

Ispitivanje polnog dimorfizma vrste *Calopteryx virgo* L. (Odonata: Calopterygidae) u okolini reke Banje i reke Gradac

Primenom metoda geometrijske morfometrije analiziran je polni dimorfizam u veličini i obliku krila u populacijama vrste vilinskih konjica Calopteryx virgo L. Jedinke su prikupljene u populacijama uz reke Banja i Gradac. Veličina krila predstavljena je preko veličine centroida, koja predstavlja geometrijsko središte specifičnih tačaka, dok je oblik definisan Prokrustovim koordinatama specifičnih tačaka. Varijable veličine i oblika su statistički istražene analizom glavnih komponenti (PCA), dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA) i multivarijantnom analizom varijanse (MANOVA). Razlika u veličini i obliku krila uočena je između mužjaka i ženki na oba lokaliteta, i za prednja i za zadnja krila. Ženke poseduju veća, uža i izduženija krila, dok su krila mužjaka manja, šira i u proseku kraća. Primećena je i razlika u veličini i obliku krila između populacija, i te razlike između populacija mogu se objasniti lokalnim adaptacijama.

Uvod

Analiza oblika igra važnu ulogu u biološkim istraživanjima. Mnogi biološki procesi, kao što su ontogenetsko razviće, polni dimorfizam, prilagođavanje lokalnim stanjima ekoloških faktora ili dugoročna evolucionarna diverzifikacija, stvaraju razlike u obliku među jedinkama. Analiza oblika je jedan pristup razumevanju različitih uzroka varijabilnosti (Zelditch *et al.* 2004). Kvantitativnom analizom oblika bavi se morfometrija, koja se deli na tradicionalnu i geometrijsku morfometriju.

Dok se tradicionalnom morfometrijom uglavnom ispituju linearne distance između tačaka neke morfološke celine, geometrijska morfometrija analizira oblik, uglavnom analizirajući raspored specifičnih tačaka u dve ili tri dimenzije (Richtsmeier *et al.* 2002; Adams *et al.* 2009). U odnosu na tradicionalnu morfometriju, geometrijska morfometrija ima niz prednosti kao što su mogućnost nezavisne analize veličine i oblika, verodo-

Nataša Puzović (1993), Beograd, Dr Ivana Ribara 59, učenica 4. razreda Devete gimnazije „Mihailo Petrović Alas” u Beogradu

Jelisaveta Đorđević (1993), Beograd, Raljska 5, učenica 4. razreda Šeste beogradske gimnazije

MENTORI:
Ivana Budinski, istraživač pripravnik, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Univerziteta u Beogradu

dr Anđeljko Petrović, docent na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu

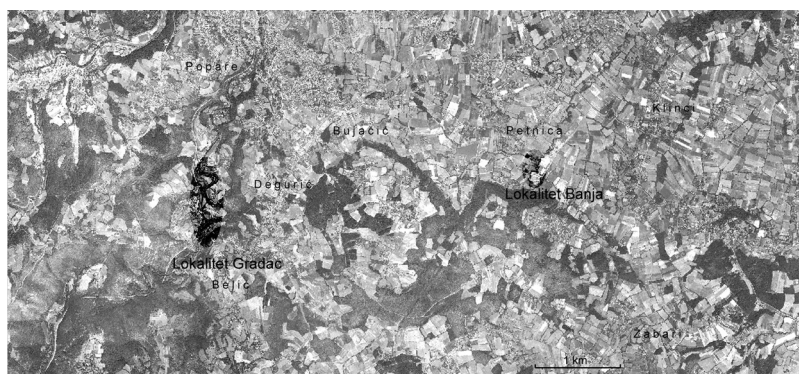
stojniji opis i tumačenje varijabilnosti oblika, i grafička vizuelizacija promene oblika.

