

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Marija M. Tanasković

**SINERGISTIČKI EFEKAT GENOMSKOG I
SREDINSKOG STRESA U DVE POPULACIJE**
Drosophila subobscura

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Marija M. Tanasković

**THE SYNERGISTIC EFFECT OF GENOMIC AND
ENVIRONMENTAL STRESS IN TWO
POPULATIONS OF *Drosophila subobscura***

doctoral dissertation

Belgrade, 2016.

MENTORI:

dr Marina Stamenković-Radak, redovni profesor
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Zorana Kurbalija Novičić, viši naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
(Marie Curie Fellow, Univerzitet u Upsali, Švedska)

ČLANOVI KOMISIJE:

akademik Marko Anđelković, redovni profesor u penziji
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

dr Bojan Kenig, naučni saradnik
Univerzitet u Beogradu, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

dr Marija Savić Veselinović, docent
Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet

datum odbrane:

Eksperimentalna istraživanja čiji su rezultati predstavljeni u okviru ove doktorske disertacije urađena su na Odeljenju za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu i Department of bioscience Genetic, Ecology and Evolution, Aarhus University, Danska.

Rad je realizovan u okviru projekata osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije 173012.

Imala sam čast i zadovoljstvo da disertaciju radim u laboratoriji Odeljenja za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju kao deo tima koji su oformili i vodili akademik Marko Anđelković, profesorka dr Marina Stamenković-Radak i dr Tatjana Savić. Njihovo znanje i iskustvo mi je bilo od velike pomoći prilikom izrade disertacije.

Veliku zahvalnost iskazujem svojim mentorkama profesorki dr Marini Stamenković-Radak i dr Zorani Kurbalija Novičić. Profesorki Stamenković-Radak dugujem neizmernu zahvalnost za sve pružene prilike za naučno usavršavanje i razjašnjenje svih nedoumica koje sam imala tokom izrade ove doktorske disertacije. Dr Kurbalija Novičić dugujem neizmernu zahvalnost zbog oblikovanja puta kojim se odvijao moj naučni rad, za svu pomoć, savete i diskusije koji su izradu ove teze učinili mnogo lakšom.

Posebnu zahvalnost dugujem i akademiku Marku Anđelkoviću na idejama i podršci. Hvala mu za razumevanje, usmeravanje i razjašnjenje teorijskih i praktičnih neodoumica.

Imala sam čast i zadovoljstvo da ovu disertaciju uradim kao deo tima koji čine izuzetne, vredne i talentovane kolege: dr Zorana Kurbalija Novičić, dr Bojan Kenig, dr Marija Savić Veselinović, dr Mihailo Jelić, dr Aleksandra Patenković i Sonja Lečić. Svako od njih mi je posebno značio u nekom trenutku izrade ove disertacije. Bojanu hvala što me je uveo u svet proučavanja adaptivne vrednosti i zagađenja teškim metalima, Mariji hvala za sve vikende koje je samnom provela u laboratoriji i uvodu u svet epigenetičkih istraživanja, Mihailu hvala što mi je otvorio vrata u svet

izučavanja genetičke varijabilnosti i mitonukleusnih interakcija, Aleksandri hvala za približavanje koncepata geometrijske morfometrije. A najviše od svega im se zahvaljujem na prijateljstvu, razumevanju i podršci i na svim diskusijama koje su pomogle u oblikovanju mog naučnog razmišljanja. Veliku zahvalnost dugujem i kolegini Ivani Bukvić Cvetković za svu tehničku pomoć.

Ova teza ne bi bila ovako dobra bez pomoći prof Volkera Loeschkea i prof Jaspera Sorensena od kojih sam imala čast i zadovoljstvo da učim o ekspresiji Hsp proteina i pomoći dr Jasmine Ludoški koja mi je rasvetlila sve nedoumice oko metoda geometrijske morfometrije. Zahvaljujem im se na sugestijama, znanju i savetima.

Zahvalnost dugujem kolegama - prijateljima: doc dr Katarini Zeljić, Ljupki Filipović, dr Milanu Plećašu, dr Maji Raković, Marku Raković, dr Nataši Popović i Nemanji Popović za mnogobrojne diskusije i „čašice razgovora“ i što su uvek bili tu za mene tokom izrade ove disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem mami, tati i sestri; roditeljima sto su mi usadili odgovornost prema svemu što radim, a Mirki zato što me je naučila da precizno i metodično iznosim svoje stavove. Hvala im i za veliku ljubav i nesebičnu podršku bez kojih sada ne bih bila to što jesam. Hvala i porodicama Tanasković i Žanko, što su me prihvatili kao svoju i pružali iskrenu podršku i pomoć.

Najveću zahvalnost dugujem suprugu Aljoši za sve male i velike stvari bez kojih moje ostvarenje kao istraživača ne bi bilo moguće, za bezrezervnu podršku, razumevanje, ljubav i prave reči u pravom trenutku.

Ovaj rad posvećujem svojoj F1 generaciji, sa nadom u heterozis..

Sinergistički efekat genomskog i sredinskog stresa u dve populacije *Drosophila subobscura*

Sažetak

Predmet disertacije je populaciono genetička analiza sinergističkog efekta genomskog i sredinskog stresa na model vrsti *Drosophila subobscura*.

Jedinke uzorkovane iz dva ekološki različita staništa, i hibridi nastali njihovim ukrštanjem (unutar-linijski, unutar-populacioni i među-populacioni) izlagane su povećanoj koncentraciji olova, čime je omogućeno da se utvrdi razlika u odgovoru jedinki različitog nivoa heterozigotnosti genoma na sredinski stres odnosno, testira hipoteza o heterozigotnoj superiornosti u stresnim uslovima i utvrdi populaciono specifičan odgovor na prisustvo olova. Sinergistički efekat stresa evaluiran je na tri nivoa: populacionom - analizom komponenti adaptivne vrednosti (dužina razvića i preživljavanje od jaja do adulta), morfološkom - analizom varijabilnosti veličine krila i biohemijskom - praćenjem ekspresije proteina toplotnog šoka.

Rezultati su pokazali redukciju svih ispitivanih osobina kod inbredovanih jedinki i njihovo povećanje kod jedinki sa višim nivoom heterozigotnosti genoma, potvrđujući hipotezu heterozigotne superiornost koja se intenzivira u stresnim uslovima. Uočen je trend sinergističkog efekta genomskog i sredinskog stresa za komponente adaptivne vrednosti, koji je statistički značajan za veličinu krila, s obzirom da je najintenzivnija redukcija primećena kod inbredovanih jedinki u stresnim uslovima. Nije dobijen populaciono specifičan odgovor u prisustvu olova, ali je utvrđeno da na ishod međupopulacione hibridizacije u stresnim uslovima veliki uticaj ima poreklo ženke i evolucionarna istorija njene prirodne populacije.

Može se zaključiti da je održavanje genetičke varijabilnosti od velike važnosti za opstanak populacija, i da čak i nizak stepen inbridinga utiče na pad adaptivne vrednosti, naročito u stresnim uslovima sredine.

Ključne reči: *Drosophila subobscura*; sredinski stres; genomski stres; sinergistički efekat; zagađenje olovom; komponente adaptivne vrednosti; veličina krila; ekspresija Hsp proteina

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK broj: [575.113.2 +[504.5:546.815]]:575.17

The synergistic effect of genomic and environmental stress in two populations of *Drosophila subobscura*

Abstract

The subject of this dissertation is population genetic analysis of synergistic effect of genomic and environmental stress in model species *Drosophila subobscura*.

Individuals sampled from two ecologically distinct habitats, and their hybrids with different levels of genome heterozygosity (intra-line, intra-population and inter-population hybrids) were exposed to elevated concentrations of lead, aiming to test hypothesis of heterozygote superiority in stressful conditions and detect population specific response to lead pollution. Synergistic effect of stress was evaluated at three levels: population - through analysis of fitness components (development time and egg-to-adult survival), morphological - through analysis of variability in the wings size and biochemical - through the expression of heat shock protein.

The results showed a reduction of all investigated traits in inbred individuals and their increase in those with higher levels of genome heterozygosity, confirming the hypothesis of heterozygote superiority which intensifies under stressful conditions. Analysis of fitness components indicates synergistic effect of genomic and environmental stress, and variance in wing size shows statistical significance, since the greatest reduction of all traits was observed in inbred groups. Population specific response to lead pollution was not detected, but significant influence of female origin on the outcome of between-population hybridization under stressful conditions was observed.

It can be concluded that the maintenance of genetic variation is important for the survival of populations in changing environments, and even low levels of inbreeding lead to decline in adaptive value, especially in stressful environments.

Key words: *Drosophila subobscura*; environmental stress; genomic stress, synergistic effect; lead pollution; fitness components; wing size; Hsp expression

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics

UDC number: [575.113.2 +[504.5:546.815]]:575.17

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Stres.....	4
1.2. Genomski stres.....	6
1.2.1. <i>Inbriding</i>	7
1.2.2. <i>Autbriding</i>	11
1.3. Sredinski stres	15
1.3.1. <i>Teški metali kao oblik sredinskog stresa</i>	19
1.3.2. <i>Olovo</i>	21
1.4. Sinergistički efekat genomskog i sredinskog stresa	28
2. CILJEVI RADA	34
3. MATERIJAL I METODE.....	36
3.1. Vrsta, opis lokaliteta, uzorkovanje populacija i uspostavljanje linija.....	37
3.2. Koncentracije teških metala u zemljištima	39
3.3. Dizajn eksperimenta.....	41
3.4. Komponente adaptivne vrednosti	43
3.5. Veličina krila	45
3.6. Ekspresija proteina toplotnog šoka (Hsp proteina).....	47
4. REZULTATI	50
4.1. Analiza koncentracije teških metala u zemljištu	51
4.2. Analiza komponenti adaptivne vrednosti	52
4.2.1. <i>Preživljavanje od jaja do adulta</i>	52
4.2.2. <i>Dužina razvića</i>	54
4.3. Veličina krila	58
4.4. Ekspresija Hsp proteina.....	63
4.4.1. <i>Ekspresija ukupnih Hsp proteina</i>	63
4.4.2. <i>Uporedna ekspresija ukupnih i inducibilnih Hsp proteina</i>	65
5. DISKUSIJA	67
5.1. Komponente adaptivne vrednosti	70
5.2. Varijabilnost u veličini krila	82
5.3. Ekspresija Hsp proteina.....	90
6. ZAKLJUČCI.....	93

7. LITERATURA.....	96
--------------------	----

1. UVOD

What is needed, at the present stage of our understanding of evolution, is not so much a greater elaboration of formal theories of quantitative and population genetics, or even more analyses of wild populations in terms of genetics divorced from their ecology. What we need is more knowledge about the ways in which populations, in fact, meet evolutionary challenges.

(Waddington, 1965)

U svetu u kome se životna sredina neprestano menja, a različiti selektivni pritisci sa vremenom postaju sve intenzivniji, prirodne populacije brojnih biljnih i životinjskih vrsta se susreću sa konstantnim izazovima kojima moraju da se prilagode da bi opstale. Raznovrsnost živih sistema je ugrožena na svim nivoima, od populacionog do biosfere (Sala i sar., 2000; Cardinale i sar., 2012).

Istraživanja pokazuju da delimično nepredvidljiv ali konstantno prisutan, antropogeni uticaj ostavlja efekat na sve aspekte kvaliteta životne sredine i procenjuje se da će taj efekat biti još izraženiji tokom XXI veka (Smith i sar., 2009). Efekat je uglavnom negativan sa stanovišta opstanka prirodnih populacija koje ne pripadaju ljudskoj vrsti, ali i sa stanovišta ljudske vrste, i ogleda se u uticaju na globalno zagrevanje, povećanoj emisiji zagađivača u atmosferu, vodu i zemljište, uništavanju i fragmentaciji prirodnih staništa (Parmesan i sar., 1999, 2006; Daszak i sar., 2000; Midgley i sar., 2002).

Usled povećanog antropogenog uticaja na sve delove biosfere, ni jedan od selektivnih pritisaka se najčešće ne javlja sam, već deluju zajedno, u sinergiji. Klimatske promene i zagađenje često se javljaju zajedno sa smanjenjem brojnosti populacija ili uspostavljanjem novih migratornih koridora. Populacije su tako suočene sa različitim tipovima selektivnih pritisaka koji mogu postati izvori sredinskog i genomskog stresa.

Zagađenje, naročito hemijsko, predstavlja faktor koji u značajnoj meri doprinosi smanjenju biodiverziteta (Ives i Cardinale, 2004). Negativan efekat na prirodne populacije prilikom snažnih akutnih izlaganja zagađivačima može biti veliki i razoran. Hronično izlaganje populacija subletalnim nivoima zagađenja dovodi do promena koje često nisu odmah vidljive, ali ima velike dugoročne posledice. Literaturni podaci jasno pokazuju da zagađenje utiče na genetičku varijabilnost prirodnih populacija brojnih bioloških vrsta. Promene u diverzitetu mogu biti direktna posledica uticaja zagađivača na pad adaptivne vrednosti organizma, promene stope migracije, pravca i smera migracionih ruta usled migriranja sa kontaminiranih staništa, ili indirektna usled menjanja suptilnih ekoloških odnosa na staništu kao što su promene u pritisku predatora ili parazita

ili u kompetitivnim odnosima (Klerks i Levinton, 1993). Fragmentacija staništa najčešće ima negativan uticaj na prirodne populacije: može povećati rizik od slučajnih promena efektivne veličine populacija, menja njihovu prostornu distribuciju i čak može uticati na dinamiku čitave metapopulacije i na njenu genetičku strukturu (Debinski i Holt, 2000, Fahrig, 2003). Sa druge strane, fragmentacijom staništa se otvaraju novi migratorni koridori i omogućava kontakt između populacija koje pre toga nisu stupale u reproduktivne odnose (Debinski i Holt, 2000). Imajući u vidu da se ni jedan od ovih faktora najčešće ne javlja sam, postavlja se pitanje sposobnosti i granice do kojih prirodne populacije i vrste mogu da se adaptiraju na različite kombinacije selektivnih pritisaka, među kojima antropogeni uticaj zauzima značajno mesto (Bijlsma i Loeschcke, 2005; Ewers i Didham, 2006).

Činjenica je da se životna sredina neprestano menja i da su evolucionari mehanizmi oblikovali prirodne populacije da se maksimalno prilagode tim promenama, ali je i činjenica da u preseku vremena u kome živimo, antropogeni uticaj ne samo što ubrzava promene sredine već uvodi i nove sredinske selektivne pritiske što stavlja prirodne populacije u situaciju da im je neophodno razvijanje novih adaptacija i adaptivnih strategija da bi osigurale svoj opstanak. Adaptacije su evolutivno skupe, ali opravdano prisutne. Pitanje koje svi postavljamo je koliko brzo mogu nastati da bi adekvatno ispratili konstantni rast pritisaka sredine.

Jedan od osnovnih zadataka populacione i konzervacione biologije je procena odgovora prirodnih populacija na izazove uslovljene antropogenim faktorima, kao i razvoj strategija za što bolju procenu i ublažavanje štetnih efekata izazvanih antropogenim uticajem.

1.1. Stres

Stres je pojam koji se koristi za opisivanje bilo kog stanja koje je nepovoljno za organizam. Promenjeno stanje entiteta se naziva „stresirano“ ili „pod stresom“, dok se faktori koji su odgovorni za takvo stanje nazivaju „sredinski stres“, „stresori“ ili „stresni uslovi“ (Hoffmann i Parsons, 1993). Stres je teško definisati jer definicije zavise od discipline koja ga proučava, tipa stresa i nivoa biološke organizacije na kom se efekat stresa ispoljava. Ono oko čega se sve definicije stresa slažu je da stres nije samo svojstvo stresora (tj. faktora koji izaziva stres) već i stresiranog (tj. biološkog entiteta koji trpi stres). Za očekivati je da će biološki entiteti trpeti najslabiji stres u stabilnim sredinama koje su već iskusili, a da će efekat stresa biti najveći u novim, promenljivim sredinama. Dakle, stres i nivo stresa koji je prisutan može se definisati isključivo u odnosu na biološki entitet koji se nalazi pod uticajem konkretnog stresnog faktora. Takođe, promene u nivou stresa koji biološki entitet doživljava mogu biti posledica promena kako u stresoru tako i u stresiranom.

S obzirom na širok opseg variranja definicije stresa, u ovom radu je stres posmatran kroz evolucionu kontekst, pa je kao stresor uzeta promena spoljašnje sredine i njen uticaj na različite entitete genetičke raznovrsnosti (bliže, nivoa heterozigotnosti), a kao stresirani subjekti prirodne populacije jedne vrste. Sa evolucionog stanovišta, stres je potrebno razmatrati kako u odnosu na stresora tako i u odnosu na stresiranog pa bi se mogao definisati na jedan od sledećih načina: (i) stres predstavljaju uslovi sredine koji kada se prvi put pojave izazivaju pad adaptivne vrednosti (Sibly i Calow, 1989); (ii) promena sredine koja izaziva pad adaptivne vrednosti organizama (Koehn i Bayne 1989); (iii) sredinski faktor koji izaziva potencijalno štetnu promenu u biološkom sistemu (Hoffmann i Parsons, 1991). Sve navedene definicije ističu da je glavni efekat stresa pad adaptivne vrednosti populacija usled delovanja spoljašnjih faktora. Ali ako definicija stresa podrazumeva svaki pad adaptivne vrednosti, kako veliki tako i mali, može se zaključiti da su onda prirodne populacije u stalnom stanju stresa s obzirom da sredina u kojoj žive nikad nije optimalna i konstantno se menja pa se maksimalna adaptivna vrednost nikada ne dostiže (Hoffmann i Parsons, 1991; Fry

i sar., 1996; Bijlsma i Loeschcke, 2005). Iz tog razloga većina autora smatra da bi pojam stresa trebalo koristiti onda kada intenzitet stresa dostigne nivo koji može ograničiti preživljavanje ili reproduktivnu sposobnost organizama, a posledično i ugroziti opstanak organizama i konačno i populacija. Međutim, intenzitet stresa često kontinualno varira i najčešće se može proceniti samo *a posteriori*, te je stoga teško proceniti granicu na kojoj intenzitet promene postaje stres a prestaje da bude prirodna varijabilnost uslova sredine koju populacija doživljava (Bijlsma i Loeschcke, 2005).

U prirodnim populacijama stres mogu izazvati kako promene spoljašne sredine (sredinski stres) tako i promene u genetičkoj homeostazi izazvane promenama u genetičkoj strukturi populacije (genomski stres). S obzirom na rastući antropogeni uticaj koji dovodi kako do sve bržih i značajnijih promena u spoljašnjoj sredini tako i do promena genetičkih struktura populacija usled hibridizacije ili inbridinga, realno je očekivati da će u budućnosti sve veći broj prirodnih populacija biti izložen sinergističkom delovanju sredinskog i genomskog stresa (Frankham, 2005).

1.2. Genomski stres

Smanjenje adaptivne vrednosti kao posledicu ukrštanja u srodstvu i povećanje adaptivne vrednosti nakon ukrštanja nesrodnih jedinki opisao je još Darwin (1876). Generacije biologa nakon njega su proučavale ukrštanje u srodstvu (inbriding) i ukrštanje nesrodnih jedinki (autbriding) da bi dosli do zaključka da ni jedno nije toliko dobro ni toliko loše i da su efekti različitih sistema ukrštanja ne samo specifični za vrstu nego mogu biti i populaciono specifični (Maynard Smith, 1956; Pederson, 1968; Dudash, 1990; Armbruster i sar., 2000; Kristensen i sar., 2003; Bijlsma i Loeschcke, 2005; Liao i Reed, 2009; Pickup i sar., 2013). Brojni proučavaoci ovih fenomena se slažu da promena genetičke homeostaze izazvana bilo kojim od ova dva faktora značajno menja odgovor organizama i/ili populacija na sredinu u kojoj žive i da u sadejstvu sa prirodnom selekcijom može dovesti populaciju na vrh adaptivnog pejzaža ili je spustiti u „dolinu“ i posledično dovesti do izumiranja (Bijlsma i sar., 2000; Frankham 2005; Cheptou i Donohue, 2011; Reed i sar., 2012)

Kao što je već rečeno, termin stres se najčešće primenjuje onda kada dolazi do pada adaptivne vrednosti organizama i populacija usled promene uslovi u njihovom prirodnom okruženju. Stres se najčešće posmatra kroz promenu faktora spoljašnje sredine bilo da je izazvan njenim fizičkim (temperatura, teški metali) ili biološkim (predatorstvo, parazitizam) karakteristikama. Međutim, stres može biti i unutrašnji, izazvan povećanom homozigotizacijom usled inbridinga ili promenom genetičke arhitekture usled inkorporiranja novih alelskih varijanti. Promene genetičke strukture organizama i/ili populacija koje menjaju njihov odgovor u sredinama u kojima prirodno žive može se nazvati genomskim stresom (Bijlsma i sar., 1997, 2000).

Izvor genomskog stresa mogu biti: inbriding, odnosno ukrštanje u srodstvu ili autbriding, ukrštanje nesrodnih jedinki.

1.2.1. Inbriding

Termin inbriding se koristi za opisivanje nekoliko povezanih fenomena koji se odnose na ukrštanje između srodnih jedinki i povećanje homozigotnosti koje nastaje kao posledica takvih ukrštanja (Anđelković i Stamenković-Radak, 2013). Ti fenomeni uključuju: "pedigre inbriding" u slučajevima kad jedinka ima dva alela na jednom lokusu koja su poreklom od istog pretka; inbriding kao neslučajno ukrštanje - onda kada su jedinke koje stupaju u reproduktivne odnose nalaze u većem stepenu srodstva nego što je to slučaj sa dve slučajno izabrane jedinke iz populacije; inbriding koji nastaje kao posledica podele populacije na manje, izolovane grupe kada do inbridinga dolazi zbog delovanja genetičkog drifta usled smanjenja brojnosti populacije. U slučajevima smanjenja brojnosti populacije, zbog delovanja drifta povećava se verovatnoća da će jedinke koje stupaju u reproduktivne odnose nositi alele istog porekla čak iako je ukrštanje po principu slučajnosti (Keller i Waller, 2002)

Bez obzira na fenomen na koji se odnosi, glavna posledica inbridinga je homozigotizacija. Iako inbriding ne menja alelske učestalosti i s toga ne predstavlja evolucionni faktor, on efektivno menja distribucije genotipova povećavajući učestalosti homozigota na račun smanjenja učestalost heterozigota. Usled homozigotizacije štetnih, naročito recesivnih alela, inbriding često dovodi do inbriding depresije, odnosno smanjenja prosečne adaptivne vrednosti organizama i populacija. Obe hipoteze koje predlažu genetičku osnovu inbriding depresije zasnivaju se na ovom povećanju homozigotnosti (Lynch i Walsh, 1998). Po hipotezi overdominanse, inbriding depresija nastaje zbog superiornosti heterozigota nad homozigotima, odnosno smanjenje učestalosti heterozigota smanjuje verovatnoću ispoljavanja overdominanse i samim tim i adaptivnu vrednost populacije. Po hipotezi dominanse do inbriding depresije dolazi zbog ispoljavanja štetnih alela u recesivnom homozigotnom stanju. Naime, štetne mutacije konstantno nastaju u populacijama i većina je ako ne potpuno, bar delimično, recesivna. Povećanje homozigotnosti povećava ispoljavanje genetičkog opterećenja i dovodi do inbriding depresije. Eksperimentalni dokazi potvrđuju oba mehanizma. Jasno razgraničenje između ove dve hipoteze se ispostavilo kao veoma teško iz razloga

što vezani setovi recesivnih alela koji imaju međusobno poništavajuće efekte mogu imitirati efekat overdominance, što je poznato kao "asocijativna dominansa" (Keller i Waller, 2002).

Iako naizgled veoma slične, navedene hipoteze imaju različite implikacije na održavanje i opstanak populacija. Po hipotezi overdominance, sve inbredovane jedinke će u jednom trenutku postati inferiorne u odnosu na jedinke koje su proizvod slučajnih ukrštanja. Po hipotezi dominance, moguće je, kroz pročišćavajuću selekciju (engl. *purging selection*), dobiti čiste linije koje imaju adaptivnu vrednost jednaku maksimalnoj adaptivnoj vrednosti genotipa u heterogenoj populaciji. Empirijski dokazi u većini slučajeva idu u prilog hipotezi dominance (Keller i Waller, 2002; Kristensen i sar., 2010) ali je pokazano da overdominansa može biti glavni mehanizam pod određenim uslovima (Charlesworth i Charlesworth, 1999; Li i sar., 2001; Charlesworth i Willis, 2009). Pored overdominance i dominance, na inbriding depresiju mogu uticati i epistatičke interakcije nealelnih gena (Lynch i Walsh, 1998; Luo i sar., 2009).

Osim što dovodi do pada adaptivne vrednosti populacija, inbriding ima uticaj i na morfološke osobine i metaboličke funkcije organizama (Pedersen i sar., 2008; Paige, 2010; Trotta i sar., 2011).

Osobine životne istorije pokazuju veći nivo varijabilnosti nastale usled dominance i po teoriji evolucije bi na njih inbriding depresija trebalo da ima veći efekat u poređenju sa morfološkim karakteristikama koje su pod slabijim selektivnim priskom. Veći broj literaturnih navoda pokazuje da je efekat inbridinga dvostruko veći kada se posmatraju osobine životne istorije u poređenju sa morfološkim karakteristikama (Coltman i Slate, 2003). To međutim ne znači da se efekat inbridinga ne prepoznaje na morfološkom nivou. Veličina i oblik svake morfološke karakteristike nekog organizma su osobine koje kontinualno variraju i zavise od velikog broja faktora koji se mogu uključiti na različitim stupnjevima razvika jedinke. Iako svaka morfološka karakteristika ima genetički i razvojni plan, na krajnji ishod može uticati veliki broj faktora. Poznato je da je konačna veličina i oblik krila kod *Drosophila* rezultat koordinacije velikog broja procesa: proliferacije,

apoptoze i alokacije ćelija i mitotske orijentacije (de Celis, 2003; Palsson i Gibson, 2004; Baena-López i sar., 2005; Dworkin i Gibson, 2006). Inbriding, i posleđično ispoljavanje većeg broja štetnih recesivnih alela, može promeniti vremenski tok i dinamiku ovih procesa i dovesti do promena u obliku i veličini krila. Pokazano je da inbriding dovodi do smanjenja veličine krila: inbredovane linije *Drosophila melanogaster* imaju manja krila u odnosu na jedinke iz slobodnog ukrštanja (Trotta i sar., 2011). Smanjenje veličine različitih morfoloških karakteristika je pokazano i na većem broju sisarskih vrsta, uključujući vuka (Fredrickson i Hedrick, 2002), iberijskog risa (Pertoldi i sar., 2006) i crnonogu feretku (Wisely i sar., 2008).

Novija istraživanja transkriptoma i metaboloma različitih organizama pokazuju da inbriding izaziva fiziološke promene, što je i očekivano obzirom na redukciju fitnesa do koje najčešće dovodi (Kristensen i sar., 2010). Ono što je neočekivano je da ispoljavanje genetičkog opterećenja indukuje direkcioni molekularni odgovor. Inbriding dovodi do promena u ekspresiji glavnih metaboličkih puteva i sistemu kvaliteta kontrole proteina koji reaguju u cilju smanjenja njegovih štetnih posledica. Veliki broj gena koji se uključuju u sistemu odgovora na inbriding, uključuje i gene koji su odgovorni za reagovanje organizama na stres izazvan sredinskim faktorima. Efektivno se menja ekspresija gena odgovornih za sintezu proteina toplotnog šoka (eng. Heat shock-Hsp) i gena uključenih u imuni odgovor, ukazujući na to da organizmi na fiziološkom nivou na inbriding reaguju kao da su izloženi sredinskom stresoru (Kristensen i sar., 2002; Pedersen i sar., 2005, 2008; Ayroles i sar., 2009).

Geni toplotnog šoka su prisutni u svim živim bićima od bakterija do sisara. Njihova nukleotidna sekvenca je visoko konzervirana i upravo ova mala varijabilnost i univerzalno prisustvo u živom svetu ukazuju na njihov veliki evolutivni značaj i važnu biološku ulogu. Produkti *hsp* gena su Hsp proteini, velika proteinska familija koja je deo sistema nazvanog Sistem kvaliteta proteina (eng. The Protein Quality System - PQC). Većina Hsp su molekularni šaperoni sa "house-keeping" funkcijom u ćeliji koja uključuje sprečavanje agregacije oštećenih proteina; transport, savijanje i odvijanje, sastavljanje i rastavljanje multistrukturnih jedinica kao i degradaciju pogrešno savijenih ili agregiranih

proteina (Hartl, 1996; Sørensen, 2003). Oni su konstantno prisutni u ćeliji ali je njihova povećana ekspresija gotovo univerzalan odgovor na različite tipove stresa, uključujući temperaturni stres, stres izazvan insekticidima, teškim metalima, desikacijom, parazitizmom i inbridingom (Steinert i Pickwell, 1993; Matz i sar., 1996; Wong i sar., 1996; Su i Gordon 1997; Kristensen i sar., 2002; Cheng i sar., 2006; Pedersen i sar., 2008).

Hsp proteini obuhvataju veliku familiju proteina čija je klasifikacija izvršena na osnovu molekularne mase u kDa. Glavne proteinske familije su označene kao HSP100, HSP90, HSP70, HSP 60, HSP40, mali HSP-sHSP (nazvani tako zbog molekularne težine manje od 30 kDa) i manji ko-faktori (Sørensen, i sar. 2003). Pokazano je da je kod najvećeg broja organizama Hsp70 familija najveća i sa najznačajnijom ulogom u održavanju ćelijske homeostaze. Hsp70 familija se sastoji od isključivo inducibilnih, konstitutivnih i inducibilnih i isključivo konstitutivnih proteina. Povećana ekspresija inducibilnih i konstitutivnih Hsp70 proteina je najčešći odgovor živih sistema na stresne uslove i predstavlja široko korišćen metod za analizu odgovora živih organizama na različite tipove stresa. Povećana ekspresija Hsp70 je proteina pokazana kod inbredovanih jedinki *D. melanogaster* i *D. buzzatii* u poređenju sa jedinkama iz populacije slobodne oplodnje (Kristensen i sar., 2002; Pedersen i sar., 2005). Inbridig povećava ekspresiju štetnih alela koji redukuju stabilnost proteina i povećavaju pojavu pogrešnih proteinskih konformacija što je ćeliji signal da poveća ekspresiju Hsp koji predstavljaju osnovni mehanizam odbrane ćelije u ovakvim uslovima (Sørensen, i sar. 2003; Paige, 2010). U skladu sa ovim su i rezultati dobijeni na transkriptomu *D. melanogaster* koji ukazuju da inbriding ostavlja direkcionu otisak na regulaciju gena eksprimirajući one gene koji su primarno uključeni u otpornost na stres, imunitet i osnovne metaboličke puteve (Kristensen i sar., 2005; Ayroles i sar., 2009). Analiza transkriptoma inbredovanih linija je pokazala da iako je genetički razlog inbriding depresije populaciono specifičan, moguće je tvrditi da inbriding indukuje mehanizme odgovorne za prevazilaženje stresa.

1.2.2. Autbridging

Autbridging je termin koji se koristi za opisivanje ukrštanja među jednkama koje su u manjem stepenu srodstva nego što bi se očekivalo pri slučajnom parenju (Anđelković i Stamenković-Radak, 2103) i/ili ukrštanja između jedinki poreklom iz udaljenih populacija koje nisu ranije stupale u reproduktivne kontakte. U ovom radu se autbridgingom smatra i ukrštanje nesrodnih jedinki u okviru iste populacije ali i ukrštanje jedinki poreklom iz dve različite populacije. U jednom i u drugom slučaju, osnovni efekat ovakvih ukrštanja je uspostavljanje heterozigotnosti kod potomaka (Shull, 1908; Crow, 2008; Szulkin i sar., 2010)

Ukrštanje između jedinki iste vrste poreklom iz udaljenih populacija predstavlja protok gena, evolucionim mehanizam koji smanjuje divergenciju između populacija i održava određenu vrstu kao evolutivnu jedinicu (Mayr, 1963). Čak i niska stopa protoka gena je dovoljna da spreči veliku lokalnu genetičku diferencijaciju između populacija (Wright 1931; Maruyama 1970; Slatkin 1991; Singh i Long, 1992). Fragmentacija staništa, novi migratorni koridori i sve veći antropogeni pritisak predstavljaju novi izvor kontakta do sada izolovanih populacija. Ovi kontakti mogu imati pozitivne posledice usled uvođenja novih alela sa pozitivnim efektom u genetički fond recipijentske populacije, ali i dovesti do pada adaptivne vrednosti usled genetičkog preplavlivanja, odnosno priliva velikog broja genotipova i alela koji nisu prilagođeni na uslove sredine u novom okruženju (Lenormand, 2002).

Introdukcija novih genetičkih varijanti u populaciju može dovesti do heterozisa koji predstavlja povećanje fitnesa potomaka u odnosu na roditelje. Štetni efekti recesivnih alela su u heterozigotnom stanju maskirani, a takođe dolazi i do ponovnog uspostavljanja overdominanse pa se pretpostavlja da su pozitivni efekti autbridginga posledica upravo ovih fenomena (Lynch, 1991; Lynch i Walsh, 1998; Whitlock i sar., 2000; Lippman i Zamir, 2007). Pozitivni efekti mogu nastati i usled novih povoljnih interakcija između lokusa i razdvajanja negativnih interakcija koje mogu biti fiksirane u malim izolovanim populacijama (Lynch, 1991; Erickson i Fenster, 2006; Edmands i sar., 2009). Jedna od hipoteza koje

objašnjavaju superiornost heterozigota je da, bar što se alozimskih lokusa tiče, heterozigoti imaju enzime sa različitim katalitičkim svojstvima i da su zbog toga njihovi biohemijski i fiziološki procesi efikasniji od istih kod homozigota (Mitton i Grant, 1984). Novija istraživanja pokazuju da heterozigotna superiornost proizilazi iz efikasnije upotrebe energije koju imaju heterozigoti. Naime, heterozigoti su su stanju da fino regulišu količinu energije neophodnu za energetske procese metabolizma proteina i da taj višak energije, koji im preostaje nakon održavanja bazalnog metabolizma, usmere u procese rasta i razvića (Goff, 2011; Baranwal i sar., 2012). Druga predložena hipoteza je Lernerova hipoteza genetičke homeostaze, po kojoj heterozigoti imaju povećanu sposobnost da ostanu u normama razvojne kanalisnosti usled većeg broja heterozigotnih lokusa u celokupnom genomu (Lerner, 1954).

S druge strane introdukcija novih alelskih varijanti u populaciju može dovesti i do pada adaptivne vrednosti potomaka u odnosu na roditelje, odnosno autbriding depresije ili negativnog heterozisa. Jedan od mehanizama autbriding depresije leži u narušavanju genetičke osnove lokalnih adaptacija (Templeton i sar., 1986; Lynch i Walsh, 1998), ali je pokazano da do nje dolazi i slučajevima ukrštanja jedinki iz populacija adaptiranih na iste sredinske uslove. Genetički drift i prirodna selekcija oblikuju genetičku strukturu populacija često vodeći ka evoluciji različitih multilokusnih genotipova čija kombinacija ima pozitivne efektne na fitnes, odnosno stvaranju takozvanih koadaptiranih genskih kompleksa (Templeton i sar., 1986; Lynch, 1991; Fenster i sar., 1997; Lynch i Walsh, 1998). Interpopulaciona hibridizacija može razdvojiti te koadaptirane genske komplekse i dovesti do autbriding depresije. Takođe, spajanje alela koji zasebno imaju neutralan ili čak pozitivan efekat na adaptivnu vrednost može dovesti do autbriding depresije jer te nove kombinacije mogu imati štetan efekat (Phillips i Johnson, 1998; Orr i Turelli, 2001; Edmands, 2007). Novija istraživanja pokazuju da ulogu u autbriding deperesiji može imati i razdvajanje mito-nukleusnih kompleksa. Iako se pod koadaptiranim genskim kompleksom najčešće smatraju Dobžanski-Mulerove nukleusne koadaptacije, koadaptirani genski kompleks može da se odnosi i na koadaptaciju nukleusnog i mitohondrijskog genoma koji se

materinski nasleđuje. Istraživanja na kopepodama *Tigriopus californicus* pokazuju da se pad fitnesa kod hibridnog potomstva može objasniti upravo ovim fenomenom (Elison i Burton, 2008). Iako je inbriding depresija mnogo više proučavan fenomen, autbriding depresija je sve više u fokusu naučnih istraživanja, naročito u konzervacionim strategijama i upravljanju ugroženim populacijama (prikazano u Edmands, 2007).

