsiromašnijoj hrani (**Tabela 9**). Nasuprot tome, heritabilnost mase na temperaturi od 23°C je bila statistički značajna samo na nutritivno najsiromašnijoj hrani (**Tabela 9**). U okviru temperature 28°C nije dobijena značajna heritabilnost ni na jednoj od četiri ispitivane hrane (**Tabela 9**).

Poređenjem heritabilnosti za masu larvi po presvlačenju u IV larveni stupanj u okviru ispitivanih temperatura pokazano je da na sub- i supraoptimalnoj

temperaturi nutritivni sastav dijete ne utiče na promenu ekspresije genetičke varijabilnosti. Na optimalnoj temperaturi najniža vrednost heritabilnosti je dobijena na dijeti sa visokim sadržajem proteina i niskim sadržajem ugljenih hidrata (hrana 2). U odnosu na ovu dijetu dolazi do statistički značajnog povećanja heritabilnosti u grupama larvi čija dijeta ima bilo veći sadržaj ugljenih hidrata (hrana1, $t = 5.628$, $P < 0.001$) ili manji sadržaj proteina (hrana 4, $t = 9.9589$, $P < 0.001$).

Na nutritivno najbogatijoj dijeti temperatura ne utiče značajno na promenu ekspresije genetičke varijabilnosti za masu larvi. Porast temperature značajno smanjuje heritabilnost u širem smislu za masu larvi gubara ako je nizak sadržaj jednog ili oba makronutrienata. Na hrani 2 (nizak sadržaj ugljenih hidrata) smanjenje je značajno pri porastu temperature od 19 do 23°C ($t = 7.903$, $P < 0.001$), na hrani 3 (nizak sadržaj proteina) pri porastu temperature od 19 do 28°C ($t = 2.875$, $P < 0.05$), a na hrani 4 (nizak sadržaj proteina i ugljenih hidrata) pri porastu temperature od 23 do 28°C ($t = 2.3856$, $P < 0.05$).

Tabela 6. Heritabilnost u širem smislu ($H^2 \pm SE$) za TRAJANJE I LARVENOG STUPNJA kod larvi gubara gajenih na različitim temperaturama i kvalitetu hrane. Značajnost heritabilnosti je određena t-testom.

	19°C			23°C			28°		
	H ²		±SE	H ²		±SE	H ²		±SE
hrana1	1.1761	***	0.2064	1.0855	***	0.2196	1.1067	***	0.2318
hrana2	1.0054	***	0.2227	1.0010	***	0.2326	0.6252	*	0.2486
hrana3	0.8047	**	0.2313	0.7184	**	0.2399	0.9241	**	0.2528
hrana4	1.0869	***	0.2167	0.8920	**	0.2417	0.9121	**	0.2594

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Tabela 7. Heritabilnost u širem smislu ($H^2 \pm SE$) za TRAJANJE RAZVIĆA DO ULASKA U III LARVENI STUPANJ kod larvi gubara gajenih na različitim temperaturama i kvalitetu hrane. Značajnost heritabilnosti je određena t-testom.

	19°C			23°C			28°		
	H ²		±SE	H ²		±SE	H ²		±SE
hrana1	1.0576	***	0.2189	1.1487	***	0.2130	1.0399	***	0.2402
hrana2	0.9627	***	0.2257	1.0611	***	0.2288	0.5720	*	0.2581
hrana3	0.8042	**	0.2322	0.6463	*	0.2417	0.8501	**	0.2589
hrana4	0.9497	***	0.2296	1.0072	***	0.2332	0.5537	n.s.	0.2704

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Tabela 8. Heritabilnost u širem smislu ($H^2 \pm SE$) za TRAJANJE RAZVIĆA DO ULASKA U IV LARVENI STUPANJ kod larvi gubara gajenih na različitim temperaturama i kvalitetu hrane. Značajnost heritabilnosti je određena t-testom.

	19°C			23°C			28°		
	H ²		±SE	H ²		±SE	H ²		±SE
hrana1	0.9820	***	0.2244	1.1406	***	0.2140	1.0948	***	0.2332
hrana2	0.8801	**	0.2300	0.8330	**	0.2442	0.5653	*	0.2539
hrana3	0.6315	*	0.2363	0.7211	**	0.2411	0.8969	**	0.2544
hrana4	0.8705	**	0.2347	0.4859	n.s.	0.2380	0.5878	*	0.2637

*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001

Tabela 9. Heritabilnost u širem smislu ($H^2 \pm SE$) za MASU LARVI PO PRESVLAČENJU U IV LARVENI STUPANJ kod larvi gubara gajenih na različitim temperaturama i kvalitetu hrane. Značajnost heritabilnosti je određena t-testom.

	19°C		23°C		28°	
	H ²	±SE	H ²	±SE	H ²	±SE
hrana1	0.4957 *	0.2233	0.4152 n.s.	0.2263	0.2873 n.s.	0.2269
hrana2	0.5158 *	0.2247	-0.0600 n.s.	0.1537	0.1422 n.s.	0.2073
hrana3	0.5523 *	0.2331	0.1407 n.s.	0.1927	0.0115 n.s.	0.1749
hrana4	0.3485 n.s.	0.2166	0.5485 *	0.2414	0.0348 n.s.	0.1937

*P<0.05

4.2.2. Varijabilnost fenotipske plastičnosti

Značajna interakcija „genotip × sredina” ukazuje na genetičku varijabilnost fenotipske plastičnosti. U našem eksperimentu ispitivana je varijabilnost plastičnosti trajanja razvića do ulaska u IV larveni stupanj i mase larvi po presvlačenju u IV stupanj u odgovoru na tri različite konstantne temperature i 4 hrane na osnovu interakcije faktora ”leglo” (genotip, ful-sib familija) i faktora „temperatura” i/ili ”hrana” (sredina) u analizi varijanse.

Pored značajnog uticaja sredine (temperatura i kvalitet hrane) na trajanje razvića, značajan je i uticaj genotipa (**Tabela 10**). Za trajanje prvog stupnja kao i trajanje razvića do ulaska u III i do ulaska u IV larveni stupanj otkrivena je značajna varijabilnost fenotipske plastičnosti u odgovoru na variranje temperature (interakcija T × L, P < 0.01), ali ne i u odgovoru na variranje kvaliteta hrane (interakcija H × L, P > 0.05). Za trajanje prvog stupnja i trajanje razvića do ulaska u III larveni stupanj značajna interakcija „temperatura × hrana × leglo” ukazuje da variranje temperaturnih normi reakcije zavisi od nutritivnog sastava dijetete.

Četvorofaktorska analiza varijanse nam daje uvid na koji način se pored delovanja temperature odgovor legala u pogledu trajanja razvića menja i u zavisnosti od sadržaja proteina i ugljenih hidrata u hrani (**Tabela 11**). Nesumnjivo je da larve gubara imaju različito trajanje razvića u odnosu na temperaturu gajenja (19, 23 i 28°C) i sadržaj proteina u dijeti. Ugljeni hidrati imaju marginalno značajan

uticaj samo na trajanje razvića do ulaska u III larveni stupanj ($P < 0.1$), tako što visok sadržaj ugljenih hidrata utiče na produžavanje trajanja razvića.

Variranje temperaturnih normi reakcije kao i variranje normi reakcije u odnosu na sadržaj proteina ili sadržaj ugljenih hidrata u dijeti nije značajno, odnosno analiza varijanse nije pokazala značajne interakcije faktora „leglo” (ful-sib familija) sa ovim faktorima životne sredine. Međutim, četverostruka interakcija svih ispitivanih faktora (leglo, temperatura, sadržaj proteina i ugljenih hidrata) značajno utiče na variranje trajanja I larvenog stupnja i trajanje razvića do ulaska u III larveni stupanj (**Tabela 11**).

Doprinos temperature variranju mase larvi na početku IV larvenog stupnja je veoma značajan kao i uticaj kvaliteta hrane, a posebno sadržaja proteina u dijeti ($P < 0.001$) (**Tabele 12 i 13**). Međutim, značajnih interakcija ispitivanih faktora nema tako da se može zaključiti da za masu larvi nije pokazana varijabilnost fenotipske plastičnosti.

Tabela 10. Trofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima TRAJANJA LARVENOG RAZVIĆA (I, I+II i I+II+III larveni stupanj). Temperatura i hrana su fiksirani faktori, a legla su slučajni faktor.

		SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
I	temperatura (T)	10.505	2	5.252	167.1	0.0000	19 > 23 > 28
	hrana (H)	0.383	3	0.128	9.6	0.0001	(1=2) < (3=4)
	leglo (L)	3.853	14	0.275	8.8	0.0000	
	T×H	0.037	6	0.006	0.5	0.8386	
	T×L	0.884	28	0.032	2.3	0.0018	
	H×L	0.560	42	0.013	1.0	0.5260	
	T×H×L	1.151	84	0.014	1.4	0.0136	
	Greška	6.697	686	0.010			
I+II	temperatura (T)	10.946	2	5.473	439.3	0.0000	19 > 23 > 28
	hrana (H)	0.226	3	0.075	12.6	0.0000	(1=2) < (3=4)
	leglo (L)	1.657	14	0.118	9.7	0.0000	
	T×H	0.028	6	0.005	0.7	0.6116	
	T×L	0.350	28	0.013	2.0	0.0075	
	H×L	0.252	42	0.006	1.0	0.5436	
	T×H×L	0.523	84	0.006	1.3	0.0310	
	Greška	3.135	671	0.005			
I+II+III	temperatura (T)	12.546	2	6.273	942.5	0.0000	19 > 23 > 28
	hrana (H)	0.201	3	0.067	18.1	0.0000	(1=2) < (3=4)
	leglo (L)	0.932	14	0.067	9.3	0.0000	
	T×H	0.013	6	0.002	0.7	0.6508	
	T×L	0.187	28	0.007	2.1	0.0052	
	H×L	0.156	42	0.004	1.2	0.2805	
	T×H×L	0.269	84	0.003	1.1	0.2230	
	Greška	1.917	672	0.003			

Tabela 11. Četvorofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima TRAJANJA LARVENOG RAZVIĆA (I, I+II i I+II+III larveni stupanj). Temperatura, sadržaj proteina (Pr) i sadržaj ugljenih hidrata (Ug) u hrani su fiksirani faktori, a legla su slučajni faktor. n – nizak sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani, v – visok sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani.

		SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
I	temperatura (T)	10.505	2	5.252	167.1	0.0000	19 > 23 > 28
	Pr	0.359	1	0.359	33.0	0.0000	v < n
	Ug	0.014	1	0.014	1.5	0.2334	
	leglo (L)	3.853	14	0.275	11.4	0.0033	
	T×Pr	0.011	2	0.005	0.5	0.5958	
	T×Ug	0.016	2	0.008	0.6	0.5809	
	Pr×Ug	0.005	1	0.005	0.3	0.6021	
	T×L	0.884	28	0.032	3.9	0.1268	
	Pr×L	0.153	14	0.011	0.8	0.6545	
	Ug×L	0.128	14	0.009	0.5	0.8545	
	T×Pr×Ug	0.011	2	0.006	0.4	0.7030	
	T×Pr×L	0.281	28	0.010	0.6	0.8880	
	T×Ug×L	0.394	28	0.014	0.9	0.6333	
	Pr×Ug×L	0.271	14	0.019	1.2	0.3224	
	T×Pr×Ug×L	0.448	28	0.016	1.6	0.0206	
Greška	6.697	686	0.010				
I+II	temperatura (T)	10.946	2	5.473	439.3	0.0000	19 > 23 > 28
	Pr	0.211	1	0.211	46.5	0.0000	v < n
	Ug	0.010	1	0.010	1.9	0.1919	
	leglo (L)	1.657	14	0.118	8.7	0.0006	
	T×Pr	0.001	2	0.001	0.1	0.8640	
	T×Ug	0.019	2	0.010	1.6	0.2127	
	Pr×Ug	0.002	1	0.002	0.2	0.6325	
	T×L	0.350	28	0.013	10.6	0.5440	
	Pr×L	0.063	14	0.005	1.6	0.5399	
	Ug×L	0.075	14	0.005	1.0	0.5534	
	T×Pr×Ug	0.007	2	0.004	0.4	0.6571	
	T×Pr×L	0.104	28	0.004	0.4	0.9839	
	T×Ug×L	0.167	28	0.006	0.7	0.8222	
	Pr×Ug×L	0.107	14	0.008	0.9	0.5623	
	T×Pr×Ug×L	0.237	28	0.008	1.8	0.0066	
Greška	3.135	671	0.005				

...nastavak **Tabela 11**

I+II+III	temperatura (T)	12.546	2	6.273	942.5	0.0000	19 > 23 > 28
	Pr	0.190	1	0.190	63.1	0.0000	v < n
	Ug	0.008	1	0.008	3.5	<i>0.0838</i>	v > n
	leglo (L)	0.932	14	0.067	19.3	0.0497	
	T×Pr	0.009	2	0.004	1.7	0.2073	
	T×Ug	0.003	2	0.001	0.4	0.6917	
	Pr×Ug	0.002	1	0.002	0.3	0.5889	
	T×L	0.187	28	0.007	2.2	0.1160	
	Pr×L	0.042	14	0.003	0.6	0.8115	
	Ug×L	0.034	14	0.002	0.4	0.9454	
	T×Pr×Ug	0.002	2	0.001	0.3	0.7516	
	T×Pr×L	0.075	28	0.003	0.8	0.6777	
	T×Ug×L	0.101	28	0.004	1.1	0.3802	
	Pr×Ug×L	0.078	14	0.006	1.7	0.1052	
	T×Pr×Ug×L	0.090	28	0.003	1.1	0.3017	
	Greška	1.917	672	0.003			

Tabela 12. Trofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima MASE LARVI PO PRESVLAČENJU U IV LARVENI STUPANJ. Temperatura i hrana su fiksirani faktori, a legla su slučajni faktori. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane; Oznake 1, 2, 3 i 4 se odnose na nutritivne tretmane. 1 – visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata; 2 – visok sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata; 3 – nizak sadržaj proteina, visok sadržaj ugljenih hidrata, 4 – nizak sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata.

	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
temperatura (T)	3.080	2	1.540	175.7	0.0000	19 < 23 > 28
hrana (H)	0.636	3	0.212	13.9	0.0000	(1=2) > (3=4)
leglo (L)	0.905	14	0.065	5.2	0.0013	
T×H	0.047	6	0.008	0.7	0.6701	
T×L	0.245	28	0.009	0.7	0.8043	
H×L	0.644	42	0.015	1.3	0.1450	
T×H×L	0.982	84	0.012	1.1	0.2233	
Greška	6.996	672	0.010			

Tabela 13. Četvorofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima MASE LARVI PO PRESVLAČENJU U IV LARVENI STUPANJ. Temperatura, sadržaj proteina (Pr) i sadržaj ugljenih hidrata (Ug) u hrani su fiksirani faktori, a legla su slučajni faktori. Oznake 19, 23 i 28 se odnose na temperaturne tretmane; n – nizak sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani, v – visok sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani.

	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
temperatura (T)	3.080	2	1.540	175.7	0.0000	19 < 23 > 28
Pr	0.545	1	0.545	25.8	0.0002	v > n
Ug	0.026	1	0.026	2.3	0.1487	
leglo (L)	0.905	14	0.065	4.3	0.1127	
T×Pr	0.032	2	0.016	1.3	0.3006	
T×Ug	0.012	2	0.006	0.5	0.6132	
Pr×Ug	0.074	1	0.074	6.1	0.0271	
T×L	0.245	28	0.009	0.6	0.8527	
Pr×L	0.296	14	0.021	1.5	0.2636	
Ug×L	0.158	14	0.011	0.8	0.6276	
T×Pr×Ug	0.004	2	0.002	0.2	0.8371	
T×Pr×L	0.354	28	0.013	1.2	0.3318	
T×Ug×L	0.336	28	0.012	1.1	0.3832	
Pr×Ug×L	0.170	14	0.012	1.1	0.3738	
T×Pr×Ug×L	0.300	28	0.011	1.0	0.4258	
Greška	6.996	672	0.010			

4.2.3. Genetičke korelacije

Trajanje larvenog razvića od piljenja do ulaska u IV larveni stupanj je u negativnoj korelaciji sa masom larvi IV stupnja na svim ispitivanim temperaturama i na sve četiri vrste hrane. Genetičke korelacije između ovih osobina su značajne na nepovoljnim temperaturama i nutritivno najsiromašnijoj dijeti (hrana 4) (**Tabela 14**). Na optimalnoj temperaturi 23°C može se uočiti trend porasta vrednosti korelacija između mase i trajanja razvića od nutritivno najbogatije (hrana 1) ka nutritivno najsiromašnijoj hrani (hrana 4).

Poređenje koeficijenta genetičkih korelacija trajanja razvića do ulaska u IV stupanj i mase larvi IV stupnja je pokazalo samo marginalno značajnu razliku ($t = 1.741$, $P < 0.1$) između korelacija određenih na temperaturama 23°C i 28°C kod larvi hranjenih dijetom sa visokim sadržajem proteina i ugljenih hidrata.

Većina genetičkih korelacija između sredina za osobine trajanja razvića larvi gubara je pozitivna i značajna. Značajne korelacije se statistički ne razlikuju od „+1” (**Tabela 15**). Manji broj značajnih korelacija između sredina za trajanje razvića se može uočiti ako su larve gajene na dijetama sa niskim sadržajem proteina (hrane 3 i 4) nego na dijetama sa visokim sadržajem proteina (hrane 1 i 2). Pozitivne korelacije ukazuju da je ekspresija genetičke varijabilnosti slična u različitim sredinama odnosno ne zavisi od delovanja faktora životne sredine. Pozitivne genetičke korelacije između sredina koje se ne razlikuju značajno od jedinice predstavljaju ograničenje za evoluciju optimalne fenotipske plastičnosti i mogu da otežaju specijalizaciju u temperaturno i nutritivno heterogenim sredinama.

Sa izuzetkom značajne pozitivne korelacije između temperatura 19 i 28°C za masu larvi gajenih na nutritivno najbogatijoj dijeti, genetičke korelacije između sredina za masu larvi nisu značajne i shodno tome se značajno razlikuje od „+1”.

Tabela 14. Genetičke korelacije između trajanja razvića do ulaska u IV stupanj i mase larvi gubara IV stupnja koje su gajene na različitim temperaturama i kvalitetu hrane.

	19°C	23°C	28°C
hrana1	-0.6384 p=.003	-0.1501 p=.540	-0.6575 p=.004
hrana2	-0.6195 p=.005	-0.1641 p=.515	-0.5211 p=.032
hrana3	-0.4962 p=.031	-0.3286 p=.170	-0.1895 p=.482
hrana4	-0.6042 p=.006	-0.5563 p=.013	-0.5789 p=.024

Tabela 15. Genetičke korelacije između sredina za TRAJANJE LARVENOG RAZVIĆA (I, I+II, I+II+III) i MASU (M) larvi gubara. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane; Oznake h1, h2, h3, h4 se odnose na nutritivne tretmane – hrana 1, 2, 3 i 4.

Sredina		I	I+II	I+II+III	M
19-h1	19-h2	.6002 p=.018	.7353 p=.002	.7393 p=.002	.3543 p=.195
	19-h3	.6932 p=.004	.7464 p=.001	.7588 p=.001	.2583 p=.353
	19-h4	.6023 p=.017	.6511 p=.009	.6114 p=.015	.1255 p=.656
19-h2	19-h3	.6602 p=.007	.7032 p=.003	.6957 p=.004	.3192 p=.246
	19-h4	<u>.5073</u> p=.054	<u>.4579</u> p=.086	.5542 p=.032	.0289 p=.919
19-h3	19-h4	.5535 p=.032	<u>.4760</u> p=.073	.5660 p=.028	.4297 p=.110
23-h1	23-h2	.6627 p=.007	.6589 p=.008	.7473 p=.001	.0539 p=.849
	23-h3	.7319 p=.002	.7208 p=.002	.7527 p=.001	.0295 p=.917
	23-h4	.7674 p=.001	.6984 p=.004	.6819 p=.005	.0762 p=.787
23-h2	23-h3	.5504 p=.034	<u>.4918</u> p=.063	.5641 p=.029	.2626 p=.344
	23-h4	.6098 p=.016	.5760 p=.025	.5553 p=.032	.2140 p=.444
23-h3	23-h4	<u>.4755</u> p=.073	.4287 p=.111	<u>.4639</u> p=.082	.1985 p=.478

....nastavak **Tabela 15.**

Sredina 1	Sredina 2	I	I+II	I+II+III	M
28-h1	28-h2	.7225 p=.002	.7269 p=.002	.6748 p=.006	.4320 p=.108
	28-h3	.7174 p=.003	.7178 p=.003	.6177 p=.014	.0694 p=.806
	28-h4	.8259 p=.000	.7908 p=.000	.8253 p=.000	<u>.4893</u> p=.064
28-h2	28-h3	.6718 p=.006	.8393 p=.000	.6819 p=.005	.4144 p=.125
	28-h4	.7119 p=.003	.5746 p=.025	.7056 p=.003	<u>.4638</u> p=.082
28-h3	28-h4	.6745 p=.006	.5694 p=.027	.6825 p=.005	.3870 p=.154
19-h1	23-h1	.8480 p=.000	.8820 p=.000	.8324 p=.000	.4094 p=.130
19-h1	28-h1	.5671 p=.027	.6097 p=.016	.5865 p=.022	.6032 p=.017
23-h1	28-h1	.6119 p=.015	.5794 p=.024	.5475 p=.035	<u>.4456</u> p=.096
19-h2	23-h2	.6880 p=.005	.7365 p=.002	.7162 p=.003	.2692 p=.332
19-h2	28-h2	.5145 p=.050	.5620 p=.029	.5629 p=.029	<u>.5081</u> p=.053
23-h2	28-h2	.6204 p=.014	.6618 p=.007	.6744 p=.006	.3024 p=.273
19-h3	23-h3	.5484 p=.034	.6154 p=.015	.6301 p=.012	.3108 p=.260
19-h3	28-h3	.5728 p=.026	.5216 p=.046	.6318 p=.012	.2490 p=.371
23-h3	28-h3	<u>.4619</u> p=.083	.4192 p=.120	<u>.4621</u> p=.083	.3480 p=.204
19-h4	23-h4	.7656 p=.001	.7546 p=.001	.6952 p=.004	.2961 p=.284
19-h4	28-h4	<u>.4432</u> p=.098	.2680 p=.334	<u>.4766</u> p=.072	.3558 p=.193
23-h4	28-h4	.5937 p=.020	<u>.4825</u> p=.069	.6495 p=.009	<u>.4670</u> p=.079

4.3. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA AKTIVNOST DIGESTIVNIH ENZIMA

4.3.1. Uticaj temperature i hrane na aktivnost enzima koji vare proteine

4.3.2. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost ukupnih proteaza (SPA)

Ukupna proteolitička aktivnost (SPA) u grubim homogenatima srednjeg creva larvi gubara (zid i sadržaj creva) trećeg dana IV larvenog stupnja zavisi od nutritivnog sastava hrane dok je efekat temperature marginalno značajan (**Slika 7; Tabela 16**). U proseku, SPA pokazuje trend porasta aktivnosti sa povećanjem temperature. Aktivnost ukupnih proteza (SPA) obuhvata specifične aktivnosti tripsina, elastaze (endopeptidaze) i leucin aminopeptidaze (egzopeptidaza). Za razliku od većine Lepidoptera, kod kojih je proteolitička aktivnost stimulirana visokim sadržajem proteina u dijeti (Broadwey & Duffey, 1986; Woods, 1999) specifična aktivnost ukupnih proteaza larvi gubara trećeg dana IV larvenog stupnja je pokazala obrnut obrazac aktivnosti, odnosno aktivnost je u proseku veća na hrani sa niskim sadržajem proteina (hrane 3 i 4) u odnosu na hranu sa visokim sadržajem proteina (hrane 1 i 2) i te razlike su izraženije sa porastom temperature (**Slika 7; Tabela 16**). Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da postoji značajan efekat interakcije između temperature i hrane na aktivnost ukupnih proteaza što ukazuje da oblik temperaturne norme reakcije zavisi od kvaliteta hrane (**Tabela 16**). Na primer, dok kod larvi hranjenih nutritivno najsiromašnijom hranom (hrana 4) dolazi do postepenog povećavanja aktivnosti ukupnih proteaza sa porastom temperature, obrnuti trend je karakterističan za larve hranjene nutritivno najbogatijom hranom (hrana 1).

Visok sadržaj proteina u dijeti dovodi do značajnog smanjenja aktivnosti ukupnih proteza, dok visok sadržaj ugljenih hidrata ima suprotan efekat tj. dolazi do povećanja aktivnosti na hrani bogatoj ugljenim hidratima (**Tabela 17**). Sa porastom temperature dolazi do povećanja aktivnosti proteaza samo kod larvi hranjenih dijetom sa niskim sadržajem proteina dok se kod larvi hranjenih dijetom sa visokim sadržajem proteina može uočiti trend smanjenja aktivnosti (značajna interakcija „temperatura × proteini“, **Tabela 17, Slika 7**). Visok sadržaj ugljenih hidrata dovodi do povećanja specifične aktivnosti ukupnih proteaza, a marginalno

je značajan efekat interakcije temperature i sadržaja ugljenih hidrata. Trend porasta aktivnost SPA sa porastom temperature se uočava samo na niskom sadržaju ugljenih hidrata u dijeti.

4.3.3. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost elastaze (SEA)

Dominantne proteinaze (endopeptidaze) larvi gubara su serinske proteinaze elastaza i tripsin koji čine oko 6% od ukupnih rastvorljivih proteina u lumenu srednjeg creva. Oko 75% od ukupne SEA je nađeno u luminalnoj tečnosti (Valaitis, 1995).

Na specifičnu aktivnost elastaze temperatura i kvalitet hrane, a naročito sadržaj proteina u dijeti imaju značajan uticaj (**Slika 8; Tabele 16 i 17**). Aktivnost elastaze je u proseku najniža na 19°C i raste sa porastom temperature, ali nema značajnih razlika u aktivnosti kod larvi gajenih na temperaturama 23 i 28°C. Uticaj kvaliteta hrane je marginalno značajan i larve gajene na nutritivno najbogatijoj dijeti (hrana 1) imaju nešto veću aktivnost elastaze u odnosu na druge eksperimentalne grupe (**Tabela 16**). Međutim, ispitivanjem efekta sadržaja proteina u dijeti putem trofaktorske analize varijanse pokazano je da povećan sadržaj proteina značajno povećava aktivnost elastaze što ukazuje na značaj mehanizma sekretagoge u regulaciji aktivnosti ovog enzima (**Tabela 17**). Efekti interakcija temperature i količine proteina i ugljenih hidrata, kao i međusobnih interakcija ove dve komponente hrane na aktivnost elastaze nisu značajni (**Tabela 17**).

4.3.4. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost tripsina (STA)

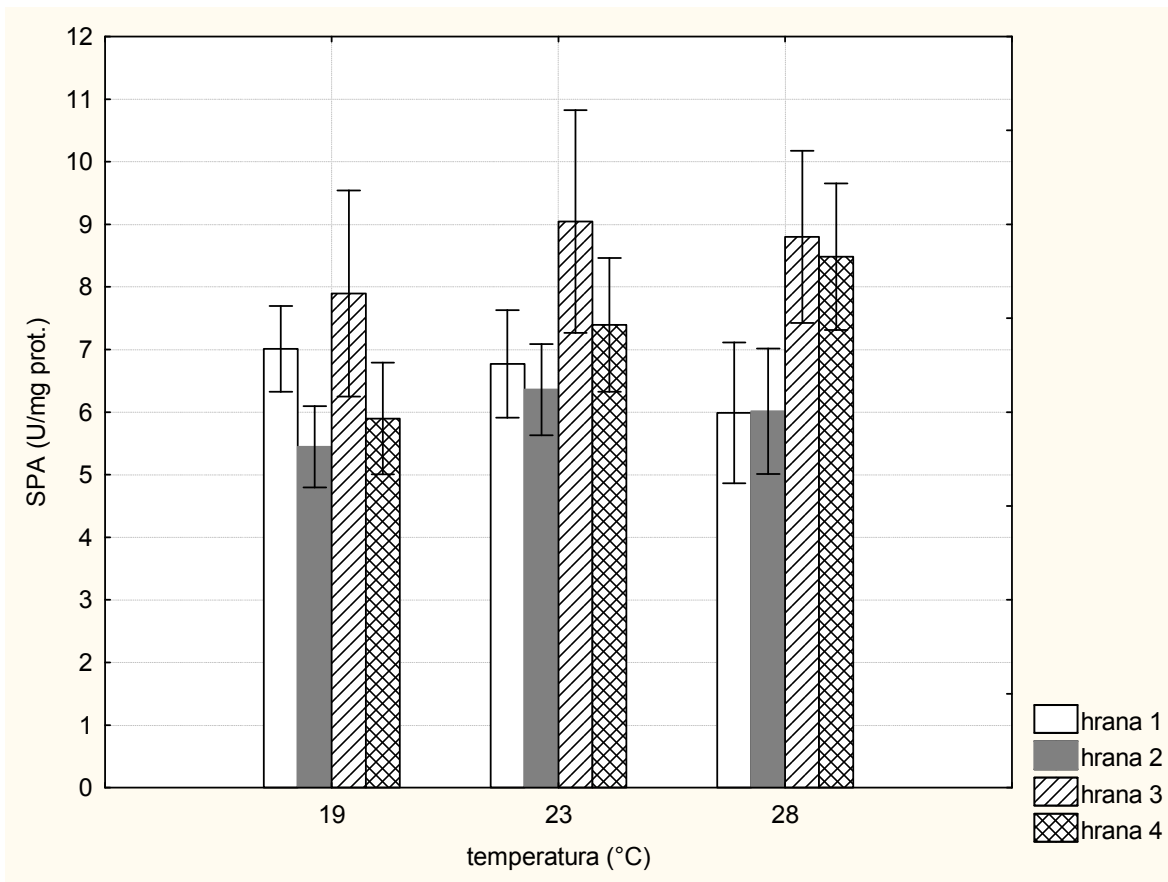
Aktivnost tripsina značajno zavisi od temperature (**Slika 9**) i nutritivnog sastava hrane (**Tabela 16**). Među nutritivnim sastojcima dijete značajan je uticaj sadržaja ugljenih hidrata, ali ne i proteina (**Tabela 17**). Tripsin pokazuje u proseku najveću aktivnost na optimalnoj temperaturi od 23°C, a između prosečnih aktivnosti na sub- i supraoptimalnim temperaturama nema značajnih razlika (**Tabele 16 i 17**).

Aktivnost tripsina je značajno niža na hrani 2 (visok sadržaj proteina i nizak sadržaj ugljenih hidrata) u odnosu na hranu 3 (nizak sadržaj proteina i visok sadržaj ugljenih hidrata) (**Tabela 16**). Suprotno prepostavci da veća količina supstrata dovodi do veće sinteze i oslobađanja odgovarajućeg enzima, "sekretagoga" mehanizam (Lehane et al., 1995), aktivnost tripsina ne zavisi od količine proteina u dijeti, ali zavisi od količine ugljenih hidrata (**Tabela 17**). Visok sadržaj ugljenih hidrata u dijeti dovodi do značajnog povećanja aktivnosti tripsina ($P < 0.001$).

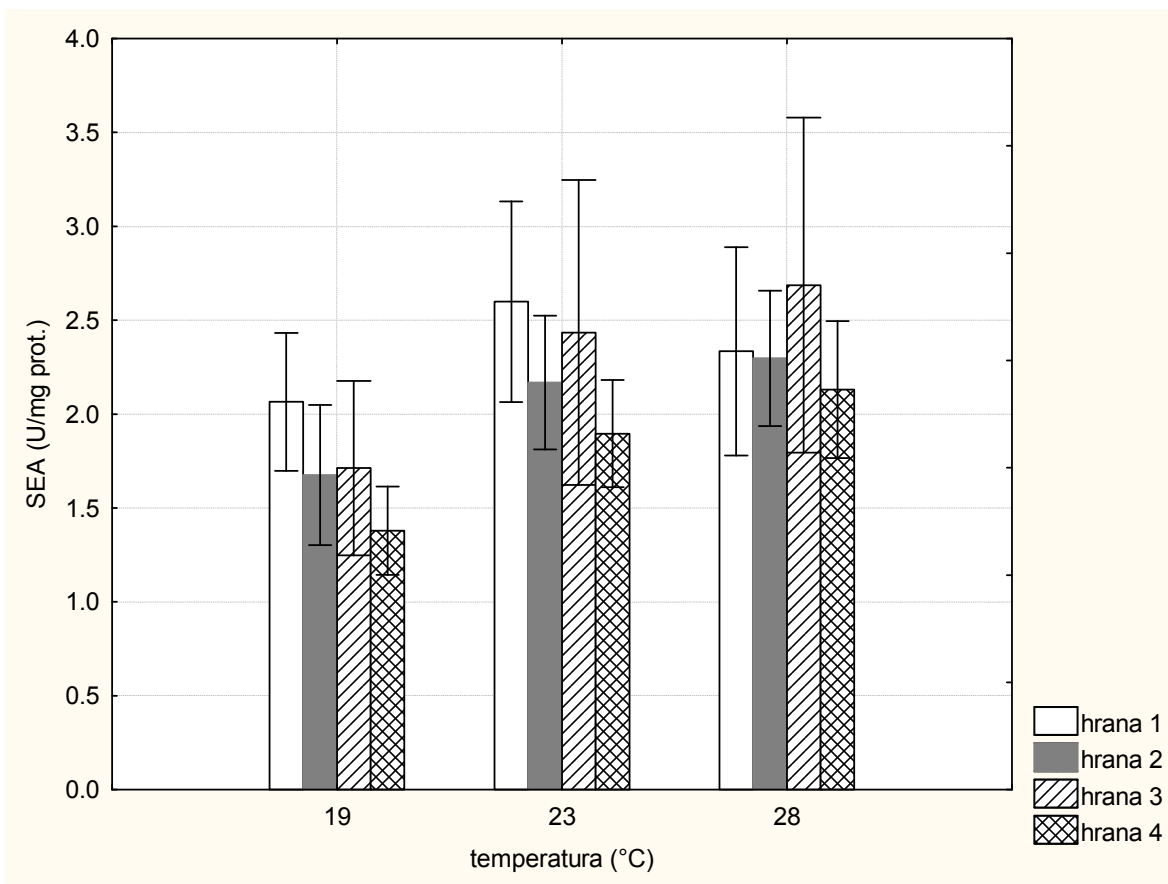
4.3.5. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost leucin aminopeptidaze (SLA)

Temperatura, sastav hrane (kako količina proteina tako i količina ugljenih hidrata) značajno menjaju aktivnost leucin aminopeptidaze larvi gubara trećeg dana IV larvenog stupnja (**Slika 10; Tabele 16 i 17**). SLA je u proseku najviša na temperauri 19°C i njena aktivnost pada sa porastom temperature. SLA zavisi od sastava hrane i veća je na hrani 1 (hrana sa visokim sadržajem i proteina i ugljenih hidrata) u odnosu na ostale dijete između kojih nema statistički značajnih razlika (**Tabela 16**).

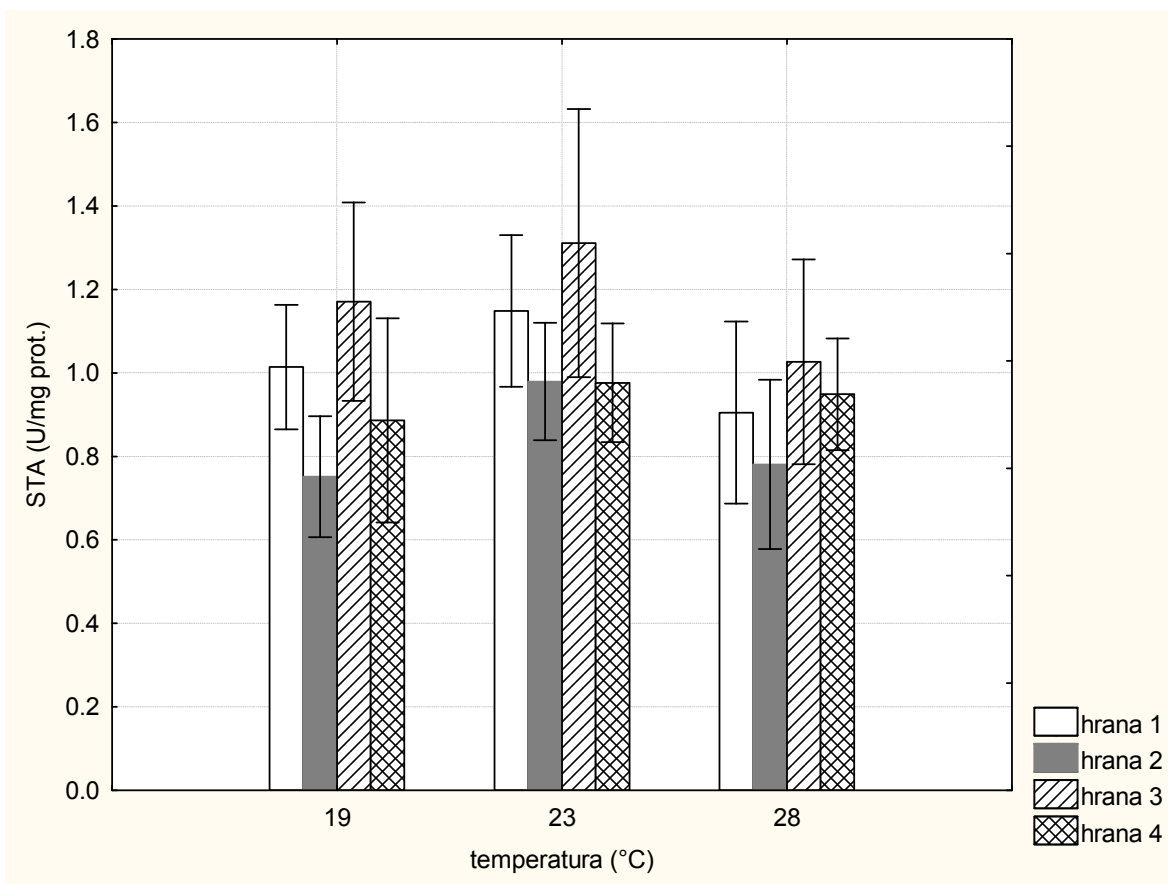
Visok sadržaj proteina kao i visok sadržaj ugljenih hidrata u hrani dovode do značajnog povećanja aktivnosti leucin aminopeptidaze (**Slika 10; Tabela 17**). Postoji značajan efekat interakcije proteina i ugljenih hidrata na aktivnost SLA. Aktivnost SLA je osetljivija na promene sadržaja proteina u dijeti ako su larve hranjene dijetom sa visokim sadržajem ugljenih hidrata (**Tabela 17**).



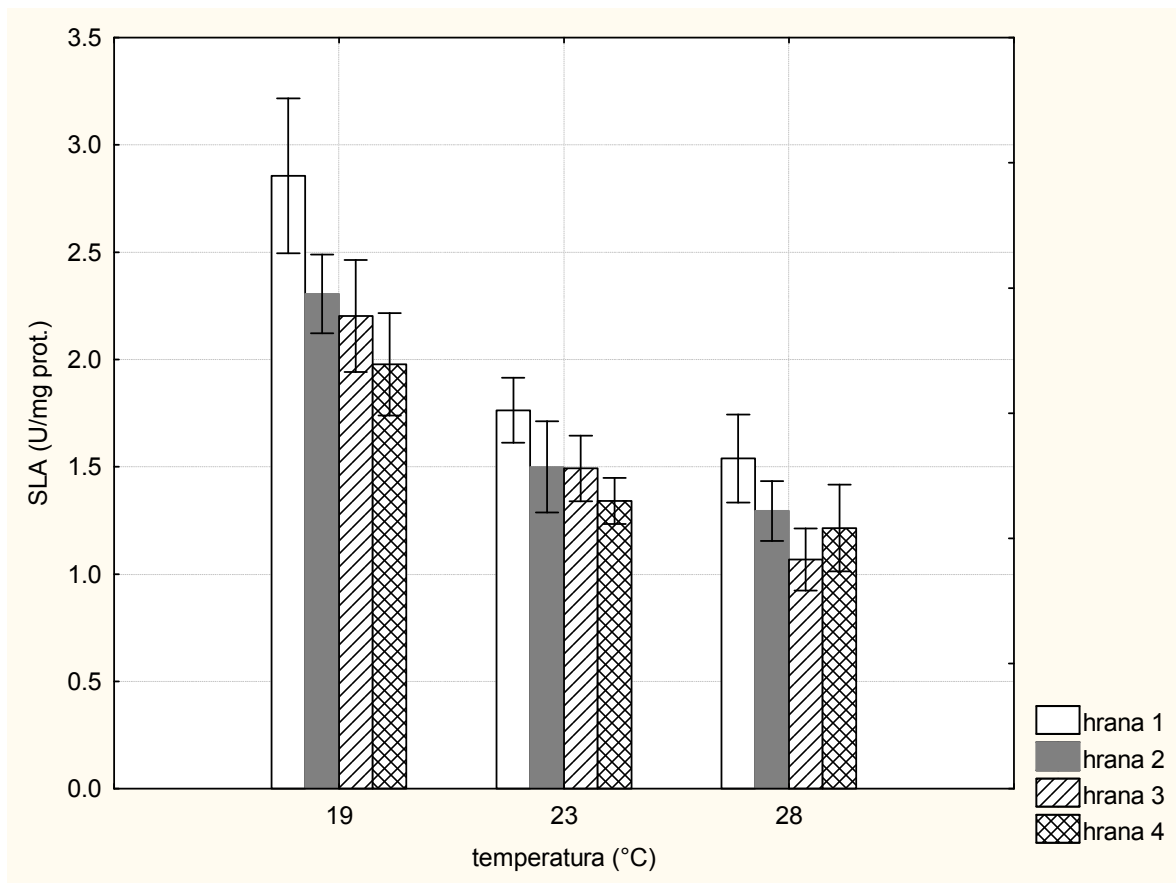
Slika 7. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST PROTEAZA (SPA) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvrtog larvenog stupnja ($\bar{X} \pm SE$).



Slika 8. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST ELASTAZE (SEA) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvtrog larvenog stupnja ($\bar{X} \pm SE$).



Slika 9. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST TRIPSINA (STA) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvrtog larvenog stupnja ($\bar{X} \pm SE$).



Slika 10. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST LEUCIN AMINOPEPTIDAZE (SLA) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvrtog larvenog stupnja ($\bar{X} \pm SE$).

Tabela 16. Dvofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima SPECIFIČNIH AKTIVNOSTI PROTEOLITIČKIH ENZIMA (SPA - ukupne proteaze, SEA – elastaza, STA – tripsin i SLA – leucin aminopeptidaza) larvi četvrtog stupnja. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane. Oznake 1, 2, 3 i 4 odnose se na nutritivne tretmane. 1 – visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata; 2 – visok sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata; 3 - nizak sadržaj proteina, visok sadržaj ugljenih hidrata, 4 - nizak sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata. Temperatura i hrana su fiksirani faktori.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
SPA	temperatura	0.095	2	0.047	2.8	0.0616	
	hrana	0.530	3	0.177	10.6	0.0000	(1=2) < (3=4)
	temperatura×hrana	0.248	6	0.041	2.5	0.0252	
	Greška	3.005	180	0.017			
ELA	temperatura	0.729	2	0.365	8.3	0.0004	19 < (23=28)
	hrana	0.292	3	0.097	2.2	0.0893	
	temperatura×hrana	0.135	6	0.023	0.5	0.8003	
	Greška	8.171	185	0.044			
STA	temperatura	0.279	2	0.140	4.0	0.0203	23 > (19=28)
	hrana	0.470	3	0.157	4.5	0.0047	2 < 3
	temperatura×hrana	0.155	6	0.026	0.7	0.6222	
	Greška	6.665	190	0.035			
SLA	temperatura	2.368	2	1.184	116.0	0.0000	19 > 23 > 28
	hrana	0.483	3	0.161	15.8	0.0000	1 > (2=3=4)
	temperatura×hrana	0.068	6	0.011	1.1	0.3585	
	Greška	1.899	186	0.010			

Tabela 17. Trofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima SPECIFIČNIH AKTIVNOSTI PROTEOLITIČKIH ENZIMA (SPA - ukupne proteaze, SEA – elastaza, STA – tripsin i SLA – leucin aminopeptidaza) larvi četvrtog stupnja. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane. n – nizak sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani, v – visok sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani. Temperatura, sadržaj proteina (Pr) i sadržaj ugljenih hidrata (Ug) u hrani su fiksirani faktori.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
SPA	temperatura	0.095	2	0.047	2.8	0.0616	
	Pr	0.398	1	0.398	23.8	0.0000	v < n
	Ug	0.148	1	0.148	8.9	0.0033	v > n
	temperatura × Pr	0.146	2	0.073	4.4	0.0138	
	temperatura × Ug	0.084	2	0.042	2.5	0.0828	
	Pr × Ug	0.007	1	0.007	0.4	0.5221	
	temperatura × Pr × Ug	0.006	2	0.003	0.2	0.8263	
	Greška	3.005	180	0.017			
SEA	temperatura	0.729	2	0.365	8.3	0.0004	19 < (23=28)
	Pr	0.207	1	0.207	4.7	0.0315	v > n
	Ug	0.090	1	0.090	2.0	0.1549	
	temperatura × Pr	0.078	2	0.039	0.9	0.4174	
	temperatura × Ug	0.032	2	0.016	0.4	0.6934	
	Pr × Ug	0.006	1	0.006	0.1	0.7167	
	temperatura × Pr × Ug	0.036	2	0.018	0.4	0.6695	
	Greška	8.171	185	0.044			
STA	temperatura	0.279	2	0.140	4.0	0.0203	23 > (19=28)
	Pr	0.086	1	0.086	2.5	0.1184	
	Ug	0.368	1	0.368	10.5	0.0014	v > n
	temperatura × Pr	0.060	2	0.030	0.9	0.4274	
	temperatura × Ug	0.080	2	0.040	1.1	0.3215	
	Pr × Ug	0.008	1	0.008	0.2	0.6418	
	temperatura × Pr × Ug	0.016	2	0.008	0.2	0.7921	
	Greška	6.665	190	0.035			
SLA	temperatura	2.368	2	1.184	116.0	0.0000	19 > 23 > 28
	Pr	0.341	1	0.341	33.4	0.0000	v > n
	Ug	0.107	1	0.107	10.5	0.0014	v > n
	temperatura × Pr	0.018	2	0.009	0.9	0.4068	
	temperatura × Ug	0.030	2	0.015	1.5	0.2320	
	Pr × Ug	0.054	1	0.054	5.3	0.0221	
	temperatura × Pr × Ug	0.018	2	0.009	0.9	0.4085	
	Greška	1.899	186	0.010			

4.3.6. Uticaj temperature i hrane na aktivnost enzima koji vare ugljene hidrate

4.3.7. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost amilaze (SAA)

Na amilolitičku aktivnost srednjeg creva larvi gubara utiču temperatura, nutritivni sastav hrane i to naročito količina proteina, kao i interakcija temperature i kvaliteta hrane (**Slika 11, Tabele 18 i 19**).

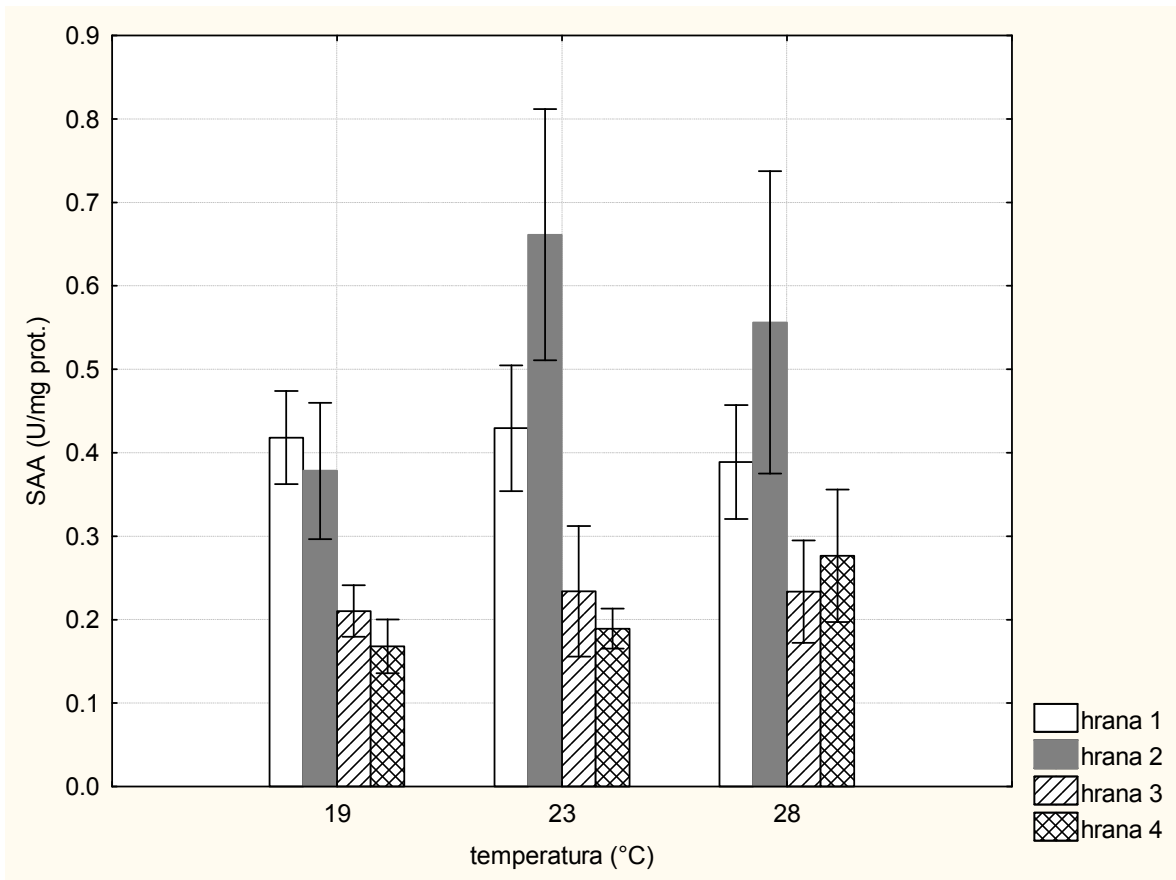
Aktivnost amilaze je u proseku niža kod larvi gajenih na 19°C u odnosu na temperature 23 i 28°C (**Slika 11, Tabela 18**). Suprotno očekivanju da je aktivnost amilaze pozitivno korelisana sa količinom ugljenih hidrata u hrani, aktivnost amilaze je u proseku veća na hrani koja je bogata proteinima (hrane 1 i 2) u odnosu na hrane 3 i 4 sa niskim sadržajem proteina. Trofaktorska analiza varijanse nam daje uvid kako aktivnost amilaze u okviru različitih dijeta zavisi od sadržaja proteina odnosno ugljenih hidrata. Visok sadržaj proteina u dijeti dovodi do značajnog povećanja aktivnosti amilaze (**Tabela 19**).

Temperatura i nutritivni sastav dijetete ne deluju nezavisno na aktivnost amilaze na šta ukazuju značajne interakcije "temperatura × hrana" i "temperatura × sadržaj ugljenih hidrata". Dok na nutritivno najbogatijoj hrani dolazi do porasta aktivnosti SAA sa porastom temperature, obrnuti trend se uočava na nutritivno najsiromašnijoj hrani (**Slika 11, Tabela 18**). Ako uporedimo efekat dijeta na osnovu sadržaja ugljenih hidrata vidi se da porast aktivnosti SAA sa povećanjem temperature pokazuju samo larve hranjene dijetama sa niskim sadržajem ugljenih hidrata kao i da je SAA najosetljivija na nizak sadržaj ugljenih hidrata u dijeti (smanjenje aktivnosti) kod larvi gajenih na 19°C (**Slika 11; Tabela 19**). Trofaktorska analiza varijanse je pokazala i marginalno značajan efekat interakcija "temperatura × sadržaj proteina" (trend porasta aktivnosti amilaze sa porastom temperature na dijeti sa visokim sadržajem proteina i konstantnost aktivnosti kod larvi gajenih na dijeti sa niskim sadržajem proteina) i "sadržaj proteina × sadržaj ugljenih hidrata" (veća je osetljivost aktivnosti amilaze na sadržaj proteina u dijeti ako je sadržaj ugljenih hidrata nizak).

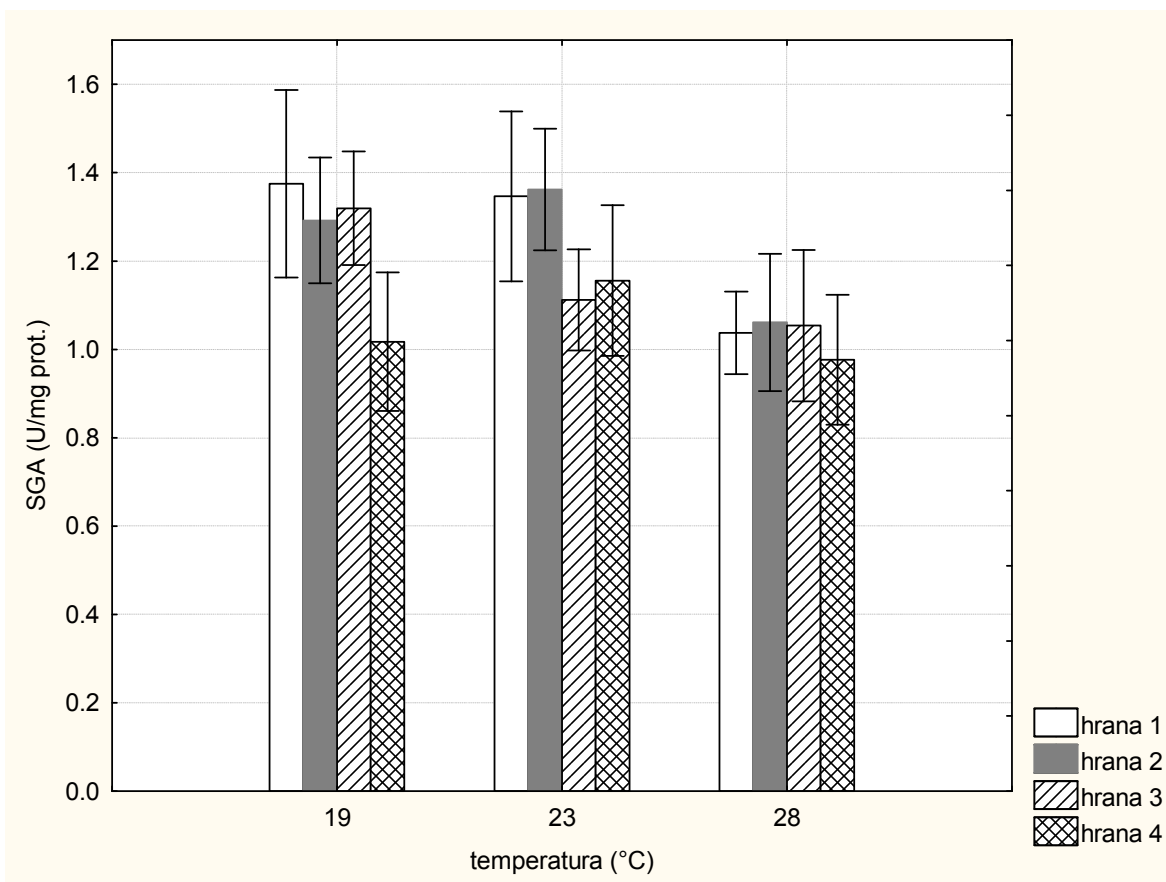
4.3.8. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost α -glikozidaze(SGA)

Aktivnost α -glikozidaze srednjeg creva larvi gubara trećeg dana IV larvenog stupnja zavisi od temperature, sastava hrane i naročito količine proteina u hrani (**Slika 12, Tabele 18 i 19**). Aktivnost α -glikozidaze je u proseku viša na temperaturama 19 i 23°C u odnosu na temperaturu 28°C (**Slika 12**). Na visokoproteinskoj hrani (hrane 1 i 2) aktivnost enzima je u proseku značajno veća u odnosu na hranu 4 koja ima nizak sadržaj proteina i ugljenih hidrata (**Tabele 18 i 19**).

