

## Uticaj olova (Pb) na komponente adaptivne vrednosti vrste *Drosophila subobscura*

---

*Jedinke Drosophila subobscura gajene su kroz pedeset generacija na standardnom supstratu (grupa K) i supstratu sa koncentracijom olovo acetata 100 ppm (grupa C). Iz obe grupe formirane su četiri linije različite koncentracije (0, 400, 800 i 1200 ppm). Ispitivane su tri komponente adaptivnih vrednosti – preživljavanje, dužina i širina krila. Analizom podataka utvrđeno je da faktor grupe i faktor koncentracije imaju značajan uticaj na variranje preživljavanja. Povišena koncentracija olova u supstratu dovodi do smanjenja preživljavanja kod obe grupe, s tim što je kontrolna grupa (K) osetljivija na prisustvo olova u supstratu. Post-hoc Tuckey HSD testom utvrđeno je da je najveći pad u preživljavanju zabeležen u kontrolnoj grupi (K) na najvišoj koncentraciji olovo acetata. Na širinu i dužinu krila kod mužjaka uticaj je imao samo faktor grupa, dok je kod ženki uočen i značajan uticaj faktora koncentracije. Ženke prethodno tretirane olovo acetatom imaju duža i šira krila od ženki kontrolne grupe na svim ispitivanim koncentracijama, s tim što je ta razlika najizraženija na koncentraciji 400 ppm. Rezultati ovog istraživanja potvrđuju hipotezu da višegeneracijska selekcija olovom u okviru prethodno trenirane grupe dovodi do povećane otpornosti na prisustvo olova u supstratu.*

---

### Uvod

Različite vrste zagađenja životne sredine danas predstavljaju veliki problem. Ljudske aktivnosti su u velikoj meri doprinele zagađenju vodenih i kopnenih ekosistema, a teški metali predstavljaju jedan od najvažnijih izvora zagađenja (Lindgren i Laurila 2005). Olovo spada u veoma zastupljene zagađivače, bilo da je reč o zagađenju prirodnim putem ili uticajem antropogenih faktora (Nriagu i Pacyna 1988). Uticaj polutanata na adaptivne vrednost izloženih organizama za direktnu posledicu ima promenu diverziteta, dok se indirektno posledice ogledaju u promeni predatorske strukture ekosistema (Klerks i Levinton 1993). S obzirom na to da dolazi do povećanja nivoa teških metala u vodenim i kopnenim ekosistemima, sve je

---

*Sanja Šajkunić (1995), Beograd, 27. marta 3, učenica 3. razreda Pete beogradske gimnazije*

*Anja Conev (1995), Beograd, Kraljice Natalije 39, učenica 3. razreda Prve beogradske gimnazije*

*MENTOR: dr Bojan Kenig, Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković” Beograd*

veća zabrinutost vezana za njihov potencijalni efekat na život ljudi i drugih organizama (Ikeda *et al.* 2000; Lin *et al.* 2002). Sve češće se postavlja pitanje da li se organizmi mogu prilagoditi stresu izazvanim uticajem teških metala (Walther *et al.* 2002; Frankham 2005).

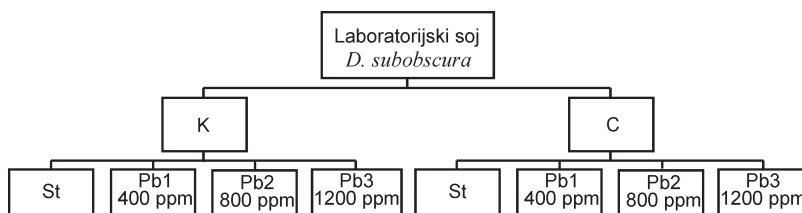
Teški metali predstavljaju selekcionni pritisak koji može dovesti do istrebljenja, aklimatizacije ili, ređe, genetičke adaptacije lokalnih populacija (Spurgeon i Hopkin 2000). Postoje različiti fiziološki odgovori na uticaj teških metala koji omogućuju populacijama koje žive u zagađenim sredinama da razviju osobine otpornosti (Klerks i Weis 1987; Bodar *et al.* 1990; Xu *et al.* 2009). Neki od odgovora na stres uključuju i promene u osobinama životne istorije jedinki, kao što su dužina životnog veka, brzina razvića, fekunditet, preživljavanje. Te osobine nazivaju se adaptivnim, a njihove promene predstavljaju adaptivne promene (Maltby 1991). Evolucija otpornosti na teške metale je primećena u populacijama mnogih riba, vodenih i kopnenih beskičmenjaka (Pauwels *et al.* 2006; Klerks i Weiss 1987; Morgan *et al.* 2007).

Kao model organizam za ispitivanje otpornosti na uticaj teških metala često se koristi *Drosophila*. *Drosophila subobscura* je palaearktička vrsta koja ima zastupljen inverzioni polimorfizam na svih pet parova akrocentričnih hromozoma (Krimbas i Loukas 1980). Dužina i širina krila jedinki *Drosophila* su osobine koje su u korelaciji sa veličinom tela, pa mogu biti indikatori različitih adaptivnih promena i značajne su u istraživanjima adaptivne evolucije (Reeve *et al.* 2000, Kurbalija Novičić *et al.* 2012). Pored drugih prednosti, vrste roda *Drosophila* omogućava preciznu višegeneracijsku genetičku analizu u strogo kontrolisanim uslovima (Hoffmann 2010).