Uticao autbridinga na adaptivnu vrednost populacije zavisi od finog balansa između pozitivnih i negativnih efekata hibridizacije. Jedan od faktora koji ima najveći uticaj na ovaj balans je genetička divergencija između populacija (Lynch, 1991; Falconer i Mackay, 1996; Lynch i Walsh, 1998; Whitlock i sar., 2000). Pozitivni efekat heterozisa nastao zbog maskiranja štetnih recesivnih alela u heterozigotnom stanju bi trebalo da linearno raste sa povećanjem divergencije. S druge strane očekuje se da negativni efekti autbriding depresije usled epistatičkih interakcija budu manji u slučaju manje divergencije a da se povećavaju sa povećanjem genetičkih različitosti između populacija (Orr, 1995; Orr i Turelli, 2001). Pod pretpostavkom da je heterozis rezultat divergencije na jednom lokusu a da autbriding depresija uključuje divergenciju na dva ili više lokusa u međusobnoj interakciji, pozitivni efekti hibridizacije bi trebalo da budu dominantni u slučajevima niske ili srednje populacione divergencije a da rizik od autbriding depresije raste sa većom divergencijom. Ove pretpostavke su potvrđene u eksperimentima na biljkama (prikazano u Edmands, 2002). Drugi faktor koji ima veliki uticaj na ishod međupopulacione hibridizacije je količina genetičke varijabilnosti koja se introdukuje. Pokazano je da čak i niska stopa migracije dovoljna da poveća fitnes malih izolovanih populacija, ali da i ta niska stopa može dovesti do autbriding depresije u slučajevima ukrštanja jedinki iz genetički nekompatibilnih populacija (Mills i Allendorf, 1996; Edmands i Timmerman, 2003; Hedrick i Fredrickson, 2010).

Takođe, hibridizacija ima i vremensku dimenziju jer njeni efekti nisu isti u svim generacijama nakon stupanja u inicijalni reproduktivni kontakt. Najveći pozitivni efekat heterozisa se najčešće ispoljava u prvoj potomačkoj generaciji da bi se smanjio u sledećim generacijama. Najverovatniji razlog ovakvog sleda

dogadaja je rekombinacija koja dalje razdvaja parentalne genske kombinacije pa dolazi do ispoljavanja štetnih epistatičkih interakcija u koje su uključeni recesivni aleli (Lynch, 1991; Lynch and Walsh, 1998). Međutim, veći broj studija je pokazao da heterotični efekti mogu trajati i veći broj narednih generacija. Dugoročni pozitivni efekti hibridizacije mogu se delimično pripisati i selekciji koja kako efikasno eliminiše štetne alele i/ili alelske kombinacije tako i favorizuje povoljne alelske kombinacije (Templeton, 1986; Crnokrak i Barrett, 2002; Edmands i sar., 2005; Erickson i Fenster, 2006; Hwang i sar., 2011). Dugotrajan pozitivan efekat hibridizacije zahteva fiksaciju povoljnih genotipskih kombinacija a verovatnoća da one nastanu zavisi od velikog broja faktora, uključujući tip genetičke varijabilnosti koja se nalazi u osnovi osobine adaptivne vrednosti i demografsku strukturu populacije (Edmands, 2007). Neke studije pokazuju da je za ovakav scenario potrebno i nekoliko stotina generacija (Buerkle i Rieseberg, 2008), ali se pretpostavlja da fluktuacija efektivne veličine populacije ometa efikasnost selekcije na hibridne genotipove. Iako je autbriding depresija često prisutna i u prvoj generaciji, njeni efekti su mnogo veći u drugoj i narednim potomačkim generacijama (prikazano u Tallmon i sar., 2004; Edmands, 2007). S druge strane, autbriding depresija može biti relativno kratkotrajan fenomen jer je moguće da prirodna selekcija za mali broj generacija ukloni neadaptirane genotipove iz populacije vraćajući prosečnu adaptivnu vrednost na stanje pre hibridizacije (Edmands i sar., 2005; Erickson i Fenster, 2006; Hwang i sar., 2011).

Jedan od prvih opisanih efekata autbridinga je povećanje veličine tela potomstva nastalog iz ukrštanja nesrodnih jedinki (Lippman i Zamir, 2006). Kao što je već pomenuto, kod heterozigotnih jedinki primećuje se povećanje veličine različitih morfoloških karakteristika u poređenju sa roditeljima.

Sve veći broj studija pokazuje da je ekspresija proteina toplotnog šoka povezana i sa genomskim stresom nastalim usled inbridinga, autbridinga, starenja ili akumuliranja štetnih mutacija. Pedersen i sar. (2005) su pokazali da autbredovane jedinke *Drosophila melanogaster* imaju značajno nižu ekspresiju Hsp70 od inbredovanih. S druge strane, Di i sar. (2013) su pokazali povećanje ekspresije Hsp70 kod hibridnih jedinki *Heliothis diversicolor* u poređenju sa

roditeljskim, ukazujući da na Hsp odgovor na stres utiče ne samo genomski stres nego i količina genetičke varijabilnosti introdukovana u recipijentsku populaciju.

1.3. Sredinski stres

Svi organizmi trpe snažan uticaj životne sredine koji ima veliku ulogu u oblikovanju ekologije i evolucije prirodnih populacija. Povoljni sredinski faktori održavaju populaciju na vrhu adaptivnog pejzaža, a nepovoljni uzrokuju redukciju adaptivne vrednosti (Lynch i Lande, 1993; Stanton i sar., 2000; Parmesan, 2006; Chevin i sar., 2010).

Nepovoljni sredinski uslovi se mogu definisati kao stresni onda kada dovode do značajnog pada relativne adaptivne vrednosti populacije i stvaraju direkcioni selektivni pritisak koji utiče na dalju evoluciju populacije (Hoffmann i Hercus, 2000). Pod sredinskim stresom se uglavnom podrazumeva odgovor na promenu fizičkih (abiotičkih) karakteristika okoline kojoj je organizam izložen (Sørensen i sar., 2005), međutim sve je veći broj literaturnih podataka koji ukazuju na važnost i biotičkih faktora koji uzrokuju sredinski stres (Relyea, 2005; Schoepner i Relyea, 2008). Abiotički faktori koji imaju najveći uticaj na fitnes organizama i populacija su: klimatski faktori i prisustvo hemijskih zagađivača, zračenja i drugo. Oni mogu biti posledica prirodnih promena u ekosistemu, ali i biti uslovljeni antropogenim aktivnostima. Biotički faktori koji mogu biti izvor stresa su: predatorstvo, parazitizam, intraspecijska i interspecijska kompeticija, uvođenje novih ili promena postojećih patogena. Biotički i abiotički stresori mogu delovati nezavisno jedan od drugog, ali i u sinergiji što je u uslovima u kojima obitavaju prirodne populacije i najčešći slučaj. U prirodi je česta pojava da su populacije koje imaju pad u prosečnoj adaptivnoj vrednosti usled izloženosti stresnim fizičkim faktorima ranjivije u prisustvu predatora ili parazita (Bijlsma i Loeschcke, 2005; Stillwell, 2007).

Postoje različiti mehanizmi kojima biološki entiteti reaguju na sredinski stres. Odgovor na stres može biti na različitim nivoima biološke organizacije: molekularnom, fiziološkom, morfološkom, populacionom, biocenološkom (Hofmann i Todgham, 2010). Organizmi mogu modulirati ekspresiju određenih

gena (između ostalih i proteina toplotnog šoka i metalotioneina) u cilju brze zaštite osnovnih ćelijskih i metaboličkih funkcija (Kregel, 2002; Rhee i sar., 2009; Ahn i sar., 2012; Kim i sar., 2014). Takođe, mogu usporiti određene fiziološke procese i alocirati resurse što može dovesti i do morfoloških promena. Jedinke mogu izmeniti svoj ponašajni fenotip tako što će izmeniti svoj cirkadijalni i/ili reproduktivni ritam ili migrirati u staništa sa povoljnijim uslovima (Gorka i sar., 1996; Schreck i sar., 2001; Chen i sar., 2011). Stres deluje i kao evolucionni faktor pa može izmeniti genetičku strukturu populacije, stvarajući uslove za favorizovanje genotipova koji imaju veću adaptivnu vrednost u datim uslovima (Lexer i Fay, 2005). Usled delovanja stresa mogu se promeniti kompleksni odnosi predatorstva, parazitizma i mutualizma u biocenozama pa se posledično i sastav biocenoza menja (Bertness i sar., 1999; Menge i Olson, 1990;). U svetlu iznetog jasno je da stres najčešće ne deluje samo na jedan od nivoa biološke organizacije i da su njegove posledice kompleksne i sveobuhvatne.

Organizmi i populacije na sredinski stres odgovaraju putem tri osnovna mehanizma koji podrazumevaju izbegavanje stresnih uslova disperzijom u staništa sa povoljnijim uslovima, prilagođavanje genetičkom adaptacijom ili kroz fenotipsku plastičnost (Davis i sar., 2005).

Izbegavanje stresnih uslova migracijama je, bar prema fosilnim zapisima, najčešći vid odgovora na promenjene uslove sredine. Populacije i jedinke se fizički pomeraju sa mesta koje postaje nepovoljno u staništa sa povoljnim sredinskim uslovima. U tim novim staništima mogu stupiti u reproduktivni kontakt sa drugim populacijama iste vrste. Ishod ovakvog kontakta prvenstveno zavisi od genetičke diferenciranosti između datih populacija koja je proistekla iz razlika u evolucionim istorijama i genetičkoj varijabilnosti. Brojni radovi su pokazali povećanje (prikazano u Tallmon i sar., 2004) ali i smanjenje (prikazano u Edmands, 2007; Kurbalija i sar., 2010) prosečne adaptivne vrednosti populacija nakon ovakvih kontakata.

Prirodna selekcija je jedan od dominantnih evolucionih mehanizama koji direktno omogućava organizmima i populacijama da se prilagode na sve uslove

sredine u kojoj žive, uključujući i stres. Adaptacija je evolucioni proces koji kroz promene genetičke strukture omogućava prirodnim populacijama da se prilagode sredinskim faktorima. Adaptaciju treba razlikovati od aklimatizacije koja predstavlja kompleks biohemijskih i fizioloških mehanizama kojima jedinka smanjuje uticaj sredinskih faktora. Genetička adaptacija na stresne uslove koja se odvija u relativno kratkom vremenskom periodu (nekoliko decenija do stotinu godina) predstavlja značajan mehanizam reakcije populacija na sredinski stres i dokumentovana je i u uslovima abiotičkog i biotičkog stresa (Stockwell i sar. 2003, Kinnison i sar. 2007). Lokalna adaptacija predstavlja stanje u kome populacija u heterogenoj sredini razvija genetičke adaptacije koje joj obezbeđuju povećanje adaptivne vrednosti u lokalnim uslovima sredine. Na adaptaciju utiče nekoliko faktora: protok gena, genetička varijabilnost i genetička arhitektura osobina koje su povezane sa fitnessom (Kawecki i Ebert, 2004). U slučaju hronične izloženosti subletalnim nivoima sredinskog stresa, selekcija favorizuje genotipove koje imaju veću adaptivnu vrednost čime se akumuliraju alelske varijante i/ili veliki genski kompleksi koji u datim uslovima povećavaju fitness populacije (Hoffmann i Hercus, 2000). Iako selekcija omogućava opstanak populacije u stresnim uslovima, postoji i cena adaptacije koja je u velikom broju slučajeva mnogo zahtevnija u pogledu potreba za energijom i resursima. Cena povećane adaptivne vrednosti kod otpornih jedinki je povezana sa izmenjenim fiziološkim procesima koji im omogućavaju da se izbore sa stresom (Medina i sar., 2007) ispoljavajući se kao među-sredinsko uzajamno ograničavanje (engl. *trade-off*). Ukoliko u procesu adaptacije dođe do samnjenja adaptivne vrednosti neke osobine životne istorije, to samnjenje može biti kompenzovano povećanjem druge, npr. redukcija preživljavanja adulta može biti kompenzovana porastom fekunditeta. Ove promene zavise od stresora ali i stepena genetičke varijabilnosti u populaciji, stepena *trade-off*-a i parenja sa neotpornim jedinkama (Falconer i MacKay, 1996). Odsustvo ovih promena u prisustvu stresa ukazuje na povećanu otpornost koja nema genetičku osnovu, a njihov opstanak i nakon prestanka dejstva stresa ukazuje na to da su mehanizmi koji su odgovorni za povećanu otpornost genetički determinisani (Donker i sar., 1993; Lam, 1999; Reinecke i sar., 1999; Spurgeon i Hopkin, 2000). Genotipovi koji pokazuju otpornost na stres, po pravilu, u

nestresnim uslovima imaju slabiju uspešnost u odnosu na genotipove osetljive na isti tip stresa. U stresnim uslovima geni koji obezbeđuju otpornost na stres povećavaju adaptivnu vrednost menjanjem opsega osobina. Selekcija *D. melanogaster* za povećanu otpornost na kadmijum je pokazala da je za povećano preživljavanje i fekunditet i smanjenje dužine razvića odgovoran jedan polno vezan gen sa velikim efektom (Shirley i Sibly, 1999). Međutim, u povoljnim uslovima, ove linije otporne na kadmijum su pokazale smanjenje fekunditeta, ali ne i promene u drugim osobinama. Geni koji u stresnim uslovima povećavaju adaptivnu vrednost mogu imati različit efekat na te iste osobine u optimalnim uslovima čime menjaju i genetičke korelacije među njima (Sgro i Hoffmann, 2004). Promene u rastu i reprodukciji organizama izloženih sredinskom stresu dovode do promena osobina životne istorije i evolucije njihovih obrazaca. Narušavanje staništa koje redukuje preživljavanje adultnih stadijuma može dovesti do ranijeg polnog sazrevanja i povećanog reproduktivnog ulaganja (Charlesworth, 1980; Sibly i Calow, 1989). Parametri životne istorije će se menjati kako bi optimizovali adaptivnu vrednost, a promenjene kombinacije adaptacija vezanih za rast i reprodukciju će biti pod selekcijom (Southwood, 1988; Donker i sar., 1993).

Sredinski stres može predstavljati i selektivni pritisak koji menja učestalosti alela u populacijama i dovodi do genetičke divergencije unutar ili između populacija (Hoffmann i Willi, 2008; Coors i sar., 2009; Orsini i sar., 2012). Poređenja populacija koje nastanjuju geografski i ekološki različita staništa su pokazala da su populacije uspešnije u sredinama iz kojih su potekle, a razlike između populacija koje dolaze iz različitih sredina često ukazuju na postojanje uzajamnog ograničavanja osobina životne istorije. Međutim, do divergencije može doći i ako nema *trade-off*-a, jer jedan set gena može biti favorizovan u jednoj, a drugi u drugoj sredini. Populacije će u tom slučaju imati veću uspešnost u sredini koja je sličnija onoj iz koje su potekle (Hoffmann i Parsons, 1993).

Variranje osobina životne istorije između odvojenih populacija iste vrste je vrlo dobro dokumentovano (Sibly i Calow, 1983; Lam, 1999). Intraspecijske interpopulacione razlike su često interpretirane kao lokalna adaptiranost na različite nivoe ranijeg izlaganja specifičnim uslovima sredine, uključujući i stresne

uslove. S obzirom na to da prirodna selekcija može da deluje samo na nasledne osobine, osnovna pretpostavka je da variranje ovih osobina imaju genetičku osnovu (Lam i Calow, 1990). Međutim ta interpopulaciona variranja mogu da budu prouzrokovana i razvojnim razlikama koje su posledica heterogenosti ili variranja sredine (Lam, 1996).

1.3.1. Teški metali kao oblik sredinskog stresa

Najznačajniji fizički faktori koji mogu izazvati stres u biološkim entitetima su: klimatski faktori i hemijsko zagađenje čiji su uzrok između ostalih i teški metali. Iako ne postoji precizna definicija teških metala, većina autora se slaže da su to metali čija je specifična gustina veća od 5g/cm^3 (Agarwal, 2009). U ovu grupu metala spadaju: olovo, kadmijum, nikl, gvožđe, cink, hrom, bakar, živa. Teški metali predstavljaju sastavni deo Zemljine kore i njihova količina je varijabilna u zavisnosti od regiona. Usled antropogenih aktivnosti broj staništa u kojima se pojavljuju veće količine teških metala raste i predstavlja sve veći selektivni pritisak na živi svet. Kao i druge potencijalno opasne materije, teški metali u organizam mogu dospeti preko vode, vazduha, zemljišta ili hrane. Uticaj teških metala na živi svet može biti direktan i indirektan. Direktan/kratkotrajni se ogleda u akutnoj toksičnosti koja izaziva veliki pad adaptivne vrednosti i može dovesti do smrti organizama i u krajnjoj istanci iščezavanja populacija. Indirektan/dugotrajni se ogleda u menjaju dinamike procesa u ekosistemima i umetanjem u lance ishrane (Peralta-Videa i sar., 2009).

Antropogeno zagađenje teškim metalima počinje još iz perioda prvog otkrića metala i njihovog korišćenja u ljudskoj upotrebi. Intenzitet zagađenja se naglo povećao sa početkom industrijske revolucije a tokom poslednjih 30-ak godina postaje sve veći problem kako razvijenih, tako i zemalja u razvoju. Najznačajniji izvori antropogenog zagađenja teškim metalima su: sagorevanje fosilnih goriva, eksploatacija ruda, industrijski, organski i urbani otpad (Agarwal, 2009). Najrasprostranjeniji zagađivači među teškim metalima su olovo, kadmijum i živa a njihova povećana koncentracija u životnoj sredini je u najvećem procentu posledica antropogenih uticaja usled sagorevanja fosilnih goriva, eksploatacije

ruda i njihove industrijske obrade. Najznačajniji izvor atmosferskog zagađenja olovom predstavljaju aerosoli poreklom iz motornih vozila (Pacyna i Pacyna, 2001). Primećeno je da se koncentracija olova u zemljištu i biljkama smanjuje sa udaljavanjem od velikih saobraćajnica, kao i da oko 90% ukupne količine olova koju biljka usvoji potiče iz atmosfere (Albasel i Cottenie, 1985). Brojna istraživanja su pokazala da je zemljište u industrijskim i urbanim regionima veoma zagađeno i sadrži visoke koncentracije teških metala (Kelly i sar., 1996). Takvo zemljište predstavlja problem za životnu sredinu jer su teški metali postojani i po nekoliko stotina godina i zbog smanjenog puferskog kapaciteta zemljišta mogu ući u podzemne vode i lance ishrane.

Teški metali se mogu nalaziti u svim delovima biotopa: zemljištu, vodi i vazduhu. Iz vazduha procesima suve ili mokre dispozicije dospevaju u vodu i zemljište, iz vode spiranjem taloga dospevaju u zemljište. Poslednja karika u ovom lancu su živi organizmi, na prvom mestu biljke koje usvajaju teške metale iz sredine, inkorporiraju ih u svoja tkiva i organe i tako čine dostupnim organizmima koji se nalaze dalje u lancu ishrane (Peralta-Videa i sar., 2009; Zhuang i sar., 2009).

Živim bićima su neophodne različite količine različitih teških metala za normalno razviće i razvoj. Ljudima su u tragovima neophodni gvožđe, bakar, kobalt i cink (Caussy i sar., 2003). Ostali teški metali kao što su živa i olovo nemaju nikakav pozitivan efekat i njihova akumulacija u organizmu može imati ozbiljne posledice. Vanadijum, tungsten i kadmijum su za većinu živih bića toksični ali su za neke pod određenim uslovima korisni (Lane i sar., 2000). Svim teškim metalima je zajedničko da su u većim količinama toksični i da njihova dugotrajna akumulacija negativno utiče na rast i razvoj živih sistema. Negativni efekti teških metala uključuju promene u biohemijskim procesima koje za posledicu imaju anatomske, morfološke i fiziološke promene. Teški metali imaju negativan uticaj na gotovo sve komponente adaptivne vrednosti. Usporavaju razviće kod velikog broja ispitivanih vrsta (Wentsel i sar., 1977; Jezierska i sar., 2009), utiču na reprodukciju (Laskowski i Hopkin, 1996.; Rožen, 2006), menjaju kompleksne osobine kao što je ponašanje (Lefcort i sar., 1996). Izazivaju morfološke promene na svim

stadijumima razvića i uglavnom deluju u pravcu smanjenja veličine tela izloženih jedinki (Hudson i Cibrwvski, 1996; Jezierska i sar., 2009).

Novija istraživanja pokazuju da teški metali mogu da utiču i na ćelijski odgovor posredovan proteinima toplotnog šoka (Hsp) čija je glavna uloga u održavanju ćelijske homeostaze u stresnim uslovima. Povećanje ekspresije Hsp70 proteina za koga je utvrđeno da je prva linija odbrane od različitih vrsta stresa pokazano je na većem broju vrsta (Köhler i sar., 1992; Sanders, 1993; Bonham i sar., 2003). Takođe, adaptacija na specifične uslove sredine ima uticaj na nivo ekspresije Hsp70 proteina, jer jedinke iz staništa sa najvećim intezitetom stresa pokazuju značajno manju ekspresiju ovih proteina u poređenju sa jedinkama iz sredina sa umerenim nivoom stresa (Köhler i sar., 1999; Zanger i sar., 2000; Warchałowska-Śliwa i sar., 2005). Ovi rezultati ukazuju da dugotrajno povećanje ekspresije Hsp70 ima negativne posledice na adaptivnu vrednost, pa organizmi povećanje ekspresije Hsp70 proteina koriste samo kao trenutnu i kratkotrajnu odbranu od stresnih uslova i da razvijaju druge adaptivne strategije za prevazilaženje stresa izazvanog teškim metalima.

Studije pokazuju da teški metali mogu uticati na promenu sastava i strukture bioloških zajednica i smanjenje genetičke varijabilnosti populacija (Ross i sar., 2002, Xiao i sar., 2000, Kim i sar., 2003, Lopes i sar., 2009, Coors i sar., 2009).

1.3.2. Olovo

U prirodi se olovo najčešće nalazi u dvovalentnom katjonskom obliku (Pb^{2+}) iako je poznat i četvorovalentni oblik koji je potpuno nerastvorljiv (Pb^{4+}). Olovo ima veliki afinitet prema sulfidnim grupama i disulfidnim vezama odakle i potiče njegov štetni efekat na žive sisteme (Flora i sar., 2012). U zemljištu se olovo uglavnom vezuje za minerale gline, mangan okside, gvožđe i aluminijum hidrokside, a naročit afinitet ima prema organskoj materiji. Iz ovih razloga se najveća akumulacije olova u zemljištu zapaža u površinskom horizontu, do 15 cm dubine (Chang i sar., 1984; Agarwal, 2009).

Količina olova u zemljištu zavisi od prirodnog sastava podloge ali i od antropogenih uticaja i u svetu varira između 16-71 mg/kg. Mrvić i sar. (2009) su u opsežnoj analizi zemljišta Srbije utvrdili da je prosečna koncentracija olova oko 40 mg/kg, u Vojvodini oko 17 mg/kg od čega je koncentracija olova ispod 50 mg/kg prisutna u 77.7% uzoraka, od 50-100 mg/kg u 19%, a samo u 3.4% ima povećan sadržaj, iznad 100 mg/kg. Primećeno je da se povećane koncentracije teških metala nalaze u zemljištima koja su formirana na stenama bogatim metalima (Kopaonik, planine iznad Raške, deo oko Surdulice, Zvornika i Bajine Bašte) i u dolinama velikih reka (Velika i Zapadna Morava) gde se nalaze prometne saobraćajnice (Vuković, 2002). Naša zemlja spada u red onih koji imaju povećanu emisiju olova u atmosferu (pored Rumunije, Bugarske, Makedonije), pa je doprinos depoziciji Pb iz sopstvenih emisija veći u odnosu na doprinos okolnih zemalja.

Olovo se u ljudskoj upotrebi nalazi već 5000 godina. Tokom istorije korišćeno je kao materijal za izgradnju, kao pigment za glaziranje keramike, za pravljenje cevi za transport vode. U starom Egiptu se intenzivno koristila šminka na bazi olova u čiju se lekovitost verovalo. Stari Rimljani su olovo acetat koristili za zaslađivanje starog vina i pretpostavlja se da su neki Rimljani unosili i do 1g olova dnevno (Järup, 2003). Ova praksa se nastavila tokom čitavog srednjeg veka i u nekoliko navrata izazvala masivna trovanja širom Evrope (Hernberg, 2000). Boje na bazi olova su jako dugo bile u upotrebi u domaćinstvima i tek je sredinom 80-ih godina prošlog veka počelo njihovo izbacivanje iz standardne upotrebe. Rutinska upotreba olova u ljudskim aktivnostima ima veliki uticaj i na druga živa bića. Jedan primer toga je slučaj trovanja olovom koje je imalo značajnu ulogu u smanjenju veličine populacije ugroženog kalifornijskog kondora (*Gymnogyps californianus*) 80-ih godina prošlog veka, pri čemu upotreba olovne sačme i posledično trovanje olovom i danas predstavlja glavnu prepreku za oporavak populacije ove ugrožene vrste (Kelly i sar., 2011).

Antropogene aktivnosti koje danas predstavljaju najveći izvor zagađenja olovom su sagorevanje fosilnih goriva, eksploatacija i industrijska prerada olovne rude i urbani otpad. Zagađenje olovom se uglavnom povezuje sa saobraćajem i zbog toga je manje više uniformno raspoređeno na celoj Zemlji. Tokom XX veka,

emisija olova u vazduh izazvala je značajno zagađenje svih delova biosfere uglavnom kao posledica korišćenja benzina obogaćenog olovom. Iako je upotreba olovnog benzina drastično smanjena poslednjih decenija, i samim tim smanjena njegova emisija u razvijenim zemljama, zagađenje olovom predstavlja poseban problem u zemljama u razvoju (Tong, 2000; Järup, 2003).

Olovo ima brojne štetne efekte na sve biološke entitete, jer najverovatnije ne postoji biološka funkcija i enzimska aktivnost na koju u dovoljno visokim koncentracijama olovo ne može imati negativan uticaj. Kod biljaka negativno utiče na brojne metaboličke procese (Sharma i Dubey, 2005), inhibira klijanje i razvoj semena (Munzuroglu i Geckil, 2002; Li i sar., 2005; Kranner i Colville, 2011), grananje korena (Liu i sar., 1994; Islam i sar., 2007), rast biljke (Uveges i sar., 2002; Pourrut i sar., 2011), transpiraciju (Parys i sar., 1998), produkciju hlorofila (Prasad i Prasad, 1987; Hu i sar., 2007) i sadržaj vode i proteina (Patra i sar., 2004). Kod životinja utiče na razvoj i normalno funkcionisanje nervnog sistema (Hirsch i sar., 2009), utiče na eritropoezu i smanjuje kapacitet prenošenja kiseonika u eritrocitima (Schwartz i sar., 1990), ometa normalno funkcionisanje bubrega i imunog sistema (Gonick, 2002; Dietert i Piepenbrink, 2006). Primećeno je da su juvenilni stadijumi daleko osetljiviji na prisustvo olova i kod dece, čak i u veoma malim dozama, olovo može izazvati neurotoksične efekte i izazvati poremećaje u ponašanju i probleme sa učenjem (Tong i sar., 2000; White i sar., 2007).

Brojni eksperimenti su pokazali štetni efekat olova na gotovo sve komponente adaptivne vrednosti kod velikog broja vrsta. Reinecke i sar. (1997.) su pokazali da iako niske koncentracije olova u supstratu imaju stimulatívno dejstvo na rast i produkciju kokona kod gliste *Eisenia fetida*, preživljavanje ovakvih kokona je značajno smanjeno. Sličan obrazac je primećen i kod kraljevske krabe *Lithodes santolla*, kod koje je izlaganje subletalnim koncentracijama olova ubrzalo dinamiku razvića i značajno povećanje broja morfoloških deformiteta kod izleženih jedinki kao i značajnu redukciju broja izleženih jedinki (Amin i sar., 1998). Ovakvi rezultati mogu ukazati na jednu od strategija preživljavanja u slučaju izlaganja teškim

metalima, da jedinke ubrzavanjam razvića nastoje da smanje vreme izlaganja nepovoljnim islovima sredine i na taj način izbegnu stres.

S druge strane, čak i male količine olova mogu produžiti period razvića i najčešće je to produženje proporcionalno koncentraciji. Ovakav trend je primećen kod brojnih ispitivanih vrsta, uključujući insekte: *Drosophila melanogaster* (Cohn i sar., 1992), *Drosophila subobscura* (Stamenković-Radak i sar., 2008.); ribe *Cyprinus carpio* (Jeziarska i sar., 2009); vodozemce *Xenopus leavis* (Berzins i Bundy, 2002) i *Pelophylax nigromaculata* (Huang i sar., 2014). Izlaganje olovu u adultnoj fazi ima uticaj i na dužinu života: Massie i sar. (1992) su pokazali malo, ali ne i statistički značajno produženje života kod jedinki *Drosophila melanogaster* koje su bile izložene veoma niskim koncentracijama olova ($\sim 0.207\text{--}2.07\ \mu\text{g/g}$ Pb-acetata dodatog u supstrat) i značajno smanjenje kod jedinki koje su bile izložene većim koncentracijama. Olovo utiče i na fekunditet: Hirsh i sar. (2003) su pokazali da niske koncentracije povećavaju ovu komponentu adaptivne vrednosti dok su Uysal i Bahececi (1996) pokazali smanjenje pri većim koncentracijama kod *Drosophila subobscura*. Veći broj studija je pokazao negativan uticaj olova na produkciju i kvalitet spermatozoida kod pacova ali i ljudi (Chowdhury i sar., 1984,1986). Takođe, olovo utiče i na kompleksne ponašajne osobine kao što je udvaranje pri parenju. Hirsh i sar. (2003.) su pokazali da male koncentracije olova (2-8 $\mu\text{g/g}$) imaju pozitivan efekat na parenje ženki ali da veće koncentracije (20-50 $\mu\text{g/g}$) imaju negativan efekat kod *Drosophila melanogaster*. Ista studija je pokazala i negativan uticaj većih koncentracija olova na lokomotornu aktivnost mužjaka, a slični rezultati su pokazani i na ribama i vodozemcima (Jeziarska i sar., 2009; Huang i sar., 2014). Ovakvi rezultati ukazuju na drugu strategiju odgovora na stres pri izloženosti teškim metalima, odnosno alokaciju resursa u energetski zahtevnije mehanizme odbrane od štetnog delovanja olova čime se usporavaju mehanizmi odgovorni za normalno razviće. Svaki organizam ima samo određenu količinu raspoložive energije koju može usmeriti u procese kao što su preživljavanje, razviće, rast i reprodukcija, a alokacija resursa u jednu osobinu obično znači smanjenje druge osobine (van Noordwijk i de Jong, 1986; Stearns, 1992; Reznick i sar., 2000; Roff, 2002). Očekivano je da fiziološki odbrambeni mehanizmi

tolerantnih genotipova (Maroni i sar., 1987; Van Straalen i sar., 1987) kao što su povećana ekskrecija metala i produkcija enzima neophodnih za detoksikaciju (Wilczek i Migula, 1996), i/ili povećana ekspresija gena kao što su proteini toplotnog šoka i metalotioneini (Singer i sar., 2005; Maitani i sar., 1986) koji su odgovorni za brz ali energetski skup odgovor na stresne uslove, smanjuju količinu resursa dostupnih za razviće i reprodukciju (Calow, 1991).

Efekat olova na veličinu tela je sličan kao i kod ostalih teških metala i uglavnom je u pravcu njene redukcije. Povećane koncentracije olova u laboratorijskim uslovima izazivaju malformacije na kostima kod žaba (Sparling i sar., 2006; Haywooda i sar., 2004) i usnom aparatu hironomida (Vermeulen i sar., 2000). Akumulacija olova u različitim tkivima i organima negativno je korelisana sa veličinom tela (Lagisz, 2008) a ovaj efekat je naročito istražen kod riba (Canli i Atli, 2003). Istraživanja na *Drosophila subobscura* pokazala su populaciono specifičan odgovor za veličinu krila u uslovima izlaganja olovu kroz veći broj generacija (Kurbalija Novičić i sar., 2012). Povećanje koncentracije olova u supstratu dovelo je do smanjenja veličine krila kod jedinki iz populacije koja je u svom prirodnom okruženju izložena zagađenju olovom, dok je sasvim obrnut trend primećen kod jedinki iz populacije sa nezagađenog staništa kod kojih je povećanje koncentracije olova u supstratu izazvalo povećanje krila.

Veliki broj studija je pokazao da populacije tokom vremena mogu da se adaptiraju na povećane koncentracije olova u svojoj sredini. Isopode su se pokazale kao odličan model sistem za procenjivanje adaptacije na zagađenje olovom u akvatičnim ekosistemima. Jedinke *Asellus meridianus* poreklom iz dela reke koji se nalazi u blizini rudnika olova pokazale su mnogo veću otpornost na olovo u laboratorijskim uslovima u poređenju sa jedinkama vrste koje naseljavaju manje zagađena staništa u istoj reci (Brown, 1976) . Slični rezultati su dobijeni i na drugoj vrsti *Asellus aquaticus* (Fraser i sar., 1978). Wright (1986) je u eksperimentu sa amfipodama *Gammarus marinus* pokazao da jedinke u čijem je prirodnom staništu olovo prisutno u većim koncentracijama manje usvajaju ovaj teški metal od jedinki koje žive u čistim staništima implicirajući da je adaptivna strategija u ovom slučaju smanjenje apsorbcije jona ovog metala. Kenig i sar.

(2013) su pokazali populaciono specifičan odgovor u dužini razvića *Drosophila subobscura*. Jedinke iz populacije koje su prethodno bile izložene zagađenju olovom imale su u laboratorijskim uslovima brže razviće od jedinki iz populacije poreklom iz nezagađene sredine u uslovima povećane koncentracije olova u supstratu.

Iako je štetni efekat olova nedvosmisleno dokazan, još uvek nije jasno utvrđen mehanizam koji leži u osnovi njegovog toksičnog delovanja (Tian and Lawrence, 1995). Jedan od mehanizama koji objašnjava štetan efekat olova može biti i njegova sposobnost da se veže za sulfhidrilne grupe proteina i da zamenjuje i/ili kompetira sa kalcijumom što dovodi do remećenja metaboličkih funkcija ćelije. Ove zamene dovode do promena u esencijalnim biološkim procesima kao što su adhezija ćelija, unutar i medjućelijski signalni putevi, pravilno uspostavljanje tercijarne i kvarternarne strukture proteina, apoptoza, jonski transport, regulacija enzima i oslobađenje neurotransmitera (Flora i sar., 2007, 2012). Drugi je indukcija oksidativnog stresa. Prisustvo olova u ćelijama izaziva hiperprodukciju slobodnih radikala kiseonika (ROS) rezultujući u sistemskoj mobilizaciji i smanjenju intrizične antioksidativne odbrane, destabilizaciji homeostaze kalcijuma, smanjenju dostupnog ATP-a i promeni jonskog membranskog fluksa menjajući balans između njihove produkcije i sposobnosti ćelije da se odbrani od toksičnog delovanja slobodnih radikala stvaranjem antioksidanata (Xu i sar., 2008). Slobodni radikali su kratkoživeća reaktivna hemijska jedinjenja (atomi ili molekuli) koja poseduju jedan nespareni elektron, a generišu se tokom različitih metaboličkih procesa, pre svega u mitohondrijama, ali i pod uticajem nekih spoljašnjih faktora. Slobodni radikali kiseonika mogu oštetiti ćelijske komponente, pre svega lipide membrana i nukleinske kiseline tokom procesa oksidacije, jer su u stanju da difunduju dovoljno daleko u ćeliji i da direktno interaguju sa DNK molekulima ili proteinima, što može smanjiti enzimatske i ne-enzimatske antioksidanse, dovodeći do progresivne disfunkcije u ćeliji, a indirektno do genotoksičnog događaja (Valko i sar., 2007; Kong i Lin, 2010).

Olovo, kao i svi ostali teški metali i veliki broj drugih zagađivača, izaziva oštećenja na molekularnom i ćelijskom nivou, ali se njegovi krajnji efekti uočavaju

na višim nivoima biološke organizacije: jedinkama, populacijama i ekosistemima. Kako je već rečeno, olovo i drugi teški metali mogu uticati na promenu sastava i strukture bioloških zajednica i uticati na genetičku strukturu populacije. Najčešći efekat na genetičku strukturu populacija je smanjenje genetičke varijabilnosti (Ross i sar., 2002; Xiao i sar., 2000; Kim i sar., 2003; Lopes i sar., 2009; Coors i sar., 2009). Smatra se da stresne sredinske promene dovode do smanjenja veličine populacije što posledično može dovesti do smanjenja ukupne genetičke varijabilnosti i ograničenja daljih adaptivnih odgovora (Hoffmann i Willi, 2008). To je često praćeno promenama u učestalostima alela do kojih dolazi usled delovanja selekcije, ili slučajne fiksacije (van Straalen i Timmermans, 2002). Ove genetičke promene, a naročito gubitak genetičke varijabilnosti, mogu biti trajne. Jednom izgubljena varijabilnost se ne može brzo vratiti, a jedan od uslova da se vrati je da populacija preživi dovoljno dug vremenski period i da postoji protok gena iz drugih populacija.