Sadržaj proteina u dijeti značajno menja aktivnost α -glikozidaze, na sličan način kao i aktivnost amilaze. Aktivnost enzima je značajno veća na hrani sa visokim sadržajem proteina u odnosu na hranu sa niskim sadržajem proteina dok količina ugljenih hidrata nema značajnog uticaja na aktivnost ovog enzima (**Tabela 19**). Za razliku od amilaze ispitivani faktori životne sredine deluju nezavisno na aktivnost α -glikozidaze, tj. analiza varijanse nije pokazala značajan efekat njihovih interakcija.



Slika 11. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST AMILAZE (SAA) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvrtog larvenog stupnja ($X \pm SE$).



Slika 12. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST α -GLIKOZIDAZE (SGA) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvtrog larvenog stupnja ($X \pm SE$).

Tabela 18. Dvofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima SPECIFIČNIH AKTIVNOSTI α -AMILAZE I α -GLIKOZIDAZE larvi četvrtog stupnja. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane. Oznake 1, 2, 3 i 4 odnose se na nutritivne tretmane. 1 - visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata; 2 - visok sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata; 3 - nizak sadržaj proteina, visok sadržaj ugljenih hidrata, 4 - nizak sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata. Temperatura i hrana su fiksirani faktori.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
SAA	temperatura	0.208	2	0.104	3.2	0.0446	19 < (23=28)
	hrana	5.379	3	1.793	54.6	0.0000	(1=2) > (3=4)
	temperatura×hrana	0.493	6	0.082	2.5	0.0240	
	Greška	5.678	173	0.033			
SGA	temperatura	0.286	2	0.143	11.5	0.0000	(19=23) > 28
	hrana	0.196	3	0.065	5.3	0.0017	(1=2) > 4, 3=1,2,4
	temperatura×hrana	0.099	6	0.016	1.3	0.2468	
	Greška	2.358	190	0.012			

Tabela 19. Trofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima SPECIFIČNIH AKTIVNOSTI α -AMILAZE (SAA) I α -GLIKOZIDAZE (SGA) larvi četvrtog stupnja. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane. n - nizak sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani, v - visok sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani. Temperatura, sadržaj proteina (Pr) i sadržaj ugljenih hidrata (Ug) u hrani su fiksirani faktori.

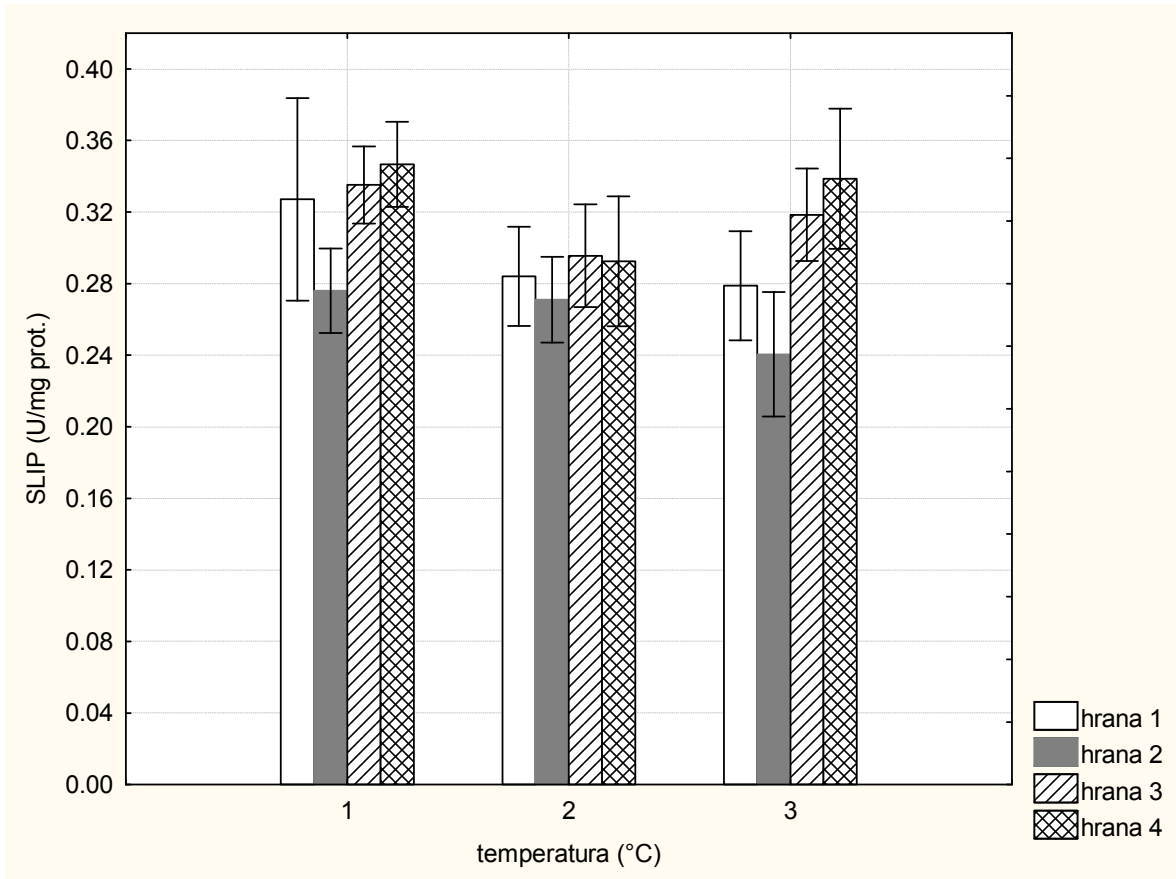
	Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
SAA	temperatura	0.208	2	0.104	3.2	0.0446	19 < (23=28)
	Pr	5.233	1	5.233	159.5	0.0000	v > n
	Ug	0.026	1	0.026	0.8	0.3722	
	temperatura ×Pr	0.158	2	0.079	2.4	0.0933	
	temperatura ×Ug	0.272	2	0.136	4.1	0.0176	
	Pr×Ug	0.121	1	0.121	3.7	0.0569	
	temperatura×Pr×Ug	0.061	2	0.031	0.9	0.3956	
	Greška	5.678	173	0.033			
SGA	temperatura	0.286	2	0.143	11.5	0.0000	(19=23) > 28
	Pr	0.140	1	0.140	11.3	0.0009	v > n
	Ug	0.029	1	0.029	2.3	0.1294	
	temperatura ×Pr	0.027	2	0.014	1.1	0.3379	
	temperatura ×Ug	0.055	2	0.027	2.2	0.1131	
	Pr×Ug	0.028	1	0.028	2.2	0.1355	
	temperatura×Pr×Ug	0.021	2	0.010	0.8	0.4319	
	Greška	2.358	190	0.012			

4.3.9. Uticaj temperature i hrane na aktivnost lipaze

Specifična aktivnost lipaze se značajno menja zavisno od temperaturnog režima, kvaliteta hrane i količine proteina u hrani (**Slika 13, Tabele 20 i 21**).

Lipaza pokazuje u proseku veću aktivnost na temperaturi od 19°C u odnosu na temperature 23 i 28°C, između kojih nema značajnih razlika u aktivnosti. Aktivnost enzima na hrani 2 (visok sadržaj proteina i nizak sadržaj ugljenih hidrata) je značajno niža u odnosu na aktivnost na hranama 3 i 4 sa niskim sadržajem proteina (**Slika 13, Tabela 20**).

Količina proteina u dijeti značajno menja aktivnost enzima i to tako da je aktivnost enzima na dijeti sa visokim sadržajem proteina u proseku značajno niža u odnosu na grupu gajenu na hrani sa niskim sadržajem proteina (**Tabela 21**). Postoji značajan efekat interakcije temperature i količine proteina u dijeti (**Slika 13, Tabela 21**). Na nepovoljnim temperaturama 19 i 28°C dolazi do porasta aktivnosti lipaze u odgovoru na nizak sadržaj proteina u dijeti, dok se aktivnost na 23°C ne menja zavisno od količine proteina. Takođe je značajan efekat interakcije količine proteina i ugljenih hidrata na promenu aktivnosti lipaze. Veća je osetljivost aktivnosti lipaze na nizak sadržaj proteina u dijeti ako je i sadržaj ugljenih hidrata nizak. (**Slika 13, Tabela 21**).



Slika 13. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST LIPAZE (SLIP) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvrtog larvenog stupnja ($X \pm SE$).

Tabela 20. Dvofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima SPECIFIČNIH AKTIVNOSTI LIPAZE larvi četvrtog stupnja. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane. Oznake 1, 2, 3 i 4 odnose se na nutritivne tretmane. 1 – visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata; 2 – visok sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata; 3 - nizak sadržaj proteina, visok sadržaj ugljenih hidrata, 4 - nizak sadržaj proteina, nizak sadržaj ugljenih hidrata. Temperatura (19, 23, 28) i hrana (1, 2, 3, 4) su fiksirani faktori.

	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
temperatura	0.094	2	0.047	5.3	0.0056	19 > (23=28)
hrana	0.282	3	0.094	10.7	0.0000	2 < (3=4), 1=2,3,4
temperatura×hrana	0.084	6	0.014	1.6	0.1530	
Greška	1.645	187	0.009			

Tabela 21. Trofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima SPECIFIČNIH AKTIVNOSTI LIPAZE larvi četvrtog stupnja. Oznake 19, 23 i 28 odnose se na temperaturne tretmane. n – nizak sadržaj proteina u hrani, v – visok sadržaj proteina u hrani. Temperatura, sadržaj proteina (Pr) i sadržaj ugljenih hidrata (Ug) u hrani su fiksirani faktori.

Izvor variranja	SS	df	MS	F	P	Scheffe-ov test
temperatura	0.094	2	0.047	5.3	0.0056	19 > (23=28)
Pr	0.210	1	0.210	23.9	0.0000	v < n
Ug	0.021	1	0.021	2.4	0.1225	
temperatura ×Pr	0.062	2	0.031	3.5	0.0315	
temperatura ×Ug	0.001	2	0.000	0.0	0.9683	
Pr×Ug	0.040	1	0.040	4.6	0.0340	
temperatura×Pr×Ug	0.018	2	0.009	1.0	0.3658	
Greška	1.645	187	0.009			

4.3.10. Uticaj temperature i hrane na aktivnost fosfataza

4.3.11. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost alkalne fosfataze (SALP)

Aktivnost alkalne fosfataze srednjeg creva larvi gubara menja se zavisno od temperaturnog režima, dok sastav hrane ne menja značajno njenu aktivnost. Analizom varijanse je pokazan značajan efekat interakcija temperature i hrane, kao i interakcija temperature sa količinom proteina i ugljenih hidrata u hrani (**Slika 14, Tabele 22 i 23**).

Aktivnost alkalne fosfataze raste sa porastom temperature i najviša je na 28°C (**Slika 14, Tabela 22**). Za aktivnost ALP značajna je interakcija temperature i hrane (**Tabela 22**). Dok na nutritivno najbogatijoj hrani dolazi do pada aktivnosti sa porastom temperature, aktivnost kod larvi gajenih na hranama 2, 3 i 4 pokazuje trend porasta aktivnosti. Najveći nagib temperaturne norme reakcije je uočen na hrani 3 koja je najmanje povoljna hrana za rast larvi.

Iako u proseku sadržaj proteina i ugljenih hidrata ne utiče značajno na aktivnost alkalne fosfataze značajan je efekat interakcija temperature i sadržaja proteina, kao i interakcije temperature i sadržaja ugljenih hidrata (**Slika 14, Tabela 23**). Temperaturna norma reakcije kod larvi gajenih na niskom sadržaju proteina odnosno ugljenih hidrata pokazuje trend porasta aktivnosti sa porastom temperature dok nema promena aktivnosti ako se larve hrane na dijeti sa visokim sadržajem ovih komponenti.

4.3.12. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost ukupnih kiselih fosfataza (SACP)

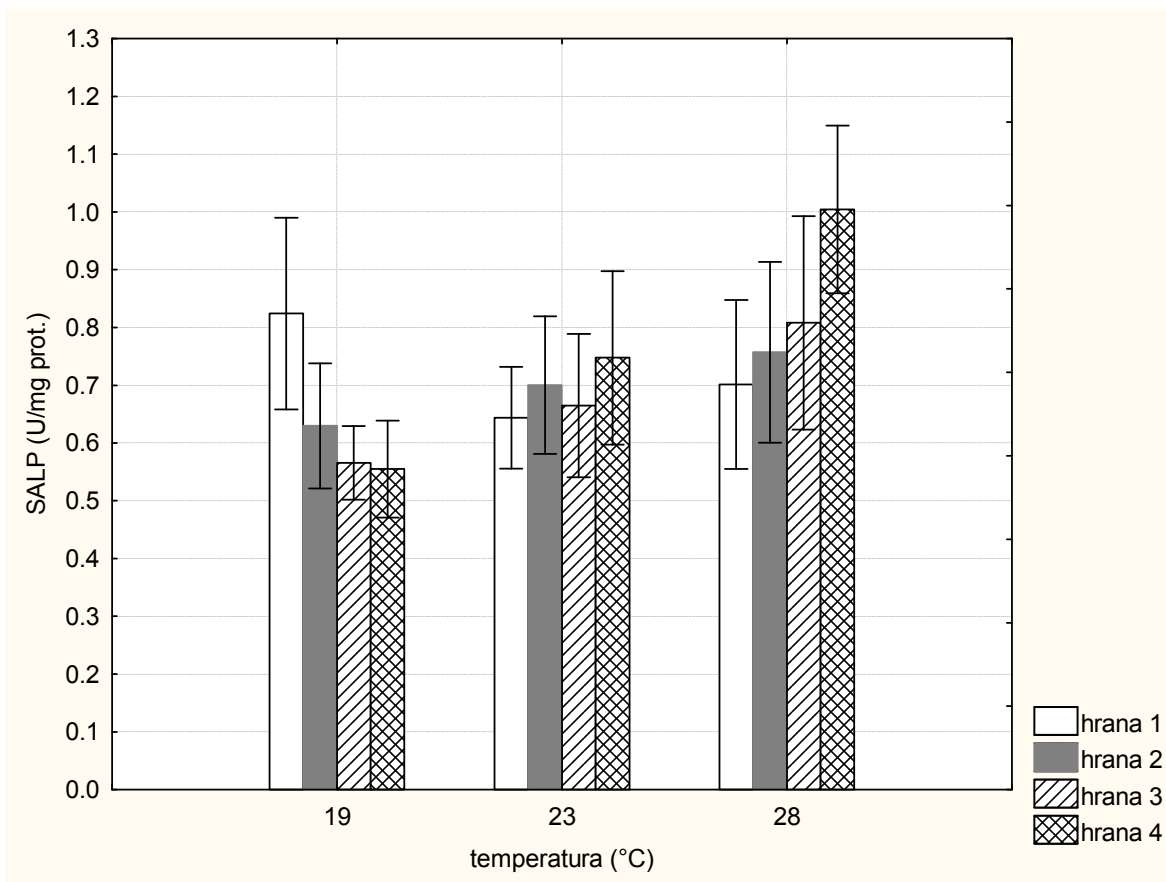
Ukupne kisele fosfataze imaju u proseku višu aktivnost na nižim temperaturama gajenja (na 19 > 23 > 28°C). Porast temperature dovodi do pada aktivnosti ukupnih kiselih fosfataza (**Slika 15, Tabela 22 i 23**). Sastav hrane značajno menja aktivnost enzima. Specifična aktivnost kiselih fosfataza je manja na hrani 2 u odnosu na hranu 3 (**Tabela 22**). Iako je ukupni sadržaj nutrienata približno isti, hrana 2 ima veći odnos proteina i ugljenih hidrata.

Količina proteina, kao i količina ugljenih hidrata u dijeti imaju značajan uticaj na aktivnost ukupnih kiselih fosfataza, a između njih ne postoje značajne interakcije (**Tabela 23**). Aktivnost kiselih fosfataza je u proseku niža na dijeti sa visokim sadržajem proteina, dok visok sadržaj ugljenih hidrata u dijeti dovodi do povećanja aktivnosti (**Tabela 23**).

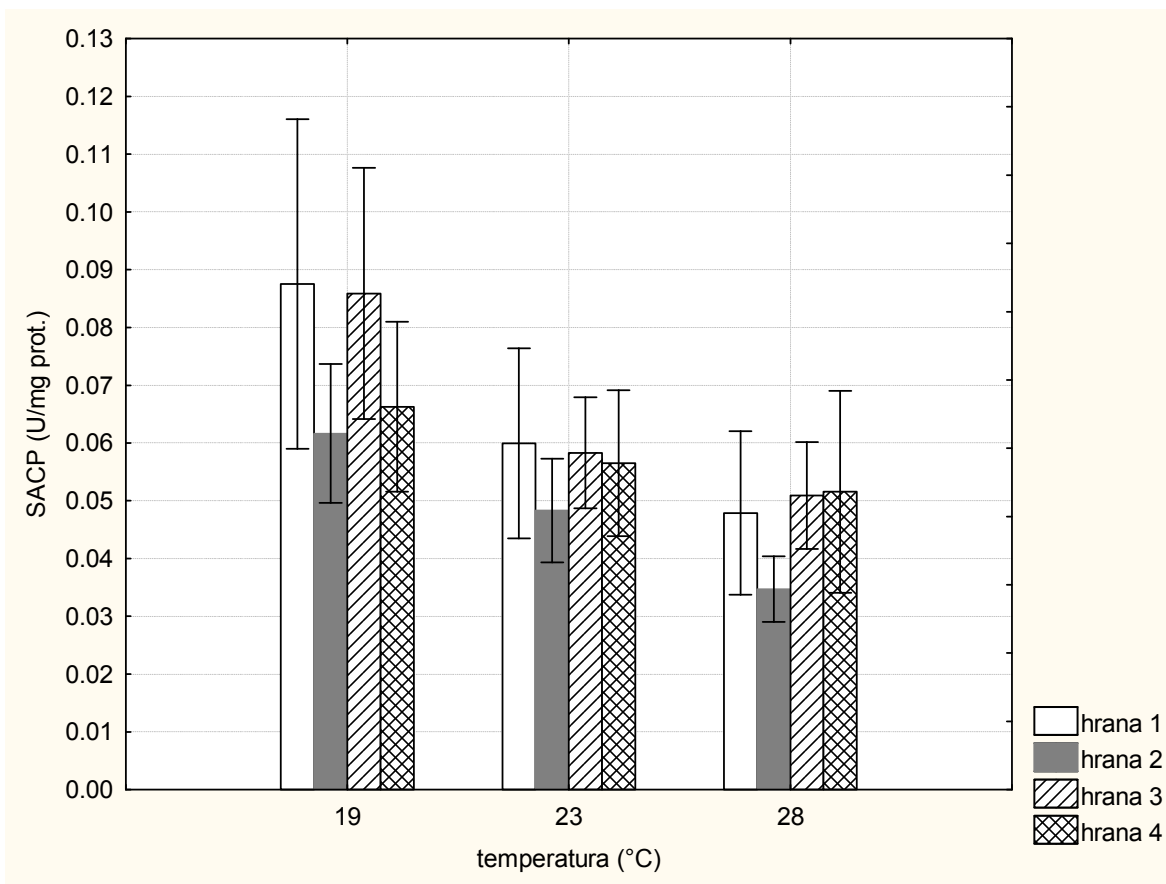
4.3.13. Uticaj temperature i hrane na specifičnu aktivnost lizosomalne kisele fosfataze (ACP_I)

Lizosomalne kisele fosfataze pokazuju slične promene aktivnosti kao i ukupne kisele fosfataze sa promenama temperature i sastava hrane. Aktivnost lizosomalnih fosfataza je u proseku najveća na 19°C i pada sa porastom temperature (**Slika 16, Tabele 22 i 23**).

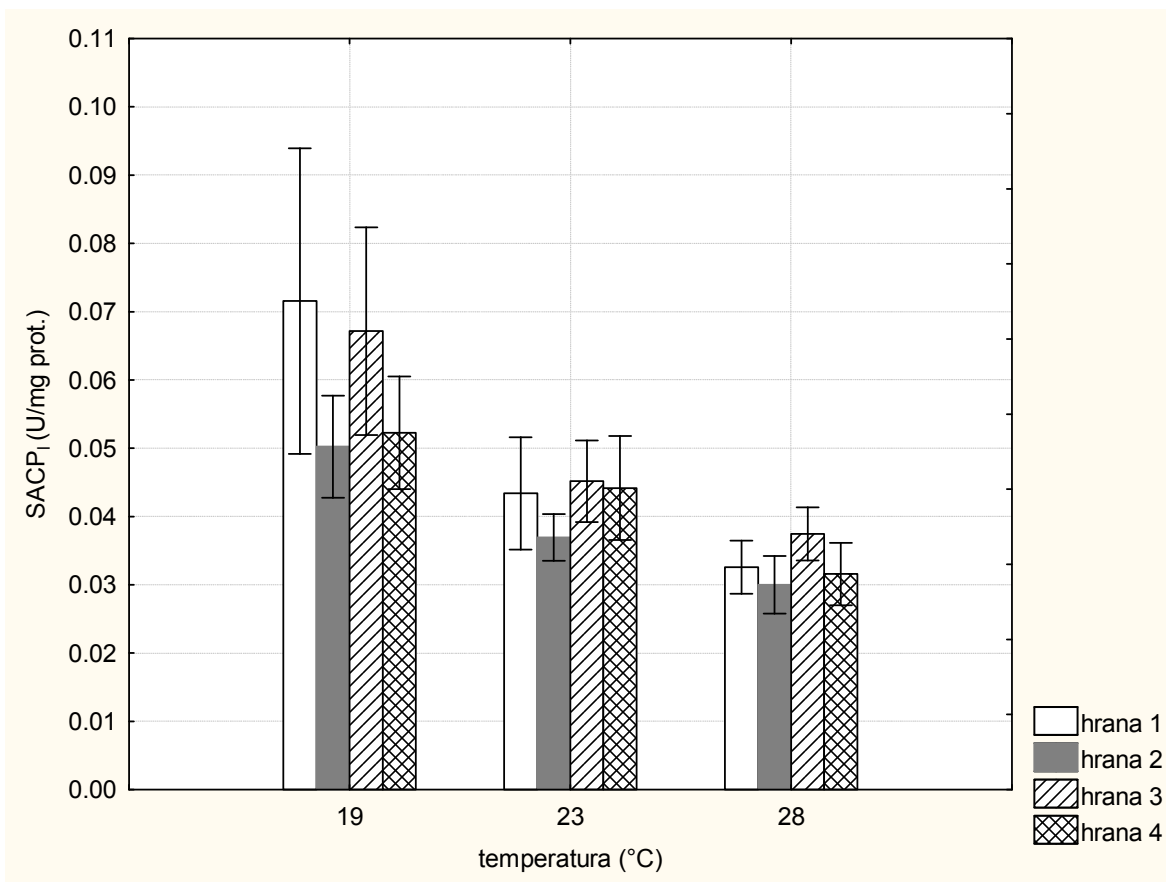
Slično ukupnim kiselim fosfatazama, aktivnost lizosomalnih fosfataza je manja na hrani 2 u odnosu na hranu 3 (**Tabela 22**), ali za razliku od ukupnih kiselih fosfataza, na njenu aktivnost nema značajnog uticaja količina proteina u dijeti. Na dijeti sa visokim sadržajem ugljenih hidrata aktivnost je u proseku viša u odnosu na dijetu sa niskim sadržajem ugljenih hidrata (**Tabela 23**).



Slika 14. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST ALKALNE FOSFATAZE (SALP) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvrtog larvenog stupnja ($\bar{X} \pm SE$).



Slika 15. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST UKUPNIH KISELIH FOSFATAZA (SACP) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvrtog larvenog stupnja ($X \pm SE$).



Slika 16. Uticaj temperature i hrane na SPECIFIČNU AKTIVNOST LIZOZOMALNIH KISELIH FOSFATAZA ($SACP_1$) u srednjem crevu larvi gubara 3. dana četvrtog larvenog stupnja ($X \pm SE$).

Tabela 22. Dvofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima SPECIFIČNIH AKTIVNOSTI ALKALNE FOSFATAZE (SALP), UKUPNE KISELE (SACP) I LIZOZOMALNE KISELE FOSFATAZE (SACP₁) larvi četvrtog stupnja. Temperatura (19, 23, 28) i hrana (1, 2, 3, 4) su fiksirani faktori.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	p	Scheffe-ov test
SALP	temperatura	0.303	2	0.152	6.7	0.0016	(19=23) < 28
	hrana	0.065	3	0.022	0.9	0.4208	
	temperatura×hrana	0.467	6	0.078	3.4	0.0032	
	Greška	4.172	183	0.023			
SACP	temperatura	1.430	2	0.715	22.9	0.0000	19 > 23 > 28 2 < 3
	hrana	0.453	3	0.151	4.8	0.0029	
	temperatura×hrana	0.089	6	0.015	0.5	0.8273	
	Greška	6.284	201	0.031			
SACP ₁	temperatura	1.754	2	0.877	48.5	0.0000	19 > 23 > 28 2 < 3
	hrana	0.236	3	0.079	4.3	0.0056	
	temperatura×hrana	0.078	6	0.013	0.7	0.6358	
	Greška	3.238	179	0.018			

Tabela 23. Trofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima SPECIFIČNIH AKTIVNOSTI ALKALNE FOSFATAZE (SALP), UKUPNE KISELE (SACP) I LIZOZOMALNE KISELE FOSFATAZE (SACP₁) larvi četvrtog stupnja. Temperatura, sadržaj proteina (Pr) i sadržaj ugljenih hidrata (Ug) u hrani su fiksirani faktori. n – nizak sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani, v – visok sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	p	Scheffe-ov test
SALP	temperatura	0.303	2	0.152	6.7	0.0016	(19=23) < 28
	Pr	0.000	1	0.000	0.0	0.9031	
	Ug	0.008	1	0.008	0.3	0.5561	
	temperatura ×Pr	0.305	2	0.153	6.7	0.0016	
	temperatura ×Ug	0.166	2	0.083	3.6	0.0283	
	Pr×Ug	0.056	1	0.056	2.4	0.1201	
	temperatura×Pr×Ug	0.020	2	0.010	0.4	0.6447	
	Greška	4.172	183	0.023			
SACP	temperatura	1.430	2	0.715	22.9	0.0000	19 > 23 > 28 v < n v > n
	Pr	0.130	1	0.130	4.1	0.0431	
	Ug	0.284	1	0.284	9.1	0.0029	
	temperatura ×Pr	0.048	2	0.024	0.8	0.4619	
	temperatura ×Ug	0.032	2	0.016	0.5	0.5994	
	Pr×Ug	0.033	1	0.033	1.1	0.3045	
	temperatura×Pr×Ug	0.011	2	0.005	0.2	0.8399	
	Greška	6.284	201	0.031			
SACP ₁	temperatura	1.754	2	0.877	48.5	0.0000	19 > 23 > 28 v > n
	Pr	0.038	1	0.038	2.1	0.1515	
	Ug	0.195	1	0.195	10.8	0.0012	
	temperatura ×Pr	0.028	2	0.014	0.8	0.4612	
	temperatura ×Ug	0.038	2	0.019	1.1	0.3484	
	Pr×Ug	0.001	1	0.001	0.1	0.7809	
	temperatura×Pr×Ug	0.017	2	0.009	0.5	0.6181	
	Greška	3.238	179	0.018			

4.4. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA FENOTIPSKU KORELACIJU IZMEĐU AKTIVNOSTI DIGESTIVNIH ENZIMA

Fenotipske korelacije između aktivnosti ispitivanih enzima su prikazane u **tabelama 24, 25 i 26**. Iako je Mantelov test pokazao da ukupna korelaciona struktura ne zavisi od temperature i kvaliteta hrane (**Tabela 27**) pojedine korelacije se značajno menjaju sa promenom uslova gajenja, a kod nekih od njih dolazi do promene znaka korelacije. Najveći broj značajnih korelacija se može uočiti na optimalnoj temperaturi gajenja (**Tabela 25**). Sa izuzetkom grupe larvi hranjenih nutritivno najsiromašnijom dijetom, broj korelacija između aktivnosti digestivnih enzima larvi gajenih na 23°C premašuje vrednosti dobijene u grupama larvi gajenih na 19 i 28°C i iznosi 17 (hrana 1), 18 (hrana 2), 15 (hrana 3) i 8 (hrana 4). Kod larvi gajenih na 19°C (**Tabela 24**) relativno visok broj korelacija je uočen kod larvi hranjenih dijetom koja je siromašna proteinima (13 značajnih korelacija na hrani 3 i 14 na hrani 4) u odnosu na larve gajene na visokoproteinskim dijetama (7 značajnih korelacija na hrani 1 i 9 na hrani 2). Kod larvi gajenih na 28°C (**Tabela 26**) visok broj korelacija (14) je uočen samo na nutritivno najbogatijoj dijeti dok se broj značajnih korelacija na ostalim dijetama kreće od 6 do 8. Značajne negativne korelacije između aktivnosti enzima su uočene samo u nekim grupama larvi hranjenih dijetom bogatom ugljenim hidratima (19°C -hrana 3 i 23°C -hrane 1 i 3). Kod larvi gajenih na 19°C to su korelacije između proteolitičkih enzima i kiselih fosfataza, a na 23°C se radi o korelacijama između proteolitičkih enzima i lipaza.

Većina fenotipskih korelacija između specifičnih aktivnosti ukupnih proteaza (SPA) i enzima koji vare proteine elastaze (SEA), tripsina (STA) i leucin aminopeptidaze (SLA) su pozitivne i statistički značajne (**Tabele 24, 25 i 26**).

U okviru proteolitičkih enzima aktivnosti dve endopeptidaze (SEA-STA) su pozitivno i značajno korelisane nezavisno od nutritivnog sastava dijetete i temperature gajenja (**Tabele 24, 25 i 26**). Nema statistički značajnih razlika između vrednosti ovih korelacija na različitim tretmanima.

Korelacije između endo i egzopeptidaza (SEA-SLA i STA-SLA) su uglavnom pozitivne. Povećavaju se kod larvi hranjenih nutritivno najbogatijom dijetom (hrana 1) dok se kod larvi hranjenih nutritivno najsromašnijom dijetom (hrana 4) njihova vrednost smanjuje sa porastom temperature. U odnosu na vrednosti korelacija određenih na temperaturi 19°C, vrednosti na 28°C su statistički značajno veće kod larvi gajenih na hrani 1 (SEA-SLA: $t = 4.440$, $P < 0.05$; STA-SLA: $t = 2.848$, $P < 0.01$) i marginalno značajno manje kod larvi gajenih na hrani 4 (SEA-SLA: $t = 1.820$, $P < 0.1$; STA-SLA: $t = 1.902$, $P < 0.1$).

Korelacije između specifičnih aktivnosti endopeptidaza (elastaze i tripsina) i endokarbohidraze (amilaze) su pozitivne i uglavnom značajne ili marginalno značajne kod larvi gajenih na 23 i 28°C dok kod larvi gajenih na 19°C nema značajnih korelacija između ovih enzima. Na optimalnoj temperaturi gajenja vrednosti ovih korelacija su značajno veće kod larvi hranjenih nutritivno najbogatijom dijetom (hrana 1) nego kod larvi hranjenih dijetom sa niskim sadržajem proteina i skroba (SEA-SAA: $t = 2.299$, $P < 0.05$; STA-SLA: $t = 2.310$, $P < 0.05$)

Jedina značajna korelacija između endo i egzokarbohidraze (SAA-SGA) je određena kod larvi gajenih na 28°C i hranjenih nutritivno najbogatijom hranom. Ova korelacija je pozitivna i marginalno značajno veća nego kod larvi hranjenih nutritivno najsromašnijom hranom u okviru iste temperature ($t = 1.800$, $P < 0.1$). Kod larvi hranjenih hranom 1 u odnosu na temperaturu 28°C, SAA-SGA korelacija je značajno manja na 19°C ($t = 2.184$, $P < 0.05$) i marginalno značajno manja na 23°C ($t = 1.964$, $P < 0.1$).

Aktivnost svih proteolitičkih enzima (SEA, STA i SLA) kao i amilaze (SAA) je u negativnoj korelaciji sa aktivnošću lipaze (SLIP) ako se larve gaje u optimalnim uslovima (23°C, hrana 1). Ni jedna od ovih korelacija nije značajna ako se larve gaje na 19 ili 28°C. Marginalno značajne promene vrednosti korelacija na 19°C su uočene za SLA-SLIP ($t = 1.896$, $P < 0.1$), a na 28°C za SPA-SLIP ($t = 2.662$, $P < 0.05$) i SLA-SLIP ($t = 1.803$, $P < 0.1$).

Larve gajene na optimalnoj temperaturi i visokoproteinskim dijetama (hrana 1 ili hrana 2) uglavnom pokazuju jake pozitivne korelacije između ukupne

aktivnosti proteaza i aktivnosti endopeptidaza (SPA, SEA i STA), sa jedne strane, i aktivnosti alkalne fosfataze (SALP), sa druge strane. Ove korelacije nisu značajne na temperaturama 19 i 28°C. Kod larvi hranjenih niskoproteinskim dijetama (hrane 3 i 4) većina korelacija proteolitičkih enzima sa alkalnim fosfatazama je pozitivna i značajna ili marginalno značajna na temperaturama 19 i 23°C dok na temperaturi 28°C ove korelacije postaju negativne mada nisu značajno različite od nule.

Kod larvi gajenih na dijeti koja ima najmanji odnos proteina i ugljenih hidrata (hrana 3) može se uočiti trend porasta vrednosti korelacija između ukupne aktivnosti proteaza i aktivnosti endopeptidaza (SPA, SEA i STA) sa jedne strane i aktivnosti kiselih fosfataza sa druge strane (SACP i SACP₁) sa porastom temperature. Na 19°C korelacije su značajne i negativne dok na 28°C postaju pozitivne. Statistički značajna razlika između temperatura je dobijena samo za SPA-SACP korelaciju ($t = 2.177$, $P < 0.05$), dok su ostale razlike marginalno značajne ($P < 0.1$) (SEA-SACP: $t = 2.008$; STA-SACP: $t = 2.029$; SPA-SACP₁: $t = 1.938$; SEA-SACP₁: $t = 1.740$; STA-SACP₁: $t = 1.731$).

Aktivnosti kiselih fosfataza su pozitivno korelisane sa aktivnošću lipaze (SLIP) ako su larve gajene na dijetama siromašnim ugljenim hidratima (hrana 4 na 19°C i hrana 2 na 23 i 28°C). Na hrani 2 ove korelacije menjaju znak od negativnog na 19°C do pozitivnog na 23 i 28°C. Razlike vrednosti između 19 i 28°C su statistički značajne za SACP ($t = 2.097$, $P < 0.05$) i marginalno značajne za SACP₁ ($t = 1.812$, $P < 0.1$).

Tabela. 24. Efekat nutritivnog sastava dijetе na korelacije između aktivnosti digestivnih enzima kod larvi gubara gajenih na TEMPERATURI 19°C.

	hrana 1										
	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁	
hrana 2	SPA	.8521 p=.000	.8136 p=.001	.2232 p=.486	.6433 p=.024	-.1502 p=.641	-.4725 p=.121	.0873 p=.787	-.2538 p=.426	-.2461 p=.441	
	SEA	.8945 p=.000	.6096 p=.035	.1259 p=.697	.4924 p=.104	-.0758 p=.815	-.1896 p=.555	-.0469 p=.885	-.4056 p=.191	-.3958 p=.203	
	STA	.8583 p=.000	.7366 p=.002	-.1234 p=.702	<u>.5507</u> p=.063	-.1353 p=.675	-.4698 p=.123	-.1449 p=.653	-.0173 p=.957	.0022 p=.995	
	SLA	.5767 p=.024	.5926 p=.020	.4354 p=.105		.1197 p=.711	.0694 p=.830	.0562 p=.862	.8540 p=.000	-.1035 p=.749	-.1245 p=.700
	SAA	.2660 p=.338	.0067 p=.981	.3063 p=.267	-.1216 p=.666		-.2915 p=.358	<u>-.5652</u> p=.056	.2410 p=.451	-.1344 p=.677	-.1243 p=.700
	SGA	.3373 p=.219	.0493 p=.861	.5864 p=.022	.0633 p=.823	.2504 p=.368		.7594 p=.004	.0875 p=.787	<u>.5051</u> p=.094	.4926 p=.104
	SLIP	-.3468 p=.205	-.4611 p=.084	-.2293 p=.411	-.0918 p=.745	<u>.4799</u> p=.070	-.0771 p=.785		.0150 p=.963	.3192 p=.312	.3024 p=.339
	SALP	.2669 p=.336	.0710 p=.802	.2116 p=.449	.2668 p=.336	.7803 p=.001	.0780 p=.782	.6962 p=.004		.0865 p=.789	.0670 p=.836
	SACP	.0088 p=.975	-.0474 p=.867	-.0572 p=.840	-.1080 p=.702	.0755 p=.789	-.2076 p=.458	-.1123 p=.690	-.2218 p=.427		.9994 p=.000
	SACP ₁	.0311 p=.912	-.0372 p=.895	-.0345 p=.903	-.0909 p=.747	.0622 p=.826	-.2025 p=.469	-.1239 p=.660	-.2214 p=.428	.9949 p=.000	

	hrana 3										
	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁	
hrana 4	SPA	.8255 p=.000	.9552 p=.000	.6392 p=.014	.4200 p=.135	.0868 p=.768	-.0763 p=.796	.5609 p=.037	-.6018 p=.023	-.6083 p=.021	
	SEA	.8371 p=.000	.8177 p=.000	.2807 p=.331	.2452 p=.398	.1984 p=.496	-.3476 p=.223	.3278 p=.253	-.5445 p=.044	-.5461 p=.043	
	STA	.8883 p=.000	.6839 p=.005	<u>.4893</u> p=.076	.3638 p=.201	-.0823 p=.780	-.2792 p=.334	<u>.5179</u> p=.058	-.6405 p=.014	-.6386 p=.014	
	SLA	.6928 p=.004	.7082 p=.003	.7064 p=.003		.5820 p=.029	.1850 p=.527	.3371 p=.239	.4358 p=.119	-.1543 p=.598	-.1635 p=.577
	SAA	.3836 p=.158	.2496 p=.370	.4294 p=.110	.6672 p=.007		-.0599 p=.839	-.1042 p=.723	<u>.4692</u> p=.091	-.0365 p=.901	-.0416 p=.888
	SGA	-.1418 p=.614	-.0181 p=.949	-.1992 p=.477	.2550 p=.359	<u>.4981</u> p=.059		.2415 p=.406	-.2717 p=.347	.2288 p=.431	.2156 p=.459
	SLIP	-.1318 p=.640	.1876 p=.503	-.3155 p=.252	.2625 p=.345	.1228 p=.663	.4337 p=.106		-.0531 p=.857	.3367 p=.239	.3078 p=.284
	SALP	.5478 p=.035	.6295 p=.012	<u>.4461</u> p=.096	.7409 p=.002	.7338 p=.002	.3547 p=.195	.3580 p=.190		-.2999 p=.297	-.3191 p=.266
	SACP	.2090 p=.455	.2539 p=.361	-.0973 p=.730	.2277 p=.414	.0543 p=.848	.2553 p=.358	.5848 p=.022	.1131 p=.688		.9986 p=.000
	SACP ₁	.2553 p=.358	.3133 p=.256	-.0428 p=.879	.2960 p=.284	.1192 p=.672	.2959 p=.284	.5628 p=.029	.1986 p=.478	.9895 p=.000	

Tabela 25. Efekat nutritivnog sastava dijetе na korelacije između aktivnosti digestivnih enzima kod larvi gubara gajenih na TEMPERATURI 23°C.

	hrana 1										
	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁	
hrana 2	SPA	.8063 p=.000	.9017 p=.000	.8352 p=.000	.6614 p=.002	.2139 p=.379	-.7192 p=.001	.6416 p=.003	-.2365 p=.330	-.2063 p=.397	
	SEA	.6530 p=.002		.7851 p=.000	<u>.4337</u> p=.064	.7584 p=.000	.0075 p=.976	-.5290 p=.020	.3299 p=.168	.0184 p=.941	.0278 p=.910
	STA	.7963 p=.000	.8879 p=.000		.6920 p=.001	.7651 p=.000	.0530 p=.829	-.6408 p=.003	.6442 p=.003	-.0815 p=.740	-.0317 p=.898
	SLA	.5666 p=.011	.4922 p=.032	.5919 p=.008		.3788 p=.110	.2946 p=.221	-.6123 p=.005	.7330 p=.000	<u>-.4351</u> p=.063	<u>-.4129</u> p=.079
	SAA	.5741 p=.010	.2241 p=.356	.4738 p=.040	.6571 p=.002		-.0989 p=.687	-.5324 p=.019	.3210 p=.180	.1599 p=.513	.1882 p=.440
	SGA	.3152 p=.189	.3223 p=.178	.2490 p=.304	-.0023 p=.992	.2096 p=.389		-.2921 p=.225	-.0461 p=.852	-.3626 p=.127	<u>-.3953</u> p=.094
	SLIP	-.1922 p=.430	.0656 p=.790	.0276 p=.911	.2663 p=.270	.2371 p=.328	<u>.4096</u> p=.082		-.2924 p=.224	.3850 p=.104	.3543 p=.137
	SALP	.7528 p=.000	.6274 p=.004	.6593 p=.002	.3751 p=.114	.3459 p=.147	.1638 p=.503	-.3206 p=.181		-.1611 p=.510	-.1159 p=.637
	SACP	.1818 p=.456	.1017 p=.679	.1557 p=.524	.4678 p=.043	.4684 p=.043	.1181 p=.630	.4903 p=.033	-.1836 p=.452		.9949 p=.000
	SACP ₁	.2020 p=.407	.1717 p=.482	.2113 p=.385	.5111 p=.025	<u>.4521</u> p=.052	.0747 p=.761	.4679 p=.043	-.1555 p=.525	.9919 p=.000	

	hrana 3										
	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁	
hrana 4	SPA		.9557 p=.000	.9700 p=.000	.6268 p=.009	.6576 p=.006	-.0280 p=.918	-.4119 p=.113	.5471 p=.028	-.3997 p=.125	-.3583 p=.173
	SEA	.7879 p=.000		.9419 p=.000	.5821 p=.018	.5459 p=.029	-.1130 p=.677	-.5164 p=.041	.5119 p=.043	-.3228 p=.223	-.2695 p=.313
	STA	.8582 p=.000	.7406 p=.000		.6666 p=.005	.6175 p=.011	-.1248 p=.645	-.4165 p=.109	.4981 p=.050	-.3206 p=.226	-.2831 p=.288
	SLA	.1586 p=.530	.2492 p=.319	.3131 p=.206		.5814 p=.018	-.3115 p=.240	-.1477 p=.585	.0300 p=.912	<u>-.4295</u> p=.097	-.4186 p=.107
	SAA	.3659 p=.135	.1715 p=.496	.1832 p=.467	.0122 p=.962		-.1646 p=.542	-.2866 p=.282	.2124 p=.430	-.2194 p=.414	-.1893 p=.483
	SGA	.6523 p=.003	.5050 p=.033	.6013 p=.008	.3400 p=.168	-.1101 p=.664		.4035 p=.121	-.0419 p=.878	.1853 p=.492	.1810 p=.502
	SLIP	-.3560 p=.147	<u>-.4320</u> p=.073	-.3452 p=.161	.3403 p=.167	-.2593 p=.299	.1456 p=.564		-.2422 p=.366	.0024 p=.993	-.0629 p=.817
	SALP	<u>.4309</u> p=.074	.2805 p=.260	<u>.4416</u> p=.067	.3842 p=.116	.3383 p=.170	.5101 p=.031	.1588 p=.529		-.1317 p=.627	-.1283 p=.636
	SACP	-.0418 p=.869	.2921 p=.240	.1930 p=.443	.3457 p=.160	.0518 p=.838	-.0056 p=.982	.1028 p=.685	.1878 p=.456		.9917 p=.000
	SACP ₁	-.0205 p=.936	.3083 p=.213	.2239 p=.372	.3435 p=.163	.0518 p=.838	.0418 p=.869	.0836 p=.742	.2072 p=.409	.9929 p=.000	

Tabela 26. Efekat nutritivnog sastava dijetete na korelacije između aktivnosti digestivnih enzima kod larvi gubara gajenih na TEMPERATURI 28°C.

	hrana 1									
	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
hrana 2	SPA	.6867 p=.010	.9033 p=.000	.7637 p=.002	.8831 p=.000	.6327 p=.020	.1448 p=.637	.0602 p=.845	.0383 p=.901	.0848 p=.783
	SEA	.2054 p=.522	.8418 p=.000	.8079 p=.001	.7740 p=.002	.3779 p=.203	-.3161 p=.293	-.0464 p=.880	-.0752 p=.807	-.0150 p=.961
	STA	<u>.5633</u> p=.057	.6249 p=.030	.7717 p=.002	.8947 p=.000	<u>.5175</u> p=.070	-.1059 p=.731	-.0138 p=.964	-.0963 p=.754	-.0513 p=.868
	SLA	.2033 p=.526	.6676 p=.018	<u>.5443</u> p=.067	.7997 p=.001	.3554 p=.233	-.0027 p=.993	-.0603 p=.845	-.1577 p=.607	-.1212 p=.693
	SAA	<u>.5226</u> p=.081	.6626 p=.019	<u>.5400</u> p=.070	.3120 p=.324	.6007 p=.030	.1503 p=.624	.2279 p=.454	-.1246 p=.685	-.0697 p=.821
	SGA	-.2626 p=.410	<u>.5267</u> p=.079	.4509 p=.141	.3819 p=.220	.0454 p=.888	.3216 p=.284	.1483 p=.629	.1808 p=.554	.2135 p=.484
	SLIP	-.0338 p=.917	.4827 p=.112	.3226 p=.306	.4301 p=.163	.0606 p=.852	.4105 p=.185	.6537 p=.015	.3919 p=.185	.3833 p=.196
	SALP	.1365 p=.672	-.0181 p=.955	.1742 p=.588	.0701 p=.829	.3110 p=.325	-.0701 p=.829	-.2392 p=.454	.3236 p=.281	.3617 p=.225
	SACP	-.0456 p=.888	.1272 p=.694	.0645 p=.842	-.0102 p=.975	-.0515 p=.874	-.0317 p=.922	.6700 p=.017	.0290 p=.929	.9953 p=.000
	SACP ₁	-.0570 p=.860	.0198 p=.951	.0221 p=.946	-.0349 p=.914	-.1259 p=.697	-.0722 p=.824	.5875 p=.045	.1446 p=.654	.9827 p=.000

	hrana 3									
	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
hrana 4	SPA	.9149 p=.000	.9608 p=.000	.2259 p=.480	.6369 p=.026	-.0403 p=.901	<u>-.5101</u> p=.090	-.1600 p=.619	.2658 p=.404	.1530 p=.635
	SEA	.6601 p=.007	.9449 p=.000	.3463 p=.270	.5881 p=.044	-.0367 p=.910	-.4619 p=.131	-.1467 p=.649	.2761 p=.385	.1591 p=.621
	STA	.9201 p=.000	.6789 p=.005	.2490 p=.435	<u>.5658</u> p=.055	-.0476 p=.883	-.4728 p=.121	-.1669 p=.604	.1402 p=.664	.0100 p=.975
	SLA	.1221 p=.665	.1451 p=.606	.1087 p=.700	.3099 p=.327	-.3636 p=.245	-.0279 p=.931	.1011 p=.755	.2160 p=.500	.1683 p=.601
	SAA	.5747 p=.025	.3794 p=.163	<u>.4690</u> p=.078	.5535 p=.032	.1500 p=.642	-.1941 p=.546	.0441 p=.892	.4539 p=.138	.2346 p=.463
	SGA	.1255 p=.656	.1852 p=.509	.3109 p=.259	-.1876 p=.503	-.0752 p=.790	-.3329 p=.290	.0884 p=.785	.4066 p=.190	.3245 p=.303
	SLIP	-.3543 p=.195	.0072 p=.980	-.2274 p=.415	.3297 p=.230	.1095 p=.698	.1399 p=.619	-.1192 p=.712	-.2714 p=.394	-.2378 p=.457
	SALP	-.1370 p=.626	-.1976 p=.480	-.1459 p=.604	.2147 p=.442	-.1379 p=.624	-.1647 p=.557	.1695 p=.546	.0694 p=.830	.0376 p=.908
	SACP	.0933 p=.741	.2598 p=.350	.2028 p=.468	-.0583 p=.836	-.1928 p=.491	.5644 p=.028	.1372 p=.626	-.2385 p=.392	.9455 p=.000
	SACP ₁	.0612 p=.829	.2166 p=.438	.1536 p=.585	-.0720 p=.799	-.2069 p=.459	.5272 p=.043	.1387 p=.622	-.2110 p=.450	.9966 p=.000

Tabela 27. Koeficijent korelacije (r) u Mantelovom testu poredjenja struktura fenotipskih korelacija aktivnosti digestivnih enzima izmedju različitih tretmana.

		r	
19-h1	19-h2	0.4114	***
	19-h3	0.6961	***
	19-h4	0.6334	***
19-h2	19-h3	0.5993	***
	19-h4	0.5674	***
19-h3	19-h4	0.7350	***
23-h1	23-h2	0.7137	***
	23-h3	0.8084	***
	23-h4	0.6263	***
23-h2	23-h3	0.7337	***
	23-h4	0.5611	***
23-h3	23-h4	0.5684	***
28-h1	28-h2	0.5454	***
	28-h3	0.5462	***
	28-h4	0.5990	***
28-h2	28-h3	0.2632	**
	28-h4	0.4860	***
28-h3	28-h4	0.7347	***
19-h1	23-h1	0.6050	***
19-h1	28-h1	0.5391	***
23-h1	28-h1	0.6240	***
19-h2	23-h2	0.5227	***
19-h2	28-h2	0.2985	***
23-h2	28-h2	0.4733	***
19-h3	23-h3	0.8579	***
19-h3	28-h3	0.4322	***
23-h3	28-h3	0.6367	***
19-h4	23-h4	0.4395	***
19-h4	28-h4	0.4485	***
23-h4	28-h4	0.4934	***

** P < 0.01; *** P < 0.001

4.5. FENOTIPSKU KORELACIJE IZMEĐU AKTIVNOSTI DIGESTIVNIH ENZIMA I KOMPONENTI ADAPTIVNE VREDNOSTI

Mali je broj značajnih fenotipskih korelacija između aktivnosti digestivnih enzima i trajanja razvića, mase i relativne brzine rasta larvi (**Tabele 28, 29 i 30**). Mantelovim testom je pokazano da kod larvi hranjenih nutritivno najbogatijom dijetom temperatura ne utiče značajno na ukupnu korelacionu strukturu (**Tabela 31**). Na dijetama koje imaju manji sadržaj skroba (hrane 2 i 4) ukupna korelaciona struktura larvi gajenih na 19°C se značajno razlikuje od korelacione strukture na 23 i 28°C, a na hrani koja ima najmanji odnos ugljenih hidrata i proteina (hrana 3) ukupna korelaciona struktura larvi gajenih na supraoptimalnoj temperaturi odstupa od korelacionih struktura na 19 i 23°C. Za ovu eksperimentalnu grupu (28°C-hrana 3) je čak dobijena negativna vrednost Mantelovog koeficijenta korelacija pri poređenju korelacionih struktura sa grupama 28°C-hrana 1 i 19°C-hrana 3. Pored toga, u okviru svake od ispitivanih temperatura može se videti da nutritivni sastav hrane može menjati ukupnu korelacionu strukturu.

Od svih ispitivanih komponenti adaptivne vrednosti najveći broj značajnih korelacija je dobijen između aktivnosti digestivnih enzima i relativne brzine rasta larvi tokom 3 dana četvrtog stupnja kod larvi koje su gajene na optimalnoj temperaturi 23°C i nutritivno najbogatijoj dijeti (**Tabela 29**). RGR je pozitivno korelisan sa aktivnošću proteolitičkih enzima (SPA, SEA, STA i SLA), amilaze (SAA) i alkalne fosfataze (SALP), a negativna i marginalno značajna korelacija se uočava između RGR i aktivnosti lipaze (SLIP). Korelacije RGR sa ukupnom aktivnošću proteaza kao i endopeptidazama (SPA, SEA, STA) se menjaju i postaju negativne na temperaturi 19°C, a razlike su marginalno značajne za SPA ($t = 1.801, P < 0.1$) i SEA ($t = 1.782, P < 0.1$).

Većina značajnih i marginalno značajnih korelacija između trajanja razvića i aktivnosti digestivnih enzima je negativna što znači da larve čije razviće do ulaska u četvrti stupanj duže traje imaju manju aktivnost digestivnih enzima. Međutim, na nutritivno najsiromašnijoj dijeti (hrana 4) uočavaju se značajne i pozitivne korelacije između trajanja razvića i aktivnosti lizozomalnih i ukupnih kiselih

fosfataza kod larvi gajenih na temperaturama 23 i 28°C. Na temperaturi 19°C ove korelacije menjaju znak i značajno se razlikuju kako od korelacija na temperaturi 23°C (ACP: $t = 2.644$, $P < 0.05$; ACP₁: $t = 2.752$, $P < 0.01$) tako i od korelacija na temperaturi 28°C (ACP: $t = 3.171$, $P < 0.01$; ACP₁: $t = 3.148$, $P < 0.01$).

Na sub- i supraoptimalnim temperaturama postoje značajne negativne korelacije između mase larvi (M0 i M3) i specifične aktivnosti lipaze ako su larve hranjene nutritivno najbogatijom dijetom. Značajna razlika od vrednosti korelacije na 23°C je dobijena samo za korelaciju SLIP-M3 na 28°C ($t = 2.531$, $P < 0.05$).