Morfologija krila (u pogledu oblika i veličine) kod insekata je bila predmet ranijih istraživanja (Sadeghi *et al.* 2009; Outomuro i Johansson 2010), naročito osvrćući se na aerodinamiku (Hedenstrom 2002). Jedan od aspekata izučavanja morfologije krila je polni dimorfizam, odnosno razlika u obliku i veličini krila između polova. Te razlike u krilima vilinskih konjica među polovima mogu se objasniti različitim ponašanjem i stilom života. Naime, dugo se pretpostavljalo da je uzrok tih razlika teritorijalna kompeticija među mužjacima. Međutim, novija istraživanja su pokazala da ne postoji korelacija između oblika i veličine krila i ishoda teritorijalnih borbi (Bots *et al.* 2012). Pošto mužjaci provode većinu životnog veka u potrazi za partnerom (Cordoba-Aguilar, Cordero-Rivera 2005), šira i zdepastija krila su verovatno prilagođena za veću okretnost i manevarsku sposobnost u vazduhu (Betts i Wootton 1988). S druge strane, neteritorijalne ženke preleću veće razdaljine i pretpostavlja se da su izdužena krila optimalna za takav način kretanja (Betts i Wootton 1988). Primećen je polni dimorfizam u pogledu veličine tela. Ženke su krupnije od mužjaka, samim tim imaju i veća krila (Anholt *et al.* 1991; Sokolovska *et al.* 2000; Serrano-Meneses *et al.* 2008).

Cilj ovog istraživanja bilo je ispitivanje varijabilnosti oblika i veličine krila kod vrste vilinskih konjica *Calopteryx virgo* L. u zavisnosti od pola i lokaliteta. *Calopteryx virgo* L. (Odonata: Calopterygidae) je polno dimorfna vrsta insekata rasprostranjena širom Evrope, koja naseljava pretežno staništa oko vodenih ekosistema (Silby 2000).

Materijal i metode

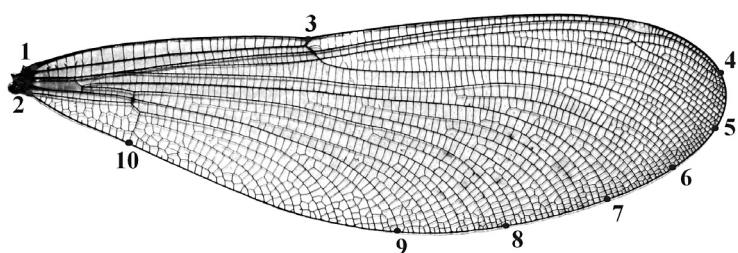
Uzorak je činilo 219 jedinki *Calopteryx virgo* L. sa dva lokaliteta (slika 1), 119 iz klisure reke Gradac (69 mužjaka i 50 ženki) i 100 jedinki iz okoline reke Banje (57 mužjaka i 43 ženke).



Slika 1.
Lokacije sa kojih su uzorkovane jedinke

Figure 1.
Map of sampling localities

Prikupljene jedinke usmrćene su etrom i nakon toga im je odstranjen desni par krila. Krila su fotografisana, a prilikom fotografisanja bila su postavljena uz centimetarsku skalu tako da ravan objektiva kamere bude u ravni krila, da bi se izbeglo iskrivljenje usled ugaone perspektive. Upotrebom softvera TpsDig2 (Rohlf 2010), na obodu svakog krila postavljeno je po 10 specifičnih tačaka (slika 2). Specifične tačke su jasno definisane tačke (tabela 1) koje je moguće utvrditi sa velikom tačnošću i ponovljivošću i one predstavljaju polazne podatke u analizama geometrijske morfometrije (Ivanović i Kalezić 2009).



Slika 2.
Položaj specifičnih tačaka

Figure 2.
Landmarks position on damselfly wing

Tabela 1. Opis specifičnih tačaka na slici 2

Specifična tačka	Pozicija
1	aksilarni sklerit
2	Početak AA+ (<i>analis anterior</i>) nerva
3	nodus
4	Završetak RA+ (<i>radius anterior</i>) nerva
5	Završetak RP2- (<i>radius posterior</i>) nerva
6	Završetak IR2- (<i>radius intercalaris</i>) nerva
7	Završetak RP3- (<i>radius posterior</i>) nerva
8	Završetak MA+ (<i>medialis anterior</i>) nerva
9	Završetak MP+ (<i>medialis posterior</i>) nerva
10	Završetak AA2+ (<i>analis anterior</i>) nerva

U geometrijskoj morfometriji se za određivanje položaja specifičnih tačaka koristi zajednički (Dekartov) koordinantni sistem. Određivanje položaja se postiže Prokrustovom superimpozicijom specifičnih tačaka, koja ih translira, rotira i skalira tako da imaju istu veličinu i orijentaciju. Odstranjivanje razlika u orijentaciji, poziciji i veličini morfoloških struktura omogućava detaljniju analizu oblika (Lawing i Polly 2009). Upotrebom softvera MorphoJ (Klingenberg 2011) izvršena je Prokrustova

superimpozicija, kojom su definisane jedna varijabla veličine (veličina centroida) i dvadeset varijabli oblika (Prokrustove koordinate). Veličina krila predstavljena je veličinom centroida (CS), koji predstavlja kvadratni koren sume kvadrata rastojanja specifičnih tačaka od geometrijskog središta (centroida).