1.4. Sinergistički efekat genomskog i sredinskog stresa

Obzirom na rastući antropogeni uticaj na sve aspekte životne sredine, istraživanja promena genetičke strukture prirodnih populacija, izazvanih inbridingom i autbridingom, posebno su aktuelna sa aspekata praćenja efekata klimatskih promena, fragmentacije staništa i porasta broja ugroženih populacija i vrsta. Inbriding, ukrštanje između jedinki u srodstvu, kao posledicu ima homozigotizaciju genoma što može dovesti do ispoljavanja štetnih recesivnih alela koji dovode do smanjenja adaptivne vrednosti jedinki, a posledično i populacija. Efekat inbridinga je naročito veliki u malim izolovanim populacijama koje su izložene promenama sredine i stresnim uslovima. Autbriding, ukrštanje između nesrodnih jedinki, ima dve suprotne posledice, može dovesti do povećanja adaptivne vrednosti heterozigotnih jedinki u literaturi poznatog kao heterozis ili hibridni vigor ili dovesti do pada adaptivne vrednosti heterozigotnih jedinki poznato kao autbriding depresija. Genetička osnova heterozisa može biti dominansa, overdominansa, ali i epistatičke interakcije. Genetička osnova autbriding depresije leži u razbijanju koadaptiranih genskih kompleksa. Po Dobžanski-Milerovom modelu, populacije tokom svoje evolucione istorije akumuliraju povoljne i neutralne mutacije i u kombinaciji sa specifičnim uslovima sredine razvijaju jedinstvene koadaptirane genske komplekse specifične za svaku populaciju. Spajanje dva genofonda sa različitim koadaptiranim genskim kompleksima, što se dešava pri ukrštanju jedinki poreklom iz dve različite populacije, može dovesti do razbijanja tih koadaptiranih genskih kompleksa pri čemu se aleli koji ranije nikad nisu bili „testirani“ zajedno dolaze u kontakt i mogu potencijalno imati štetan efekat. Efekat hibridizacije na adaptivnu vrednost zavisi od većeg broja faktora među kojima je najznačajnija genetička divergencija između populacija. Ako su populacije genetički slične najverovatniji efekat autbridinga je heterozis, ako su genetički različite najverovatnije će doći do autbriding depresije. Sve promene u genetičkoj strukturi populacije mogu dovesti do promene adaptivne vrednosti populacije u sredini u kojoj živi i dovesti do takozvanog genomskog stresa. U sredini koja je nalazi pod antropogenim uticajem populacije sa narušenom genetičkom strukturom su mnogo ranjivije u odnosu na one kojima

je genetička struktura očuvana. U svetlu sve većih i dramatičnijih promena nastalih antropogenim uticajem, postavlja se pitanje sposobnosti i granica organizama i populacija da se izbore sa većim brojem simultanih selektivnih antropogenih pritisaka te je stoga neophodno proučavati sinergistički efekat genomskog i sredinskog stresa.

Kako je već rečeno, i inbriding i autbriding predstavljaju stres koji može imati različite efekte na prirodne populacije u zavisnosti od genetičke arhitekture osobine koja se posmatra, ali i genetičke strukture ispitivane populacije. Sredinski stres izazvan bilo biotičkim (parazitizam, predatorstvo) ili abiotičkim faktorima (klima, hemijski zagađivači, zračenje, teški metali) oblikuje genetičku strukturu populacije vodeći ka fiksaciji najbolje adaptiranih alelskih kombinacija, ali u zavisnosti od inteziteta može da dovede do izumiranja populacije u staništu. Jedinke koje migracijom izbegavaju sredinski stres mogu doći u reproduktivni kontakt sa jedinkama druge populacije koja u svom staništu može biti izložena antropogeno izazvanom pritisku sredinskog stresa. Takođe, fragmentacija staništa dovodi do stvaranja malih izolovanih populacija u kojima su štetni efekti inbridinga i genetičkog drifta relativno veliki. Takva novonastala staništa mogu biti izložena antropogenom pritisku pa se štetni efekat inbridinga može povećati. Obzirom na sve veći, uglavnom štetni, antropogeni uticaj na prirodne populacije, fokus istraživanja efekta stresa u prirodnim populacijama se pomera ka sinergističkom efektu genomskog i sredinskog stresa. Kombinovani efekat genomskog i sredinskog stresa je kao i najveći broj bioloških fenomena specifičan za vrstu, zavisi od tipa stresa i genetičke arhitekture, kako osobine tako i populacije koja se posmatra, pa je donošenje nekog generalnog zaključka teško i nezahvalno. Veliki broj novijih istraživanja se bavi proučavanjem i procenom efekta sinergističkog delovanja genomskog i sredinskog stresa.

Obzirom da je izučavanje inbridinga i inbriding depresije istorijski starije, najveći broj literaturnih podataka o kombinovanom efektu genomskog i sredinskog stresa potiče upravo iz eksperimenata sa inbredovanim jedinkama u različitim stresnim okruženjima. Interesovanje za inbriding-stres interakcije ne jenjava proteklih 60-ak godina. Tokom 50-ih i 60-ih godina prošlog veka pojavio se

veliki broj radova, uglavnom iz oblasti agronomije, koji je proučavao ovaj efekat iz perspektive heterozigotnosti, razvojne stabilnosti i kanalizacije, održavanja optimalnog fenotipa duž gradijenta promene sredine. U ovim radovima fokus je bio na heterozisu nastalom usled ukrštanja inbredovanih linija, a ne na gubitku genetičke varijabilnosti i povećanoj homozigotnosti nastalim usled fragmentacija staništa i nastankom populacija sa malim efektivnim veličinama. Iako varijabilni, rezultati ovih studija su bili dovoljni da Wright (1977) predloži da su sa smanjenjem heterozigotnosti (odnosno povećanjem inbridinga) jedinice generalno osetljivije na sredinski stres. Kada su se nekoliko decenija kasnije, istraživači ponovo fokusirali na ovaj fenomen pokazalo se da taj trend uopšte nije toliko generalan (Armbruster i Reed, 2005; Marr i sar., 2006; Waller i sar., 2008; Angeloni i sar., 2011). Armbruster i Reed (2005) su u meta-analizi dotadašnjih podataka potvrdili Rajtovu inicijalnu pretpostavku da sredinski stres u proseku povećava efekat inbriding depresije. Međutim, po Arambisteru i Reedu 24% studija na ovu temu je pokazalo da sinergistički efekat sredinskog stresa i inbridinga ne samo da ne povećava štetne efekte inbridinga, već u nekim slučajevima ima i suprotan obrazac, odnosno da je inbriding depresija smanjena u stresnim uslovima. Odgovor različitih vrsta, populacija, čak i inbredovanih linija korišćenih u eksperimentima na kombinovani uticaj inbridinga i stresa se pokazao kao veoma varijabilan. U svetlu ovih rezultata, došlo se do zaključka da iako se inbriding depresija povećava u stresnim uslovima sredine, njeni specifični efekti su karakteristični za genetičku strukturu izučavane populacije i tip stresa koji je primenjen. Fox i Reed (2011) su u svom eksperimentu i meta-analizi pokazali da dominantan razlog za ovakvu varijabilnost u dobijenim rezultatima leži u intenzitetu sredinskog stresa kojem su jedinice bile izložene. U slučajevima kada je primenjivan relativno nizak intenzitet sredinskog stresa najčešće nije pokazano povećanje inbriding depresije dok je u slučajevima kada je primenjivan visok intezitet sredinskog stresa pokazano da se inbriding depresija značajno povećava. Ovi rezultati su pokazali da je efekat stresa na inbriding depresiju mnogo ujednačeniji nego što se ranije mislilo, i da ipak ne zavisi u tolikoj meri od genetičke arhitekture populacije i tipa stresa, već da postoji generalan trend povećanja inbriding depresije sa povećanjem inteziteta sredinskog stresa. Ovakvi

zaključci su kasnije nezavisno potvrđeni od strane Enders i Nunney (2012) koji su pokazali linearnu zavisnost između inbriding depresije i inteziteta stresa, odnosno linearno povećanje inbriding depresije sa povećanjem nivoa stresa.

Veliki broj istraživanja je pokazao da stres u populacijama koji imaju određeni nivo inbridinga, deluju jednovremeno i neodvojivo jedan od drugog (Armbruster i Reed, 2005; Fox i Reed, 2011; Enders i Nunney, 2012). Inbriding povećava homozigotnost genoma čime su recesivni štetni aleli izloženi dejstvu selekcije koja ih efikasno eliminiše iz populacije. Ako je otpornost na stres generalni princip koji ne zavisi od tipa stresa koji je primenjen, onda će populacija biti otporna na više različitih tipova stresa i u budućnosti će imati veći adaptivni potencijal da se suoči sa promenama sredine (Frankham i sar., 1993; Hedrick 1994). Međutim, ako štetni recesivni aleli imaju efekat koji je specifičan za stres onda će selekcija i inbriding pročistiti samo one alele koji su nepovoljni u datoj sredini (Reed i sar., 2012). Sudbina ostalih štetnih alela u ovom slučaju će zavisiti uglavnom od drifta. Brojna istraživanja su pokazala da čak i umereni nivo inbridinga utiče na odgovor jedinki u različitim stresnim uslovima i da u ovom odgovoru ne učestvuju štetni recesivni aleli sa generalnim efektom i da su efekti inbridinga barem delimično specifični za sredinu i stres koji je primenjen (Dudash 1990; Jimenez i sar., 1994; Pray i sar., 1994; Bijlsma i sar., 1999, Dahlggaard i Hoffmann, 2000). Takođe, ekspresija štetnih recesivnih alela može zavisiti od uslova sredine što može ukazati da je interakcija stresa i inbridinga ipak donekle zavisna od tipa stresa koji je primenjen (Kondrashov i Houle, 1994). U ovom slučaju inbriding i selekcija koja deluje zbog uticaja određenog stresa iz populacije pročišćava samo one štetne alele koji su eksprimirani u datim stresnim uslovima, ostavljajući populaciju već narušene genetičke strukture ranjivu u slučaju promena sredine i novog izvora stresa.

Postoji veći broj hipoteza koji objašnjavaju povećanje inbriding depresije sa povećanjem nivoa sredinskog stresa. Jedna od predloženih hipoteza je da izloženost sredinskom stresu menja genetičku arhitekturu osobina koje leže u osnovi inbriding depresije, odnosno povećava ekspresiju genetičkog opterećenja usled čega dolazi do pada adaptivne vrednosti (Bijlsma i sar., 1999; Cheptou i

Donohue, 2011; Bijlsma i Loeschke, 2012). Druga je da ekspresija genetičkog opterećenja povećava osetljivost inbredovanih jedinki na fiziološke efekte sredinskog stresa, odnosno da ekspresija genetičkog opterećenja remeti ćelijski odgovor na stres i smanjuje mogućnost organizma da na adekvatan način fiziološki odgovori na stresne uslove čime se smanjuje ukupna adaptivna vrednost (Lerner, 1954; Waller i sar., 2008; Enders i Nunney, 2010). Treća hipoteza pretpostavlja da je povećanje inbriding depresije u stresnim sredinskim uslovima posledica povećane fenotipske varijabilnosti. Naime, pokazano je da smanjena sposobnost organizma da ublaži efekte sredinskog stresa na ćelijskom nivou dovodi do povećanja asimetrije nekih morfoloških karakteristika i čak do povećanja učestalosti novih fenotipova u laboratorijskim uslovima, čime se smanjuje ukupna adaptivna vrednost populacije (Reed i sar., 2012).

Brojne studije inbriding depresije nedvosmisleno pokazuju hibridnu superiornost u slučajevima izloženosti sredinskom stresu, ali broj studija koje se bave kombinovanim efektom genomskog i sredinskog stresa iz percepcije autbridinga relativno je mali (Tallmon, 2004; Edmands, 2007). Kao što je slučaj i sa inbridingom, posledice autbridinga su najverovatnije specifične za vrstu, zavise od genetičke arhitekture osobine koja se posmatra, od razlika u evolucionim istorijama između populacija koje dolaze u kontakt, od adaptacije na uslove staništa kao i od intenziteta i tipa stresa koji se proučava. Nekoliko ranih studija je pokazalo da stresni uslovi povećavaju efekat heterozisa (Pederson, 1968; Armbruster i sar., 1997). Moguća objašnjenja ovakvih rezultata bi bila da se u stresnim uslovima intenzivira maskiranje štetnog efekta recesivnih alela (Hoffman i Parsons, 1991) ili da zbog povećanog puferskog kapaciteta heterozigoti pokazuju veći heterotičan efekat u stresnim nego u nestresnim uslovima (Lerner, 1954). Pored efekta dominanse i overdominanse, pokazano je da u stresnim uslovima može doći do smanjenja štetnih epistatičkih interakcija pa se samim tim ublažavaju efekti autbriding depresije (Edmands i Deimler, 2004). Vetukhiv i Beardmore (1959) su u eksperimentu sa *Drosophila pseudoobscura* pokazali da temperaturni stres ima uticaj na fitnes i u F1 i u F2 generaciji, odnosno da smanjuje i očekivane pozitivne efekte ali i ublažava predviđene negativne efekte međupopulacione

hibridizacije. Oni su pokazali da temperaturni stres smanjuje heterotični efekat u F1 generaciji, ali i da ublažava pad adaptivne vrednosti u F2 generaciji. S druge strane, Armbruster i sar. (1997) su pokazali da stres izazvan gustinom jedinki po jedinici površine povećava pozitivne efekte međupopulacionih ukrštanja kod *Wyeomyia smithii*, povećavajući i hibridni vigor u F1 generaciji i smanjujući autbriding depresiju u F2 generaciji. Kopepoda *Tigriopus californicus* je možda najbolje izučavan model sistem međupopulacione hibridizacije i kod njih je dobro opisan hibridni vigor u F1 generaciji i autbriding depresija u F2 generaciji izazvana razdvajanjem koadaptiranih genskih kompleksa. Edmands i Deimler (2004) su pokazali da postoji povećana adaptivna vrednost kod hibridnih jedinki koje su bile izložene temperaturnom stresu i povećanom salinitetu i dodatno su pokazali da je odgovor zavisian od sredine. U ovoj studiji je izloženost povišenoj temperaturi, kao najstresnijem spoljašnjem faktoru za ovu vrstu, rezultovalo u održavanju heterozisa u F1 i smanjenju autbriding depresije u F2 generaciji. Bitno je istaći da na efekat međupopulacione hibridizacije značajan uticaj ima evoluciona istorija populacija koje dolaze u kontakt, odnosno adaptiranost makar jedne populacije na stresne uslove sredine u staništu koje nastanjuje. Pokazano je da hibridi *Chironomus riparius* nastali ukrštanjem jedinki iz populacije koja je adaptirana na zagađenje kadmijumom i populacije koja živi u nezagađenim uslovima brzo gube toleranciju na teške metale ukazujući da hibridizacija može imati štetne efekte u uslovima lokalne adaptacije na stanište (Groenendijk i sar., 2002). Heterotični efekti na oblik i veličinu krila su pokazani kod *Drosophila melanogaster* u uslovima temperaturnog stresa (Kjærsgaard i sar., 2012). Ista studija je pokazala sličan efekat i za lokomotornu aktivnost, a kasnije analize su pokazale da su razlike u lokomotornim aktivnostima inbredovanih i autbredovanih linija temperaturno specifične, odnosno da hibridne jedinice imaju bolje performanse na višim temperaturama a da su inbredovane jedinice bolje u standardnim laboratorijskim uslovima (Kjærsgaard i sar., 2014). Ovi rezultati ukazuju na već pomenutu hipotezu, da heterozis ima veći intenzitet u stresnim uslovima jer u njima maskiranje štetnih, uslovno eksprimiranih recesivnih alela ima značajan pozitivan uticaj na adaptivnu vrednost (Reed i sar., 2002, 2012; Joubert i Bijlsma, 2010; Bijlsma i Loeschcke, 2012).

2. CILJEVI RADA

Predmet ove doktorske disertacije je analiza sinergističkog efekta genomskog i sredinskog stresa na jedinke populacija *Drosophila subobscura* iz dva ekološki i topološki različita staništa, kao i hibrida nastalih njihovim ukrštanjem. Sinergistički efekat genomskog i sredinskog stresa, u ovom radu, evaluira se na populacionom nivou preko procene komponenti adaptivne vrednosti (dužina razvića i preživljavanje od jaja do adulta), na morfološkom nivou praćenjem varijabilnosti u veličini krila i biohemijskom nivou praćenjem ekspresije proteina toplotnog šoka.

Ciljevi ovog istraživanja su:

1. Da se utvrdi odgovor jedinki sa različitim nivoima heterozigotnosti genoma (unutar-linijski, unutar-populacioni i među-populacioni hibridi), na uslove povećane koncentracije olova kao sredinskog stresogenog faktora.
2. Da se testira hipoteza o superiornosti heterozigota u stresnim uslovima. Predikcija je da heterozis kroz overdominansu- maskiranjem recesivnih štetnih alela u heterozigotnom stanju ili kroz epistatičke interakcije, daje selektivnu prednost heterozigotnim nosiocima i posledično povećava adaptivnu vrednost u populaciji.
3. Da se testira populaciono specifičan odgovor na prisustvo olova kao sredinskog stresogenog faktora pod pretpostavkom da populacije iz ekološki različitih staništa poseduju različite populaciono-genetičke i demografske istorije, i stoga daju različit odgovor na stresne uslove sredine izazvane zagađenjem olovom.
4. Da se testira hipoteza o autbridging depresiji kao mogućem ishodu među-populacijskih ukrštanja u F1 generaciji, pod pretpostavkom da su ukrštene jedinke koje su poreklom iz različitih populacija nosioci koadaptiranih genskih kompleksa čije "razbijanje" može dovesti do pada adaptivne vrednosti u populaciji.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Vrsta, opis lokaliteta, uzorkovanje populacija i uspostavljanje linija

U ovom istraživanju korišćene su jedinke vrste *Drosophila subobscura* (Collin, 1936) koja pripada podrođu *Sophophora*, rodu *Drosophila*. *D. subobscura* je široko rasprostranjena Palearktička vrsta koja se može naći u najvećem delu Evropskog kontinenta osim na krajnjem severu (Island, Centralna i Severna Skandinavija), Kanarskim ostrvima, Severozapadnoj Africi, Srednjem Istoku, a od polovine sedamdesetih godina prošlog veka je veoma uspešno kolonizovala i oba američka kontinenta. U regionu Srbije koji spada u ekološki centralni deo rasprostranjenja, ova vrsta se može naći na ekološki različitim staništima (Krimbas, 1993; Jelić i sar., 2009, 2012). Relevantna komponenta sredine prilikom odabira lokaliteta na kojima će se uzorkovati populacije u ovom redu je bila procena stepena zagađenja zemljišta olovom, antropogeno indukovanim teškim metalom.

Za potrebe ovog istraživanja jedinke su uzorkovane sredinom juna 2010. godine na dva lokaliteta koja predstavljaju ekološki različita staništa: (i) u Botaničkoj bašti, Univerziteta u Beogradu na koordinatama 44°49'01"N i 20°28'24,88"E i 87m nadmorske visine; (ii) u Sićevačkoj klisuri na koordinatama 43°19'N i 22°08'E, na 279 m nadmorske visine i severnoj ekspoziciji.

Botanička bašta, Univerziteta u Beogradu je antropogeno formirana biljna zajednica (*Arboretum*). Botanička bašta se nalazi u urbanoj, široj centralnoj zoni Beograda koja se po procenama stanja životne sredine smatra jednom od najzagađenijih na teritoriji grada. Usled izraženog antropogenog uticaja, ovaj lokalitet ima specifične mikroklimatske uslove. Koncentracija olova u vazduhu fluktuirala kako sezonski tako i na godišnjem nivou. U neposrednoj blizini Botaničke bašte tokom 2010. godine kretala se između 0,7 mg/m³ i 1,8 mg/m³ što je značajno više od dozvoljene vrednosti koja iznosi 0,5mg/m³ (Kvalitet životne sredine u gradu Beogradu u 2010. godini).

Sićevačka klisura se nalazi u jugoistočnom delu Srbije i po svojim geomorfološkim karakteristikama spada u red velikih krečnjačkih klisura. Predstavlja probojnicu reke Nišave kroz Kunovičku površ, prostire se u pravcu

istok-zapad, duga je oko 17km a u najužem delu je duboka između 260m i 360m. Odlikuje je izuzetno bogatstvo reliktnih i endemoreliktnih vrsta a ujedno i predstavlja jedan od najbogatijih refugijuma submediteranski vrsta. Zbog svojih geomorfoloških osobina i prirodnih vrednosti Sićevačka klisura je 2000. godine u skladu sa Zakonom o zaštiti prirode Republike Srbije proglašena za Park prirode II kategorije zaštite.

Uspostavljanje *iso-female* (IF) linija

Jedinke *Drosophila subobscura* na oba lokaliteta su uzorkovane pomoću klopki od fermentisanih jabuka, entomološkim mrežicama u periodu od 17h-20h sa intervalima od 20 minuta između uzorkovanja.

Jedinke su nakon uzorkovanja odvojene po polovima i ženke su iskorišćene za uspostavljanje *iso-female* (IF) linija. Svaka ženka je postavljena pojedinačno u flakon sa 15 ml standardnog supstrata za gajenje *Drosophila* koji se sastoji od kukuruznog griza (7.88%), šećera (7.12%) i agara (0.52%), obogaćen suvim kvascem (0.76%) i sa dodatkom fungicida (alkoholni rastvor metil-4-hidroksibenzoata-Nipagin®). Narednih desetak dana flakoni su držani u optimalnim laboratorijskim uslovima za vrstu *D. subobscura* (temperatura od 19°C, relativna vlažnost vazduha oko 60%, intenzitet svetlosti 300 lux, pri svetlosnom režimu 12h svetlost/12h mrak), tokom kojih su ženke polagale jaja. Nakon tog perioda ženke su uklanjane. S obzirom da je utvrđeno da se višestruka inseminacija ženki *D. subobscura* u prirodi izuzetno retko dešava (Loukas i sar. 1981), jedinke F1 generacije iz jednog flakona se mogu smatrati potomcima u punom srodstvu („full-sibs“, braća i sestre). Na ovaj način uspostavljeno je 55 IF linija iz Botaničke bašte (u daljem tekstu BB) i 50 IF linija iz Sićevačke klisure (u daljem tekstu S). Potomstvo ženki iz prirode prebacivano je na svež supstrat tokom četiri sukcesivne generacije u cilju aklimatizacije na laboratorijske uslove.

3.2. Koncentracije teških metala u zemljištima

Uzorkovanje jedinki je vršeno u delu Botaničke bašte koji je pretežno pod drvenastim pokrovom, sa preovlađujućim biljnim vrstama *Celtis australis* L. i *Corilus colurna* L. Uzorkovanje jedinki u Sićevačkoj klisuri je vršeno u polidominantnoj šumskoj zajednici tipa *Carpino orientalis-Quercetum mixtum* (calcicolum).

Na oba lokaliteta uzorkovan je površinski sloj zemljišta za koji je pokazano da teški metali, naročito olovo, imaju najveći afinitet. Zemljište je uzorkovano na više mesta u okviru svakog lokaliteta u cilju pokrivanja što veće površine prirodnog staništa i obezbeđivanja reprezentativnog uzorka zemljišta. Zatim su uzorci odneti u Gradski Zavod za Javno Zdravlje, Beograd, gde je urađena analiza koncentracije teških metala olova, cinka, kadmijuma i žive u zemljištu. Analiza je urađena Metodom za određivanje sadržaja ukupnih metala u zemljištu i sedimentu, koja se standardno koristi u ovoj instituciji za procenu zagađenja zemljišta teškim metalima.

Metoda za određivanje teških metala u uzorcima zemljišta i sedimenata se sastoji od metoda pripreme i metoda određivanja. Priprema teških metala u zemljištu se sastoji od pripreme čvrstih uzoraka zemljišta i sedimenata postupkom kisele digestije prema metodi EPA 3050 B i SRPS ISO 11466:2004-metoda pripreme carskom vodom. Kvantitativno određivanje pripremljenih uzoraka zemljišta i sedimenata vrši se prema metodi EPA 200.7.

Kisela digestija reprezentativnog uzorka se zasniva na digerovanju 1-2g reprezentativnog uzorka ponovljenim porcijama koncentrovane azotne kiseline (HNO_3) i/ili koncentrovane hlorovodonične kiseline (HCl) i/ili 30% vodonik peroksida H_2O_2 .

Nakon postupka digestije analiza koncentracije teških metala se vrši tehnikom plamena i tehnikom generacije hidrida. Za analizu rastvora prema ovoj metodi koristi se simultani optički emisioni spektrometar sa aksijalnom indukovano

kuplovanom plazmom, a rezultati se dobijaju na osnovu poređenja uzorka sa standardnom krivom.

3.3. Dizajn eksperimenta

Za postavku osnovnog eksperimenta disertacije su po principu slučajnosti izabrane po 32 IF linije iz svake od populacija, BB i S. U cilju uspostavljanja serije eksperimentalnih linija koje poseduju različit nivo ukupne genomske heterozigotnosti izvršena su tri tipa ukrštanja:

- I) Unutar-linijska ukrštanja (u daljem tekstu UL)- predstavljaju slučajna ukrštanja između jedinki u okviru svake IF linije (za svako ukrštanje korišćeno je po tri nasumično uzetih ženki i mužjaka)
- II) Unutar-populaciona ukrštanja (u daljem tekstu UP)- predstavljaju slučajna ukrštanja između jedinki iz različitih IF linija u okviru svake populacije (za svako ukrštanje korišćeno je po tri ženke i tri mužjaka, nasumično uzetih)
- III) Među-populaciona ukrštanja (u daljem tekstu MP) - predstavljaju slučajna ukrštanja između jedinki poreklom iz različitih linija između populacija (za svako ukrštanje nasumično je uzeto po tri ženke i tri mužjaka)

U okviru UP i MP sprovedena su kako direktna tako i recipročna ukrštanja u odnosu na pol da bi se detektovalo moguće prisustvo materinskog efekta (npr. direktno ukrštanje: mužjak iz IF linije br.1, sa ženkom iz IF linije br.2, i recipročno ukrštanje: mužjak iz IF linije br.2 sa ženkom iz IF linije br.1, itd.). (Tabela 3.1). Na ovaj način formirano je osam eksperimentalnih grupa prema tipu ukrštanja:

1. UL ukrštanja u okviru populacije Botanička bašta (u daljem tekstu B)
2. UL ukrštanja u okviru populacije Sićevačka klisura (u daljem tekstu S)
3. UP ukrštanja u okviru populacije Botanička bašta, direktna (u daljem tekstu BB dir)
4. UP ukrštanja u okviru populacije Botanička bašta, recipročna (u daljem tekstu BB rec)
5. UP ukrštanja u okviru populacije Sićevačka klisura, direktna (u daljem tekstu SS dir)

6. UP ukrštanja u okviru populacije Sićevačka klisura, recipročna (u daljem tekstu SS rec)
7. MP ukrštanja između populacija, ženke iz Botaničke bašte i mužjaci iz Sićevačke klisure (u daljem tekstu BBS)
8. MP ukrštanja između populacija, ženke iz Sićevačke klisure i mužjaci iz Botaničke bašte (u daljem tekstu SBB)

Tabela 3.1. Shema ukrštanja; N-broj uspešnih ukrštanja

Tip ukrštanja			N	
Unutar-linijska (UL)	B		Bi♀xBi♂	30
	S		Si♀xSi♂	31
Unutar-populaciona (UP)	BB	direktno (BB dir)	Bi♀xBj♂	23
		recipročno (BB rec)	Bj♀x Bi♂	30
	SS	direktno (SS dir)	Si♀xSj♂	26
		recipročno (SS rec)	Sj♀x Si♂	29
Među-populaciona (MP)	BBxSS	direktno (BBS)	Bi♀xSi♂	24
		recipročno (SBB)	Si♀x Bi♂	29

Za ukrštanja su korišćene nevine, tri do pet dana stare, jedinke koje su sakupljane u intervalima od 24 sata i držane razdvojene po polovima. Za svaki tip ukrštanja (UL, UP, MP kako direktna tako i recipročna) korišćeno je po tri ženke i tri mužjaka.

Jedinke su ostavljene da se pare 48 sati i nakon toga su ženke svakodnevno prebacivane na svež standardni supstrat dodatno obogaćen kvascem, da polažu jaja. Iz svakog ukrštanja sakupljano je po 30 položenih jaja dnevno, pri čemu je 15 jaja postavljano na flakone sa standardnim supstratom, drugih 15 na flakone sa 200 µg/mL olovo-acetata (Pb (CH₃COO)₂·3H₂O). Ovaj postupak je ponavljan u tri sukcesivna dana i na taj način su uspostavljene po tri tehničke replike svakog ukrštanja na svakom supstratu. Postavljanjem položenih jaja na standardni supstrat i supstrat sa olovom napravljeno je 16 eksperimentalnih grupa (osam na standardnom supstratu-kontrolna grupa i osam na supstratu sa olovom - tretman).

Koncentracija od 200 µg/mL olovo-acetata je izabrana na osnovu pilot eksperimenta urađenog na S populaciji koji je pokazao LD₂₀ za ovu koncentraciju.

Od početka izleganja, svakodnevno je beležen broj izleglih jedinki, zatim su jedinke odvajane po polovima i zamrzavane na -20°C za dalju morfometrijsku analizu varijabilnosti veličine krila.

3.4. Komponente adaptivne vrednosti

U cilju procenjivanja adaptivne vrednosti jedinki izloženih sinergističkom efektu genomskog (različiti nivoi heterozigotnosti) i sredinskog (prisustvo olova u supstratu) stresa praćeni su preživljavanje od jaja do adulta i brzina razvića od jaja do adulta za svako ukrštanje.

Preživljavanje od jaja do adulta

D. subobscura je holometabolni insekt čiji ciklus razvića obuhvata jaje, larvu, lutku i adulta i u optimalnim uslovima traje oko 20 dana. Preživljavanje predstavlja procentualni odnos izleglih adultnih jedinki u odnosu na broj postavljenih jaja. Za svako ukrštanje izračunata je prosečna vrednost preživljavanja na osnovu podataka prikupljenih iz te tri tehničke replike, a koje je izračunato po formuli

$$V = \frac{n}{N},$$

gde je N broj postavljenih jaja u flakonu, a n broj adulta koji se iz njih izlegao.

Dužina razvića

Dužina razvića predstavlja vreme trajanja ciklusa razvića, od trenutka polaganja jaja do izleganja, izraženo u danima. Od početka izleganja, broj izleženih adulta je beležen u periodima od 24h u svakom flakonu uvek u isto vreme. Izleganje se smatralo završenim kada u flakonu u periodu od 72h nije bilo novih adulta. Za svako ukrštanje izračunata je prosečna vrednost brzine razvića, na osnovu tri flakona u koje su jaja postavljena, pomoću formule

$$DT = \frac{\sum n_d * d}{\sum n_d},$$

gde je n_d broj adulta koji se izlegao d dana nakon sto su jaja postavljena na supstrat.

- *Statistička analiza komponenti adaptivne vrednosti*

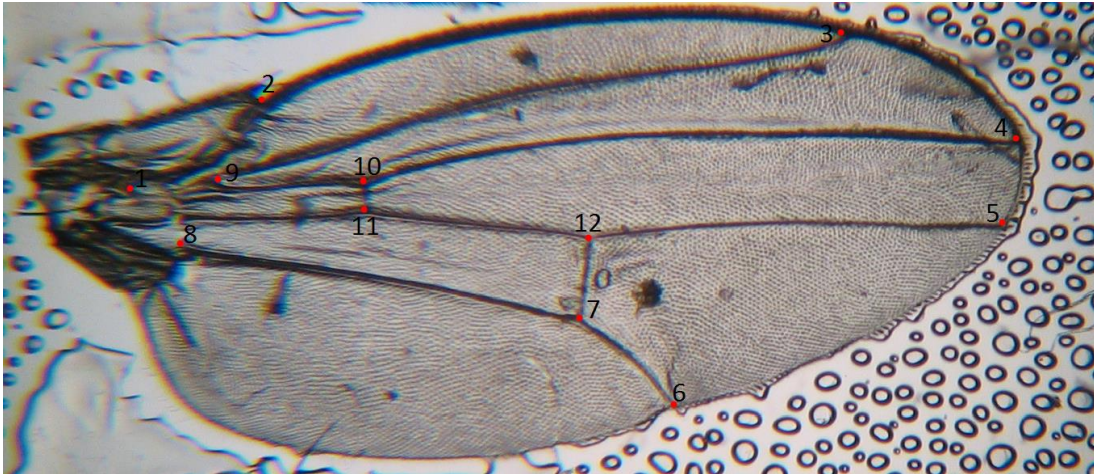
Svi podaci su pre statističke obrade testirani na normalnost raspodele neparametarskim Jarque-Bera testom i peocenjena je homogenost varijanse Bartlett i Levenovim testom, a zatim je određen metod za analizu podataka. Statistička obrada podataka dobijenih u analizi komponenti adaptivne vrednosti je bazirana na srednjim vrednostima replika, tj. tri opservacije za broj uspehlih ukrštanja za svaki tip ukrštanja i tip supstrata. Podaci dobijeni za komponentu adaptivne vrednosti preživljavanje nisu pokazivali normalnu raspodelu te je stoga izvršena *arcsin* transformacija ($p' = \arcsin \sqrt{p}$) podataka. Podaci za dinamiku razvića su imali normalnu raspodelu te njihova transformacija nije bila potrebna. Za obe komponente adaptivne vrednosti je urađena dvofaktorska analiza varijanse (ANOVA) sa fiksiranim faktorima *tretman* i *tip ukrštanja*. U slučaju značajnih rezultata u dvofaktorskoj analizi varijanse primenjen je Fisherov LSD post-hoc test. Statistička analiza podataka dobijenih u ovom istraživanju izvršena je u programima PAST (Hammer *et al.* 2001.) i Statistica for Windows 6.0 (StatSoft Inc., Aurora, CO, USA).

3.5. Veličina krila

Analiza varijabilnosti veličine krila jedinki tri nivoa heterozigotnosti u uslovima sa i bez zagađenja olovom izvršena je metodom geometrijske morfometrije. Geometrijska morfometrija se kao metoda pokazala veoma uspešnom u kvantifikovanju suptilnih fenotipskih varijacija metričkih karaktera što je čini veoma korisnom za širok spektar bioloških istraživanja, uključujući i praćenje uticaja sredinskih faktora. Dvodimenzionalna geometrijska morfometrija je naročito pogodna za analizu ravnih struktura kao što su krila insekata (Klingenberg, 2002).

S obzirom da kod *D. subobscura* postoji jasno izražen polni dimorfizam, za analizu veličine i oblika krila korišćeni su odvojeno ženke i mužjaci svih eksperimentalnih grupa, ukupno oko 4100 jedinki. Desno krilo svake prethodno zaleđene jedinke odvajano je pincetama od ostatka tela i fiksirano na predmetno staklo dvostano-lepljivom trakom i zaštićeno pokrovnom ljušpicom. Sva krila su fotografisana sistemom Cannon digitalne kamere i Leica stereomikroskopa pod uveličanjem od 40x. Geometrijsko morfometrijske analize izvršene su na digitalnim fotografijama krila, rezolucije 96x96 dpi, u različitim programima softverskog paketa Tps koji je dostupan na internet adresi <http://life.bio.sunysb.edu/morph>. Dobijene vrednosti su beležene u pikselima.

Za analizu veličine i oblika krila odabrano je 12 dvodimenzionalnih, jasno definisanih tačaka, *landmarks*. Tačkama je obuhvaćena cela površina krila a nalaze se na mestima preseka vena i susretanja vena i oboda krila (Slika 3.1). Tačke su zabeležene na svakom pojedinačnom krilu u softverskom paketu tpsDig2, uvek istim redosledom i nose oznake od 1 do 12.



Slika 3.1 Fotografija uvećanog desnog krila *D. subobscura* sa fiksiranim rasporedom 12 tačka korišćenih u geometrijsko - morfometrijskoj analizi krila

- *Statistička analiza veličine krila*

Za analizu veličine podaci su grupisani u okviru faktora *tretman*, *tip ukrštanja* i *pol*. Veličina krila je procenjena na osnovu parametra *veličina centroida* (eng. *centroid size*, CS) u programu tps Relw1.44 (Rohlf, 2006).

CS se za svako krilo izračunava kao kvadratni koren sume kvadrata rastojanja između svake tačke i težišta date konfiguracije (Dryden i Mardia, 1998). Normalnost raspodele CS je utvrđena neparametarskim Jarque-Bera testom. Za analizu varijanse veličine krila korišćena je trofaktorska ANOVA sa fiksiranim faktorima *tretman*, *tip ukrštanja* i *pol* kao mogućim izvorima varijabilnosti. Za prikazivanje statistički značajnih razlika u veličini krila između eksperimentalnih grupa korišćen je post-hoc Fisher LSD test.