Na dijeti koja ima najmanji odnos proteina i ugljenih hidrata (hrana 3) može se uočiti trend smanjenja vrednosti korelacija između mase larvi (M0 i M3) i aktivnosti proteolitičkih enzima koje od pozitivnih vrednosti na 19°C postaju negativne na 28°C. Na 19°C statistički su značajne samo pozitivne korelacije sa specifičnom aktivnosti tripsina, a na 28°C značajne su samo negativne korelacije sa specifičnom aktivnosti leucin aminopeptidaze. Značajne razlike korelacija mase i aktivnost proteolitičkih enzima između temperatura 19 i 28°C su dobijene za SLA (M0: $t = 2.371$, $P < 0.05$; M3: $t = 2.848$, $P < 0.01$), a za STA su dobijene marginalno značajne razlike (M0: $t = 1.806$, $P < 0.1$; M3: $t = 1.720$, $P < 0.1$).

Tabela 28. Efekat nutritivnog sastava dijetе na korelacije između komponenti adaptivne vrednosti i aktivnosti digestivnih enzima kod larvi gubara gajenih na TEMPERATURI 19°C. h1, h2, h3, h4 – hrana1, hrana2, hrana 3, hrana 4; I+II+III – trajanje razvića do ulaska u IV stupanj, M₀ – masa larve po presvlaćenju u IV stupanj; M₃ – masa larve trećeg dana IV stupnja; RGR-relativna brzina rasta larvi tokom 3 dana u IV larvenom stupnju.

h1	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.2414 p=.450	-.1960 p=.541	-.1652 p=.608	-.1612 p=.617	<u>-.5090</u> p=.091	.0533 p=.869	.3214 p=.308	.0153 p=.962	.2147 p=.503	.2060 p=.521
M ₀	.4004 p=.197	.3412 p=.278	.4141 p=.181	-.5776 p=.049	.2092 p=.514	-.3334 p=.290	-.6027 p=.038	-.6368 p=.026	-.2899 p=.361	-.2703 p=.396
M ₃	.4274 p=.166	.3424 p=.276	<u>.5370</u> p=.072	-.5853 p=.046	<u>.5724</u> p=.052	-.4348 p=.158	-.7051 p=.010	-.4963 p=.101	-.1808 p=.574	-.1558 p=.629
RGR	-.1286 p=.690	-.2062 p=.520	-.0777 p=.810	.4196 p=.175	.4301 p=.163	-.1788 p=.578	-.0248 p=.939	.6184 p=.032	.1703 p=.597	.1658 p=.607

h2	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	<u>-.4650</u> p=.081	-.4161 p=.123	-.0567 p=.841	-.5353 p=.040	-.0753 p=.790	.1277 p=.650	-.0303 p=.915	-.4387 p=.102	.2722 p=.326	.2519 p=.365
M ₀	.0853 p=.762	.1159 p=.681	.1915 p=.494	-.3102 p=.260	.3427 p=.211	-.0325 p=.908	.2789 p=.314	.2405 p=.388	.0912 p=.746	.0975 p=.730
M ₃	.1654 p=.556	.2248 p=.421	.1630 p=.562	-.2210 p=.429	.0290 p=.918	-.1264 p=.653	.0276 p=.922	.0435 p=.878	.0052 p=.985	.0432 p=.879
RGR	.1444 p=.608	.1828 p=.514	-.0163 p=.954	.1160 p=.680	-.3971 p=.143	-.1286 p=.648	-.3152 p=.252	-.2152 p=.441	-.1340 p=.634	-.0881 p=.755

h3	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.3191 p=.266	-.0494 p=.867	-.2907 p=.313	<u>-.4831</u> p=.080	-.6554 p=.011	-.0545 p=.853	-.1282 p=.662	-.3084 p=.283	-.1016 p=.730	-.1007 p=.732
M ₀	.4438 p=.112	.3811 p=.179	.5711 p=.033	.2919 p=.311	.0718 p=.807	-.2198 p=.450	-.2219 p=.446	.1533 p=.601	-.1828 p=.532	-.1609 p=.583
M ₃	<u>.4757</u> p=.086	.4263 p=.128	.5355 p=.048	<u>.5248</u> p=.054	.1536 p=.600	.0757 p=.797	-.1680 p=.566	.0004 p=.999	-.1942 p=.506	-.1751 p=.549
RGR	-.0067 p=.982	.0576 p=.845	-.1288 p=.661	.3882 p=.170	.1568 p=.592	<u>.5306</u> p=.051	.0533 p=.856	-.2768 p=.338	.0278 p=.925	.0212 p=.943

h4	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.5307 p=.042	<u>-.4506</u> p=.092	-.3920 p=.148	-.3155 p=.252	-.0420 p=.882	-.2444 p=.380	.0310 p=.913	-.0340 p=.904	-.4312 p=.109	-.4342 p=.106
M ₀	.1996 p=.476	.2292 p=.411	<u>.4676</u> p=.079	.3164 p=.251	.0402 p=.887	-.1978 p=.480	-.2499 p=.369	-.1113 p=.693	-.2730 p=.325	-.2591 p=.351
M ₃	.1770 p=.528	.1639 p=.559	.2997 p=.278	.2311 p=.407	.0237 p=.933	-.2161 p=.439	-.0708 p=.802	-.1714 p=.541	-.0434 p=.878	-.0840 p=.766
RGR	.0531 p=.851	-.0099 p=.972	-.2443 p=.380	-.1252 p=.657	-.0950 p=.736	-.0375 p=.894	.3388 p=.217	-.1462 p=.603	<u>.5034</u> p=.056	.4003 p=.139

Tabela 29. Efekat nutritivnog sastava dijetе na korelacije između komponenti adaptivne vrednosti i aktivnosti digestivnih enzima kod larvi gubara gajenih na TEMPERATURI 23°C. h1, h2, h3, h4 – hrana1, hrana2, hrana 3, hrana 4; I+II+III – trajanje razvića do ulaska u IV stupanj, M₀ – masa larve po prewvlaćenju u IV stupanj; M₃ – masa larve trećeg dana IV stupnja; RGR-relativna brzina rasta larvi tokom 3 dana u IV larvenom stupnju.

h1	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.1257 p=.608	-.2414 p=.319	-.0450 p=.855	-.0598 p=.808	-.1556 p=.525	.1610 p=.510	.1400 p=.568	.0715 p=.771	-.1067 p=.664	-.0796 p=.746
M ₀	-.3267 p=.172	-.0424 p=.863	-.2622 p=.278	-.5227 p=.022	.0407 p=.868	-.0738 p=.764	-.0155 p=.950	<u>-.4434</u> p=.057	-.0356 p=.885	-.0552 p=.822
M ₃	-.0542 p=.825	.2239 p=.357	-.0247 p=.920	-.2681 p=.267	.2671 p=.269	-.3583 p=.132	-.2157 p=.375	-.2217 p=.362	-.0229 p=.926	-.0327 p=.894
RGR	.5402 p=.017	.4778 p=.039	.5053 p=.027	.4923 p=.032	.4576 p=.049	-.4928 p=.032	<u>-.4266</u> p=.069	.4972 p=.030	-.0122 p=.960	.0181 p=.941

h2	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.2868 p=.234	.3755 p=.113	.1462 p=.550	.0476 p=.847	-.1847 p=.449	.0248 p=.920	<u>.4129</u> p=.079	-.1022 p=.677	.1823 p=.455	.2463 p=.309
M ₀	.0441 p=.858	-.0490 p=.842	.0168 p=.946	-.1223 p=.618	-.1546 p=.527	.0068 p=.978	-.1748 p=.474	-.1598 p=.513	.1556 p=.525	.1598 p=.513
M ₃	.1805 p=.460	.0377 p=.878	.1108 p=.651	-.0500 p=.839	-.1373 p=.575	.1655 p=.498	-.0482 p=.845	-.0880 p=.720	.0993 p=.686	.0753 p=.759
RGR	.2790 p=.247	.1470 p=.548	.1576 p=.519	.1018 p=.678	.0133 p=.957	.3811 p=.107	.2416 p=.319	.1298 p=.596	-.0614 p=.803	-.1265 p=.606

h3	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.1290 p=.634	-.0565 p=.835	.0360 p=.895	.3603 p=.170	.1598 p=.554	<u>-.4739</u> p=.064	.0820 p=.763	-.4144 p=.111	.3123 p=.239	.3071 p=.247
M ₀	.0101 p=.971	.0563 p=.836	-.0294 p=.914	-.2473 p=.356	.3174 p=.231	-.0431 p=.874	-.4087 p=.116	-.0517 p=.849	-.0010 p=.997	.0393 p=.885
M ₃	.4026 p=.122	.3656 p=.164	.3100 p=.243	.1727 p=.522	<u>.4279</u> p=.098	.2754 p=.302	-.1868 p=.489	.0243 p=.929	-.2583 p=.334	-.1684 p=.533
RGR	<u>.4597</u> p=.073	.3878 p=.138	.4102 p=.115	<u>.4837</u> p=.058	.1735 p=.520	.3216 p=.224	.1568 p=.562	.0766 p=.778	-.2269 p=.398	-.1712 p=.526

h4	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.0354 p=.889	.3043 p=.220	.1391 p=.582	.1384 p=.584	-.5322 p=.023	.1509 p=.550	.0443 p=.861	.1391 p=.582	.5061 p=.032	.5334 p=.023
M ₀	-.2922 p=.239	-.3167 p=.200	-.2097 p=.404	.1722 p=.495	.1534 p=.543	-.0414 p=.871	.2295 p=.360	-.0662 p=.794	.3725 p=.128	.3521 p=.152
M ₃	-.1634 p=.517	-.2689 p=.281	-.1797 p=.476	.2475 p=.322	.2925 p=.239	.2154 p=.391	<u>.4571</u> p=.056	.1352 p=.593	.1664 p=.509	.1697 p=.501
RGR	.2756 p=.268	.2456 p=.326	.0886 p=.727	.0844 p=.739	.0256 p=.920	.3756 p=.125	.1794 p=.476	.2409 p=.336	-.3498 p=.155	-.3179 p=.199

Tabela 30. Efekat nutritivnog sastava dijetе na korelacije između komponenti adaptivne vrednosti i aktivnosti digestivnih enzima kod larvi gubara gajenih na TEMPERATURI 28°C. h1, h2, h3, h4 – hrana1, hrana2, hrana 3, hrana 4; I+II+III – trajanje razvića do ulaska u IV stupanj, M₀ – masa larve po prewvlaćenju u IV stupanj; M₃ – masa larve trećeg dana IV stupnja; RGR-relativna brzina rasta larvi tokom 3 dana u IV larvenom stupnju.

h1	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.3258 p=.277	-.1605 p=.600	-.4188 p=.154	-.1319 p=.667	-.4239 p=.149	-.4310 p=.141	.1199 p=.697	.0337 p=.913	.2678 p=.376	.2591 p=.393
M ₀	-.3559 p=.233	.0533 p=.863	-.0615 p=.842	-.0976 p=.751	-.1854 p=.544	<u>-.5431</u> p=.055	-.5918 p=.033	-.2823 p=.350	-.0724 p=.814	-.0958 p=.755
M ₃	-.0974 p=.752	.4537 p=.119	.1944 p=.525	.1983 p=.516	.0337 p=.913	-.4193 p=.154	-.8471 p=.000	-.3655 p=.219	-.2492 p=.412	-.2326 p=.444
RGR	.3611 p=.225	.3273 p=.275	.2053 p=.501	.3162 p=.293	.2043 p=.503	.1525 p=.619	-.1185 p=.700	-.0429 p=.889	-.2705 p=.371	-.2157 p=.479

h2	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.4041 p=.193	.4171 p=.177	.0970 p=.764	.1794 p=.577	-.0300 p=.926	.1645 p=.609	.2654 p=.404	-.0087 p=.979	<u>.5090</u> p=.091	.4760 p=.118
M ₀	-.2581 p=.418	-.1246 p=.700	-.3216 p=.308	.0343 p=.916	.1087 p=.737	-.2467 p=.439	.0031 p=.992	.4109 p=.185	.0136 p=.967	.0540 p=.868
M ₃	-.1446 p=.654	.1337 p=.679	-.0563 p=.862	.2688 p=.398	.3714 p=.235	-.1872 p=.560	-.1974 p=.539	.6072 p=.036	-.1743 p=.588	-.1199 p=.711
RGR	.1003 p=.757	.4165 p=.178	.2983 p=.346	.4645 p=.128	.3277 p=.298	.0522 p=.872	-.2801 p=.378	.3310 p=.293	-.3126 p=.323	-.2807 p=.377

h3	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	.0777 p=.810	.3228 p=.306	.1410 p=.662	-.0372 p=.909	.2472 p=.439	.4120 p=.183	-.1006 p=.756	-.0488 p=.880	.4625 p=.130	.3480 p=.268
M ₀	-.1169 p=.717	-.2926 p=.356	-.1520 p=.637	-.6411 p=.025	-.0133 p=.967	<u>.5043</u> p=.095	.0530 p=.870	.1504 p=.641	.1265 p=.695	.1279 p=.692
M ₃	-.1366 p=.672	-.2637 p=.408	-.1654 p=.607	-.5967 p=.041	-.0429 p=.895	.4410 p=.151	.0896 p=.782	.3973 p=.201	.1091 p=.736	.1248 p=.699
RGR	-.0148 p=.964	.2306 p=.471	.0511 p=.875	.4617 p=.131	-.0930 p=.774	-.4223 p=.171	.0643 p=.843	.4560 p=.136	-.1373 p=.671	-.1075 p=.740

h4	SPA	SEA	STA	SLA	SAA	SGA	SLIP	SALP	SACP	SACP ₁
I+II+III	-.1086 p=.700	-.1482 p=.598	.0980 p=.728	.0571 p=.840	-.0982 p=.728	<u>.5044</u> p=.055	.2865 p=.301	-.2638 p=.342	.6783 p=.005	.6713 p=.006
M ₀	.1312 p=.641	-.0584 p=.836	.2423 p=.384	.2160 p=.439	.0518 p=.855	.1710 p=.542	.0551 p=.845	.0137 p=.961	-.1128 p=.689	-.1582 p=.573
M ₃	-.0063 p=.982	-.1943 p=.488	.0181 p=.949	.0977 p=.729	.0289 p=.919	.0005 p=.999	.2145 p=.443	-.0539 p=.849	-.1792 p=.523	-.2036 p=.467
RGR	-.3248 p=.238	-.3429 p=.211	<u>-.4705</u> p=.077	-.2297 p=.410	-.1096 p=.697	-.3527 p=.197	.2761 p=.319	-.1280 p=.649	-.2167 p=.438	-.1845 p=.510

Tabela 31. Koeficijent korelacije (r) u Mantelovom testu poredjenja struktura fenotipskih korelacija aktivnosti digestivnih enzima i komponenti adaptivne vrednosti izmedju razlicitih tretmana.

		r	
19-h1	19-h2	0.1566	n.s.
	19-h3	0.3589	***
	19-h4	0.2959	***
19-h2	19-h3	0.2774	**
	19-h4	0.0918	n.s.
19-h3	19-h4	0.5795	***
23-h1	23-h2	0.0878	n.s.
	23-h3	0.2933	**
	23-h4	0.0081	n.s.
23-h2	23-h3	0.4260	***
	23-h4	0.4372	***
23-h3	23-h4	0.1448	n.s.
28-h1	28-h2	0.3931	***
	28-h3	-0.2824	***
	28-h4	-0.1741	n.s.
28-h2	28-h3	0.3032	***
	28-h4	0.0765	n.s.
28-h3	28-h4	0.1652	n.s.
19-h1	23-h1	0.4662	***
19-h1	28-h1	0.4986	***
23-h1	28-h1	0.4558	***
19-h2	23-h2	0.0196	n.s.
19-h2	28-h2	0.1340	n.s.
23-h2	28-h2	0.2747	**
19-h3	23-h3	0.3069	**
19-h3	28-h3	-0.5139	***
23-h3	28-h3	0.0355	n.s.
19-h4	23-h4	-0.5608	***
19-h4	28-h4	-0.1147	n.s.
23-h4	28-h4	0.2164	*

* P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001

4.6. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA REZISTENTNOST PREMA VISOKOJ TEMPERATURI

4.6.1. Uticaj temperature i hrane na vreme preživljavanja (VP)

Vreme preživljavanja (VP) je pod snažnim uticajem hranljivog sastava dijetе i temperature na kojoj su larve gajene pre prebacivanja na stresnu temperaturu od 36°C (**Slika 17, Tabele 32 i 33**).

Larve u proseku najduže preživljavaju na temperaturi od 36°C ako su prethodno gajene na 23°C, a najkraće ukoliko su do 3. dana IV larvenog stupnja gajene na 28°C (**Slika 17, Tabela 32**). Larve najduže preživljavaju na hrani siromašnoj proteinima i ugljenim hidratima (hrana 4), dok je preživljavanje na hranama 1, 2 i 3 značajno kraće (i nije međusobno značajno različito) u odnosu na hranu 4. Vreme preživljavanja zavisi od međusobnih interakcija temperature i hrane (**Tabela 32**). Na nutritivno najbogatijoj hrani uočava se trend porasta rezistentnosti na stresnu temperaturu sa porastom temperature gajenja, dok je na nutritivno najsiromašnijoj hrani trend smanjenja vremena preživljavanja (**Slika 17**).

Trofaktorska analiza varijanse nam daje uvid na koji način sastav dijetе, odnosno sadržaj njenih specifičnih komponenti proteina i ugljenih hidrata, utiče na vreme preživljavanja na stresnoj temperaturi (**Tabela 33**). Visoka koncentracija proteina u dijeti, kao i visoka koncentracija ugljenih hidrata, značajno skraćuje vreme preživljavanja na stresnoj temperaturi 36°C (**Tabela 33**).

Veoma je značajan efekat međusobne interakcije ove dve komponente hrane, kao i njihovih interakcija sa temperaturom na vreme preživljavanja (**Tabela 33**). Rezistentnost prema visokoj temperaturi, određena na osnovu vremena preživljavanja, je osetljivija na sadržaj proteina u dijeti ako su larve gajene na 19 i 23°C nego na 28°C. Najveću osetljivost vremena preživljavanja na sadržaj ugljenih hidrata u dijeti pokazuju larve gajene na 23°C pre izlaganja stresnoj temperaturi 36°C. Značajan efekat interakcije sadržaja proteina i ugljenih hidrata pokazuje da je porast rezistentnosti u odgovoru na nizak sadržaj proteina veći ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata nizak (**Slika 17**).

4.6.2. Trajanje IV larvenog stupnja larvi izloženih temperaturi 36°C

Većina larvi gubara IV stupnja je uspjela da se presvuče u V larveni stupanj nakon izlaganja temperaturi 36°C (**Slika 19**). Uticaj temperature gajenja pre izlaganja larvi visokoj stresnoj temperaturi na trajanje IV stupnja je marginalno značajan tj. postoji trend skraćanja trajanja IV stupnja sa porastom temperature gajenja ($P < 0.1$) (**Slika 18, Tabela 32**). S druge strane, nutritivni sastav dijete značajno menja trajanje IV larvenog stupnja. Trajanje IV larvenog stupnja je u proseku kraće na visokoproteinskoj hrani (hrane 1 i 2) u odnosu na hranu sa niskim sadržajem proteina (hrane 3 i 4) (**Tabela 32**). Značajan efekat sadržaja proteina u dijeti je pokazan i trofaktorskom analizom varijanse (**Tabela 33**). Trajanje IV stupnja ne zavisi od sadržaja ugljenih hidrata, a temperatura i nutritivni sastav dijete deluju nezavisno na ovu osobinu na šta ukazuje odsustvo značajnih interakcija ispitivanih faktora sredine (**Tabele 32 i 33**).

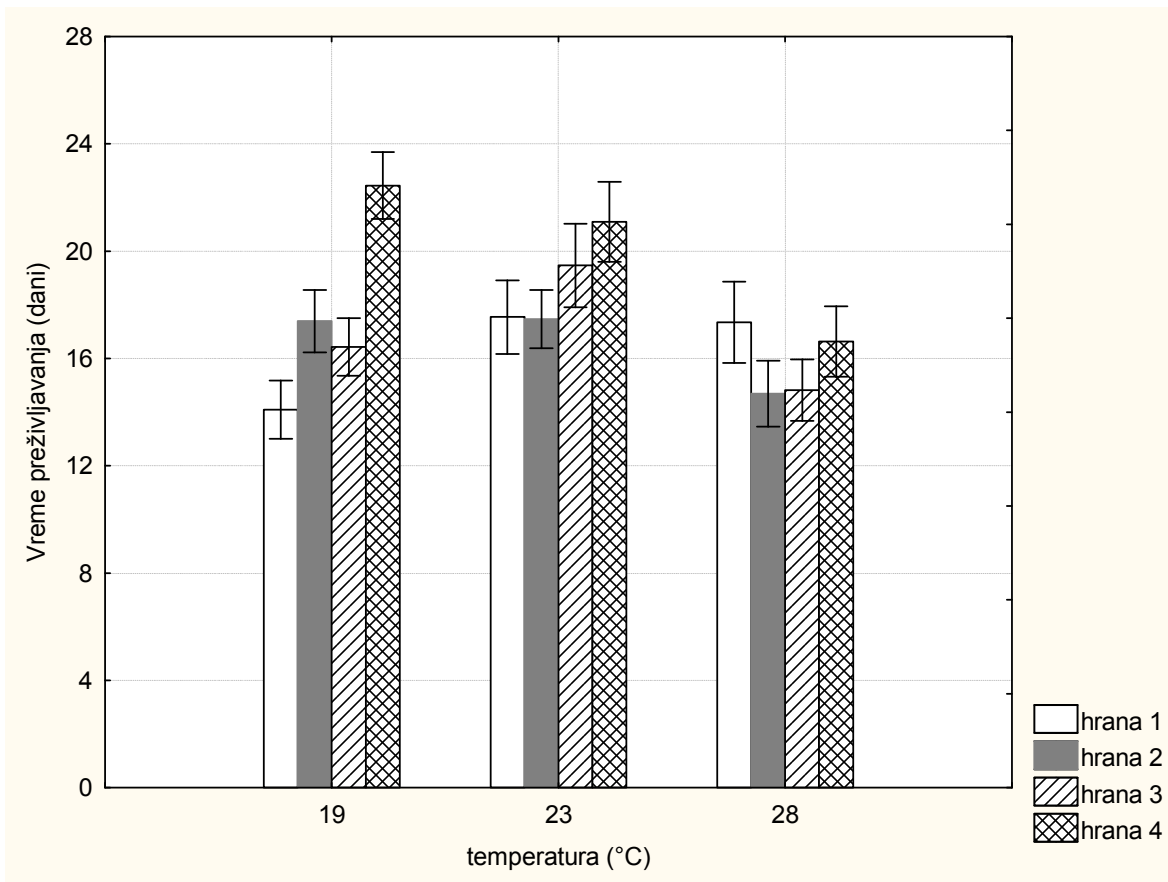
4.6.3. Uticaj hrane i temperature na broj presvlačenja larvi nakon prebacivanja na stresnu temperaturu 36°C

Uticaj prethodnih uslova gajenja na sposobnost larvi da se presvlače u uslovima stresne temperature 36°C prikazan je na **Slici 19**. Za procenu uticaja temperature i kvaliteta hrane na raspodelu larvi sa 0, 1 i 2 presvlačenja korišćen je G- test. Poređenje broja presvlačenja larvi na stresnoj temperaturi od 36°C ako su one do 3. dana IV stupnja bile gajene na 19°C je pokazalo najveći broj presvlačenja larvi koje su gajene na dijetama siromašnim ugljenim hidratima (hrane 2 i 4), a najmanji broj presvlačenja je uočen na dijeti koja ima najmanji odnos proteina i ugljenih hidrata (hrana 3). Na nutritivno najbogatijoj dijeti (hrana 1) larve su se presvukle manji broj puta u odnosu na dijete siromašne ugljenim hidratima (hrana 2: $G = 14.184$, $df = 2$, $P < 0.001$; hrana 4: $G = 9.227$, $df = 2$, $P < 0.001$), a veći broj presvlačenja je uočen u odnosu na larve gajene na hrani 3 ($G = 14.027$ $df = 2$, $P < 0.001$). U odnosu na ovu dijetu veći broj presvlačenja su imale i larve gajene na dijetama sa niskim sadržajem ugljenih hidrata (hrana 2: $G = 44.94$; $df=2$, $P < 0.0001$; hrana 4: $G = 35.689$; $df=2$, $P < 0.0001$). Prema tome, može se zaključiti da je

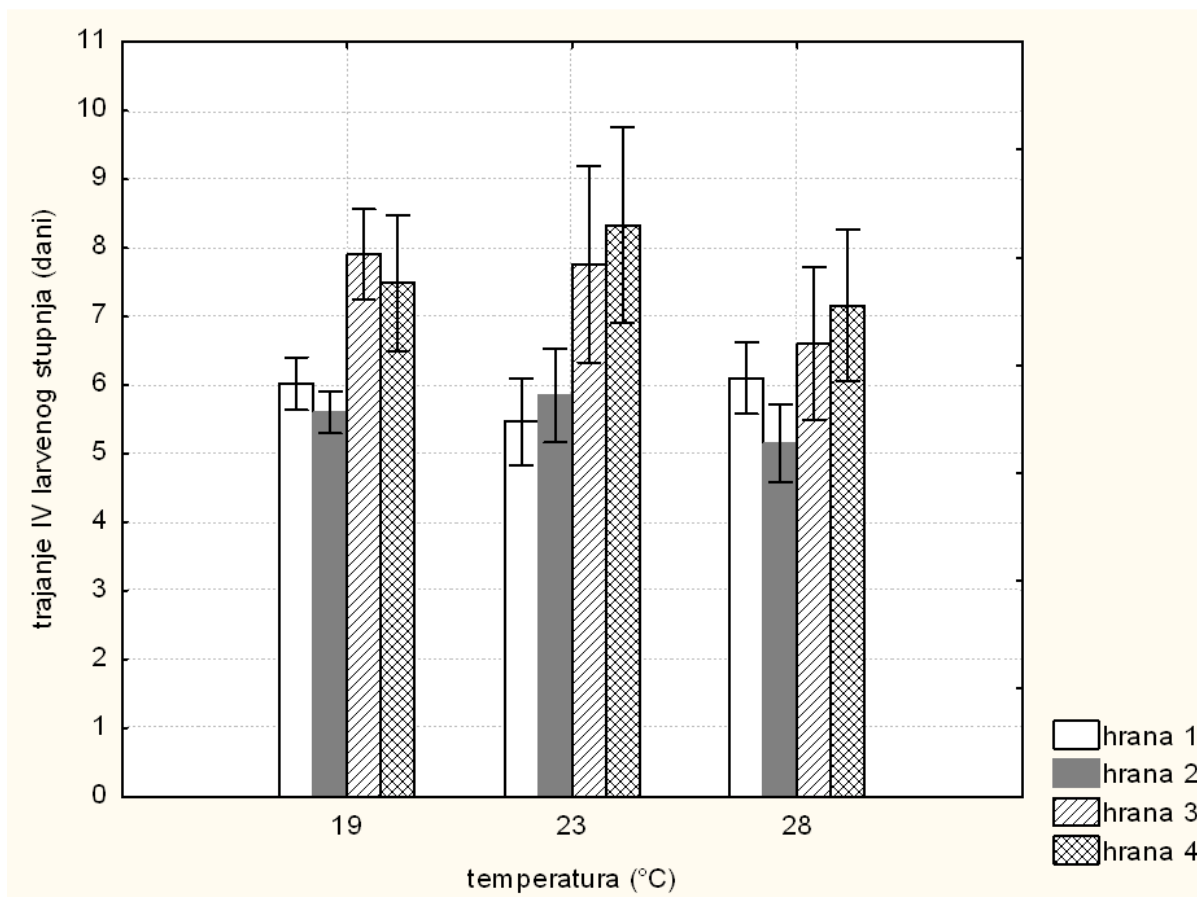
za larve gajene na 19°C, hrana 3 najmanje povoljna za razviće larvi u uslovima stresne povišene temperature 36°C

Negativan efekat hrane sa najmanjim odnosom proteini/ugljeni hidrati je pokazan i za larve koje su pre izlaganja stresnoj temperaturi gajene na temperaturama od 23°C i 28°C, odnosno larve gajene na ovoj dijeti su imale manji broj presvlačenja u odnosu na one gajene na dijetama sa visokim sadržajem proteina, odnosno hrani 1 (23°C: $G = 17.257$; $df = 2$, $P < 0.0001$; 28°C: $G = 20.712$; $df = 2$, $P < 0.0001$) i hrani 2 (23°C: $G = 23.296$; $df = 2$, $P < 0.0001$; 28°C: $G = 34.110$; $df = 2$, $P < 0.0001$), kao i nutritivno najsiromašnijoj dijeti (23°C: $G = 13.906$; $df = 2$, $P < 0.01$).

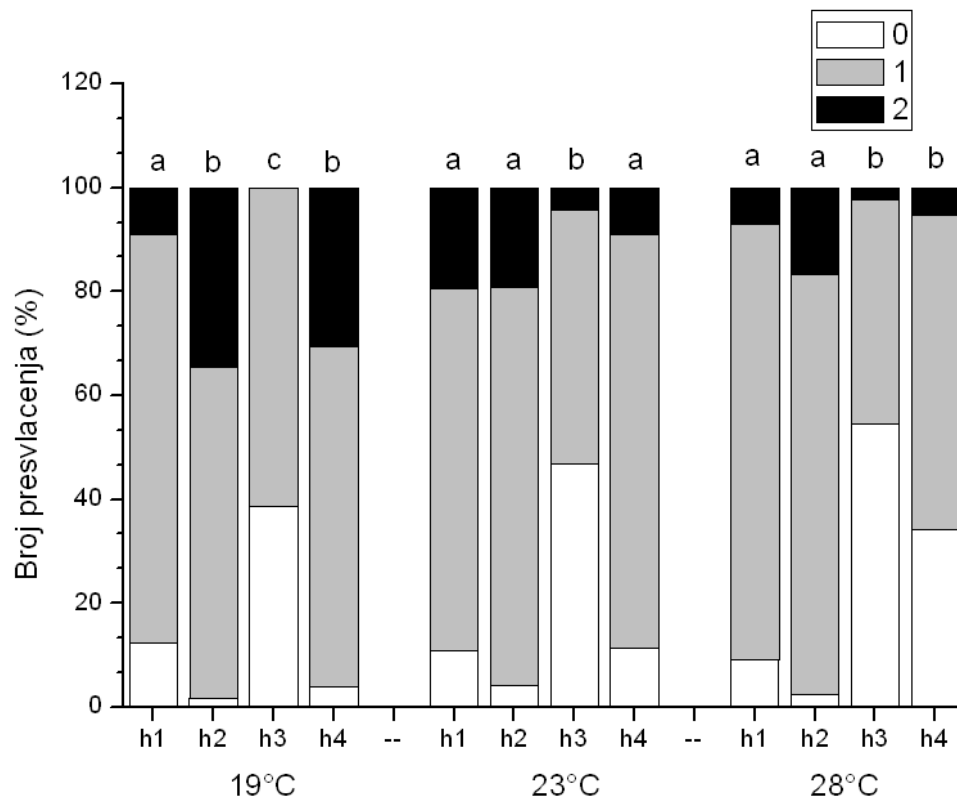
Temperatura utiče na broj presvlačenja samo na nutritivno najsiromašnijoj hrani i to tako što se sa porastom temperature povećava procenat larvi sa manjim brojem presvlačenja (19/23°C: $G = 7.595$; $df = 2$, $P < 0.05$; 19/28°C: $G = 19.68$; $df = 2$, $P < 0.0001$; 23/28 °C : $G = 6.076$; $df = 2$, $P < 0.05$) (**Slika 19**).



Slika 17. VREME PREŽIVLJAVANJA ($X \pm SE$) larvi gubara gajenih na različitim temperaturama i hranljivim supstratima nakon prebacivanja na stresnu temperaturu 36°C u IV larvenom stupnju (treći dan).



Slika 18. TRAJANJE IV LARVENOG STUPNJA ($X \pm SE$) larvi gubara gajenih na različitim temperaturama i hranljivim supstratima koje su prebačene na stresnu temperaturu 36°C.



Slika 19. BROJ PRESVLAČENJA izražen u procentima kod larvi gubara gajenih na različitim temperaturama i hranljivim supstratima nakon prebacivanja na stresnu temperaturu 36°C. U okviru svake temperature gajenja, odnos larvi sa 0, 1 i 2 presvlačenja obeležen različitim slovima (a, b, c) se značajno razlikuje između grupa larvi hranjenih na različitim dijetama.

Tabela 32. Dvofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima VREMENA PREŽIVLJAVANJA (VP) i TRAJANJA IV LARVENOG STUPNJA (T_{IV}) kod larvi gubara izloženih stresnoj temperaturi 36°C. Temperatura gajenja do trećeg dana IV larvenog stupnja (19, 23, 28) i hranljivi sastav dijetete (1, 2, 3, 4) su fiksirani faktori.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	p	Scheffe-ov test
VP	temperatura	0.518	2	0.259	18.5	0.0000	23 > 19 > 28
	hrana	0.746	3	0.249	17.7	0.0000	(1=2=3) < 4
	temperatura×hrana	0.691	6	0.115	8.2	0.0000	
	Greška	7.682	548	0.014			
TIV	temperatura	0.127	2	0.063	2.7	0.0669	
	hrana	1.311	3	0.437	18.7	0.0000	(1=2) < (3=4)
	temperatura×hrana	0.247	6	0.041	1.8	0.1046	
	Greška	10.360	444	0.023			

Tabela 33. Trofaktorska analiza varijanse na log-transformisanim vrednostima VREMENA PREŽIVLJAVANJA (VP) i TRAJANJA IV LARVENOG STUPNJA (T_{IV}) kod larvi gubara izloženih stresnoj temperaturi 36 °C. Temperatura gajenja do trećeg dana IV stupnja (19, 23, 28), sadržaj proteina (Pr) i sadržaj ugljenih hidrata (Ug) u hrani su fiksirani faktori. n – nizak sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani, v – visok sadržaj proteina ili ugljenih hidrata u hrani.

	Izvor variranja	SS	df	MS	F	p	Scheffe-ov test
VP	temperatura	0.518	2	0.259	18.5	0.0000	23 > 19 > 28
	Pr	0.342	1	0.342	24.4	0.0000	v < n
	Ug	0.267	1	0.267	19.1	0.0000	v < n
	temperatura ×Pr	0.244	2	0.122	8.7	0.0002	
	temperatura ×Ug	0.388	2	0.194	13.8	0.0000	
	Pr×Ug	0.168	1	0.168	12.0	0.0006	
	temperatura×Pr×Ug	0.051	2	0.026	1.8	0.1627	
	Greška	7.682	548	0.014			
T_{IV}	temperatura	0.127	2	0.063	2.7	0.0669	
	Pr	1.221	1	1.221	52.3	0.0000	v < n
	Ug	0.013	1	0.013	0.5	0.4590	
	temperatura ×Pr	0.052	2	0.026	1.1	0.3278	
	temperatura ×Ug	0.087	2	0.043	1.9	0.1573	
	Pr×Ug	0.023	1	0.023	1.0	0.3176	
	temperatura×Pr×Ug	0.090	2	0.045	1.9	0.1462	
	Greška	10.360	444	0.023			

DISKUSIJA

5.1. UTICAJ TEMPERATURE I KVALITETA HRANE NA KOMPONENTE ADAPTIVNE VREDNOSTI

Temperatura i kvalitet hrane su glavni faktori koji utiču na performansu fitofagnih insekata, delujući nezavisno ili u međusobnoj interakciji (Stamp, 1990; Lindroth *et al.*, 1997; Petersen *et al.*, 2000; Kingsolver *et al.*, 2006; Miller *et al.*, 2009; Lee & Roh, 2010). Promena temperature može uticati na osobine životne istorije, broj generacija godišnje, gustinu, veličinu i genetičku strukturu populacija, opseg biljaka domaćina, areal rasprostranjenja i kolonizaciju novih područja (Kocsis & Hufnagel, 2011). Kako je ustanovljeno, u odgovoru na promenu temperature organizmi mogu plastično reagovati kroz promenu trajanja razvića, brzine rasta, preadultnog preživljavanja, veličine tela i dužine života adulta (Kingsolver *et al.*, 2004a; McMillan *et al.*, 2005; Kingsolver & Huey, 2008; Stillwell *et al.*, 2010). Veliki broj istraživanja je pokazao brži rast i skraćenje trajanja razvića sa porastom temperature (Partridge *et al.*, 1994; Levesque *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2009). Na koji način ovakve promene, opisane kroz fenomen fenotipske plastičnosti, mogu uticati na pravce evolucije u populacijama insekata, predmet je istraživanja brojnih studija.

Uticaj temperature na komponente adaptivne vrednosti

Istraživanja uticaja temperature na performansu larvi gubara su retka (Maksimović, 1958; Karolewski *et al.*, 2007). Brzina rasta larvi gubara se povećava sa povećanjem temperature i dostiže plato na temperaturama između 28 °C i 32 °C, a donji temperaturni prag za razviće je 12°C (Pantuykhov, 1962). Gubar ne može da završi razviće na temperaturi od 36°C, a na temperaturi od 35°C počinje sinteza različitih klasa proteina temperaturnog stresa, Hsp (Yocum *et al.*, 1991). U kulturi

ćelija je pokazano da sinteza svih proteina kod gubara prestaje na temperaturama iznad 40°C (Evgen'ev *et al.*, 1987). Prema rezultatima ovog rada, preživljavanje larvi gubara do ulaska u IV larveni stupanj smanjeno je na temperaturi od 28°C (**Slika 1, Tabela 1**). Karolewski i sar. (2007) su pokazali da je preživljavanje larvi gubara hranjenih hrastovim lišćem na temperaturama 20°C i 25°C skoro dvostruko veće u odnosu na preživljavanje na 15°C, kao i da povećanje temperature skraćuje trajanje razvića. Prema Maksimović (1958), kraće trajanje larvenog razvića, manja masa lutke i smanjeni fekunditet karakterističan je za gubare gajene na konstantnoj temperaturi od 28°C u odnosu na temperaturu gajenja od 24°C. S druge strane, Lindroth i sar. (1997) nisu pokazali značajan uticaj temperaturnog režima, kao ni značajnu interakciju temperature i sadržaja azota, na preživljavanje larvi gubara i masu lutke, ali je promena temperaturnog režima (19:16°C na 25:22°C) dovela do značajnog skraćivanja ukupnog trajanja razvića i povećanja relativne brzine rasta (RGR) larvi tokom IV stupnja. Dodatno, ovi istraživači su ustanovili i da je efekat temperature značajan za promenu nutritivnih indeksa, relativne brzine konzumacije (RCR), efikasnost konverzije unete hrane (ECI), relativnu brzinu konzumacije, akumulacije i efikasnosti korišćenja azota (RNAR i RNCR i NUE) (Lindroth *et al.*, 1997). Takođe, sa porastom temperature na hrani sa visokim sadržajem azota relativna brzina rasta i efikasnost konverzije unete i svačene hrane (ECI i ECD) se značajno povećavaju, dok je najveća efikasnost asimilacije hrane (AD) ustanovljena na optimalnoj temperaturi i hrani sa visokim sadržajem azota, što ukazuje na značajne inerakcije ova dva faktora na individualnu performansu gubara (Lindroth *et al.*, 1997). Williams i sar. (2003) su takođe pokazali da se trajanje razvića gubara skraćuje sa povećanjem temperature. Više temperature i bolji kvalitet lišća biljke domaćina kod *Ormiscodes amphimone* (Lepidoptera) imaju pozitivan efekat na performansu, povećavaju relativnu brzinu rasta i brzinu konzumacije hrane, a skraćuju trajanje razvića (Paritsis & Veblen, 2010). U eksperimentu na *Manduca sexta* je pokazano da efekat temperature na masu, trajanje razvića, brzinu rasta i preživljavanje zavisi od stupnja u razviću i da se značajno razlikuje između ranih i kasnih larvenih stupnjeva. Dok se kod larvi I-

III stupnja razviće skraćuje sa porastom temperature, trajanje IV i V stupnja se produžava sa porastom temperature i dolazi do značajnog povećanja mortaliteta (Petersen *et al.*, 2000). Visoka temperatura i povećana brzina rasta dovode do smanjenog preživljavanja *Spodoptera exigua*, a to je naročito izraženo na ekstremno neizbalansiranim dijetama (Lee & Roh, 2010). Smanjeno preživljavanje na visokim temperaturama je pokazano i kod dugih vrsta insekata (Reynolds & Nottingham, 1985; Lee & Roh, 2010), ali su ustanovljeni i drugačiji efekti temperature, kao što je povećano preadultno preživljavanje i povećanje veličine tela *Chrysomia megacephala* (Diptera) na temperaturi 30°C u odnosu na 20°C (Hu *et al.*, 2010). Načelno, različiti rezultati dobijeni u eksperimentima na različitim vrstama insekata ukazuju da vrste imaju različite temperaturne optimume, kao i da je za razmatranje efekata sredinskih faktora na performansu jedinki veoma značajno poznavanje njihovog geografskog porekla i lokalne adaptiranosti populacija (Angilletta, 2009; Stillwell *et al.*, 2010).

Najveća masa larvi gubara u ovom radu ustanovljena je na optimalnoj temperaturi gajenja (**Slika 5; Tabela 4 i 5**). Sličan efekat temperature je pokazan i kod larvi *Maduca sexta*, kod kojih se masa smanjuje sa porastom temperature (Petersen *et al.*, 2000). Smanjenje mase na višim temperaturama kod insekata može biti posledica povećanih energetske potrebe povezanih sa odbrambenim i kompenzatornim odgovorima (Hochachka & Somero, 2002; Malmendal *et al.*, 2006; Chown & Terblanche, 2007), kao i smanjene efikasnosti varenja i asimilacije hrane na višim temperaturama (Yang & Joern, 1994a), smanjene efikasnosti konverzije unete/svarene hrane u telesnu masu (Miller *et al.*, 2009) i povećanog unosa sekundarnih biljnih metabolita zbog povećanog unosa hrane (Stamp & Horwath, 1992). Na primer, u eksperimentu na *Melanopus differentialis* Yang i Joern (1994) su ustanovili smanjenu efikasnost varenja na visokim temperaturama koja, u kombinaciji sa niskim sadržajem azota u hrani, skraćuje vreme prolaska hrane kroz digestivni trakt i dovodi do značajnog pada mase. Izlaganje visokim temperaturama tokom razvića ima za posledicu i smanjenje veličine adulta (Atkinson, 1994, Atkinson & Sibly, 1997; Kingsolver & Huey, 2008). Nasuprot ovim

rezultatima, Miller i sar. (2009) su pokazali da je porast mase *Locusta migratoria* na veštačkoj dijeti tokom V stupnja veći na višim u odnosu na niže temperature u uslovima kada količina hrane nije ograničavajući faktor.

Značajni efekti temperature na trajanje razvića i relativnu brzinu rasta larvi gubara (RGR) ustanovljeni u ovom radu, u skladu su sa podacima koje navode drugi autori (Kingsolver & Woods, 1997, 1998; Lindroth *et al.*, 1997; Levesque *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2009). Razviće larvi gubara je najkraće, a brzina rasta najveća na temperaturi od 28°C i na hrani bogatoj proteinima, dok količina ugljenih hidrata u ranim larvenim stupnjevima ne utiče značajno na trajanje razvića (**Tabela 2 i 3; Slike 2, 3 i 4**). Slično rezultatima nekih studija (Lindroth *et al.*, 1997; Stillwell *et al.*, 2007; Paritsis & Veblen, 2010) ni u ovom radu nisu ustanovljene značajne interakcije između temperature i kvaliteta hrane na trajanje razvića. tj. temperatura, sadržaj proteina i sadržaj ugljenih hidrata u dijeti utiču na trajanje razvića nezavisno (**Tabela 3**). Međutim, iako statistički neznačajni, efekti hrane sa niskim sadržajem ugljenih hidrata pokazuju trend ka skraćivanju trajanja razvića larvi. Takođe, efekat povećanja relativne brzine rasta na proteinski bogatoj dijeti je izraženiji ukoliko je temperatura viša (**Tabela 5, Slika 6**). Relativna brzina rasta pokazuje različitu osetljivost na delovanje temperature u ranim i kasnim larvenim stupnjevima (Petersen *et al.*, 2000). Levesque i sar. (2002) su pokazali da je brzina rasta *Malacosoma disstria* hranjenih lišćem *Acer saccharum* na višim temperaturama povezana sa većim unosom i efikasnijim korišćenjem hrane. U osnovi povećane brzine rasta insekata na višim temperaturama nalazi se povećana konzumacija hrane, odnosno povećanje količine i brzine unosa hrane sa porastom temperature (Stamp, 1990; Yang & Joern, 1994; Kingsolver & Woods, 1997; Petersen *et al.*, 2000; Levesque *et al.*, 2002; Miller *et al.*, 2009, Lee & Roh, 2010). Značajna interakcija temperature i biljke domaćina je pokazana za brzinu rasta *Callosobruchus maculatus* kod koga je uticaj povoljnog domaćina na povećanje i nepovoljnog domaćina na smanjenje brzine rasta veći na višim u odnosu na niže temperature (Stillwell *et al.*, 2007). Interakcija temperature i sadržaja proteina u dijeti nije značajna za promenu mase i relativne brzine rasta larvi *Manduca sexta*,

ali ima značajne efekte na trajanje razvića, i to tako što visok sadržaj proteina u veštačkoj dijeti značajno skraćuje trajanje ranih larvenih stupnjeva na nižim temperaturama (Petersen *et al.*, 2000). U eksperimentu na *Blatella germanica* je pokazano kraće trajanje larvenih stupnjeva kada je balans hranljivih materija bliži optimalnom i duže trajanje na dijetama u kojima je prisutan nutritivni disbalans (Raubemheimer & Jones, 2006).

Najveća brzina rasta larvi gubara u našem eksperimentu ustanovljena je na temperaturi od 28°C (**Slika 6; Tabela 4 i 5**). Istovremeno, na istoj temperaturi detektovano je najmanje preživljavanje (**Slika 1; Tabela 1**). Slični rezultati su dobijeni na *Spodoptera exigua*, kod koga je najveća brzina rasta na temperaturama između 30-34°C, a preživljavanje najveće na temperaturama 18-26°C (Lee i Roh, 2010). Optimalne temperature na kojima su preživljavanje i brzina rasta najveći su različite i mogu biti posledica uzajamnih ograničenja između ovih osobina na datoj temperaturi (Angilleta *et al.*, 2003). Na primer, visoka brzina rasta može biti povezana sa visokim nivoom razvojne nestabilnosti usled smanjenog „kvaliteta kontrole“ tokom razvića (De Block *et al.*, 2008), što umanjuje verovatnoću preživljavanja jedinki. Dodatno, ubrzavanje razvića može imati značajnu fiziološku cenu povezanu sa velikim energetske ograničenjima (Stockhoff, 1991; Gotthard, 2001; Stoks *et al.*, 2006). Fiziološka cena je veća ako se organizam razvija u nutritivno siromašnoj sredini, u fazama razvića kada rastu energetske potrebe usled ulaganja u reprodukciju (Stockhoff, 1991; Gotthard *et al.*, 1994) i/ili na višim temperaturama na kojim je intenzitet metabolizma veći (Clarke & Fraser 2004; Irlich *et al.*, 2009). S druge strane, veća brzina rasta na višim temperaturama može predstavljati i adaptivnu prednost budući da skraćuje vreme izloženosti predatorima i omogućava veći broj generacija u datom periodu vremena (Berney & Denno, 1997; Nylin & Gotthard, 1998).

Fenotipska plastičnost brzine rasta u odgovoru na promene različitih abiotičkih i biotičkih faktora je prisutna kod većine organizama (Stamp & Yang, 1996; Davidowitz & Nijhout 2004; Diamond & Kingsolver, 2010; Stillwell *et al.*,

2007), ali kod ektotermnih organizama temperatura predstavlja jedan od glavnih uzroka promene brzine rasta (Huey & Kingsolver, 1989; Kingsolver *et al.*, 2004 a,b; Van Doorslaer & Stoks, 2005). Temperaturna osetljivost brzine rasta *Pieris rapae* zavisi od kvaliteta hrane i veća je kod larvi hranjenih lišćem *Brassica oleracea* u odnosu na veštačku dijetu (Kingsolver *et al.*, 2006). Brzina rasta zavisi od interakcija temperature i biljnih alelohemikalija (Stamp & Horwath 1992; Stamp *et al.*, 1994; Stamp & Casey, 1996) i adaptiranosti na nepovoljne biljke domačine (Hilbeck & Kenedy, 1998; Diamond & Kingsolver, 2010, 2012).

Uticaj kvaliteta hrane na komponente adaptivne vrednosti

Kao što postoji optimalna temperatura za većinu osobina ispod i iznad koje dolazi do smanjenja adaptivne vrednosti (Angilletta, 2006), tako postoji i optimalan balans hranljivih materija koji omogućava maksimalno preživljavanje i reprodukciju (Raubenheimer & Simpson, 1997; Lee *et al.*, 2002, 2006a; Awmack & Leather, 2002; Simpson *et al.*, 2004; Raubenheimer & Simpson, 2004; Behmer, 2009) a odstupanje od optimalnog balansa dovodi do smanjenja adaptivne vrednosti (Raubenheimer *et al.*, 2005; Boersma & Elser, 2006; Lee *et al.*, 2006b; Merx-Jacques *et al.*, 2008). Azot je od centralne važnosti za performansu fitofagnih insekata (Mattson, 1980). Veći sadržaj azota u hrani dovodi do kraćeg trajanja razvića, većeg preživljavanja, povećanja težine, većeg fekunditeta, veće rezistentnosti na patogene, ali ako nivo azota pređe određeni *species*-specifični prag može predstavljati nutritivni stres (Zhang *et al.*, 1991; Stockoff, 1993a; Boersma & Elser, 2006; Zehnder & Hunter, 2009) i imati negativne posledice kroz smanjeno preživljavanje (Despland & Noseworthy, 2006), smanjenu masu lutke (Lee *et al.*, 2002) i smanjenje brzine rasta (Stockhoff, 1993; Noseworthy & Despland, 2006). Uticaj sadržaja ugljenih hidrata na performansu insekata je od manjeg značaja i on može zavistiti od interakcija sa proteinima (Joern & Behmer, 1997).

Slično rezultatima na drugim vrstama lepidoptera (Broadwey & Duffey, 1986; Karowe & Martin, 1989; Woods, 1999; Lee, 2007; Lee *et al.*, 2008) naši rezultati pokazuju da nepovoljna temperatura i niska koncentracija azota smanjuju performansu larvi gubara. Proteini i ugljeni hidrati imaju različite fiziološke uloge, pa promena njihovog relativnog odnosa, kao i interakcija sa drugim abiotičkim (Raubenheimer, 1992; Hemming & Lindroth, 2000; Simpson & Raubenheimer, 2001; Miller *et al.*, 2009) i biotičkim faktorima (Thompson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006) imaju različite posledice na performansu insekata.

Novija istraživanja ukazuju na značaj nutritivnog balansa na performansu fitofagnih insekata (Raubenheimer & Simpson, 2003; Lee *et al.*, 2004; Simpson *et al.*, 2004; Raubenheimer & Jones, 2006; Lee, 2007; Behmer, 2009). Višak ugljenih hidrata u odnosu na proteine u biljkama domaćinima i/ili u veštačkoj dijeti dovodi do povećanog mortaliteta (Raubenheimer *et al.*, 2005; Merckx-Jacques *et al.*, 2008). Kod nekih vrsta insekata visok sadržaj ugljenih hidrata može povećati preživljavanje (Stockoff, 1991; Despland & Noseworthy, 2006; Noseworthy & Despland, 2006), što je obično povezano sa produženim trajanjem razvića i smanjenom brzinom rasta larvi (Lee *et al.*, 2002; Despland & Noseworthy, 2006; Noseworthy & Despland 2006; Lee, 2007; Colasurdo *et al.*, 2007, 2009).

Smanjenje sadržaja proteina u hrani dovodi do produžavanja trajanja razvića i do smanjenja mase lutke gubara (Rossiter, 1987; Stockoff, 1993 a, b) dok povećanje sadržaja proteina povećava preživljavanje, skraćuje trajanje razvića i povećava brzinu rasta (Lindroth *et al.*, 1997; Stockoff, 1992; Hemming & Lindroth, 2000). U eksperimentu u kojem su larve gubara izlagane različitim temperaturama, povećanje koncentracije azota u dijeti povećava preživljavanje i masu lutke, skraćuje ukupno trajanje larvenog razvića, a kod larvi IV stupnja ubrzava rast (RGR), smanjuje konzumaciju (RCR), povećava svarljivost hrane (AD), efikasnost konverzije unete hrane u biomasu (ECI), relativnu brzinu akumulacije (RNAR) i konzumacije azota (RNCR) (Lindroth *et al.*, 1997). U našem eksperimentu kvalitet hrane, odnosno sadržaj proteina i ugljenih hidrata u dijeti, nije uticao na

preživljavanje, za razliku od podataka Stockoff-a (1991) i Lindroth-a i sar. (1997). U eksperimentu sa variranjem sadržaja proteina i skroba u veštačkoj dijeti došlo se do zaključka da skrob ne utiče značajno na preživljavanje, količinu proteina, ugljenih hidrata i lipida u larvama gubara, kao ni na njihovu rezistentnost na gladovanje, a da smanjena količina proteina u dijeti povećava preživljavanje i povećava sadržaj ugljenih hidrata što omogućava veću otpornost na gladovanje (Stockoff, 1991). Mada je preživljavanje u uslovima gladovanja bilo manje na dijeti sa visokim sadržajem proteina, brzina rasta i masa lutke su bile veće, ukazujući na uzajamna ograničenja između brzine rasta i rezistentnosti na stres (Stockoff, 1991). Mlađi larveni stupnjevi su osetljiviji na nedostatak proteina u odnosu na V i VI strupanj (Stockhoff, 1992). Takođe, ženke su u odnosu na mužjake pokazivale veću osetljivost na nedostatak proteina u ishrani (Lindroth *et al.*, 1997) verovatno zbog usmeravanja resursa u sintezu vitelogenina tokom poslednjih larvenih stupnjeva.