Pomoću softvera MorphoJ urađena je analiza glavnih komponenti (Principal Component Analysis – PCA) Prokrustovih koordinata. Varijabilnost veličine centroida između lokaliteta i između polova analizirana je dvofaktorskom analizom varijanse (ANOVA), dok je varijabilnost oblika krila u odnosu na pol i lokalitet analizirana multivarijantnom analizom varijanse (MANOVA). Analize varijanse izvršene su u softverskom paketu Statistica 7 (StatSoft Inc. 2004).

Promene oblika su grafički predstavljene u vidu TPS deformacija mreže koje su uslovljene promenom položaja specifičnih tačaka duž ose prve glavne komponente. Matematička osnova za vizuelizaciju promena oblika zasniva se na poređenju dve odgovarajuće konfiguracije postavljene na idealno tankoj, beskonačnoj metalnoj ploči (*thin plate spline* – TPS) i energiji potrebnoj za njihovo savijanje (Bookstein 1991). Razlike u Prokrustovim koordinatama konfiguracija uslovljavaju promene ploče, koja se izdužuje ili skraćuje, odnosno uvija tako da poveže specifične tačke konfiguracija koje se porede.

Polni dimorfizam kvantifikovan je indeksom dimorfizma veličine (SDI, Lovich i Gibbons 1992), koji se računa po sledećoj formuli:

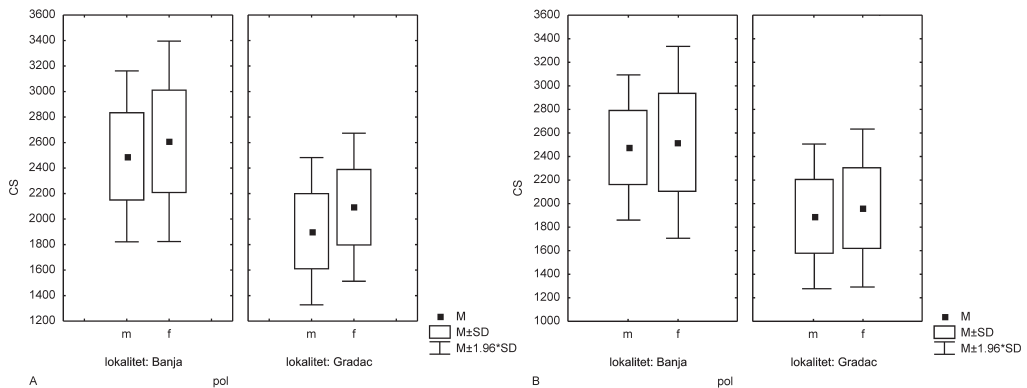
$$SDI = \frac{\text{SREDNJA VELIČINA CENTROIDA VEĆEG POLA}}{\text{SREDNJA VELIČINA CENTROIDA MANJEG POLA}} - 1$$

Vrednost SDI se po konvenciji označava kao pozitivna ukoliko su jedinke ženskog pola veće, a kao negativna ukoliko su jedinke muškog pola veće (Lovich i Gibbons 1992).

Rezultati i diskusija

Razlika u veličini krila uočena je između mužjaka i ženki na oba lokaliteta, i za prednja i za zadnja krila (slika 3). Ženke poseduju veća krila – indeks polnog dimorfizma veličine na celom uzorku za prednja krila iznosi SDI = +0.073, dok za zadnja iznosi SDI = +0.025.

Dvofaktorskom analizom varijanse veličine centroida prednjih i zadnjih krila u odnosu na lokalitet i pol ustanovljena je statistički značajna razlika u veličini prednjih krila između lokaliteta ($F_{1, 211} = 144.76$, $p < 0.001$) i između polova ($F_{1, 211} = 11.15$, $p < 0.001$) dok varijabilnost uslovljena interakcijom faktora lokalitet i pol nije bila statistički značajna. Na veličinu zadnjih krila statistički značajan efekat ima lokalitet ($F_{1, 210} = 144.19$, $p < 0.001$), dok efekat pola i interakcija faktora pol i



Slika 3. Prosečne vrednosti (M) i standardne devijacije (SD) veličine centroida za (A) prednja i (B) zadnja krila kod mužjaka (m) i ženki (f) na lokalitetima Banja i Gradac