3.6. Ekspresija proteina toplotnog šoka (Hsp proteina)

Za analizu ekspresije Hsp proteina ukrštanja su izvršena po istoj shemi kao i za analizu komponenti adaptivne vrednosti. Po 30 jaja iz svakog ukrštanja je preneto na standardni supstrat i supstrat sa olovom. Flakoni su držani u optimalnim laboratorijskim uslovima narednih 10-12 dana. Za procenu količine Hsp proteina korišćene su larve trećeg stupnja razvića, neposredno pred ulutkavanje. Larve su mehanički vađene iz supstrata, a zatim zamrzavane na -70°C .

U ovom radu merena je količina ukupnih Hsp70 proteina iz 5 eksperimentalnih grupa (B, S, BB dir, SS dir, BBS) gajenih na standardnom supstratu i istih 5 grupa na supstratu sa olovom. Takođe, utvrđena je količina inducibilnih Hsp70 antitela iz četiri eksperimentalne grupe (B i BB gajenih u kontrolnim uslovima i na supstratu sa olovom). Za određivanje ukupne količine prisutnih Hsp70 proteina kao primarno antitelo korišćeno je monoklonalno HSP70/ Heat Shock Protein 70 Antibody (5A5) u odnosu 1:1000 i sekundarno HRP konjugovano Rabbit anti-Mouse IgG antitelo, u odnosu 1:4000. Za određivanje količine inducibilnih Hsp70 proteina korišćeno je hsp70 specifično monoklonalno antitelo 7FB u odnosu 1:3000 i HRP konjugovano Anti-rat IgG sekundarno antitelo.

Po 10 larvi po eksperimentalnoj grupi je korišćeno za ekstrakciju proteina. Homogenizacija larvi je izvršena na ledu u 1ml rastvora za homogenizaciju koji se sastoji od Sigmafast protease inhibitor tablete rastvorene u 100ml miliQ vode. Homogenizovan uzorak je potom centrifugiran 30 minuta na 14000 obrtaja i temperaturi od 4°C . Supernatant je zatim prebačen u dve tubice od 0,5ml i čuvan na -70°C .

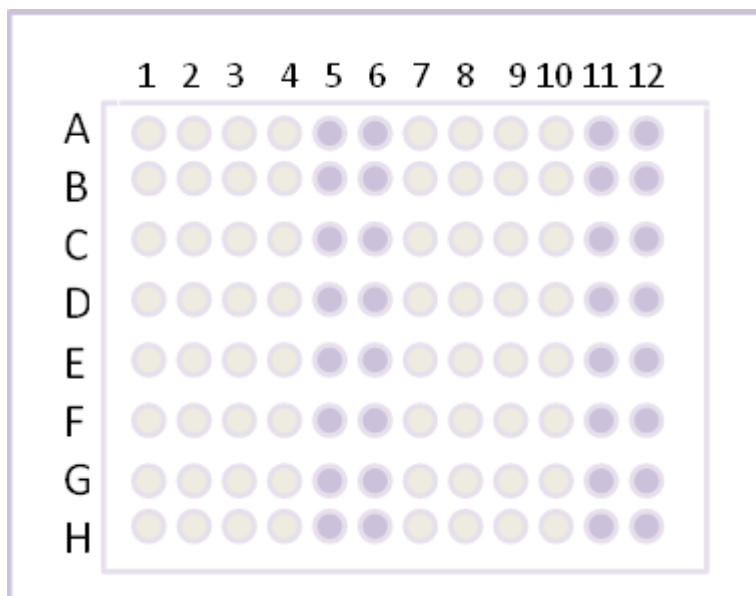
Ukupna količina proteina u supernatantu je određivana pomoću testa bicinoninične kiseline, BCA assay, (Thermo Scientific) po uputstvu proizvođača. Radi što preciznijeg određivanja ukupne koncentracije proteina u supernatantu, korišćeno je pet replika po svakom uzorku. 10 μl supernatanta je sa 200 μl BCA miksa inkubirano na 37°C 30 minuta a zatim je spektar očitana na 562nm. Očitane koncentracije su standardizovane na osnovu bovine serum albumina rastvorenog

u destilovanoj vodi. Za ELISA esej je korišćena koncentracija od 25 µl/ml proteina u uzorku.

ELISA esej je rađen po proceduri opisanoj u Sørensen i sar. (1999). Po 120 µl uzorka rastvorenog u karbonatnom puferu ("coating buffer") je stavljeno u standardnu ELISA ploču sa 96 bunarića i inkubirano preko noći. Nakon inkubacije je dodato 100 µl "bloking buffera" i inkubirano 60 minuta na 37°C. Zatim su ploče oprane 4 puta deterdžentom PBS-Tween pa je dodato 100 µl primarnog antitela u sve bunariće koji nisu određeni da budu "blank" (slika 3.2). Nakon inkubacije od 60 minuta na 37°C ploče su oprane 4 puta deterdžentom PBS-Tween, a zatim je dodato 100 µl sekundarnog antitela u sve bunariće. Nakon inkubacije od 60 minuta na 37°C ploče su oprane 4 puta deterdžentom PBS-Tween a zatim još 3 puta deterdžentom PBS da bi se otklonili ostaci Tween pufera iz bunarića. Nakon toga je dodato 100 µl peroksidaza regensa i ploča je ostavljena da se inkubira na sobnoj temperaturi u mraku do razvoja boje (oko 30 minuta). Reakcija je zaustavljena sa 100 µl 0,5M H₂SO₄ a zatim ploča čitana na spektrofotometarskom čitaču mikroploča (PowerWave XS2 Biotek, Bad Friedrichshall, Germany) i talasnoj dužini od 490 nm.

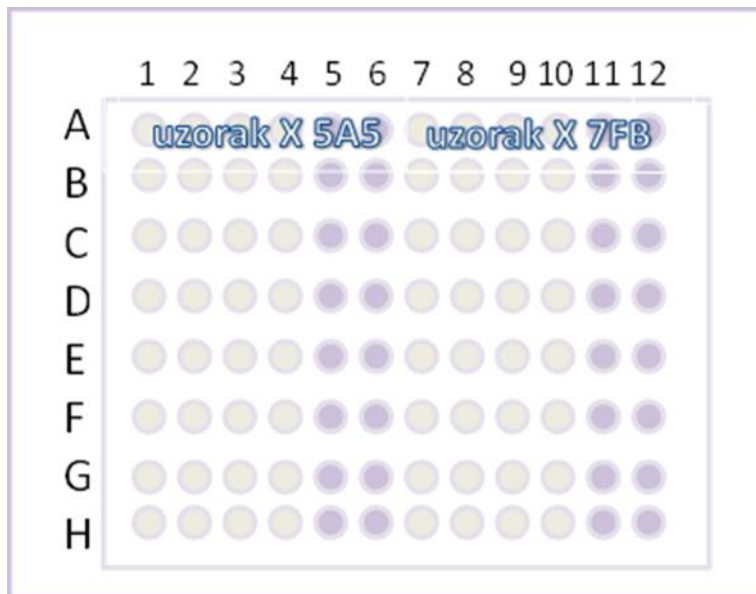
ELISA ploče su dizajnirane tako da se na svakoj nalazi po jedan uzorak iz svake eksperimentalne grupe u šest replika. Četiri replike su korišćene za određivanje koncentracije Hsp proteina a dve su korišćene kao "blank", odnosno bez primarnog antitela da bi bila moguća korekcija u slučaju očitavanja nespecifičnog signala i provera tačnosti tehničkog izvođenja metode. Ovakav dizajn ploče je urađen da bi se svaka ploča mogla normalizovati na osnovu srednje vrednosti svih očitanih koncentracija za sve grupe koje su ispitivane.

Za određivanje koncentracije ukupnih Hsp70 proteina merenih preko 5A5 antitela, uzorci gajeni na kontrolnom supstratu i supstratu sa olovom su nasumično raspoređivani na ploči da bi se izbegao efekat pozicije na očitavanje talasne dužine (Slika 3.2).



Slika 3.2 Dizajn ELISA ploče za određivanje ekspresije Hsp70 proteina preko 5A5 antiela (Svetli krugovi predstavljaju tehničke replike svakog uzorka, a ljubičastom bojom su obeleženi bunarići koji su dizajnirani da budu "blank", odnosno bez primarnog antitela)

Kod uporedne analize ekspresije inducibilnih i konstitutivnih Hsp70 proteina, svaki uzorak je paralelno analiziran na koncentraciju Hsp70 proteina merenu preko 5A5 antitela (ukupni Hsp proteini) i 7FB (inducibilni Hsp proteini) antitela (Slika 3.3). I u ovom slučaju uzorci gajeni na kontrolnom supstratu i supstratu sa olovom su nasumično raspoređivani da bi se izbegao efekat pozicije na očitavanje koncentracije Hsp proteina.



Slika 3.3 Dizajn ELISA ploče za određivanje ekspresije inducibilnih i konstitutivnih Hsp70 proteina merenih preko 5A5 i 7FB antitela (Svetli krugovi predstavljaju tehničke replike uzorka a ljubičastom bojom su obeleženi bunarići koji su dizajnirani da budu "blank", odnosno bez primarnog antitela)

- *Statistička analiza ekspresije Hsp proteina*

Pre statističke obrade podataka očitane koncentracije Hsp proteina su standardizovane na osnovu ploče. Obzirom da je svaka ELISA ploča sadržala sve grupe uzorka, moguće je standardizovati očitane koncentracije na osnovu srednje vrednosti izmerenih koncentracija Hsp proteina svih ispitivanih grupa, da bi se izbegli eventualni efekti različitih očitavanja izazvanih promenama u sredini. Tako svaka vrednost koja je uneta u statističku analizu predstavlja odnos stvarne izmerene ekspresije Hsp proteina i srednje vrednosti svih ispitivanih grupa za svaku ploču. S obzirom da su za uporedno određivanje inducibilnih i konstitutivnih Hsp proteina korišćena dva antitela očitane koncentracije su standardizovane po antitelu, odnosno određena je srednja vrednost svih koncentracija svih ispitivanih grupa na za jedno antitelo i na osnovu toga je standardizovana vrednost svih očitanih koncentracija. Isti postupak je primenjen i za standardizovanje dobijenih vrednosti za drugo antitelo.

Za analizu varijanse ekspresije ukupne količine Hsp proteina svih ispitivanih grupa merene preko 5A5 antitela korišćena je dvofaktorska ANOVA sa fiksiranim faktorima *tretman* i *tip ukrštanja* kao mogućim izvorima varijabilnosti. U slučaju značajnih rezultata u dvofaktorskoj analizi varijanse primenjen je Fisherov LSD post-hoc test.

Za analizu varijanse uporedne ekspresije inducibilnih i ukupnih Hsp proteina svih ispitivanih grupa korišćena je trofaktorska ANOVA sa fiksiranim faktorima *tretman*, *tip ukrštanja* i *antitelo* kao mogućim izvorima varijabilnosti. U slučaju značajnih rezultata u trofaktorskoj analizi varijanse primenjen je Fisherov LSD post-hoc test. Statistička analiza podataka dobijenih u ovom delu istraživanju izvršena je u programu Statistica for Windows 6.0 (StatSoft Inc., Aurora, CO, USA).

4. REZULTATI

4.1. Analiza koncentracije teških metala u zemljištu

Rezultati analize prisustva teških metala u zemljištu uzorkovanom u Botaničkoj bašti pokazuju da je zemljište pod velikim antropogenim uticajem s obzirom da je lokalitet u centralnog gradskom jezgru. Struktura zemljišta je laporoviti peščar i glina čija je prirodna karakteristika nešto povećana koncentracija nikla, dok je uzrok povećane koncentracija olova u najvećoj meri emisija iz antropogenih izvora. Analizom uzorkovanog zemljišta iz Botaničke bašte je utvrđeno prisustvo cinka, kadmijuma, olova i žive. Koncentracija olova u zemljištu Botaničke bašte, iako nešto viša od proseka za Srbiju, niža je od maksimalno dozvoljene koncentracije koja iznosi 100 mg/kg (Službeni Glasnik RS 23/1994).

Krečnjačko zemljište Sićevačke klisure odlikuje se relativno niskim koncentracijama teških metala a detektovano je prisustvo cinka, kadmijuma, olova i žive (Tabela 4.1).

Analizom koncentracije ovih teških metala na oba lokaliteta može se videti da su koncentracije cinka i olova višestruko više u zemljištu uzorkovanom u Botaničkoj bašti u poređenju sa zemljištem uzorkovanim u Sićevačkoj klisuri (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Koncentracije teških metala (izraženi kao suva masa) u zemljištu na lokalitetima Botanička bašta i Sićevačka klisura

	Botanička bašta	Sićevačka klisura
Sadržaj vlage (%)	9,57	12,63
Cink (mg/kg)	96,5	5,35
Kadmijum (mg/kg)	0,33	0,23
Olovo (mg/kg)	68,5	7,41
Živa (mg/kg)	<0,22	<0,22

4.2. Analiza komponenti adaptivne vrednosti

4.2.1. Preživljavanje od jaja do adulta

Pregled deskriptivne statistike za komponentu adaptivne vrednosti preživljavanje od jaja do adulta kod svih eksperimentalnih grupa dat je u Tabeli 4.2. Srednje vrednosti preživljavanja se kreću u opsegu od 66%-84% i može se uočiti da je preživljavanje najmanje u S i B grupama gajenim na olovu, a najveće u SBB i BBS grupama gajenim na oba tipa supstrata.

Tabela 4.2. Deskriptivna statistika za preživljavanje od jaja do adulta za sve eksperimentalne grupe (kontrolu i tretman)

Tip ukrštanja		kontrola				olovo			
		$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.	CV(%)	N	$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.	CV(%)	N
UL	B	0,66 ± 0,04	0,20	30,70	30	0,64 ± 0,04	0,21	33,35	30
	S	0,66 ± 0,03	0,15	28,30	31	0,64 ± 0,03	0,19	29,02	31
UP	BB dir	0,82 ± 0,02	0,09	11,32	23	0,81 ± 0,02	0,08	9,98	23
	BB rec	0,78 ± 0,03	0,16	20,39	30	0,79 ± 0,04	0,20	25,06	30
	SS dir	0,73 ± 0,04	0,23	31,00	26	0,76 ± 0,04	0,22	28,31	26
	SS rec	0,75 ± 0,04	0,20	27,14	29	0,74 ± 0,04	0,21	27,80	29
MP	BBS	0,79 ± 0,03	0,16	20,54	24	0,84 ± 0,02	0,07	24,53	21
	SBB	0,84 ± 0,02	0,08	23,54	27	0,84 ± 0,02	0,09	23,16	27

\bar{X} - srednja vrednost; S.E. - standardna greška; S.D. – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije; N - broj uzoraka

Fligner-Kileen test poređenja koeficijenta varijacije nije pokazao značajne razlike u direktnim poređenjima eksperimentalnih grupa gajenih na supstratu sa olovom i onih u kontrolnim uslovima. Takođe, nisu utvrđene ni razlike u poređenjima IL, UP i MP grupa gajenih na istom tipu supstrata osim u slučajevima poređenja BB dir sa B i BBS u kontrolnim uslovima i BB dir i B na supstratu sa olovom.

Za ispitivanje razlika u variranju ove osobine u zavisnosti od tretmana (standardni supstrat i supstrat sa olovom) i tipa ukrštanja (UL, UP, MP) korišćena je dvofaktorska ANOVA. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 4.3.

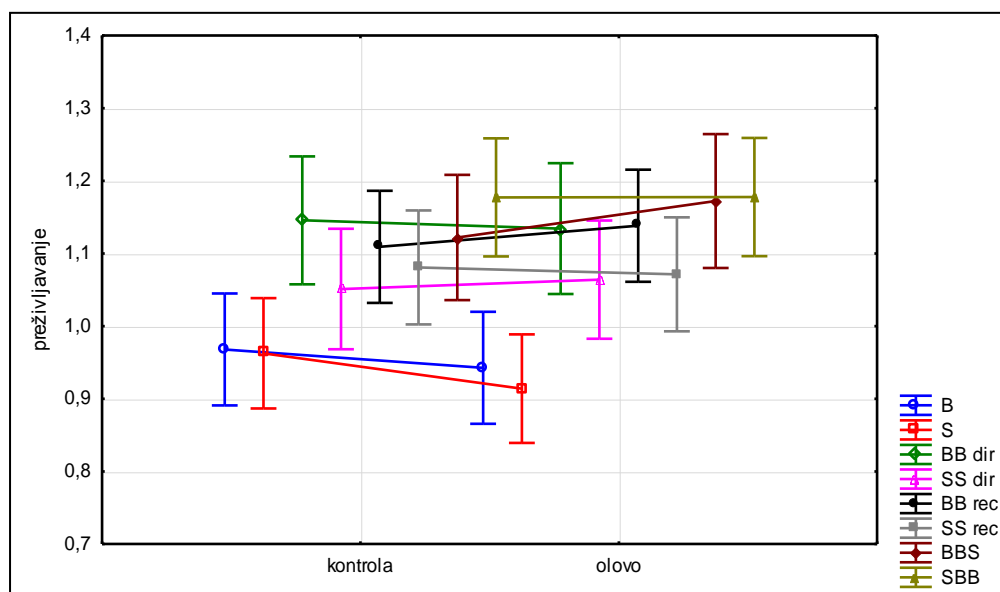
Tabela 4.3. Dvofaktorska ANOVA za preživljavanje od jaja do adulta

Izvor varijabilnosti	df	SS	MS	F	p
tretman	1	0,005	0,005	0,124	0,725
tip ukrštanja	7	2,956	0,422	9,846	0,000***
tretman*tip ukrštanja	7	0,09	0,013	0,299	0,954
greška	421	18,055	0,043		

df- stepeni slobode; SS- suma kvadrata; MS – srednja vrednost kvadrata; F – vrednost F testa; p – nivo značajnosti

Dobijeni rezultati pokazuju značajan efekat tipa ukrštanja na preživljavanje ($F=9,846$, $p<0,001$), dok gajenje mušica na različitim tipovima supstrata nema statistički značajan efekat na ovu komponentu adaptivne vrednosti. Takođe, ne postoji značajan efekat interakcije dva faktora (tretman i tip ukrštanja) na preživljavanje ispitivanih grupa.

Na Slici 4.1 prikazani su srednje vrednosti *arc sin* transformisanih podataka za preživljavanja svih eksperimentalnih grupa. Može se uočiti da je preživljavanje UL najmanje u poređenju sa ostalim eksperimentalnim grupama kako na kontroli tako i na supstratu sa olovom. Fisherova LSD Post-hoc analiza pokazala je značajno manje preživljavanje UL (kako B i S) gajene u kontrolnim uslovima u poređenju sa svim ostalim grupama gajenim u istim uslovima sa izuzetkom SS dir (post hoc Fisher LSD u svim poređenjima $p<0,05$). Takođe, UL gajene na supstratu sa olovom pokazuju statistički značajno manje preživljavanje u poređenju sa svim ostalim grupama gajenim na istom supstratu (post hoc Fisher LSD u svim poređenjima $p<0,01$). Ne postoji statistički značajna razlika u preživljavanju UL gajenih na kontrolnom i supstratu sa olovom.



Slika 4.1. *Arcsin* transformisani podaci preživljavanja svih eksperimentalnih grupa na standardnom supstratu i supstratu sa olovom.

Analiza nije pokazala statistički značajne razlike u preživljavanju UP grupa, ni u poređenjima na istom tipu supstrata ni u poređenjima na različitim tipovima supstrata. Takođe, nema statistički značajnih razlika između direktnih i recipročnih ukrštanja.

Nisu utvrđene statistički značajne razlike u preživljavanju MP na različitim tipovima supstrata.

Interesantno je napomenuti da je u svim UP i MP poređenjima na istom tipu supstrata, statistički značajna razlika u preživljavanju pronađena samo u slučaju SS dir i SSB u kontrolnim uslovima.

4.2.2. Dužina razvića

Deskriptivna statistika za dužinu razvića svih eksperimentalnih grupa prikazana je u Tabeli 4.4. Najduže vreme razvića imale su jединke B grupe gajene na supstratu sa olovom, a najkraće BB rec i SBB gajene u kontrolnim uslovima. Iz tabele se može uočiti generalan trend produžetka dužine razvića u svim eksperimentalnim grupama koje su gajene na supstratu sa olovom.

Tabela 4.4. Deskriptivna statistika za dužinu razvića (jaje-adult) za sve eksperimentalne grupe

Tip ukrštanja		kontrola				olovo			
		$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.	CV(%)	N	$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.	CV(%)	N
UL	B	21.61 ± 0.19	1,05	4,88	30	25.14 ± 0.30	1,65	6,56	30
	S	21.49 ± 0.16	0,91	4,24	31	24.66 ± 0.18	1,00	4,05	30
UP	BB dir	21.21 ± 0.21	0,92	4,32	23	24.36 ± 0.19	0,90	3,70	23
	BB rec	20.95 ± 0.15	0,80	3,84	30	24.17 ± 0.22	1,21	5,00	29
	SS dir	21.10 ± 0.19	0,95	4,52	26	24.55 ± 0.19	1,21	4,04	26
	SS rec	21.25 ± 0.15	0,84	3,93	29	24.12 ± 0.18	0,97	4,03	29
MP	BBS	21.32 ± 0.15	0,72	3,37	24	24.14 ± 0.20	1,00	4,14	21
	SBB	20.96 ± 0.17	0,92	4,41	27	24.10 ± 0.17	0,91	3,76	27

\bar{X} - srednja vrednost; S.E. - standardna greška; S.D. – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije; N – broj uzoraka

Fligner-Kileen test poređenja koeficijenta varijacije nije pokazao značajne razlike u direktnim poređenjima eksperimentalnih grupa gajenih na supstratu sa olovom i onih u kontrolnim uslovima. Koeficijent varijacije je takođe uniforman kod svih eksperimentalnih grupa gajenih u kontrolnim uslovima. Međutim, značajno veći koeficijent varijacije je uočen kod B grupe u poređenju sa svim ostalim eksperimentalnim grupama gajenim na supstratu sa olovom osim BB rec dok takve razlike nisu uočene u ostalim poređenjima.

Za ispitivanje razlika u variranju ove osobine u zavisnosti od tretmana (standardan supstrat vs. supstrat sa olovom) i tipa ukrštanja (UL, UP, MP) korišćena je dvofaktorska ANOVA. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 4.5.

Tabela 4.5. Dvofaktorska ANOVA za dužinu razvića

Izvor varijabilnosti	df	SS	MS	F	p
tretman	1	1099	1099	1066	0,000***
tip ukrštanja	7	33	5	5	0,000***
tretman*tip ukrštanja	7	6	1	1	0,575
greška	427	439,911	1,03		

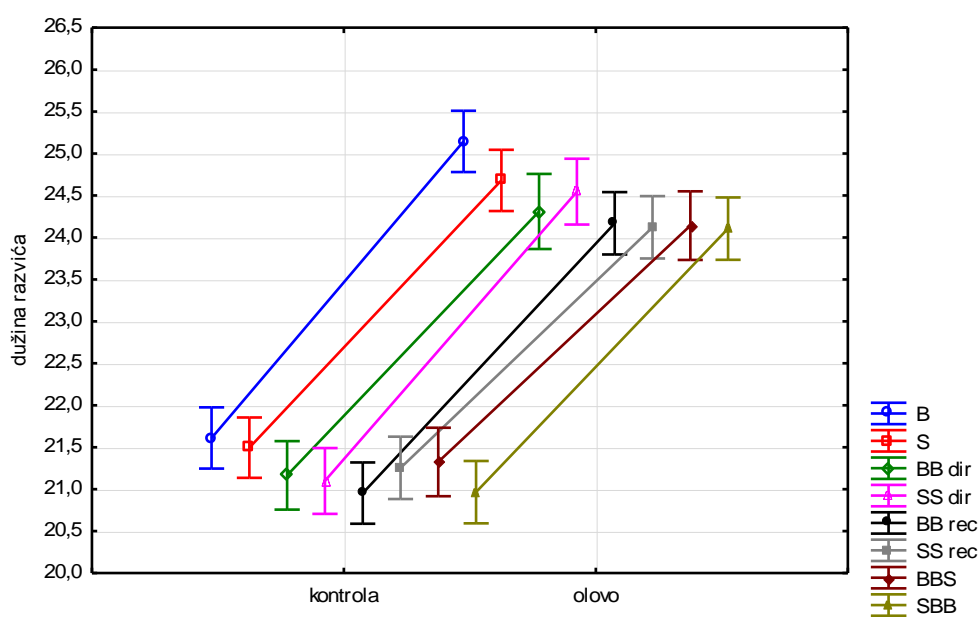
df- stepeni slobode; SS- suma kvadrata; MS – srednja vrednost kvadrata; F – vrednost F testa; p – nivo značajnosti

Dobijeni rezultati pokazuju da prisustvo olova u supstratu značajno utiče na dužinu razvića ispitivanih jedinki ($F=1066$, $p<0,001$). Takođe, tip ukrštanja ima značajan efekat na ovu komponentu adaptivne vrednosti ($F=5$, $p<0,001$). Međutim,

nije uočen značajan efekat interakcije ova dva faktora na posmatranu komponentu adaptivne vrednosti (Tabela 4.5.)

Na Slici 4.2. prikazane su prosečne dužine razvića svih ispitivanih grupa na standardnom supstratu i supstratu sa olovom. Može se uočiti da prisustvo olova u supstratu značajno produžava dužinu razvića kako u celini tako i u svim međusobnim poređenjima istog tipa ukrštanja na različitim supstratima (Post hoc Fisher LSD $p < 0,001$).

Obe UL grupe pokazuju značajno duže razviće od BB rec i SBB u kontrolnim uslovima (Post hoc Fisher LSD $p < 0,05$ u svim poređenjima). U istim uslovima nije utvrđena značajna razlika u dužini razvića između UP i MP grupa kao ni između direktnih i recipročnih ukrštanja.



Slika 4.2. Dužina razvića (izražena u danima) svih eksperimentalnih grupa na standardnom supstratu i supstratu sa olovom.

Zanimljivo je istaći razliku u odgovoru ove komponente adaptivne vrednosti između UL grupa u uslovima prisustva olova u supstratu. Naime, B ima značajno duže razviće u poređenju sa svim UP i UM grupama (Post hoc Fisher LSD $p < 0,05$ u svim poređenjima) dok se značajno produžavanje dužine razvića S uočava samo u poređenju sa SS rec i SBB (Post hoc Fisher LSD $p < 0,05$ u oba poređenja). Nije

utvrđena značajna razlika u dužini razvića između UP i MP grupa kao ni između direktnih i recipročnih ukrštanja u uslovima prisustva olova u supstratu.

4.3. Veličina krila

Prikaz deskriptivne statistike za veličinu krila svih eksperimentalnih grupa dat je u Tabeli 4.6. Iz prikazanih rezultata može se jasno uočiti polni dimorfizam u veličini krila (jer su ženke krupnije u odnosu na mužjake) kao i trend smanjenja veličine krila kod jedinki koje su bile izložene delovanju olova. Izuzetak od ovog trenda predstavljaju jedinke iz BB dir ukrštanja kod kojih se veličina krila nije promenila u uslovima zagađenja olovom u odnosu na kontrolne uslove.

Tabela 4.6. Deskriptivna statistika za veličinu krila (izraženu u pikselima) za sve eksperimentalne grupe

Tip ukrštanja	Pol	kontrola				olovo				
		$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.	CV(%)	N	$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.	CV(%)	N	
UL	B	♀	1248,02±3,89	42,44	3,40	118	1230,07±3,85	42,13	3,43	120
		♂	1136,82±3,38	39,89	3,51	139	1109,42±3,00	32,07	2,89	115
	S	♀	1254,84±4,19	49,56	3,95	140	1212,94±4,52	52,11	4,30	133
		♂	1134,51±3,25	39,7	3,50	150	1096,59±4,59	49,49	4,51	117
UP	BBdir	♀	1263,84±3,06	32,85	2,60	116	1263,86±3,03	35,24	2,79	135
		♂	1139,34±3,20	36,25	3,18	128	1141,54±2,70	31,24	2,74	134
	BBrec	♀	1277,24±3,10	35,21	2,76	130	1243,73±3,06	36,05	2,90	139
		♂	1149,89±2,96	35,58	3,09	145	1116,41±2,70	29,74	2,66	121
	S dir	♀	1282,64±2,39	31,36	2,45	176	1265,11±4,38	40,39	3,19	86
		♂	1147,78±2,59	31,04	2,7	144	1128,24±2,76	29,98	2,66	120
	S rec	♀	1285,44±2,78	31,69	2,47	132	1250,71±3,80	39,28	3,14	108
		♂	1157,54±3,23	36,38	3,14	127	1119,03±3,42	33,3	2,98	96
MP	BBS	♀	1283,04±2,82	32,82	2,56	136	1272,52±3,10	34,13	2,68	121
		♂	1163,50±2,41	29,18	2,51	147	1149,66±3,26	33,39	2,90	108
	SBB	♀	1273,25±2,80	32,81	2,58	137	1247,96±3,36	38,72	3,10	133
		♂	1150,65±2,34	28,77	2,50	151	1125,74±2,90	33,15	2,94	133

\bar{X} - srednja vrednost; S.E. - standardna greška; S.D. – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije, N-broj jedinki

Za ispitivanje razlika u variranju ove osobine u zavisnosti od tretmana (standardni supstrat vs. supstrat sa olovom), tipa ukrštanja (UL, UP, MP) i pola (ženke i mužjaci) korišćena je trofaktorska ANOVA. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 4.7.

Dobijeni rezultati pokazuju da svi ispitivani faktori (prisustvo olova u podlozi, tip ukrštanja i pol) imaju značajan efekat na veličinu krila ispitivanih jedinki ($F=416$, $p<0,001$; $F=71$, $p<0,001$; $F=11700$, $p<0,001$, respektivno). Takođe, uočeni su i značajni efekti interakcije tretmana i tipa ukrštanja ($F=18$, $p<0,001$) kao i tipa

ukrštanja i pola isptivanih jedinki ($F=4$, $p<0,001$). Interakcije tretmana i pola kao i kombinovana interakcija sva tri faktora nisu pokazali značajan efekat (Tabela 4.6).

Tabela 4.7. Trofaktorska ANOVA za veličinu krila

Izvor varijabilnosti	df	SS	MS	F	p
tretman	1	5,54E+05	5,54E+05	416	0,000***
tip ukrštanja	7	6,64E+05	9,49E+04	71	0,000***
pol	1	1,56E+07	1,56E+07	11700	0,000***
tretman*tip ukrštanja	7	1,65E+05	2,36E+04	18	0,000***
tretman*pol	1	567	567	0	0,514
tip ukrštanja*pol	7	3,59E+04	5131	4	0,000***
tretman*tip ukrštanja*pol	7	3816	545	0	0,897

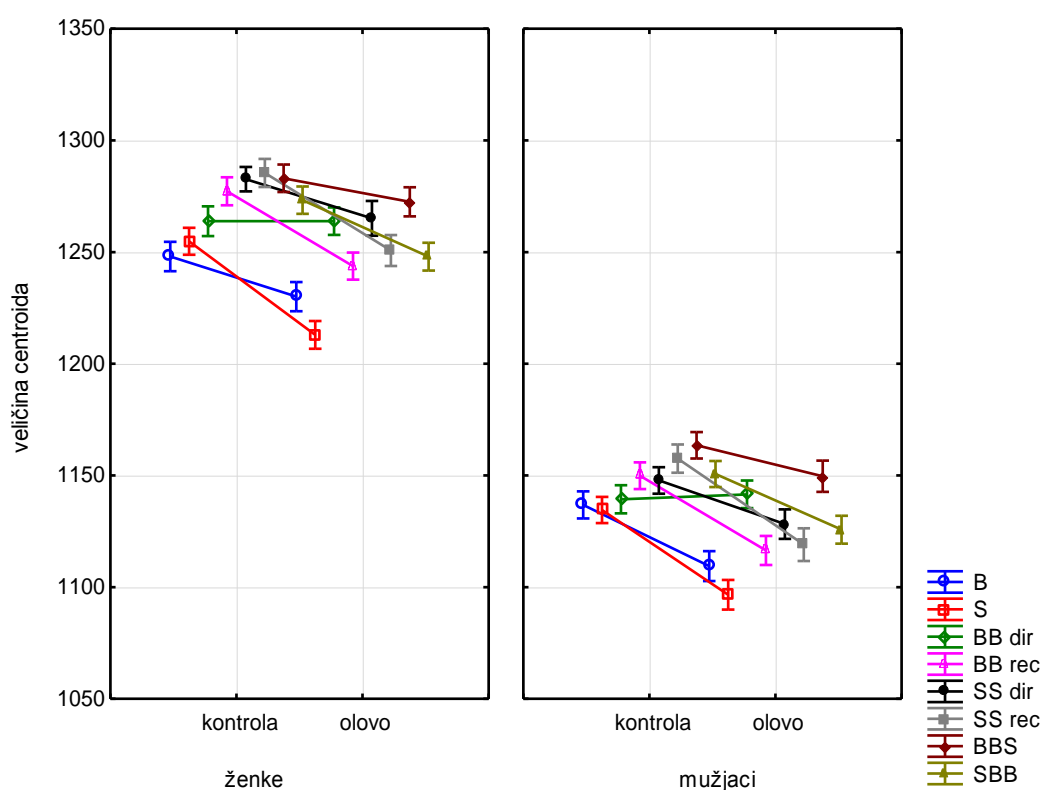
df- stepeni slobode; SS- suma kvadrata; MS – srednja vrednost kvadrata; F – vrednost F testa; p – nivo značajnosti

Prisustvo olova u podlozi značajano utiče na smanjenje veličine krila a najveći efekat je izražen kod UL grupa. I ženke i mužjaci iz ove grupe imaju značajno manja krila u uslovima zagađenja olovom u poređenju sa standardnim uslovima (Post hoc Fisher LSD $p<0,05$ u svim poređenjima). Smanjenje krila UP i MP grupa na supstratu sa olovom je evidentirano u većini direktnih poređenja između ispitivanih grupa (Post hoc Fisher LSD $p<0,05$ u svim poređenjima). Izuzetak od primećenog obrasca su kod ženskog pola BB dir, SS dir i BBS a kod muškog BB dir i BBS, gde nije utvrđena razlika u veličini krila između jedinki gajenih na supstratu sa olovom i u kontrolnim uslovima.

Jedinke iz UL grupa imaju značajno manja krila u poređenju sa UP i MP jedinkama gajenim u istim uslovima ali je primećen nešto drugačiji obrazac između polova. U kontrolnim uslovima UL ženke imaju značajno manja krila u poređenju sa svim UP i MP grupama (Post hoc Fisher LSD $p<0,01$ u svim poređenjima) sa izuzetkom BB dir. Isti obrazac je primećen i na supstratu sa olovom (Post hoc Fisher LSD $p<0,01$ u svim poređenjima), osim u poređenju B i BB rec gde nije utvrđena statistički značajna razlika. Mužjaci iz UL grupa imaju generalno manja krila od mužijaka UP i MP grupa gajenih u istim uslovima. U kontrolnim uslovima značajno smanjenje veličine krila se detektuje samo u poređenjima između B i SS rec, B i BBS; S i SS rec, S i BBS, S i SBB (Post hoc Fisher LSD $p<0,05$ u svim poređenjima). Međutim, u uslovima zagađenja olovom, S mužjaci imaju značajno manja krila u

poređenju sa svim UP i MP grupama a B mužjaci imaju značajno manja krila u poređenju sa BB dir, SS rec i BBS (Post hoc Fisher LSD $p < 0,05$ u svim poređenjima) (Slika 4.3).

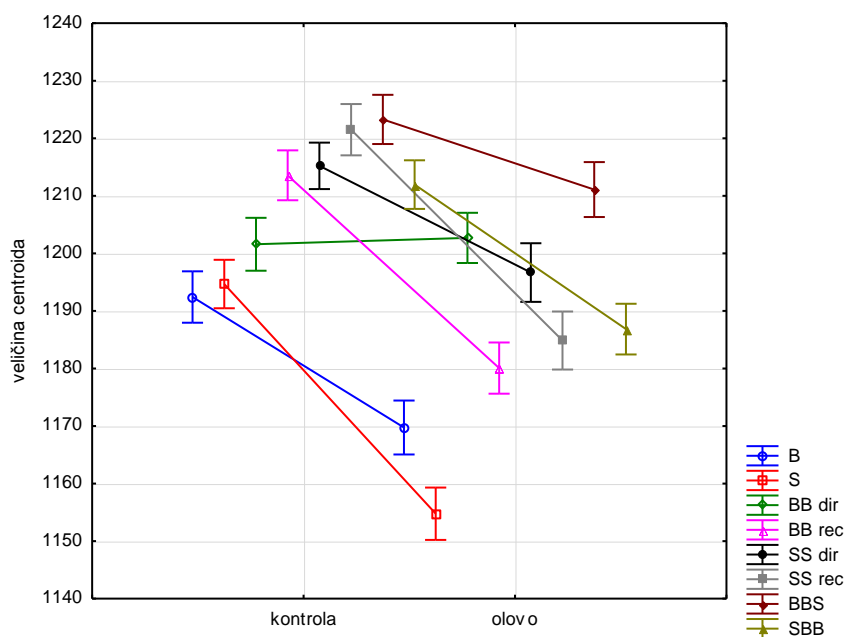
Rezultati pokazuju da nema značajne razlike između većine krila direktnih i recipročnih ukrštanja na istom tipu supstrata. Zanimljiv izuzetak od utvrđenog obrasca u oba pola predstavljaju poređenja na supstratu sa olovom gde su jedinke u BB dir i BBS značajno veće od jedinki iz odgovarajućih recipročnih ukrštanja (Post hoc Fisher LSD $p < 0,01$ u svim poređenjima).