Preživljavanje i masa lutke *Spodoptera littoralis* se (još više) smanjuje sa povećanjem količine zeina (protein niskog kvaliteta) u dijeti, ukoliko balans proteina i ugljenih hidrata nije optimalan, odnosno ukoliko je sadržaj proteina manji u odnosu na sadržaj ugljenih hidrata (Lee, 2007). Preživljavanje skakavca *Ageneotettix deorum* je najmanje ukoliko je sadržaj obe komponente hrane nizak, a najveće ako je sadržaj ugljenih hidrata visok a proteina nizak (Joern & Behmer, 1997). Pokazano je da su larve lepidoptera i ortoptera osetljivije na nutritivni disbalans proteina u odnosu na ugljene hidrate u starijim larvenim stupnjevima (Thompson *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2002; Raubenheimer & Simpson, 2003). Autoselekcija hrane (Waldbauer & Friedman, 1991, Stockoff, 1993; Fielding & Defoliart, 2008; Merks-Jacques *et al.*, 2008), promena vrste hrane (engl. *switching*) (Stockoff, 1992; Raubenheimer & Simpson, 2003), kompenzatorno povećanje unosa nutritivno siromašne hrane (Slansky & Scriber, 1985; Simpson & Simpson, 1990; Yang & Yoern, 1994b; Fieldig & Defoliart, 2008), duže vreme prolaska hrane kroz digestivni trakt (Yang & Yoern, 1994a), povećanje apsorptivne površine digestivnog trakta (Yang & Yoern, 1994c; Raubenheimer & Bassil, 2007), kao i

plastični odgovori na nivou digestivnog trakta (Clissold *et al.*, 2010; Sorensen *et al.*, 2010) omogućavaju prevazilaženje negativnih efekata nutritivnog stresa.

U ovom radu je pokazano da sadržaj ugljenih hidrata ne utiče značajno na masu larvi četvrtog stupnja, ali da plastičnost mase zavisi od uzajamnih interakcija količine proteina i ugljenih hidrata (**Tabela 5**). Smanjenje je mase veće na hrani sa smanjenim sadržajem ugljenih hidrata ukoliko je i sadržaj proteina nizak, kao i da je masa (marginalno) veća na hrani koja pored većeg sadržaja proteina ima manju količinu ugljenih hidrata (hrana sa optimalnim balansom ovih nutrijenata). Smanjenje mase sa povećanjem sadržaja ugljenih hidrata može biti posledica homeostatske regulacije unosa hrane koja zavisi od koncentracije trehaloze u hemolimfi, koja je povećana na dijetama sa visokim sadržajem ugljenih hidrata, pa larve na takvim dijetama unose manju količinu hrane (Thompson, 1998; Thompson *et al.*, 2003). Ukoliko je odnos proteina i ugljenih hidrata u hrani balansiran, koncentracija trehaloze u hemolimfi je niža, pa je unos hrane veći (Thompson & Redak, 2000). U eksperimentu na larvama *Spodoptera exigua* je pokazano da na temperaturama nižim od optimalne, balansiranost i kvalitet hrane ne utiču značajno na promenu mase, dok na temperaturama višim od optimalne dolazi do značajnog smanjenja mase na ekstremno neizbalansiranim dijetama u odnosu na dijetu u kojima je disbalans (proteina u odnosu na ugljene hidrate) manji (Lee & Roh, 2010).

Uticao kvaliteta hrane na brzinu rasta gubara pokazan u našem eksperimentu (**Slika 6, Tabela 4**) u skladu je sa nalazima drugih autora koji su ustanovili da je brzina rasta veća na proteinski bogatijim dijetama (Stockoff, 1991, 1993b; Lindroth *et al.*, 1990, 1997; Hemming & Lindroth, 2000). Pored toga, relativna brzina rasta je osetljivija na nizak sadržaj proteina u hrani ako se larve gaje na višim temperaturama (**Slika 6, Tabela 5**). U ovom radu je takođe ustanovljeno da, pored pozitivnog uticaja sadržaja proteina, povećana koncentracija ugljenih hidrata u hrani dovodi do smanjenja relativne brzine rasta larvi gubara (**Tabela 5**). U eksperimentu na *Hylobius transversovittatus*

(Coleoptera) takođe je pokazano da se brzina rasta povećava sa smanjenjem količine ugljenih hidrata (Tomić-Carruthers, 2007). Opseg do koga brzina rasta može da se povećava sa porastom temperature je ograničen kada je u hrani prisutan nutritivni disbalans, odnosno kada je količina proteina u odnosu na ugljene hidrate u dijeti suviše visoka ili suviše niska što je ustanovljeno kod larvi *Spodoptera exigua* (Lee & Roh, 2010). Najveća brzina rasta kod ove vrste na svim ispitivanim temperaturama 18, 24 i 36°C, ustanovljena je na dijetama sa „umerenim“ (najbliže optimalnom) odnosom proteina i ugljenih hidrata, dok su najveće razlike u brzini rasta između različitih temperatura pokazane na „umerenim“ dijetama, u čemu se u stvari i ogledaju značajne interakcije ovih faktora na promenu relativne brzine rasta (Lee & Roh, 2010). Kod larvi *Spodoptera littoralis* na visokoproteinskim dijetama, koje omogućavaju veliku brzinu rasta i kraće trajanje razvića, neoptimalno povećanje količine proteina dovodi do maksimalnog povećanja brzine rasta po „cenu“ neoptimalnog skraćivanja trajanja razvića (Simpson *et al.*, 2004). Generalno, niska koncentracija proteina u dijeti vodi smanjenoj brzini rasta (Woods, 1999), a osnovni bihevioralni mehanizam putem koga larve na proteinski siromašnim dijetama održavaju brzinu rasta, podrazumeva kompenzatorno povećanje unosa hrane (Lindroth *et al.*, 1990, 1991, 1997; Woods, 1999) pre nego povećavanje efikasnosti korišćenja hrane ili povećanje apsorpcije amino kiselina (Kingsolver & Woods, 1997).

Uzroci smanjene brzine rasta mogu biti posledica smanjene konzumacije na biljkama domaćinima i/ili veštačkim dijetama kod kojih je prisutan nutritivni disbalans (Augner, 1995; Berenbaum, 1995; Lee *et al.*, 2004; Despland & Noseworthy, 2006; Lee, 2007; Fielding & Defoliart, 2008). Takođe, nizak nivo jednog nutrijenta može ograničiti efikasnost korišćenja drugog (Raubenheimer, 1992), dok višak nutrijenta može delovati kao antimetabolit (Reinecke, 1985) ili fagoinhibitor (Sivapalan & Gnanapragam, 1979). Hrana sa visokim sadržajem hranljivih materija ima manji fagostimulacioni efekat u odnosu na hranu sa umerenim sadržajem (Simpson & Raubenheimer, 1996). Neoptimalan balans

proteina i ugljenih hidrata u hrani može povećati osetljivost insekata na delovanje biljnih alelohemikalija (Simpson & Raubenheimer, 2001).

Uzroci smanjene brzine rasta, kao posledice unosa viška ugljenih hidrata, mogu podrazumevati i visoku metaboličku cenu, jer se višak ugljenih hidrata deponuje u obliku glikogena i/ili lipida u masnom telu (Simpson *et al.*, 2004; Raubenheimer *et al.*, 2005), usled čega dolazi do povećanja respiracije (Zanotto *et al.*, 1997), povećanog stvaranja toplote (Trier & Mattson, 2003), korišćenja ugljenih hidrata za sintezu amino kiselina (Thompson *et al.*, 2003), odnosno dolazi do usmeravanja energije u ove procese ostavljajući manje dostupne metaboličke energije za procese rasta. „Konstitutivno“ stvaranje toplote je veće ukoliko je sadržaj proteina u dijeti veći od količine ugljenih hidrata i lipida (Westerterp-Plantenga *et al.*, 1999), dok na dijetama sa viškom ugljenih hidrata i manjkom proteina, stvaranje toplote zavisi od temperature (Zanotto *et al.*, 1997) i predstavlja regulatorni odgovor koji omogućava da se brzina rasta i sadržaj proteina, lipida i ugljenih hidrata u organizmu održe uprkos disbalansu u dijeti (Trier & Mattson, 2003).

Može se zaključiti da je brzina rasta larvi gubara u našem eksperimentu plastična u odnosu na variranje temperature, sadržaja proteina i sadržaja ugljenih hidrata u dijeti premda između ova dva ekološka faktora nema značajnih interakcija.

5.2. PROMENE KVANTITATIVNO-GENETIČKIH PARAMETARA U NUTRITIVNO I TEMPERATURNO HETEROGENIM SREDINAMA

Postoje različite hipoteze koje se odnose na delovanje stresnih faktora životne sredine na ekspresiju genetičke varijabilnosti (Hoffmann & Parsons, 1991; Charmantier & Garant, 2005). Heritabilnost u širem smislu, obuhvata pored udela aditivne genetičke varijanse (aditivnih efekta gena, dominantnosti i epistatičkih interakcija između gena), epigenetičke („materinski efekti“) i ne-genetičke, odnosno sredinske uticaje u ukupnom fenotipskom variranju osobine.

Ekspresija genetičke varijabilnosti se može povećati u novim sredinama zbog ekspresije novih gena (Holloway *et al.*, 1990; Pigliucci, 1995), usled direktnih efekata stresora na povećanje stepena mutacija i rekombinacija (Hoffmann & Parsons, 1991), nagomilavanja štetnih mutacija čija ekspresija zavisi od sredine (Kawecki *et al.*, 1997) ili „narušavanja“ postojećih genetičkih korelacija u novim sredinama (Guntrip *et al.*, 1997; Sgro & Hoffmann, 2004). Očekivano je da laboratorijske populacije, u poređenju sa populacijama u prirodi, imaju veću heritabilnost zbog manje sredinske varijanse (Risk a *et al.*, 1989; Weigensberg & Roff 1996; Geber & Griffen, 2003). Tako je, kod laboratorijskih populacija *Drosophila* pokazan porast heritabilnosti sa povećanjem nivoa stresa zbog povećanja aditivne genetičke varijanse (Hoffmann, 2000). Kako neke studije navode, stresni uslovi mogu uzrokovati povećanje i genetičke i sredinske varijanse pri čemu se sama procenjena heritabilnost ne mora menjati (Blanckenhorn, 2002), ili, u drugim slučajevima, heritabilnost se neće značajno menjati i pored variranja sredinskih faktora (Charmantier & Garant, 2005). Generalno govoreći, stresni uslovi životne sredine mogu povećati ili smanjiti sredinsku i/ili genetičku varijansu, ili rezultirati niskim genetičkim korelacijama između sredina i zbog toga smanjiti heritabilnost (Hoffmann & Merilä, 1999).

Istraživanja na gubaru su pokazala značajnu ekspresiju genetičke varijabilnosti za različite osobine adaptivne vrednosti u nepovoljnim uslovima životne sredine (Rossiter, 1987; Lazarević *et al.*, 1998, 2002, 2008; Lazarević, 2000; Vlahović,

2009; Mrdaković, 2010; Mrdaković *et al.*, 2011). Značajan nivo genetičke varijabilnosti performanse je pokazan i kod drugih insekata na različitim temperaturama (Brakefield & Kesbeke, 1997; Guntrip *et al.*, 1997; de Jong & Imasheva, 2001; Bublly & Loeschcke, 2001; Kingsolver *et al.*, 2004; Bentz *et al.*, 2011; Guney *et al.*, 2011), na različitim biljkama domaćinima (Kawecki, 1995; Ueno *et al.*, 2001, 2003; Subramanian & Mohankumar, 2006) i različitom kvalitetu hrane (Grill *et al.*, 1997; Bublly *et al.*, 2000b, 2001; Lee *et al.*, 2008, Valtonen *et al.*, 2011; Lewis *et al.*, 2012).

Rezultati u ovom radu pokazali su da heritabilnost za trajanje razvića ima visoke i srednje vrednosti, izuzimajući heritabilnost na temperaturama 23 i 28°C na hrani sa niskim sadržajem proteina, koja nije značajno različite od nule (**Tabela 7, 8**). Takođe je pokazano odsustvo statistički značajnih razlika heritabilnosti trajanja razvića između različitih uslova gajenja. Guntrip i sar. (1997) su na *Callosobruchus maculatus* pokazali da je aditivna genetička varijansa i heritabilnost u užem smislu za trajanje razvića i veličinu tela manja na 30°C u odnosu na 25°C. Sgro & Hoffmann (1998) su pokazali da je genetička varijabilnost trajanja razvića *Drosophila melanogaster* značajno niža na 14°C u odnosu na 24°C. Povećanje temperature dovodi do povećanja genetičke varijabilnosti i heritabilnosti u užem smislu za veličinu tela kod *Culex quinquefasciatus* (Gunay *et al.*, 2011). Većina podataka na laboratorijskim populacijama *Drosophila* pokazuje da ekstremne temperature dovode do povećanja heritabilnosti (Imasheva *et al.*, 1998, 2000; Bublly & Loeschcke, 2002), dok na umerenim temperaturama efekti nisu značajni (Gebhardt & Staerns, 1988; David, 1994; Baker & Krebs, 1995). Prosek heritabilnosti u širem smislu za tri ispitivane osobine, trajanje larvenog i lutkinog razvića i masu lutke, kod mužjaka i ženki gubara poreklom iz hrastove i bagremove šume je veći na novom domaćinu nego na ancestralnom (Lazarević *et al.*, 2002). Poređenje populacija gubara u različitim fazama populacionog rasta je pokazalo da je heritabilnost osobina trajanja razvića, trajanje razvića larve i lutke, ukupno preadultno trajanje razvića i dužina života adulta, veća na srednjoj nego niskoj

gustini populacije, što je posledica povećane genetičke varijanse (Lazarević *et al.*, 2008).

Temperatura ima značajan uticaj na heritabilnost mase larvi. Pokazane su niske i srednje vrednosti heritabilnosti mase, kao i značajne razlike između tremana (**Tabela 9**). Porast temperature značajno smanjuje heritabilnost mase ako je u hrani nizak sadržaj jednog ili oba nutrijenta (**Tabela 9**), dok je na optimalnoj temperaturi gajenja detektovano značajno povećanje heritabilnosti za masu larvi jedino na nutritivno najsiromašnijoj hrani. Uzimajući u obzir rezultate ovog rada, kao i prethodne studije na gubaru (Lazarević *et al.*, 2002; Lazarević *et al.*, 2008), može se pretpostaviti da su povišene vrednosti heritabilnosti posledica povećanja genetičke varijanse. Povišena temperatura, zajedno sa niskim kvalitetom resursa, predstavlja stresnu sredinu za gubara koja uslovljava promenu heritabilnosti. Niska genetička varijabilnost i visoka adaptivna vrednost su karakteristike populacija u životnim sredinama na koje su organizmi adaptirani, dok se u novim i/ili stresnim sredinama adaptivna vrednost smanjuje, a genetička varijabilnost može rasti (Zhivotovsky *et al.*, 1996, 1997; ali videti i prethodno navedene studije u kojima heritabilnost opada u stresnim uslovima).

Prethodna istraživanja na gubaru nisu pokazala značajne promene heritabilnosti mase lutke u odgovoru na nizak sadržaj proteina u veštačkoj dijeti (Rossiter, 1987), nepovoljnom domaćinu (Lazarević *et al.*, 1998, 2002) ili povećanoj gustini gajenja (Lazarević *et al.*, 2008). Adaptacija gubara, tokom 50 generacija, na nepovoljnog domaćina (bagrem) koga karakteriše nizak sadržaj proteina i visok sadržaj alelohemikalija, dovela je do smanjenja genetičke varijabilnosti mase larvi V stupnja na veštačkoj dijeti i povećanja fenotipske plastičnosti u odgovoru na prisustvo taninske kiseline u dijeti (Mrdaković, 2010). Poređenjem heritabilnosti mase larvi gubara V stupnja iz hrastove i bagremove populacije pokazane su niže vrednosti heritabilnosti mase kod gubara poreklom iz bagremove populacije nezavisno od prisustva stresora, taninske kiseline, u veštačkoj dijeti što ukazuje na činjenicu da adaptacija na nepovoljnu ishranu

putem delovanja selekcije, smanjuje heritabilnost kod gubara (Mrdaković *et al.*, 2011). Značajne razlike heritabilnosti između sredina mogu olakšati evoluciju fenotipske plastičnosti iako nema značajnih interakcija između genotipa i sredine, odnosno varijabilnosti fenotipske plastičnosti.

Bubliy i sar. (2000b, 2001) su kod *Drosophila* pokazali smanjenje genetičke varijanse i odsustvo promena sredinske varijanse na nutritivno siromašnoj hrani (niska koncentracija kvasca), dok su Imasheva i sar. (1999) ustanovili povećanje kako genetičke tako i sredinske varijanse morfoloških osobina, a time i smanjenje heritabilnosti u uslovima nutritivnog stresa. Pored toga, rezultati na *Drosophila* su pokazali da se aditivna genetička varijansa trajanja razvića povećava na nutritivno siromašnoj hrani, kao i hrani sa niskim sadržajem kvasca, ali ne i genetička varijabilnost mase (Gebhardt & Staerns, 1988, 1992). Heritabilnost trajanja razvića *Drosophila melanogaster* u nutritivno siromašnoj sredini tokom ranih larvenih stupnjeva je veća u odnosu na heritabilnost u nutritivno bogatoj sredini, dok značajne razlike u heritabilnosti veličine tela nisu pokazane (Valtonen *et al.*, 2011). Heritabilnost u širem smislu (za melanizaciju kutikule) *Spodoptera littoralis* je veća na dijeti sa lošim kvalitetom proteina u odnosu na visokoproteinsku dijetu (Lee *et al.*, 2008).

Povećanje heritabilnosti se može pripisati povećanju aditivne genetičke varijanse ili smanjenju sredinske varijanse (Halloway *et al.*, 1990; Sisodia & Singh, 2009) i u skladu je sa hipotezom da je genetička varijabilnost povećana u stresnim sredinama (Parsons, 1987; Hoffmann & Parsons, 1991; Kawecki *et al.*, 1997; Sgro & Hoffmann, 1998). Alternativna mogućnost da se heritabilnost smanjuje u stresnim uslovima (Hoffmann & Merilä, 1999) ili kod populacija u prirodi (Charmantier & Garant, 2005) može voditi usporavanju evolucionih procesa. Osobine životne istorije su kontrolisane većim brojem gena što povećava verovatnoću njihovih interakcija i veći udeo neaditivnog genetičkog variranja (dominatnost i epistaza) u ukupnom fenotipskom variranju (Blows & Sokolowski, 1995; de Jong & Imasheva, 2001; Bublly *et al.*, 2001). U stresnim uslovima postoji i

značajan uticaj roditeljske generacije na ekspresiju genetičke varijabilnosti potomaka (Mousseau & Fox, 1998; Badyaev & Uller, 2009; Vijendravarma *et al.*, 2010). Genetička varijabilnost veličine tela kod *Drosophila* je povećana na stresnim temperaturama i to tako što se aditivna genetička varijabilnost veličine tela povećava na niskim, a varijansa trajanja razvića se povećava na visokim temperaturama, dok je udeo neaditivne genetičke varijabilnosti trajanja razvića značajan na umerenim temperaturama (de Jong & Imasheva, 2001). Pod delovanjem stresnih temperatura (konstantnih i/ili promenljivih) dolazi do značajnog povećanja genetičke varijanse morfometrijskih osobina na niskim i smanjenja na visokim temperaturama kod *Drosophila melanogaster* (Petavy *et al.*, 2004), dok je aditivna genetička varijansa morfometrijskih i seksualnih karakteristika *Drosophila ananassae* povećana na nepovoljnim temperaturama (18 i 32°C) u odnosu na optimalnu temperaturu od 25°C (Sisodia & Singh, 2009). Istovremeni efekat temperature i hrane može povećati sredinsku komponentu varijanse i usloviti manju heritabilnost kod populacija u prirodi (Coyne & Beecham, 1987; Hoffmann, 2000) ili promeniti odgovor kod laboratorijskih populacija (De Moed, 1997). Istovremena adaptacija na nepovoljne temperature i kvalitet hrane dovode do razlika u usvajanju i raspodeli resursa i različitih uzajamnih ograničenja između osobina životne istorije (Bochdanovits & de Jong, 2003).

Toplotni stres je sve važniji činilac prirodne selekcije u uslovima globalnog zagrevanja, koji može smanjiti genetičku varijabilnost, a time i sposobnost adaptacije na nove temperaturne promene (Hoffmann *et al.*, 2003; Bochdanovits & de Jong, 2003; Hoffmann & Willi, 2008; Mitchell & Hoffmann, 2010). Za razliku od morfometrijskih osobina, osobine rezistentnosti na stres pokazuju smanjenu genetičku varijabilnost u stresnim uslovima (Noory *et al.*, 2008) i zavise od načina delovanja stresora (Mitchell & Hoffmann, 2010). Povećanje aditivne varijanse (V_A) rezistentnosti na toplotni stres u uslovima konstantno povišene temperature i smanjenje kada se temperatura postepeno povećava ustanovljeno je u nekim studijama (Mitchell & Hoffmann, 2010).

Varijabilnost fenotipske plastičnosti

Fenotipska plastičnost i interakcija genotipa i sredine imaju važnu ulogu u evoluciji osobina životne istorije (Roff, 2002). Plastičnost osobina životne istorije omogućava jedinkama i populacijama da adekvatno odgovore na promene faktora životne sredine (nastale u velikoj meri i antropogenim uticajima) (Parmesan & Yohe, 2003; Crispo *et al.*, 2010).

Fenotipska plastičnost može biti rezultat različite ekspresije istih (strukturnih) gena u različitim sredinama, tzv. „plejotropni“ (Falconer, 1952) ili model alelske osetljivosti (alelska ekspresija je sredinski zavisna) (Via, 1993; Via *et al.*, 1995) ili je ekspresija strukturnih gena modulirana regulatornim genima („epstatički“ ili regulatorni model) (Scheiner, 1983; Scheiner & Lyman, 1991; Schlichting & Pigliucci, 1993). Prisustvo genetičke varijabilnosti fenotipske plastičnosti podržava hipotezu da je plastičnost osobina na koju deluje prirodna selekcija (Scheiner, 1993). Ukoliko postoje značajne interakcije genotipa i sredine (Guntrip & Silby, 1998), različit oblik i nagib normi reakcije (Gotthard & Nylin, 1995) ili različita heritabilnost osobina između sredina usled uticaja faktora životne sredine (Gavrillities & Scheiner, 1993), moguća je evolucija fenotipske plastičnosti. Takođe, postoje uzroci koji mogu ograničiti evoluciju fenotipske plastičnosti: genetička cena, koja uključuje vezano nasleđivanje gena, gametski disekvilibrjum i/ili antagonističku plejotropiju, odnosno negativne genetičke korelacije (Schlichting & Pigliucci 1998; Sgro & Hoffmann, 2004).

Rezultati opisani u ovom radu ukazuju na prisustvo značajne varijabilnosti fenotipske plastičnosti trajanja razvića u odgovoru na delovanje temperature („temperatura x leglo“ interakcija), ali i odsustvo razlika u odgovoru familija na promenu kvaliteta hrane (**Tabela 10**). Međutim, za trajanje I i II stupnja ustanovljena je značajna interakcija „temperatura × hrana × leglo“ koja ukazuje da variranje temperaturnih normi reakcije zavisi od nutritivnog sastava dijeta. Za trajanje I stupnja i trajanje razvića do ulaska u III stupanj pokazana je i značajna četvorostruka interakcija svih ispitivanih faktora (legla, temperature, sadržaja

proteina i ugljenih hidrata) (**Tabela 11**). Varijabilnost fenotipske plastičnosti, međutim, nije detektovana za osobinu masa larvi (**Tabele 12 i 13**). Guntrip & Silby (1998) su takođe pokazali odustvo značajnih interakcija genotipa i sredine za masu kod *Callosobruchus maculatus*, ali su interakcije bile značajne za trajanje razvića. Varijabilnost fenotipske plastičnosti u odgovoru na prisustvo taninske kiseline u dijeti je ustanovljena kod larvi gubara poreklom iz hrastove i bagremove populacije za različite komponente adaptivne vrednosti: trajanje razvića, masu i relativnu brzinu rasta (Mrdaković, 2010). Odsustvo značajne interakcije „hrana x leglo” na veštačkoj dijeti sa različitim sadržajem proteina za masu lutke gubara ustanovila je Rossiter (1987). U eksperimentima u kojima je ispitivana fenotipska plastičnost osobina gubara u odgovoru na različite biljke domaćine, pokazana je značajna varijabilnost opsega korišćenja različitih domaćina (Rossiter, 1987; Lazarević *et al.*, 1998, 2002).

Značajna varijabilnost fenotipske plastičnosti u odgovoru na temperaturu i kvalitet hrane prisutna je i kod drugih insekata. Kod larvi *Pieris rapae* ustanovljeno je značajno variranje temperaturnih normi reakcije za RGR zavisno od tipa dijete (Kingsolver *et al.*, 2006). Takođe, *Manduca sexta* pokazuje promene nagiba temperaturnih normi reakcije za veličinu tela na nepovoljnom u odnosu na povoljnog domaćina (Diamond & Kingsolver, 2010, 2012). Značajna varijabilnost fenotipske plastičnosti za brzinu razvića jajeta, larvenog razvića i veličinu jajeta, koja se ogleda u različitom nagibu normi reakcije na temperaturama 12 i 22°C, kao i značajnim G x E interakcijama, utvrđena je kod *Orchesella cincta* (Ellers & Dreissen, 2011).

Genetičke korelacije

Negativne genetičke korelacije između osobina u okviru sredina doprinose održavanju genetičke varijabilnosti osobina adaptivne vrednosti u prirodnim populacijama i osnovna su pretpostavka njihove zajedničke evolucije, tj. evolucije

određenih životnih strategija (Reznick, 1992). Osobine životne istorije su najčešće u negativnoj korelaciji (Stearns, 1992; Reznick, 1985) zbog uzajamnih ograničenja u raspodeli ograničenih resursa (van Noordwijk & de Jong 1986; Angilleta *et al.*, 2003), naročito u stresnim uslovima životne sredine (Dmitriew, 2011). Međutim, veliki procenat genetičkih korelacija između osobina adaptivne vrednosti može biti i pozitivan (Roff, 1996; Vorburger, 2005; Vehviläinen *et al.*, 2012). Ukoliko osobine pozitivno utiču na adaptivnu vrednost, genetičke korelacije između tih osobina mogu olakšati evoluciju optimalnih fenotipova (Ellers & Dreissen, 2011). Prisustvo genetičkih korelacija između osobina može biti rezultat zajedničkih regulatornih mehanizama što može ograničiti evoluciju optimalnih kombinacija fenotipskih osobina (Weinig *et al.*, 2006; Allen *et al.*, 2008). Načelno, genetička osnova korelacija određuje verovatnoću korelisanih odgovora pod delovanjem selekcije (Czesak *et al.*, 2006).

Sve je više dokaza koji ukazuju na zavisnost genetičkih korelacija od delovanja faktora životne sredine (Gutteling *et al.*, 2007). U tim promenama odnosa osobina može doći i do promena znaka korelacija (+/-) između sredina (Czesak & Fox, 2003; Sgro & Hoffmann, 2004). Rezultati našeg eksperimenta su pokazali da su genetičke korelacije između trajanja razvića i mase larvi negativne, ali su značajne u nepovoljnim uslovima, na suboptimalnim temperaturama i nutritivno siromašnoj hrani, tj. larve familija koje karakteriše duže larveno razviće istovremeno imaju u proseku i manju masu (**Tabela 14**). U optimalnim uslovima gajenja nisu detektovane značajne korelacije između ovih osobina (**Tabela 14**). [Pozitivna korelacija između trajanja razvića i mase larvi u nepovoljnim uslovima mogla bi predstavljati uzajamno ograničenje za larve gubara, jer bi to značilo da veće larve imaju duže razviće, uprkos činjenici da se negativne genetičke korelacije koriste kao dokaz o postojanju uzajamnog ograničavanja (eng. “*trade-off*”) (Reznick *et al.*, 2000; Sgro & Hoffmann, 2004)]. Iako je očekivano da veće individue imaju duže trajanje razvića, takva uzajamna ograničenja nisu pokazana kod Lepidoptera sa eruptivnom populacionom dinamikom (Tammaru *et al.*, 2000). Treba imati u vidu da genetičke korelacije zavise od stupnja u razviću, da se, kao što je već pomenuto,

značajno menjaju u zavisnosti od uticaja faktora životne sredine (Gutelling *et al.*, 2006, 2007), kao i da su u porastu rezultati koji ukazuju da osobine adaptivne vrednosti ne moraju biti u negativnoj korelaciji (Vehviläinen *et al.*, 2012). Ukupna korelaciona struktura (jačina korelacija) ukazuje na stabilnost genetičke strukture. Za funkcionalno povezane osobine se očekuje da imaju stabilne korelacije, dok se za osobine koje su fenotipski plastične očekuje promena jačine koeficijenata korelacije i/ili znaka korelacija (Tucić *et al.*, 1991). Ni u ranijim istraživanjima na gubaru na različitim biljkama domaćinima nisu pokazana uzajamna ograničenja između trajanja razvića i veličine tela (Miller *et al.*, 1991; Lazarević, 1994, Lazarević *et al.*, 1998). Strategija preživljavanja larvi gubara u stresnim uslovima može biti povećanje brzine rasta, slično drugim vrstama insekata. Kod larvi *Tribolium castaneum*, tokom adaptacije na nepovoljnog domaćina, nisu pokazana značajna uzajamna ograničenja između preživljavanja i trajanja razvića (Agashe *et al.*, 2011). Takođe, pozitivne genetičke korelacije između trajanja razvića, veličine tela i fekunditeta (kao i veličine i broja potomaka) ustanovljene su kod *Myzus persicae* (Vorburger, 2005; Vorburger & Ramsauer, 2008). Kod populacija u prirodi, genetička varijabilnost za sticanje kao i za usmeravanje resursa (van Noordwijk & de Jong, 1986) može favorizovati uspešnije genotipove i usloviti pozitivne korelacije između osobina adaptivne vrednosti (Reznick *et al.*, 2000). Kod riba, na primer, detektovane su pozitivne korelacije između brzine rasta i preživljavanja (Vehviläinen *et al.*, 2012). Genetičke korelacije između osobina životne istorije imaju tendenciju da postanu pozitivne u novim sredinama (Service & Rose, 1985; Holloway *et al.*, 1990; Simons & Roff, 1996; Guntrip *et al.*, 1997) i u zavisnosti od sezonskih promena kvaliteta biljaka domaćina (Kause *et al.*, 2001). Kod *Drosophila mercatorum*, genetičke korelacije između trajanja razvića i mase zavisile su od nutritivnog kvaliteta hrane i menjale su se od značajnih i pozitivnih na nutritivno bogatoj hrani do negativnih na siromašnoj (Gebhardt & Stearns, 1988). Na osnovu podataka kod različitih vrsta himenoptera prema kojima se genetičke korelacije između trajanja razvića i mase mogu menjati od visokih i pozitivnih do negativnih i bliskih nuli sa pogoršanjem kvaliteta hrane, može se

očekivati da će genetičke korelacije biti pozitivne u sredinama visokog kvaliteta resursa i njihovog manjeg variranja (Kause & Morin, 2001; Kause *et al.*, 2001). Iako se ovi poslednji zaključci generalno slažu sa vrednostima genetičkih korelacija otkrivenim u ovom radu na larvama gubara, sve navedene studije, kao i ranije studije na gubaru u kojima se dolazilo do drugačijih zaključaka, navode nas na zaključak sličan onom koji smo naveli za promene heritabilnosti – promena vrednosti i znaka genetičkih korelacija između različitih osobina u stresnim uslovima zavisi od analizirane vrste i njene prethodne evolucione istorije, od uzročnika stresa i od, naravno, osobina za koje se korelacije analiziraju.

Temperaturni stres dovodi do promena genetičkih korelacija između osobina životne istorije (Krebs & Loeschke, 1999). U svom radu na *Bicyclus anynana*, Winding (1994) je ustanovio promenu znaka korelacija između trajanja razvića i oblika krila, od značajnih i negativnih na 28°C do pozitivnih na 20°C. U eksperimentu veštačke selekcije, Norry i Loeschke (2002) su pokazali da negativne genetičke korelacije između dužine života i veličine tela *Drosophila melanogaster* na 25°C mogu postati pozitivne na 14°C. Na istoj vrsti, Karan i sar. (2000) su detektovali pozitivne genetičke korelacije između dužine krila i toraksa na optimalnoj temperaturi, kao i njihovo smanjivanje sa udaljavanjem od temperaturnog optimuma.

Genetičke korelacije osobina između sredina mogu se menjati u zavisnosti od delovanja faktora životne. Visoke i pozitivne korelacije jedne osobine između različitih sredina su karakteristika generalista (Via, 1984) i ukazuju da isti set gena kodira za datu osobinu u različitim sredinama (Lynch & Walsh, 1998). Pozitivne genetičke korelacije između sredina, koje se ne razlikuju statistički značajno od „1“, predstavljaju ograničenje za evoluciju optimalne fenotipske plastičnosti i mogu da otežaju specijalizaciju u temperaturno i nutritivno heterogenim sredinama. Ukoliko se pozitivne korelacije značajno razlikuju od jedinice, selekcija može favorizovati specijalizaciju u heterogenim sredinama (Fry, 1996).

Sve genetičke korelacije između sredina za trajanje razvića i masu larvi su pozitivne (**Tabela 15**). Većina genetičkih korelacija za trajanje razvića je visoka i nije značajno različita od jedinice, što predstavlja ograničenje za evoluciju optimalne fenotipske plastičnosti. Evolucija fenotipske plastičnosti za trajanje razvića je dodatno otežana odsustvom značajnih razlika u heritabilnosti između sredina, ali, kako predviđa „regulatorni model” moguća je zbog značajnih interakcija genotipa i sredine. Ispitivanja genetičkih korelacija trajanja razvića i mase larvi gubara između različitih sredina (kontrolna dijeta i dijeta sa dodatkom taniske kiseline), su pokazala da je većina korelacija značajna i pozitivna, ali i značajno različita od 1 tako da se ne smatraju ograničenjem za evoluciju fenotipske plastičnosti (Mrdaković *et al.*, 2011).

Sa izuzetkom korelacije između masa na temperaturama 19° i 28°C na nutritivno najbogatijoj hrani, genetičke korelacije između sredina za masu larvi su pozitivne i nesignifikantne (**Tabela 15**). Mada za masu larvi nije pokazana varijabilnost fenotipske plastičnosti, evolucija plastičnosti je moguća usled značajnih razlika u heritabilnosti između sredina. Stillwell i sar. (2007) takođe su pokazali značajne pozitivne korelacije za masu, brzinu rasta i fekunditet *Callosobruchus maculatus* bliske „+1” koje nisu zavisile od biljke domaćina, što ukazuje na stabilnost genetičke arhitekture koja stoji u osnovi fenotipske plastičnosti. Za razliku od ovih rezultata, genetičke korelacije za brzinu rasta *Pieris rapae* između temperatura, od značajnih i pozitivnih na veštačkoj dijeti postaju negativne i nesignifikantne na biljci domaćinu (Kingsolver *et al.*, 2006). Messina i Fry (2003) su pokazali promenu genetičkih korelacija između sredina za fekunditet i dužinu života *Callosobruchus maculatus* od pozitivnih i značajno različitih od +1, do negativnih u prisustvu odnosno odustvu hrane. Ustanovljene su i pozitivne genetičke korelacije plastičnosti trajanja razvića jajeta i brzine rasta kod *Orchesella cincta* između temperatura (Ellers *et al.*, 2011).

5.3. DIGESTIVNA PLASTIČNOST U ODGOVORU NA NUTRITIVNI I TEMPERATURNI STRES

Bihevioralni, metabolički, apsorptivni i ekskretorni odgovori, kao i promene sinteze i sekrecije digestivnih enzima predstavljaju veoma važan deo regulatornih mehanizama koje organizmi koriste u odgovoru na promene nutritivnog kvaliteta hrane. Sastav hrane može izazvati postingestivna prilagođavanja gastrointestinalnog trakata (Raubenheimer & Simpson, 1993; Yang & Yoern, 1994c; Raubenheimer & Bassil, 2007; Sorensen *et al.*, 2010) kao i kvantitativne i kvalitativne promene aktivnosti digestivnih enzima (Lemos *et al.*, 1992; Felton, 1996; Lwalaba *et al.*, 2010). Mehanizmi regulacije aktivnosti digestivnih enzima mogu biti neuralni, parakrini i prandialni (sekretagoga). Rezultati na različitim vrstama insekata ukazuju na mehanizam sekretagoge u regulaciji aktivnosti digestivnih enzima, koji se sastoji u usklađivanju količine izlučenih enzima sa količinom specifičnog supstrata u crevu (Applebaum, 1985; Houseman *et al.*, 1985; Broadway & Duffey, 1986). Međutim, kada se hrana razlikuje ne samo po apsolutnoj koncentraciji hranljivih materija, već u njihovim relativnim količinama, odnos između sekrecije enzima i koncentracije supstrata ne mora biti u pozitivnoj korelaciji (Ishaaya *et al.*, 1971; Woodring *et al.*, 2009).

Količina i odnos makronutrijenata u hrani imaju važnu ulogu u regulaciji nivoa digestivnih enzima putem parakrinog mehanizma. Pokazano je da kontrola sinteze i sekrecije digestivnih enzima u odgovoru na nutritivni sastav hrane zavisi od neurohormona, kao i od različitih peptida koji se sintetišu u difuznom endokrinom sistemu srednjeg creva insekata (Fúse *et al.*, 1999; Harshini *et al.*, 2002; Hill & Orchard, 2005; Sakai *et al.*, 2006; Bede *et al.*, 2007; Audsley & Weaver, 2009). U uslovima nutritivnog disbalansa može funkcionisati i homeostatska regulacija aktivnosti digestivnih enzima, da se enzim za supstrat koji je u višku sintetiše u manjoj količini nego enzim za supstrat koji je u manjku (Kotkar *et al.*, 2009; Clissold *et al.*, 2010; Sarate *et al.*, 2012).

Plastični odgovori digestivnih enzima na nutritivni stres

Različiti rezultati su pokazali da je aktivnost digestivnih enzima generalno viša na veštačkim dijetama u odnosu na različite biljke domaćine, zbog visoke nutritivne vrednosti i balansirano sastava amino kiselina u veštačkim dijetama (Clissold *et al.*, 2006; Hari *et al.*, 2007; Kotkar *et al.*, 2009; Naseri *et al.*, 2010).

Srednje crevo larvi lepidoptera ima kompleksan sastav različitih proteolitičkih enzima koji su uključeni u varenje proteina (Srinivasan *et al.*, 2006). Serinske proteinaze dominiraju u srednjem crevu larvi i čine oko 95% ukupne digestivne aktivnosti. Obrazac hranjenja (Browne *et al.*, 2003; Stockoff, 1993c) kao i sastav digestivnih proteaza se menja tokom larvenog razvića (Patanakar *et al.*, 2001). Početno varenje proteina se odvija u endoperitrofnom prostoru pod delovanjem endopeptidaza koje katalizuju hidrolizu unutrašnjih peptidnih veza prevodeći ih u oligopeptide. Varenje oligopeptida se nastavlja u ektoperitrofnom prostoru zahvaljujući dejstvu egzopeptidaza sa N-terminusa (aminopeptidaze) ili C-terminusa (karboksipeptidaze) odvajanjem po jedne amino kiseline (Terra & Ferreira, 2005). Aktivnost himotripsina i karboksipeptidaza nije detektovana ni u jednoj frakciji srednjeg creva larvi gubara (Valaitis, 1995).

Rezultati našeg eksperimenta su pokazali smanjenu aktivnost ukupnih proteaza na hrani sa visokim sadržajem proteina i povećanu aktivnost na hrani sa visokim sadržajem ugljenih hidrata (**Tabela 16 i 17**). Slično ovim rezultatima, aktivnost proteaza srednjeg creva larvi *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera) koji je takođe generalista, je bila niža na proteinski bogatijim dijetama, leguminozama i veštačkoj dijeti, u odnosu na hranu bogatu ugljenim hidratima (Kotkar *et al.*, 2009). Ispitujući efekat sastava hrane na aktivnost tripsina, pokazano je da je aktivnost značajno niža na hrani sa visokim sadržajem proteina i niskim sadržajem ugljenih hidrata u odnosu na hranu sa niskim sadržajem proteina i visokim sadržajem ugljenih hidrata (**Tabela 16**). Posmatrajući odvojeno efekat proteina i ugljenih hidrata, iznenađujuće je da aktivnost tripsina nije zavisila od sadržaja proteina u

dijeti, ali da je visok sadržaj ugljenih hidrata doveo do povećanja aktivnosti tripsina (**Tabela 17**). Slični rezultati su dobijeni u eksperimentu na *Locusta migratoria* hranjenih veštačkom dijetom sa visokim sadržajem proteina i niskim sadržajem ugljenih hidrata. Pokazana je smanjena aktivnost α -himotripsin-like enzima, njihovih dominantnih proteaza (dok je aktivnost tripsina bila i do deset puta niža u odnosu na α -himotripsin), a na dijeti sa niskim sadržajem proteina a visokim sadržajem ugljenih hidrata, niska aktivnost α -amilaze (Clissold *et al.*, 2010).

Za razliku od naših rezultata o aktivnosti ukupnih proteaza i tripsina, veći broj podataka ukazuje da je aktivnost proteaza, endopepidaza i egzopeptidaza, proporcionalna koncentraciji proteina u dijeti. Nivo varenja proteina i aktivnost tripsina kod larvi *Spodoptera exigua* i *Heliothis zea* je proporcionalan sadržaju proteina u dijeti i ukazuje na mehanizam sekretagoge u regulaciji sinteze i sekrecije enzima (Brodway & Duffey, 1986). Mehanizam sekretagoge je pokazan kod larvi gubara za kazeinolitičku aktivnost na povoljnom (hrast), odnosno nepovoljnom domaćinu (bagrem) (Lazarević *et al.*, 1994), a u uslovima povećane gustine gajenja za aktivnost tripsina i leucin aminopeptidaze (Lazarević *et al.*, 2004). Larve *Helicoverpa armigera* IV stupnja hranjene biljkama domaćinima sa visokim sadržajem proteina imale su značajno višu aktivnost kako proteaza tako i tripsin-like enzima u odnosu na dijete u kojima je sadržaj proteina bio niži (Sarate *et al.*, 2012). Sinteza i sekrecija digestivnih enzima larvi *Bombyx mori* u velikoj meri zavisi od nutritivnog sastava dijete. Na lišću duda sa dodatkom proteina indijskog pasulja povećana je sinteza proteaze, amilaze, saharaze i ureaze, a smanjena sinteza trehalaze (Manjula *et al.*, 2010). Kod *Helicoverpa zea* pokazana je povećana aktivnost tripsina na dijeti sa lošim kvalitetom proteina, uslovljena prisustvom alkilirajućih agenasa (Felton, 1996), dok je u eksperimentu na *Spodoptera exigua* ustanovljena smanjena sinteza proteolitičkih enzima na dijeti sa visokim sadržajem proteina kukuruza (zein) lošeg kvaliteta (Brodway & Duffey, 1988). Adulti *Melanoplus sanguinipes* hranjeni biljkama u kojima je sadržaj proteina bio

nizak imali su povećanu aktivnost tripsina i himotripsina, ali ne i aminopeptidaze i karboksipeptidaze (Hinks *et al.*, 1991; Hinks & Erlandson, 1995).

Kod omnivorne *Periplaneta americana* je pokazano da kazein i skrob u dijeti stimuliraju sintezu i sekreciju CCAP (*crustacean cardioactive peptides*), koji povratno, istovremeno povećava aktivnost proteaze i amilaze srednjeg creva (Sakai *et al.*, 2006). Za regulaciju aktivnosti tripsina kod različitih insekata pokazana je uloga tripsin-modulirajućeg oocitnog faktora (TMOF). Injekcija TMOF kod larvi *Heliothes virescens* II i IV stupnja zaustavlja sintezu tripsina (Nauen *et al.*, 2001). Takođe prisustvo inhibitora angiotenzin konvertujućeg enzima (ACE) u hrani *Spodoptera littoralis* dovodi do negativne regulacije aktivnosti tripsina srednjeg creva, verovatno putem interakcije sa TMOF (Lemeire *et al.*, 2008). Kod *Spodoptera frugiperda* je pokazano da je kontrola sinteze i oslobađanja amilaze i tripsina stimulirana alatotropinima dok alatostatini imaju inhibitorni efekat (Lwalaba *et al.*, 2011).

Kod vrsta kod kojih varenje hrane u najvećoj meri zavisi od tripsina, prisutan je određeni bazalni nivo sinteze i sekrecije, koji se nije smanjio kod larvi koje su gladovale, ali ni značajno povećao kod larvi koje se hrane (Woodring *et al.*, 2009; Lwalaba *et al.*, 2010). U eksperimentu na *Grillus bimaculatus* (Woodring *et al.*, 2009) i *Spodoptera frugiperda* (Lwalaba *et al.*, 2010) je pokazano da povećanje količine proteina ne mora dovesti do povećane sinteze i oslobađanja proteolitičkih enzima. Proteini i amino kiseline nisu stimulirali oslobađanje tripsina i aminopeptidaza *Spodoptera frugiperda*, a samo niska koncentracija peptona je imala stimulatorni efekat na aktivnost tripsina *Grillus bimaculatus* (Woodring *et al.*, 2009). Različiti solubilni proteini stimuliraju sekreciju tripsina srednjeg creva *Stomoxys calcitrans*, dok amino kiseline nemaju stimulatorni efekat (Blakemore, 1995).

Generalisti, kao što su gubar, *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera* koje karakteriše visok nivo polifagije, pokazuju veliku razvojnu i digestivnu plastičnost, a postdigestivna prilagođavanja na nivou digestivnog trakta putem kontrolisanog

oslobađanja digestivnih enzima predstavljaju ključni faktor koji doprinosi ispoljenoj plastičnosti (Sarate *et al.*, 2012). Digestivna plastičnost ili homeostatska regulacija aktivnosti enzima u zavisnosti od makromolekulskog sastava hrane, odnosno balansa glavnih makronutrijenata u hrani (Kotkar *et al.*, 2009; Clissold *et al.*, 2010; Sarate *et al.*, 2012), koja se ispoljava kao smanjena sinteza i sekrecija enzima za supstrat koji je u višku (engl. *downregulation*) i održavanje ili povećanje sinteze enzima za supstrat koji je u manjku (engl. *upregulation*) pokazana je za aktivnost tripsina i α -amilaze, koji predstavljaju deo iste sekretorne vezikule i oslobađaju se mehanizmom mikroapokrine sekrecije kod larvi lepidoptera (Santos & Terra, 1986; Terra & Ferreira, 1994). Takođe je pokazana i za ukupne proteaze, tripsin, α -amilazu i α -glikozidazu u našem eksperimentu.

Specifična aktivnost elastaze u našem eksperimentu je viša na hrani sa visokim sadržajem proteina i oko dva puta viša u odnosu na aktivnost tripsina (**Tabela 17**). Elastaza predstavlja dominantnu proteazu larvi gubara (Valaitis, 1995) i ima širu specifičnost (Christeller *et al.*, 1994) u odnosu na tripsin, koji cepa peptidne veze između amino kiselina Arg i Lys, čiji je sadržaj u hrani nizak i zato varenje proteina u većoj meri zavisi od elastaze. Pošto je aktivnost elastaze pozitivno korelisana sa količinom proteina u dijeti, možemo zaključiti da je aktivnost ovog enzima regulisana mehanizmom sekretagoge.

Aktivnost leucin aminopeptidaze u našem eksperimentu je viša na hrani u kojoj je sadržaj i proteina i ugljenih hidrata visok u odnosu na sve druge hrane (**Tabela 16 i 17**). Pad aktivnosti leucin aminopeptidaze na dijetama sa niskim sadržajem proteina je veći ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata nizak (**Tabela 17**). Slično našim rezultatima, specifična aktivnost leucin aminopeptidaze *Trichoplusia ni* (Lepidoptera, Noctuidae) je bila niža na dijetama sa niskim sadržajem proteina, a povećana na veštačkim dijetama sa dodatkom amino kiselina i proteaznim inhibitorom soje (Wang *et al.*, 2005). Pokazani su i drugačiji rezultati, da nizak sadržaj proteina u dijeti dovodi do povećanja aktivnosti leucin aminopeptidaze *Manduca sexta* (Neal, 1996). Kod larvi gubara hranjenih veštačkom dijetom sa

dodatkom taninske kiseline pokazana je tendencija povećanja aktivnosti leucin aminopeptidaze (Mrdaković, 2010). Rezultati na ženjkama komaraca *Aedes aegypti* su pokazali indukciju egzopeptidaza, leucin aminopeptidaze i karboksipeptidaza A i B, sa pikom aktivnosti 24 časa nakon proteiniskog obroka i nakon hranjenja krvlju domaćina, koji koincidira sa maksimalnom aktivnošću "kasnog" tripsina (Noriega *et al.*, 2002). Kod ove vrste je pokazan i relativno visok nivo konstitutivne aktivnosti leucin aminopeptidaze, kao i visok nivo aktivnosti proteolitičkih enzima na hrani sa visokim sadržajem proteina.

Relativni odnos između različitih klasa (proteolitičkih) enzima se može promeniti u stresnim uslovima (Ivanović *et al.*, 2002; Lazarević & Perić-Mataruga, 2003; Lazarević *et al.*, 2004), kao i korelacije između digestivnih enzima (Mrdaković, 2010). Kod larvi gubara hranjenih lišćem hrasta, koji su nakon presvlačenja u IV stupanj prebačene na ishranu bukovim lišćem (koje je bogato flavonoidima i alkaloidima a siromašno proteinima), došlo je do značajnog povećanja aktivnosti tripsina i α -amilaze, dok je aktivnost leucin peptidaze bila značajno smanjena u grupi larvi čiji su „roditelji“ u predačkoj generaciji bili hranjeni lišćem bukve (Lazarević & Perić-Mataruga, 2003). Aktivnost tripsina je bila viša, dok se aktivnost amilaze i leucin aminopeptidaze nije značajno promenila u uslovima povećane gustine gajenja kod gubara (Lazarević *et al.*, 2004). Larve *Ceratitis capitata* na dijeti sa visokim sadržajem životinjskih proteina povećavaju sintezu i sekreciju tripsina, a smanjuju sintezu aminopetidaza (Lemos *et al.*, 1992). Aktivnost aminopeptidaza *Helicoverpa armigera* je bila značajno povećana na nepovoljnim biljkama domaćinima, dok je aktivnost serinskih proteaza, tripsina i himotripsina bila smanjena (Lomate & Hivrale, 2011). Diferencijalna ekspresija proteaza na različitim dijetama u ovom slučaju, omogućava prevazilaženje nutritivnog disbalansa usled prisustva biljnih proteaznih inhibitora (Lomate & Hirvale, 2011).

Sve fenotipske korelacije između aktivnosti ukupnih proteaza i endo- i egzopeptidaze su pozitivne (**Tabela 24, 25 i 26**). Korelacije između enopetidaza

elastaze i tripsina, koje su pozitivne i statistički značajne nezavisno od temperature i kvaliteta hrane, mogu ukazati na zajedničku regulaciju njihove aktivnosti u optimalnim, ali i u stresnim uslovima. Sličan rezultat, pozitivne korelacije visokog intenziteta između aktivnosti ukupnih proteaza i tripsina (i između tripsina i leucin aminopeptidaze, kod larvi iz hrastove populacije) pokazane su u prisustvu stresora, taninske kiseline u dijeti (Mrdaković, 2010). U našem eksperimentu, korelacije između endopeptidaza i egzopeptidaze su uglavnom pozitivne i jače su na nutritivno bogatoj hrani u odnosu na nutritivno siromašnu hranu (**Tabele 24, 25 i 26**).

Iako je broj značajnih korelacija između aktivnosti digestivnih enzima i komponenti adaptivne vrednosti mali (**Tabele 28, 29 i 30**), korelacije između proteolitičkih enzima, ukupnih proteaza, tripsina, elastaze i leucin aminopeptidaze i relativne brzine rasta larvi su pozitivne i značajne jedino u optimalnim uslovima gajenja (**Tabela 29**). Visoka aktivnost proteolitičkih enzima je neophodna da omogući veću brzinu rasta u optimalnim uslovima kao i najveći porast mase koji je pokazan na optimalnoj temperaturi (**Slika 5**). Aktivnost leucin aminopeptidaze je u značajnoj negativnoj korelaciji sa masom larvi na nutritivno bogatoj hrani na 19 i 23°C (**Tabele 28, 29**), a na temperaturi 28°C značajne su samo negativne korelacije na hrani u kojoj je disbalas između proteina i ugljenih hidrata najveći (**Tabela 30**). To može ukazati na potencijalnu ulogu leucin aminopeptidaze, koja podrazumeva, pored osnovne uloge u varenju proteina u optimalnim uslovima, i ulogu u prevazilaženju negativnih posledica narušavanja ćelijske homeostaze u uslovima nutritivnog i temperaturnog stresa.

Varenje ugljenih hidrata, skroba i glikogena dešava se u prednjem delu srednjeg creva većine insekata (Cristofolletti *et al.*, 2001) i zavisi od luminalnih amilaza i glikozidaza. U grupi enzima koji deluju prvenstveno na dugačke α -1,4-glukanske lance, kao što su skrob i glikogen i razlažu ih na maltozu (Terra & Ferreira, 1994), jedino je α -amilaza nađena kod insekata. α -glikozidaze prisutne u

srednjem crevu insekata katalizuju hidrolizu terminalnih veza oligosaharida i disaharida: saharoze, maltoze, maltodekstrina (Franco *et al.*, 2002).

Rezultati našeg eksperimenta su pokazali povećanu aktivnost karbohidraza, α -amilaze i α -glikozidaze, na hrani sa visokim sadržajem proteina, dok sadržaj ugljenih hidrata nije značajno uticao na njihovu aktivnost (**Slike 11 i 12; Tabela 18 i 19**). Slično našim rezultatima, na *Helicoverpa armigera* je ustanovljena viša aktivnost amilaze na dijeti i/ili biljkama domaćinima sa visokim sadržajem proteina i niža aktivnost na dijetama i/ili biljkama bogatim skrobom, odnosno nivo amilaze je bio obrnuto proporcionalan sadržaju ugljenih hidrata u dijeti (Kotkar *et al.*, 2009; Sarate *et al.*, 2012). Takođe, smanjena aktivnost α -amilaze u lumenu i svim regionima gastrointestinalnog trakta *Locusta migratoria* je pokazana na veštačkoj dijeti sa niskim sadržajem proteina i visokim sadržajem ugljenih hidrata (Clissold *et al.*, 2010).

Međutim, ukoliko se posmatraju efekti ugljenih hidrata nezavisno od uticaja drugih komponenti hrane, pokazano je da maltoza i glukoza u *in vitro* eksperimentu *Gryllus bimaculatus* imaju stimulatorni efekat na oslobađanje amilaze, dok skrob u niskim koncentracijama ima inhibitorni efekat (Woodring *et al.*, 2009). U eksperimentu na lepidopteri *Spodoptera frugiperda*, takođe je pokazano da glukoza i maltoza, ali ne i skrob, povećavaju sintezu amilaze za oko 350%, odnosno da se sinteza i sekrecija α -amilaze prilagođava količini ugljenih hidrata u dijeti (Lwalaba *et al.*, 2010). Ovi nalazi su u suprotnosti sa rezultatima koji ukazuju da je aktivnost amilaze viša na dijetama koje sadrže skrob u odnosu na dijetu koje sadrže proste šećere (Hickey & Benkel, 1982; Benkel & Hickey, 1986) i da je to posledica inhibitornog efekta glukoze, pre nego stimulatornog efekta skroba (Kamin-Belsky & Wool, 1991). Pokazano je da se nivo ekspresije gena za amilazu *Helicoverpa armigera*, Amy 1 i Amy2 u srednjem crevu menja u zavisnosti od sadržaja skroba i redukujućih šećera i da je viši na veštačkoj dijeti i/ili biljkama u kojima je sadržaj skroba visok u odnosu na sadržaj saharoze i redukujućih šećera (Kotkar *et al.*, 2012). Pokazana je indukcija aktivnosti

disaharidaza skrobom i supresija aktivnosti kada je sadržaj lipida u dijeti visok (Caviedes-Vidal *et al.*, 2000), kao i da je fenotipska plastičnost aktivnosti digestivnih enzima (disaharidaza) izazvana sastavom hrane tokom prvih 12 dana nakon izleganja kod *Passer domesticus* potpuno reverzibilna (Brzek *et al.*, 2011).