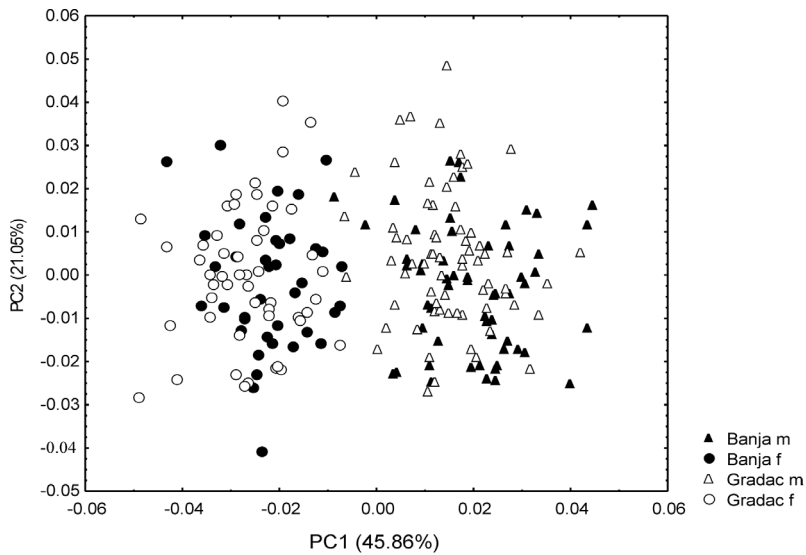
Figure 3. Plot of centroid size means and standard deviations for (A) front and (B) hind wings in males (m) and females (f) on Banja and Gradac localities

lokalitet nemaju statistički značajan uticaj na varijabilnost u veličini zadnjih krila.

Varijabilnost oblika prednjih i zadnjih krila predstavljena je na graficima analize glavnih komponenti (slike 4 i 5), a razlike u obliku krila između polova su vizualizovane pomoću TPS deformacija.

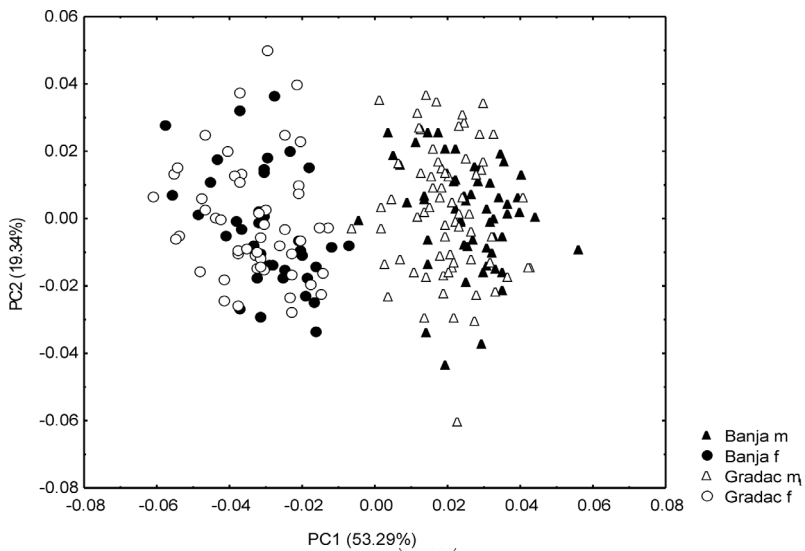
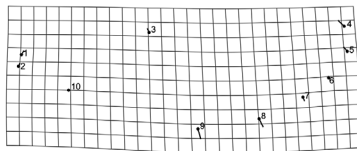
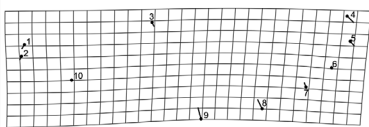
Varijabilnost oblika prednjih i zadnjih krila analizirana je i multivarijantnom analizom varijanse. Uočena je statistički značajna razlika, u obliku prednjih krila između lokaliteta ($\lambda_{Wilks} = 0.65$, $F_{16,196} = 6.48$, $p < 0.001$) i polova ($\lambda_{Wilks} = 0.11$, $F_{16, 196} = 98.50$, $p < 0.001$), dok interakcija faktora lokalitet i pol nema značajan efekat na oblik prednjih krila. Statistički značajan efekat na oblik zadnjih krila imaju pol ($\lambda_{Wilks} = 0.07$, $F_{16, 195} = 157.47$, $p < 0.001$) i lokalitet ($\lambda_{Wilks} = 0.72$, $F_{16,195} = 4.63$, $p < 0.001$), kao i njihova interakcija ($\lambda_{Wilks} = 0.86$, $F_{16, 195} = 1.93$, $p < 0.005$).