Slika 4.3. Veličina centroida (izražena u pikselima) svih eksperimentalnih grupa podeljenih po polu na standardnom supstratu i supstratu sa olovom

Na osnovu dobijenih rezultata može se reći da ne postoje značajne razlike između UP i MP grupa gajenih u istim uslovima. Međutim, i ovde se javlja izuzetak kod BB dir grupe. Ženke ove grupe gajene u kontrolnim uslovima imaju značajno manja krila u poređenju sa svim ostalim ženkama iz UP i MP grupa osim SBB gajenim u istim uslovima (Post hoc Fisher LSD $p < 0,01$ u svim poređenjima), dok takva razlika nije uočena na supstratu sa olovom. Mužjaci ove grupe imaju

značajno manja krila od SS rec i BBS u kontrolnim uslovima (Post hoc Fisher LSD $p < 0,05$ u oba poređenja) i SS rec na supstratu sa olovom (Post hoc Fisher LSD $p = 0,002$). Takođe, BBS mužjaci gajeni na supstratu sa olovom imaju značajno veća krila u poređenju sa svim ostalim UP i UM mužjacima gajenim u istim uslovima, osim BB dir (Post hoc Fisher LSD $p < 0,001$ u svim poređenjima).



Slika 4.4. Interakcija tip ukrštanja*tretman

Statistički značajna interakcija između tipa ukrštanja i tretmana u kojoj su oba pola posmatrana zajedno pokazuje interesantan trend. Naime, na Slici 4.4. se vidi da je efekat olova generalno veći kod jedinki koje vode poreklo iz Sićevačke klisure. Kod UP smanjenje veličine krila je daleko izraženije kod S jedinki pri čemu su UP jedinke iz Sićevačke klisure gajene na olovu značajno manje od UP jedinki iz Botaničke bašte (Post hoc Fisher LSD $p = 0,0002$). U okviru UP, BB dir koja ima najmanju prosečnu veličinu krila u kontrolnim uslovima ne pokazuje nikakvu promenu u veličini krila u uslovima prisustva olova u supstratu, dok sve ostale UP grupe pokazuju značajno smanjenje veličine krila sa nešto većim efektom kod SS grupa. U okviru MP, jedinke čije su majke poreklom iz Sićevačke klisure pokazuju smanjenje veličine krila koje je statistički značajno (Post hoc Fisher LSD $p < 0,001$),

dok jedinke čije su majke poreklom iz Botaničke bašte nemaju značajno manja krila u uslovima prisustva olova u supstratu (Post hoc Fisher LSD $p=0,09$).

4.4. Ekspresija Hsp proteina

4.4.1. Ekspresija ukupnih Hsp proteina

Prikaz deskriptivne statistike za ekspresiju ukupnih Hsp proteina svih eksperimentalnih grupa dat je u Tabeli 4.8. Iz rezultata se može uočiti da je najniža ekspresija zabeležena kod UL ukrštanja gajenih na supstratu sa olovom a najveća kod MP ukrštanja gajenih na supstratu sa olovom.

Tabela 4.8. Deskriptivna statistika za ekspresiju ukupnih Hsp proteina za sve eksperimentalne grupe

Tip ukrštanja		kontrola				olovo			
		$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.	CV	N	$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.	CV	N
UL	B	1,45 ± 0,09	0,35	24,37	15	1,18 ± 0,06	0,24	20,35	15
	S	1,48 ± 0,07	0,27	17,92	15	1,21 ± 0,06	0,24	19,36	15
UP	BB	1,35 ± 0,09	0,32	23,46	13	1,35 ± 0,09	0,35	25,94	15
	SS	1,47 ± 0,09	0,34	22,84	15	1,59 ± 0,11	0,43	28,29	15
MP	BBS	1,57 ± 0,08	0,30	19,02	15	1,62 ± 0,08	0,30	18,56	15

\bar{X} - srednja vrednost; S.E. - standardna greška; S.D. – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije; N – broj uzoraka

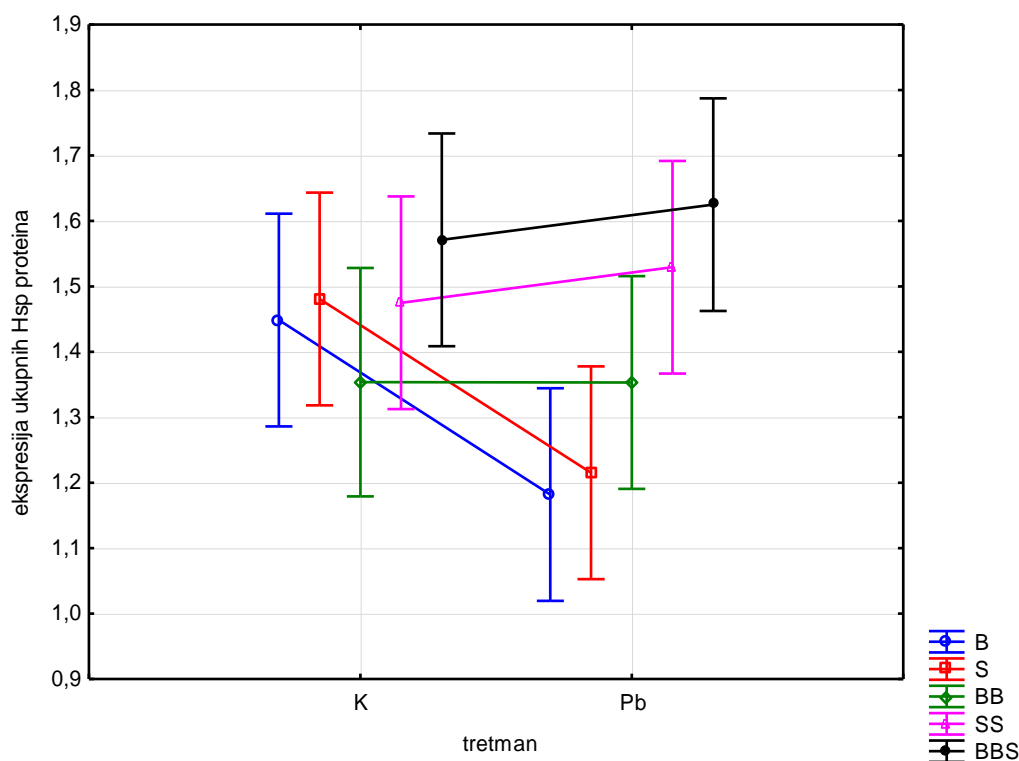
Za ispitivanje razlika u variranju ekspresije Hsp u zavisnosti od tretmana (standardni supstrat vs. supstrat sa olovom) i tipa ukrštanja (UL, UP, MP) korišćena je dvofaktorska ANOVA. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 4.9.

Tabela 4.9. Dvofaktorska ANOVA za ekspresiju ukupnih Hsp proteina

Izvor varijabilnosti	df	SS	MS	F	p
tretman	1	0,266	0,266	2,63	0,107
tip ukrštanja	4	1,7594	0,44	4,34	0,002*
tretman*tip ukrštanja	4	0,831	0,208	2,051	0,091

df- stepeni slobode; SS- suma kvadrata; MS – srednja vrednost kvadrata; F – vrednost F testa; p – nivo značajnosti

Analiza pokazuje da tip ukrštanja (UL, UP, MP) ima statistički značajan efekat na ekspresiju ukupnih Hsp proteina ($F=4,34$, $p=0,002$). Međutim, prisustvo olova u podlozi kao i interakcija između dva posmatrana faktora nemaju značajni efekat na ekspresiju ukupnih Hsp proteina.



Slika 4.6. Ekspresija ukupnih Hsp proteina za sve analizirane eksperimentalne grupe

Zanimljivo je istaći postojanje različitog trenda ekspresije Hsp proteina između UL i UP i MP grupa. Naime, kod UL grupa gajenih na olovu postoji statistički značajno smanjenje ekspresije Hsp proteina u odnosu na jedinke koje su gajene u kontrolnim uslovima (post hoc Fisher LSD u svim poređenjima $p < 0,05$). Kod SS i BBS grupa gajenih na supstratu sa olovom došlo je do povećanja ekspresije Hsp proteina u poređenju sa kontrolnim uslovima, ali ovo povećanje nije statistički značajno. Kod BB grupe nema razlike u nivou ekspresije Hsp proteina na različitim tipovima supstrata.

U poređenjima između eksperimentalnih grupa gajenih na olovu, utvrđeno je statistički značajno manja ekspresija Hsp proteina kod UL grupa u poređenjima sa SS i BBS grupama (post hoc Fisher LSD u svim poređenjima $p < 0,01$). Takođe, postoji statistički značajna razlika između BB i BBS grupa gajenih na olovu, pri čemu je utvrđeno da je ekspresija u BB grupi statistički značajno niža (post hoc Fisher LSD $p < 0,05$).

Nije utvrđena statistički značajna razlika u poređenjima ekspresije Hsp proteina između eksperimentalnih grupa gajenih u kontrolnim uslovima.

4.4.2. Uporedna ekspresija ukupnih i inducibilnih Hsp proteina

Prikaz deskriptivne statistike za uporednu ekspresiju ukupnih i inducibilnih Hsp proteina za dve ispitivane eksperimentalne grupe prikazane su u Tabeli 4.10. Iz tabele se može uočiti da je obrazac ekspresije ukupnih Hsp proteina u BB i B grupama isti kao kod već prikazanih rezultata u Tabeli 4.8. Naime, B jedinke gajene na supstratu sa olovom imaju nižu ekspresiju ukupnih Hsp proteina u poređenju sa jedinkama gajenim na kontrolnim uslovima, dok BB jedinke gajene na supstratu sa olovom imaju nešto veću ekspresiju ukupnih Hsp proteina u poređenju sa jedinkama gajenim na standardnom supstratu. Zanimljivo je istaći obrnut obrazac ekspresije inducibilnih Hsp proteina između ove dve eksperimentalne grupe. Naime, kod B grupe nema razlike u ekspresiji inducibilnih Hsp proteina na različitim tipovima supstrata dok je kod BB grupe ekspresija ove grupe proteina veća na supstratu sa olovom nego u kontrolnoj grupi.

Tabela 4.10. Deskriptivna statistika za uporednu ekspresiju ukupnih i inducibilnih Hsp proteina za dve ispitivane eksperimentalne grupe

		kontrola		olovo	
		$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.	$\bar{X} \pm S.E.$	S.D.
ukupni Hsp	B	1,55 ± 0,16	0,46	1,20 ± 0,10	0,27
	BB	1,35 ± 0,12	0,35	1,43 ± 0,11	0,30
inducibilni Hsp	B	1,38 ± 0,05	0,13	1,38 ± 0,12	0,35
	BB	1,30 ± 0,14	0,40	1,65 ± 0,13	0,37

\bar{X} - srednja vrednost; S.E. - standardna greška; S.D. – standardna devijacija

Za ispitivanje razlika u variranju ekspresije ukupnih i inducibilnih Hsp proteina u zavisnosti od uslova gajenja (standardan supstrat i supstrat sa olovom), tipa ukrštanja (B i BB) i tipa proteina čija je koncentracija merena (ukupni i inducibilni, u tabeli predstavljeni tipom antitela koje je korišćeno) korišćena je trofaktorska ANOVA. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 4.11.

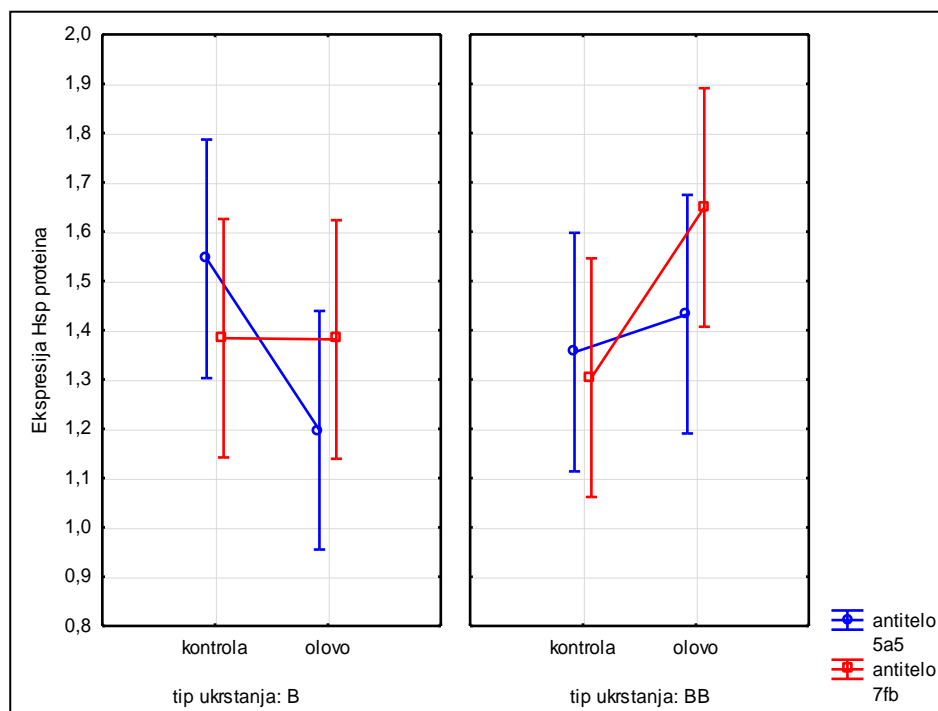
Tabela 4.11. Trofaktorska ANOVA za ekspresiju ukupnih i inducibilnih Hsp proteina

Izvor varijabilnosti	df	SS	MS	F	p
tretman	1	0,005	0,005	0,045	0,833
tip ukrštanja	1	0,055	0,055	0,467	0,497
antitelo	1	0,035	0,035	0,302	0,585
tretman*tip ukrštanja	1	0,597	0,597	5,113	0,028*
tretman*antitelo	1	0,377	0,377	3,226	0,078
tip ukrštanja*antitelo	1	0,02	0,02	0,172	0,68
tretman*tip ukrštanja*antitelo	1	0,006	0,006	0,051	0,823

df- stepeni slobode; SS- suma kvadrata; MS – srednja vrednost kvadrata; F – vrednost F testa; p – nivo značajnosti

Rezultati analize pokazuju da ni jedan od ispitivanih faktora nema statistički značajan efekat na koncentraciju Hsp proteina. Takođe, nije nađena ni značajna interakcija između faktora: tretman*antitelo, tip ukrštanja*antitelo, tretman*tip ukrštanja*antitelo. Analiza je pokazala da postoji statistički značajna interakcija između tretmana i tipa ukrštanja ($F=5,113$, $p=0,028$).

Rezultati analize ekspresije ukupne količine Hsp proteina izvršene ovom uporednom analizom pokazuju statistički značajno smanjenje kod jedinki B grupe gajene na supstratu sa olovom u poređenju sa jedinkama gajenim u kontrolnim uslovima (post hoc Fisher LSD $p=0,046$). Iako je kod jedinki iz BB grupe gajenih na olovu došlo do blagog povećanja ekspresije ukupnih proteina u odnosu na jedinke gajene na standardnom supstratu ovo povećanje nije statistički značajno Slika 4.7.



Slika 4.7. Ekspresija ukupnih i inducibilnih Hsp proteina podeljenih na osnovu tipa ukrštanja (na grafiku je koncentracija ukupnih Hsp obeležena antitelom 5A5, a inducibilnih antitelom 7FB)

Rezultati analize ekspresije inducibilnih Hsp proteina pokazuju drugačiji obrazac u odnosu na rezultate dobijene za ukupne Hsp proteine. Naime, kod jedinki B grupe nema razlike u koncentraciji inducibilnih Hsp proteina između jedinki gajenih na supstratu sa olovom i kod jedinki gajenih u kontrolnim uslovima. Kod jedinki BB grupe postoji statistički značajno povećanje ekspresije inducibilnih Hsp proteina u uslovima zagađenja olovom u poređenju sa kontrolnim uslovima (post hoc Fisher LSD $p=0,048$).

5. DISKUSIJA

Antropogeni uticaj na globalno zagrevanje, zagađenje i fragmentaciju staništa dostiže zabrinjavajući nivo poslednjih decenija a procene su da će se tokom XXI veka dodatno povećati (Smith i sar., 2009). U skladu sa sve većim promenama životne sredine postavlja se pitanje granica do kojih su organizmi i populacije sposobni da odgovore i adaptiraju se na ove nove uslove. Antropogeni uticaj se najčešće ne ogleda u promeni jednog faktora, već više njih deluju simultano ostavljajući biološkim entitetima manje maneverskog prostora da se izbore sa svim novonastalim uslovima. Olovo je jedan od najprisutnijih zagađivaca koji utiče na komponente adaptivne vrednosti i genetičku strukturu populacija velikog broja ispitivanih vrsta (Stamenković-Radak i sar., 2008; Kurbalija Novičić i sar., 2012; Kenig i sar., 2013, 2014; Groenendijk i sar., 2002). Promene u genetičkoj strukturi populacija izazvane inbridingom ili autbridingom imaju dalekosežne posledice na opstanak populacija kako u postojećim tako i u narušenim uslovima staništa (Reed i sar., 2012; Edmands, 2007). Veliki broj studija se bavio proučavanjem efekata kako genomskog tako i sredinskog stresa, ali je broj istraživanja koji se bave njihovim sinergističkim efektom relativno mali. Serija istraživanja na vrsti *D. subobscura* u kojima su ispitivani pojedinačni efekti ovih faktora su pokazala njihov značajan uticaj na promene vrednosti komponenti adaptivne vrednosti i morfoloških karakteristika, što zajedno sa bogatim i relativno dobro istraženim adaptivnim polimorfizmom prirodnih populacija čini ovu vrstu izuzetno pogodnim model sistemom za proučavanje njihovog sinergističkog efekta. Rezultati koji su dobijeni u ovom radu daju novi uvid u relativno neistraženo polje kombinovanog efekta dva tipa stresa. Sinergistički efekat genomskog i sredinskog stresa može pojačati nepovoljno dejstvo oba pojedinačna faktora na opstanak organizama i populacija. Iz ovih razloga javlja se sve veća potreba za proučavanjem kombinovanog efekta stresnih faktora u cilju procene odgovora ne samo ugroženih populacija već i opstanka onih koje trenutno nisu u stanju ugroženosti.

Rezultati ovog rada su pokazali da genetička struktura ispitivanih jedinki, prisustvo olova u supstratu kao i njihov sinergistički efekat utiču na rast, razviće, veličinu tela i ekspresiju proteina toplotnog šoka *D. subobscura* a njihov efekat se

ogleda u promeni varijabilnosti komponenti adaptivne vrednosti kroz njihovo smanjenje pod uticajem stepena homozigotizacije genoma i prisustva olova.

5.1. Komponente adaptivne vrednosti

Adaptivna vrednost (fitnes) je konačan rezultat svih razvojnih i fizioloških procesa određenog genotipa u životnoj sredini koja ga okružuje i predstavlja meru njegovog populaciono-evolucionog uspeha a rezultira performansama fenotipa koje nazivamo komponentama adaptivne vrednosti. Adaptivna vredost je složena karakteristika koja predstavlja skup više osobina životne istorije od kojih su najvažnije preživljavanje i fertilitet, kao i dužina i obrasci razvića, veličina tela, fekunditet i veličina potomaka (Stearns, 1992). Rezultati dobijeni u ovom radu pokazuju su posmatrane komponente adaptivne vrednosti različito osetljive na svaki pojedinačni ispitivan faktor, ali i na njihov kombinovan efekat, i da je pri proceni uticaja bilo kog tipa stresa neophodno efekat pratiti na većem broju osobina životne istorije kao i morfološkim i biohemijskim karakteristikama.

Eksperimentalni dizajn ovog rada je omogućio detektovanje i genomskog i sredinskog stresa kao i njihovog sinergističkog delovanja izraženog kroz njihovu interakciju. U ovom radu sredinski stres je izazvan prisustvom olova u podlozi u koncentraciji od 200 µg/mL. Genomski stres je predstavljen serijom ukrštanja kojom su dobijene jedinke sa različitim nivoom heterozigotnosti genoma: unutar-linijski (potomci jedne ženke koji imaju blagu stopu inbridinga), unutar-populacioni (heterozigoti nastali ukrštanjem dve iso-female linije u okviru iste populacije) i među-populacioni (heterozigoti nastali spajanjem dva genofonda, obzirom da su nastali ukrštanjem iso-female linija poreklom iz dve različite populacije). Tako je prisustvo sredinskog stresa detektovano razlikama u analiziranim komponentama adaptivnih vrednosti između jedinki gajenih na supstratu sa olovom i u kontrolnim uslovima, obzirom na trend redukcije u uslovima izlaganja olovu, koja je u slučaju brzine razvića i statistički značajan. Prisustvo genomskog stresa je detektovano razlikama u adaptivnoj vrednosti između različitih tipova ukrštanja u optimalnim uslovima sredine i izloženosti olovu, s obzirom na značajno povećanje i preživljavanja i smanjenje dužine razvića sa porastom heterozigotnosti. Sinergistički efekat genomskog i sredinskog stresa mogao bi se detektovati postojanjem razlika u odgovoru različitih genotipova u različitim uslovima sredine, što u ovom radu nije pokazano analizom

preživljavanja od jaja do adulta i brzinom razvića do adulta. Posmatrajući obe analizirane komponente adaptivne vrednosti, na osnovu dobijenih rezultata, može se generalno doneti zaključak da prisustvo oba tipa stresa utiče na njihovu promenu, ali da je efekat genomskog stresa jasnije uočljiv na komponenti adaptivne vrednosti preživljavanje a sredinskog na dinamiku razvića. Osim toga, rezultati ovog rada ukazuju na heterozis koji se intenzivira u uslovima sredinskog stresa.

Obe ispitivane komponente adaptivne vrednosti imaju trend povećanja sa povećanjem heterozigotnosti genoma, a u slučaju preživljavanja ovaj trend je i statistički značajan. Prednost heterozigota, heterozis, može se objasniti na osnovu dva osnovna teoretska koncepta, dominantse i ovrdominantse. Dominansa pretpostavlja da u heterozigotnom stanju superiorniji aleli jednog roditelja komplementiranu sa štetnim i/ili nepovoljnim alelima drugog roditelja, odnosno maskiraju ih. Overdominansa pretpostavlja da se kod hibrida javljaju alelske interakcije koje ih čine boljim od oba roditelja. Neke studije pokazuju da i interakcije između nealelnih gena doprinose heterozisu (Lynch, 1991; Lynch i Walsh, 1998; Whitlock i sar., 2000; Lippman i Zamir, 2007). Precizni biohemijski procesi koji leže u osnovi heterozisa još uvek nisu detaljno poznati ali se pretpostavlja da nastaju upravo zbog prisustva različitih alela. Usled toga postoji više produkata genske aktivnosti koji heterozigotima omogućavaju veću fleksibilnost i opseg biohemijskih procesa nego što je to slučaj sa homozigotima (Gillespie i Langley, 1974; Berger, 1976). Ovakva fleksibilnost i veći opseg reakcija bi trebalo da omogući i bolje reagovanje u stresnim uslovima u kojima bi prednost heterozigota trebalo da bude dodatno povećana (Bryant, 1974; Berger, 1976; Milkman, 1978; Wills, 1978). Rezultati dobijeni za obe komponente adaptivne vrednosti u ovom radu slažu se sa teorijskim pretpostavkama, s obzirom da unutar-populacione i među-populacione jedinice imaju veću ukupnu adaptivnu vrednost, izraženu kroz povećano preživljavanje i smanjenje perioda neophodnog za razviće, u odnosu na unutar-linijske jedinice. Takođe, rezultati se slažu i sa velikim brojem literaturnih podataka koji pokazuju i veću adaptivnu vrednost heterozigota nastalih spajanjem inbredovanih ili delimično inbredovanih linija i heterozigota

nastalih spajanjem dve populacije iste vrste (Hedrick i Kalinowski, 2000; Ferreira i Amos, 2006; Whitlock i sar., 2013). Iako je najčešće redukcija adaptivne vrednosti inbredovanih u odnosu na autbredovane jedinke pripisivana inbriding depresiji, odnosno povećanom ispoljavanju štetnih recesivnih alela u homozigotnom stanju, nova istraživanja pokazuju da se povećanje adaptivne vrednosti heterozigota ne mora objasniti samo smanjenjem adaptivne vrednosti homozigota. Ferreira i Amos (2006) su ispitivanjem 12 mikrosatelitskih lokusa kod inbredovanih i autbredovanih jedinki *Drosophila*, pokušali da utvrde adaptivnu prednost heterozigota u različitim stresnim uslovima. Kao što je i očekivano i u ovoj studiji je pokazana inbriding depresija, odnosno smanjenje adaptivne vrednosti u odnosu na autbredovane eksperimentalne grupe. Međutim, oni su pokazali da mnogi lokusi u heterozigotnom stanju pokazuju mnogo veću adaptivnu prednost nego što bi se očekivalo samo na osnovu efekta inbridinga i da je taj efekat intenziviran u stresnim uslovima ukazujući da epistatičke interakcije i funkcionalni odnosi između nealelnih gena imaju veliki uticaj na heterotični efekat.

Rezultati za preživljavanje su pokazali statistički značajne razlike za tip ukrštanja dok, suprotno očekivanjima, značajnost nije utvrđena u pogledu prisustva olova u podlozi. Takođe, nije utvrđena značajna interakcija između ova dva faktora. Statistička značajnost tipa ukrštanja proizilazi iz značajno manjeg preživljavanja UL jedinki poreklom iz obe populacije u odnosu na UP i MP. Najverovatniji razlog ovakvih rezultata leži u činjenici da su UL jedinke delimično inbredovane i da je iako mala, ova homozigotizacija genoma dovoljna da dovede do ekspresije štetnih recesivnih alela koji su doveli do pada adaptivne vrednosti. Iako recesivni štetni aleli najčešće imaju mali pojedinačni efekat, moguće je da je u ovom slučaju došlo do ispoljavanja manjeg broja recesivnih alela sa većim efektom i da se taj efekat intenzivirao u stresnim uslovima. Ovi rezultati predstavljaju još jedan u velikom broju dokaza da čak i relativno mala stopa inbridinga može dovesti do značajnog pada adaptivne vrednosti, naročito u narušenim uslovima životne sredine kakve predstavlja zagađenje olovom (Ferreira i Amos, 2006;). Dalja podrška ovakvom zaključku predstavlja i uočeni trend povećanog preživljavanja sa povećanjem heterozigotnosti genoma. Iako nije utvrđena

statistički značajna razlika između UP i MP grupa, može se uočiti da je preživljavanje najveće u MP grupi i u kontrolnim uslovima i na supstratu sa olovom. Najbolje performanse su pokazale one jedinke koje su imale najveći stepen heterozigotnosti genoma obzirom da su dobijene spajanjem jedinki poreklom iz različitih populacija. Prednost heterozigota je najverovatnije posledica intenziviranja maskiranja recesivnih štetnih alela i/ili povećane raznovrsnosti metaboličkih puteva. Ovakvi rezultati navode na zaključak da je za populacije, naročito u stresnim uslovima od najveće važnosti održanje genetičke varijabilnosti neophodne da se populacija izbori sa stresnim uslovima.

Kako za preživljavanje, tako i za dužinu razvića postoji trend povećanja adaptivne vrednosti sa povećanjem heterozigotnosti genoma, jer je UL jedinkama potrebno najduže vreme da kompletiraju razvojni ciklus od jaja do adulta. Međutim, ovde posledice homozigotizacije genoma nisu tako jasne. Iako u kontrolnim uslovima UL grupe imaju generalno duže razviće od UP i MP grupa, ove razlike su statistički značajne samo u poređenju sa BB rec i SBB. Na osnovu ovih rezultata ne možemo tvrditi da je homozigotizacija genoma dovela do pada adaptivne vrednosti u kontrolnim uslovima. Moguće je da je nizak stepen homozigotizacije genoma koji je prisutna kod UL jedinki nije dovoljan da dovede do promena u dužini razvića, bar u optimalnim uslovima sredine.

Prisustvo olova u supstratu nema uticaj na jednu od najvažnijih komponenti adaptivne vrednosti, preživljavanje od jaja do adulta. Ranija istraživanja uticaja olova na preživljavanje *D. melanogaster* su pokazala da prisustvo olova u supstratu, čak i u većim dozama nego što je korišćena u ovom radu, ne smanjuje značajno preživljavanje u odnosu na jedinke gajene u kontrolnim uslovima (Cohn i sar., 1992) ali da značajno utiče na druge komponente adaptivne vrednosti. Slični rezultati su dobijeni i u istraživanjima terestričnih organizama koji su zbog svoje ekologije najugroženiji prisustvom teških metala u zemljištu. Pokazano je da iako olovo značajno smanjuje preživljavanje, stepen redukcije ove komponente adaptivne vrednosti zavisi od većeg broja faktora među kojima je najznačajniji njegova koncentracija. U eksperimentima sa crvima *Eisenia fetida*, često korišćenom model sistemu za procenu zagađenja terestričnih ekosistema,

pokazano je da, iako ekološki relevantne, niže koncentracije olova ne dovode do pada preživljavanja iako utiču na promenu drugih komponenti adaptivne vrednosti (Žaltauskaitė i Sodienė, 2014). Jedinke *D. subobscura* korišćene u ovom eksperimentu bile su izložene hroničnoj subletalnoj koncentraciji olova koja, iako relativno visoka, predstavlja stres niskog intenziteta sa malim uticajem na ovu komponentu adaptivne vrednosti u ovakvom eksperimentalnom dizajnu.

Iako je prisutan generalan trend slabijeg preživljavanja kod UL jedinki gajenih na supstratu sa olovom, ovo smanjenje ne možemo pripisati prisustvu olova. *D. subobscura* je holometabolni insekt čije razviće čine jaje, larva, lutka i imago. Svaka od ovih faza razvića zahteva usku koordinaciju velikog broja procesa koji uključuju ekspresiju velikog broja gena, pravilnu orijentaciju ćelija i segmentaciju različitih ćelijskih grupa i struktura, uspostavljanje anteriorno-posteriorne organizacije i prolaženje kontrolnih tačaka između različitih stupnjeva razvića. Iako postoji dinamika, vremenski sled i period trajanja ovih događaja u optimalnim uslovima, oni mogu veoma varirati u zavisnosti od raspoloživih resursa (Bakker, 1959; Robertson, 1963; Burnet i sar., 1977; Santos i sar., 1997). Ono što je bitno napomenuti u ovom kontekstu je da produžavanje perioda razvića kod *Drosophila* može dovesti do slabijeg preživljavanja i snižavanja kompetitivne sposobnosti larvi, zbog kašnjenja u vremenskim okvirima kada se prelazi u fazu lutke (Bakker, 1969). Uspešno kompletiranje svih metaboličkih, fizioloških i razvojnih procesa kao najosetljiviji proces u životnoj istoriji, rezultira u formiranju adulta i predstavlja biološki imperativ za svaku jedinku. Stresni uslovi mogu interferirati sa ovim procesima i u slučaju visokog intenziteta stresa mogu onemogućiti njihovo kompletiranje smanjujući preživljavanje. Međutim, u subletalnim stresnim uslovima jedinke mogu odlagati završetak pojedinih faza ovog ciklusa, zbog alokacije resursa u mehanizme odbrane i/ili usporavanja određenih faza u cilju obezbeđivanja njihovog uspešnog kompletiranja i završavanja razvojnog ciklusa koji rezultuje preživljavanjem.

Upravo se prilagođavanje dužine razvića javilo kao odgovor na prisustvo olova u podlozi koji se ogleda u produžavanju vremena neophodnog za njegovo kompletiranje razvića. Dosadašnji rezultati pokazuju da je varijabilnost dužine

razvića i preživljavanja od larve do adulta kod *Drosophila* u stresnim uslovima, kao što su ekstremne temperature ili restriktivna ishrana značajno veća nego u optimalnijim uslovima (Krebs i Loeschcke 1999; Bublly i Loeschcke 2001, 2002; Sgrò i Hoffmann, 2004). Koristeći biofizički model, de Jong i Imasheva (2001) su pokazale značajnu mogućnost odgovora u ekstremnim uslovima modifikacijom dužine trajanja razvića.

Olovo produžava period neophodan za kompletiranje razvića pokazujući isti obrazac u svim eksperimentalnim grupama različitih tipova ukrštanja. Ovi rezultati su u skladu sa velikim brojem literaturnih podataka koji pokazuju da izlaganje jedinki hroničnom dejstvu teških metala tokom perioda razvića interferira sa fino regulisanim procesima uključenim u njegovo kompletiranje. Produženo razviće u uslovima izlaganja teškim metalima, uključujući i olovo, pokazano je na velikom broju vrsta uključujući insekte: *Drosophila melanogaster* (Cohn i sar., 1992), *Drosophila subobscura* (Stamenković-Radak i sar., 2008.), *Aiolopus thalassinus* (Schmidt i sar., 1991), *Lymantria dispar* (Gintenreiter i sar., 1993), *Chironmus riparius* (McCahon i Pascoe, 1991) i *Oncopeltus fasciatus* (Cervera i sar., 2004), *Boettcherisca peregrine* (Wu i sar., 2006); ribe *Cyprinus carpio* (Jeziarska i sar., 2008); vodozemce *Xenopus laevis* (Berzins i Bundy, 2002) i *Pelophylax nigromaculata* (Huang i sar., 2014).

Veći broj predloženih mehanizama može ležati u osnovi produžetka razvića kod jedinki izloženih olovu i ostalim teškim metalima. Produžetak razvića može se objasniti jednim od predloženih mehanizama toksičnog delovanja olova: produkcijom slobodnih radikala kiseonika i sposobnošću olova da kompetitira sa drugim esencijalnim dvovalentnim katjonima kao što je kalcijum. Zamena kalcijumskih jona olovom ima možda najveći efekat, jer kalcijum, slično natrijumu i drugim jonima, igra važnu ulogu u razviću (Spitzer, 1979), naročito u ranim embrionalnim procesima (Barth i Barth, 1974; Messenger i Warner, 1979; Shirayoshi i sar., 1983; Smedley i Stanišstreet, 1985, 1986). Unutarćelijska koncentracija Ca^{2+} utiče na stope sinteze DNK, RNK i proteina, stopu ćelijske proliferacije, skraćivanje ćelijskog ciklusa, i ubrzavanje deobe ćelija (Berridge, 1995). Tokom razvića jedinki, kao i tokom gametogeneze, ovi ćelijski procesi se

konstantno odvijaju, i sve promene u stopama proliferacije ćelija i sinteze navedenih biomolekula mogu rezultovati promenom u dužini razvića, bilo njegovim produženjem bilo skraćanjem.