Negativna regulacija aktivnosti amilaze na dijetama sa visokim sadržajem ugljenih hidrata može biti kompenzatorni odgovor koji omogućava da se prevaziđe višak njihovog unosa uslovljen disbalansom u dijeti (Kotkar *et al.*, 2009). Kada je sadržaj ugljenih hidrata u hrani visok, čak i mala količina enzima je dovoljna za njihovo varenje, dok je neophodan visok nivo proteaza za varenje proteina na dijetama bogatim ugljenim hidratima a siromašnim proteinima. Generalisti, kao što je *Spodoptera exigua*, *Helicoverpa armigera* (lepidoptera) koriste enzim glukoza oksidazu (GOX) iz pljuvačke (*saliva*), koja konvertuje glukozu u glukonat (nesvarljivi oblik ugljenih hidrata), da bi smanjili količinu ugljenih hidrata koja se razlaže u digestivnom traktu (Merkx-Jacques & Bede, 2005; Babić *et al.*, 2008; Hu *et al.*, 2008). Ukoliko nema homeostatske regulacije digestivnih enzima, varenje proteina i ugljenih hidrata u višku može biti toksično za insekte (Raubenheimer *et al.*, 2005).

Aktivnost α -amilaze je u negativnoj korelaciji sa trajanjem razvića, što ukazuje da niska aktivnost enzima produžava trajanje razvića, naročito na suboptimalnoj temperaturi i na hrani sa niskim sadržajem ugljenih hidrata, dok je na optimalnoj temperaturi u negativnoj korelaciji na hrani koja ima nizak sadržaj i ugljenih hidrata i proteina (**Tabela 28 i 29**). Ovaj rezultat ukazuje da se trajanje stupnjeva razvića produžava usled nedostatka hranljivih materija, što je podržano nalazom da nizak sadržaj ugljenih hidrata u hrani sa niskim sadržajem proteina ne uzrokuje povećanje aktivnosti amilaze (Ug x Pr interakcija, **Tabela 19**), Aktivnost većine digestivnih enzima, uključujući i aktivnost α -amilaze, u našem eksperimentu nalazi se u pozitivnoj korelaciji sa relativnom brzinom rasta (osim α -glikozidaze i lipaze) ukoliko se larve gaje u optimalnim uslovima (**Tabela 28, 29 i 30**). Aktivost α -amilaze uglavnom nije u značajnoj korelaciji sa masom larvi, ali suboptimalna

temperatura povećava vrednost ovih korelacija na nutritivno bogatoj hrani (Tabela 28) kao i na hrani siromašnoj skrobom na optimalnoj temperaturi (Tabela 29). Za porast mase u našem eksperimentu pokazan je značajniji uticaj temperature i sadržaja proteina u dijeti u odnosu na sadržaj ugljenih hidrata (Tabela 19), pa to može usloviti odsustvo značajnih korelacija između mase larvi i aktivnosti karbohidraza. Za razliku od naših rezultata, u eksperimentu sa *Parnassius apollo* (Lepidoptera) čija se ishrana zasniva na polisaharidima, nađena je jaka, pozitivna korelacija između aktivnosti α -amilaze i α -glikozidaze, kao i pozitivna korelacija ovih enzima sa masom larvi (Nakonieczny *et al.*, 2006). Regulacija aktivnosti karbohidraza je posebno značajna kod insekata na dijetama bogatim ugljenim hidratima kod kojih je obično prisutan i visok nivo inhibitora amilaze (Silva *et al.*, 1999, 2001a, 2001b). Larve *Zabrotes subfasciatus* mogu da modulišu aktivnost α -amilaze i α -glikozidaze, kao i ekspresiju različitih izoformi oba enzima u zavisnosti od sastava dijete (Silva *et al.*, 1999, 2001), a na istoj vrsti je pokazano da indukcija različitih izoformi digestivnih karbohidraza ne zavisi od strukture granula skroba u dijeti (Silva *et al.*, 2001a) već od prisustva inhibitora amilaze (Silva *et al.*, 2001b).

Lipaze (triacilglicerol hidrolaze, EC 3.1.1.3) su grupa enzima koja hidrolizuje karboksil estarsku vezu triacilglicerola, diacilglicerola, galaktolipida i fosfolipida, a kao koprodukt nastaju masne kiseline (Beisson *et al.*, 2000). Lipaze insekta pokazuju veliki strukturni i funkcionalni diverzitet (Horne *et al.*, 2008, 2009; Christeller *et al.*, 2010). Analizom strukture enzima i ekspresije gena za lipaze srednjeg creva larvi *Epiphyas postvittana* (Lepidoptera) pokazano je da lipaze srednjeg creva Lepidoptera formiraju devet subfamilija neutralnih lipaza, koje *in vivo* funkcionišu kao galaktolipaze i fosfolipaze (Horne *et al.*, 2009; Christeller *et al.*, 2010), dok kisele lipaze funkcionišu kao triacilglicerol hidrolaze (Christeller *et al.*, 2010). Lipaza srednjeg creva larvi gubara pripada esterazi-lipazi (Mrdaković *et al.*, 2009). Digestivne lipaze *Bombyx mori* imaju, pored digestivne uloge, i antivirusno dejstvo na virus nukleopolihedroze (Ponnuvel *et al.*, 2003). Viša aktivnost digestivnih enzima, α -amilaze i lipaze je povezana sa rezistentnošću na

insekticid piretroid kod *Sitophilus zeamais* (Araujo *et al.*, 2008). Pokazano je da je aktivnost digestivnih lipaza *Helicoverpa armigera* hormonski regulisana, tako da sintetički analog juvenilnog hormona, metopren, dovodi do povećane ekspresije gena za lipazu, dok 20-hidroksiekdizon ima blagi inhibitorni efekat (Sui *et al.*, 2008). Digestivne lipaze, pored uloge u varenju lipida, mogu imati ulogu i u drugim procesima kao što su metamorfoza, apoptoza i eklozija adulta (Nishiura *et al.*, 2007).

Ekspresija digestivnih lipaza se menja u zavisnosti od vrste i sadržaja lipida prisutnih u dijeti (Christeller *et al.*, 2010), kao i prisustva inhibitora lipaze (Markwick *et al.*, 2011). Ispitivanjem aktivnosti digestivnih lipaza kod šest različitih vrsta Lepidoptera, pokazano je da je aktivnost galaktolipaza i fosfolipaza visoka kod folivornih vrsta, dok je aktivnost TAG lipaza umerena, što je prilagođeno visokom sadržaju galaktolipida u lišću i značajno manjoj količini fosfolipida i triacilglicerola (Christeller *et al.*, 2011). Glavna digestivna lipaza ženki *Rhodnius prolixus* je TAG lipaza (Grillo *et al.*, 2007). Kod larvi *Epiphias postvittana* promena dijetete, prelazak sa ishrane lišćem na veštačku dijetu koja ima visok sadržaj triacilglicerola, dovodi do značajnog snižavanja aktivnosti galaktolipaze, dok se aktivnost fosfolipaze i TAG lipaze ne menja značajno (Christeller *et al.*, 2010). Na veštačkoj dijeti bez dodataka slobodnih masnih kiselina, dolazi do suprotne promene obrasca aktivnosti u smislu značajnog povećanja aktivnosti galaktolipaze, a snižavanja aktivnosti triacilglicerol lipaze (Christeller *et al.*, 2010).

Aktivnost lipaze larvi gubara IV stupnja na veštačkim dijetama sa različitim sadržajem proteina i ugljenih hidrata u našem eksperimentu bila je niža na hrani sa visokim sadržajem proteina i niskim sadržajem ugljenih hidrata (hrana sa optimalan balansom hranljivih materija) u odnosu na hranu u kojoj je sadržaj ugljenih hidrata bio visok a sadržaj proteina nizak, kao i u odnosu na hranu u kojoj je sadržaj obe komponente nizak (**Slika 13; Tabela 20**). Ako se posmatra nezavisno uticaj sadržaja ugljenih hidrata i proteina, visok sadržaj proteina dovodi do snižavanja aktivnosti lipaze, dok sadržaj ugljenih hidrata ne utiče značajno na

njenu aktivnost (**Tabela 21**). Većina podataka o aktivnosti lipaza se odnosi na variranje sadržaja ugljenih hidrata ili lipida u dijeti i/ili biljkama domaćinima. Aktivnost lipaza u larvama hranjenim veštačkim dijetama je u proseku niža u odnosu na prirodne dijetete, ali je pokazan visok udeo digestivne lipaze u ukupnoj aktivnosti, kao i niža aktivnost na dijetama sa visokim sadržajem ugljenih hidrata (Lwalaba *et al.*, 2010) ili visokim sadržajem lipida (Woodrig *et al.*, 2007). Visok sadržaj ugljenih hidrata u dijeti dovodi do supresije gena za kiselu lipazu kod *Drosophila melanogaster*, koja učestvuje u razgradnji triacilglicerola u masnom telu (Zinke *et al.*, 1999), kao i do supresije gena koji kodiraju neutralne lipaze, koje učestvuju u razgradnji lipida u srednjem crevu (Zinke *et al.*, 2002). Na mogućnost da odgovor aktivnosti lipaze u uslovima nutritivnog stresa može biti kompenzatorni sa ciljem obezbeđivanja dovoljnih količina energije u nepovoljnim uslovima ukazuje nekoliko rezultata ove studije na gubaru: 1) aktivnosti lipaze je povećana na hrani sa niskim sadržajem proteina a visokim sadržajem ugljenih hidrata, 2) aktivnost ovog enzima je povećana i na dijeti sa niskim sadržajem obe komponente, 3) ustanovljena je značajna interakcija između količine proteina i ugljenih hidrata za aktivnost lipaze, 4) pokazano je da je porast aktivnosti lipaze veći na hrani sa niskim sadržajem proteina ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata nizak i 5) aktivnost lipaze je povećana i na nepovoljnim temperaturama (19 i 28°C) u odgovoru na nizak sadržaj proteina (**Tabela 21**). Treba napomenuti da je aktivnost lipaze u značajnoj negativnoj korelaciji sa aktivnošću proteolitičkih enzima u optimalnim uslovima gajenja (**Tabela 25**). Nutritivni stres, usled prisustva taninske kiseline u veštačkoj dijeti, takođe povećava aktivnost lipaze kod larvi gubara (Mrdaković, 2010). Tokom larvenog razvića gubara dolazi do promene preference za ishranu, od hrane sa visokim sadržajem proteina u ranim, ka hrani sa većim sadržajem lipida u kasnijim larvenim stupnjevima (Stockoff, 1993c), kako bi se obezbedila dovoljna količina energetske rezervi neophodnih za kasnije procese reprodukcije kod ženki i za letenje kod mužjaka (Stockoff, 1992). Aktivnost digestivne lipaze *Helicoverpa armigera* se povećava u kasnijim larvenim stupnjevima (Sui *et al.*, 2008), što može ukazati na to da digestivne lipaze, pored

uloge u varenju lipida, mogu imati ulogu i u drugim procesima kao što su metamorfoza, apoptoza i eklozija adulta (Nishiura *et al.*, 2007).

Za razliku od rezultata ovog rada, aktivnost lipaze *Helicoverpa armigera* je bila viša na biljkama sa visokim sadržajem proteina i niskim sadržajem ugljenih hidrata u odnosu na biljke sa umerenim sadržajem proteina i visokim sadržajem ugljenih hidrata (Sarate *et al.*, 2012). To može biti posledica „olakšane” sinteze lipaze kada je sadržaj amino kiselina u hrani visok i/ili kada su povećane potrebe za korišćenjem lipida kao izvora energije da bi se kompenzovao njihov nizak sadržaj u hrani (Sarate *et al.*, 2012). Na biljkama koje imaju nizak sadržaj proteina i ugljenih hidrata, aktivnost lipaze *Helicoverpa armigera* je bila različita, što može biti posledica korišćenja lipaza biljke domaćina (Sarate *et al.*, 2012). Pokazano je da je aktivnost digestivnih lipaza *Helicoverpa armigera* hormonski regulisana, tako da sintetički analog juvenilnog hormona, metopren, dovodi do povećane ekspresije gena za Ha-lipazu, dok 20-hidroksiekdizon ima blagi inhibitorski efekat (Sui *et al.*, 2008).

Fosfataze alkalne, kisele i lizosomalna kiselna fosfataza (ALP, ACP, ACP_i) su enzimi koji hidrolizuju fosfatne monoestre u alkalnoj ili kiselj sredini (Janda & Benešova, 1991; Bai *et al.*, 1993) i mogu vršiti transfosforilaciju organskih molekula, pa je njihova uloga važna u metabolizmu fosfolipida, fosfoproteina, nukleotida i ugljenih hidrata (Hollander, 1971; Millan, 2006; Chaubey *et al.*, 2010). Alkalna i kiselna fosfataza mogu imati ulogu hidrolaza tokom završnih faza varenja hrane (Cheung & Low, 1975). Srednje crevo insekata ima daleko najvišu aktivnost kiselih i alkalnih fosfataza u odnosu na sva druga tkiva insekata (Okada, 1989; Eguchi, 1990, 1995; Miao, 2002). U srednjem crevu *Bombyx mori* detektovane su dve izoforme ovog enzima - membranski vezana, m-ALP i solubilna, s-ALP (Eguchi, 1995). Smatra se da je m-ALP uključena u varenje, apsorpciju i transport hranljivih materija u cilindričnim epitelnim ćelijama (Eguchi, 1995; Chen *et al.*, 1997; Yan *et al.*, 2009), naročito glukoze i masnih kiselina (Sridharta & Bath, 1963), dok je s-ALP prisutna u peharastim ćelijama, ima ATP-aznu aktivnost i

učestvuje u regulaciji jonskog balansa (Azuma *et al.*, 1991; Eguchi, 1995). Alkalna fosfataza (ALP) je marker enzim četkaste membrane epitelnih ćelija (Wolfersberg, 1984) i naročito je aktivna u tkivima sa aktivnim membranskim transportom, kao što su epitelne ćelije srednjeg creva i Malpigijevi sudovi (Eguchi 1995; Ferreira & Terra, 1980). Aktivnost alkanih i kiselih fosfataza je niska tokom i postepeno se povećava nakon presvlačenja kod *Bombyx mori*, što je povezano sa povećanim unosom hrane (Miao, 1988, 2002). U kasnijim larvenim stupnjevima aktivnost fosfataza se smanjuje. Visoka aktivnost s-ALP u Malpigijevim sudovima ukazuje na njenu ulogu u resorpciji metabolita, ekskreciji i aktivnom membranskom transportu (Srivastana & Saxena, 1967). Sekundarni biljni metaboliti mogu inhibirati aktivnost fosfataza i smanjiti efikasnost varenja (Nathan, 2006; Nathan *et al.*, 2007; Basiouny *et al.*, 2010).

Kod insekta fosfataze su uključene i u druge procese kao što su odgovor na stres (Sukhanova *et al.*, 1996; Raushembach *et al.*, 2007a, b), patogeneza (Sujak *et al.*, 1978), otpornost na infekcije i insekticide (Miao, 2002; Wang *et al.*, 2011). m-ALP srednjeg creva *Helicoverpa armigera*, *Manduca sexta* (Ning *et al.*, 2010; McNall & Adang, 2003) kao i gubara (Valaitis *et al.*, 1997) je mogući receptor za vezivanje Cry1Ac (toksina *Bacillus thuringiensis*), koja može olakšati njegovu ugradnju u membranu epitelnih ćelija. Smanjena aktivnost membranski vezane fosfataze srednjeg creva je zajednička karakteristika Lepidoptera *Heliothis virescens*, *Helicoverpa armigera* i *Spodoptera frugiperda* rezistentnih na toksin *Bacillus thuringiensis* (Jurat-Fuentes *et al.*, 2011). Alkalna fosfataza kod *Leptinotarsa decemlineata* ima ulogu u dijapauzi (Yi & Adams, 2001).

U ovom radu, aktivnost alkalnih fosfataza u grubim homogenatima srednjeg creva nije se menjala značajno u zavisnosti od nutritivnog sastava hrane (**Slika 14**, **Tabela 22**), ali su na promenu aktivnosti značajno uticale interakcije između temperature i hrane, kao i između temperature i sadržaja proteina i sadržaja ugljenih hidrata u hrani. Sa porastom temperature aktivnost alkalnih fosfataza se smanjuje na nutritivno najbogatijoj hrani, dok na ostalim hranama pokazuje trend

porasta, koji je najizraženiji na h3 koja je zbog niskog sadržaja proteina u odnosu na ugljene hidrate najnepovoljnija za rast larvi (**Tabela 22**). Iako sadržaj proteina i ugljenih hidrata ne utiče značajno na promenu aktivnosti alkalne fosfataze, porast temperature dovodi do značajnog povećanja aktivnosti ako se larve gaje na hrani sa niskim sadržajem ovih komponenti (**Tabela 23**). Ovakva promena aktivnosti alkalnih fosfataza, s obzirom na njihovu ulogu u varenju, apsorpciji i transportu hranljivih materija, predstavlja kompenzatorni odgovor u uslovima delovanja nutritivnog stresa. U prilog tome idu i značajne pozitivne korelacije sa drugim digestivnim enzimima. Na suboptimalnoj temperaturi aktivnost alkalnih fosfataza u značajnoj je pozitivnoj korelaciji sa proteolitičkim enzimima, ukupnim proteazama i endopeptidazama, kao i α -amilazom uglavnom na proteinski siromašnim dijetama (h3 i h4) (**Tabela 24**). Sa porastom temperature korelacije alkalnih fosfataza sa proteolitičkim enzimima nisu značajne, one menjaju znak i njihova vrednost se smanjuje (**Tabela 26**). S obzirom na ulogu alkalnih fosfataza u varenju i apsorpciji hrane, transportu i resorpciji hranljivih materija (Cheung & Low, 1975; Sridharta & Bath, 1963; Eguchi, 1995), u obezbeđivanju dovoljne količine fosfatnih jona za sintezu ATP (Sakharov, 1989; Adefolaju *et al.*, 2009), nije iznenađujuća njihova pozitivna korelacija sa proteolitičkim enzimima, koji su od vitalne važnosti za rast i razviće, na šta ukazuje i pozitivna korelacija sa relativnom brzinom rasta u optimalnim uslovima (**Tabela 29**), ali i pozitivna korelacija sa proteolitičkim enzimima u nepovoljnim uslovima, nutritivno siromašnoj hrani i suboptimalnoj temperaturi (**Tabela 24**). Povećana aktivnost alkalne fosfataze na proteinski siromašnoj hrani i suboptimalnoj temperaturi može usloviti bolje iskorišćavanje proteina, na šta upućuju i rezultati eksperimenata na drugim vrstama.

Pokazano je da nutritivno siromašna hrana, hrana sa smanjenim sadržajem azota, smanjena količina hrane, kao i nizak sadržaj fosfora u hrani, dovode do povećanja aktivnosti alkalnih fosfataza *Daphnia magna* i *Daphnia pulex* (Wagner & Frost, 2012). Takođe, aktivnost alkalne fosfataze *Daphnia* je bila povećana na hrani u kojoj je relativna količina ugljenika u odnosu na fosfor bila visoka (Wojewodzic *et*

al., 2011; Wagner & Frost, 2012). Kod lepidoptere *Cnaphalocrocis medinalis*, na larvama IV stupnja hranjenim lišćem pirinča, pokazano je da smanjena aktivnost kiselih i alkalnih fosfataza, usled delovanja biljnih insekticida, dovodi do smanjene efikasnosti konverzije unete (ECI) i svarene hrane u biomasu (EDC) i do smanjene relativne brzine rasta larvi (Nathan *et al.*, 2007). Takođe, sekundarni biljni metaboliti dovode do smanjivanja aktivnosti kisele fosfataze za 69% a alkalne i do 71%, što za posledicu ima smanjenu efikasnost varenja i konverzije hrane u biomasu kod iste vrste (Nathan, 2006). Ovi podaci ukazuju na značaj fosfataza u varenju hrane i apsorpciji hranljivih materija (Nathan *et al.*, 2007). Kratkotrajna i dugotrajna promena biljke domaćina utiče na povećanje aktivnosti ALP na povoljnim i smanjivanje aktivnosti na nepovoljnim domaćinima kod *Bemisia tabaci* i *Trialeurodes vaporariorum*. Smatra se da ovakve promene aktivnosti mogu omogućiti fiziološku prednost u korišćenju različitih biljaka kod ovih polifagnih vrsta (Yan *et al.*, 2011). Prednost jedne nad drugom vrstom može se ogledati i u sposobnosti da koristi ALP u metabolizmu saharoze, koja predstavlja prekursor trehaloze (Yan *et al.*, 2011). Pokazano je da postoji korelacija između niske aktivnosti alkalne fosfataze i niske koncentracije trehaloze u hemolimfi. Kod larvi riba, ALP predstavlja pokazatelj apsorbivne aktivnosti (Cahu & Zambonino, 1998), dok je smanjena aktivnost obično povezana sa gladovanjem ili nutritivno siromašnom hranom (Shan *et al.*, 2009). Kod larvi *Silurus soldatovi* gajenih na prirodnoj hrani (Daphnia, gliste) ustanovljena je visoka aktivnost alkalne intestinalne fosfataze u poređenju sa aktivnošću ovog enzima pri ishrani na veštačkoj dijeti (Liu *et al.*, 2010).

Pozitivna korelacija aktivnosti alkalnih fosfataza sa aktivnošću α -amilaze i lipaze ustanovljena je na hrani sa niskim sadržajem skroba na suboptimalnoj temperaturi (**Tabela 24**), što može ukazati na značaj aktivnosti alkalne fosfataze u apsorpciji glukoze i masnih kiselina (Sridhara & Bhat, 1963) i obezbeđivanju dovoljne količine energije u uslovima kada je količina ugljenih hidrata u hrani smanjena. U prilog tome govori i pozitivna korelacija aktivnosti ALP sa α -glikozidazom na optimalnoj temperaturi i nutritivno najsiromašnjoj hrani (**Tabela**

25). Dodatno, na takav zaključak navodi i ustanovljena pozitivna korelacija između aktivnosti alkalnih fosfataza sa apsorpcijom glukoze, masnih kiselina, kalcijuma i fosfora pokazana na larvama riba (Tengjaroenkul *et al.*, 2000).

Aktivnost alkalnih fosfataza ne utiče značajno na trajanje razvića i porast mase larvi na šta ukazuje mali broj značajnih korelacija alkalne fosfataze sa ovim komponentama adaptivne vrednosti. Ipak, povećana aktivnost alkalnih fosfataza doprinosi većoj relativnoj brzini rasta larvi u optimalnim uslovima, što se može zaključiti na osnovu značajnih pozitivnih korelacija na nutritivno bogatoj hrani i optimalnoj temperaturi (**Tabela 29**).

Kod insekata, *kisela fosfataza* (ACP) je poznata i kao lizozomalni marker enzim (Csikos & Sass, 1997) mada je pokazano značajno prisustvo ovog enzima i u nukleusu (kao i endoplazmatičnom retikulumu) epitelnih ćelija srednjeg creva *Bombyx mori* (Chen *et al.*, 2005b). Nesporno je prisutna u crevu (Janda and Benešova, 1991; Bai *et al.*, 1993), Malpigijevim sudovima, kao i u tkivima i organima gde se vrši razgradnja i zamena oštećenih ćelija (Lehane, 1976; Csikos & Sass, 1997; Goncu & Parlak, 2011). Pokazano je da je aktivnost ACP viša u odnosu na aktivnost ALP tokom embrionalnog razvića *Spodoptera littoralis* (Zahia *et al.*, 2009).

Aktivnost ukupnih kiselih i lizozomalnih fosfataza zavisi od sastava hrane i niža je na hrani sa visokim sadržajem proteina i niskim sadržajem ugljenih hidrata (**h2**) u odnosu na hranu koja ima niži sadržaj proteina a viši sadržaj ugljenih hidrata (**h3**) (približan ukupan sadržaj, ali nepovoljan odnos proteina i ugljenih hidrata) (**Tabela 22**). Ukoliko se posmatra efekat glavnih makronutrijenata, aktivnost ukupnih kiselih fosftaza je u proseku niža na hrani sa visokim sadržajem proteina, dok visok sadržaj ugljenih hidrata dovodi do povećanja aktivnosti. Za razliku od ukupnih, na aktivnost lizozomalnih fosftataza ne utiče sadržaj proteina već sadržaj ugljenih hidrata u dijeti (**Tabela 23**). Naši rezultati su u suprotnosti sa podacima o aktivnosti kiselih fosftaza dobijenih na kičmenjacima. U eksperimentu na *Cyprinus carpio* u tkivu jetre, pokazano je da je najniža aktivnost ALP i ACP bila

na hrani koja je imala visok sadržaj ugljenih hidrata, a na hrani sa visokim sadržajem proteina je bila niža u odnosu na hranu sa optimalnim odnosom proteina u odnosu na ugljene hidrate i lipide (Ahmad et al., 2012). Kisele i alkalne fosfataze imaju ulogu u varenju i apsorpciji kod dekapode *Penaeus penicillatus*, i u pozitivnoj su korelaciji sa metaboličkom aktivnošću (Chen et al., 1997). Yi i Adams (2001) su pokazali povećanu aktivnost s-ACP, kao i aktivnost m-ALP u srednjem crevu *Leptinotarsa decemlineata* tokom perioda intenzivnog hranjenja i varenja hrane i značajno smanjivanje aktivnosti tokom dijapauze, što je povezano sa hormonskom kontrolom aktivnosti ovih enzima. Stimulatorni efekat alatotropina na sintezu juvenilnog hormona dovodi do povećane aktivnosti fosfataza u digestivnom traktu (Sridhara & Bhat, 1963; Yi & Adams, 2001). Aktivnost kiselih fosfataza kod *Neobellieria bullata* je niska tokom perioda hranjenja larvi i značajno povećana tokom formiranja lutke. U svom radu na ovoj vrsti, Csikos & Sas (1997) su pokazali da je ova promena aktivnosti tokom razvića povezana sa titrom ekdistroida i ulogom u razgradnji larvenih tkiva tokom metamorfoze. Hormonska regulacija aktivnosti alkalnih i kiselih fosfataza zida srednjeg creva larvi i lutki, u zavisnosti od titra ekdisteroida, ustanovljena je i kod lepidoptere *Galleria mellonella* (Nemec & Ženka, 1996). Visoka aktivnost ALP prati visok titar ekdisteroida, dok je aktivnost ACP visoka kada je titar ekdistroida nizak (Nemec & Ženka, 1996), što ukazuje da kisele fosfataze dostižu maksimum aktivnosti tokom metamorfoze (Goncu & Parlak, 2011). Aktivnost lizosomalne kisele fosfataze srednjeg creva *Bombyx mori* je značajno smanjena na hrani sa dodatkom redukujućeg šećera, D-galaktoze, koji dovodi do lipidne peroksidacije membrana, dok je aktivnost mikrozomalne ACP u tim uslovima povećana (Gaikwad et al., 2010).

Digestivne kisele fosfataze i lipaza pokazuju sličan obrazac aktivnosti u odgovoru na delovanje temperature i sastav dijeta. Balansiran sastav dijeta smanjuje aktivnost ovih enzima, dok suboptimalna temperatura deluje u pravcu povećanja njihove aktivnosti. Aktivnosti kiselih fosfataza su u značajnoj negativnoj korelaciji sa aktivnošću proteolitičkih enzima, ukupnim proteazama, elastazom i

tripsinom na suboptimalnoj temperaturi od 19°C i hrani koja je najnepovoljnija za rast larvi (**h3**), tj. pri niskom sadržaju proteina u odnosu na ugljene hidrate (**Tabela 24**). S druge strane, aktivnosti kiselih fosfataza su u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa lipazom na dijetama sa smanjenim sadržajem ugljenih hidrata na suboptimalnoj temperaturi (**h4**) (**Tabela 24**), kao i na optimalnoj i povišenoj temperaturi i dijetetskom tretmanu **h2** (**Tabela 25 i 26**). Povećana aktivnost ACP u digestivnom traktu slepih miševa (čija ishrana se zasniva većim delom na različitim ugljenim hidratima) omogućava da se “pokupi” veća količina fosfatnih jona oslobođenih hidrolizom ATP (pri čemu je hidroliza ATP na ADP i P_i olakšana aktivnošću alkalne fosfataze) (Adefolaju *et al.*, 2009). Primarna uloga fosfataza je hidroliza fosfatnih monoestara (Sakharov *et al.*, 1989), ali ona učestvuje i u reakcijama transfosforilacije različitih jedinjenja (Millan, 2006), čime se povećava količina fosfatanih jona neophodnih za sintezu visokoenergetskih jedinjenja kao što je ATP i sintezu ATP-aze (Hollander, 1971) koja je od ključnog značaja za transport glukoze, amino kiselina i drugih organskih molekula kroz membranu epitelnih ćelija. Promene aktivnosti fosfataza mogu reflektovati i promene u sintezi i sekreciji enzima uključenih u varenje hrane, ekskreciju i druge funkcije (Basiouny, *et al.*, 2010). Smanjena aktivost fosfataza, kao posledica delovanja sekundarnih biljnih metabolita, insekticida i fluora, smanjuje efikasnost varenja i konverziju unete i svarene hrane (ECI i ECD), apsorpciju i transport hranljivih materija, kao i fosforilaciju različitih jedinjenja u ćelijama srednjeg creva insekata (Chen *et al.*, 2005; Nathan, 2006; Nathan *et al.*, 2007). Povećana aktivnost kiselih fosfataza na hrani sa niskim sadržajem proteina (**h3**) (**Tabela 22**), kao i značajna pozitivna korelacija kiselih fosfataza sa lipazom na hrani sa niskim sadržajem ugljenih hidrata (**Tabela 24**) pokazana u našem eksperimentu, može predstavljati kompenzatorni odgovor, koji može povećati efikasnost varenja, apsorpcije i transporta proteina i ugljenih hidrata u uslovima nutritivnog stresa.

Plastični odgovori digestivnih enzima na temperaturni stres

Promene temperature utiču na aktivnost različitih klasa enzima, kako digestivnih, tako detoksifikacionih i enzima intermedijarnog metabolizma (Chen & Denlinger, 1990; Singh *et al.*, 2010; Rajesh *et al.*, 2011; Jia *et al.*, 2011). Način na koji enzimi reaguju na promene temperature zavisi ne samo od njihovih biohemijskih karakteristika, termalne stabilnosti i temperaturnog i pH optimuma, već i od temperature životne sredine i nutritivnog kvaliteta hrane tokom razvića. Razlike u aktivnosti digestivnih enzima na različitim temperaturama mogu biti posledica različite termalne stabilnosti i različitih temperaturnih optimuma, kao i kompenzatornih odgovora koji omogućavaju uspostavljanje homeostaze u uslovima narušenog nutritivnog balansa i istovremenog delovanja nepovoljnih temperatura. Povećanje temperature može povećati efikasnost varenja čime se prevazilaze negativni efekti promene kvaliteta hrane (Zvereva & Kozlov, 2006).

Aktivnost proteaza kod lepidoptere *Manduca sexta* raste sa porastom temperature do 42°C (Kingsolver & Woods, 1997) dok niske temperature smanjuju aktivnost proteaza, a povećavaju aktivnost lipaze kod lepidoptere *Philosamia ricini* (Pant & Gupta, 1979). Rajesh i sar. (2011) su pokazali smanjenje aktivnosti različitih klasa serinskih proteaza u homogenatima celih larvi *Bombyx mori* V stupnja izloženih kratkotrajnom dejstvu visoke temperature. Pokazana je pozitivna regulacija gena za tripsin pod dejstvom visokih temperatura kod lutke *Delia antiqua* (Chen *et al.*, 2005a). Promena odgovora na dejstvo različitih temperatura je ustanovljena za proteazu i amilazu srednjeg creva larvi *Morimus funereus* izloženih dejstvu temperature od 35°C (Ivanović *et al.*, 1987). Aktivnost oba enzima je smanjena sedam dana nakon izlaganja stresnoj temperaturi (Ivanović *et al.*, 1992). Kod larvi *Morimus funereus*, promene aktivnosti digestivnih enzima pod delovanjem povišenih temperatura povezane su sa aktivnošću neurosekretnih neurona. Tako je, na primer, ustanovljena pozitivna korelacija između aktivnosti digestivnih proteaza i veličine A1 neurosekretnih neurona (Leković *et al.*, 2001). Kompenzacija aktivnosti proteaza kod larvi *Tenebrio molitor* aklimatizovanih na

niske temperature (Appelbaum *et al.*, 1964) je takođe povezana sa aktivnošću medijalnih neurosekretnih neurona (Jankovic-Hladni & Grozdanovic, 1969).

Aktivnost ukupnih proteaza u našem eksperimentu nije pokazala značajnu promenu u zavisnosti od temperature na kojoj su larve gajene do četvrog larvenog stupnja (**Tabela 16**). Međutim, temperaturne norme reakcije jesu zavisile od nutritivnog kvaliteta hrane, kako od sadržaja proteina, tako i od sadržaja ugljenih hidrata. Pokazan je značajan trend porasta aktivnosti ukupnih proteaza sa povećanjem temperature na nutritivno najsiromašijoj (**h4**) i pad aktivnosti na nutritivno najbogatijoj hrani (**h1**) (**Tabela 16**). Pored toga, u odgovoru na porast temperature aktivnost ukupnih proteaza raste na dijeti sa niskim sadržajem proteina i smanjuje se na dijeti sa visokim sadržajem proteina (**Tabela 17**). Trend povećanja aktivnosti sa porastom temperature uočava se i kod larvi na dijeti sa niskim sadržajem ugljenih hidrata. Ovi kompenzatorni odgovori ukazuju na prilagođavanje sinteze i sekrecije proteaza u uslovima povišenih temperatura i nutritivnog stresa. Kompenzatorni odgovor treba da omogući zadovoljavanje povećanih potreba za proteinima, usled povećanja relativne brzine rasta na višim temperaturama, ali i da kompenzuje nepovoljne efekte visokih temperatura.

Enopeptidaza elastaza i egzopeptidaza, leucin aminopeptidaza, pokazuju obrnut obrazac aktivnosti u odnosu na temperaturu. Dok aktivnost elastaze raste sa porastom temperature, aktivnost leucin aminopeptidaze se smanjuje pri istom temperaturnom trendu (**Slika 8 i 10, Tabela 16**). Ovakvi odnosi aktivnosti mogu ukazati na različit temperaturni optimum enzima, promenu kvantitativnih odnosa između endo i egzopeptidaza uslovljenu promenom temperature, kao i na razlike u odgovoru slobodnih i membranski vezanih enzima (leucin aminopeptidaza) na povećanje temperature. Leucin aminopeptidaza lepidoptera je membranski vezan enzim (Valaitis, 1995) pa povećanje temperature koje dovodi do povećane fluidnosti i promene sastava i strukture membranskih lipida (Hazel, 1995; Hochachka & Somero, 2002; van Dooremalen *et al.*, 2011) može uticati na promenu aktivnosti enzima. Sa porastom temperature korelacije između endopeptidaza i

egzopeptidaze-leucin aminopeptidaze se povećavaju na nutritivno najbogatijoj i smanjuju na nutritivno najsiromašnijoj dijeti (**Tabele 24, 25 i 26**), što može ukazati da u uslovima delovanja stresnih temperatura, koje indukuju stvaranje reaktivnih molekula kiseonika i oksidativni stres u ćelijama, leucin aminopeptidaza može zajedno sa detoksifikacionim enzimima učestvovati u prevazilaženju negativnih posledica narušavanja ćelijske homeostaze (Matsui *et al.*, 2006).

Endokarbohidraza, α -amilaza i egzokarbohidraza, α -glikozidaza, slično endo i egzopeptidazama, pokazuju „obrnut“ obrazac aktivnosti sa porastom temperature - aktivnost endokarbohidraze se povećava, a aktivnost egzokarbohidraze se smanjuje sa porastom temperature (**Tabela 18; Slike 11 i 12**). Ovakav „obrnut“ obrazac aktivnosti između endo i egzokarbohidraze u odgovoru na povećanje temperature, može ukazati na različite mehanizme regulacije njihove aktivnosti na različitim temperaturama. Temperaturne norme reakcije aktivnosti amilaze zavise od sadržaja proteina i ugljenih hidrata u hrani. Porast temperature dovodi do povećanja aktivnosti amilaze na nutritivno bogatoj (h1 i h2) i smanjenja aktivnosti na nutritivno siromašnoj hrani (h3 i h4) (**Tabela 18**). Porast temperature dovodi i do tendencije porasta aktivnosti amilaze na visokim proteinima (**Tabela 19**). U odgovoru na povećanje temperature, porast aktivnosti amilaze je veći na niskim, dok se na visokim ugljenim hidratima aktivnost amilaze ne menja značajno sa temperaturom (**Tabela 19**), a osetljivost amilaze na nizak sadržaj proteina u dijeti se povećava ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata nizak (**Tabela 19**). Ove interakcije ukazuju na značaj prilagođavanja aktivnosti amilaze u zavisnosti od sadržaja proteina i ugljenih hidrata u hrani u odnosu na temperaturu ($T \times Hr$, $T \times Ug$ i $T \times Pr$) i prilagođavanja u odnosu na njihov relativan odnos ($Ug \times Pr$).

Jedina značajna i pozitivna korelacija između aktivnosti α -amilaze i α -glikozidaze je na nutritivno bogatoj hrani i povišenoj, stresnoj temperaturi (**Tabela 26**). Moguće je da se na povišenoj temperaturi veća količina energije troši na sintezu digestivnih, kao i drugih klasa enzima, koji treba da obezbede dovoljnu

količinu proteina (amino kiselina) i dovoljno energije neophodne za brz rast, ali i za prevazilaženje negativnih posledica delovanja povišenih temperatura. Značajne negativne fenotipske korelacije između aktivnosti α -amilaze i lipaze i značajna pozitivna korelacija između α -glikozidaze i lipaze na suboptimalnoj temperaturi i nutritivno bogatoj hrani (**Tabela 24**), mogu ukazati na kompenzatorne odgovore endo i egzokarbohidraza na suboptimalnim temperaturama u zavisnosti od nutritivnog sadržaja hrane.

Kod nekih vrsta je pokazano da aktivnost amilaze zavisi od aklimacije na različite temperature. Urbašek i Rusek (1994) su pokazali povišenu amilolitičku aktivnost planinskih populacija kolebole *Tetrodontophora bielanensis* aklimatizovanih na niže temperature. Aktivnost amilaze se povećala aklimacijom na nisku temperature i kod *Onychiurus arcticus*, a sa povećanjem temperature došlo je do sporijeg smanjivanja aktivnosti u odnosu na aktivnost kod vrsta adaptiranih iz umerenih regiona adaptiranih na više temperature (Šustr & Block, 1998).

Postoji malo podataka o ekspresiji digestivnih **lipaza** kod različitih vrsta insekata na različitim biljkama domaćinima i u različitim temperaturnim uslovima (Terra & Fereirra, 2005; Heidel-Fischer *et al.*, 2012). Većina podataka se odnosi na aktivnost lipaza u zavisnosti od sadržaja makronutrijenata u hrani (Zinke *et al.*, 2002; Grillo *et al.*, 2007; Lwlababa *et al.*, 2010). Aktivnost lipaze je u proseku viša na temperaturi od 19°C i smanjuje se sa porastom temperature (**Tabela 20; Slika 13**). Na nepovoljnim temperaturama, 19 i 28°C dolazi do porasta aktivnosti lipaze na nutritivno siromašnoj hrani, odnosno hrani sa niskim sadržajem proteina (**Slika 13**), što može ukazati na potrebu maksimalnog korišćenja hranljivih materija kada je njihova koncentracija u hrani niska, naročito na suboptimalnoj temperaturi, (detaljnije, pogledati na str. 13). Negativna korelacija ukupnih proteaza, kao i svih proteolitičkih enzima ponaosob, sa lipazom na temperaturi 23°C i hrani sa visokim sadržajem proteina i ugljenih hidrata (**Tabela 24, 25 i 26**), ukazuje da nije neophodna visoka aktivnost lipaze da bi se obezbedila dovoljna količina energije

za različite fiziološke procese razgradnjom lipida u optimalnim uslovima gajenja. Na suboptimalnoj temperaturi i nutritivno siromašnoj hrani (**h4**), aktivnost lipaze je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa kiselim fosfatazama (**Tabela 24**).

Digestivne *fosfataze* pokazuju obrnut obrazac aktivnosti u odnosu na temperaturu - specifična aktivnost alkalnih fosfataza raste, a aktivnosti kiselih fosfataza se smanjuju sa porastom temperature (**Tabela 22; Slika 14, 15 i 16**). Temperaturne norme reakcije aktivnosti alkalnih fosfataza zavise od nutritivnog sadržaja hrane, na šta upućuju značajne interakcije između temperature i hrane, kao i temperature i sadržaja proteina i sadržaja ugljenih hidrata (**Tabela 22 i 23**).

Pokazano je da su alkalne fosfataze *Drosophila* digestivnog trakta deo odgovora na delovanje različitih stresora, uključujući i visoku temperaturu. Nakon izlaganja toplotnom stresu, aktivnost alkalnih fosfataza se prvo smanjuje a potom raste (Sukhanova *et al.*, 1996). Aktivnost ALP u stresnim uslovima je regulisana nivoom hormona stresa, dopamina i oktopamina, čija sinteza i sekrecija između ostalog, zavise od juvenilnog hormona (JH) i hidroksiekdizona (20 HE) (Grutenko *et al.*, 2004; Rauschenbach *et al.*, 2007a). Juvenilni hormon se sintetise u *corpora allata* i važan je i u otpornosti insekata na visoke temperature. Povećanje sinteze i sekrecije JH, nakon jednog sata delovanja visokih temperatura kod *Drosophila virillis* i *D. melanogaster*, dovodi do snižavanja nivoa dopamina i do povećanja aktivnosti alkalnih fosfataza (Rauschenbach *et al.*, 2007b). Tretman ženki *Drosophila virilis* i *D. melanogaster* JH i 20HE dovodi do značajne promene intenziteta odgovora (u smislu povećanja) alkalnih fosfataza na delovanje toplotnog stresa (Rauschenbach *et al.*, 2007b). Za razliku od prethodnog, povećanje nivoa dopamina u stresnim uslovima dovodi do smanjene aktivnosti alkalnih fosfataza *Drosophila* (Bogomolova *et al.*, 2010), a smanjena sinteza juvenilnog hormona, usled ablacije *corpora allata*, dovodi smanjene aktivnosti ALP i do modulacije aktivnosti alkalnih fosfataza u toplotnom stresu kod *Drosophila* (Grutenko *et al.*, 2012). Wojewodicz i sar. (2011) su pokazali da temperatura značajno utiče na ekspresiju alkalnih fosfataza *Daphnia magna* i da je uticaj temperature značajniji od koncentracije fosfora u hrani. Povećana aktivnost

enzima na nižim temperaturama (overekspresija) zajedno sa nedostatkom fosfora, predstavlja kompenzatorni odgovor koji omogućava neophodnu aktivnost enzima u oslobađanju dovoljne količine fosfora za rast.

Povećanje temperature dovodi do smanjenja aktivnosti ukupnih i lizozomalnih kiselih fosfataza (**Tabela 22, Slike 15 i 16**). Naši nalazi su u skladu sa nalazima drugih autora na lepidopterama, koji uglavnom pokazuju snižavanje aktivnosti kiselih fosfataza sa porastom temperature, pri čemu se većina podataka odnosi na masno telo, hemolimfu, a manji broj na digestivne fosfataze. Pandey i sar. (2012) su na svilenoj bubi *Antheraea mylitta* pokazali povećanu aktivnost kiselih fosfataza masnog tela na nižim temperaturama u odnosu na prirodne uslove u kojima temperature variraju u opsegu 35-45°C, kao i generalno višu aktivnost ACP masnog tela u odnosu na hemolimfu, bez obzira na temperaturu. Izlaganje larvi *Philosamia ricini* niskoj temperaturi (aklimacija na 10°C u trajanju od sedam dana) dovodi do značajnog povećanja aktivnosti i kiselih i alkalnih fosfataza u masnom telu i žlezdama koje stvaraju svilu i smanjenja aktivnosti ACP u hemolimfi (Singh *et al.*, 2010). Pokazan je značajan porast aktivnosti kiselih fosfataza tokom embrionalnog razvića pirinčanog moljca, *Corcyra cephalonica* (Lepidoptera) sa snižavanjem temperature od 28°C na 24°C, kao i značajno produžavanje razvića na nižoj temperaturi usled smanjene aktivnosti kiselih fosfataza (Chaubey *et al.*, 2010). Ovi nalazi govore u prilog rezultatima na gubaru u ovom radu po kojima je aktivnost kiselih fosfataza u značajnoj pozitivnoj korelaciji jedino sa trajanjem razvića, i to na nutritivno siromašnoj hrani i optimalnoj i povišenoj temperaturi (**Tabela 29 i 30**).

Povećana aktivnost enzima na temperaturi nižoj od optimalne, putem povećanja koncentracije enzima i/ili povećanjem afiniteta enzima za supstrat, može predstavljati kompenzatorni odgovor koji omogućava višu aktivnost enzima na nižim temperaturama (Hochachka & Somero, 2004). Kompenzatorni mehanizmi tokom aklimacije mogu biti povećana ekspresija iste izoforme enzima i/ili ekspresija novih izoformi sa različitim kinetičkim karakteristikama.

Obrnuti obrasci aktivnosti u odgovoru na delovanje temperature, tj. porast aktivnosti nekih enzima uz istovremeno smanjivanje aktivnosti drugih enzima sa porastom temperature, kao što je ustanovljeno za endo i egzo-peptidaze (elastaze i leucin aminopeptidaze), endo i egzokarbohidraze (α -amilaze i α -glikozidaze) i alkalnu i kisele fosfataze, ukazuju na evoluciju različitih mehanizama regulacije ovih enzima u uslovima delovanja nepovoljnih temperatura.

5.4. REZISTENTNOST NA VISOKU TEMPERATURU

Organizmi su u prirodnim uslovima konstantno izloženi promenama različitih faktora životne sredine, koji mogu varirati od kratkotrajnih fluktuacija tokom individualnog razvića do dugotrajnih promena tokom više generacija. Sposobnost da detektuju, tolerišu i/ili se adaptiraju na promene životne sredine je ključna za preživljavanje individua i populacija (Cossins & Bowler, 1987; Boggs, 2009; Chown *et al.*, 2010; Terblanche *et al.*, 2010). Insekti koriste različite mehanizme da prežive stresne uslove među kojima je fenotipska plastičnost veoma važna (West-Eberhard, 2003; Pigliucci, 2005; Whitman, 2009). Fenotipska plastičnost izazvana promenama temperature je prisutna kod većine organizama (Angiletta, 2009), a kod insekata ona uključuje kratkotrajnu aklimaciju (*hardening*), razvojnu plastičnost i aklimaciju/aklimatizaciju, što podrazumeva prilagođavanja na različitim nivoima biološke organizacije (Chown & Terblanche, 2007; Moczek, 2010).

Larve gubara najduže preživljavaju stresnu temperaturu od 36°C ako su prethodno, do 3. dana IV stupnja, gajene na optimalnoj temperaturi od 23°C suprotno pretpostavci da će prethodna aklimacija na 28°C omogućiti prednost u preživljavanju stresne temperature od 36°C (**Slika 17**, **Tabele 32** i **33**). Pretpostavka je da aklimatizacija na određene uslove životne sredine povećava adaptivnu vrednost u toj sredini u odnosu na organizme koji nisu imali mogućnost da se aklimatizuju (Leroi *et al.*, 1994), odnosno da prethodno izlaganje umereno stresnim uslovima omogućava organizmu da se prilagodi na stres većeg intenziteta putem fizioloških, morfoloških ili promena u ponašanju. Leroi i sar. (1994) su odbacili hipotezu o povoljnom efektu aklimacije, jer je u eksperimentu na *Escherchia coli* aklimovanih na temperaturama 32° i 41.5°C tokom 7 generacija, pokazano značajno smanjenje performanse grupe aklimovane na 41.5°C i na test temperaturi 41.5°C i na 32°C. Hipoteza o korisnosti aklimacije (eng. *beneficial acclimation hypothesis*) je dovedena u pitanje i u drugim slučajevima (Huey & Berrigan, 1996, 1999; Wilson & Franklin, 2002; Woods & Harrison, 2002; Deere & Chown, 2006; Geister & Fischer, 2007). Rezultati ovog rada načelno govore u prilog

hipotezi o štetnosti aklimacije, koja predviđa značajno smanjenje performanse organizma izloženih ekstremnim uslovima (temperaturama) ukoliko su prethodno bili izloženi stresu umerenog intenziteta u odnosu na organizme gajene u optimalnim uslovima (Loeschcke & Hoffmann, 2002). Takođe, nalazi na gubaru ukazuju na verodostojnost hipoteze o optimalnoj temperaturi tokom razvića, koja predviđa da organizmi gajeni na umerenim temperaturama imaju veću adaptivnu vrednost u različitom opsegu temperatura, u odnosu na organizme gajene na nižim odnosno povišenim temperaturama (Zamudio *et al.*, 1995; Huey & Berrigan, 1996, 1999). Međutim, rezultati na *Cydia pomonella* aklimovanih u laboratorijskim uslovima na temperaturama 20, 25 i 30°C, pokazuju da prethodna aklimacija na niže temperature poboljšava performansu na nižim temperaturama u prirodi. Cena aklimacije na niskim temperaturama podrazumeva lošiju performansu na višim temperaturama, dok aklimacija na povišene temperature u laboratorijskim uslovima omogućava bolju performansu adulta u različitom opsegu temperatura u prirodi u odnosu na organizme bez prethodne aklimacije i/ili one aklimovane na nižim temperaturama. Ovakvi nalazi bi, dakle, govorili u prilog hipotezi o povoljnim efektima aklimacije (Chidawanyika & Terblanche, 2011b). U eksperimentu na adultima *Liriomyza huidobrensis* je pokazano da kratkotrajna aklimacija na povišene temperature (32 i 35°C) značajno povećava termotolerantnost prema visokim ali ne i niskim temperaturama (Huang *et al.*, 2007). Takođe, u ovom radu na gubarima nije potvrđena hipoteza po kojoj stres umerenog intenziteta ima pozitivan, hormetički efekat na preživljavanje na visokoj temperaturi od 36°C (Kristensen *et al.*, 2003; Hercus *et al.*, 2003; Scannapieco *et al.*, 2007; Sorensen *et al.*, 2008). Smatra se da se u osnovi hormetičkog odgovora na dejstvo visokih temperature nalazi sinteza Hsp (Kristensen *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2008). U eksperimentu na voćnim mušicama, *Ceratitis capitata* i *Ceratitis rosa*, pokazano je da aklimacija na povišenu temperaturu, u trajanju od nekoliko časova/nekoliko dana, značajno poboljšava tolerantnost prema visokim temperaturama (Nyamukondiwa & Terblanche, 2010), ali da je trajanje aklimacije koja ima pozitivne efekte ograničeno (Weldon *et al.*, 2011). Brakefield i sar. (2007)

su na *Bicyclus sp.* pokazali da razvojna plastičnost i aklimacija zajedno doprinose adaptivnim odgovorima na stres izazvan promenom temperature, hrane i vlažnosti. U eksperimentu na *Drosophila melanogaster* gajenih na temperaturama 18° i 25°C je pokazano da adulti koji su gajeni na temperaturi od 18°C imaju veću rezistentnost na gladovanje, oksidativni i toplotni stres, a analizom sastava lipida, proteina i glikogena je utvrđen povećan nivo ovih materija i smanjena ekspresija gena Imd puta, vezanih za antimikrobni imuni odgovor. Svi ovi rezultati mogu se povezati sa uzrokom povećane rezistentnosti na stres kod organizama aklimovanih na nižoj temperaturi (Kim *et al.*, 2011).

Fiziološki efekti aklimacije ne moraju uvek biti adaptivni. Aklimacija na temperaturu koja je za 4°C niža odnosno viša u odnosu na optimalnu temperaturu gajenja u trajanju od 7-9 dana, kod *Acheta domesticus* dovodi do značajnog povećanja mortaliteta (Lachenicht *et al.*, 2010). Takođe, laboratorijski eksperimenti ukazuju da evolucija u uslovima konstantnih temperatura može smanjiti adaptivnu vrednost na ekstremno niskim/visokim temperaturama (Krebs *et al.*, 2001; Kingsolver & Nagle, 2007; Kingsolver *et al.*, 2009), odnosno da aklimacija na određeni opseg temperatura može dovesti do uzajamnih ograničenja/cene u drugačijim temperaturnim uslovima (Angilletta *et al.*, 2002) najčešće kroz smanjeni fekunditet (Silbermann & Tatar, 2000; Huang *et al.*, 2007; Marshall & Sinclair, 2010). Pokazano je da povećanje termotolerantnosti usled povećanja broja kopija gena za Hsp "na duže staze" ima za posledicu smanjeno preživljavanje (Solomon *et al.*, 1991; Krebs & Feder, 1997, 1998; Gong & Golic, 2006; Bettencourt *et al.*, 2008). Povećanje termalne tolerantnosti može biti povezano sa smanjenim kapacitetom za aklimaciju na temperaturu kod morskih artropoda (Stillman, 2003). Međutim, Calosi i sar. (2008) nisu pokazali uzajamna ograničenja između termalne tolerantnosti i kapaciteta za aklimaciju kod "vodenih" buba *Dendronectes sp.* (Coleoptera). Gornja temperaturna granica određuje kapacitet za aklimaciju. Vrste sa najmanjom tolerantnošću na visoke temperature imaju i najmanji kapacitet za aklimaciju i najosetljivije su na uticaj klimatskih promena (Calosi *et al.*, 2008).