Polni dimorfizam u obliku ustanovljen je i kod prednjih i zadnjih krila. Krila mužjaka su šira i u proseku kraća u odnosu na krila ženki, koja su uža i izduženija (slike 5 i 6). Ovo je u skladu sa prethodnim istraživanjima na ovoj vrsti insekata (Outomuro i Johansson 2010). Razlike u obliku krila među polovima mogu se objasniti favorizovanjem zdepastijeg oblika krila kod mužjaka zbog veće okretnosti u vazduhu, kao i favorizovanjem izduženog oblika krila kod ženki prilikom dugih letova. Razlike u pritisku prirodne selekcije među lokalitetima mogu uzrokovati primećene razlike u obliku i veličini krila, nastale različitim stabilizacionim ili direkcionim pritiscima prirodne selekcije na svakom lokalitetu.



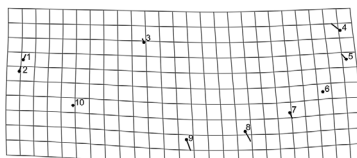
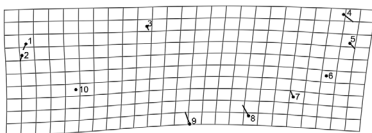
Slika 4

Figure 4



Slika 5

Figure 5



Slika 4. Analiza glavnih komponenti (PCA) za prednja krila, sa mrežama deformacije duž prve PC ose: Banja m – mužjaci s lokaliteta Banja, Banja f – ženke s lokaliteta Banja, Gradac m – mužjaci s lokaliteta Gradac, Gradac f – ženke s lokaliteta Gradac. Mreža deformacija sa leve strane predstavlja ženska krila, a mreža deformacija sa desne strane muška krila.

Figure 4. Principal component analysis (PCA) of front wings: Banja m – male wings from Banja, Banja f – female wings from Banja, Gradac m – male wings from Gradac, Gradac f – female wings from Gradac. Cranial shape changes are presented in the form of TPS deformation grids along the first PC axis for females (on the left) and males (on the right).

Slika 5. Analiza glavnih komponenti (PCA) za zadnja krila, sa mrežama deformacije duž prve PC ose: Banja m – mužjaci s lokaliteta Banja, Banja f – ženke s lokaliteta Banja, Gradac m – mužjaci s lokaliteta Gradac, Gradac f – ženke s lokaliteta Gradac. Mreža deformacija sa leve strane predstavlja ženska krila, a mreža deformacija sa desne strane muška krila.

Figure 5. Principal component analysis (PCA) of hind wings: Banja m – male wings from Banja, Banja f – female wings from Banja, Gradac m – male wings from Gradac, Gradac f – female wings from Gradac. Cranial shape changes are presented in the form of TPS deformation grids along the first PC axis for females (on the left) and males (on the right).

Jedinke sa reke Banje su veće u odnosu na jedinke sa Graca. Kako se lokaliteti nalaze na relativno malom rastojanju (8 km), može se pretpostaviti da je *Calopteryx virgo* L. vrsta sa veoma izraženim potencijalom za lokalnu adaptaciju.

Zaključak

U ovom radu analiziran je polni dimorfizam *Calopteryx virgo* L. sa dva lokaliteta u okolini Petnice primenom metoda geometrijske morfometrije. Polni dimorfizam uočen je u veličini krila – prednja krila ženki su statistički značajno veća od krila mužjaka. Ustanovljene su i statistički značajne razlike između mužjaka i ženki u obliku prednjih i zadnjih krila. Krila mužjaka su zdepastija i šira, dok su krila ženki izduženija i uža. Ovo je protumačeno različitim selektivnim pritiscima koji deluju na mužjake i ženke. Takođe su ustanovljene statistički značajne međupopulacione razlike u veličini i obliku krila. Potrebna su eksperimentalna istraživanja da bi se utvrdilo koji tip prirodne selekcije deluje na uočenu varijabilnost veličine i oblika krila.

Zahvalnica. Autori se zahvaljuju dr Vladimiru Jovanoviću, naučnom saradniku Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, na pruženoj nesebičnoj pomoći u statističkim analizama.