Drugo moguće objašnjenje je da izlaganje teškim metalima menja energetske metabolizam ćelije, smanjujući dostupne izvore energije u obliku lipida, proteina i ugljenih hidrata. Studije na akvatičnim organizmima su pokazale da olovo (Torreblanca i sar., 1991; Chinni i sar., 2000; Chinni i Yallapragada, 2002) i drugi teški metali (Dickson i sar., 1982; Radhakrishnaiah i Busappa, 1986;) dovode do smanjenja energetskih resursa neophodnih za razviće. Kod *D. melanogaster* je uočena značajna povezanost između stresa, dužine trajanja larvalnog razvića i pokazatelja energetskog metabolizma: količine kofaktora nikotinamid adenin dinukleotid (NAD) i odnosa ATP/ADP (Kohane, 1994). Smanjenje dostupnih izvora energije može usporiti procese razvića dovodeći do njegovog produženja naročito kod jedinki koje imaju energetske neefikasan metabolizam. Iako je razviće svih grupa izloženih olovu produženo može se uočiti trend njegovog skraćanja sa povećanjem heterozigotnosti genoma. Kraće razviće može doneti adaptivnu prednost, jer skraćuje vreme izloženosti predatorima, infekcijama i/ili stresu, omogućava prednost u ranoj reprodukciji i omogućava veći broj generacija u datom periodu vremena (Sibly i Calow 1986, 1999; Stearns, 1992; Gotthard i sar., 1994; James i sar., 1995; Nylin i Gotthard, 1998). Kod *D. melanogaster* i *D. subobscura*, kratko vreme razvića je u korelaciji sa većom aktivnošću nekoliko analiziranih enzima (Marinković i sar., 1986). Ovakvi rezultati sugerišu da brzo razviće počiva na fenotipu sa većom metaboličkom aktivnošću i da, u zavisnosti od enzima koji se posmatraju, može postojati veza između nivoa opštih metaboličkih sposobnosti i adaptivne vrednosti izražene kroz dužinu razvića (Parsons, 2004). Veliki broj studija ukazuje da je nivo heterozigotnosti u prirodnim populacijama pozitivno korelisan sa fitnessom, naročito ako je analiza vršena za enzimske lokuse koji utiču na metabolizam i doprinose povećanju energije za razviće i rast. Ova korelacija je naročito izražena u uslovima ekstremnog abiotičkog stresa kada su energetske zahtevi koje sredina nameće visoki ili kada su dostupni izvori energije ograničeni usled nedostatka nutrijenata (Mitton, 1993). Obzirom da kod

heterozigota postoji tendencija da imaju manje energetske zahteve u odnosu na homozigote, naročito u stresnim uslovima, kod njih bi trebalo da postoji potencijal da ostvare bolje razviće i reprodukciju u širem opsegu sredinskih uslova u poređenju sa odgovarajućim homozigotima (Koehn i Bayne 1989). Koehn i Bayne (1989) čak tvrde da u osnovi viših adaptivnih vrednosti heterozigota u stresnim uslovima leži njihova smanjena energetska potrošnja u održavanju osnovnog metabolizma, a kasnija istraživanja su potvrdila ove pretpostavke, naročito kod morskih organizama (Borsa i sar., 1992). Takođe, istraživanja na *Mytilus edulis*, su pokazala jaku negativnu korelaciju između multilokusne heterozigotnosti i standardnog metabolizma pokazujući da je veća otpornost heterozigota na aerobni i anaerobni stres povezana sa njihovim relativno malim osnovnim metaboličkim potrebama (Myrand i sar., 2002). Uzimajući u obzir izneto, može se zaključiti da heterozigotima ostaje više raspoložive energije da se izbore sa stresnim uslovima nego homozigotima (Koehn and Bayne 1989; Hawkins 1991) i da bi, usled veće energetske efikasnosti, trebalo da imaju veći fitness. Rezultati ovog rada su u skladu sa iznetim hipotezama, obzirom da UP i MP grupe pokazuju trend i većeg preživljavanja i kraćeg vremena razvića od UL grupa u stresnim uslovima.

Prisustvo olova u podlozi pokazuje najveći efekat na dužinu razvića B grupe čije je razviće značajno produženo u odnosu na sve UP i MP grupe gajene na supstratu sa olovom. Takođe, Fligen Killer test pokazuje da je koeficijent varijacije ove grupe značajno veći u poređenju sa svim ostalim grupama gajenim na olovu. Obzirom da povećan koeficijent varijacije uglavnom ukazuje na veće variranje između uzoraka očekivano je da bude povećan u grupama koje su potomci jedne ženke i samim tim na neki način odražavaju varijabilnost jedinki u svakoj populaciji. Povećan CV obično znači da između linija postoji razlika koja direktno potiče od individualnih genetičkih razlika između jedinki u jednoj populaciji. Međutim, koeficijent varijabilnosti malo varira između eksperimentalnih grupa u kontrolnim uslovima ukazujući da se u optimalnim uslovima sredine jedinke uniformno razvijaju i prate kanalisani proces razvića. U prisustvu olova kao sredinskog stresa se takav obrazac zadržava osim u poređenju B sa ostalim grupama. Jedno od objašnjenja bi moglo biti i da se u uzorku B jedinki nalaze i oni

genotipovi koji su prilagođeni na prisustvo olova, (s obzirom da su već bili izloženi takvim uslovima u staništu), ali i oni koji nisu. Selekcija na kadmijum kod *D. melanogaster* je pokazala da se u osnovi povećane otpornosti na ovaj teški metal nalazi jedan gen na polnom hromozomu sa velikim efektom, ukazujući da otpornost na teške metale može nastati kao posledica promene na samo jednom genu (Shirley i Sibly, 1999). Homozigotizacija genoma je u ovom slučaju mogla dovesti do eksprimiranja onih alela koji povećavaju sposobnost adaptacije na olovo, rezultujući u smanjenju dužine razvića ali i onih koji su senzitivni čime su doprineli većem padu adaptivne vrednosti. Populacija iz Botaničke bašte se inače odlikuje visokim nivoom heterozigotnosti, izraženim i preko adaptivnog polimorfizma u obliku prisustva različitih inverzija i izraženog preko neutralnog polimorfizma, kako nukleusnog tako i mitohondrijalnog (Kenig i sar., 2010; Kurbalija Novičić i sar., 2011; Stamenković-Radak i sar., 2012). Izlaganje tog polimorfizma selekciji u homozigotnom stanju moglo je dovesti do nastanka otpornih, senzitivnih, i genotipova u srednjem opsegu otpornosti, međusobno različitih po inicijalnim alelskim kombinacijama koje nose. Takve razlike u genotipovima su se mogle odraziti i na ukupnu fenotipsku varijabilnost u stresnim uslovima koja se ogleda u povećanom koeficijentu varijacije za ovu osobinu.

Drugo objašnjenje povećanog koeficijenta varijacije bi moglo biti oslobađanje skrivene genetičke varijabilnosti koja se ispoljava usled prisustva olova kao izvora sredinskog stresa. U uslovima genetičkih ili sredinskih promena može doći do promena u utvrđenom putu razvoja fenotipskih osobina, odnosno "dekanalisanosti", i ispoljavanja "kriptične" genetičke varijabilnosti. Dužina razvića je kompleksna osobina u čijem formiranju učestvuje veliki broj razvojnih puteva i mreža. Obim kanalisnosti zavisi od složenosti razvojnih mreža koje učestvuju u formiranju te osobine, jer u situaciji kada veći broj visoko povezanih puteva učestvuje u determinaciji jednog fenotipa oni evoluiraju ka visokoj kanalisnosti (Siegal i Bergman, 2002). Takođe, fenotipske osobine se kanalisano razvijaju usled dugotrajnog i konzistentnog delovanja prirodne selekcije. Ovakvi uslovi favorizuju optimalne fenotipove, pa je njihova genetička varijabilnost mala. Visoka kanalisnost za dužinu razvića prisutna je u kontrolnim uslovima. Dobijene

vrednosti koeficijenta varijacije za dužinu razvića su niske i iznose oko 5% ukazujući na uniforman odgovor svih grupa, bez obzira na stepen heterozigotnosti genoma. Ovako niski koeficijenti varijacije obično ukazuju da se genotipovi u okviru grupa međusobno mnogo ne razlikuju, barem što se tiče njihovog uticaja na osobinu koja se ispituje. Značajno viši koeficijent varijacije primećen u stresnim uslovima u B grupi može da ukaže na proces dekanalisanosti, čime se ispoljava kriptična varijabilnost. Dekanalisanost izazvana genetičkim promenama pokazana je u nizu eksperimenata koji su proučavali uticaj smanjenja funkcije šaperona *Hsp90* na ovaj proces (Rutherford i Lindquist, 1998; Jarosz i Lindquist, 2010; Rohner i sar., 2013), ali su kod *Drosophila* opisani i drugi primeri dekanalisanosti (Gibson i Hogness, 1996; Lott i sar., 2007; Gavin-Smyth i sar., 2013; Chen i sar., 2015). Dekanalisanost i ispoljavanje kriptične genetičke varijabilnosti, naročito u populacijama koje su izložene novom ili stresnom okruženju, može da olakša fenotipsku adaptaciju i dovede do neočekivano brze evolucije osobina koje izgledaju kao relativno nepromenljive, ali u isto vreme može biti i nepovoljno (Schlichting, 2008; McGuigan i Sgrò, 2009; Paaby i Rockman, 2014) na šta ukazuju i rezultati dobijeni u ovom radu, obzirom da jedinke koje imaju najveći koeficijent varijacije pokazuju generalno najniži fitness.

Kako se vidi iz rezultata ovog rada, ni jedna od ispitivanih komponenti adaptivne vrednosti nije pokazala populaciono specifičan odgovor na prisustvo olova kao izvor sredinskog stresa. Jedna od osnovnih pretpostavki sa kojom je početa izrada ove disertacije bila je vezana za specifične populacione istorije svake od izabranih populacija. Ranija istraživanja genetičke varijabilnosti i strukture populacija *Drosophila subobscura* poreklom iz Sićevačke klisure i Botaničke bašte u Beogradu pokazala su da se ove populacije odlikuju određenim specifičnostima. Naime, za populaciju *D. subobscura* iz Sićevačke klisure specifično je prisustvo hromozomskih aranžmana koji se češće sreću u populacijama koje se nalaze u južnom delu areala vrste kao i nešto povećana učestalost retkih mitohondrijalnih haplotipova (Jelić i sar., 2012; Stamenković-Radak i sar., 2012). U ovoj populaciji je zabeležena i velika duplikacija u kontrolnom regionu mtDNK i najduža do sada opisana mtDNK kod *D. subobscura* (Jelic i sar., 2012). Za populaciju iz Botaničke

bašte je specifična povećana heterozigotnost (izračunata i preko inverzionog polimorfizma i preko mikrosatelitskih lokusa) u odnosu na druge izučavane populacije Balkanskog poluostrva (Kenig i sar., 2010; Stamenković-Radak i sar., 2012) kao i povećan procenat retkih mitohondrijalnih DNK haplotipova. Jedno od objašnjenja za povećanu genetičku varijabilnost ove populacije može ležati u činjenici da visok nivo urbanizacije dovodi do povećanja broja i varijabilnosti ekoloških niša koju može pratiti i povećanje genetičke varijabilnosti (Valiati i Valente, 1997). Jedinke koje su izložene konstantnim fluktuacijama sredine i žive u narušenim uslovima staništa imaju veći izbor suženih ekoloških niša što može dovesti do povećanja genetičke varijabilnosti neophodne za adaptaciju na promenljive uslove. Takođe, bitno je naglasiti da se populacije iz Botaničke bašte i Sićevačke klisure međusobno značajno razlikuju na osnovu F_{st} vrednosti (indeksa genetičke međupopulacione diferencijacije) izračunate preko mikrosatelitske varijabilnosti što ukazuje na divergenciju ovih populacija.

Staništa koje ove dve populacije zauzimaju imaju potpuno različite karakteristike. Botanička bašta u Beogradu je urbano stanište, pod jakim antropogenim uticajem. Nalazi se u centralnoj gradskoj zoni, u blizini jedne od najprometnijih Beogradskih saobraćajnica i odlikuje se visokim koncentracijama aero polutanata (Kvalitet životne sredine u gradu Beogradu u 2010. godini, 2011). Iako u granicama dozvoljenih, koncentracija teških metala, naročito olova i cinka su povišene u odnosu na zemljište u Sićevačkoj klisuri. Iako cink i olovo predstavljaju teške metale sa dokazanim štetnim efektima u visokim koncentracijama oni se značajno razlikuju po svojim ulogama u živim organizmima. Cink je esencijalni metal neophodan za normalno obavljanje većeg broja ćelijskih funkcija i predstavlja komponentu brojnih enzima i transkripcionih faktora (Sharif i sar., 2012). U malim koncentracijama koristi se kao suplement ishrani sa dokazanim antioksidacionim svojstvima dok je u većim koncentracijama toksičan. S druge strane, za olovo nije utvrđena ni jedna biološka funkcija u organizmu, a pokazano je da čak i u malim koncentracijama u tkivima i organima može imati štetne posledice.

Ranija istraživanja su pokazala da su jedinke *D. subobscura* iz Botaničke bašte adaptirana na povećanu koncentraciju olova u staništu. Prilikom izlaganja povećanim koncentracijama olova u laboratorijskim uslovima one su pokazale povećanu adaptivnu vrednost, izraženu smanjenjem vremena razvića, u poređenju sa populacijom poreklom iz nezagađene sredine (Kenig i sar, 2013). Inicijalna pretpostavka je bila da će ove adaptirane jedinke pokazati višu adaptivnu vrednost u poređenju sa jedinkama iz Sićevačke klisure koja u prirodnoj sredini nije izložena antropogenom uticaju. Unutar-populacione grupe predstavljaju simulaciju prirodne populacije iz kojih su potekle. BB grupe tako predstavljaju populaciju Botaničke bašte koja je adaptirana na stanište sa povećanom koncentracijom olova dok SS grupe predstavljaju populaciju iz Sićevačke klisure koja živi u uslovima sredine neopterećene zagađenjem teškim metalima. Na osnovu prethodnih istraživanja bilo je očekivano da će populacija iz Botaničke bašte imati veću adaptivnu vrednost u uslovima zagađenja olovom. Međutim, rezultati dobijeni analizom komponenti adaptivne vrednosti, kao i variranja u veličini krila nisu podržale ovu pretpostavku što je u suprotnosti sa dosadašnjim istraživanjima (Kenig i sar., 2013; Kurbalija Novičić i sar., 2012). Osnovni razlog izostanka populaciono specifičnog odgovora najverovatnije leži u činjenici da je eksperimentalni dizajn u ovoj disertaciji bio napravljen sa ciljem da se proceni postojeća genetička varijabilnost (eng. *standing genetic variation*) prisutna u ispitivanim populacijama, dok su u navedenim radovima populaciono specifični odgovori bili detektovani nakon nekoliko generacija selekcije na supstratu sa olovom. Adaptacija predstavlja dinamičan evolutivni proces tokom koga populacije akumuliraju povoljne alele na lokusima koji kontrolišu adaptivne fenotipove. Polimorfizmi koji doprinose adaptaciji mogu da budu prisutni ili kao postojeća genetička varijabilnost ili da nastanu u procesu mutacija tokom selekcije. Aleli sa pozitivnim efektom koji su prisutni usled postojeće genetičke varijabilnosti imaju nekoliko prednosti u odnosu na nove koji se generišu mutacionim događajuma. Prvo, oni su evolutivno stariji i mogli su već biti testirani u prethodnim stresnim sredinama čime prošli kroz „selektivni filter“ koji može povećati verovatnoću pojave povoljnih alela sa većim efektom. Drugo, takvi aleli mogu sa sobom doneti višestruke povoljne genetičke promene (Barrett i Schluter, 2008). Razumno je bilo

pretpostaviti da antropogeni pritisak i značajno veća koncentracija olova u podlozi oblikuju ovaj vid adaptivne varijabilnosti. Inicijalna pretpostavka o postojećoj genetičkoj varijabilnosti za povećanje otpornosti na olovo nije pokazana posmatranjem izabranih osobina. Međutim, dobijeni rezultati nikako nisu razlog da odbacimo pretpostavku njenog postojanja, jer mada relativno veliki, uzorak obuhvata samo deo varijabilnosti koja postoji u ispitivanim populacijama. Moguće je i da izlaganje subletalnim koncentracijama olova koje su korišćene u ovom radu tokom jedne generacije nije dovoljno stresan faktor koji bi doveo do vidljivog populaciono specifičnog odgovora i da bi se efekat ispoljio praćenjem više generacija, s obzirom da je pokazano da olovo ima značajan negativni uticaj i na spermatogenezu i oogenezu (Chowdhury i sar., 1984, 1986; Acharia i sar., 2003).

5.2. Varijabilnost u veličini krila

Rezultati dobijeni analizom veličine krila jasno pokazuju da zagađenje olovom značajno smanjuje veličinu krila kod svih ispitivanih jedinki i da su ovi štetni efekti naročito izraženi kod jedinki koje su izložene blagoj homozigotizaciji genoma, ukazujući na sinergistički efekat genomskog i sredinskog stresa na ovu osobinu. Rezultati takođe pokazuju da veličina krila raste sa nivoom heterozigotnosti genoma a heterozigoti su stabilniji i u stresnim uslovima sredine, dodatno podržavajući pretpostavku da je pozitivan heterozis osnovni mehanizam koji se opire štetnom uticaju olova koji se ogleda u smanjenju veličine krila. Takođe, rezultati pokazuju da je u slučaju međupopulacione hibridizacije, poreklo ženke veoma bitno obzirom da je kod jedinki čije su majke poreklom iz nezagađene sredine detektovano smanjenje veličine krila.

Kompletiranje procesa razvića ima centralnu ulogu u evoluciji, jer se kroz taj proces genotipovi ostvaruju kao fenotipovi. Veliki broj studija je pokazao da genetički ili sredinski izazvane promene u razviću mogu uticati na konačni izgled organizma, odnosno njegov fenotip, stvarajući evolutivno važne fenotipske razlike u populacijama. Da bi razviće bilo uspešno kompletirano, kod višećelijskih

organizama mora doći do kordinisanog rasta i diferenciranja ćelija u prostoru i vremenu da bi postigli pravu veličinu i oblik (Mirth i Shingleton, 2012).

Krila *Drosophila* predstavljaju često korišćen model za genetičke i evolucione analize i praćenje efekata velikog broja faktora, uključujući i sredinski i genomski stres (Debat i sar., 2003; Trotta i sar., 2011). Krilo *Drosophila* se tokom embriogeneze razvija iz imaginalnih diskova krila koje predstavljaju grupu epitelnih ćelija koje tokom larvalnog perioda razvića prolaze kroz ubrzan period proliferacije da bi u stadijumu lutke prošli kroz diferencijaciju do konačne strukture koju treba da obrazuju. Rigidni egzoskelet tela adulta koji ograničava naknadno povećanje dimenzija organizma diferencira se tokom metamorfoze, a konačna veličina tela, a time i veličina krila, trebalo bi da bude regulisana stopom i trajanjem larvalnog rasta. Povećanje u veličini i broju ćelija imaginalnih diskova krila tokom larvalnih faza je pod kontrolom nekoliko selektivno eksprimiranih gena i koordinisanom kontrolom nekoliko usko povezanih signalnih puteva. Važnu ulogu u regulaciji stope rasta, a samim tim i trajanja rasta larvi, imaju insulinski i ripamicinski-target (TOR) signalni putevi, kao i njihova interakcija sa hormonalnim sistemom, pre svega sa egdizonom i juvenilnim hormonom koji su pod kontrolom neuroendokrinog sistema (Davidowitz i sar., 2003), i njihova regulacija se vrši neuropeptidima i signalima iz spoljašnje sredine (De Loof, 2008; Yamanaka i sar., 2013). Ova interakcija omogućava larvama da integrišu signale iz spoljašnje sredine da bi u skladu sa njima osigurale postizanje optimalne veličine i proporcije. Svaka promena koja menja jedan od razvojnih mehanizama može da promeni konačni fenotip organizma, a pokazano je da stopa rasta znatno varira u odgovoru na različite uslove, uključujući kompeticiju, dostupnost resursa, predatorstvo, sezonske uslove i temperaturu (Lima i Dill, 1990; Rowe i Ludwig, 1991; Arendt, 1997; Flatt i Heyland, 2011).

Položaj vena na krilima je visoko konzervirana osobina i pretpostavlja se da jedan od puteva kojima se modulira promena u obliku i veličini krila upravo genetička varijabilnost gena uključenih u formiranje vena. Promena obrasca rasta krila je vrlo ograničena i mogla bi da bude posledica homeostatske organizacije genetskog sistema ili rigidnosti razvojnih puteva (Moreto i sar., 1998; Klingenberg

i Zaklan, 2000). Jedan od razloga ove rigidnosti bi mogao biti visoka kanalisnost nastala usled prirodne selekcije obzirom da je funkcija krila usko povezana sa komponentama adaptivne vrednosti (Gilchrist i sar., 2000). Uprkos tome, pokazano je da u populacijama *Drosophila* postoji visoka aditivna genetička varijansa za oblik i veličinu krila (Gilchrist i Partridge, 2001). Međutim, učešće genetičke varijanse u ukupnoj fenotipskoj varijansi se razlikuje kod oblika i veličine krila. Heritabilnost za veličinu je mala, što ukazuje da je je uticaj sredinskih faktora na varijabilnost relativno veliki (Moraes i sar., 2004; Breuker i sar., 2006). S druge strane, heritabilnost za oblik krila je velika i manje podložna promenama usled promena spoljašnje sredine (Weber i sar., 1999, 2001; Gilchrist i Partridge, 2001; Santos i sar., 2004). Sve navedeno predstavlja razlog zbog čega su promene u veličini krila dobar model sistem za istraživanje uticaja različitih faktora, uključujući i genomski i sredinski stres.

Jasno smanjenje veličine krila u uslovima izloženosti olovu ukazuje da je varijabilnost veličine krila pogodan pokazatelj prisustva stresnih uslova u staništu. Rezultati dobijeni u ovom radu su u skladu sa prethodnim istraživanjima (Kurbalija Novičić i sar., 2012) ukazujući da prisustvo olova interferira sa fino regulisanim procesima uključenim u razviće krila bilo kroz remećenje metaboličkih svojstava ćelije, bilo kroz narušavanje endokrinog i/ili nervnog sistema. Kao što je prethodno pomenuto, veličina tela, a samim tim i krila *Drosophila* trebalo bi da bude koordinisana sa stopom i trajanjem larvalnog rasta pa se očekuje da duže razviće rezultuje većom veličinom adulta. Veličina tela je blisko povezana sa adaptivnom vrednošću jedinke. Tako je pokazano je da krupnije jedinke imaju generalno bolji fitnes, najčešće odražen kroz fekunditet (Patenković i sar., 2015). Međutim, u ovom radu je pokazan upravo suprotan trend, dužina razvića u stresnim uslovima je znatno povećana u odnosu na optimalne uslove sredine, a veličina krila u istim uslovima znatno redukovana. Moguće je da štetno dejstvo olova simultano deluje na procese rasta i razvića ograničavajući i jedan i drugi proces kroz ometanje signalnih puteva neophodnih za njihovu uspešnu koordinaciju i kompletiranje. U stresnim uslovima je energija neophodna i za održavanje osnovnih metaboličkih funkcija ali i za prevazilaženje i otklanjanje

posledica negativnog uticaja stresnog faktora koji zahteva aktiviranje energetski skupih mehanizama odbrane, kao što su aktiviranje proteina toplotnog šoka ili metalotioneina u slučaju izlaganja olovom ukazujući na mogući *trade-off* između ovih osobina u stresnim uslovima. Svakom organizmu je dostupna samo određena količina energetskih resursa koje treba usmeriti i raspodeliti između energetskih veoma zahtevnih procesa preživljavanja, razvića, reprodukcije, rasta i veličine tela. U stresnim uslovima, kada je neophodno raspodeliti ograničene dostupne izvore energije u cilju prevazilaženja nepovoljnih uslova, alokacija resursa u jednu osobinu obično dovodi do redukcije druge (van Noordwijk i de Jong, 1986; Stearns, 1992; Reznick i sar., 2000; Roff, 2002). Moguće je da pod stresnim uslovima izazvanim prisustvom olova u podlozi jedinke alociraju dostupne resurse u kompletiranje razvića time što ga produžuju čime im ostaje manje dostupne energije za dostizanje optimalnog rasta, pa dolazi do redukcije veličine tela. S obzirom da molekularni mehanizmi štetnog efekta olova nisu detaljno proučavani kod *Drosophila* oba objašnjenja su jednako moguća. Ono što se na osnovu rezultata ove studije može nesumnjivo zaključiti je da se u uslovima izlaganja olovu, uočava pad adaptivne vrednosti jer je jedinkama potrebno i duže vreme da kompletiraju razviće, čime im se smanjuje veličina tela.

Statistički značajan efekat tipa ukrštanja navodi na dva pravca razmišljanja. Prvi je da čak i relativno mala stopa inbridinga značajno smanjuje veličinu krila obzirom da je efekat smanjenja najizraženiji kod UL jedinki. Čak i u optimalnim uslovima za rast i razviće došlo je do značajnog smanjenja veličine krila ukazujući na inbriding depresiju. Najverovatniji razlog ovako dobijenih rezultata leži u tome što je kod ovih jedinki došlo do ekspresije štetnih recesivnih alela u homozigotnom stanju koji su, kao i u slučaju preživljavanja, doveli do pada ove komponente adaptivne vrednosti. Iako inbriding ima generalno manji efekat na veličinu tela u poređenju sa drugim osobinama životne istorije, redukcija veličine inbredovanih jedinki pokazana je u nekoliko studija (Bos i Scharloo, 1974; Trotta i sar., 2011) ukazujući da mutacije koje smanjuju adaptivnu vrednost takođe mogu dovesti i do smanjenja veličine tela, najverovatnije kroz ometanje, a posledično i smanjenje

normalnih procesa rasta. Jedan od razloga ovakvih rezultata može biti ekspresija velikog broja štetnih alela sa malim pojedinačnim efektom.

Povećanje krila sa povećanjem nivoa heterozigotnosti genoma nedvosmisleno pokazuje da je i u slučaju ove komponente adaptivne vrednosti došlo do pozitivnih efekta autbridginga, odnosno heterozisa. Ovaj efekat je naročito izražen u stresnim uslovima u kojim heterozigoti pokazuju generalnu manju redukciju veličine krila u odnosu na homozigote, dok u slučaju BB dir jedinki redukcija potpuno izostaje. UP jedinke iz Botaničke bašte su generalno manje od jedinki iz Sićevačke klisure. Ovo se može pripisati specifičnim uslovima staništa Botaničke bašte koje predstavlja relativno malu zelenu površinu, pod jakim antropogenim uticajem u kojoj su jedinke prinuđene da se izbore sa nepovoljnim uslovima, visokom kompeticijom i ograničenom disperzijom što posledično može uticati na adaptivnu vrednost i smanjenje veličine tela i krila (Sustek, 1987; Blake i sar., 1994; Niemalä i sar., 2000). Održavanje veličine krila kod BB dir grupe u stresnim uslovima može predstavljati indikaciju da u ovoj populaciji postoji preadaptacija na zagađenje olovom, s tim što ovu indikaciju moramo uzeti sa rezervom s obzirom da je kod recipročnih ukrštanja u ovoj populaciji došlo do jasne redukcije veličine. Iako ne postoje značajne razlike između UP i MP grupa, jasno je da se sa povećanjem nivoa genomske heterozigotnosti smanjuje negativan uticaj sredinskog stresa izazvanog olovom. Obzirom da heterozigotnost UP i MP jedinki počiva na različitim osnovama, moguće je da su u osnovi heterozisa ove dve grupe različiti mehanizmi. Moguće je da UP jedinke imaju veće sposobnosti kanalsanja razvojnih procesa u stresnim uslovima zbog heterozigotnog stanja *per se*, a da su kod MP dodatni pozitivni efekti proizašli i zbog novih pozitivnih interakcija između lokusa i/ili razdvajanja negativnih interakcija fiksiranih u originalnim populacijama. Bez obzira na mehanizam kojim može ležati u osnovi boljeg adaptivnog odgovora heterozigotnih jedinki, može se zaključiti da je heterozigotnost i maskiranje uslovno štetnih recesivnih alela od velike važnosti za održavanje populacija, naročito u stresnim uslovim sredine (Lynch, 1991; Erickson i Fenster, 2006; Edmands i sar., 2009).

Analiza veličine krila je ustanovljeni metod za procenu uticaja sredinskog i genomskog stresa koja je pokazala svoju osetljivost detekcije na velikom broju

vrsta i populacija. Osetljivost metode se pokazala i u ovom radu obzirom da je jedino analizom veličine krila utvrđena interakcija između dva tipa ispitivanog stresa. Olovo, kao izvor sredinskog stresa, najznačajnije utiče na redukciju veličine krila upravo kod UL jedinki jasno ukazujući da je čak i relativno mala homozigotizacija genoma u stresnim uslovima može imati dalekosežne štetne posledice na populaciju i njenu adaptivnu vrednost. Pokazano je da je efekat sredinskog stresa najizraženiji u populacijama sa narušenom genetičkom strukturom, u kojima je usled smanjenja brojnosti i genetičkog drifta došlo do gubitka genetičke varijabilnosti (Keller i Waller, 2002). Genetička varijabilnost je resurs kojim populacija odgovara na stresne uslove sredine, i ako je smanjena postoji mogućnost da populacija neće moći da na adekvatan način odgovori na novonastale uslove i da će doći do pada adaptivne vrednosti. Smanjenje genetičke varijabilnosti usled antropogenih uticaja koji se ogledaju kroz fragmentaciju i narušavanje staništa, možda je jedan od najznačajnijih štetnih uticaja ljudskih aktivnosti na živi svet. Fragmentacijom staništa smanjuje se i efektivna veličina populacija i ograničava broj jedinki koje mogu da stupe u reproduktivne odnose što posledično može dovesti do homozigotizacije genoma i smanjenja genetičke varijabilnosti. Gubitak genetičke varijabilnosti popravilo dovodi do povećanja homozigotnosti i najčešće rezultira inbriding depresijom koja se dodatno intenzivira u stresnim uslovima staništa i raste sa nivoom stresa. S obzirom da fragmentacija staništa najčešće sa sobom donosi i narušene uslove sredine u vidu drugih oblika sredinskog stresa prirodne populacije će sve više biti izložene simultanom delovanju genomskog i sredinskog stresa čije su posledice, kako je pokazano i u ovom radu, daleko veće nego delovanje pojedinačnih stresnih faktora. Dodatnu podršku da je genetička struktura populacije veoma važna za održavanje visoke adaptivne vrednosti naročito u stresnim uslovima, su rezultati koji ukazuju da je štetni efekat olova manje izražen kod heterozigotnih jedinki. Kao i kod komponenti adaptivne vrednosti, heterozigoti imaju veću sposobnost da zadrže optimalan fenotip u stresnim uslovima. Ovi rezultati su u skladu sa velikim brojem istraživanja koja su pokazala da heterozis ima veći intenzitet u stresnim sredinama gde je maskiranje štetnih, uslovno eksprimiranih recesivnih alela od značajne

prednosti za adaptivnu vrednost (Reed i sar., 2002, 2012; Joubert i Bijlsma, 2010; Bijlsma and Loeschcke, 2012).

Evoluciona istorija populacija koje dolaze u sekundarni kontakt ima značajan efekat na ishod hibridizacije. Spajanje dve populacije koje su evoluirale u različitim ekološkim uslovima može dovesti do razvoja različitih genetičkih konteksta, može doći ili do heterozisa ili do autbriding depresije. Usled spajanja dva različita genofonda može doći do segregacije fiksiranih štetnih alela prisutnih u osnivačkim populacijama pri čemu detektujemo heterozis. Međutim, svaka populacija teži da fiksira alele koji joj u datim uslovima sredine obezbeđuju maksimalni fitnes što može dovesti do stvaranja koadaptiranih genskih kompleksa kao vida neravnoteže vezanosti (koji se održava inbridingom). Razbijanje ovih kompleksa rekombinacijama može dovesti do autbriding depresije. Iako se pod koadaptiranim genskim kompleksom najčešće smatraju Dobžanski-Milerove nukleusne koadaptacije, koadaptirani genski kompleks može da se odnosi i na koadaptaciju nukleusnog i mitohondrijskog genoma koji se materinski nasleđuje. Primećena je redukcija veličine krila na supstratu sa olovom u MP grupama samo kod jedinki čije su majke poreklom iz relativno nezagađene sredine, Sićevačke klisure. Ovo ukazuje na veliki značaj populacionog porekla ženke i citoplazmatskog uticaja i mtDNK transfera. Geni na mtDNK zajedno sa nuklusnim genomom zajedno učestvuju u koordinisanom metaboličkom sistemu ćelije i procesima uključenim u oksidativnu fosforilaciju i elektron transportni lanac (OXPHOS) i energetske metabolizam ćelije. Novija istraživanja ukazuju da geni na mtDNK koevoluiraju sa nukleusnim genima sa kojima zajedno učestvuju u formiranju enzimskih kompleksa odgovornih za proizvodnju energije u mitohondrijama (Arnqvist i sar., 2010) a da sredinski faktori kao što je temperatura favorizuju određene mito-nukleusne kombinacije (Dowling i sar., 2007). Ako pretpostavimo da je varijabilnost mtDNK oblikovana prirodnom selekcijom (Ballard i Whitlock, 2004; Ballard i Rand, 2005; Meiklejohn i sar., 2007; Kazancioglu and Arnqvist, 2014) moguće je da ženke poreklom iz zagađene sredine imaju efikasniji (OXPHOS) i da svojim potomcima omogućavaju bolju adaptivnu vrednost u stresnim uslovima, bar što se veličine tela tiče. Ako uzmemo u obzir da olovo utiče na energetske metabolizam ćelije povećavajući produkciju

slobodnih radikala kiseonika, moguće je da je izloženost ženki olovu u prirodnom staništu Botaničke bašte uticalo na povećanje efikasnosti mitohondrijalnih enzima koji su mogli rezultirati u održavanju veličine tela njihovih potomaka.

5.3. Ekspresija Hsp proteina

Proteini toplotnog šoka su velika familija molekularnih šaperona koji učestvuju u „*house-keeping*“ funkcijama u ćeliji. Njihova osnovna funkcija je sprečavanje neodgovarajućih agregacija drugih proteina a učestvuju i u transportu, savijanju, odvijanju, sastavljanju i rastavljanju multistrukturnih jedinica i degradaciji pogrešno sastavljenih i agregiranih proteina (Sørensen i sar., 2003). Normalno odvijanje svih ovih procesa je izuzetno važno za funkcionisanje ćelija i u optimalnim uslovima (Frydman, 2001; Hartl i Hayer-Hartl, 2002) ali se potreba za molekularnim šaperonima intenzivira u stresnim uslovima koji mogu oštetiti ćelijske i molekularne strukture. Hsp70 familija proteina toplotnog šoka je možda najizučavanija familija molekularnih šaperona koja je uključena u odgovor na brojne tipove stresa (Steinert i Pickwell, 1993; Matz i sar., 1996; Wong i sar., 1996; Su i Gordon 1997; Kristensen i sar., 2002; Cheng i sar., 2006; Košťál i Tollarová-Borovanská, 2009). Ono što je bitno istaći je da je indukcija svih Hsp proteina neraskidivo vezana sa realizovanom nišom organizma koji se ispituje (Feder i Hofmann, 1999) i da je indukciju ovih proteina izaziva sredinski i/ili genomski stres koji je veći od opsega stanja koje jedinke i populacije doživljavaju u uslovima svojih prirodnih staništa.

Prirodne populacije su konstantno izložene promenljivoj sredini i genetičkim izazovima. Proteini toplotnog šoka ublažavaju sredinske varijacije i stoga predstavljaju važan faktor za održavanje homeostaze u nizu sredinskih režima (Sørensen i sar., 2003; Tomanek, 2010), ali su i mehanizam koji ublažava negativne efekte poremećene genetičke homeostaze izazvane inbridingom i autbridingom (Kristensen i sar., 2002; Trotter i sar., 2002; Zhao i sar., 2002; Pedersen i sar., 2005). S obzirom na činjenicu da Hsp utiče na komponente adaptivne vrednosti pod suboptimalnim uslovima, regulacija i ekspresija Hsp proteina je od velikog ekološkog i evolucionog značaja. Iako ekstremni stresni uslovi nesumnjivo indukuju povećanu ekspresiju Hsp proteina, promene u nivou ekspresije u uslovima konstantnih sredinskih izazova je od velike važnosti (Sørensen i sar., 2003). Nivoi ekspresije Hsp proteina, u svakoj populaciji i vrsti, predstavljaju fini balans između prednosti koja se dobija kroz razvijanje otpornosti

na stres i cene koja je izražena kroz štetni uticaj povećane ekspresije na rast, brzinu razvića i fertilitet (Sørensen i sar., 2003). Produkcija i funkcija Hsp-ova je energetski zahtevna i koristi značajni deo ćelijske energije dostupne u vidu ATP-a, a pokazano je da je povećan nivo ekspresije u nestresnim uslovima štetan (Feder i sar., 1992; Krebs i Loeschke, 1994; Silbermann i Tatar, 2000). Ranije pretpostavke da je povećana ekspresija Hsp proteina neposredni, kratkotrajni odgovor organizma nastao uglavnom usled vanrednih stanja u ćeliji polako zamenjuju dokazi da je nivo ekspresije Hsp-a fino regulisan mehanizam i da je njihova ekspresija konstantna i nakon blagog hroničnog delovanja stresnih faktora (Sørensen i sar., 2003). Takođe, lokalna adaptacija kao i adaptacija na hronične uslove sredinskog stresa dovodi do selekcije protiv povećanih nivoa ekspresije Hsp, pri čemu jedinke adaptirane na određen tip stresa smanjuju njihovu produkciju alocirajući resurse u druge mehanizme odbrane u stresnim uslovima (Sørensen i sar., 1999, 2001; Kohler i sar., 2000).