U našem eksperimentu nije bilo kratkotrajnog pretretmana, već su larve izlagane temperaturi koja je za 4-5°C viša, odnosno niža od optimalne temperature gajenja. Povišena temperatura je bila ispod praga indukcije Hsp. Na različitim divljim i/ili domestifikovanim sojevima *Bombyx mori*, čije ćelije u *in vitro* uslovima karakteriše visoka termorezistentost, odnosno sinteza Hsp na temperaturama koje se približavaju 48°C, aklimacija ne mora biti povezana sa sintezom Hsp ukoliko je u opsegu "blago" povišenih temperatura (Manjunatha *et al.*, 2010). Termotolerantnost može biti uspostavljena i hroničnim izlaganjem temperaturama koje su ispod praga indukcije Hsp70 kao i povećanom aktivnošću antioksidativnih enzima (Hall *et al.*, 2000; Jia *et al.*, 2011; Celino *et al.*, 2011). Antioksidativni enzimi, katalaza, glutation transferaza i superoksid dismutaza zajedno sa Hsp, pomažu da se smanji lipidna peroksidacija membrana nastala delovanjem niskih i/ili visokih temperatura kod *Bactrocera dorsalis* (Jia *et al.*, 2011). Povećana termostabilnost ćelijskih membrana (Hazel, 1995; Hochachka & Somero, 2002; Overgaard *et al.*, 2008), povećanje koncentracije krioprotektanata kao što je sorbitol, koji u fiziološkim koncentracijama povećava termalnu stabilnost proteina i sprečava njihovu agregaciju održavajući katalitičku aktivnost enzima na višim temperaturama (Wolfe *et al.*, 1998; Salvucci, 2000; Salvucci *et al.*, 2000), očuvanje funkcije membranskih proteina kao što su jonske pumpe, Na⁺/K⁺-ATPaza i modulacija provodnosti K⁺ (Robertson, 2004), doprinose termotolerantnosti i mogu smanjiti potrebu za Hsp (Barua & Heckathorn, 2004). Sinteza Hsp je energetski skup proces i obično je povezana sa smanjenom i/ili prestankom sinteze drugih proteina u ćeliji (Parsell & Lindquist, 1994).

Nakon trećeg dana IV stupnja, larve gubara, prethodno aklimovanih na 19 i 28°C, izložene su stresnoj temperaturi od 36°C, na kojoj gubar ne može da završi razviće. Ova temperatura indukuje sintezu Hsp, dok normalna sinteza proteina nakon uklanjanja larvi gubara iz temperaturno stresnih uslova nastupa nakon 1-3 sata (Yocum *et al.*, 1991). Mehanizmi koji stoje u osnovi odgovora na tolotni stres (eng. *heat shock response*) tokom individualnog razvića nisu u potpunosti razjašnjeni. Efekat povišene ekspresije Hsp je kratkotrajan, a dugotrajno izlaganje

povišenim temperaturama prevazilazi njihov kapacitet u održavanju temperaturne tolerantnosti (Denlinger & Yocum, 1998). Različite klase Hsp imaju različite funkcije, ćelijsku lokalizaciju, tkivnu specifičnost, mehanizme regulacije i različitu ekspresiju na različitim temperaturama aklimacije (Barua & Heckathorn, 2004). Rezultati rada Ilijin (2009) ukazuju na moguću ekspresiju različitih formi hit šok proteina kod larvi gubara koje su do ulaska u IV stupanj gajene na optimalnoj temperaturi od 23°C, a potom izlagane stresnoj temperaturi od 35°C u trajanju od 1, 12 ili 24 časa. Nesporno je da sinteza Hsp70 ima ključnu ulogu u preživljavanju akutnog delovanja visokih temperatura (Feder & Hofmann, 1999; Hoffmann *et al.*, 2003; Sorensen *et al.*, 2003), kao i da inducibilni Hsp imaju važnu ulogu u termotolerantnosti i rezistentnosti na visoke temperature (Kregel, 2002; Gong & Golic, 2006; Bettencourt *et al.*, 2008; Bahrndorff *et al.*, 2009). Međutim, uloga Hsp u termotolerantnosti zavisi od vrste, tretmana i prethodne „termalne istorije“/pretretmana i ne mora uvek biti u pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom različitih formi Hsp (Yocum & Denlinger, 1992; Krebs & Feder, 1998; Johnson *et al.*, 2009; Bahrndorff *et al.*, 2010; Jensen *et al.*, 2010; Manjunatha *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012; Bublik *et al.*, 2012). Treba imati u vidu da je najveći broj podataka o ulozi Hsp, a posebno familije Hsp70 u inducibilnoj termotolerantnosti vezan za kratkotrajnu aklimaciju. Kratkotrajna aklimacija podrazumeva jedno i/ili ponovljena izlaganja temperaturi koja je za nekoliko stepeni niža od letalne temperature za datu vrstu u trajanju od nekoliko minuta do nekoliko časova (ta temperatura je iznad praga indukcije Hsp), a nakon toga sledi izlaganje toplotnom šoku velikog intenziteta (Yocum & Denlinger, 1992; Tiwari *et al.*, 1995; Gong & Golic, 2006; Huang *et al.*, 2007; Bettencourt *et al.*, 2008; Bahrndorff *et al.*, 2009). Takođe, u okviru familije Hsp70, treba praviti razliku između konstitutivnog Hsp70 koji je prisutan u ćeliji u „normalnim“ uslovima i inducibilnog Hsp koji se sintetiše nakon delovanja različitih stresora (Kregel, 2002; Mayer & Bukau, 2005). Odgovor na toplotni stres, koji nastaje nakon kratkotrajne aklimacije, menja transkripciju i translaciju velikog broja gena, od kojih mnogi nisu direktno povezani sa sintezom Hsp (DiDomenico *et al.*, 1982; Sorensen *et al.*, 2005a).

Ekspresija različitih klasa Hsp kod insekata je različita na različitim (visokim) stresnim temperaturama (Evgenev *et al.*, 1987; Lerman & Feder, 2001; Haung *et al.*, 2007; Velu *et al.*, 2008; Karl *et al.*, 2012), u različitim stupnjevima razvića (Sharma *et al.*, 2007; Bowler & Terblanche, 2008; Zhao & Jones, 2012) i u različitim tkivima (Garbuz *et al.*, 2002; Tachibana *et al.*, 2005; Velu *et al.*, 2008; Manjunatha *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2012). Važno je napomenuti i različitu ulogu Hsp u oporavku nakon toplotnog stresa (Lakhotia *et al.*, 2002; Gong & Golic, 2006; Sharma *et al.*, 2007; Velu *et al.*, 2008).

Uticaj temperature i nutritivnog kvaliteta hrane na rezistentnost larvi gubara prema visokoj stresnoj temperaturi ustanovljen u ovom radu, ukazuje da efekat ovih sredinskih faktora značajno zavisi kako od njihovih direktnih uticaja, tako i od međusobnih interakcija. Larve najduže preživljavaju stresnu temperaturu od 36°C na nutritivno najsiromašnijoj hrani, dok visok sadržaj proteina i ugljenih hidrata značajno skraćuje vreme preživljavanja (**Slika 17, Tabele 32 i 33**). Značaj ovih interakcija ogleda se i u trendu porasta rezistentnosti na stresnu temperaturu sa porastom temperature gajenja od 19-23-28°C na nutritivno najbogatijoj hrani, dok je na nutritivno najsiromašnijoj hrani ustanovljeno skraćivanje vremena preživljavanja sa porastom temperature gajenja. Takođe, porast rezistentnosti u odgovoru na nizak sadržaj proteina je veći ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata u hrani nizak. Temperatura gajenja ima marginalno značajan uticaj na trajanje IV stupnja na stresnoj temperaturi, dok visok sadržaj proteina u dijeti značajno skraćuje trajanje ovog stupnja na stresnoj temperaturi (**Slika 18, Tabela 32**).

Ishrana tokom larvenog razvića utiče na rezistentnost na stres izazvan delovanjem temperature (Smith *et al.*, 2007; Andersen *et al.*, 2010; Verdu *et al.*, 2010). Pokazano je da smanjeni kalorijski unos hrane (*caloric restriction*) poboljšava termotolerantnost (Wenzel, 2006; Smith *et al.*, 2007) i može imati pozitivan uticaj na povećanje dužine života kod insekata (Min *et al.*, 2007), kao i nizak odnos proteina u odnosu na ugljene hidrate (Simpson & Raubenheimer, 2009). Smanjena kalorijska vrednost hrane kod pacova uzrokuje smanjeno

stvaranje reaktivnih molekula kiseonika i smanjenu akumulaciju Hsp i povezana je sa indukcijom primarnih antioksidativnih enzima, Mn/CuSOD i translokacijom katalaze iz citoplazme u jedro ćelija jetre (Hall *et al.*, 2000). Kada je kvalitet resursa smanjen, aklimacija na visoku temperaturu kod *Drosophila melanogaster* dovodi do povećanog preživljavanja a manje veličine adulta (Bochdanovits & De Jong, 2003). Aklimacija kod *D. melanogaster* na visoku, odnosno nisku temperaturu i nutritivno siromašnu hranu dovodi do razlika u sticanju, efikasnosti korišćenja i raspodeli resursa. Na visokoj temperaturi i siromašnoj hrani, veći deo resursa se usmerava na preživljavanje nepovoljnih uslova a ne u rast, što uzrokuje manju veličinu tela. Na niskim temperaturama i nutritivno siromašnoj hrani resursi se više usmeravaju na povećanje mase, jer to povećava adaptivnu vrednost na niskoj temperaturi. Povećan unos nutritivno bogate hrane na višim temperaturama može imati svoju cenu kroz smanjeno preživljavanje (Chippindale *et al.*, 1998). Brojni rezultati, međutim, ukazuju na suprotne zaključke. Andersen i sar. (2010) na *Drosophila melanogaster* su pokazali da larve gajene na proteinski bogatom medijumu u adultnom stupnju imaju povećanu otpornost na delovanje visokih temperatura (i isušivanje), kao i povećanu ekspresiju gena za Hsp70, dok one gajene na medijumu sa visokom koncentracijom ugljenih hidrata imaju brži oporavak od kome izazvane hladnoćom. Kod pacova hranjenih dijetom sa visokom koncentracijom saharoze, došlo je do povećane ekspresije gena za Hsp70 i 27, što može ublažiti efekat delovanja različitih stresora (Kanazawa *et al.*, 2003).

Toplotni stres narušava ćelijsku homeostazu (Malmendal *et al.*, 2006), dovodi do smanjenja koncentracije metabolita uključenih u energetske metabolizam: glukoze, trehaloze i glikogena i do povećanja koncentracija slobodnih amino kiselina, naročito onih koje su prekursori hormona stresa, dopamina i oktopamina (Sukhanova *et al.*, 1997; Hirashima *et al.*, 2000). Više temperature dovode do povećanja intenziteta metabolizma (Clarke & Fraser, 2004). Odgovor gena osetljivih na delovanje toplotnog stresa ukazuje da dugotrajno/produženo izlaganje povišenoj temperaturi dovodi do supresije ćelijskog rasta, popravke oštećenih i *de novo* sinteze proteina, izaziva oksidativni

stres, utiče na imune funkcije organizma i preraspodelu i usmeravanje energije u ove procese (Kassahn *et al.*, 2007). Sve ovo ukazuje da je odgovor na stres veoma kompleksan. Mnogi od ovih odgovora mogu biti razlog zašto larve gajene na 19 i 28°C u našem eksperimentu imaju kraće vreme preživljavanja na temperaturi od 36°C u odnosu one gajene na optimalnoj temperaturi.

Broj presvlačenja kao parametar rezistentnosti na visoku temperaturu, ustanovljen u ovom radu, pokazuje na koji način uslovi gajenja utiču na sposobnost larvi gubara da se presvlače na stresnoj temperaturi od 36°C. Poređenje broja presvlačenja larvi na stresnoj temperaturi od 36°C, u odnosu na nutritivni kvalitet hrane, je pokazalo da najveći broj presvlačenja imaju larve koje su gajene na dijetama siromašnim ugljenim hidratima, a najmanji broj presvlačenja je ustanovljen na hrani koja ima najmanji odnos proteina i ugljenih hidrata, kada su one do IV stupnja bile gajene na 19°C (**Slika 19**). Negativan efekat ove hrane je pokazan i na temperaturama 28°C i 23°C, pa se može se zaključiti da je hrana koju karakteriše disbalans proteina u odnosu na ugljene hidrate, najnepovoljnija za razviće u uslovima visoke stresne temperature.

Ukoliko se procenjuje uticaj hrane nezavisno od uticaja temperature na sposobnost insekata da se presvlače u stresnim uslovima, gladovanje kao i nizak sadržaj ugljenih hidrata na početku poslednjeg larvenog stupnja, umesto formiranja lutke dovode do pojave dodatnog stupnja (Jones *et al.*, 1980, 1981; De La Garza *et al.*, 1991; Cymbrowski *et al*

5.5. INSEKTI I GLOBALNE KLIMATSKE PROMENE

Rezistentnost na toplotni stres je jedan od glavnih faktora koji određuje geografsko rasprostranjenje i brojnost insekata (Chown & Nicolson, 2004). Malo je podataka koji se odnose na uticaj temperature na rast i preživljavanje larvi gubara naročito u kontekstu globalnih klimatskih promena (Hättenschwiler & Schafellner, 2004; Kocsis & Hufnagel, 2011). Porast CO₂ u atmosferi dovodi do porasta temperature, a u biljkama do smanjenja sadržaja azota i povećanja sadržaja ugljenih hidrata (Traw *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 2000, 2003; Wang *et al.*, 2009; Ji *et al.*, 2011). Interakcija različitih biotičkih i abiotičkih faktora u prirodnim staništima utiče na kompleksnost normi reakcija različitih osobina performanse gubara (Rossiter *et al.*, 1988; van Frankenhuyzen *et al.*, 2008; Milenković *et al.*, 2010). Pored povećanja CO₂, povećanje temperature, promena količine padavina, fotoperioda, kao i promene nutritivnog kvaliteta biljaka domaćina utiču na populacionu dinamiku i promenu areala rasprostranjenja ove izrazito polifagne vrste (Gray, 2004; Vanhanen *et al.*, 2007).

Gubar je vrsta sa eruptivnom populacionom dinamikom i pokazuje periodične fluktuacije brojnosti gde prolazi kroz faze latence, progradacije, kulminacije i retrogradacije (Elkinton & Liebhold, 1990). Povećanje temperature, naročito u zimskom periodu, smatra se glavnim faktorom koji utiče na areal rasprostranjenja šumskih insekata zbog smanjenja mortaliteta u tom periodu (Veteli *et al.*, 2005). Povećanje srednje dnevne maksimalne i minimalne temperature za oko 1.5°C, kao posledica globalnih klimatskih promena, može dovesti do širenja opsega rasprostranjenja *Lymantria dispar* na sever i smanjivanja opsega rasprostranjenja na jugu i do ukupnog povećanja areala rasprostranjenja na području severne Amerike za oko 16% (Gray, 2004). Promena areala rasprostranjenja *Lymantria dispar* i *Lymantria monacha* kao posledica globalnog zagrevanja u Evropi, može dovesti do pomeranja granice na sever za oko 500-700 km i povlačenja južnog oboda za oko 100-900 km (Vanhanen *et al.*, 2007). Pokazano je da se u ravničarskim lišćarskim šumama pojave prenamnoženja

gubara javljaju periodično, svakih 10.6 godina, i da su sinhronizovane sa temperaturom i količinom padavina. Pik povećanja brojnosti populacija gubara povezan je sa značajnim povećanjem temperature u decembru, a pad sa značajnim povećanjem količine padavina u martu (Pernek *et al.*, 2008).

Larve gubara mogu „profitirati“ u nepovoljnim uslovima nutritivno siromašne hrane, jer je rezistentost gubara na temperaturni stres u laboratorijskim uslovima procenjena na osnovu vremena preživljavanja, pokazala najveću vrednost upravo u takvim uslovima (**Tabela 32**). Nasuprot tome, ograničavajući faktori preživljavanja u laboratorijskim uslovima predstavljeni su prethodnom aklimacijom na (konstantno) povišenu temperaturu tokom ranih stupnjeva larvenog razvića i visokim sadržajem proteina i ugljenih hidrata u hrani (**Slika 17**, **Tabela 33**). Najveću osetljivost temperaturne tolerantnosti na povećanje sadržaja proteina i ugljenih hidrata u hrani pokazuju larve koje su prethodno gajene na optimalnoj temperaturi, a značajan efekat interakcije sadržaja proteina i ugljenih hidrata pokazuje da je porast rezistentnosti u odgovoru na nizak sadržaj proteina veći ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata nizak (**Tabela 33**).

Sve pomenute interakcije temperature i nutritivnog sadržaja hrane nam ukazuju na kompleksnost odgovora u promenjenim uslovima životne sredine i na posledice variranja, čak i u relativno „uskom opsegu“, temperature i nutritivnog sastava hrane na performansu larvi gubara, što zajedno i/ili u interakciji sa drugim abiotičkim faktorima može uticati na promenu populacione dinamike i arel rasprostranjenja ove vrste. Pošto se u prirodi gubar susreće sa nutritivno i temperaturno heterogenim sredinama, prednost može biti relativno slična performansu u različitim sredinama (generalizam) u odnosu na specijalizaciju u jednoj sredini.

U predviđanju efekata globalnih klimatskih promena, fiziološki kapaciteti vrsta i opseg u kome oni mogu da se menjaju bilo putem plastičnosti u okviru jedne generacije ili transgeneracijski, tj. evolucijom, kao i promene plastičnih odgovora ili njihovo odsustvo, ključni su faktori koji će odrediti biloški odgovor vrsta (Chown

et al., 2010). Ukoliko evolucione promene ili plastično prilagođavanje nisu mogući i/ili njihov tempo ne prati promene u životnoj sredini, demografski efekti mogu voditi lokalnom izumiranju vrsta (Chevin *et al.*, 2010; Hoffmann & Sgro, 2011). Velika variranja temperature mogu smanjiti, ograničiti i/ili izazvati plastične odgovore u suprotnom smeru od onog koji se smatra adaptivnim (Chevin *et al.*, 2010; Chown *et al.*, 2010). Insekti suočeni sa velikim temperaturnim ekstremima mogu biti “prisiljeni” da se mnogo više oslanjaju na promene u ponašanju u borbi sa klimatskim promenama (Huey *et al.*, 2003), što povratno može uticati na populacionu dinamiku i adaptivnu vrednost (Kearney *et al.*, 2010). Takođe, iz rezultata ovog rada postaje jasno da se u razmatranju ekoloških i evolucionih promena populacija gubara moraju se uzeti u obzir i raznovrsne interakcije temperature sa drugim abiotičkim i biotičkim faktorima.

ZAKLJUČCI

1. Uticaj i temperature i nutritivnog kvaliteta hrane na komponente adaptivne vrednosti

1.1. Nutritivni kvalitet hrane nije ograničavajući faktor za preživljavanje larvi gubara za razliku od povišene temperature, koja značajno smanjuje preživljavanje u ranim larvenim stupnjevima (I-IV).

1.2. Uticaji temperature, sadržaja proteina i sadržaja ugljenih hidrata na trajanje razvića do ulaska u IV larveni stupanj su međusobno nezavisni. Suboptimalna temperatura i nizak sadržaj proteina u hrani značajno produžavaju trajanje, dok nizak sadržaj ugljenih hidrata pokazuje trend skraćivanja trajanja razvića.

1.3. Nepovoljne temperature, 19° i 28°C, kao i nutritivno siromašna hrana značajno smanjuju masu larvi. Sadržaj ugljenih hidrata nema značajan uticaj na masu, ali je smanjenje mase u odgovoru na nizak sadržaj proteina veće ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata u hrani nizak.

1.4. Nizak sadržaj proteina i visok sadržaj ugljenih hidrata u hrani predstavljaju ograničavajuće faktore za relativnu brzinu rasta larvi (RGR). Iako nije pokazana značajna interakcija temperature i nutritivnog sadržaja hrane, RGR je osetljivija na nizak sadržaj proteina u hrani ako se larve gaje na povišenoj temperaturi.

2. Promene kvantitativno-genetičkih parametara u nutritivno i temperaturno heterogenim sredinama

2.1. Heritabilnost trajanja razvića do IV stupnja ne pokazuje značajne razlike između različitih uslova gajenja. Porast temperature značajno

smanjuje heritabilnost mase larvi ako je u hrani nizak sadržaj jednog ili oba nurijskih faktora.

- 2.2. Pokazana je značajna varijabilnost fenotipske plastičnosti trajanja razvića u odgovoru na delovanje temperature, ali ne i u odgovoru na variranje kvaliteta hrane. Za masu larvi nije pokazana varijabilnost fenotipske plastičnosti.
- 2.3. Većina genetičkih korelacija između trajanja razvića i mase larvi je negativna u nepovoljnim uslovima životne sredine, tj. larve koje karakteriše duže larveno razviće istovremeno imaju i manju masu, dok u optimalnim uslovima nisu detektovane značajne korelacije između ovih osobina.
- 2.4. Sve genetičke korelacije između sredina za trajanje razvića larvi su pozitivne i nisu značajno različite od „1” tako da predstavljaju ograničenje za evoluciju fenotipske plastičnosti. Genetičke korelacije između sredina za masu larvi su pozitivne i značajno različite od „1” i, mada za masu larvi nije pokazana varijabilnost fenotipske plastičnosti, evolucija plastičnosti je moguća usled značajnih razlika u heritabilnosti između sredina.

3. Digestivna plastičnost u odgovoru na nutritivni i temperaturni stres

- 3.1. Digestivni enzimi koji učestvuju u varenju proteina, ukupne proteaze i tripsin, imaju nižu aktivnost na hrani sa visokim sadržajem proteina u odnosu na hranu sa niskim sadržajem proteina, što ukazuje na homeostatsku regulaciju njihove aktivnosti.
- 3.2. Kompenzatorni odgovor ukupnih proteaza na povećanje temperature predstavlja povećanje aktivnosti sa porastom temperature (19°-23°-28°C) na nutritivno najsiromašnijoj hrani i smanjenje aktivnosti na nutritivno najbogatijoj hrani.

- 3.3. U odnosu na sadržaj proteina u hrani, plastični odgovor ukupnih proteaza predstavlja povećanje aktivnosti sa porastom temperature na hrani sa niskim sadržajem i smanjivanje aktivnosti na hrani sa visokim sadržajem proteina.
- 3.4. Aktivnost elastaze je visoka na hrani sa visokim sadržajem proteina što ukazuje na mehanizam sekretagoge u regulaciji aktivnosti ovog enzima.
- 3.5. Aktivnost leucin aminopeptidaze je visoka na hrani sa visokim sadržajem proteina i ugljenih hidrata i menja se u zavisnosti od interakcija ovih komponenti hrane. Aktivnost enzima je osjetljivija na promene sadržaja proteina ako su larve hranjene dijetom sa visokim sadržajem ugljenih hidrata.
- 3.6. Digestivni enzimi koji učestvuju u varenju ugljenih hidrata, α -amilaza i α -glikozidaza, pokazuju višu aktivnost na hrani sa visokim sadržajem proteina i nižu aktivnost na hrani sa niskim sadržajem proteina a visokim sadržajem ugljenih hidrata, kao i na nutritivno siromašnoj hrani, što ukazuje na homeostatsku regulaciju njihove aktivnosti.
- 3.7. Kompenzatorni odgovor aktivnosti α -amilaze na variranje temperature i kvaliteta hrane sastoji se u porastu aktivnosti sa porastom temperature na nutritivno najbogatijoj hrani i smanjivanje aktivnosti na nutritivno najsiromašnijoj hrani. U odnosu na sadržaj ugljenih hidrata, porast aktivnosti sa porastom temperature pokazan je samo na dijetama sa niskim sadržajem ugljenih hidrata.
- 3.8. Aktivnost lipaze je niža na hrani sa optimalnim balansom proteina i ugljenih hidrata u odnosu na hrane sa niskim sadržajem proteina. Kompenzatorni odgovor ovog enzima na nepovoljne temperature, 19 i 28°C, predstavlja porast aktivnosti na hrani sa niskim sadržajem

proteina, kao i veći porast aktivnosti na hrani sa niskim sadržajem proteina ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata nizak.

- 3.9. Za aktivnost alkalnih fosfataza najznačajnije su interakcije sadržaja proteina i ugljenih hidrata u hrani. Aktivnost ovog enzima se smanjuje sa porastom temperature na nutritivno najbogatijoj hrani a raste sa porastom temperature na hrani sa niskim sadržajem proteina, odnosno niskim sadržajem ugljenih hidrata.
- 3.10. Aktivnosti kiselih fosfataza (ukupne i lizosomalne) su niže na hrani sa optimalnim balansom proteina i ugljenih hidrata u odnosu na hranu sa manjim sadržajem proteina u odnosu na ugljene hidrate. Proteini i ugljeni hidrati imaju nezavisno uticaj na promenu aktivnosti ovih enzima. Aktivnost kisele fosfataze je niža na hrani sa visokim sadržajem proteina i viša na hrani sa visokim sadržajem ugljenih hidrata.
- 3.11. Značajna interakcija temperature i hrane, odnosno promena temperaturnih normi reakcija u zavisnosti od nutritivnog sastava hrane je pokazana za aktivnost ukupnih proteaza, leucin aminopeptidaze, α -amilaze, lipaze i alkalne fosfataze. U grupi enzima kod kojih hrana i temperatura deluju nezavisno, tj. nisu pokazane značajne interakcije ovih faktora su elastaza, tripsin, α -glikozidaza i kisele fosfataze.
- 3.12. Obrnuti obrasci aktivnosti u odnosu na delovanje temperature tj. porast aktivnosti nekih enzima uz istovremeno smanjivanje aktivnosti drugih enzima sa porastom temperature, ustanovljeni su za aktivnosti endopeptidaze-elastaze i egzopeptidaze-leucin aminopeptidaze, endo i egzokarbohidraze, α -amilazu i α -glikozidazu i alkalnu i kisele fosfataze.
- 3.13. Uočene su i značajne fenotipske korelacije između pojedinih klasa enzima, značajne negativne korelacije između proteolitičkih enzima i

kiselih fosfataza na hrani sa najmanjim odnosom proteina i ugljenih hidrata, značajne pozitivne korelacije između proteolitičkih enzima i alkalnih fosfataza na nutritivno najsiromašnijoj hrani i značajne pozitivne korelacije kiselih fosfataza i lipaze na hrani siromašnoj ugljenim hidratima - sve na nepovoljnim temperaturama. Različiti obrasci aktivnosti pojedinih enzima u odnosu na delovanje temperature, zajedno sa uočenim korelacijama između pojedinih klasa enzima u uslovima istovremenog delovanja nepovoljnih temperatura i nutritivnog stresa, ukazuju na evoluciju različitih mehanizama regulacije ovih enzima u stresnim uslovima.

4. Rezistentost na visoku temperaturu

- 4.1. U uslovima delovanja stresne temperature od 36°C, prethodno izlaganje povišenoj temperaturi od 28°C značajno skraćuje vreme preživljavanja na stresnoj temperaturi.
- 4.2. Larve gubara najduže preživljavaju temperaturu od 36°C na nutritivno najsiromašnijoj hrani. Na nutritivno najbogatijoj hrani uočava se trend porasta rezistentnosti na stresnu temperaturu sa porastom temperature gajenja od 19-23-28°C, dok je na nutritivno najsiromašnijoj hrani pokazan trend smanjenja vremena preživljavanja sa porastom temperature gajenja.
- 4.3. Visoka koncentracija proteina i ugljenih hidrata u hrani značajno skraćuje vreme preživljavanja. Porast rezistentnosti u odgovoru na nizak sadržaj proteina je veći ukoliko je i sadržaj ugljenih hidrata u hrani nizak.
- 4.4. Rezistentnost prema stresnoj temperaturi procenjena na osnovu broja presvlačenja, ukazuje da na suboptimalnoj temperaturi gajenja, najnepovoljniji efekat na sposobnost larvi da se presvlače na stresnoj temperaturi ima hrana sa najmanjim odnosom proteina i ugljenih

hidrata. Uticaj temperature gajenja na sposobnost larvi da se presvlače na stresnoj temperaturi je značajan na nutritivno najsiromašnijoj hrani, tako što se sa porastom temperature od 19° na 28°C povećava procenat larvi sa manjim bojem presvlačenja.

LITERATURA

- Addo-Bediako** A., Chown S. L. & Gaston K. J. (2000) Thermal tolerance, climatic variability and latitude. *Proc. R. Soc. Lond. B* 267, 739–745.
- Adefolaju** G. A., Caxton-Martins A. E., Enaibe B. U., Alabi O. T. & Ajao M. S. (2009) Acid and alkaline phosphatase activities in the small intestine of the Rat (*Rattus norvegicus*), bat (*Eidolon helvum*) and pangolin (*Manis tricuspis*). *Int. J. Pharmacol.* 6: DOI: 10.5580.
- Agashe** D., Falk J. J. & Bolnick D. I. (2011) Effects of founding genetic variation on adaptation to a novel resource. *Evolution* 65, 2481–2491.
- Agrawal** A. A. (2001) Phenotypic plasticity in the interactions and evolution of species. *Science* 294, 321-326.
- Ahmad** M., Qureshi T. A. and Singh A. B. (2012) Effect of dietary protein, lipid and carbohydrate contents on the liver composition and enzyme activity of *Cyprinus carpio communis* fingerlings. *Internat. J. Fish. Aquacul.* 4, 22-29.
- Ali** A., Luttrell R. G. & J. C. Schneider (1990) Effects of temperature and larval diet on development of the fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83, 725-733.
- Allen** C. E., Beldade P., Zwaan B. J. & Brakefield P. M. (2008) Differences in the selection response of serially repeated color pattern characters: standing variation, development, and evolution. *BMC Evol Biol.* 8, 94.
- Andersen** L. H., Kristensen T. N., Loeschcke V., Toft S. & Mayntz D. (2010) Protein and carbohydrate composition of larval food affects tolerance to thermal stress and desiccation in adult *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 56, 336–340.
- Anderson** T. R., Hessen D. O., Elser J. J. & Urabe J. (2005) Metabolic stoichiometry and the fate of excess carbon and nutrients in consumers. *Am. Nat.* 165, 1-15.
- Angelucci** C., Barrett-Wilt G. A., Hunt D. F., Akhurst R. J., East P. D., Gordon K. H. J. & Campbell P. M. (2008) Diversity of aminopeptidases, derived from four

- lepidopteran gene duplications, and polycalins expressed in the midgut of *Helicoverpa armigera*: Identification of proteins binding the δ -endotoxin, Cry1Ac of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 685-696.
- Angilletta** M. J. (2006) Estimating and comparing thermal performance curves. *J. Thermal Biol.* 31, 541-545.
- Angilletta** M. J. (2009) *Thermal Adaptation: A Theoretical and Empirical Synthesis*. Oxford University Press, Oxford.
- Angilletta** M. J., Niewiarowski P. H. & Navas C. A. (2002) The evolution of thermal physiology in ectotherms. *J. Thermal Biol.* 27,249-268.
- Angilletta** M. J., Wilson R. S., Navas C. A. & James R. S. (2003) Trade offs and the evolution of thermal reaction norms. *Trends Ecol. Evol.* 18, 234-240.
- Applebaum** S. W., Jankovic M., Grozdanovic J. & Marinkovic D. (1964) Compensation for temperature in the digestive metabolism of *Tenebrio molitor* larvae. *Physiol. Zool.* 37, 90-95.
- Applebaum** S. W. (1985) Biochemistry of digestion. In: Kerkut, G.A., Gilbert, L.I, eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, Vol. 4. London, Pergamon Press. pp. 9-311.
- Arau'jo** R. A., Guedes R. N. C., Oliveira M. G. A. & Ferreira G. H. (2008) Enhanced activity of carbohydrate and lipid-metabolizing enzymes in insecticide-resistant populations of the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Bull. Entomol. Res.* 98, 417-424.
- Arbogast** R. T. (1981) Mortality and reproduction of *Ephestiacautella* and *Plodia interpunctella* exposed as pupae to high temperatures. *Environ. Entomol.* 10, 708-710.
- Arreguin-Espinoza** R., Arreguin B. & Gonsales C. (2000) Purification and properties of a lipase from *Cephaloleia presignis* (Coleoptera, Chrysomelidae). *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31, 239-244.
- Atkinson** D. (1994) Temperature and organism size - a biological law for ectotherms. *Adv. Ecol. Res.* 25, 1-58.

- Atkinson** D. & Sibly R. M. (1997) Why are organisms usually bigger in colder environments? Making sense of a life history puzzle. *Trends Ecol. Evol.* 12, 235–239.
- Attfield** P. V. (1987) Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett.* 225, 259–263.
- Augner** M. (1995) Low nutritive quality as a plant defense: Effects of herbivore-mediated interactions. *Evol. Ecol.* 9, 605–616.
- Audsley** N. & Weaver R. J. (2009) Neuropeptides associated with the regulation of feeding in insects. *Gen. Comp. Endocrinol.* 162, 93–104.
- Awmack** C. S. & Leather S. R. (2002) Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Ann. Rev. Entomol.* Vol. 47, 817–844.
- Azuma** M., Takeda S., Yamamoto H., Endo Y. & Eguchi M. (1991) Goblet cell alkaline phosphatase in silkworm midgut epithelium: its entity and role as an ATPase. *J. Exp. Zool.* 258, 294–302.
- Babić** B., Poisson A., Darwish S., Lacasse J., Merckx-Jacques M., Despland E. & Bede J. C. (2008) Influence of dietary nutritional composition on caterpillar salivary enzyme activity. *J. Insect Physiol.* 54, 286–296.
- Badyaev** A. V. & Uller T. (2009) Parental effects in ecology and evolution: mechanisms, processes and implications. *Phil. Trans. R. Soc. B* **364**, 1169–1177.
- Bae** H. & Sicher R. (2004) Changes of soluble protein expression and leaf metabolite levels in *Arabidopsis thaliana* grown in elevated atmospheric carbon dioxide. *Field Crops Res.* 90, 61–73.
- Bahrndorff** S., Mariën J., Loeschcke V. & Ellers J. (2009) Dynamics of heat-induced thermal stress resistance and Hsp70 expression in the springtail, *Orchesella cincta*. *Funct. Ecol.* 23, 233–239.
- Bahrndorff** S., Mariën J., Loeschcke V. & Ellers J. (2010) Genetic variation in heat resistance and HSP70 expression in inbred isofemale lines of the springtail *Orchesella cincta*. *Clim. Res.* 43, 41–47.

- Bai C.**, Yi S. X. & Degheele D. (1993) Phosphatases in last instar larvae of the African armyworm, *Spodoptera exempta* (Walker) (Lepidoptera: Noctuidae). Med. Fac. Landbouw Univ. Gent. 58, 317–327.
- Bale J. S.**, Masters G. J., Hodkinson I. D., Wmack C. A., Bezemer T. M., Brown V. K., Butterfield J., Buse A., Coulson J. C., Farrar J., Good J. E. G., Harrington R., Hartley S., Jones T. H., Lindroth, R. L., Press M. C., Symrnioudis I., Watt A. D. & Whittaker J. B. (2002) Herbivory in global climate change research: direct effects of rising temperature on insect herbivores. *Global Change Biol.* 8, 1-16.
- Baker J. E.** (1991) Properties of glycosidases from the maize weevil, *Sitophilus zeamais*. *Insect Biochem.* 21, 615-621.
- Barker J. S. F.** & Krebs R. A. (1995) Genetic variation and plasticity of thorax length and wing length in *Drosophila aldrichi* and *D. buzzatii*. *J. Evol. Biol.* 8, 689–709.
- Barua D.** & Heckathorn S. A. (2004) Acclimation of the temperature set-points of the heat-shock response. *J. Thermal Biol.* 29, 185–193.
- Basiouny A. L.**, Hamadah Kh. Sh. & Tanani M. A. (2010) Efficacy of the wild plant *fagonia bruguieri* (zygophyllaceae) on acid and alkaline phosphatase activities in the desert locust *Schistocerca gregaria* (orthoptera: acrididae). *Egypt. Acad. J. Biol. Sci.* 2, 1 – 10.
- Becker W. A.** (1984) *Manual of Quantitative Genetics* 4th edition, Academic Enterprises, Pullman, Washington.
- Beckett S. J.**, Evans D. E. (1997) The effects of thermal acclimation on immature mortality in the Queensland fruit fly *Bactrocera tryoni* and the light brown apple moth *Epiphyas postvittane* at a lethal temperature. *Entomol. Exp. Appl.* 82, 45–51.
- Bede J. C.**, McNeil J. N. & Tobe S. S. (2007) The role of neuropeptides in caterpillar nutritional ecology. *Peptides* 28, 185- 196.
- Beere H. M.** (2004) ‘The stress of dying’: the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell Sci.* 117, 2641-2651.
- Behmer S. T.** (2009) Insect herbivore nutrient regulation. *Ann. Rev. Entomol.* 54, 165-187.

- Beisson** F., Tiss A., Riviere C., Verger R. (2000) Methods for lipase detection and assays: a critical review. *E. J. Lipid Sci. Technol.* 102, 133-153.
- Benkel** B. F. & Hickey D. A. (1986) Glucose repression of amylase gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 114, 137-144.
- Benrey** B. & Denno R. F. (1997) The slow-growth-high-mortality hypothesis: a test using the cabbage butterfly. *Ecology* 78, 987-999.
- Bentz** B. J., Bracewell R. R., Mock, K. E. & M. E. Pfrender (2011) Genetic architecture and phenotypic plasticity of thermally-regulated traits in an eruptive species, *Dendroctonus ponderosae*. *Evol. Ecol.* 25, 1269–1288.
- Berger** D., Walters R. & Gotthard K. (2008) What limits insect fecundity? Body size-and temperature-dependent egg maturation and oviposition in a butterfly. *Funct. Ecol.* 22, 523–529.
- Bettencourt** B. R., Hogan C. C., Nimali M. & Drohan B. W. (2008) Inducible and constitutive heat shock gene expression responds to modification of *Hsp70* copy number in *Drosophila melanogaster* but does not compensate for loss of thermotolerance in *Hsp70* null flies. *BMC Biology*, 6: 5.
- Bettencourt** B. R., Kim I. Y., Hoffmann A. A. & Feder M. E. (2002) Response to natural and laboratory selection at the *Drosophila* HSP70 genes. *Evolution* 56, 1796–1801.
- Bernays** E. A., Singer M. S. & Rodrigues D. (2004) Foraging in nature: foraging efficiency and attentiveness in caterpillars with different diet breadths. *Ecol. Entomol.* 29: 389-397.
- Bernfeld** P. (1955) Amylases α and β . *Met. Enzymol.* 1, 149-158.
- Bin** Z., Huai L., Hull-Sanders H. (2011) Effect of host plants on development, fecundity and enzyme activity of *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae)[J]. *J. Integ. Agric.* 10, 1232-1240.
- Blakemore** D. Williams S. & Lehane M. J. (1995) Protein stimulation of trypsin secretion from the opaque zone midgut cells of *Stomoxys calcitrans*. *Comp. Biochem. Physiol.* 110, 301-307.

- Blanckenhorn** W. U. (2002) The consistency of quantitative genetic estimates in field and laboratory in the yellow dung fly. *Genetica* 114, 171–182.
- Blows** M. W. & Sokolowski M. B. (1995) The expression of additive and non additive genetic variation under stress. *Genetics* 140, 1149-1159.
- Bochdanovits** Z. & de Jong G. (2003) Experimental evolution in *Drosophila melanogaster*: Interaction of temperature and food quality selection regimes. *Evolution* 57, 1829–1836.
- Bochdanovits** Z., van der Klis H. & de Jong G. (2003) Covariation of larval gene expression and adult body size in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Biol. Evol.* 20, 1760–1766.
- Boersma** M. & Elser J. J. (2006) Too much of a good thing: On stoichiometrically balanced diets and maximal growth. *Ecology* 87, 1325-1330.
- Bogomolova** E. V., Rauschenbach I. Y., Adonyeva N. V., Alekseev A. A., Faddeeva N. V. & Gruntenko N. E. (2010) Dopamine down-regulates activity of alkaline phosphatase in *Drosophila*: The role of D2-like receptors. *J. Insect Physiol.* 56, 1155–1159.
- Boggs** C. L. (2009) Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct. Ecol.* 23, 27-37.
- Bowler** K. (2005) Acclimation, heat shock and hardening. *J. Thermal Biol.* 30, 125–130.
- Bowler** K. & Terblanche J. S. (2008) Insect thermal tolerance: what is the role of ontogeny, ageing and senescence? *Biol. Rev.* 83, 339–355.
- Bown** D. P., Wilkinson H. S. and Gatehouse J. A. (2004) Regulation of expression of genes encoding digestive proteases in the gut of a polyphagous lepidopteran larva in response to dietary protease inhibitors. *Physiol. Entomol.* 29, 278-290.
- Bradford** M. A. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.* 72, 248-254.

- Brakefield** P. M. & Kesbeke F. (1997) Genotype-environment interactions for insect growth in constant and fluctuating temperature regimes. *Proc. Biol. Sci.* 264, 717-723.
- Brakefield** P. M., Pijpe J. & Zwaan B. J. (2007) Developmental plasticity and acclimation both contribute to adaptive responses to alternating seasons of plenty and of stress in *Bicyclus* butterflies. *J. Biosci.* 32, 465–475.
- Broadway** R. M. & Duffey S. S. (1986) The effect of dietary protein on the growth and digestive physiology of larval *Heliothis zea* and *Spodoptera exigua*. *J. Insect Physiol.* 32, 673-680.
- Broadway** R. M. & Dufey S. S. (1988) The effect of plant protein quality on insect digestive physiology and the toxicity of plant proteinase inhibitors. *J. Insect Physiol.* 34, 1111-1117.
- Bradshaw** W. E. & Holzapfel C. M. (2006) Evolutionary response to rapid climate change. *Science* 312, 1477–1478.
- Browne** L. B. & Raubenheimer D. (2003) Ontogenic changes in the rate of ingestion and estimates of food consumption in fourth and fifth instar *Helicoverpa armigera* caterpillars. *J. Insect Physiol.* 49, 63-71.
- Brzek** P., Kohl K. D., Caviedes-Vidal E. & Karasov W. H. (2011) Fully reversible phenotypic plasticity of digestive physiology in young house sparrows: lack of long-term effect of early diet composition. *J. Exp. Biol.* 214, 2755-2760.
- Bubliy** O. A., Loeshcke V. & Imasheva A. G. (2000a) Effect of stressful and non stressful growth temperatures on variation of sternopleural bristle number in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54, 1444-1449.
- Bubliy** O. A., Imasheva A. G. & Loeshcke V. (2000b) Half-sib analysis of three morphological traits in *Drosophila melanogaster* under poor nutrition. *Hereditas* 133, 59-63.
- Bubliy** O. A., Loeshcke V. & Imasheva A. G. (2001) Genetic variation of morphological traits in *Drosophila melanogaster* under poor nutrition: isofemale lines and offspring-parent regression. *Heredity* 86, 363-369.

- Bubliy O. A. & Loeschke V. (2002)** Effect of low stressful temperature on genetic variation of five quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 89, 70-75.
- Bubliy O. A., Kristensen T. N., Kellermann V. & Loeschke V. (2012)** Plastic responses to four environmental stresses and cross-resistance in a laboratory population of *Drosophila melanogaster*. *Function. Ecol.* 26, 245-253.
- Burnell A. M., Reaper C. & Doherty J. (1991)** The effect of acclimation temperature on enzyme activity in *Drosophila melanogaster*. *Comp. Biochem. Physiol.* 98B, 609-614.
- Byers D. L. (2005)** Evolution in heterogeneous environments and the potential of maintenance of genetic variation in traits of adaptive significance. *Genetica* 123, 107-124.
- Cahu C. L., Zambonino-Infante J. L. (1998)** Algal addition in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae rearing: Effect on digestive enzymes [J]. *Aquaculture* 161, 479-489.
- Calabria G., Dolgova O., Rego C., Castaneda L. E., Rezende E. L. , Baanya` J., Pascual M., Sorensen J. G., Loeschke V. & Santos M. (2012)** Hsp70 protein levels and thermotolerance in *Drosophila subobscura*: a reassessment of the thermal co-adaptation hypothesis. *J. Evol. Biol.* 25, 691-700.
- Calosi P., Bilton D. T. & Spicer J. I. (2008)** Thermal tolerance, acclimatory capacity and vulnerability to global climate change. *Biol. Lett.* 4, 99-102.
- Calvo D. & Molina J. M. (2010)** Differences in foliage affect performance of the lappet moth, *Streblote panda*: Implications for species fitness. *J. Insect Sci.* 10: 177.
- Caviedes-Vidal E., Afik D., Carlos-Martinez D. L. & Karasov W. (2000)** Dietary modulation of intestinal enzymes of the house sparrow (*Passer domesticus*): testing an adaptive hypothesis. *Comp. Biochem. Physiol. A: Mol. Inegr. Physiol.* 125, 11-24.

- Celino** F. T., Yamaguchi S., Miura C., Ohta T., Tozawa Y., Iwai T. & Miura T. (2011) Tolerance of spermatogonia to oxidative stress is due to high levels of Zn and Cu/Zn superoxide dismutase. *PLoSOne* 6: e16938.
- Charmantier** A. & Garant D. (2005) Environmental quality and evolutionary potential: lessons from wild populations. *Proc. R. Soc. B* 272, 1415-1425.
- Chaubey** S. N., Ram T., Maurya S. P. & Mishra R. (2010) Studies on the effect of low temperature on the duration of embryonic life, hatching percentage, wet weight, water and glucose levels and acid phosphatase activity during embryogenesis in eggs of *Corcyra cephalonica* (Stainton). *Egypt. Acad. J. Biolog. Sci.* 3, 187-197.
- Chen** C. P. & Denlinger D. L. (1990) Activation of phosphorylase in response to cold and heat stress in the flesh fly *Sarcophaga crassipalpis*. *J. Insect Physiol.* 36, 549-553.
- Chen** C. P., Lee R. E. & Denlinger D. L. (1991) Cold shock and heat shock: a comparison of the protection generated by brief pretreatment at less severe temperatures. *Physiol. Entomol.* 16, 19-26.
- Chen** S., Chen Q., Yang P., Qiu W., Lin D., Li Y. & Yan S. (1997) Effect of alkaline and acid phosphatase activity on physiology and metabolic activity of *Penaeus penicillatus*. *J. Mari. Biol.* 43, 201-207.
- Chen** B., Kayukawa T., Jiang H., Monteiro A., Hoshizaki S. & Ishikawa Y. (2005a) *Da trypsin*, a novel clip-domain serine protease gene up-regulated during winter and summer diapause of the onion maggot, *Deli aantiqua*. *Gene* 347, 115-123.
- Chen** Y., Du X., Jin Y. (2005b) Cytochemical evidence for an anomalous dose-response of acid phosphatase activity in the blood but not in the midgut of fluoridated-treated silkworm larvae, *Bombyx mori*. *Fluoride* 38, 133-138.
- Chen** B. & Wagner A. (2012) Hsp90 is important for fecundity, longevity, and buffering of cryptic deleterious variation in wild fly populations. *BMC Evol. Biol.* 12:25.
- Cheung** W. W. K. & Low K. W. (1975) Ultrastructural and functional differentiation of the midgut of the sugar cane beetle, *Protaetia acuminata* (F.) (Coleoptera: Cetoniidae). *Int. J. Insect Morph. Embryol.* 4, 349-361.

- Chevin** L. M., Lande R. & Mace G. M. (2010) Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. *PLoS Biol* 8(4).
- Chiang** H., Terlecky S. R., Plant C. P. & Dice J. F. (1994) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246, 382-385.
- Chidawanyika** F. & Terblanche J. S. (2011a) Rapid thermal responses and thermal tolerance in adult codling moth *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Insect Physiol.* 57, 108–117.
- Chidawanyika** F. & Terblanche J. S. (2011b) Costs and benefits of thermal acclimation for codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae): implications for pest control and the sterile insect release programme. *Evol. Appl.* 4, 534–544.
- Chippindale** A. K., Gibbs A. G., Sheik M., Yee K. J., Djawan M., Bradley T. J. & Rose M. R. (1998) Resource acquisition and the evolution of stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 52, 1345-1352.
- Chown** S. L. & Nicholson S. W. (2004) *Insect Physiological Ecology: Mechanisms and Patterns*. Oxford Press, New York.
- Chown** S. L. (2001) Physiological variation in insects: hierarchical levels and implications. *J. Insect Physiol.* 47, 649–660.
- Chown** S. L., Hoffmann A. A., Kristensen T. N., Angilletta M. J. Jr., Stenseth N. C. & Pertoldi C. (2010) Adapting to climate change: a perspective from evolutionary physiology. *Clim. Res.* 43, 3–15.
- Chown** S. L., Jumbam K. R., Sørensen J. G. & Terblanche J. S. (2009) Phenotypic variance, plasticity and heritability estimates of critical thermal limits depend on methodological context. *Funct. Ecol.* 23, 133–140.
- Chown** S. L., Terblanche J. S. (2007) Physiological diversity in insects: ecological and evolutionary contexts. *Adv. Insect Physiol.* 33, 50–152.
- Christeller** J. T., Gatehouse A. M. R. & Laing W. A. (1994) The interaction of the elastase inhibitor, elgin C, with insect digestive endopeptidases: The effect of pH on the dissociation constants. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 24, 103-109.

- Christeller** J. T., Poulton J., Markwick N. M. & Simpson R. M. (2010) The effect of diet on the expression of lipase genes in the midgut of the light brown apple moth (*Epiphyas postvittana* Walker; Tortricidae). *Insect Mol. Biol.* 19, 9–25.
- Christeller** J. T., Amara S. & Carrière F. (2011) Galactolipase, phospholipase and triacylglycerol lipase activities in the midgut of six species of lepidopteran larvae feeding on different lipid diets. *J. Insect Physiol.* 57, 1232–1239.
- Clarke** A. & Fraser K. P. P. (2004) Why does metabolism scale with temperature? *Funct. Ecol.* 18, 243–251.
- Clisold** F. J., Tedder B. J., Conigrave A. D. & Simpson S. J. (2010) The gastrointestinal tract as a nutrient-balancing organ. *Proc. R. Soc. B* 277, 1751–1759.
- Colasurdo** N., Dussutoura A. & Despland E. (2007) Do food protein and carbohydrate content influence the pattern of feeding and the tendency to explore of forest tent caterpillars? *J. Insect Physiol.* 53, 1160–1168.
- Cooper** B. S., Hammad L. A., Fisher N. P., Karty J. A. & Montooth K. L. (2011) In a variable thermal environments selection favors greater plasticity of cell membranes in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01566.x.
- Colasurdo** N., Gélinas Y. & Despland E. (2009) Larval nutrition affects life history traits in a capital breeding moth. *J. Exp. Biol.* 212, 1794–1800.
- colonizing population of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Heredity* 78, 261–269.
- Cossins** A. R. & Bowler K. (1987) *Temperature biology of animals*. Chapman and Hall, New York.
- Cossins** A., Fraser J., Hughes M. & Gracey A. (2006) Post-genomic approaches to understanding the mechanisms of environmentally induced phenotypic plasticity. *J. Exp. Biol.* 209, 2328–2336.
- Coudron** T. A. & Kim Y. (2004) Life history and cost analysis for continuous rearing of *Perillus bioculatus* (Heteroptera: Pentatomidae) on a zoophytogenous artificial diet. *J. Economic Entomol.* 97, 807–812.

- Coyne J. A. & Beecham E.** (1987) Heritability of two morphological characters within and among natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 117, 727-737.
- Crava C., Bel Y., Lee S. F., Manachini B., Heckel D. G. & Escriche B.** (2010) Study of the aminopeptidase N gene family in the lepidopterans *Ostrinia nubilalis* (Hübner) and *Bombyx mori* (L.): Sequences, mapping and expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 506-515.
- Crispo E., DiBattista J. D., Correa C., Thibert-Plante X., McKellar A. E., Schwartz A. K., Berner D., De León L. F. & Hendry A. P.** (2010) The evolution of phenotypic plasticity in response to anthropogenic disturbance. *Evol. Ecol. Res.* 12, 47-66.
- Cristofolletti P., Ribeiro A. & Terra W.** (2001) Apocrine secretion of amylase and exocytosis of trypsin along the midgut of *Tenebrio molitor* larvae. *J. Insect Physiol.* 47, 143-155.
- Cross J. M., von Korff M., Altman T., Bartzetko L., Sulpice R., Gibon Y., Palacios N. & Stitt M.** (2006) Variation of enzyme activities and metabolite levels in 24 *Arabidopsis* accessions growing in carbonlimited conditions. *Plant Physiol.* 142, 1574–1588.
- Csikós G. & Sass M.** (1997) Changes of acid phosphatase content and activity in the fat body and the hemolymph of the flesh fly *Neobellieria (Sarcophaga) bullata* during metamorphosis. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 34, 369-390.
- Cui X., Wan F., Xie M. & Liu T.** (2008) Effects of heat shock on survival and reproduction of two whitefly species, *Trialeurodes vaporariorum* and *Bemisia tabaci* biotype B. *J. Insect Sci.* 8:24.
- Cymborowski B. & Bogus M. I.** (1976) Juvenilizing effect of cooling on *Galleria mellonella*. *J. Insect Physiol.* 22, 669-672.
- Cymborowski B., Bogus M. I., Beckage N. E., Williams C. M. & Riddiford L. M.** (1982) Juvenile hormone titres and metabolism during starvation-induced supernumerary larval moulting of the tobacco hornworm, *Manduca sexta* L. *J. Insect Physiol.* 28, 129-135.

- Cymborowski B.** (1991) Effects of cold stress on endocrine system in *Galleria mellonella*. In *Hormones and Metabolism in Insect stress* (Eds Ivanovic J. and Jankovic-Hladni M.), pp. 99-114. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Cymborowski B.** (2000) Temperature-dependent regulatory mechanism of larval development of the wax moth (*Galleria mellonella*). *Acta Biochim.Pol.* 47, 215-221.
- Czesak M. E. & Fox C. W.** (2003) Evolutionary ecology of egg size and number in a seed beetle: genetic trade-offs differ between environments. *Evolution* 57, 1121-1132.
- Czesak M. E., Fox C.W., Wolf J. B.** (2006) Experimental evolution of phenotypic plasticity: how predictive are cross-environment genetic correlations? *Am. Nat.* 168, 323–335.
- Das A. K. & Das A. B.** (1982) Compensations for temperature in the activities of digestive enzymes of *Periplaneta americana* (L.). *Comp. Biochem. Physiol.* 71, 255–263.
- Davidowitz G. & Nijhout H. F.** (2004) The physiological basis of reaction norms: The interaction among growth rate, the duration of growth and body size. *Integr. Comp. Biol.* 44, 443–449.
- De Block M., Campero M. & Stoks R.** (2008) Developmental costs of rapid growth in a damselfly. *Ecol. Entomol.* 33, 313–318.
- De Jong G. & Imasheva A.** (2001) Genetic variance in temperature dependent adult size deriving from physiological genetic variation at temperature boundaries. *Genetica* 110, 195–207.
- De La Garza L. M., Bhaskaran G., Barrera P. & Dahhm K. H.** (1991) Effects of starvation and sucrose feeding on *corpora allata* of last instar larvae of *Manduca sexta*: *in vitro* activity, size, and cell number. *Physiol. Entomol.* 16, 163-172.
- De Moed G. H., De Jong G. & Scharloo W.** (1997) Environmental effects on body size variation in *Drosophila melanogaster* and its cellular basis. *Genet. Res.* 70, 35-43.