Literatura

- Adams D., Rohlf F. J., Slice D. E. 2009. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, **71**: 5.
- Anholt B. R., Marden J. H., Jenkins D. M. 1991. Patterns of mass gain and sexual dimorphism in adult dragonflies (Insecta: Odonata). *Canadian Journal of Zoology*, **69**: 1156.
- Betts C. R., Wootton R. J. 1988. Wing shape and flight behaviour in butterflies (Lepidoptera: Papilionoidea and Hesperioidea): A preliminary analysis. *Journal of Experimental Biology*, **138**: 271.
- Bots J., Breauker C. J., Kaunisto K. M., Koskimaki J., Van Gossum H., Suhonen J. 2012. Wing shape and its influence on the outcome of territorial contests in the damselfly *Calopteryx virgo*. *Journal of Insect Science*, **12**: 96.
- Bookstein F. L. 1991. *Morphometric Tools for Landmark Data, Geometry and Biology*. New York: Cambridge University Press
- Cordoba-Aguilar A., Cordero-Rivera A. 2005. Evolution and ecology of Calopterygidae (Zygoptera: Odonata): status of knowledge and research perspectives. *Neotropical Entomology*, **34**: 861.
- Hedenstrom A. 2002. Aerodynamics, evolution and ecology of avian flight. *Trends in ecology and evolution*, **17**: 415.
- Ivanović A., Kalezić M. 2009. *Evoluciona morfologija – teorijske postavke i geometrijska morfometrija*. Biološki fakultet: Beograd
- Klingenberg C. P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, **11**: 353.
- Lawing A. M., Polly P. D. 2009. Geometric Morphometrics: Recent Applications to the Study of Evolution and Development. *Journal of Zoology*, **280**: 1.
- Lovich J. E., Gibbons J. W. 1992. A review of techniques for quantifying sexual size dimorphism. *Growth, Development and Aging*, **56**: 269.
- Outomuro D., Johansson F. 2010. The effects of latitude, body size and sexual selection on wing shape in a damselfly. *Biological Journal of the Linnean Society*, **102**: 263.
- Richtsmeier J. T., Deleon V. B., Lele S. R. 2002. The promise of geometric morphometrics. *Yearbook of Physical Anthropology*, **45**: 63.
- Rohlf F. J. 2010. TpsDig2, ver. 2.16, Ecology and Evolution, SUNY at Stony Brook. <http://life.bio.sunysb.edu/morph/>
- Sadeghi S., Adriaens D., Dumont H. J. 2009. Geometric morphometric analysis of wing shape variation in ten European populations of *Calopteryx splendens* (Harris, 1782) (Zygoptera: Odonata). *Odonatologica*, **38**: 343.
- Serrano-Meneses M. A., Cordoba-Aguilar A., Azpilicueta-Amorin M., Gonzalez-Soriano S. T. 2008. Sexual selection, sexual size dimorphism and Rensch's rule in Odonata. *Journal of Evolutionary Biology*, **21**: 1259.
- Silby J. 2000. *Dragonflies of the world*. Washington: Smithsonian Institution Press
- Sokolovska N., Rowe L., Johansson F. 2000. Fitness and body size in odonates. *Ecological Entomology*, **25**: 239.

StatSoft, Inc. 2004. Statistica (data analysis software system), ver. 7.
www.statsoft.com

Zelditch M. L., Swiderski D. L., Sheets H. D., Fink W. L. 2004. *Geometric Morphometrics For Biologists: A Primer*. New York: Elsevier Academic Press

Nataša Puzović and Jelisaveta Đorđević

Analysis of Sexual Dimorphism in the Damselfly *Calopteryx virgo* L. (Odonata: Calopterygidae) from the Populations Near Banja and Gradac Rivers

In this paper, sexual dimorphism in wing morphology (wing size and shape) in damselfly *Calopteryx virgo* L. populations was analyzed using geometric morphometrics. The insect specimens were collected from Banja and Gradac rivers' populations. Wing size was estimated through centroid size, which represents the geometric center of the landmark configuration, while wing shape was represented with Procrustes coordinates of landmark points. Results were obtained by performing principal component analysis (PCA), two-factor univariate analysis (ANOVA) and multivariate analysis of variance (MANOVA) on the variables of size and shape. Analyses of sexual dimorphism revealed significant differences between sexes for both. front and hind wings on both locations. Wings of females were bigger, narrower and more elongated, than those in males (that could be described as smaller, broader and shorter). The obtained differences between populations in both size and shape could have been caused by local adaptations.