Rezultati dobijeni u ovom radu su pokazali da genomski stres izazvan inbridingom i autbridingom nema statistički značajan uticaj na promenu ekspresije Hsp proteina u kontrolnim uslovima. Iako je veći broj studija pokazao povećanu ekspresiju Hsp proteina pri različitim nivoima inbridinga (Kristensen i sar., 2002, 2010), dobijeni rezultati nisu u skladu sa ovim rezultatima. Moguće je da je nivo inbridinga prisutan kod UL jedinki korišćenih u ovom radu bio nedovoljan za detekciju promena u ekspresiji Hsp proteina bez obzira na činjenicu da je štetni efekat jasno zabeležen posmatranjem komponenti adaptivne vrednosti i varijabilnosti veličine krila. Ekspresija Hsp proteina merena kako konvencionalnim western blot i ELISA metodama, tako i metabolomički profili ekspresije ovih gena pokazuju veliku međulinijsku varijabilnost u nivoima ekspresije (Sørensen i sar., 2005; Pedersen i sar., 2008). Stoga je moguće da je upravo visok koeficijent varijacije, odnosno velika međulinijska varijabilnost doprinela gubitku statističke značajnosti i ujednačavanju nivoa ekspresije Hsp proteina između ispitivanih grupa.

Neočekivani rezultat je statistički značajna redukcija ekspresije Hsp proteina primećena kod UL ukrštanja u uslovima zagađenja olovom. Jedno od

mogućih objašnjenja ovih rezultata je da je sinergistički efekat inbridinga i zagađenja olovom predstavljao suviše visok intenzitet stresa da bi izazvao odgovor posredovan proteinima toplotnog šoka i da su energetske resursi morali da budu alocirani u neki druge mehanizme odbrane. Slični rezultati su primećeni i u eksperimentu na leptiru *Bicyclus anynana*, gde su inbredovane jedinke u uslovima velikog temperaturnog stresa pokazale smanjenu ekspresiju Hsp proteina u odnosu na kontrolne uslove (Franke i Fischer, 2015). Odsustvo odgovora jednog od najvažnijeg sistema za prevazilaženje stresnih uslova može da bude i jedan od razloga za uočenu redukciju komponenti adaptivne vrednosti i izraženo smanjenje veličine krila unutar-linijskih grupa u stresnim uslovima zagađenja olovom. Redukcija odgovora molekularnih šaperona mogla je povećati količinu pogrešno agregiranih i savijenih proteina i time dodatno ometati ćelijsku homeostazu što je posledično dovelo do pada adaptivne vrednosti ovih grupa. Prateći ovu nit razmišljanja, možemo uočiti i značaj trenda povećane ekspresije Hsp proteina u UP i MP grupama u uslovima izlaganja olovu. Povećana koncentracija bi mogla da ukazuje da je stres izazvan prisustvom olova u podlozi uspešno prevaziđen povećanim prisustvom Hsp proteina i njihovom sposobnošću da uspostave ćelijsku homeostazu i omoguće ovim jedinkama normalni proces razvića. Povećano prisustvo inducibilnih Hsp proteina kod BB jedinki a odsustvo odgovora kod B jedinki u uslovima izlaganja olovu dodatno podržavaju ovu hipotezu.

Jednaka ekspresija Hsp proteina dobijena kod BB jedinki u kontrolnim i uslovima zagađenja olovom mogla bi da odražava prethodne adaptacije ove grupe na prisustvo olova u staništu koje ove jedinke nastanjuju u prirodi, s obzirom na to da je pokazano da lokalna adaptacija dovodi do smanjenja ekspresije ovih proteina u stresnim uslovima (Sørensen i sar., 1999, 2001; Knigge i Köhler, 2000).

6. ZAKLJUČCI

1. Veliki broj radova, uključujući i ovu doktorsku disertaciju, pokazuje smanjenje komponenti adaptivne vrednosti i smanjenje veličine tela kod inbredovanih jedinki i njihovo povećanje, odnosno heterozis ili hibridnih vigor kod jedinki sa većim nivoom heterozigotnosti genoma.
2. Različite komponente adaptivne vrednosti imaju različitu snagu detektovanja intenziteta sredinskog i genomskog stresa. Dužina razvića od jaja do adulta se pokazala kao dobar indikator sredinskog i genomskog stresa, s obzirom da postoji statistički značajno produženje vremena neophodnog za kompletiranje ciklusa razvića kod svih jedinki tretiranih olovom. Preživljavanje od jaja do adulta se pokazalo kao dobar indikator prisustva genomskog stresa obzirom da je kod grupa sa niskim nivoom inbridinga došlo do značajne redukcije ove komponente adaptivne vrednosti u poređenju sa grupama sa većom heterozigotnošću genoma.
3. Uočen je trend sinergističkog efekta genomskog i sredinskog stresa, s obzirom da obe posmatrane komponente adaptivne vrednosti imaju najizraženiju redukciju u inbredovanim grupama izloženim sredinskom stresu. Ovaj trend je statistički značajan za veličinu krila, s obzirom da je najintenzivnija redukcija veličine primećena upravo kod inbredovanih jedinki. Čak i mali stepen inbridinga u uslovima sredinskog stresa utiče na pad adaptivne vrednosti i potencijano ugrožava opstanak populacije.
4. Rezultati nedvosmisleno potvrđuju hipotezu heterozigotne superiornost koja se intenzivira u stresnim uslovima za sve ispitivane osobine i u skladu su sa velikim brojem istraživanja koji pokazuju da je heterozigotnost i maskiranje uslovno štetnih recesivnih alela od velike važnosti za održavanje populacija, naročito u stresnim uslovima sredine.
5. Nijedna od ispitivanih osobina nije pokazala populaciono specifičan odgovor u prisustvu olova kao izvora sredinskog stresa. Najverovatniji razlozi ovih rezultata leže u činjenici da je u ovom radu bila izvršena procena postojeće genetičke varijabilnosti i da je intenzitet sredinskog stresa primenjen u ovom radu bio nedovoljan da detektuje znake preadaptacije.
6. Na ishod međupopulacione hibridizacije veliki uticaj ima poreklo ženke i prethodna evolucionarna istorija njene prirodne populacije. Pad veličine krila

kod među-populacijskih hibrida utvrđen je samo kod jedinki kod kojih je ženka poreklom iz populacije Sićevačke klisure, što jasno ukazuje da je poreklo ženke važno sa aspekta citoplazmatskog uticaja, mtDNA transfera i potencijalnog adaptivnog značaja kompleksa gena u okviru mitohondrija.

7. Zagađenje olovom indukuje povećanu ekspresiju Hsp proteina kod heterozigotnih jedinki, međutim kod jedinki sa smanjenom heterozigotnošću odgovor omogućen sistemom koji je najvažniji za ublažavanje štetnih posledica stresa na ćelijskom nivou potpuno izostaje.

7. LITERATURA

Acharya, U.R., Acharya, S., and Mishra, M. (2003). Lead acetate induced cytotoxicity in male germinal cells of Swiss mice. *Industrial health*, 41(3):291-294

Agarwal, S.K. (2009). *Heavy metal pollution (Vol. 4)*. APH publishing

Ahn, Y.O., Kim, S.H., Lee, J., Kim, H., Lee, H.S., and Kwak, S.S. (2012). Three *Brassica rapa* metallothionein genes are differentially regulated under various stress conditions. *Molecular biology reports*, 39(3):2059-2067.

Albasel, N., and Cottenie, A. (1985). Heavy metal contamination near major highways, industrial and urban areas in Belgian grassland. *Water, Air, and Soil Pollution*, 24(1):103-109

Amin, O.A., Rodriguez, E.M., Hernando, M., Comoglio, L.I., Lopez, L.S., and Medesani, D.A. (1998). Effects of lead and cadmium on hatching of the southern king crab *Lithodes santolla* (Decapoda, Anomura). *Invertebrate reproduction and development*, 33(1):81-85.

Anđelković, M., Stamenković-Radak, M. (2013). *Geni u populacijama*. Univerzitet u Beogradu-Biološki Fakultet.

Angeloni, F., Ouborg, N.J., and Leimu, R. (2011). Meta-analysis on the association of population size and life history with inbreeding depression in plants. *Biological Conservation*, 144(1):35-43.

Arendt, J.D. (1997). Adaptive intrinsic growth rates: an integration across taxa. *Quarterly Review of Biology*, 149-177.

Armbruster, P., Bradshaw, W.E., and Holzapfel, C.M. (1997). Evolution of the genetic architecture underlying fitness in the pitcher-plant mosquito, *Wyeomyia smithii*. *Evolution*, 451-458.

Armbruster, P., Hutchinson, R.A., and Linnell, T. (2000). Equivalent inbreeding depression under laboratory and field conditions in a tree-hole-breeding mosquito. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 267(1456):1939-1945.

Armbruster, P., and Reed, D.H. (2005). Inbreeding depression in benign and stressful environments. *Heredity*, 95(3):235-242.

Arnqvist, G., Dowling, D.K., Eady, P., Gay, L., Tregenza, T., Tuda, M. and Hosken, D.J. (2010). Genetic architecture of metabolic rate: environment specific

epistasis between mitochondrial and nuclear genes in an insect. *Evolution*, 64:3354–3363.

Ayroles, J.F., Hughes, K.A., Rowe, K.C., Reedy, M.M., Rodriguez-Zas, S.L., Drnevich, J.M., Cáceres, C.E. and Paige, K.N. (2009). A genomewide assessment of inbreeding depression: gene number, function, and mode of action. *Conservation Biology*, 23:920–930.

Baena-López, L.A., Baonza, A. and García-Bellido, A. (2005). The orientation of cell divisions determines the shape of *Drosophila* organs. *Current Biology*, 15(18):1640-1644.

Bakker, K. (1959). Feeding period, growth, and pupation in larvae of *Drosophila melanogaster*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 2(3):171-186.

Bakker, K. (1969). An analysis of factors which determine success in competition for food among larvae of *Drosophila melanogaster*. *Archive of Neerl. Zoology*, 14:200-281.

Ballard, J.W.O., and Rand, D.M. (2005). The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 621-642.

Ballard, J.W.O., and Whitlock, M.C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4):729-744.

Baranwal, V.K., Mikkilineni, V., Zehr, U.B., Tyagi, A.K., and Kapoor, S. (2012). Heterosis: emerging ideas about hybrid vigour. *Journal of experimental botany*, 63(18):6309-6314.

Barrett, R.D., and Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in ecology and evolution*, 23(1):38-44

Barth, L.G., and Barth, L.J. (1974). Ionic regulation of embryonic induction and cell differentiation in *Rana pipiens*. *Developmental biology*, 39(1):1-22.

Berger, E. (1976). Heterosis and the maintenance of enzyme polymorphism. *American Naturalist*, 823-839.

Berridge, M. J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays*, 17(6):491-500.

Bertness, M.D., Leonard, G.H., Levine, J.M., and Bruno, J.F. (1999). Climate-driven interactions among rocky intertidal organisms caught between a rock and a hot place. *Oecologia*, 120(3):446-450.

Berzins, D.W., and Bundy, K.J. (2002). Bioaccumulation of lead in *Xenopus laevis* tadpoles from water and sediment. *Environment international*, 28(1):69-77

Bijlsma, R. and Loeschcke, V. (eds)(1997). *Environmental Stress, Adaptation and Evolution*. Birkhäuser Verlag, Basel, CH.

Bijlsma, R., Bundgaard, J. and Van Putten, W.F. (1999). Environmental dependence of inbreeding depression and purging in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, 12:1125-1137.

Bijlsma, R., Bundgaard, J. and Boerema, A.C. (2000). Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, 13(3):502-514.

Bijlsma, R. and Loeschcke, V. (2005). Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *Journal of Evolutionary Biology*, 18:744-749

Bijlsma, R., and Loeschcke, V. (2012). Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments, *Evolutionary Applications*, 5(2):117-129.

Blake, S., Foster, G.N., Eyre, M.D., and Luff, M.L. (1994). Effects of habitat type and grassland management practices on the body size distribution of carabid beetles. *Pedobiologia*, 38:502-512.

Bonham, R.T., Fine, M.R., Pollock, F.M., and Shelden, E.A. (2003). Hsp27, Hsp70, and metallothionein in MDCK and LLC-PK1 renal epithelial cells: effects of prolonged exposure to cadmium. *Toxicology and applied pharmacology*, 191(1):63-73.

Borsa, P., Jouselin, Y., and Delay, B. (1992). Relationships between allozymic heterozygosity, body size, and survival to natural anoxic stress in the palourde *Ruditapes decussatus* L. (Bivalvia: Veneridae). *Journal of experimental marine Biology and Ecology*, 155(2):169-181

Bos, M., and Scharloo, W. (1973). The effects of disruptive and stabilizing selection on body size in *Drosophila melanogaster*. I. Mean values and variances. *Genetics*, 75(4):679-693

Breuker, C.J., Patterson, J.S., and Klingenberg, C.P. (2006). A single basis for developmental buffering of *Drosophila* wing shape. *PLoS one*, 1(1), e7.

Brown, B.E. (1976). Observations on the tolerance of the isopod *Asellus meridianus* Rac. to copper and lead. *Water Research*, 10(6):555-55.

Bryant, E.H. (1974). On the adaptive significance of enzyme polymorphisms in relation to environmental variability. *American Naturalist*, 1-19.

Bubliy, O.A. and Loeschcke, V. (2001). High stressful temperature and genetic variation of five quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Genetica*, 110:79-83

Bubliy, O.A. and Loeschcke, V. (2002). Effect of low stressful temperature on genetic variation of five quantitative traits in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 89:70-75

Buerkle, C.A. and L.H. Rieseberg. (2008). The rate of genome stabilization in homoploid hybrid species. *Evolution*, 62:266-275

Burnet, B., Sewell, D., and Bos, M. (1977). Genetic analysis of larval feeding behaviour in *Drosophila melanogaster*: II. Growth relations and competition between selected lines. *Genetical Research*, 30(02):149-161.

Calow, P. (1991). Physiological costs of combating chemical toxicants: ecological implications. *Comparative Biochemical Physiology*, 1/2:3-6

Canli, M. and Atli, G. (2003). The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environmental pollution*, 121(1):129-136.

Cardinale, B.J., Duffy, J.E., Gonzalez, A., Hooper, D.U., Perrings, C., Venail, P., ... and Kinzig, A.P. (2012). Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486(7401):59-67.

Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., and Ruedel, H. (2003). Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicology and environmental safety*, 56(1):45-51.

Cervera, A., Maymo, A.C., Sendra, M., Martinez-Pardo, R., and Garcera, M.D. (2004). Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae). *Journal of insect physiology*, 50(8):737-749.

Charlesworth, B. and Charlesworth, D (1999). The genetic basis of inbreeding depression. *Genetical Research*, 74:329-340

Charlesworth, D., and Willis, J.H. (2009). The genetics of inbreeding depression. *Nature Reviews Genetics*, 10(11):783-796.

Chen, I.C., Hill, J.K., Ohlemüller, R., Roy, D.B., and Thomas, C.D. (2011). Rapid range shifts of species associated with high levels of climate warming. *Science*, 333(6045):1024-1026.

Chen, J., Nolte, V., and Schlötterer, C. (2015). Temperature stress mediates decanalization and dominance of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, 11(2):e1004883.

Cheng, P., Liu, X., Zhang, G., and Deng, Y. (2006). Heat-shock protein70 gene expression in four hatchery Pacific Abalone *Haliotis discus hannai* Ino populations using for marker-assisted selection. *Aquaculture Research*, 37(13):1290-1296.

Cheptou, P.O., and Donohue, K. (2011). Environment-dependent inbreeding depression: its ecological and evolutionary significance. *New Phytologist*, 189(2):395-407.

Chevin, L.M., Lande, R., and Mace, G.M. (2010). Adaptation, plasticity, and extinction in a changing environment: towards a predictive theory. *PLoS Biology*, 8(4):e1000357.

Chinni, S. and Yallapragada, P.R. (2002). Energy levels of *Penaeus indicus* postlarvae on exposure to lead. *Ecotoxicology and environmental safety*, 52(3):173-179

Chinni, S., Khan, R.N. and Yallapragada, P.R. (2000). Oxygen consumption, ammonia-N excretion, and metal accumulation in *Penaeus indicus* postlarvae exposed to lead. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 64(1):144-151

Chowdhury, R.A, Chinoy, N.J., Gautam, A.K., Rao, R.V., Parikh, D.J., Shah, G.M., Highland, H.N., Patel, K.G. and Chatterjee, B.B. (1986). Effect of lead on human semen. *Contraceptive Delivery System* 2:208-10

Chowdhury, R.A, Dewan, A. and Gandhi D.N. (1984). Toxic effect of lead on the testes of rat. *Biomed Biochem Acta* 1:95-100

Cohn, J., Widzowski, D.V., and Cory-Slechta, D.A. (1992). Lead retards development of *Drosophila melanogaster*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 102(1):45-49.

Coltman, D.W. and Slate, J. (2003), Microsatellite measures of inbreeding: a meta-analysis. *Evolution*, 57:971–983

Coors, A., Vanoverbeke, J., De Bie, T., and De Meester, L. (2009). Land use, genetic diversity and toxicant tolerance in natural populations of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, 95(1):71-79.

Crnokrak, P., and Barrett, S.C. (2002). Perspective: purging the genetic load: a review of the experimental evidence. *Evolution*, 56(12):2347-2358.

Crow, J.F. (2008). Mid-century controversies in population genetics. *Annual review of genetics*, 42:1-16.

Dahlgaard, J., and Hoffmann, A.A. (2000). Stress resistance and environmental dependency of inbreeding depression in *Drosophila melanogaster*. *Conservation Biology*, 14(4):1187-1192.

Darwin, C.R. (1876). *The Effects of Cross and Self Fertilization in the Vegetable Kingdom* John Murray, London.

Daszak, P., Cunningham, A.A., and Hyatt, A.D. (2000). Emerging infectious diseases of wildlife--threats to biodiversity and human health. *Science*, 287(5452):443-449.

Davidowitz, G., D'Amico, L.J., and Nijhout, H.F. (2003). Critical weight in the development of insect body size. *Evolution and development*, 5(2):188-197.

Davis M.B, Shaw R.G. and Etterson J.R (2005) Evolutionary responses to changing climate. *Ecology*, 86:1704–1714

de Celis, J.F. (2003), Pattern formation in the *Drosophila* wing: The development of the veins. *Bioessays*, 25:443–451

de Jong, G. and Imasheva, A. (2001). Genetic variance in temperature dependent adult size deriving from physiological genetic variation at temperature boundaries. *Genetica*, 110:193–207

De Loof, A. (2008). Ecdysteroids, juvenile hormone and insect neuropeptides: recent successes and remaining major challenges. *General and comparative endocrinology*, 155(1):3-13.

Debat, V., Bégin, M., Legout, H., and David, J.R. (2003). Allometric and nonallometric components of *Drosophila* wing shape respond differently to developmental temperature. *Evolution*, 57(12):2773-2784.

Debinski, D.M., and Holt, R.D. (2000). A survey and overview of habitat fragmentation experiments. *Conservation biology*, 14(2):342-355.

Di, G., You, W., Yu, J., Wang, D., and Ke, C. (2013). Genetic changes in muscle protein following hybridization between *Haliotis diversicolor reeve* Japan and Taiwan populations revealed using a proteomic approach. *Proteomics*, 13(5):845-859.

Dickson, G.W., Giesy, J.P., and Briese, L.A. (1982). The effect of chronic cadmium exposure on phosphoadenylate concentrations and adenylate energy charge of gills and dorsal muscle tissue of crayfish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1(2):147-156

Dietert, R.R., and Piepenbrink, M.S. (2006). Lead and immune function. *Critical reviews in toxicology*, 36(4):359-385.

Donker, M.H., Zonneveld, C., and Van Straalen, N.M. (1993). Early reproduction and increased reproductive allocation in metal-adapted populations of the terrestrial isopod *Porcellio scaber*. *Oecologia*, 96(3):316-323.

Dowling, D.K., Abiega, K.C., and Arnqvist, G. (2007). Temperature-specific outcomes of cytoplasmic-nuclear interactions on egg-to-adult development time in seed beetles. *Evolution*, 61(1):194-201

Dryden, I.L. and Mardia K.V. (1998). *Statistical Shape Analysis*. John Wiley and Sons, New York

Dudash, M.R. (1990). Relative fitness of selfed and outcrossed progeny in a self-compatible, protandrous species, *Sabatia angularis* (Gentianaceae): a comparison in three environments. *Evolution* 44:1129-1139.

Dworkin, I. and Gibson, G. (2006). Epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- β signaling contributes to variation for wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 173(3):1417-1431

Edmands, S. (2007). Between a rock and a hard place: evaluating the relative risks of inbreeding and outbreeding for conservation and management. *Molecular Ecology*, 16(3):463-475

Edmands, S., and Timmerman, C. C. (2003). Modeling factors affecting the severity of outbreeding depression. *Conservation Biology*, 17(3):883-892.

Edmands, S., Feaman, H.V., Harrison, J.S., and Timmerman, C.C. (2005). Genetic consequences of many generations of hybridization between divergent copepod populations. *Journal of Heredity*, 96(2):114-123.

Edmands, S., Northrup, S.L. and Hwang, A.S. (2009). Maladapted gene complexes within populations of the intertidal copepod *Tigriopus californicus*?. *Evolution*, 63(8):2184-2192

Ellison, C.K. and Burton, R.S. (2008). Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution*, 62:631–638

Enders, L.S., and Nunney, L. (2010). Sex-specific effects of inbreeding in wild-caught *Drosophila melanogaster* under benign and stressful conditions. *Journal of evolutionary biology*, 23(11):2309-2323.

Enders, L.S., and Nunney, L. (2012). Seasonal stress drives predictable changes in inbreeding depression in field-tested captive populations of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, rspb20121018.

Erickson, D.L., and Fenster, C.B. (2006). Intraspecific hybridization and the recovery of fitness in the native legume *Chamaecrista fasciculata*. *Evolution*, 60(2):225-233

Ewers, R.M., and Didham, R.K. (2006). Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews*, 81(01):117-142.

Fahrig, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 487-515.

Falconer, D.S., and T.F.C. MacKay. (1996). *Introduction to quantitative genetics*. 4th edition. Longman Scientific and Technical, Burnt Mill, Harlow, United Kingdom

Feder, J.H., Rossi, J.M., Solomon, J., Solomon, N., and Lindquist, S. (1992). The consequences of expressing hsp70 in *Drosophila* cells at normal temperatures. *Genes and development*, 6(8):1402-1413.

Ferreira, A.G., and Amos, W. (2006). Inbreeding depression and multiple regions showing heterozygote advantage in *Drosophila melanogaster* exposed to stress. *Molecular Ecology*, 15(13):3885-3893

Flatt, T., and Heyland, A. (Eds.). (2011). Mechanisms of life history evolution: the genetics and physiology of life history traits and trade-offs. OUP Oxford.

Flora, G., Gupta, D., and Tiwari, A. (2012). Toxicity of lead: a review with recent updates. *Interdisciplinary toxicology*, 5(2):47-58.

Flora, S., Saxena, G., and Mehta, A. (2007). Reversal of lead-induced neuronal apoptosis by chelation treatment in rats: role of reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 322(1):108-116

Fox, C.W., and Reed D.H. (2011). Inbreeding depression increases with environmental stress: an experimental study and meta-analysis. *Evolution*, 65:246–258

Franke, K., and Fischer, K. (2015). Inbreeding interferes with the heat-shock response. *Heredity*, 114(1):80-84.

Frankham, R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*. 126:131–140.

Frankham, R. (2005). Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of Evolutionary Biology*, 18:750–755

Frankham, R., Smith, G.J., and Briscoe, D.A. (1993). Effects on heterozygosity and reproductive fitness of inbreeding with and without selection on fitness in *Drosophila melanogaster*. *Theoretical and Applied Genetics*, 86(8):1023-1027.

Fraser, J., Parkin, D.T., and Verspoor, E. (1978). Tolerance to lead in the freshwater isopod *Asellus aquaticus*. *Water Research*, 12(8):637-641.

Fredrickson, R., and Hedrick, P. (2002). Body size in endangered Mexican wolves: effects of inbreeding and cross-lineage matings. *Animal Conservation*, 5(1):39-43

Fry, J.D., Heinsohn, S.L., and MacKay, T.F. (1996). The contribution of new mutations to genotype-environment interaction for fitness in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 2316-2327.

Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*, 70(1):603-647.

Garton, D.W., and Haag, W.R. (1991). Heterozygosity, shell length and metabolism in the European mussel, *Dreissena polymorpha*, from a recently

established population in Lake Erie. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 99(1-2):45-48.

Gavin-Smyth, J., Wang, Y.C., Butler, I., and Ferguson, E.L. (2013). A genetic network conferring canalization to a bistable patterning system in *Drosophila*. *Current Biology*, 23(22):2296-2302.

Gibson, G., and Hogness, D.S. (1996). Effect of polymorphism in the *Drosophila* regulatory gene *Ultrabithorax* on homeotic stability. *Science*, 271(5246):200.

Gilchrist, A.S., and Partridge, L. (2001). The contrasting genetic architecture of wing size and shape in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, 86(2):144-152.

Gilchrist, A.S., Azevedo, R.B.R., Partridge, L., and O'higgins, P. (2000). Adaptation and constraint in the evolution of *Drosophila melanogaster* wing shape. *Evolution and development*, 2(2):114-124.

Gillespie, J.H., and Langley, C.H. (1974). A general model to account for enzyme variation in natural populations. *Genetics*, 76(4):837-848.

Gintenreiter, S., Ortel, J., and Nopp, H.J. (1993). Effects of different dietary levels of cadmium, lead, copper, and zinc on the vitality of the forest pest insect *Lymantria dispar* L.(Lymantriidae, Lepid). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 25(1):62-66.

Goff, S.A. (2011). A unifying theory for general multigenic heterosis: energy efficiency, protein metabolism, and implications for molecular breeding. *New Phytologist*, 189(4):923-937.

Gonick, H.C. (2002). Lead, renal disease and hypertension. *American journal of kidney diseases*, 40(1):202-204.

Gorka, Z., Moryl, E., and Papp, M. (1996). Effect of chronic mild stress on circadian rhythms in the locomotor activity in rats. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, 54(1):229-234.

Gotthard, K., Nylin, S., and Wiklund, C. (1994). Adaptive variation in growth rate: life history costs and consequences in the speckled wood butterfly, *Pararge aegeria*. *Oecologia*, 99(3-4):281-289.

Groenendijk, D., Lücker, S.M., Plans, M., Kraak, M.H., and Admiraal, W. (2002). Dynamics of metal adaptation in riverine chironomids. *Environmental Pollution*, 117(1):101-109.

Gupta, D.K., Huang, H.G., Yang, X.E., Razafindrabe, B.H.N., and Inouhe, M. (2010). The detoxification of lead in *Sedum alfredii* H. is not related to phytochelatins but the glutathione. *Journal of hazardous materials*, 177(1):437-444.

Hartl, F.U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 571-580.

Hartl, F.U., and Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science*, 295(5561):1852-1858.

Haywood, L.K., Alexander, G.J., Byrne, M.J. and Cukrowska, E. (2004). *Xenopus laevis* embryos and tadpoles as models for testing for pollution by zinc, copper, lead and cadmium. *African Zoology*, 39(2):163-174

Hedrick, P.W. (1994). Purging inbreeding depression and the probability of extinction: full-sib mating. *Heredity*, 73(4):363-372.

Hedrick, P.W., and Fredrickson, R. (2010). Genetic rescue guidelines with examples from Mexican wolves and Florida panthers. *Conservation genetics*, 11(2):615-626.

Hedrick, P.W., and Kalinowski, S.T. (2000). Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 31:139–162

Hernberg, S. (2000). Lead Poisoning in a Historical Perspective. *American Journal Of Industrial Medicine*, 38: 244-254

Hirsch, H.V., Mercer, J., Sambaziotis, H., Huber, M., Stark, D.T., Torno-Morley, T., ... and Ruden, D M. (2003). Behavioral effects of chronic exposure to low levels of lead in *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology*, 24(3):435-442

Hirsch, H.V., Possidente, D., Averill, S., Despain, T. P., Buytkins, J., Thomas, V., ... and Possidente, B. (2009). Variations at a quantitative trait locus (QTL) affect development of behavior in lead-exposed *Drosophila melanogaster*. *Neurotoxicology*, 30(2):305-311.

Hoffmann, A.A. and Parsons, P.A. (1991). *Evolutionary Genetics and Environmental Stress*. Oxford University Press, Oxford, UK.

Hoffmann, A. A., and Parsons, P. A. (1993). Direct and correlated responses to selection for desiccation resistance: a comparison of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Journal of Evolutionary Biology*, 6(5):643-657.

Hoffmann, A.A., and Willi, Y. (2008). Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Reviews Genetics*, 9(6):421-432.

Hofmann, G.E., and Todgham, A.E. (2010). Living in the now: physiological mechanisms to tolerate a rapidly changing environment. *Annual review of physiology*, 72:127-145.

Hu, J.Z., Shi, G.X., Xu, Q.S., Wang, X., Yuan, Q.H., and Du, K.H. (2007). Effects of Pb²⁺ on the active oxygen-scavenging enzyme activities and ultrastructure in *Potamogeton crispus* leaves. *Russian Journal of Plant Physiology*, 54(3):414-419.

Huang, M.Y., Duan, R.Y., and Ji, X. (2014). Chronic effects of environmentally-relevant concentrations of lead in *Pelophylax nigromaculata* tadpoles: Threshold dose and adverse effects. *Ecotoxicology and environmental safety*, 104:310-316

Hudson, L.A. and Ciborowski, J.J.H. (1996). Teratogenic and genotoxic responses of larval *Chironomus salinarius* group (diptera: Chironomidae) to contaminated sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15:1375-1381

Hwang, A.S., Northrup, S.L., Alexander, J.K., Vo, K.T., and Edmands, S. (2011). Long-term experimental hybrid swarms between moderately incompatible *Tigriopus californicus* populations: hybrid inferiority in early generations yields to hybrid superiority in later generations. *Conservation Genetics*, 12(4):895-909.

Islam, E., Yang, X., Li, T., Liu, D., Jin, X., and Meng, F. (2007). Effect of Pb toxicity on root morphology, physiology and ultrastructure in the two ecotypes of *Elsholtzia argyi*. *Journal of hazardous materials*, 147(3):806-816.

Ives, A.R., and Cardinale, B.J. (2004). Food-web interactions govern the resistance of communities after non-random extinctions. *Nature*, 429(6988):174-177.

James, A.C., Azevedo, R.B., and Partridge, L. (1995). Cellular basis and developmental timing in a size cline of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 140(2):659-666.

Jarosz, D.F., and Lindquist, S. (2010). Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation. *Science*, 330(6012):1820-1824.

Järup, L. (2003). Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 68(1): 167-182

Jelić, M., Kenig, B., Kurbalija, Z., Stamenković-Radak, M., and Anđelković, M. (2009). Intra-species differentiation among *Drosophila subobscura* from different habitats in Serbia. *Archive of Biological Science Belgrade*, 61(3):513-521.

Jelic, M., Kenig, B., Tanaskovic, M., Stamenkovic-Radak, M., and Anđelkovic, M. (2012). Relationship between chromosomal and mitochondrial DNA variability of *Drosophila subobscura* population from the Lazar's River Canyon. *Genetika*, 44(2):409-17.

Jelić, M., Castro, J.A., Kurbalija Novičić, Z., Kenig, B., Dimitrijević, D., Savić Veselinović, M., ... and Anđelković, M. (2012). Absence of linkage disequilibria between chromosomal arrangements and mtDNA haplotypes in natural populations of *Drosophila subobscura* from the Balkan Peninsula. *Genome*, 55(3):214-221.

Jeziarska, B., Ługowska, K., and Witeska, M. (2009). The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(4):625-640.

Jimenez, J.A., Hughes, K.A., Alaks, G., Graham, L., Lacy, R.C. (1994). An experimental study of inbreeding depression in a natural habitat. *Science* 266:271-273.

Kawecki, T.J., and Ebert, D.(2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology letters*, 7(12):1225-1241

Kazancıoğlu, E., and Arnqvist, G. (2014). The maintenance of mitochondrial genetic variation by negative frequency-dependent selection. *Ecology letters*, 17(1):22-27.

Keller, L.F., and Waller, D.M. (2002). Inbreeding effects in wild populations. *Trends in Ecology and Evolution*, 17(5):230-241

Kelly, J., Thornton, I. and Simpson, P.R. (1996). Urban geochemistry: a study of the influence of anthropogenic activity on the heavy metal content of soils in traditionally industrial and non-industrial areas of Britain. *Applied geochemistry*, 11(1):363-370

Kelly, T.R., Bloom, P.H., Torres, S.G., Hernandez, Y.Z., Poppenga, R.H., Boyce, W.M., and Johnson, C.K. (2011). Impact of the California lead ammunition ban

on reducing lead exposure in golden eagles and turkey vultures. PLoS One, 6(4) e17656

Kenig, B., Jelic, M., Kurbalija, Z., Stamenkovic-Radak, M., and Andjelkovic, M. (2010). Inversion polymorphism in populations of *Drosophila subobscura* from urban and non-urban environments. Archive of Biological. Science Belgrade, 62(3):565-574.

Kenig, B., Stamenković-Radak, M., and Anđelković, M. (2013). Population specific fitness response of *Drosophila subobscura* to lead pollution. Insect science, 20(2), 245-253.

Kenig, B., Patenković, A., Anđelković, M., and Stamenković-Rada, M. (2014). Life-history variation of *drosophila subobscura* under lead pollution depends on population history. Genetika, 46(3):693-703.

Kim, B.M., Rhee, J.S., Jeong, C.B., Seo, J.S., Park, G.S., Lee, Y.M., and Lee, J.S. (2014). Heavy metals induce oxidative stress and trigger oxidative stress-mediated heat shock protein (*hsp*) modulation in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus*. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 166:65-74.

Kim, S.J., Rodriguez-Lanetty, M., Suh, J.H., and Song, J.I. (2003). Emergent effects of heavy metal pollution at a population level: *Littorina brevicula* a study case. Marine Pollution Bulletin, 46(1):74-80.

Kinnison, M.T., Hendry, A.P., and Stockwell, C.A. (2007). Contemporary evolution meets conservation biology II: impediments to integration and application. Ecological Research 22(6):947-954

Kjærsgaard, A., Le, N., Demontis, D., Novicic, Z. K., Loeschcke, V., and Pertoldi, C. (2012). The effect of developmental temperature fluctuation on wing traits and stressed locomotor performance in *Drosophila melanogaster*, and its dependence on heterozygosity. Evolutionary Ecology Research, 14(7):803-819.

Kjærsgaard, A., Faurby, S., Thomsen, H.P., Loeschcke, V., Kristensen, T.N., and Pertoldi, C. (2014). Temperature-specific acclimation effects on adult locomotor performance of inbred and crossbred *Drosophila melanogaster*. Physiological Entomology, 39(2):127-135.

Klerks P.L. and Levinton J.S. (1993). Evolution of resistance and changes in community compositions in metal polluted environment: a case study of

Foundry Cove, pp. 223–241. In R. Dallinger and P. S. Rainbow (eds.), From ecotoxicology of metals in invertebrates. SETAC, America

Klingenberg, C. P. (2002). Morphometrics and the role of the phenotype in studies of the evolution of developmental mechanisms. *Gene*, 287(1):3-10.

Klingenberg, C.P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular ecology resources*, 11(2):353-357.

Klingenberg, C.P. and Zaklan, S.D. (2000). Morphological integration between developmental compartments in the *Drosophila* wing. *Evolution*, 54: 1273–1285.

Knigge, T., and Köhler, H.R. (2000). Lead impact on nutrition, energy reserves, respiration and stress protein (hsp 70) level in *Porcellio scaber* (Isopoda) populations differently preconditioned in their habitats. *Environmental Pollution*, 108(2):209-217.

Koehn, R.K. and Bayne, B.L. (1989). Towards a physiological and genetical understanding of the energetics of the stress response. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37:157-171

Kohane, M.J. (1994). Energy, development and fitness in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 257(1349):185-191.

Köhler, H.R., Eckwert, H., Tribskorn, R., and Bengtson, G. (1999). Interaction between tolerance and 70 kD stress protein (hsp70) induction in collembolan populations exposed to long-term metal pollution. *Applied Soil Ecology*, 11(1).

Köhler, H.R., Tribskorn, R., Stöcker, W., Kloetzel, P.M., and Alberti, G. (1992). The 70 kD heat shock protein (hsp 70) in soil invertebrates: a possible tool for monitoring environmental toxicants. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 22(3):334-338.

Kondrashov, A.S., and Houle, D. (1994). Genotype-environment interactions and the estimation of the genomic mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 258(1353):221-227.

Kong, Q., and Lin, C.L.G. (2010). Oxidative damage to RNA: mechanisms, consequences, and diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(11):1817-1829.

Koštál, V., and Tollarová-Borovanská, M. (2009). The 70 kDa heat shock protein assists during the repair of chilling injury in the insect, *Pyrrhocoris apterus*. PloS One, 4(2): e4546.

Kranner, I., and Colville, L. (2011). Metals and seeds: biochemical and molecular implications and their significance for seed germination. Environmental and Experimental Botany, 72(1):93-105.

Krebs, R.A., and Loeschcke, V. (1994). Costs and benefits of activation of the heat-shock response in *Drosophila melanogaster*. Functional Ecology, 8:730-737.

Krebs, R.A. and Loeschcke, V. (1995). Resistance to thermal stress in preadult *Drosophila buzzatii*: variation among populations and changes in relative resistance across life stages. Biological Journal of the Linnean Society, 56(4):517-531.