- DeWitt** T. J. & Scheiner S. M. (2004) Phenotypic variation from single genotypes. A primer. In: DeWitt TJ, Scheiner SM (eds.) Phenotypic plasticity. Functional and conceptual approaches. Oxford University Press, New York, pp 1–9.
- Deere** J. A. & Chown S. L. (2006) Testing the Beneficial Acclimation Hypothesis and its alternatives for locomotor performance. *Am. Nat.* 168, 630-644.
- Denlinger** D. L. & Yocum G. D. (1998) Physiology of heat sensitivity. (In: Hallman G. J., Denlinger D. L., eds. Thermal sensitivity in insects and application in integrated pest management 11–18). Westview Press, Boulder, Colorado, USA.
- Despland** E. & Noseworthy M. (2006) How well do specialist feeders regulate nutrient intake? Evidence from a gregarious tree-feeding caterpillar. *J. Exp. Biol.* 209, 1301-1309.
- Diamond** S. E. & Kingsolver J. G. (2010) Environmental dependence of thermal reaction norms: host plant quality can reverse the temperature-size rule. *Am. Nat.* 175, 1-10.
- Diamond** S. E. & Kingsolver J. G. (2012) Host plant adaptation and the evolution of thermal reaction norms. *Oecologia* 169, 353-360.
- DiDomenico** B. J., Bugaisky G. E. & Lindquist S. (1982) Heat shock and recovery are mediated by different translational mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 6181-6185.
- Dillon** M. E., Cahn L. R. Y. & Huey R. B. (2007) Life history consequences of temperature transients in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 210, 2897-2904.
- Doane** W. W. (1967) Quantitation of amylases in *Drosophila* separated by acrylamide gel electrophoresis. *J. Exp.* 2001. 164, 363-377.
- Dojnov** B. Lončar N., Božić N., Nenadović V., vanović J. & Vujčić Z. (2010) Comparison of α -amylase isoforms from the midgut of *Cerambyx cerdo* L. (Coleoptera: Cerambycidae) larvae developed in the wild and on an artificial diet. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 62, 575-583.
- Dmitriew** C. & Rowe L. (2011) The Effects of larval nutrition on reproductive performance in a food-limited adult environment. *PLoS ONE* 6(3).

- Elkinton** J. S. & Liebhold A. M. (1990) Population dynamics of gypsy moth in north America. *Ann. Rev. Entomol.* 35, 571-596.
- Eguchi** M., Azuma M., Yamamoto H. & Takeda S. (1990) Genetically defined membrane-bound and soluble alkaline phosphatase of the silkworm: their discrete localization and properties. *Prog. Clin. Biol. Res.* 344, 267-287.
- Eguchi** M. (1995) Alkaline phosphatase isozymes in insects and comparison with mammalian enzyme. *Comp. Biochem. Physiol.* 111B, 151-162.
- Ellers** J. & Driessen G. (2011) Genetic correlation between temperature-induced plasticity of life-history traits in a soil arthropod. *Evol. Ecol.* 25, 473-484.
- Ellers** J., Mariën J., Driessen G. & Van Straalen N. M. (2008) Temperature-induced gene expression associated with different thermal reaction norms for growth rate. *J. Exp. Zool. (Mol. Dev. Evcol.)* 310B, 137-147.
- Elser** J. J., Fagan W. F., Denno R. F., Dobberfuhl D. R., Folarin A. & Huberty A. (2000) Nutritional constraints in terrestrial and freshwater food webs. *Nature* 408, 578- 580.
- Erlanger** B. F., Kokowsky N. & Cohen W. (1961) The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271-278.
- Esperk** T., Tammaru T. & Nylin S. (2007) Intraspecific variability in number of larval instars in insects. *J. Econ. Entomol.* 100, 627-645.
- Evgen'ev** M. B., Sheinker V. S. & Levin A. V. (1987) Molecular mechanisms of adaptation to hyperthermia in higher organisms. Synthesis of Heat-shock proteins in cell cultures and larvae of certain silkworm species. *Mol. Biol.* 21, 484-494.
- Evgen'ev** M. B., Garbuz D. G., Shilova V. Y. & Zatsepina O. G. (2007) Molecular mechanisms underlying thermal adaptation of xeric animals. *J. Biosci.* 32, 489-499.
- Falconer** D. S. & Macay T. F. C. (1996) *Introduction to Quantitative Genetics*, 4th ed. Longman, Harlow.

- Falconer** D. S. (1952) The problem of environment and selection. *Am. Nat.* 86, 293–298.
- Feder** M. E. & Hofmann G. E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Ann. Rev. Physiol.* 61, 243–282.
- Felton** G. W. (1996) Nutritive quality of plant protein: sources of variation and insect herbivore responses. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 32, 107–130.
- Ferreira** C. & Terra W. R. (1980) Intracellular distribution of hydrolases in midgut caeca cells from an insect with emphasis on plasma membrane-bound enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 66, 467–473.
- Fielding** D. J. & Defoliart L. (2008) Discriminating tastes: self-selection of macronutrients in two populations of grasshoppers. *Physiol. Entomol.* 33, 264–273.
- Fischer** K. & Karl I. (2010b) Exploring plastic and genetic responses to temperature variation using Cooper butterflies. *Clim. Res.* 43, 17–30.
- Fischer** K., Dierks A., Franke T., Geister L., Liszka M., Winter S. & Pflücke C. (2010a) Environmental effects on temperature stress resistance in the tropical butterfly *Bicyclusa anynana*. *PLoS ONE* 5(12): e15284.
- Fischer** K., Liniek S., Bauer M., Baumann B., Richter S., Dierks A. (2012) Phenotypic plasticity in temperature stress resistance is triggered by photoperiod in a fly. *Evol. Ecol.* 26, 1067–1083.
- Forster** J., Hirst A. G. & Atkinson D. (2011) How do organisms change size with changing temperature? The importance of reproductive method and ontogenetic timing. *Funct. Ecol.* 25, 1024–1031.
- Franco** O. L., Rigden D. J., Melo F. R., Bloch C., Silva C. P. & Grossi de Sa M. F. (2002) Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. *E. J. Biochem.* 267, 2166–2173.
- Freitak** D., Heckel D. G. & Vogel H. (2009) Dietary dependent trans-generational immune priming in an insect herbivore. *Proc. R. Soc. B* 276, 2617–2624.

- Fry J. D.** (1996) The evolution of host specialization: Are trade-offs overrated? *Am. Nat.* 148, 84-107.
- Fúse M., Zhang J. R., Partridge E., Nachman R. J., Orchard I., Bendena W. G.** (1999) Effects of an allatostatin and a myosuppressin on midgut carbohydrate enzyme activity in the cockroach *Diploptera punctata*. *Peptides* 20, 1285–1293.
- Gaikwad Y. B., Gaikwad S. M. & Bhawane G. P.** (2010) Effect of induced oxidative stress and herbal extracts on acid phosphatase activity in lysosomal and microsomal fractions of midgut tissue of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Sci.* 10, 1-9.
- Garcia-Barros E.** (2006) Number of larval instars and sex-specific plasticity in the development of the small heath butterfly, *Coenonympha pamphilus* (Lepidoptera: Nymphalidae). *Eur. J. Entomol.* 103, 47–53.
- Gavriliotis S. & Scheiner S. M.** (1993) The genetics of phenotypic plasticity. V. Evolution of reaction norm shape *J. Evol. Biol.* 6, 31-48.
- Geber M. A. & Griffen L. R.** (2003) Inheritance and natural selection on functional traits. *Int. J. Plant Sci.* 164, S21–S42.
- Gebhardt M. D. & Staerns S. C.** (1988) Reaction norms for developmental time and weight at eclosion in *Drosophila mercatorum*. *J. Evol. Biol.* 1, 335-354.
- Gebhardt M. D. & Staerns S. C.** (1992) Phenotypic plasticity for life history characters in *Drosophila melanogaste*. III. Effect of the environment on genetic parameters. *Genet. Res.* 60, 87-101.
- Geister T. L. & Fischer K.** (2007) Testing the beneficial acclimation hypothesis: temperature effects on mating success in a butterfly. *Behav. Ecol.* 18, 658–664.
- Gibson G. & Dworkin I.** (2004) Uncovering cryptic genetic variation. *Nature Rev. Genet.* 5, 681–690.
- Ghalambor C. K., McKay J. K., Carroll S. P. & Reznick D. N.** (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Funct. Ecol.* 21, 394–407.

- Goodman** W.G., Cusson M. (2012) The juvenile hormones, in: L.I. Gilbert (Ed.), *Insect Endocrinology*, Elsevier, Amsterdam, pp. 310–365.
- Goncu** E. & Parlak O. (2011) The influence of juvenile hormone analogue, fenoxycarb on the midgut remodeling in *Bombyx mori* (L., 1758) (Lepidoptera: Bombycidae) during larval-pupal metamorphosis. *Türk. Entomol. Derg.* 35, 179-194.
- Gong** W. J. & Golic K. G. (2006) Loss of Hsp70 in *Drosophila* is pleiotropic, with effects on thermotolerance, recovery from heat shock and neurodegeneration. *Genetics* 172, 275–286.
- Gotthard** K., Nylin S. & Wilklund C. (1994) Adaptive variation in growth rate: life history costs and consequences in the speckled wood butterfly, *Pararge aegeria*. *Oecologia* 99, 281–289.
- Gotthard** K. (2000) Increased risk of predation as a cost of high growth rate: an experimental test in a butterfly. *J. Anim. Ecol.* 896-902.
- Gotthard** K. (2001) Growth strategies of ectothermic animals in temperate environments. *Environment and Animal Development: Genes, Life histories and Plasticity* (ed. by D. Atkinson & M. Thorndyke), 287–303.
- Gray** D. R. (2004) The gypsy moth life stage model: landscape-wide estimates of gypsy moth establishment using a multi-generational phenology model. *Ecol. Mod.* 176, 155-171.
- Grill** C. P., Moore A. J. & E. D. Brodi (1997) The genetics of phenotypic plasticity in a colonizing population of the ladybird beetle, *Harmonia axyridis*. *Heredity*, 78, 261-269.
- Grillo** L. A. M., Majerowicz D. & Gondim K. C. (2007) Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): role of a midgut triacylglycerol-lipase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 37, 579-588.
- Gruntenko** N. E., Monastiriotti M., Wilson T. & Rauschenbach, I. Yu. (2000) Stress reactivity and juvenile hormone degradation in *Drosophila melanogaster* strains having stress related mutations. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 775-783.

- Gruntenko** N. E., Chentsova, N. A., Andreenkova, E. V., Karpova, E. K., Glazko, G. V., Monastiriotti M., Rauschenbach, I. Yu. (2004). The effect of mutations altering biogenic amine metabolism in *Drosophila* on viability and the response to heat stress. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 55, 55–66.
- Gruntenko** N. E., Rauschenbach I. Yu. (2008) Interplay of juvenile hormone, 20-hydroxyecdysone and biogenic amines under normal and stress conditions and its effect on reproduction. *J. Insect Physiol.* 56, 902-908.
- Gruntenko** N. E., Wen D.; Karpova E. K., Adonyeva N. V., Liu Y., He Q., Faddeeva N. V., Fomin A. S., Li S. & Rauschenbach I.Yu. (2010) Altered juvenile hormone metabolism, reproduction and stress response in *Drosophila* adults with genetic ablation of the corpus allatum cells. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 891-897.
- Gruntenko** N. E., Bogomolova E. V., Adonyeva N. V., Karpova E. K., Menshanova P. N., Alekseev A. A., Romanova I. V., Li S. & Rauschenbach I. Yu. (2012) Decrease in juvenile hormone level as a result of genetic ablation of the *Corpus allatum* cells affects the synthesis and metabolism of stress related hormones in *Drosophila*. *J. Insect Physiol.* 58, 49–55.
- Gu** S. H., Tsia W. H. & Chow Y. S. (2000) Temporal analysis of ecdysteroidogenic activity of the prothoracic glands during the fourth larval instar of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 30, 499–505.
- Gunay** F., Alten B. & Ozsoy E. D. (2011) Narrow-sense heritability of body size and its response to different developmental temperatures in *Culex quinquefasciatus* (Say 1923). *J. Vector Ecol.* 36, 348-354.
- Guntrip** J. & Sibly R. M. & Holloway G. J. (1997) The effect of novel environment and sex on the additive genetic variation and covariation in and between emergence body weight and development period in the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera, Bruchidae). *Heredity* 78, 158-165.
- Guntrip** J. & Sibly R. M. (1998) Phenotypic plasticity, genotype-by-environment interaction and analysis of generalism and specialization in *Callosobruchus maculatus*. *Heredity* 81, 198-204.

- Gupta** R. S. & Singh B. (1994) Phylogenetic analysis of 70kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. *Curr. Biol.* 4, 1104–1114.
- Gutteling** E. W., Doroszuk A., Riksen J. A. G., Prokop Z., Reszka J. & Kammenga J. E. (2006) Environmental influence on the genetic correlations between life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* 98, 206–213.
- Gutteling** EW, Riksen JA, Bakker J, Kammenga JE (2007) Mapping phenotypic plasticity and genotype-environment interactions affecting life-history traits in *Caenorhabditis elegans*. *Heredity* 98, 28–37.
- Hall** D. M., Oberley T. D., Moseley P. M., Buettner G. R., Oberley L. W., Weindruch R. & Kregel K. C. (2000) Caloric restriction improves thermotolerance and reduces hyperthermia-induced cellular damage in old rats. *FASEB J.* 14, 78–86.
- Hari** N. S., Jindal J., Malhi N. S. & Khosa J. K. (2007) Effect of adult nutrition and insect density on the performance of the spotted stem borer, *Chilo partellus*, in laboratory cultures. *J. Pestic. Sci.* 81, 23–27.
- Harshini** S., Nachmann R. J. & Sreekumar S. (2002) Inhibition of digestive enzyme release by neuropeptides in the larvae of *Opisina arenosella*. *Comp. Biochem. Physiol.* 132, 353–358.
- Hättenschwiler** S. & Schafellner C. (2004) Gypsy moth feeding in the canopy of a CO₂-enriched mature forest. *Global Change Biol.* 10, 1899–1908.
- Hazel** J. R. & Prosser L. C. (1974) Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol. Rev.* 54, 620–677.
- Hazel** J. R. (1995) Thermal adaptation in biological membranes: Is homeoviscous adaptation the explanation? *Ann. Rev. Physiol.* 57, 19–42.
- Heidel-Fischer** H. M., Freitag D., Janz N., Söderlind L., Vogel H. & Nylin S. (2009) Phylogenetic relatedness and host plant growth form influence gene expression of the polyphagous comma butterfly (*Polygonia c-album*). *BMC Genomics* 10: 506.
- Hemming** J. D. C. & Lindroth R. L. (2000) Effects of phenolic glycosides and protein on *Gypsy moth* (Lepidoptera: Lymantriidae) and forest tent caterpillar

- (Lepidoptera: Lasiocampidae) performance and detoxication activities. Environm. Entomol. 29, 1108-1115.
- Hercus** M. J., Loeschcke V. & Rattan S. I. S. (2003) Life span extension of *Drosophila melanogaster* through hormesis by repeated mild heat stress. Biogerontology 4, 149–156.
- Hickey** D. A. & Benkel B. (1982) Regulation of amylase activity in *Drosophila melanogaster*: effects of dietary carbohydrate. Biochem. Genet. 20 (11/12), 1117-1129.
- Hill** S. R. & Orchard I. (2005) In vitro analysis of the digestive enzymes amylase and α -glucosidase in the midguts of *Locusta migratoria* L. in response to the myosuppressin, Schisto FLRF amide. J. Insect Physiol. 51, 1-9.
- Hilbeck** A. & Kenedy G. G. (1998) Effects of temperature on survival and preimaginal development rates of Colorado potato beetle on potato and horse-nettle: potential role in host range expansion. Entomol. Exp. Appl. 89, 261–269.
- Hinks** C. F., Cheeseman M. T., Erlandson M. A., Olfert O. & Westcott N. D. (1991) The effects of kochia, wheat and oats on digestive proteinases and the protein economy of adult grasshoppers, *Melolontha sanguinipes*. J. Insect Physiol. 37, 417-423.
- Hinks** C. F. & Erlandson M. A. (1995) The accumulation of haemolymph proteins and activity of digestive proteinases of grasshoppers (*Melanoplus sanguinipes*) fed wheat, oats or kochia. J. Insect Physiol. 41, 425-433.
- Hirashima** A., Sukhanova M. & Rauschenbach I. Y. (2000) Biogenic amines in *Drosophila virilis* under stress conditions. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64, 2625–2630.
- Hivrale** P. R., Lomate N. D., Kalve and Kachole M. S. (2011) *Periplaneta americana* midgut proteases differentially expressed against dietary components from different plant seeds. Physiol. Entomol. 36, 180–186.
- Hochachka** P. W. & Somero G. N. (2002) Biochemical Adaptation: Mechanism and Process. In Physiological Evolution Oxford: Oxford University Press.

- Hoffmann** A. A. & Parsons P. A. (1991) Evolutionary genetics and environmental stress. Oxford University Press, Oxford.
- Hoffmann** A. A. & Merilä J. (1999) Heritable variation and evolution under favourable and unfavourable conditions. *Tren. Ecol. Evol.* 14, 96-101.
- Hoffmann** A. A. (2000) Laboratory and field heritabilities: some lessons from *Drosophila*. In Adaptive genetic variation in the wild (ed. Mousseau T. A., Sinervo B. & Endler J. A.), New York: Oxford University Press.
- Hoffmann** A. A., Sorensen J. G. & Loeschcke V. (2003) Adaptation of *Drosophila* to temperature extremes: bringing together quantitative and molecular approaches. *J. Thermal Biol.* 28, 175–216.
- Hoffmann** A. A. & Willi Y. (2008) Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Rev. Gen.* 9, 421–432.
- Hoffmann** A. A. & Sgro C. M. (2011) Climate change and evolutionary adaptation. *Nature* 470, 479-485.
- Hollander** V. P. (1971) Acid phosphatases. In: "the Enzyme". (ed. Boyer P.), 3rd Academic Press, New York.
- Holloway** G. J., Povey S. R. & Sinly R. M. (1990) The effect of new environment on adapted genetic architecture. *Heredity*, 64 323-330.
- Horne** I., Haritos V. S. & Oakeshott J. G. (2009) Comparative and functional genomics of lipases in holometabolous insects. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 547–567.
- Hottiger** T., Boller T. & Wiemken A. (1987) Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEB Lett.* 220, 113-115.
- Houseman** J. G., Downe A. E. R. & Morrison P. E. (1985) Similarities in digestive proteinase production in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae) and *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Insect Biochem.* 15, 471-474.
- Hu** Y. H., Leung D. W. M., Kang L. & Wang C. Z. (2008) Diet factors responsible for the change of the glucose oxidase activity in labial salivary glands of *Helicoverpa armigera*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 68, 113–121.

- Hu** Y., Yuan X., Zhu F. & Lei C. (2010) Development time and size-related traits in the oriental blow fly, *Chrysomya megacephala* along altitudinal gradient from China. *J. Thermal Biol.* 35, 366–371.
- Huang** L. H., Chen B. & Kang L. (2007) Impact of mild temperature hardening on thermotolerance, fecundity, and Hsp gene expression in *Liriomyza huidobrensis*. *J. Insect Physiol.* 53, 1199–1205.
- Huey** R. B. & Kingsolver J. G. (1989) Evolution of thermal sensitivity of ectotherm performance. *Trends Ecol. Evol.* 4, 131–135.
- Huey** R. B. & Berrigan D. (1996) Testing evolutionary hypotheses of acclimation. Pp. 205-238 in: I. A. Johnston and A. F. Bennett, eds. *Animals and temperature: phenotypic and evolutionary adaptation*. SEB Seminar Series. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
- Huey** R. B., Hertz P. E. & Sinervo B. (2003) Behavioral drive versus behavioral inertia in evolution: a null model approach. *Am. Nat.* 161, 357–366.
- Ilijin** L. (2009) Protocerebral neurosecretory neurons in acute stress in gypsy moth caterpillars (*Lymantria dispar* L.). Ph. D. Thesis, Faculty of Biology, University of Belgrade.
- Imasheva** A. G., Loeschcke V., Zhivotovsky L. A. & Lazeby O. E. (1997) Effects of extreme temperatures on phenotypic variation and developmental stability in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila buzzatii*. *Biol. J. Linn. Soc.* 61, 117-126.
- Imasheva** A. G., Bosenko D. V. & Bublik O. A. (1999) Variation in morphological traits of *Drosophila melanogaster* (fruit fly) under nutritional stress. *Heredity* 82, 187–192.
- Imasheva** A. G., Loeschcke V., Zhivotovsky L. A. & Lazeby O. E. (1998) Stress temperatures and quantitative variation in *Drosophila melanogaster*. *Heredity* 81: 246-253.
- Imasheva** A. G., Moreteau B. & David, J. R. (2000) Growth temperature and genetic variability of wing dimensions in *Drosophila*: opposite trends in two sibling species. *Genet. Res.* 76, 237–247.

- Irlich** U. M., Terblanche J. S., Blackburn T. M. & Chown S. L. (2009) Insect rate-temperature relationships: environmental variation and the metabolic theory of ecology. *Am. Nat.* 174, 819–835.
- Ishaaya** I., Moore I. & Joseph D. (1971) Protease and amylase activity in larvae of the Egyptian cotton worm, *Spodoptera littoralis*. *J. Insect Physiol.* 17, 945–953.
- Ivanovic** J., Jankovic-Hladni M., Spasic V. & Frusic M. (1987) Compensatory reactions at the level of digestive enzymes in relation to acclimatization in *Morimus asper funereus* larvae. *Comp. Bioch. Physiol.* 68, 217–224.
- Ivanovic** J. & Jankovic-Hladni M. (1991) (Eds.) (1991) *Hormones and Metabolism in Insect Stress*, 178, CRC Press, Boca Raton.
- Ivanovic** J., Jankovic-Hladni M., Djordjevic S., Stamenovic S. & Lazarevic J. (1992) The effect of high temperature on metabolism of *Morimus funereus* larvae during an intermolt period. *J. Insect Physiol.* 38, 877–883.
- Ivanović** J., Đorđević S., Ilijin L., Janković-Tomanić M. & Nenadović V. (2002) Metabolic response of cerambycid beetle (*Morimus funereus*) larvae to starvation and food quality. *Comp. Biochem. Physiol.* 132A: 555-566.
- Đorđević** S., Ivanović J. & Janković-Hladni M. (1995) Effects of dietary regime and stressful temperatures on *Morimus funereus* larval metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 111, 139-145.
- Janda** V. & Benešová J. (1991) Changes in the activity of phosphomonoesterases in relation to growth and metamorphosis of *Galleria mellonella* (Lepidoptera). *Acta Entomol. Biochmoslov.* 88, 19–24.
- Janković-Tomanić** M. & Lazarević J. (2012) Effects of temperature and dietary nitrogen on genetic variation and covariation in gypsy moth larval performance traits. *J. Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 64, 1109-1116.
- Jensen** L. T., Cockerell F. E., Kristensen T. N., Rako L. & Loeschcke V. (2010) Adult heat tolerance variation in *Drosophila melanogaster* is not related to Hsp70 expression. *J. Exp. Zool.* 313A, 35–44.
- Ji** L. Z., Ann L. L. & Wang X. W. (2011) Growth responses of gypsy moth larvae to elevated CO₂: the influence of methods of insect rearing. *Insect Sci.* 18, 409-418.

- Jia** F. X., Dou W., Hu F. & Wang J. J. (2011) Effects of thermal stress on lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis*. (Diptera: Tephritidae). Florida Entomol. 94, 956-963.
- Johnson** T. K., Cockerell F. E., Carrington L. B., Rako L., Hoffmann A. A. & McKechnie S.W. (2009) The capacity of *Drosophila* to heat harden associates with low rates of heat-shocked protein synthesis. J. Thermal Biol. 34, 327-331.
- Jones** D., Jones G. & Bhaskaran G. (1980) Induction of supernumerary moulting by starvation in *Manduca sexta* larvae. Entomol. Exp. Appl. 28, 259-267.
- Jones** D., Jones G. & Bhaskaran G. (1981) Dietary sugars, hemolymph trehalose levels, and supernumerary molting of *Manduca sexta* larvae. Physiol. Zool. 54, 260-266.
- Jedlicka** P., Mortin M. A. & Wu C. (1997) Multiple functions of *Drosophila* heat shock transcription factor in vivo. Embo J. 16, 2452-2462.
- Joern** A. & Behmer S. T. (1997) Importance of dietary nitrogen and carbohydrates to survival, growth, and reproduction in adults of the grasshopper *Ageneotettix deorum* (Orthoptera: Acrididae). Oecologia 112, 201-208.
- Johnson** T. K., Cockerell F. E., Carrington L. B., Rako L., Hoffmann A. A. & McKechnie S. W. (2009) The capacity of *Drosophila* to heat harden associates with low rates of heat-shocked protein synthesis. J. Thermal Biol. 34, 327-331.
- Jurat-Fuentes** J. L., Karumbaiah L., Jakka S. R. K., Ning C. & Liu C. (2011) Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to Lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. PLoS ONE 6(3): e17606.
- Kamata** N. & Igarashi M. (1995) Relationship between temperature, number of instars, larval growth, body size, and adult fecundity of *Quadricalcarifera punctatella* (Lepidoptera: Notodontidae): cost-benefit relationship. Environ. Entomol. 24, 648-656.
- Kamin-Belsky** N. & Wool D. (1991) Dietary modification of digestive physiology in larvae of almond moth (Lepidoptera: Phycitidae). J. Econ. Entomol. 84, 768-775.

- Kanazawa** M., Xue C.Y., Kageyama H., Suzuki E., Ito R., Namba Y., Osaka T., Kimura S. & Inoue S. (2003) Effects of a high-sucrose diet on body weight, plasma triglycerides, and stress tolerance. *Nutr. Rev.* 61, 27–33.
- Kassahn** K. S., Crozier R. H., Ward A. C., Stone G. & Caley M. J. (2007) From transcriptome to biological function: environmental stress in an ectothermic vertebrate, the coral reef fish *Pomacentrus moluccensis*. *BMC Genomics*, 8:358.
- Karan** D., Morin J. P., Gibert P., Moreteau B., Scheiner S. M. & David J. R. (2000) The genetics of phenotypic plasticity. IX. Genetic architecture, temperature, and sex differences in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54, 1035–1040.
- Karl** I., Michalowski C., Sorensen J. G., Loeschcke V. & Kristensen T. N. (2012) Effects of rearing and induction temperature on the temporal dynamics of heat shock protein 70 expression in a butterfly. *Physiol. Entomol.* 37, 103–108.
- Karolewski** P., Grzebyta J., Oleksyn J. & Gietrych M. J. (2007) Effects of temperature on larval survival rate and duration of development in *Lymantria monacha* (L.) on needles of *Pinus sylvestris* (L.) and *Lymantria dispar* (L.) on leaves of *Quercus robur* (L.) *Pol. J. Ecol.* 55, 595-600.
- Karowe** D. N. & Martin M. M. (1989) The effects of quantity and quality of diet nitrogen on the growth, efficiency of food utilization, nitrogen budget and metabolic rate of fifth instar *Spodoptera eridania* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Insect Physiol.* 135, 699- 708.
- Karowe** D. N. (1989) Differential effect of tannic acid on two tree-feeding Lepidoptera: implications for theories of plant anti-herbivore chemistry. *Oecologia* 80, 507-512.
- Kause** A. & Morin J. P. (2001) Seasonality and genetic architecture of development time and body size of the birch feeding sawfly *Priophorus pallipes*. *Gen. Res.* 78, 31–40.
- Kause** A., Saloniemi I., Morin J. P., Haukioja E., Hanhimäki S. & Ruohomäki K. (2001) Seasonally varying diet quality and the quantitative genetics of development time and body size in birch feeding insects. *Evolution* 55, 1992–2001.

- Kawecki T. J.** (1995) Expression of genetic and environmental variation for life history characters on the usual and novel hosts in *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae). *Heredity* 75, 70-76.
- Kawecki T. J., Barton N. H. & Fry J. D.** (1997) Mutational collapse of fitness in marginal habitats and the evolution of ecological specialization. *J. Evol. Biol.* 10, 407-429.
- Kearney M., Simpson S. J., Raubenheimer D. & Helmuth B.** (2010) Modelling the ecological niche from functional traits. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 3469–3483.
- Kellermann V., Heerwaarden B., Sgrò C. M. & Hoffmann A. A.** (2009) Fundamental evolutionary limits in ecological traits drive *Drosophila* species distributions. *Science* 325, 1244-1246.
- Kim K., Lin Y. R. & Park Y.** (2010) Enhancement of stress resistances and downregulation of Imd pathway by lower developmental temperature in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* 45, 984–987.
- Kingsolver J. G. & Woods H. A.** (1997) Thermal sensitivity of growth and feeding in *Manduca sexta* caterpillars. *Physiol. Zool.* 70, 631-638.
- Kingsolver J. G. & Woods H. A.** (1998) Interactions of temperature and dietary protein concentrations in growth and feeding of *Manduca sexta* caterpillars. *Physiol. Entomol.* 23, 354-359.
- Kingsolver J. G., Izem R. & Ragland G. J.** (2004a) Plasticity of size and growth in fluctuating thermal environments: Comparing reaction norms and performance curves. *Integr. Comp. Biol.* 44, 450–460.
- Kingsolver J. G., Ragland, G. J. & Slichta J. G.** (2004b) Quantitative genetics of continuous reaction norms: thermal sensitivity of caterpillar growth rates. *Evolution* 58, 1521–1529.
- Kingsolver J. G., Shilchta J. G., Ragland G. J. & Massie K. R.** (2006) Thermal reaction norms for caterpillar growth depend on diet. *Evol. Ecol. Res.* 8, 703-715.
- Kingsolver J. G.** (2007) Variation in growth and instar number in field and laboratory *Manduca sexta*. *Proc. Roy. Soc. B* 274, 977–981.

- Kingsolver** J. G. & Nagle A. M. (2007) Evolutionary divergence in thermal sensitivity and diapause of field and laboratory populations of *Manduca sexta*. *Physiol. Biochem. Zool.* 80, 473–479.
- Kingsolver** J. G. & Huey R. B. (2008) Size, temperature, and fitness: three rules. *Evol. Ecol. Res.* 10, 251–268.
- Kingsolver** J. G., Ragland G. J. & Diamond S. E. (2009) Evolution in a constant environment: thermal fluctuations and thermal sensitivity of laboratory and field populations of *Manduca sexta*. *Evolution* 63, 537–541.
- Kocsis** M. & Hufnagel L. (2011) Impacts of climate change on Lepidoptera species and communities. *Appl. Ecol. Environ. Res.* 9, 43–72.
- Kotkar** H. M., Sarate P. J., Tamhane V. A., Gupta V. S. & Giri A. P. (2009) Responses of midgut amylases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host plants. *J. Insect Physiol.* 55, 663–670.
- Kotkar** H. M., Bhide A. J., Gupta V. S. & Giri A. P. (2012) Amylase gene expression patterns in *Helicoverpa armigera* upon feeding on a range of host plants. *Gene* 501, 1–7.
- Khani** A., Moharramipour S. & Barzegar M. (2007) Cold tolerance and trehalose accumulation in overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). *E. J. Entomol.* 104, 385–392.
- Khani** A., Moharramipour S., (2010) Cold hardiness and supercooling capacity in the overwintering larvae of the codling moth, *Cydia pomonella*. *J. Insect Sci.* 10, 83.
- Kührt** U., Samietz H. H. & Dorn S. (2006) Modelling the phenology of codling moth: influence of habitat and thermoregulation. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 117, 29–38.
- Krebs** R. A. & Loeschcke V. (1994) Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. *Funct. Ecol.* 8, 730–737.
- Krebs** R. A. & Feder M. E. (1997) Deleterious consequences of Hsp70 overexpression in *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress Chaperon.* 2, 60–71.

- Krebs** R. A. & Feder M. E. (1998) Hsp70 and larval thermotolerance in *Drosophila melanogaster*: how much is enough and when is more too much? *J. Insect Physiol.* 44, 1091–1101.
- Krebs** R. A. & Loeschcke V. (1999) A genetic analysis of the relationship between life-history variation and heat-shock tolerance in *Drosophila buzzatii*. *Heredity* 83, 46–53.
- Krebs** J. R., Robert S. P., Bettencourt B. R. & Feder M. E. (2001) Changes in thermotolerance and Hsp 70 expression with domestication in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 14, 75–82.
- Kregel** K. C. (2002) Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J. App. Physiol.* 92, 2177–2186.
- Kristensen** T. N., Sørensen J. G. & Loeschcke V. (2003) Mild heat stress at a young age in *Drosophila melanogaster* leads to increased Hsp70 synthesis after stress exposure later in life. *J. Genet.* 82, 89–94.
- Kristensen** T. N., Hoffmann A. A., Overgaard J., Sørensen J. G., Hallas R. & Loeschcke V. (2008) Costs and benefits of cold acclimation in field released *Drosophila*. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 105, 216–221.
- Kunitz** M. (1947) Crystalline soyabean trypsin inhibitor. II General properties. *J. Gen. Physiol.* 30, 291–310.
- Lakhotia** S. C., Srivastava P. & Prasanth K. V. (2002) Regulation of heat shock proteins, Hsp70 and Hsp64, in heat-shocked Malpighian tubules of *Drosophila melanogaster* larvae. *Cell Stress & Chaperones* 7, 347–356.
- Lachenicht** M. W., Clusella-Trullas S., Boardman L., Le Roux C., Terblanche J. S. (2010) Effects of acclimation temperature on thermal tolerance, locomotion performance and respiratory metabolism in *Acheta domesticus* L. (Orthoptera: Gryllidae) *J. Insect Physiol.* 56, 822–830.
- Lazarević** J. (1994) The effect of host plants on the digestive enzymes and variation of fitness components in the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. MSc Thesis, Faculty of Sciences, University of Belgrade, Belgrade.

- Lazarević J., Perić-Mataruga, V., Ivanović, J. & Anđelković M. (1998)** Host plant effects on the genetic variation and correlations in the individual performance of the gypsy moth. *Funct. Ecol.* 12, 141-148.
- Lazarević J. (2000)** Physiological and genetic mechanisms of adaptation to unsuitable nutrition in the gypsy moth, *Lymantria dispar* L. Doctoral Dissertation, Faculty of Biology, University of Belgrade, Belgrade.
- Lazarević J., Perić-Mataruga V. Stojković B. & Tucić N. (2002)** Adaptation of the gypsy moth to an unsuitable host plant. *Entomol. Exp. Appl.* 102, 75-86.
- Lazarević J., Perić-Mataruga V. (2003)** Nutritive stress effects on growth and digestive physiology of *Lymantria dispar* larvae. *Jugoslov. Med. Biochem.* 22, 53 – 59.
- Lazarević J., Perić-Mataruga V., Vlahović M. & Mrdaković M. (2004)** Effects of rearing density on larval growth and activity of digestive enzymes in *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae). *Folia Biologica* 52, 1-2.
- Lazarević J., Nenadović, V. Janković-Tomanić M. & Milanović S. (2008)** Genetic variation and correlations of life-history traits in gypsy moths (*Lymantria dispar* L.) from two populations in Serbia. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 60, 619-627.
- Lazzaro B.P., Flores H. A., Lorigan J. G., Yourth C. P. (2008)** Genotype-by-environment interactions and adaptation to local temperature affect Immunity and fecundity in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog* 4(3): e1000025.
- Lee K. Y., Valaitis A. P., Denlinger D. L. (1998)** Activity of gut alkaline phosphatase, proteases and esterase in relation to diapause of pharate first instar larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 37, 197–205.
- Lee K. P., Behmer S. T., Raubenheimer D. & Simpson S. J. (2002)** A geometric analysis of nutrient regulation in the generalist caterpillar *Spodoptera littoralis* (Boisduval). *J. Insect Physiol.* 48, 655–665.
- Lee K. Y. & Horodyski F. M. (2002)** Restriction of nutrient intake results in the increase of specific *Manduca sexta* allatotropin (Manse-AT) mRNA in the larval nerve cord. *Peptides* 23, 653-661.

- Lee** K. P., Raubenheimer D., Behmer S.T. & Simpson S. J. (2003) A correlation between macronutrient balancing and insect host-plant range: evidence from the specialist caterpillar *Spodoptera exempta* (Walker). *J. Insect Physiol.* 49, 1161–1171.
- Lee** K. P., Raubenheimer D. & Simpson S. J. (2004a) The effects of nutritional imbalance on compensatory feeding for cellulose mediated dietary dilution in a generalist caterpillar. *Physiol. Entomol.* 29, 108–117.
- Lee** K. P., Simpson S. J. & Raubenheimer D. (2004b) A comparison of nutrient regulation between solitary and gregarious phases of the specialist caterpillar *Spodoptera exempta* (Walker). *J. Insect Physiol.* 50, 1171–1180.
- Lee** K. P., Behmer S. T. & Simpson S. J. (2006a) Nutrient regulation in relation to diet breadth: a comparison of *Heliothis* sister species and a hybrid. *J. Exp. Biol.* 209, 2076–2084.
- Lee** K. P., Cory J. S., Wilson K., Raubenheimer D. & Simpson S. J. (2006b) Flexible diet choice offsets protein costs of pathogen resistance in a caterpillar. *Proc. Roy. Soc. London* 273, 823–829.
- Lee** K. P. (2007) The interactive effects of protein quality and macronutrient imbalance on nutrient balancing in an insect herbivore. *J. Exp. Biol.* 210, 3236–3244.
- Lee** K. P., Simpson S. J. & Wilson K. (2008) Dietary protein-quality influences melanization and immune function in an insect. *Funct. Ecol.* 22, 1052–1061.
- Lee** R. E. & Denlinger D. L. (2010) Rapid cold-hardening: ecological significance and underpinning mechanisms. In: Denlinger, D.L., Lee, R. E. (Eds.), *Low Temperature Biology of Insects*. Cambridge University Press, New York, 35–58.
- Lee** K. P. & Roh C. (2010) Temperature-by-nutrient interactions affecting growth rate in an insect ectotherm. *Entomol. Exp. Appl.* 136, 151–163.
- Ledón-Rettig** C. C., Pfennig D. W. & Crespi E. J. (2010) Diet and hormonal manipulation reveal cryptic genetic variation: implications for the evolution of novel feeding strategies. *Proc. R. Soc. B* 277, 3569–3578.

- Lehane** M. J. (1976) Digestive enzyme secretion in *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae). *Cell Tissue Res.* 170, 275–287.
- Leković** S., Lazarević J., Nenadović V., Ivanović J. (2001) The effect of heat stress on the activity of A1 and A2 neurosecretory neurons of *Morimus funereus* (Coleoptera: Cerambycidae) larvae. *Eur. J. Entomol.* 98, 13-18.
- Lemeire** E., Borovsky D., Van Camp J. & Smagghe G. (2008) Effect of ace inhibitors and TMOF on growth, development, and trypsin activity of larval *Spodoptera littoralis*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 69, 199–208.
- Lemos** F. J. A., Zucoloto F. S. & Terra W. R. (1992) Enzymological and excretory adaptations of *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) larvae to high protein and high salt diets. *Comp. Biochem. Physiol.* 102, 775-779.
- Leonard** D. E. (1974) Recent developments in ecology and control of the gypsy moth. *Ann. Rev. Entomol.* 19, 197-229.
- Lerman** D. & Feder M. E. (2001) Laboratory selection at different temperatures modifies heat-shock transcription factor (HSF) in *Drosophila melanogaster*. *J. Exp. Biol.* 204, 315-323.
- Lerman** D. N., Michalak D. N., Helin A. M., Bettencourt B. R. & Feder M. E. (2003) Modification of Heat-shock gene expression in *Drosophila melanogaster* populations via transposable elements. *Mol. Biol. Ecol.* 20, 135-144.
- Leroi** A. M., Bennett A. F., & Lenski R. E. (1994) Temperature acclimation and competitive fitness: an experimental test of the beneficial acclimation assumption. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 1917–1921.
- Levesque** K. R., Fortin M. & Mauffette Y. (2002) Temperature and food quality effects on growth, consumption and post-ingestive utilization efficiencies of the forest tent caterpillar *Malacosoma disstria* (Lepidoptera: Lasiocampidae). *Bull. Entomol. Res.* 92, 127-136.
- Lewis** S. M., Tigreros N., Fedina T. & Ming Q. L. (2012) Genetic and nutritional effects on male traits and reproductive performance in *Tribolium flour* beetles. *J. Evol. Biol.* 25, 438-451.

- Li J.**, Moghaddam S. H. H., Du X., Zhong B. & Chen Y. Y. (2012) Comparative analysis on the expression of inducible HSPs in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Rep.* 39, 3915-3923.
- Lindroth R. L.**, Anson B. D. & Weisbrod A. V. (1990) Effects of protein and juglone on gypsy moths: growth performance and detoxification enzyme activity. *J. Chem. Ecol.* 16, 2533-2547.
- Lindroth R. L.**, Barman M. A. & Weisbrod A. V. (1991) Nutrient deficiencies and the gypsy moth, *Lymantria dispar*: Effects on larval performance and detoxification enzyme activities. *J. Insect Physiol.* 37, 45-52.
- Lindroth R. L.**, Klein K. A., Hemming J. C. D. & Feiker A. M. (1997) Variation in temperature and dietary nitrogen affect performance of the gypsy moth (*Lymantria dispar* L.). *Physiol. Entomol.* 22, 55-64.
- Lindroth R. L.** (2010) Impacts of elevated atmospheric CO₂ and O₃ on forests: Phytochemistry, trophic interactions, and ecosystem dynamics. *J. Chem. Ecol.* 36, 2-21.
- Liu W.**, Zhang X. M. & Wang L. B. (2010) Digestive enzyme and alkaline phosphatase activities during the early stages of *Silurus soldatovi* development. *Zool. Res.* 31, 627-632.
- Lomate P. R.** & Hivrale V. K. (2011) Differential responses of midgut soluble aminopeptidases of *Helicoverpa armigera* to feeding on various host and non-host plant diets. *Arthr. Plant Inter.* 4, 359-368.
- Loeschcke V.** & Hoffmann A. A. (2002) The detrimental acclimation hypothesis. *Trends Ecol. Evol.* 17, 407-408.
- Loeschcke V.** & Sorensen J. G. (2005) Acclimation, heat shock and hardening-a response from evolutionary biology. *J. Thermal Biol.* 30, 255-257.
- Loeschcke V.** & Hoffmann A. A. (2007) Consequences of heat hardening on a field fitness component in *Drosophila* depend on environmental temperature. *Am. Nat.* 169, 175-183.
- Lynch M.** & Walsh B. (1998) Genetics and analysis of quantitative traits. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

- Lwalaba D.**, Hoffmann K. H, Woodring J. (2010) Control of the release of digestive enzymes in the larvae of the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 72, 1–16.
- Lwalaba D.**, Weidlich S., Hoffmann K. H. & Woodring J. (2011) Exogenous and endogenous protease inhibitors in the gut of the fall armyworm larvae, *Spodoptera frugiperda*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 74, 114–126.
- Maksimović M.** (1958) Experimental researches on the influence of temperature upon the development and the dynamics of population of the gypsy moth (*Liparis dispar* L.). Biological Institute of N. R. Serbia, monographs, tome 3, pp 115.
- Malá J.**, Sehnal F., Kumara A. K., Granger N. A., (1987) Effects of starvation, chilling, and injury on endocrine gland function in *Galleria mellonella*. Insect Biochem. Physiol. 4, 113-128.
- Malmendal A.**, Overgaard J., Bundy J. G., Sørensen J. G., Nielsen N. Chr., Loeschcke V. & Holmstrup M. (2006) Metabolomic profiling of heat stress: hardening and recovery of homeostasis in *Drosophila*. Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 291, R205-R212.
- Mantel N.** (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Res. 27, 209–220.
- Manjula S.**, Sabhanayakam S., Mathivanan V. & Saravanan N. (2010) Studies on the changes in the activities of digestive enzymes in the midgut of silkworm *Bombyx mori* (L), (Lepidoptera: Bombycidae) fed with mulberry leaves supplemented with Indian bean (*Dolichos lablab*). Int. J. Biol. Med. Res. 1, 168-171.
- Manjunatha H. B.**, Rajesh R. K. & Aparna H. S. (2010) Silkworm thermal biology: A review of heat shock response, heat shock proteins and heat acclimation in the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. J. Insect Sci. 10, 204.
- Marais E.**, Terblanche J. S. & Chown S. L. (2009) Life stage-related differences in hardening and acclimation of thermal tolerance traits in the kelp fly, *Paractora dreuxi* (Diptera, Helcomyzidae). J. Insect Physiol. 55, 336-343.

- Marshall** K. E. & Sinclair B. J. (2010) Repeated stress exposure results in a survival–reproduction trade-off in *Drosophila melanogaster*. *Proc. R. Soc. B* 277, 963-969.
- Markwick** N. P., Poulton J., Mc Ghie T. K., Wohlers M. W. & Christeller J. T. (2011) The effects of the broad-specificity lipase inhibitor, tetrahydrolipstatin, on the growth, development and survival of the larvae of *Epiphyas postvittana* (Walker) (Tortricidae, Lepidoptera). *J. Insect Physiol.* 57, 1643–1650.
- Mattson** W. J. (1980) Herbivory in relation to plant nitrogen content. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 11, 119–161.
- Matsui** M., Fowler J. H. & Walling L. L. (2006) Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function. *Biol. Chem.* 387, 1535–1544.
- Matsuki** M., Ayres M. P. & McLean S. F. Jr. (1994) Temperature effects on growth and molt of *Nematus calais* (Hymenoptera: Tenthredinidae). *Physiol. Chem. Ecol.* 23, 719-725.
- Mayer** M. P. & Bukau B. (2005) Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.* 62, 670–684.
- McMillan** D. M., Fearnley S. L., Rank N. E. & Dahlhoff E. P. (2005) Natural temperature variation affects larval survival, development and Hsp70 expression in a leaf beetle. *Funct. Ecol.* 19, 844–852.
- McMillan** H. A. Walsh J. P. & Sinclair B. J. (2009) The effects of selection for cold tolerance on cross-tolerance to other environmental stressors in *Drosophila melanogaster*. *Insect Sci.* 16, 263–276.
- McNall** R. J. & Adang M. J. (2003) Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 999–1010.
- Merkx-Jacques** M. & Bede J. C. (2005) Influence of diet on the larval beet armyworm, *Spodoptera exigua*, glucose oxidase activity. *J. Insect Sci.* 5: 48.
- Merkx-Jacques** M. & Despland E. & Bede J. C. (2008) Nutrient utilization by caterpillars of the generalist beet armyworm *Spodoptera exigua*. *Physiol. Entomol.* 33, 51–61.

- Messina** F. J. & Fry J. D. (2003) Environment-dependent reversal of a life history trade-off in the seed beetle *Callosobruchus maculatus*. *J. Evol. Biol.* 16, 501–509.
- Miao** Y. G. (1988) Study on the alkaline phosphatase in the midgut of domestic silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericol. Sinica* 14, 154–158.
- Miao** Y. G. (2002) Studies on the activity of the alkaline phosphatase in the midgut of infected silkworm, *Bombyx mori*. *L. J. Appl. Entomol.* 126, 138–142.
- Michaud** S., Morrow G., Marchand J. & Tanguay R. M. (2002) *Drosophila* small heat shock proteins: cell and organelle-specific chaperones? *Prog. Mol. Subcell. Biol.* 28, 79–101.
- Michaud** M. R., Benoit J. B., Lopez-Martinez G., Elnitsky M. A., Lee R. E. Jr. & Denlinger D. L. (2008) Metabolomics reveals unique and shared metabolic changes in response to heat shock, freezing and desiccation in the Antarctic midge, *Belgica Antarctica*. *J. Insect Physiol.* 54, 645–655.
- Millán** J. L. (2006) Alkaline Phosphatases: Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Pur. Sig.* 2, 335–341.
- Milanović** S. (2011) Razviće gubara *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera, Lymantriidae) na različitim vrstama hrastova u Srbiji. Doktorska disertacija, Šumarski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Miller** J. C., Hanson, P. E. & D. N. Kimberling (1991) Development of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) on douglas-fir foliage. *J. Econ. Entomol.* 84, 461–465.
- Miller** G. A., Clissold F. J., Manytz D. & Simpson S. J. (2009) Speed over efficiency: locusts selected body temperatures that favore growth rate over efficient nutrient utilization. *Proc. R. Soc. B.* 276, 3581–3589.
- Min** K. Y., Flatt T., Kulaots I. & Tatar M. (2007) Counting calories in *Drosophila* diet restriction. *Exp Gerontol.* 42, 247–251.
- Mitchell** H. K. & Lipps L. S. (1978) Heat shock and phenocopy induction in *Drosophila*. *Cell* 15, 907–918.

- Mitchell** K. A. & Hoffmann A. A. (2010) Thermal ramping rate influences evolutionary potential and species differences for upper thermal limits in *Drosophila*. *Funct. Ecol.* 24, 694–700.
- Moczek** A. P. (2010) Phenotypic plasticity and diversity in insects. *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 593–603.
- Morrow** G., Heikkila J. J. & Tanguay R. M. (2006) Differences in the chaperone-like activities of the four main small heat shock proteins of *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress & Chaperones* 11, 51–60.
- Mousseau** T. A. & Roff D. A. (1987) Natural selection and the heritability of fitness components. *Heredity* 59, 181–197.
- Mousseau** T. A. & Fox C. W. (1998) *Maternal effects as adaptations*, Oxford, UK: Oxford University Press.
- Mrdaković** M., Ilijin L., Janković-Tomanić M., Vlahović M., Prolić Z., Perić-Mataruga V., Lazarević J. & Nenadović V. (2005) Effects of thermal stress on activity of *corpora allata* and dorsolateral neurosecretory neurons in *Morimus funereus* larvae. *Arch. Biol. Sci.* 57, 83-92.
- Mrdaković** M., Lazarević J., Perić-Mataruga V., Janković-Tomanić M., Ilijin L., Vlahović M., Mirčić D. & Nenadović V. (2007) Morphometric changes of *corpora allata* in *Morimus funereus* Muls. (Cerambycidae) larvae during thermal stress. *Arch. Biol. Sci. Belgrade*, 59, 47P-48P.
- Mrdaković** M., Lazarević J., Perić-Mataruga V., Ilijin L., Vlahović M. (2008) Partial characterization of a lipase from gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) larval midgut. *Folia biologica (Krakow)* 56, 103-110.
- Mrdaković** M. (2010) The evolution of phenotypic plasticity in response to nutritive stress in the gypsy moth *Lymantria dispar* (L.) larvae. Doctoral dissertation, Faculty of Biology, University of Belgrade, Serbia.
- Mrdaković** M., Perić-Mataruga V., Ilijin L., Vlahović M., Todorović D., Nenadović V. & Lazarević J. (2011) The effects of tannic acid on fitness-related traits of *Lymantria dispar* L. larvae. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, 63, 1037-1045.

- Munyiri** F. N. & Ishikawa Y. (2005) Feeding glucose or sucrose, but not trehalose, suppresses the starvation-induced premature pupation in the yellow-spotted longicorn beetle, *Psacotheta hilaris*, J. Insect Physiol. 51, 1005-1012.
- Nabizadeh** P. & Kumar T. S. J. (2011) Fat body catalase activity as a biochemical index for the recognition of thermotolerant breeds of mulberry silkworm, *Bombyx mori* (L.). J. Therm. Biol. 36, 1-6.
- Nakonieczny** M., Michalczyk K. & Kedziorski A. (2006) Midgut glycosidases activities in monophagous larvae of Apollo butterfly, *Parnassius apollo ssp. frankenbergeri*. CR Biologies 329, 765-774.
- Naseri** B., Fathipour Y., Moharramipour S., Hosseiniaveh V. & Gatehouse A. M. R. (2010) Digestive proteolytic and amylolytic activities of *Helicoverpa armigera* in response to feeding on different soybean cultivars. Pest Man. Sci. 66, 1316-1323.
- Nathan** S. S. (2006) Effects of *Melia azedarach* on nutritional physiology and enzyme activities of the rice leaf folder *Cnaphalocrocis medinalis* (Guenée) (Lepidoptera: Pyralidae). Pest. Biochem. Physiol. 84, 98-108.
- Nathan** S. S., Choi M. Y., Paik C. H. & Seo H. Y. (2007) Food consumption, utilization, and detoxification enzyme activity of the rice leaf folder larvae after treatment with *Dysoxylum* triterpenes. Pest. Biochem. Physiol. 88, 260-267.
- Nauen** R., Sorge D., Sterner A. & Borovsky D. (2001) TMOF-like factor controls the biosynthesis of serine proteases in the larval gut of *Heliothis virescens*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 47, 169-180.
- Neal** J. J. (1996) The brush border membrane and amino acid transport. Arch. Insect Biochem. Physiol. 32, 55-64.
- Nemec** V. & Ženka J. (1996) Activity of phosphatases and esterases in the aphid, *Acrythosiphon pisum* (Hemiptera: Sternorrhyncha: Aphidae) and in the gut wall of the *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larve and pupa. Eur. J. Entomol. 93, 37-44.

- Nemec V. & Socha R. (1988)** Phosphatases and pteridines in malpighian tubules: a possible marker of mosaic mutant in *Pyrrhocoris apterus* (Heteroptera, Pyrrhoridae). *Acta Entomol. Bohemoslov.* 35, 321-326.
- Neven L. G. & Rehfield L. M. (1995)** Comparison of prestorage heat treatments on fifth-instar codling moth (Lepidoptera: Tortricidae) mortality. *J. Econ. Entomol.* 88, 1371-1375.
- Neven L. G. (2000)** Physiological responses of insects to heat. *Post. Biol. Technol.* 21, 103-111.
- Nijhout H. F. (1994)** *Insect hormones*. Princeton University Press, Princeton, NJ.
- Nijhout H. F. (2003)** The control of body size. *Develop. Biol.* 261, 1-9.
- Ning C., Wua K., Liu C., Gao Y., Jurat-Fuentes J. L. & Gao X. (2010)** Characterization of a Cry1Ac toxin-binding alkaline phosphatase in the midgut from *Helicoverpa armigera* (Hübner) larvae. *J. Insect Physiol.* 56, 666-672.
- Nishiura J. T., Burgos C., Aya S., Goryacheva Y. & Lo W. (2007)** Modulation of larval nutrition affects midgut neutral lipid storage and temporal pattern of transcription factor expression during mosquito metamorphosis. *J. Insect Physiol.* 53, 47-58.
- Noriega F. G., Edgar K. A., Bechet R. & Wells M. A. (2002)** Midgut exopeptidase activities in *Aedes aegypti* are induced by blood feeding. *J. Insect Physiol.* 48, 205-212.
- Norry F. M. & Loeschke V. (2002)** Temperature-induced shifts in associations of longevity with body size in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 56, 299-306.
- Norry F. M., Gomez F. H. & Loeschke V. (2008)** Knockdown resistance to heat stress and slow recovery from chill coma are genetically associated in a quantitative trait locus region of chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Ecol.* 16, 3274-3284.
- Noseworthy M. K. & Despland E. (2006)** How do primary nutrients affect the performance and preference of forest tent caterpillars on trembling aspen? *Can. Entomol.* 138, 367-375.