Kregel, K.C. (2002). Invited review: heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. Journal of applied physiology, 92(5):2177-2186.

Kristensen, T.N., Dahlgaard, J., and Loeschcke, V. (2002). Inbreeding affects Hsp70 expression in two species of *Drosophila* even at benign temperatures. Evolutionary Ecology Research, 4(8):1209-1216.

Kristensen, T.N., Dahlgaard, J., and Loeschcke, V. (2003). Effects of inbreeding and environmental stress on fitness—using *Drosophila buzzatii* as a model organism. Conservation Genetics, 4(4):453-465.

Kristensen, T.N., Pedersen, K.S., Vermeulen, C.J., and Loeschcke, V. (2010). Research on inbreeding in the 'omic'era. Trends in Ecology and Evolution, 25(1):44-52.

Kristensen, T.N., Sørensen, P., Kruhøffer, M., Pedersen, K.S., and Loeschcke, V. (2005). Genome-wide analysis on inbreeding effects on gene expression in *Drosophila melanogaster*. Genetics, 171(1):157-167

Kurbalija Novicic, Z., Kenig, B., Ludoski, J., Stamenkovic-Radak, M., and Andjelkovic, M. (2012). Lead-induced variation in wing size and shape in populations of *drosophila subobscura*. Environmental entomology, 41(4):979-988.

Lagisz, M. (2008). Changes in morphology of the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* F.(Coleoptera; Carabidae) from vicinities of a zinc and lead smelter. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(8):1744-1747.

Lagisz, M., Wolff, K., Sanderson, R.A., and Laskowski, R. (2010). Genetic population structure of the ground beetle, *Pterostichus oblongopunctatus*, inhabiting a fragmented and polluted landscape: Evidence for sex-biased dispersal. *Journal of Insect Science*, 10(1):105.

Lam, P.K. (1996). Effects of cadmium on the consumption and absorption rates of a tropical freshwater snail, *Radix plicatulus*. *Chemosphere*, 32(11):2127-2132.

Lam, P.K.S. (1999). Methods for distinguishing genetic and environmental variance in stress tolerance. *Ecological Applications*, 9(2):449-455.

Lam, P.K.S., and Calow, P. (1990). Interpopulation variation in juvenile survival and growth rates of *Lymnaea peregra* (Gastropoda: Pulmonata); temperature at recruitment as a selection pressure?. *Journal of molluscan studies*, 56(1):17-23.

Lane, T.W. and Morel, F.M. (2000). A biological function for cadmium in marine diatoms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(9):4627-4631

Laskowski, R. and Hopkin, S.P. (1996). Effect of Zn, Cu, Pb, and Cd on Fitness in Snails (*Helix aspersa*). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 34(1):59-69

Lefcort, H., Meguire, R.A and Wilson, L.H. (1998). Heavy Metals Alter the Survival, Growth, Metamorphosis, and Antipredatory Behavior of Columbia Spotted Frog (*Rana luteiventris*) Tadpoles. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(3):447-457

Lenormand, T. (2002). Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 17(4):183-189

Lerner, I.M. (1954). *Genetic Homeostasis*. Edinburgh: Oliver and Boyd.

Lexer, C., and Fay, M.F. (2005). Adaptation to environmental stress: a rare or frequent driver of speciation?. *Journal of evolutionary biology*, 18(4):893-900.

Li, W., Khan, M.A., Yamaguchi, S., and Kamiya, Y. (2005). Effects of heavy metals on seed germination and early seedling growth of *Arabidopsis thaliana*. *Plant growth regulation*, 46(1):45-50.

Li, Z.K., Luo, L.J., Mei, H.W., Wang, D.L., Shu, Q.Y., Tabien, R., ... and Paterson, A.H. (2001). Overdominant epistatic loci are the primary genetic basis of inbreeding depression and heterosis in rice. I. Biomass and grain yield. *Genetics*, 158(4):1737-1753

Liao, W., and Reed, D.H. (2009). Inbreeding–environment interactions increase extinction risk. *Animal Conservation*, 12(1):54-61.

Lima, S.L., and Dill, L.M. (1990). Behavioral decisions made under the risk of predation: a review and prospectus. *Canadian Journal of Zoology*, 68(4):619-640.

Lippman, Zachary B. and Zamir, D. (2007). Heterosis: revisiting the magic. *Trends in genetics*, 23(2):60-66

Liu, D., W. Jiang, W. Wang, F. Zhao, Lu C. (1994). Effects of lead on root growth, cell division, and nucleolus of *Allium cepa*. *Environmental Pollution*, 86:1–4

Lopes, I., Baird, D.J., and Ribeiro, R. (2005). Resistance to metal contamination by historically-stressed populations of *Ceriodaphnia pulchella*: Environmental influence versus genetic determination. *Chemosphere*, 61(8):1189-1197.

Lopes, I., Martins, N., Baird, D.J., and Ribeiro, R. (2009). Genetic erosion and population resilience in *Daphnia longispina* OF Müller under simulated predation and metal pressures. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(9):1912-1919.

Lott, S.E., Kreitman, M., Palsson, A., Alekseeva, E., and Ludwig, M.Z. (2007). Canalization of segmentation and its evolution in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(26):10926-10931.

Luo, X., Fu, Y., Zhang, P., Wu, S., Tian, F., Liu, J., ... and Sun, C. (2009). Additive and over-dominant effects resulting from epistatic loci are the primary genetic basis of heterosis in rice. *Journal of integrative plant biology*, 51(4):393-408.

Lynch, M. (1991). The genetic interpretation of inbreeding depression and outbreeding depression. *Evolution*, 622-629

Lynch, M. and Walsh, B (1998). *Genetics and Analysis of Quantitative Traits*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts

Lynch, M., and Lande, R. (1993). Evolution and extinction in response to environmental change. *Biotic interactions and global change*, 234-250.

Maitani, T., Watahiki, A., and Suzuki, K.T. (1986). Induction of metallothionein after lead administration by three injection routes in mice. *Toxicology and applied pharmacology*, 83(2):211-217.

Marinković, D., Milošević, M., and Milanović, M. (1986). Enzyme activity and dynamics of *Drosophila* development. *Genetica*, 70(1):43-52.

Maroni, G., Wise, J., Young, E. and Otto, E. (1987). Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 117:739-744

Marr, A.B., Arcese, P., Hochachka, W.M., Reid, J.M., and Keller, L.F. (2006). Interactive effects of environmental stress and inbreeding on reproductive traits in a wild bird population. *Journal of Animal Ecology*, 75(6):1406-1415.

Maruyama, T. (1970). On the rate of decrease of heterozygosity in circular stepping stone models of populations. *Theoretical population biology*, 1(1):101-119.

Massie, H., Alello, V., and Whitney S. (1992). Lead accumulation during aging of *Drosophila* and effect of dietary lead on life span. *Age*, 15:47-49

Matz, J.M., LaVoi, K.P., Moen, R.J., and Blake, M.J. (1996). Cold-induced heat shock protein expression in rat aorta and brown adipose tissue. *Physiology and behavior*, 60(5):1369-1374.

Maynard Smith, J. (1956). Acclimatization to high temperatures in inbred and outbred *Drosophila subobscura*. *Journal of Genetic*, 54:497-505.

Mayr E. (1963). *Animal Species and Evolution*. BelknapPress, Cambridge, MA.

McCahon, C.P., and Pascoe, D. (1991). Brief-exposure of first and fourth instar *Chironomus riparius* larvae to equivalent assumed doses of cadmium: effects on adult emergence. *Water, Air, and Soil Pollution*, 60(3-4):395-403.

McGuigan, K., and Sgro, C.M. (2009). Evolutionary consequences of cryptic genetic variation. *Trends in ecology and evolution*, 24(6):305-311.

Medina, M.H., Correa, J.A., and Barata, C. (2007). Micro-evolution due to pollution: possible consequences for ecosystem responses to toxic stress. *Chemosphere*, 67(11):2105-2114.

Meiklejohn, C.D., Montooth, K.L., and Rand, D.M. (2007). Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends in Genetics*, 23(6):259-263.

Menge, B.A., and Olson, A.M. (1990). Role of scale and environmental factors in regulation of community structure. *Trends in Ecology and Evolution*, 5(2):52-57.

Messenger, E.A., and Warner, A.E. (1979). The function of the sodium pump during differentiation of amphibian embryonic neurones. *The Journal of physiology*, 292:85-105.

Midgley, G.F., Hannah, L., Millar, D., Rutherford, M.C., and Powrie, L.W. (2002). Assessing the vulnerability of species richness to anthropogenic climate change in a biodiversity hotspot. *Global Ecology and Biogeography*, 11(6):445-451.

Milkman, R. (1978). Selection differentials and selection coefficients. *Genetics*, 88(2):391-403.

Mills, L.S., and Allendorf, F.W. (1996). The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. *Conservation Biology*, 10(6):1509-1518.

Mirth, C.K., and Shingleton, A.W. (2012). Integrating body and organ size in *Drosophila*: recent advances and outstanding problems. *Frontiers in endocrinology*, 3:49.

Mitton, J.B. (1993). Enzyme heterozygosity, metabolism, and developmental variability. *Genetica*, 89:47-63

Mitton, J.B. and Grant, M.C. (1984). Associations among protein heterozygosity, growth rate, and developmental homeostasis. *Annual review of ecology and systematics*, 15:479-499

Moraes, E.M., Spersola, V.L., Prado, P.R.R., Costa, L.F., and Sene, F.M. (2004). Divergence in wing morphology among sibling species of the *Drosophila buzzatii* cluster. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 42(2):154-158.

Moreto, B., Imasheva, A.G., Moren, Z., and David, Z. (1998). Wing shape and developmental temperature in two *Drosophila* species: different wing regions exhibit different reaction norms. *Genetika*, 34(2):248-258.

Mrvić, V., Zdravković, M., Sikirić, B., Čakmak, D. and Kostić-Kravljanić, Lj., (2009). Sadržaj štetnih i opasnih elemenata. In: Plodnost i sadržaj opasnih i štetnih materija u zemljištima centralne Srbije, Mrvić V, Antović G and Martinović Lj. (ed). Institut za zemljište, Beograd.

Munzuroglu, O., and Geckil, H. (2002). Effects of metals on seed germination, root elongation, and coleoptile and hypocotyl growth in *Triticum aestivum* and *Cucumis sativus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 43(2):203-213.

Myrand, B., Tremblay, R. and Se´vigny, J.M (2002) Selection against blue mussels (*Mytilus edulis* L) homozygotes under various stressful conditions. *Heredity* 93:238–248

Niemelä, J., Kotze J., Ashworth, A., Brandmayr, P., Desender, K., New, T., Penev, L., Samways, M., and Spence, J. (2000). The search for common anthropogenic impacts on biodiversity: a global network. *Journal of Insect Conservation*, 4(1):3-9.

Novicic Kurbalija, Z., Jelic, M., Jovanovic, M., Dimitrijevic, D., Veselinovic Savic, M., Stamenkovic-Radak, M., and Andjelkovic, M. (2011). Microsatellite variability of *Drosophila subobscura* populations from the central Balkans. *Evolutionary Ecology Research*, 13(5):479-494.

Nylin, S., and Gotthard, K. (1998). Plasticity in life-history traits. *Annual review of entomology*, 43(1):63-83.

Orr, H.A. (1995). The population genetics of speciation: the evolution of hybrid incompatibilities. *Genetics*, 139(4):1805-1813.

Orr, H.A., and Betancourt, A.J. (2001). Haldane's sieve and adaptation from the standing genetic variation. *Genetics*, 157(2):875-884.

Orr, H.A., and Turelli, M. (2001). The evolution of postzygotic isolation: accumulating Dobzhansky-Muller incompatibilities. *Evolution*, 55(6):1085-1094.

Orsini, L., Spanier, K.I., and De Meester, L. (2012). Genomic signature of natural and anthropogenic stress in wild populations of the waterflea *Daphnia magna*: validation in space, time and experimental evolution. *Molecular Ecology*, 21(9):2160-2175.

Paaby, A.B., and Rockman, M.V. (2014). Cryptic genetic variation: evolution's hidden substrate. *Nature Reviews Genetics*, 15(4):247-258.

Pacyna, J.M., and Pacyna, E.G. (2001). An assessment of global and regional emissions of trace metals to the atmosphere from anthropogenic sources worldwide. *Environmental Reviews*, 9(4):269-298

- Paige, K.N. (2010). The functional genomics of inbreeding depression: a new approach to an old problem. *Bioscience*, 60(4):267-277
- Palsson, A. and Gibson, G. (2004). Association between nucleotide variation in *Egfr* and wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167(3):1187-1198
- Parmesan, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 37:637-669.
- Parmesan, C., Ryrholm, N., Stefanescu, C., Hill, J.K., Thomas, C.D., Descimon, H.,...and Warren, M. (1999). Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with global warming. *Nature*, 399:579-583.
- Parsons, P.A. (2004). From energy efficiency under stress to rapid development and a long life in natural populations. *Biogerontology*, 3:201-210
- Parys, E., Romanowska, E., Siedlecka, M., and Poskuta, J.W. (1998). The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 20(3):313-322.
- Patenković, A., Savić, T., Kenig, B., Novičić Kurbalija, Z, and Anđelković, M. (2015). The impact of extremely low frequency electromagnetic field. *Genetika*, 47(3):967-982.
- Patra, M., Bhowmik, N., Bandopadhyay, B., and Sharma, A. (2004). Comparison of mercury, lead and arsenic with respect to genotoxic effects on plant systems and the development of genetic tolerance. *Environmental and Experimental Botany*, 52(3):199-223.
- Pedersen, K.S., Kristensen, T.N., and Loeschcke, V. (2005). Effects of inbreeding and rate of inbreeding in *Drosophila melanogaster* –Hsp70 expression and fitness. *Journal of evolutionary biology*, 18(4):756-762.
- Pedersen, K.S., Kristensen, T.N., Loeschcke, V., Petersen, B.O., Duus, J.Ø., Nielsen, N.C., and Malmendal, A. (2008). Metabolomic signatures of inbreeding at benign and stressful temperatures in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 180(2):1233-1243.
- Pederson, D.G. (1968). Environmental stress, heterozygote advantage and genotype-environment interaction in *Arabidopsis*. *Heredity*, 23:127-138.
- Peralta-Videa, J.R., Lopez, M.L., Narayan, M., Saupe, G., and Gardea-Torresdey, J. (2009). The biochemistry of environmental heavy metal uptake by plants:

implications for the food chain. The international journal of biochemistry and cell biology, 41(8):1665-1677.

Pertoldi, C., García-Perea, R., Godoy, J.A., Delibes, M. and Loeschcke, V. (2006). Morphological consequences of range fragmentation and population decline on the endangered Iberian lynx (*Lynx pardinus*). Journal of Zoology, 268(1):73-86

Phillips, P.C., and Johnson, N.A. (1998). The population genetics of synthetic lethals. Genetics, 150(1):449-458.

Pickup, M., Field, D.L., Rowell, D.M., and Young, A.G. (2013). Source population characteristics affect heterosis following genetic rescue of fragmented plant populations. Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 280(1750):2012-2058.

Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., and Pinelli, E. (2011). Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants. In Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume, 213 (pp. 113-136). Springer New York.

Prasad, D.D.K., and Prasad, A.R.K. (1987). Effect of lead and mercury on chlorophyll synthesis in mung bean seedlings. Phytochemistry, 26(4):881-883.

Pray , L.A. , J.M. Schwartz , C.J. Goodnight , and L. Stevens . (1994). Environmental dependency of inbreeding depression: implications for conservation biology . Conservation Biology, 8:562 – 568.

Radhakrishnaiah, K. and Busappa, B. (1986). Effect of cadmium on the carbohydrate metabolism of the freshwater field crab, *Oziotelphusa senex senex*(Fabricius). Journal of Environmental Biology, 7(1):17-21

Reed, D.H., Fox, C.W., Enders, L.S., and Kristensen, T.N. (2012). Inbreeding-stress interactions: evolutionary and conservation consequences. Annals of the New York Academy of Sciences, 1256(1):33-48.

Regionalni centar za životnu sredinu za Centralnu i Istočnu Evropu (REC), Sekretarijat za zaštitu životne sredine grada Beograda i Gradski zavod za javno zdravlje, Beograd. (2011). Kvalitet životne sredine u gradu Beogradu u 2010. godini.

Reinecke, A.J., Maboeta, M.S., and Reinecke, S.A. (1997). Stimulating effects of low lead concentrations on growth and cocoon production of *Eisenia fetida* (Oligochaeta). South African Journal of Zoology, 32(3):72-75

Reinecke, S.A., Prinsloo, M.W., and Reinecke, A.J. (1999). Resistance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to cadmium after long-term exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 42(1):75-80.

Relyea, R.A. (2005). The heritability of inducible defenses in tadpoles. *Journal of evolutionary biology*, 18(4):856-866.

Reznick, D., Nunney, L. And Tessier, A. (2000). Big houses, big cars, superfleas and the cost of reproduction. *Trends in Ecology and Evolution*, 15:421–425

Rhee, J.S., Raisuddin, S., Lee, K.W., Seo, J.S., Ki, J.S., Kim, I.C., ... and Lee, J.S. (2009). Heat shock protein (Hsp) gene responses of the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* to environmental toxicants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 149(1):104-112.

Robertson, F.W. (1963). The ecological genetics of growth in *Drosophila* 6. The genetic correlation between the duration of the larval period and body size in relation to larval diet. *Genetical Research*, 4(1):74-92.

Roff, D.A. (2002). *Life History Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.

Rohner, N., Jarosz, D.F., Kowalko, J.E., Yoshizawa, M., Jeffery, W.R., Borowsky, R.L., ... and Tabin, C.J. (2013). Cryptic variation in morphological evolution: HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish. *Science*, 342(6164):1372-1375.

Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., and Elder, J. (2002). Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine Pollution Bulletin*, 44(7):671-679.

Rowe, L., and Ludwig, D. (1991). Size and timing of metamorphosis in complex life cycles: time constraints and variation. *Ecology*, 72(2):413-427.

Rozen, A. (2006) Effect of cadmium on life-history parameters in *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae: Oligochaeta) populations originating from forests differently polluted with heavy metals. *Soil Biology and Biochemistry* 38(3):489–503

Rozen, A. (2006). Effect of cadmium on life-history parameters in *Dendrobaena octaedra* (Lumbricidae: Oligochaeta) populations originating from forests differently polluted with heavy metals. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(3):489-503.

Rutherford, S.L., and Lindquist, S. (1998). Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature*, 396(6709):336-342.

Sala, O.E., Chapin, F.S., Armesto, J.J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R.,... and Leemans, R., (2000). Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science*, 287(5459):1770-1774.

Sanders, B.M. (1993). Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. *Critical reviews in toxicology*, 23(1):49-75.

Santos, M., Borash, D.J., Joshi, A., Bounlutay, N., and Mueller, L.D. (1997). Density-dependent natural selection in *Drosophila*: evolution of growth rate and body size. *Evolution*, 420-432.

Santos, M., Iriarte, P.F., Céspedes, W., Balanyà, J., Fontdevila, A., and Serra, L. (2004). Swift laboratory thermal evolution of wing shape (but not size) in *Drosophila subobscura* and its relationship with chromosomal inversion polymorphism. *Journal of evolutionary biology*, 17(4):841-855.

Schlichting, C.D. (2008). Hidden reaction norms, cryptic genetic variation, and evolvability. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1133(1):187-203.

Schmidt, G.H., Ibrahim, N.M., and Abdallah, M.D. (1991). Toxicological studies on the long-term effects of heavy metals (Hg, Cd, Pb) in soil on the development of *Aiolopus thalassinus* (Fabr.)(Saltatoria: Acrididae). *Science of the total environment*, 107:109-133.

Schoeppner, N.M. and Relyea, R.A. (2008). Detecting small environmental differences: risk-response curves for predator-induced behavior and morphology. *Oecologia*, 154(4):743-754.

Schreck, C.B., Contreras-Sanchez, W., and Fitzpatrick, M.S. (2001). Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture*, 197(1):3-24.

Schwartz, J., Landrigan, P.J., Baker Jr, E.L., Orenstein, W.A., and Von Lindern, I.H. (1990). Lead-induced anemia: dose-response relationships and evidence for a threshold. *American journal of public health*, 80(2):165-168.

Sgro, C.M. and Hoffmann, A.A. (2004). Genetic correlations, tradeoffs and environmental variation. *Heredity*, 93:241-248.

Sharif, R., Thomas, P., Zalewski, P., and Fenech, M. (2012). The role of zinc in genomic stability. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 733(1):111-121.

Sharma, P., and Dubey, R.S. (2005). Lead toxicity in plants. *Brazilian journal of plant physiology*, 17(1):35-52.

Shirayoshi, Y., Okada, T.S., and Takeichi, M. (1983). The calcium-dependent cell-cell adhesion system regulates inner cell mass formation and cell surface polarization in early mouse development. *Cell*, 35(3):631-638.

Shirley, M.D.F., and Sibly, R.M. (1999). Genetic basis of a between-environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53(3):826-836.

Shull, G.H. (1908). The composition of a field of maize. *Proceedings of American Breeders Association*, 4:296–301.

Sibly, R.M. and Calow, P. (1989). A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society*, 37(1-2):101-116

Siegal, M.L., and Bergman, A. (2002). Waddington's canalization revisited: developmental stability and evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(16):10528-10532.

Silbermann, R., and Tatar, M. (2000). Reproductive costs of heat shock protein in transgenic *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 54(6):2038-2045.

Singer, C., Zimmermann, S., and Sures, B. (2005). Induction of heat shock proteins (hsp70) in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) following exposure to platinum group metals (platinum, palladium and rhodium): comparison with lead and cadmium exposures. *Aquatic toxicology*, 75(1):65-75.

Singh R.S., Long A.D. (1992). Geographic variation in *Drosophila*: from molecules to morphology and back. *Trends in Ecology and Evolution*, 7:340–347.

Slatkin, M. (1991). Inbreeding coefficients and coalescence times. *Genetical research*, 58(02):167-175.

Smedley, M.J., and Stanisstreet, M. (1985). Calcium and neurulation in mammalian embryos. *Development*, 89(1):1-14.

Smith, K.L., Ruhl, H.A., Bett, B.J., Billett, D.S.M., Lampitt, R.S., and Kaufmann, R.S. (2009). Climate, carbon cycling, and deep-ocean ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(46):19211-19218.

Sørensen, J.G., Dahlgaard, J., and Loeschcke, V. (2001). Genetic variation in thermal tolerance among natural populations of *Drosophila buzzatii*: down regulation of Hsp70 expression and variation in heat stress resistance traits. *Functional ecology*, 15(3):289-296.

Sørensen, J.G., Norry, F.M., Scannapieco, A.C., and Loeschcke, V. (2005). Altitudinal variation for stress resistance traits and thermal adaptation in adult *Drosophila buzzatii* from the New World. *Journal of evolutionary biology*, 18(4):829-837.

Sørensen, J.G., Kristensen, T.N. and Loeschcke, V., (2003). The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. *Ecology Letters*, 6(11):1025-1037

Sørensen, J.G., Michalak, P., Justesen, J. and Loeschcke, V. (1999) Expression of the heat-shock protein HSP70 in *Drosophila buzzatii* lines selected for thermal resistance. *Hereditas* 131:155–164

Southwood, T.R.E. (1988). Tactics, strategies and templets. *Oikos*, 3-18.

Sparling, D.W., Krest S., and Ortiz-Santaliestra, M. (2006). Effects of lead-contaminated sediment on *Rana sphenocephala* tadpoles. *Archives of environmental contamination and toxicology* 51(3):458-466

Spitzer, N.C. (1979). Ion channels in development. *Annual review of neuroscience*, 2(1):363-395.

Spurgeon, D.J., and Hopkin, S.P. (2000). The development of genetically inherited resistance to zinc in laboratory-selected generations of the earthworm *Eisenia fetida*. *Environmental Pollution*, 109(2):193-201.

Stamenkovic-Radak, M., Kalajdzic, P., Savic, T., Savic, M., Kurbalija, Z., Rasic, G., and Andjelkovic, M. (2008). The effect of lead on fitness components and developmental stability in *Drosophila subobscura*. *Acta Biologica Hungarica*, 59(1):47-56

Stamenković-Radak, M., Jelic, M., Novičič, Z. K., Kenig, B., Tanaskovic, M., and Andjelković, M. (2012). Balkan glacial history and modern *Drosophila subobscura* population genetics. *Evolutionary Ecology Research*, 14(7):839-858.

Stanton, M.L., Roy, B.A., and Thiede, D.A. (2000). Evolution in stressful environments. I. Phenotypic variability, phenotypic selection, and response to selection in five distinct environmental stresses. *Evolution*, 54(1):93-111.

Stearns, S.C.(1992). *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, Oxford

Steinert, S.A., and Pickwell, G.V. (1993). Induction of Hsp70 proteins in mussels by ingestion of tributyltin. *Marine Environmental Research*, 35(1):89-93.

Stillwell, R.C., Wallin, W.G., Hitchcock, L.J. and 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(2):309-321.

Stockwell, C.A., Hendry, A.P. and Kinnison M.T. (2003) Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(2):94-101.

Su, W.Y., and Gordon, T. (1997). In vivo exposure to ozone produces an increase in a 72-kDa heat shock protein in guinea pigs. *Journal of Applied Physiology*, 83(3):707-711.

Sustek, Z. (1987). Changes in body size structure of carabid communities(Coleoptera, Carabidae) along an urbanisation gradient. *Biologia (Bratisl.)*, 42(2):145-156.

Szulkin, M., Bierne, N., and David, P. (2010). Heterozygosity-fitness correlations: a time for reappraisal. *Evolution*, 64(5):1202-1217.

Tallmon, D.A., Luikart, G. and Waples, R.S. (2004). The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology and Evolution*, 19:489–496

Templeton, A.R., Hemmer, H., Mace, G., Seal, U.S., Shields, W.M. and Woodruff, D.S. (1986). Local adaptation, coadaptation, and population boundaries. *Zoo Biology*, 5:115–125.

Tian, L.C. and Lawrence, D.A. (1995). Lead inhibits nitric oxide production in vitro by murine splenic macrophages. *Toxicology and applied pharmacology*, 132(1):156-163.

Tomanek, L. (2010). Variation in the heat shock response and its implication for predicting the effect of global climate change on species' biogeographical distribution ranges and metabolic costs. *Journal of Experimental Biology*, 213(6):971-979.

Tong, S., Schirnding, Y.E.V., and Prapamontol, T. (2000). Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization*, 78(9):1068-1077

Torreblanca, A., Diaz-Mayans, J., Del Ramo, J. and Nunez, A. (1987). Oxygen uptake and gill morphological alterations in *Procambarus clarkii* (Girard) after sublethal exposure to lead. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 86(1):219-224.

Trotta, V., Cavicchi, S., Guerra, D., Andersen, D.H., Babbitt, G.A., Kristensen, T.N., ... and Pertoldi, C. (2011). Allometric and non-allometric consequences of inbreeding on *Drosophila melanogaster* wings. *Biological Journal of the Linnean Society*, 102(3):626-634.

Trotter, E.W., Kao, C.M.F., Berenfeld, L., Botstein, D., Petsko, G.A., and Gray, J.V. (2002). Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47):44817-44825.

Uveges, J.L., Corbett, A.L., and Mal, T.K. (2002). Effects of lead contamination on the growth of *Lythrum salicaria* (purple loosestrife). *Environmental Pollution*, 120(2):319-323.

Uysal, U. and Bahceci, Z. (1996). Effect of lead acetate and mercury chloride on offspring production in *Drosophila melanogaster*. *Drosophila Information Service*, 77:102-103

Valiati, V.H., and Valente, V.L.S. (1997). Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. *Brazilian Journal of Genetics*, 20(4).

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The international journal of biochemistry and cell biology*, 39(1):44-84.

Van Noordwijk, A.J. and De Jong, G. (1986). Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *American Naturalist*, 128:137-142

van Straalen, N.M., and Timmermans, M.J. (2002). Genetic variation in toxicant-stressed populations: an evaluation of the "genetic erosion" hypothesis. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8(5):983-1002.

Van Straalen, N.M., Burghouts, T.B.A., Doornhof, M.J., Groot, G.M., Jansens, M.P.M., Joose, E.N.G., ... and Zoomer, H.R. (1987). Efficiency on lead and cadmium excretion in populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. *Journal of Applied Ecology*, 24:953–968

Vermeulen, A.C., Liberloo, G., Dumont, P., Ollevier, F. and Goddeeris, B. (2000). Exposure of *Chironomus riparius* larvae (diptera) to lead, mercury and β -sitosterol: effects on mouthpart deformation and moulting. *Chemosphere*, 41(10):1581-1591.

Vermeulen, C.J., and Bijlsma, R. (2004). Changes in mortality patterns and temperature dependence of lifespan in *Drosophila melanogaster* caused by inbreeding. *Heredity*, 92(4):275-281.

Vermeulen, C.J., and Bijlsma, R. (2004). Characterization of conditionally expressed mutants affecting age-specific survival in inbred lines of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 167(3):1241-1248.

Vetukhiv, M.O., and Beardmore, J.A. (1959). Effect of environment upon the manifestation of heterosis and homeostasis in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 44(5):759.

Vuković, T. (2002) Prekogranični transport teških metala putem atmosfere (poglavlje u monografiji) R. Kadović, M. Knežević: Teški metali u šumskim ekosistemima Srbije, str. 21-33, izd. Šumarski fakultet i Ministarstvo za zaštitu prirodnih bogatstava i životne sredine RS, Beograd.

Waller, D.M., Dole, J., and Bersch, A.J. (2008). Effects of stress and phenotypic variation on inbreeding depression in *Brassica rapa*. *Evolution*, 62(4):917-931.

Warchałowska-Śliwa, E., Niklińska, M., Görlich, A., Michailova, P., and Pyza, E. (2005). Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environmental Pollution*, 133(2):373-381.

Weber, K., Eisman, R., Higgins, S., Morey, L., Patty, A., Tausek, M., and Zeng, Z.B. (2001). An analysis of polygenes affecting wing shape on chromosome 2 in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 159(3):1045-1057.

Weber, K., Eisman, R., Morey, L., Patty, A., Sparks, J., Tausek, M., and Zeng, Z.B. (1999). An analysis of polygenes affecting wing shape on chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 153(2):773-786.

- Wentsel, R., McIntosh, A., McCafferty, W.P., Atchison, G., and Anderson, V. (1977). Avoidance response of midge larvae (*Chironomus tentans*) to sediment containing heavy metals. *Hydrobiologia*, 55:171–175
- White, L.D., Cory-Slechta, D.A., Gilbert, M.E., Tiffany-Castiglioni, E., Zawia, N.H., Virgolini, M., ... and Basha, M.R. (2007). New and evolving concepts in the neurotoxicology of lead. *Toxicology and applied pharmacology*, 225(1):1-27.
- Whitlock, M.C., Ingvarsson, P.K., and Hatfield, T. (2000). Local drift load and the heterosis of interconnected populations. *Heredity*, 84(4):452-457
- Whitlock, R., Stewart, G.B., Goodman, S.J., Piertney, S.B., Butlin, R.K., Pullin, A.S., and Burke, T. (2013). A systematic review of phenotypic responses to between-population outbreeding. *Environmental Evidence*, 2(1):1.
- Wilczek, G. and Migula, P. (1996). Metal body burdens and detoxifying enzymes in spiders from industrially polluted areas. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 354:643–647
- Wills, C. (1978). Rank-order selection is capable of maintaining all genetic polymorphisms. *Genetics*, 89(2):403-417.
- Wisely, S.M., Santymire, R.M., Livieri, T.M., Mueting, S.A. and Howard, J. (2008). Genotypic and phenotypic consequences of reintroduction history in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*). *Conservation Genetics*, 9(2):389-399
- Wong, C.G., Bonakdar, M., Mautz, W.J., and Kleinman, M.T. (1996). Chronic inhalation exposure to ozone and nitric acid elevates stress-inducible heat shock protein 70 in the rat lung. *Toxicology*, 107(2):111-119.
- Wright, D.A. (1986). Trace metal uptake and sodium regulation in *Gammarus marinus* from metal polluted estuaries in England. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(01):83-92.
- Wright, S. (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16:97–159.
- Wright, S. (1977). *Evolution and the Genetics of Populations, Vol. 3. Experimental Results and Evolutionary Deductions*. University of Chicago Press. Chicago
- Wu, G.X., Ye, G.Y., Hu, C., and Cheng, J.A. (2006). Cadmium effects on growth and development as well as reproduction of *Boettcherisca peregrine* in the parental generation and first filial generation. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences)*, 1, 014.

Xiao, C., Qin, D., Yao, T., Ren, J., and Li, Y. (2000). Global pollution shown by lead and cadmium contents in precipitation of polar regions and Qinghai-Tibetan Plateau. *Chinese Science Bulletin*, 45(9):847-853.

Xu, J., Lian, L.J., Wu, C., Wang, X.F., Fu, W.Y. and Xu, L.H. (2008). Lead induces oxidative stress, DNA damage and alteration of p53, Bax and Bcl-2 expressions in mice. *Food and chemical toxicology*, 46(5):1488-1494

Yamanaka, N., Rewitz, K.F., and O'Connor, M.B. (2013). Ecdysone control of developmental transitions: lessons from *Drosophila* research. *Annual review of entomology*, 58:497-516.

Zanger, M., Eckwert, H., and Elnfeldt, I. (2000). Selection favours low hsp70 levels in chronically metal-stressed soil arthropods. *Journal of Evolutionary Biology*, 13:569–582.

Zhao, Q., Wang, J., Levichkin, I.V., Stasinopoulos, S., Ryan, M.T., and Hoogenraad, N.J. (2002). A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *The EMBO journal*, 21(17):4411-4419.

Zhuang, P., Zou, H., and Shu W. (2009). Biotransfer of heavy metals along a soil-plant-insect-chicken food chain: Field study. *Journal of Environmental Sciences*, 21(6):849-853.

Žaltauskaitė, J., and Sodienė, I. (2014). Effects of cadmium and lead on the life-cycle parameters of juvenile earthworm *Eisenia fetida*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 103:9-16

8. BIOGRAFIJA AUTORA

Marija Tansković je rođena 28. aprila 1982. godine u Beogradu. Osnovnu školu i gimnaziju prirodno-matematičkog smera završila je u Obrenovcu. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 2001/02. godine na studijskoj grupi Biologija. Diplomirala je 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,21. Doktorske studije na istom fakultetu, na smeru Genetika, upisuje 2009. godine.

Od januara 2011. godine je zaposlena kao istraživač pripravnik na Katedri za Genetiku i evoluciju Biološkog fakulteta, gde je 2012. godine izabrana u zvanje istraživač saradnik. Od oktobra 2015. je zaposlena kao istraživač saradnik na Odeljenju za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju Instituta za Biološka istraživanja Siniša Stanković. Kao doktorand Biološkog fakulteta je učestvovala u praktičnom delu nastave na predmetima Genetika na osnovnim studijama, i Genetičke osnove oplemenjivanja organizama na master studijama. Svoj naučno – istraživački rad je realizovala u okviru nacionalnog projekta osnovnih istraživanja 173012 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Autor je i koautor šest naučnih radova objavljenih u međunarodnim i domaćim časopisima. Učestvovala je i na brojnim skupovima međunarodnog i domaćeg značaja.

2015. godine je angažovana u popularizaciji nauke u okviru projekta Noć istraživača.

Član je Društva genetičara Srbije, Srpskog biološkog društva i European Society for Evolutionary Biology. 2012. godine je bila član sekretarijata simpozijuma “II Symposium of population and Evolutionary Genetics, 9-12 May 2012, Belgrade”, a 2014. godine je bila član sekretarijata kongresa “V Congress of the Serbian Genetic Society, 28.09. – 02.10. 2014, Kladovo-Beograd, Serbia“.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Марија Танасковић

Број индекса Б3506/2009

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Синергистички ефекат геномског и срединског стреса у две популације *Drosophila*

subobscura

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

Потпис аутора

У Београду, _____

Марија Танасковић

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Марија Танасковић

Број индекса Б3506/2009

Студијски програм Биологија

Наслов рада Синергистички ефекат геномског и срединског стреса у две популације *Drosophila subobscura*

Ментор проф. др Марина Стаменковић-Радак, др Зорана Курбалија Новичић

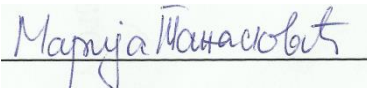
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

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

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

Потпис аутора

У Београду, _____



Изјава о коришћењу

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

Синергистички ефекат геномског и срединског стреса у две популације *Drosophila subobscura*

која је моје ауторско дело.

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

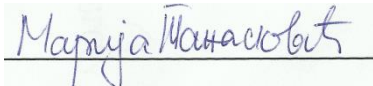
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

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

Потпис аутора

У Београду, _____



1. **Ауторство.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство – некомерцијално.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. **Ауторство – некомерцијално – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. **Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.