- Nylin S. & Gotthard K. (1998)** Plasticity in life-history traits. *Ann. Rev. Entomol.* 43, 63-83.
- Nyamukondiwa C. & Terblanche J. S. (2010)** Within-generation variation of critical thermal limits in adult Mediterranean and Natal fruit flies *Ceratitis capitata* and *Ceratitis rosa*: thermal history affects short-term responses to temperature. *Physiol. Entomol.* 35, 255–264.
- Ochieng-Odero J. R. P. (1992)** The effects of three constant temperatures on larvae critical weight, latent feeding period, larval maximal weight and fecundity of *Cnephasia jactatana* (Walker) (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Insect Physiol.* 38, 127-130.
- O'Dell T. M. & Butt C. A. & Bridgerforth A. W. (1985)** *Lymantria dispar*. In: *Handbook of Insect Rearing* (ed by P. Singht and Moore). Elsevier, New York, pp. 355-367.
- Okada N., Azuma M. & Eguchi M. (1989)** Alkaline phosphatase isoenzymes in the midgut of silkworm: purification of high pH-stable microvillus and labile cytozolic enzymes. *J. Comp. Physiol. B.* 159, 123–130.
- Okasha A. Y. K. (1968)** Effects of sub-lethal high temperature on an insect *Rhodnius prolixus* (STAL.) II. Mechanisms of cessation and delay of moulting *J. Exp. Biol.* 48, 465-473.
- 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*. *J. Insect Physiol.* 51, 1173–1182.
- Overgaard J., Sorenson J. G., Petersen S. O., Loeschcke V. & Holmstrup M. (2006)** Reorganisation of membrane lipids during fast and slow cold hardening in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Entomol.* 31, 328–335.
- Overgaard J., Tomčala A., Sorensen J. G., Holmstrup M., Krogh P. H., Imašek P. & Košťál V. (2008)** Effects of acclimation temperature on thermal tolerance and membrane phospholipid composition in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 54, 619–629.

- Pandey J. P., Kumar D., Roy S. K., Mishra P. K., Sinha A. K. & Prasad B. C. (2012)** Hemocytes and enzyme-based route to evaluate the impact of seed cocoons preservation conditions on *Anhheraea mylitta* pupae. *Int. J. Zool. Res.* 8, 1-11.
- Pant R. & Gupta D. K. (1979)** The effect of exposure to low temperature on the metabolism of carbohydrates, lipids and protein in the larvae of *Philosamia ricini* J. *Biosci.* 1, 441-446.
- Pantyukhov G. A. (1962)** The effect of positive temperatures on different geographic populations of the European gold tail (*Euproctis chrysorrhea* L.) and the gypsy moth (*Lymantria dispar* L. Lepidoptera, Orgyide). *Entomol. Rev.* 41, 169-175.
- Paritsis J. & Veblen T. (2010)** Temperature and foliage quality affect performance of the outbreak defoliator *Ormiscodes amphimone* (F.) (Lepidoptera: Saturniidae) in northwestern Patagonia, Argentina. *Rev. Chilena Hist. Nat.* 83, 593-603.
- Parmesan C. & Yohe G. (2003)** A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421, 37-42.
- Parmesan C. (2006)** Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Ann. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37, 637-669.
- Parsell D. A. & Lindquist S. (1994)** Heat shock proteins and stress tolerance. *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones* (ed. by R. I. Morimoto, A. Tissieres and C. Georgopoulos), pp. 457-494. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, New York.
- Parsons P. A. (1987)** Evolutionary rates under environmental-stress. *Evol. Biol.* 21, 311-347.
- Partridge L., Barrie B., Fowler K. & French V. (1994)** Evolution and development of body size and cell size in *Drosophila melanogaster* in response to temperature. *Evolution* 48, 1269-1276.
- Patanakar A. G., Giri A. P., Harsulkar A.M., Sainani M. N., Deshpande V. V., Ranjekar P. K. (2001)** Complexity in specificities and expression of *Helicoverpa armigera*

- gut proteases explains polyphagous nature of the insect pest. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 453–464.
- Pe´rez-Hedo M.**, Goodman W. G., Schafellner C., Martini A., Sehnal F., Eizaguirre M. (2011) Control of larval–pupal-adult molt in the moth *Sesamia nonagrioides* by juvenile hormone and ecdysteroids. *J. Insect Physiol.* 57, 602–607.
- Peiffer M.** & Felton G. W. (2005) The host plant as a factor in the synthesis and secretion of salivary glucose oxidase in larval *Helicoverpa zea*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 58, 106–113.
- Perić-Mataruga V.**, Nenadović V. & Ivanović J. (2006) Neurohormones in insect stress: A review. *Arch. Biol. Sci.* 58, 1-12.
- Pernek M.**, Pilas I., Vrbek B., Benko M., Hrasovec B. & Miljkovic J. (2008) Forecasting the impact of the gypsy moth on lowland hardwood forests by analyzing the cyclical pattern of population and climate data series. *Forest Ecol. Manag.* 255, 1740–1748.
- Pétavy G.**, David J. R., Debat V., Gibert P. & Moreteau B. (2004) Specific effects of cycling stressful temperatures upon phenotypic and genetic variability of size traits in *Drosophila melanogaster*. *Evol. Ecol. Res.* 6, 873–890.
- Petersen C.**, Woods A. & Kingsolver J. G. (2000) Stage-specific effects of temperature and dietary protein on growth and survival of *Manduca sexta* caterpillars. *Physiol. Entomol.* 25, 35-40.
- Pigliucci M.** (2001) *Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture*. Johns Hopkins University Press.
- Pigliucci M.** (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Tren. Ecol. Evol.* 20, 481-486.
- Pigliucci M.**, Murren C. J. & Schlichting C. D. (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *J. Exp. Biol.* 209, 2362-2367.
- Podrabsky J. E.**, Somero G. N. (2004) Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. *J. Exp. Biol.* 207, 2237–2254.

- Ponnuvel** K. M., Nakazawa H., Furukawa S., Asaoka A., Ishibashi J., Tanaka H. & Yamakawa M. (2003) A lipase isolated from the silkworm *Bombyx mori* shows antiviral activity against nucleopolyhedrovirus. *J. Virol.* 77, 10725-10729.
- Pratt** W. B. & Toft D. O. (2003) Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *EBM* 228, 111-133.
- Randall** D., Burggren W., & French K. (2000) *Eckert animal physiology: mechanisms and adaptations*. 4th ed. W.H. Freeman, New York.
- Rajesh** R. K., Manjunatha H. B. & Aparna H. S. (2011) Altered protease activity due to heat shock in the whole organism *Bombyx mori* L. *African J. Biochem. Res.* 5, 206-213.
- Raubenheimer** D. (1992) Tannic acid, protein, and digestible carbohydrate: dietary imbalance and nutritional compensation in the African migratory locust. *Ecology* 73, 1012-1027.
- Raubenheimer** D. & Simpson S. J. (1996) Meeting nutrient requirements: the roles of power and efficiency. *Entomol. Exp. Appl.* 80, 65-68.
- Raubenheimer** D., Lee K. P. & Simpson S. J. (1997) Integrative models of nutrient balancing: application to insects to vertebrates. *Nutrit. Res. Rev.* 10, 151-179.
- Raubenheimer** D. & Simpson S. J. (2003) Nutrient balancing in grasshoppers: behavioural and physiological correlates of dietary breadth. *J. Exp. Biol.* 206, 1669-1681.
- Raubenheimer** D. & Simpson S. J. (2004) Organismal stoichiometry: quantifying non-independence among food components. *Ecology* 85, 1203-1216.
- Raubenheimer** D., Lee K. P. & Simpson S. J. (2005) Does Bertrand's rule apply to macronutrients. *Proc. Roy. Soc.* 272, 2429-2434.
- Raubenheimer** D. & Jones S. A. (2006) Nutritional imbalance in an extreme generalist omnivore: tolerance and recovery through complementary food selection. *Animal Behav.* 71, 1253-1262.

- Raubenheimer** D. & Bassil K. (2007) Separate effects of macronutrient concentration and balance on plastic gut responses in locusts. *J. Comp. Physiol. Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 177, 849–855.
- Rauschenbach** I. Yu. (1991) Changes in juvenile hormone and ecdysteroid content during insects development under heat stress. (In *Hormones and Metabolism in Insect Stress*, J. Ivanović and M. Hladni, eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 116-141.
- Rauschenbach** I. Yu., Serova L. I., Timochina I. S., Chentsova N. A., Schumnaja L. V. (1993) Analysis of differences in dopamine content between two lines of *Drosophila virilis* in response to heat stress. *J. Insect Physiol.* 39, 761-767.
- Rauschenbach** I. Yu., Khlebodarova T. M., Chentsova N. A., Gruntenko N. E., Grenback L. G., Yantsen E. I., Filipenikos M. L. (1995) Metabolism of the juvenile hormone in *Drosophila* adults under normal conditions and heat stress: genetical and biochemical aspects. *J. Insect Physiol.* 41, 179-189.
- Rauschenbach** I. Y., Chentsova N. A., Gruntenko N. E., Karpova E. K., Alekseev A. A., Komarova T. N., Vasiliev V. G. (2007a) Dopamine and octopamine regulate 20-hydroxyecdysone level *in vivo* in *Drosophila*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 65, 95–102.
- Rauschenbach** I. Y., Bogomolova E. V., Gruntenko N. E., Adonyeva N. V. & Chentsova N. A. (2007b) Effects of juvenile hormone and 20-hydroxyecdysone on alkaline phosphatase activity in *Drosophila* under normal and heat stress conditions. *J. Insect Physiol.* 53, 587–591.
- Régniere** J., Powell J., Bentz B. & Nealis V. (2012) Effects of temperature on development, survival and reproduction of insects: Experimental design, data analysis and modeling. *J. Insect Physiol.*, doi:10.1016/j.jinsphys.2012.01.010
- Reinecke** J. P. (1985) Nutrition: artificial diets. In G. A. Kerkut and L. I. Gilbert [eds.] 4, 391-419. *Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology*. Pergamon, Oxford, United Kingdom.

- Reynolds** S. E. & Nottingham S. F. (1985) Effects of temperature on growth and efficiency of food utilization in fifth instar caterpillars of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *J. Insect Physiol.* 31, 129-134.
- Reynolds** S., Brown A. M., Seth R. K., Riddford L. M. & Hiruma K. (2009) Induction of supernumerary larval moulting in the tobacco hornworm *Manduca sexta*: interaction of bisacylhydrazine ecdysteroid agonists with endogenous juvenile hormone. *Physiol. Entomol.* 34, 30-38.
- Reznick** D. (1985) Costs of reproduction: an evaluation of the empirical evidence. *Oikos* 44, 257-267.
- Reznick** D. (1992) Measuring the costs of reproduction. *Trends Ecol. Evol.* 7, 42-46.
- Reznick** D., Nunney L. & Tessier A. (2000) Big houses, big cars, superfleas and costs of reproduction. *Trends. Ecol. Evol.* 15, 421-425.
- Riddiford** L. M. (1980) Interaction of ecdysteroids and juvenile hormone in the regulation of larval growth and metamorphosis of the tobacco hornworm. Pp. 409-430, in J. A. Hoffmann, ed. *Progress in ecdysone research*. Elsevier, Amsterdam.
- Riddiford** L. M. (2012) How does juvenile hormone control insect metamorphosis and reproduction? *Gen. Comp. Endocrinol.* 1016/j.ygcn.2012.06.001.
- Rineharth** J., Yocum G. and Denlinger D. L. (2000) Thermotolerance and rapid cold hardening ameliorate the negative effects of brief exposures to high or low temperatures on fecundity in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. *Physiol. Entomol.* 25, 330-336.
- Rinehart** J. P., Li A., Yocum G. D., Robich R. M., Hayward S. A. L., Denlinger D. L. (2007) Up-regulation of heat shock proteins is essential for cold survival during insect diapause. *Proc. Nat. Acad. Sci. Am.* 104, 11130-11137.
- Riska** B., Prout T. & Turelli M. (1989) Laboratory estimates of heritabilities and genetic correlations in nature. *Genetics* 123, 865-871.
- Robertson** R. M. (2004) Thermal stress and neural function: adaptive mechanisms in insect model systems. *J. Thermal Biol.* 29, 351-358.

- Roelofs D.**, Aarts M. G. M., Schat H. & van Straalen N. M. (2008) Functional ecological genomics to demonstrate general and specific responses to abiotic stress. *Funct. Ecol.* 2, 8–18.
- Roelofs D.**, Morgan J., Stürzenbaum S. (2010) The significance of genome-wide transcriptional regulation in the evolution of stress tolerance. *Evol. Ecol.* 24, 527–539.
- Roff D. A.** (1996) The evolution of genetic correlations: an analysis of patterns. *Evolution* 50, 1392–1403.
- Roff D. A.** (2002) Life-history evolution. Sinauer, Sunderland, MA, USA.
- Roy B. A.** & Kirchner W. J. (2000) Evolutionary Dynamics of pathogen resistance and tolerance. *Evolution* 54, 51–63.
- Rossiter M. C.** (1987) Genetic and phenotypic variation in diet breadth in a generalist herbivore. *Evol. Ecol.* 1, 272–282.
- Rossiter M. C.**, Schultz J. C. & Baldwin I. T. (1988) Relationships among defoliation, red oak phenolics, and gypsy moth growth and reproduction. *Ecol.* 69, 267–277.
- Sakai T.**, Satake H. & Takeda M. (2006) Nutrient-induced α -amylase and protease activity is regulated by crustacean cardioactive peptide (CCAP) in the cockroach midgut. *Peptides* 27, 2157–2164.
- Sakharov I. Y.**, Makarova I. E. & Ermolin G. A. (1989) Chemical modification and composition of tetrameric isozyme K of alkaline phosphatase from harp seal intestinal mucosa, *Comp. Biochem. Physiol B* 92, 119–122.
- Salvucci M. E.** (2000) Sorbitol accumulation in whiteflies: evidence for a role in protecting proteins during heat stress. *J. Therm Biol.* 25, 353–361.
- Salvucci M. E.**, Stecher D. S. & Henneberry T. J. (2000) Heat shock proteins in whiteflies, an insect that accumulates sorbitol in response to heat stress. *J. Thermal Biol.* 25, 363–371.
- Sambucetti P.**, Scannapieco A. C. & Norry F. M. (2010) Direct and correlated responses to artificial selection for high and low knockdown resistance to high temperature in *Drosophila buzzatii*. *J. Thermal Biol.* 35, 232–238.

- Santos** C. D. & Terra W. R. (1986) Distribution and characterisation of oligomeric digestive enzymes from *Erinnys ello* larvae and inferences concerning secretory mechanisms and permeability of peritrophic membrane. *Insect Biochem.* 16, 691-700.
- Sarate** P. J, Tamhane V. A., Kotkar H. M., Ratnakaran N., Susan N., Gupta V. S. & Giri A. P. (2012) Developmental and digestive flexibilities in the midgut of a polyphagous pest, the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. *J. Insect Sci.* 12, 42.
- Scannapieco** A. C., Sørensen J. G. & Loeschcke V. & Norry F. M. (2007) Heat-induced hormesis in longevity of two sibling *Drosophila* species. *Biogerontol.* 8, 315-325.
- Sejerkilde** M., Sorensen J. G. & Loeschcke V. (2003) Effects of cold- and heat-hardening on thermal resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 49, 719-726.
- Scheiner** S. M. & Lyman R. F. (1989) The genetics of phenotypic plasticity I. Heritability. *J. Evol. Biol.* 2, 95-107.
- Scheiner** S. M. and Lyman R. F. (1991) The genetics of phenotypic plasticity. II. Responses to selection. *J. Evol. Biol.* 4: 23-50.
- Scheiner** S. M., Caplan R. L. & Lyman R. F. (1991) The genetics of phenotypic plasticity. III. Genetic correlations and fluctuating asymmetries. *J. Evol. Biol.* 4, 51-68.
- Scheiner** S. M. (1993) Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 24, 35-68.
- Scheiner** S. M. (2002) Selection experiments and the study of phenotypic plasticity. *J. Evol. Biol.* 15, 889-898.
- Schlichting** C. D. & Pigliucci M. (1993) Control of phenotypic plasticity via regulatory genes. *Am. Nat.* 142, 366-370.
- Schlichting** C. D. & Pigliucci M. (1998) *Phenotypic Evolution: A Reaction Norm Perspective*. Sinauer Associates, MA, USA.

- Schlichting** C. D. (2004) The role of phenotypic plasticity in diversification. In *Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches* (ed. T. J. DeWitt and S. M. Scheiner), pp. 191-200. Oxford: Oxford University Press.
- Shan** X. J., Huang W., Cao L., Xiao Z. Z. & Dou S. Z. (2009) Ontogenetic development of digestive enzymes and effect of starvation in miiuy croaker *Miichthys miiuy* larvae. *Fish Physiol. Biochem.* 35, 385–398.
- Sharma** S., Rohilla M. S. & Tiwari P. K. (2007) Developmental and hyperthermia-induced expression of the heat shock proteins HSP60 and HSP70 in tissues of the housefly *Musca domestica*: An in vitro study. *Gen. Mol. Biol.* 30, 159-168.
- Service** P. M. & Rose M. R. (1985) Genetic covariation among life history components: the effects of novel environments. *Evolution* 39, 943–945.
- Sgró** C. M. & Hoffmann A. A. (1998) Effects of temperature extremes on genetic variances for life history traits in *Drosophila melanogaster* as determined from parent-offspring comparisons. *J. Evol. Biol.* 11, 1-20.
- Sgró** C. M. & Hoffmann A. A. (2004) Genetic correlations, trade-offs and environmental variation. *Heredity* 93, 241–248.
- Silbermann** R. & Tatar M. (2000) Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 54, 2038–2045.
- Silva**, C. P., Terra, W. R., Xavier-Filho, J., Grossi-de-Sa', M. F., Lopes, A. R., Pontes, E. G., (1999) Digestion in larvae of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) with emphasis on α -amylases and oligosaccharidases. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 29, 355–366.
- Silva** C. P., Terra W. R., Xavier-Filho J., Grossi de Sa M. F., Isejima E. M., Da Matta R. A., Miguens F. C. & Bifano T. D. (2001a) Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 41–50.
- Silva** C. P., Terra W. R., Xavier-Filho J., de Sa' M. F. G., Isejima E. M., DaMatta R. A., Miguens F. C. & Bifano T. D. (2001b) Digestion of legume starch granules by larvae of *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae) and the induction of α -amylases in response to different diets. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31, 41–50.

- Simpson S. J. & Simpson C. L. (1990)** The mechanisms of nutritional compensation by phytophagous insects. In: Bernays, E.A. (Ed.), *Insect-Plant Interactions*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 111–160.
- Simpson S. J. & Raubenheimer D. (1993a)** A multilevel analysis of feeding behaviour: the geometry of nutritional decisions. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 342, 381–402.
- Simpson S. J. & Raubenheimer D. (1993b)** The central role of the haemolymph in the regulation of nutrient intake in insects. *Physiol. Entomol.* 18, 395–403.
- Simpson S. J. & Raubenheimer D. (1996)** Feeding behaviour, sensory physiology and nutrient feedback: a unifying model. *Entomol. Exp. Appl.* 80, 55-64.
- Simpson S. J. & Raubenheimer D. (2001)** The geometric analysis of nutrient-allelochemical interactions: A case study using locusts. *Ecology*, Vol. 82, 422-439.
- Simpson S. J., Sibly R. M., Lee K. P., Behmer S. T. & Raubenheimer D. (2004)** Optimal foraging when regulating intake of multiple nutrients. *Ann. Behav.* 68, 1299–1311.
- Simpson S. J. & Raubenheimer D. (2009)** Macronutrient balance and lifespan. *Aging* 1, 875-880.
- Simons A. M. & Roff D. A. (1996)** The effect of a variable environment on the genetic correlation structure in a field cricket. *Evolution* 50, 267-275.
- Sing A., Sharma R. Kr. & Sharma B. (2010)** Low temperature induced alterations in certain biochemical constituents of 5th instar larvae of *Philosamia ricini* (Lepidoptera: Satunidae). *Insect Physiol.* 2, 11–16.
- Sinclair B. J. & Roberts S. P. (2005)** Acclimation, shock and hardening. *J. Thermal Biol.* 30, 557–562.
- Singer M. A. & Lindquist S. (1998)** Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell.* 1, 639-648.

- Singer** M. C. & Parmesan Y. (2010) Phenological asynchrony between herbivorous insects and their hosts: signal of climate change or pre-existing adaptive strategy? *Phil. Trans. R. Soc. B* 365, 3161–3176.
- Sisodia** S. & Singh B. N. (2009) Variations in morphological and life-history traits under extreme temperatures in *Drosophila ananassae*. *J. Biosci.* 34, 263–274.
- Sivapalan** P. & Gnanapragasam N. C. (1979) Effects of varying proportions of dietary ingredients in meridic diets on the development of the tea tortrix, *Homona coffearia* in the laboratory. *Entomol. Exp. Appl.* 26, 55-60.
- Sejerkilde** M., Sorensen J. G. & Loeschcke V. (2003) Effects of cold- and heat hardening on thermal resistance in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* 49, 719-726.
- Slansky** E. Jr. & Scriber J. M. (1985) Food consumption and utilization. Pp. 87-163 in G.A. Kerkut and L.I. Gilbert, eds. *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and pharmacology*. Vol. 4. Pergamon, Oxford.
- Slansky** F. (1993) Nutritional ecology: the fundamental quest for nutrients. *Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging* (ed. by NE Stamp & TM Casey), pp. 29– 91. Chapman & Hall, New York, NY, USA.
- Smith** E. M., Hoi J. T., Eissenberg J. C., Shoemaker J. D., Neckameyer W. S., Ilvarsonn A. M., Harshman L. G., Schlegel V. L. & Zemleni J. (2007) Feeding *Drosophila* a biotin-deficient diet for multiple generations increases stress resistance and lifespan and alters gene expression and histone biotinylation patterns. *J. Nutr.* 137, 2006–2012.
- Sokal** R. R. & Rohlf F. J. (1981) *Biometry*. Freeman, San Francisco.
- Solomon** J. M., Rossi J. M., Golic K., McGarry T. & Lindquist S. (1991) Changes in Hsp70 alter thermotolerance and heat-shock regulation in *Drosophila*. *New Biol.* 3, 1106–1120.
- Somero** G. N. (2004) Adaptations of enzymes to temperature: searching for basic “strategies”. *Comp. Biochem. Physiol. B.* 139, 321-333.
- Somero** G. N. (2005) Linking biogeography to physiology: Evolutionary and acclamatory adjustments of thermal limits. *C. B. M. Front. Zool.* 2:1.

- Somero** G. N. (2010) The physiology of climate change: how potentials for acclimatization and genetic adaptation will determine “winners” and “losers”. *J. Exp. Biol.* 213, 912-920.
- Sonmez** E. & Gulel A. (2008) Effects of different temperatures on the total carbohydrate, lipid and protein amounts of the bean beetle, *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae). *Pak J. Biol. Sci.* 11, 1803-1808.
- Sørensen** J. G., Dahlggaard J. & Loeschcke V. (2001) Genetic variation in thermal tolerance among populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp 70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Func. Ecol.* 15, 289-296.
- Sørensen** J. G. & Loeschcke V. (2002) Decreased heat-shock resistance and down-regulation of Hsp70 expression with increasing age in adult *Drosophila melanogaster*. *Func. Ecol.* 16, 379–384.
- Sørensen** J. G., Kristensen T. N. & Loeschcke V. (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecol. Lett.* 6, 1025–1037.
- Sørensen** J. G., Nielsen M. M., Kruhoffer M., Justesen J. & Loeschcke V. (2005a) Full genome gene expression analysis of the heat stress response, in *Drosophila melanogaster*. *Cell Stress Chaperon.* 10, 312–328.
- Sørensen** J. G., Norry F. M., Scannapieco A. C., Loeschcke V. (2005b) Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *J. Evol. Biol.* 18, 829–837.
- Sørensen** J. G. & Loeschcke V. (2007) Studying stress responses in the post-genomic era: its ecological and evolutionary role. *J. Biosci.* 32, 447–456.
- Sørensen** J. G., Sarup P., Kristensen T. N. & Loeschcke V. (2008) Temperature-induced hormesis in *Drosophila*. E. Le Burg & S. I. S. Rattan (eds.) *Mild stress and Healty Aging*, 65-79.
- Sørensen** J.G. (2010) Application of heat shock protein expression for detecting natural adaptation and exposure to stress in natural populations. *Curr. Zool.* 56, 703–713.

- Sorensen** A., Mayntz D., Simpson S. J. & Raubenheimer D. (2010) Dietary ratio of protein to carbohydrate induces plastic responses in the gastrointestinal tract of mice. *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 180, 259–266.
- Spit** J., Badisco L., Verlinden H., Van Wielendaele P., Zels S., Dillen S. & Van den Broeck (2012) Peptidergic control of food intake and digestion in insects. *Can. J. Zool.* 90, 489-506.
- Sridhara** S. & Bhat J. V. (1963) Alkaline and acid phosphatases of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* 9, 693-701.
- Srinivasan** A., Giri A. P. & Gupta V. S. (2006) Structural and functional diversities in lepidopteran serine proteases. *Cell Mol. Biol. Lett.* 11, 132 – 154.
- Stamp** N. E. (1990) Growth versus molting time of caterpillars as a function of temperature, nutrient concentration and the phenolic rutin. *Oecologia* 82, 107–113.
- Stamp** N. E. & Horwath K. L. (1992) Interactive effects of temperature and concentrations of the flavonoid rutin on growth, molt and food utilization of *Manduca sexta* caterpillars. *Entomol. Exp. Appl.* 64, 135-150.
- Stamp** N. E. (1993) Temperate region view of the interaction of temperature, food quality, and predators on caterpillar foraging. *Caterpillars: Ecological and Evolutionary Constraints on Foraging* (ed. by NE Stamp & TM Casey), pp. 478–508. Chapman & Hall, New York, NY, USA.
- Stamp** N. E., Temple M. P., Traugott M. S. & Wilkens R.T. (1994) Temperature-allelochemical interactive effects on performance of *Manduca sexta* caterpillars. *Entomol. Exp. App.* 72, 199-210.
- Stamp** N. E. & Yang Y. (1996) Response of insect herbivores to multiple allelochemicals under different thermal regimes. *Ecol.* 77, 1088-1102.
- Stay** B. & Tobe S. S. (2007) The role of allatostatins in juvenile hormone synthesis in insects and crustaceans. *Ann. Rev. Entomol.* 52, 277-299.
- Stearns** S. C. (1992) *The Evolution of Life Histories*, Oxford University Press: Oxford.

- Steigenga** M. J., Zwaan B. J., Brakefield P. M. & Fisher K. (2005) The evolutionary genetics of egg size plasticity in a butterfly. *J. Evol. Biol.* 18, 281–289.
- Stoks** R., De Block M. & McPeck M. A. (2006) Physiological costs of compensatory growth in a damselfly. *Ecology* 87, 1566–1574.
- Stillman** J. H. (2003) Acclimation capacity underlies susceptibility to climate change. *Science* 301, 65.
- Stillwell** R. C., Wallin W. G., Hitchcock L. J. & Fox C. W. (2007) Phenotypic plasticity in a complex world: interactive effects of food and temperature on fitness components of a seed beetle. *Oecologia* 153, 309–321.
- Stillwell** R. C., Blanckenhorn W. U., Teder T. & Fox C. W. (2010) Sex differences in phenotypic plasticity affect variation in sexual size dimorphism in insects: from physiology to evolution. *Ann. Rev. Entomol.* 55, 227–245.
- Stockhoff** B. A. (1991) Starvation resistance of gypsy moth, *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae): tradeoffs among growth, body size and survival. *Oecologia* 88, 422–429.
- Stockhoff** B. A. (1992) Diet-switching by gypsy moth: effects of diet nitrogen history vs. switching on growth, consumption, and food utilization. *Entomol. Exp. Appl.* 64, 225–238.
- Stockhoff** B. A. (1993a) Diet Heterogeneity: Implications for growth of a generalist herbivore, the gypsy moth. *Ecology* 74, 1939–1949.
- Stockhoff** B. A. (1993b) Protein intake by gypsy moth larvae on homogeneous and heterogeneous diets. *Physiol. Entomol.* 18, 409–419.
- Stockhoff** B. A. (1993c) Ontogenetic change in dietary selection for protein and lipid by gypsy moth larvae. *J. Insect Physiol.* 39, 677–686.
- Stoks** R., De Block M. & McPeck M. A. (2006) Physiological costs of compensatory growth in a damselfly. *Ecology* 87, 1566–1574.
- Subramanian** S. & Mohankumar S. (2006) Genetic variability of the bollworm, *Helicoverpa armigera*, occurring on different host plants. *J. Insect Sci.* 6, 1–8.

- Sui** Y. P., Wang J. X. & Zhao X. F. (2008) Effects of classical insect hormones on the expression profiles of a lipase gene from the cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*). *Insect Mol. Biol.* 17, 523–529.
- Sujak** P., Ziemnicki K., Ziemnicka J., Lipa J. J. & Obuchowicz L. (1978) Acid and alkaline phosphatase activity in the fat body and midgut of the beet armyworm, *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), infected with nuclear polyhedrosis virus. *J. Inverteb. Pathol.* 31, 4-9.
- Sukhanova** M. Z., Grenback L. G., Gruntenko N. E., Khlebodarova T. M. & Rauschenbach I. Y. (1996) Alkaline phosphatase in *Drosophila* under heat stress. *J. Insect Physiol.* 42, 161–165.
- Sukhanova** M., Shumnaya L. V., Grenback L. G., Gruntenko N. E., Khlebodarova T. M. & Rauschenbach I. Y. (1997) Tyrosine decarboxylase and dopa decarboxylase in *Drosophila virilis* under normal conditions and heat stress: genetic and physiological aspects. *Biochem. Genet.* 35, 91–103.
- Šustr** V. & Block W. (1998) Temperature dependence and acclimatory response of amylase in the High Arctic springtail *Onychiurus arcticus* (Tullberg) compared with the temperate species *Protaphorura armata* (Tullberg). *J. Insect Physiol.* 44, 991–999.
- Tachibana** S. I., Numata H. & Goto S. G. (2005) Gene expression of heat-shock proteins (Hsp23, Hsp70 and Hsp90) during and after larval diapause in the blow fly *Lucilia sericata*. *J. Insect Physiol.* 51, 641–647.
- Takaki** K., Sakurai S. (2003) Regulation of prothoracic gland ecdysteroidogenic activity leading to pupal metamorphosis. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 1189–1199.
- Tammaru** T., Ruhomaki K. & M. Montola (2000) Crowding induced plasticity in *Epirrita autumnata* (Lepidoptera: Geometridae): weak evidence of specific modifications in reaction norms. *Oikos* 90, 171-181.
- Tengjaroenkul** B., Smith B. J., Caceci T. & Smith S. A. (2000) Distribution of intestinal enzyme activities along the intestinal tract of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L [J]. *Aquaculture*, 182, 317-327.

- Terblanche** J. S., Chown S. L. (2006) The relative contributions of developmental plasticity and adult acclimation to physiological variation in the tsetse fly, *Glossina pallidipes* (Diptera, Glossinidae). *J. Exp. Biol.* 209, 1064–1073.
- Terblanche** J. S., Deere J. A., Clusella-Trullas S., Janion C. & Chown S. L. (2007) Critical thermal limits depend on methodological context. *Proc. R. Soc. London. Biol. Sci.* 274, 2935–2942.
- Terblanche** J. S., Nyamukondiwa C. & Kleynhans E. (2010) Thermal variability alters climatic stress resistance and plastic responses in a globally invasive pest, the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). *Entomol. Exp. App.* 137, 304–315.
- Terra** W. R. & Ferreira C. F. (1994) Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B, 1-62.
- Terra** W. R. & Ferreira C. F. (2005) Biochemistry of digestion. In: *Comprehensive Molecular Insect Science* 4, 171-224. Ed. by: Gilbert L. I., Iatrou K., Gill S. S. Oxford, Elsevier.
- Tiwari** P. K., Mohan D. R. K. & Joshi A. (1995) Developmental study of thermotolerance and the heat shock response in *Lucilia cuprina* (Weidemann). *J. Biosci.* 20, 341–354.
- Thompson** S. N. (1998) Long-term regulation of gluconeogenesis by dietary carbohydrate and relevance to blood sugar level in an insect *Manduca sexta*. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 30, 987-999.
- Thompson** S. N. & Redak R. A. (2000) Interactions of dietary protein and carbohydrate determine blood sugar level and regulate nutrient selection in the insect *Manduca sexta* L. *Bioch. Bioph. Acta* 1523, 91-102.
- Thompson** S. N., Borchardt D. B. & Wang L. W. (2003) Dietary nutrient levels regulate protein and carbohydrate intake, gluconeogenic/glycolytic flux and blood trehalose level in the insect *Manduca sexta* L. *J. Comp. Physiol.* 173B, 149-163.

- Thompson S. N., Redak R. A. & Wang L. W.** (2005) Host nutrition determines blood nutrient composition and mediates parasite development success: *Manduca sexta* L. parasitized by *Cotesia congregata* (Say). *J. Exp. Biol.* 208, 625-635.
- Tomanek L. & Somero G. N.** (2002) Interspecific- and acclimation-induced variation in levels of heat-shock proteins 70 (hsp70) and 90 (hsp90) and heat-shock transcription factor-1 (HSF1) in congeneric marine snails (genus *Tegula*): implications for regulation of *hsp* gene expression. *J. Exp. Biol.* 205, 677-685.
- Tomic-Carruthers N.** (2007) Development of a meridic diet for *Hylobius transversovittatus* (Coleoptera: Curculionidae) and the role of carbohydrates in feeding, growth, and survival of larvae *J. Econom. Entomol.* 100, 1062-1070.
- Traw M. B., Lindroth R. L. & Bazzaz F. A.** (1996) Decline in gypsy moth (*Lymantria dispar*) performance in an elevated CO₂ atmosphere depends upon host plant species. *Oecologia* 108, 113-120.
- Trier T. M. & Mattson W. J.** (2003) Diet-induced thermogenesis in insects: a developing concept in nutritional ecology. *Environ. Entomol.* 32, 1-8.
- Tucic N., Milošević M., Gliksman I., Milanovic D. & Aleksic I.** (1991) The effects to larval density on genetic variation and covariation among life-history traits in the bean weevil (*Acanthoscelides obtectus* Say). *Funct. Ecol.* 5, 525-534.
- Ueno H., Hasegawa Y., Fujiyama N. & Katakura H.** (2001) Comparison of genetic variation in growth performance on normal and novel host plants in a local population of a herbivorous ladybird beetle, *Epilachna vigintioctomaculata*. *Heredity* 86, 1-7.
- Ueno H., Fujiyama N., Yao I., Sato Y. & Katakura H.** (2003) Genetic architecture for normal and novel host-plant use in two local populations of the herbivorous ladybird beetle, *Epilachna pustulosa*. *J. Evol. Biol.* 16, 883-895.
- Urbášek F. & Rusek J.** (1994) Activity of digestive enzymes in seven species of Collembola (Insecta: Entognatha). *Pedobiol.* 38, 400-406.
- Valaitis A. P.** (1995) Gypsy moth midgut proteinases: purification and characterization of luminal trypsin, elastase and the brush border membrane leucine aminopeptidase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 139-149.

- Valaitis** A. P., Lee M. K., Rajamohan F. & Dean D. H. (1997) Brush border membrane aminopeptidase-N in the midgut of the *Gypsy moth* serves as the receptor for the CryIA (c) δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25, 1143-1151.
- Valtonen** T. M., Roff D. A. & Rantala M. J. (2011) Analysis of the effects of early nutritional environment on inbreeding depression in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 24, 196–205.
- Vanhanen** H., Veteli T.O., Päivinen S., Kellomäki S. & Niemelä P. (2007) Climate change and range shifts in two insect defoliators: gypsy moth and nun moth - a model study. *Silva Fennica* 41, 621–638.
- Van Dooremalen** C., Suring W. & Ellers J. (2011) Fatty acid composition and extreme temperature tolerance following exposure to fluctuating temperatures in a soil arthropod. *J. Insect Physiol.* 57, 1267–1273.
- Van Noordwijk** A. J. & De Jong G. (1986) Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *Am. Nat.* 128, 137–142.
- Van Doorslaer** W. & Stoks R. (2005) Growth rate plasticity to temperature in two damselfly species differing in latitude: contributions of behaviour and physiology. *Oikos* 111, 599-605.
- Van Frankenhuyzen** K., Regniere, J. & Bernier-Cardou M. (2008) Response of *Lymantria dispar* L. (Lepidoptera: Lymantriidae) to *Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki* at different ingested doses and temperatures. *J. Invertebr. Patholog.* 99, 263–274.
- Vehviläinen** H., Kause A., Kuukka-Anttila H., Koskinen H. and Paananen T. (2012) Untangling the positive genetic correlation between rainbow trout growth and survival. *Evol. Appl.* doi:10.1111/j.1752-4571.2012.00251.x.
- Velu** D., Ponnuvel K. M. & Hussein-Qadri S. M. (2008) Expression of the Heat shock protein genes in response to thermal stress in the silkworm, *Bombyx mori*. *Int. J. Indust. Entomol.* 16, 21-27.
- Verdu** J. R., Casas J. L., Lobo J. M. & Numa C. (2010) Dung beetles eat acorns to increase their ovarian development and thermal tolerance. *PLoS ONE* 5 (4).

- Veteli** T. O., Lahtinen A., Repo T., Niemelä P. & Varama M. (2005) Geographic variation in winter freezing susceptibility in the eggs of the European pine sawfly (*Neodiprion sertifer*). *Agr. Forest Entomol.* 7, 115–120.
- Via** S. (1984) The Quantitative Genetics of Polyphagy in an Insect Herbivore. II. Genetic correlations in larval performance within and among host plants. *Evolution* 38, 896-905.
- Via** S. (1993) Adaptive phenotypic plasticity: target or by-product of selection in a variable environment? *Am. Nat.* 142, 352–365.
- Vieira** C., Pasyukova E.G., Zeng Z. B., Hackett J. B., Lyman R. F. & Mackay T. F. C. (2000) Genotype-environment interaction for quantitative trait loci affecting life span in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 154, 213–227.
- Vijendravarma** R. K., Narasimha S. & Kawecki T. J. (2010) Effects of parental larval diet on egg size and off spring traits in *Drosophila*. *Biol. Lett.* 6, 238–241.
- Vila** L., Quilis J., Meynard D., Breitler J. C., Marfà V., Murillo I., Vassal J. M., Messeguer J., Guiderdoni E. & San Segundo B. (2005) Expression of the maize proteinase inhibitor (*mpi*) gene in rice plants enhances resistance against the striped stem borer (*Chilo suppressalis*): effects on larval growth and insect gut proteinases. *Plant Biotech. J.* 3, 187-202.
- Vlahović** M. (2009) Efekat kadmijuma na rast i biohemijske osobine larvi gubara *Lymantria dispar* L. Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Vollmer** J. H., Sarup P., Kærsgaard C. W., Dahlgaard J. & Loeschcke V. (2004) Heat and cold-induced male sterility in *Drosophila buzzatii*: genetic variation among populations for the duration of sterility. *Heredity* 92, 257-262.
- Vorburger** C. (2005) Positive genetic correlations among major life-history traits related to ecological success in the aphid *Myzus persicae*. *Evolution* 59, 1006-1015.
- Vorburger** C. & Ramsauer N. (2008) Genetic variation and covariation of aphid life-history traits across unrelated host plants. *Bull. Entomol. Res.* 98, 543–553.

- Wagner** N. D. & Frost P. C. (2012) Responses of alkaline phosphatase activity in *Daphnia* to poor nutrition. *Oecologia*, DOI 10.1007/s00442-012-2277-0.
- Waldbauer** G. P., Cohen R. W. & Friedman S. (1984) Self-selection of an optimal nutrient mix from defined diets by larvae of the corn earworm, *Heliothis zea* (Boddie). *Physiol. Zool.* 57, 590-597.
- Waldbauer** G. P. & Friedman S. (1991) Self-selection of optimal diets by insects. *Ann. Rev. Entomol.* 36, 43-63.
- Wang** S., Johnson J. A., Tang J. Yin X. (2005a) Heating condition effects on thermal resistance of fifth-instar *Amyelois transitella* (Walker) (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Stored Prod. Res.* 41, 469-478.
- Wang** P., Zhang X. & Zangh J. (2005b) Molecular characterization of four midgut aminopeptidase N isozymes from the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *Insect Bioch. Mol. Biol.* 35, 611-620.
- Wang** X. W., Ji L. Z. & Liu Y. (2006) Effects of increased atmospheric CO₂ on nutritional contents in poplar (*Populus pseudo-simonii* [Kitag.]) tissues and larval growth of gypsy moth (*Lymantria dispar*). *Acta Ecologica Sinica* 26, 3166-3174.
- Wang** X. W., Ji L. Z., Zhang Q. H., Liu Y. & Wang G. Q. (2009) Effects of elevated CO₂ on feeding preference and performance of the gypsy moth (*Lymantria dispar*) larvae. *J. App. Entomol.* 133, 47-57.
- Wang** Z., Liu S., Yang B. & Liu Z. (2011) Characterization of soluble and membrane-bound alkaline phosphatase in *Nilaparvata lugens* and their potential relation to development and insecticide resistance. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 78, 30-45.
- Warbrick-Smith** J., Behmer S. T., Lee K. P., Raubenheimer D. & Simpson S. J. (2006) Evolving resistance to obesity in an insect. *PNAS* 103, 14045-14049.
- Weider** L. J., Makino W., Acharya K., Glenn K. L., Kyle M., Urabe J. & Elser J. J. (2005) Genotype environment interactions, stoichiometric food quality effects, and clonal coexistence in *Daphnia pulex*. *Oecologia* 143, 537-547.

- Weigensberg** I. & Roff D. A. (1996) Natural heritabilities: can they be reliably estimated in the laboratory? *Evolution* 50, 2149–2157.
- Weinig** C., Johnston J., German Z. M. & Demink L. M. (2006) Local and global costs of adaptive plasticity to density in *Arabidopsis thaliana*. *Am. Nat.* 167, 826–836.
- Weldon** C. W., Terblanche J. S., Chown S. L. (2011) Time-course for attainment and reversal of acclimation to constant temperature in two *Ceratitidis* species. *J. Thermal Biol.* 36, 479-485.
- Wenzel** U. (2006) Nutrition, sirtuins and aging. *Genes & Nutrition* 1, 85–93.
- West-Eberhard** M. J. (2003) Developmental plasticity and evolution. New York, NY: Oxford University Press.
- Westerterp-Plantenga** M. S., Rolland V., Wilson S. A. J. & Westerterp K. R. (1999) Satiety related to 24 h diet-induced thermogenesis during high protein-carbohydrate vs high fat diets measured in a respiration chamber. *E. J. Clinical Nutr.* 53, 495-502.
- Wigglesworth** V. B. (1952) Hormone balance and the control of metamorphosis in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera). *J. Exp. Biol.* 39, 620-31.
- Wigglesworth** V. B. (1972) The principles of insect physiology. In: Digestion and nutrition. Chapman and Hall, London, pp. 476–552.
- Williams** R. S., Norby R. J. & Lincoln D. E. (2000) Effects of elevated CO₂ and temperature-grown red and sugar maple on gypsy moth performance. *Global Change Biol.* 6, 685–696.
- Williams** R. S., Lincoln D. E. & Norby R. J. (2003) Development of gypsy moth larvae feeding on red maple saplings at elevated CO₂ and temperature. *Oecol.* 137, 114–122.
- Wilson** R. S. & Franklin C. E. (2002) Testing the beneficial acclimation hypothesis. *Trends Ecol. Evol.* 17, 66-70.
- Willmer** P., Stone G., & Johnston I. A. (2000) Environmental physiology of animals. Blackwell Science, Oxford, U.K.
- Windig** J. J. (1994) Genetic correlations and reaction norms in wing pattern of the tropical butterfly *Bicyclus anynana*. *Heredity* 73, 459—470.

- Whitman** D. W. & Agrawal A. A. (2009) What is Phenotypic plasticity and why is it important? In: Whitman D. W., Phenotypic plasticity in thermal performance curves. Ananthakrishna T. N., editors. Phenotypic plasticity of insects: Mechanisms and Consequences. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, pp. 1–63.
- Whitman** D. W. (2009) Acclimation. In: Whitman, D. W. and Ananthakrishnan, T. N. (Eds.) Phenotypic Plasticity of Insects. Mechanisms and Consequences. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, USA, pp. 675-739.
- Wojewodzcic** M. W, Kyle M., Elser J. J., Hessen D. O. & Andersen T. (2011) Joint effect of phosphorus limitation and temperature on alkaline phosphatase activity and somatic growth in *Daphnia magna*. *Oecologia* 165, 837–846.
- Wolfe** G. R., Hendrix D. L. & Salvucci M. E. (1998) A thermo-protective role for sorbitol in the silverleaf whitefly. *J. Insect Physiol.* 44, 597-603.
- Wolfersberger** M. G. (1984) Enzymology of plasma membranes of insect intestinal cells. *Am. Zool.* 24, 187–197.
- Woodring** J., Hoffmann K. H. & Lorenz M. W. (2007) Feeding, nutrient flow, and digestive enzyme release in the giant milkweed bug, *Oncopeltus fasciatus*. *Physiol. Ent.* 32, 328-335.
- Woodring** J., Diersch S., Lwalaba D., Hoffmann K. H. & Meyering-Vos M. (2009) Control of the release of digestive enzymes in the caeca of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *Physiol. Entomol.* 34, 144–151.
- Woods** H. A. (1999) Patterns and mechanisms of growth of fifth-Instar *Manduca sexta* caterpillars following exposure to low-or high-protein food during early instars. *Physiol. Biochem. Zool.* 72, 445-454.
- Woods** H. A. & Harrison J. F. (2002) Interpreting rejections of the beneficial acclimation hypothesis: when is physiological plasticity adaptive? *Evolution* 56, 1863–1866.
- Woods** H. A., W. Makino J. B., Cotner S. E., Hobbie J. F., Harrison K., Acharya & J. J. Esler, (2003) Temperature and the chemical composition of poikilothermic organisms. *Funct. Ecol.* 17, 237-245.

- Wu C.** (1995) Heat Shock Transcription Factors: Structure and Regulation. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 441-469.
- Yan Y., Peng L., Liu W. X. & Wan F. H.** (2009) Research progress in insect alkaline phosphatases. *Acta Entomol. Sin.* 1, 95-105.
- Yan Y., Peng L., Liu W. X. Wan F. H. & Harris M. K.** (2011) Host plant effects on alkaline phosphatase activity in the whiteflies, *Bemisia tabaci* Biotype B and *Trialeurodes vaporariorum*. *J. Insect Sci.* 11, 1-13.
- Yang Y. & Joern A.** (1994a) Influence of diet quality, developmental stage, and temperature on food residence time in the grasshopper *Melanoplus differentialis*. *Physiol. Zoolog.* 67, 598-616.
- Yang Y. & Joern A.** (1994b) Compensatory feeding in response to variable food quality by *Melanoplus differentialis*. *Physiol. Entomol.* 19, 75-82.
- Yang Y. & Joern A.** (1994c) Gut size changes in relation to variable food quality and body size in grasshoppers. *Funct. Ecol.* 8, 36-45.
- Yi S. X. & Adams T. S.** (2001) Age and diapause-related acid and alkaline phosphatase activities in the Intestine and malpighian tubules of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata* (Say). *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 46, 152-163.
- Yocum G. D., Joplin K. H. & Denlinger D. L.** (1991) Expression of heat shock proteins in response to high and low temperature extremes in diapausing pharate larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Arch. Insect Bioch. Physiol.* 18, 239-249.
- Yocum G. D. & Denlinger D. L.** (1992) Prolonged thermotolerance in the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*, does not require continuous expression or persistence of the 72 kDa heat-shock protein. *J. Insect Physiol.* 38, 603-609.
- Yocum G.D., Coudron T. A. & Brandt S. L.** (2006) Differential gene expression in *Perillus bioculatus* nymphs fed a suboptimal artificial diet. *J. Insect Physiol.* 52, 586-592.

- Zahia** K. M., Sondas A. M. & Rashad E. M. (2009) Embryonic and post-emergence changes of acid and alkaline phosphatases in the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis* (Boisd.) Egypt. Acad. J. Biolog. Sci. 2, 133-141.
- Zamudio** K. R. Huey, R. B. and Crill, W. D. (1995) Bigger isn't always better: body size, temperature and male territorial success in *Drosophila melanogaster*. Anim. Behav. 49, 671–677.
- Zanotto** F. P., Simpson S. J. & Raubenheimer D. (1993) The regulation of growth by locusts through postingestive compensation for variation in the levels of dietary-protein and carbohydrate. Physiol. Entomol. 18, 425–434.
- Zannoto** F. P., Gouveia S. M., Simpson S. J., Raubenheimer D. & Calder P. C. (1997) Nutritional homeostasis in locusts: is there a mechanism for increased energy expenditure during carbohydrate overfeeding? J. Exp. Biol. 200, 2437-2448.
- Zatsepina** O. G., Ulmasov K. A., Beresten S. F., Molodtsov V. B., Rybtsov S. A. (2000) Thermotolerant desert lizards characteristically differ in terms of heat-shock system regulation. J. Exp. Biol. 203, 1017–1025.
- Zatsepina** O. G., Velikodvorskaia V. V., Molodtsov V. B., Garbuz D., Lerman D. N., Bettencourt B. R., Feder M. E. & Evgenev M. B. (2001) A *Drosophila melanogaster* strain from sub-equatorial Africa has exceptional thermotolerance but decreased Hsp70 expression. J. Exp. Biol. 204, 1869–1881.
- Zehnder** C. B. & Hunter M. D. (2009) More is not necessarily better: the impact of limiting and excessive nutrients on herbivore population growth rates. Ecol. Entomol. 34, 535-543.
- Zhang** C. X., Xu J. L. & Wu X. F. (1991) Effect of dietary protein level on growth, development and reproduction of the silkworm, *Bombix mori*. Acta Serol. Sin. 17, 217-222.
- Zhang** S., Cheng H., Gao Y., Wang G., Liang G. & Wu K. (2009) Mutation of an aminopeptidase N gene is associated with *Helicoverpa armigera* resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. Insect Biochem. Mol. Biol. 39, 421-429.
- Zhao** L. & Jones W. A. (2012) Expression of heat shock protein genes in insect stress responses. ISJ 9, 93-101.

- Zhivotovsky** L., Feldman M. W. & Bergman A. (1996) On the evolution of phenotypic plasticity in a spatially heterogeneous environment. *Evolution* 50, 547-558.
- Zhivotovsky** L., Feldman M. W. & Bergman A. (1997) Fitness patterns and phenotypic plasticity in a spatially heterogeneous environment. *Gen. Res.* 68, 241-249.
- Zhou** J., Wang L., Xin Y., Wang W. N., He W. Y., Wang A. L. & Liu Y. (2010) Effect of temperature on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. *J. Therm. Biol.* 35, 284-289.
- Zhu-Salzman** K., Koiwa H., Salzman R. A., Shade R. E., Ahn J. E. (2003) Cowpea bruchid *Callosobruchus maculatus* uses a three-component strategy to overcome a plant defensive cysteine protease inhibitor. *Insect Mol. Biol.* 12, 135-145.
- Zinke** I., Kirchner C., Chao L. C., Tetzlaff M. T. & Pankratz M. J. (1999) Suppression of food intake and growth by amino acids in *Drosophila*: the role of pumpless, a fat body expressed gene with homology to vertebrate glycine cleavage system. *Develop.* 126, 5275-5284.
- Zinke** I., Schuetz C. S., Katzenberger J. D., Bauer M. & Pankratz M. J. (2002) Nutrient control of gene expression in *Drosophila*: microarray analysis of starvation and sugar-dependent response. *EMBO J.* 21, 6162-6173.
- Zudarie** E., Simpson S. J., Illa I. & Montuenga L. M. (2004) Dietary influences over proliferating cell nuclear antigen expression in the locust midgut. *J. Exp. Biol.* 207, 2255-2265.
- Zvereva** E. L. & Kozlov M. V. (2006) Consequences of simultaneous elevation of carbon dioxide and temperature for plant-herbivore interactions: a metaanalysis. *Global Change Biol.* 12, 27-41.

BIOGRAFIJA

Milena Janković-Tomanić je rođena 3.7.1969. godine u Valjevu. Školske 1988/1989 upisala je Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Beogradu, na studijskoj grupi Opšta Biologija. Diplomirala je 1995. godine sa prosečnom ocenom 9,01. Kao stipendista Republičkog zavoda za tržište rada stručno se osposobljavala za rad u oblasti eksperimentalne neurofiziologije u Odeljenju za neurobiologiju i imunologiju Instituta za biološka istraživanja "Siniša Stanković" u periodu od 1995-1997. godine. Poslediplomske studije upisala je na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, na smeru Neurofiziologija, školske 1995/1996 godine. Magistarski rad pod nazivom „Uticaj stimulacije donjeg maslinastog jedra na aktivnost ćelija kore malog mozga pacova“ odbranila je 18.07.2000. godine.

Od 1998-2000. godine je učestvovala u realizaciji projekta „Uloga hormona i metabolizma u procesima razvića i stresa kod fitofagnih insekata“, a u periodu 2002-2005. godine u realizaciji projekta „Plastičnost rasta i fiziološka plastičnost u odgovoru na stres kod šumskih fitofagnih insekata“. Od 2006-2010. godine učestvovala je na projektu „Fiziološki i evolucionni aspekti stresnog odgovora u prirodnim i laboratorijskim populacijama“. Trenutno radi na projektu „Uticaj magnetnih polja i drugih sredinskih stresora na fiziološke odgovore i ponašanje različitih vrsta“. Autor je i koautor više publikacija. Rezultati predstavljeni u doktorskoj disertaciji publikovani su u radu:

Milena Janković-Tomanić & Jelica Lazarević (2012) Effects of temperature and dietary nitrogen on genetic variation and covariation in gypsy moth larval performance. *Arch. Biol. Sci.*, Belgrade, 64 (3), 1109-1116.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Милена Ж. Јанковић- Томанић

број уписа _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом:

„Утицај температуре и квалитета хране на варијабилност компоненти адаптивне вредности и физиологију варења ларви губара *Lymantria dispar* (L.)“

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

Потпис докторанда

У Београду, 19.11.2012.

М. Јанковић-Томанић

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милена Ж. Јанковић-Томанић

Број уписа _____

Студијски програм _____

Наслов рада: „Утицај температуре и квалитета хране на варијабилност компоненти
адаптивне вредности и физиологију варења ларви губара *Lymantria dispar* (L.)“

Ментор

др Јелица Лазаревић, научни саветник, Институт за биолошка истраживања „Синиша
Станковић“, Универзитет у Београду

др Биљана Стојковић, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

Потписани

Милена Јанковић-Томанић

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

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

„Утицај температуре и квалитета хране на варијабилност компоненти адаптивне вредности и физиологију варења ларви губара *Lymantria dispar* (L.)“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

У Београду, 19.11.2012.

Потпис докторанда



Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 19.11.2012.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "M. Janković", written over a horizontal line.

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