Cilj ovog istraživanja je da se ispituju eventualne razlike u komponentama adaptivne vrednosti između grupe *D. subobscura* izložene višegeneracijskom uticaju olova i grupe koja je gajena na standardnom supstratu, kada se one nađu u uslovima različitog stepena zagađenosti supstrata olovom. Na taj način se proverava evolucija otpornosti izložene grupe.

## Materijal i metode

Grupa *D. subobscura* je gajena u laboratoriji na standardnom supstratu tokom pedeset generacija (grupa K) dok je druga grupa mušica gajena na supstratu sa olovo acetatom koncentracije 100 ppm (grupa C). Iz obe grupe je formirano po 30 isofemale linija. Oplođene ženke iz linija su postavljane na standardni supstrat gde su polagale jaja. Jaja su sakupljana i postavljana na supstrate sa različitom koncentracijom olova. Na taj način su formirane četiri grupe: standardna, koncentracije 400 ppm (Pb1), koncentracije 800 ppm (Pb2) i koncentracije 1200 ppm (Pb3) (slika 1). Sve eksperimentalne grupe su gajene u kontrolisanim laboratorijskim uslovima optimalnim za vrstu čime je isključena mogućnost uticaja sporednih sredinskih faktora na posmatranu osobinu. Taj deo eksperimeta izvršen je na Institutu za biološka istraživanja „Siniša Stanković” u Beogradu.



Slika 1.  
Dizajn eksperimenta

Figure 1.  
Design of the experiment

Preživljavanje je karakterisano odnosom broja izleženih jedinki tokom perioda izleganja, koji kod *D. subobscura* traje oko nedelju dana, i ukupnog broja položenih jaja. Kako takve vrednosti predstavljaju nominalne a ne metričke varijable, nije moguće njihovo korišćenje u parametarskim testovima. Da bi to bilo moguće izvršena je arcsin transformacija podataka,  $p' = \arcsin \sqrt{p}$ , pri čemu  $p$  predstavlja odnos između ukupnog broja položenih i ukupnog broja izleženih jaja.

Dužina i širina krila je merena na mikroskopskim preparatima krila. Krila su čupana pincetom, lepljena na mikroskopske pločice uz pomoć duplotejpa, a zatim slikana pod binokularom. Koristeći program ImageJ merena je veličina krila jedinki. Veličine krila jedinki iz grupa sa različitim koncentracijom olova su potom poređene. Transformacija podataka nije bila potrebna u slučaju osobina širina i dužina krila.

Statistička analiza je bazirana na uzorku koji je jednak broju analiziranih linija u okviru svake eksperimentalne grupe na pojedinačnoj koncentraciji, i taj broj je varirao između 26 i 30. Značajnost razlike između grupa ispitivana je dvofaktorskom analizom varijanse. Normalnost i homogenost varijansi podataka su potvrđene korišćenjem Jarque-Bera, Bartlett i Levene testa. Post-hoc Tukey HSD test je korišćen kako bi se otkrile detaljnije razlike u variranju između eksperimentalnih grupa i koncentracija kojima su bile izložene. Kompletna statistička analiza podataka sprovedena je korišćenjem programa PAST (Hammer *et al.* 2001), Statistica for Windows 5.0 (StatSoft Inc., USA) i MS Excel 2003.

## Rezultati

### Preživljavanje

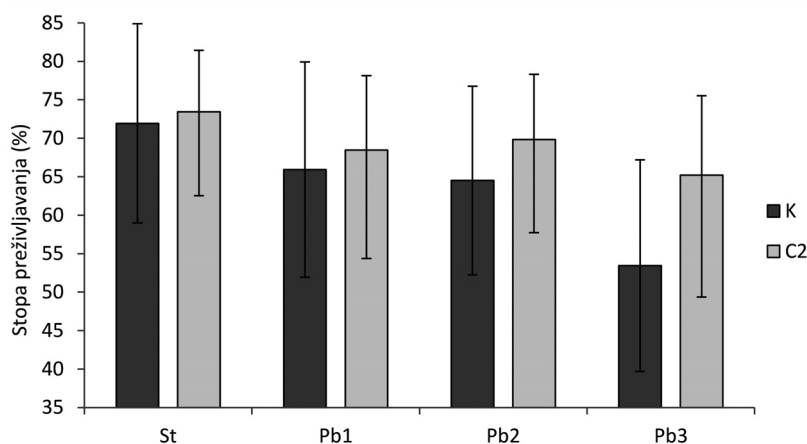
Dvofaktorska analiza varijanse je pokazala da oba proveravana faktora (grupa, koncentracija) imaju značajan uticaj na variranje preživljavanja kod analiziranih jedinki *D. subobscura* (tabela 1). Interakcija ova dva faktora nije značajna. Generalno, povišena koncentracija olova u supstratu dovodi do smanjenja preživljavanja kod obe grupe, s tim što je kontrolna grupa (K) osetljivija na prisustvo olova u supstratu, posebno na višim koncentracijama. To je potvrđeno i post-hoc testom, gde se uočava da kontrolna grupa na najvišoj koncentraciji olova (Pb3 – 1200 ppm) ima značajan pad preživljavanja u odnosu na istu grupu na standardnom supstratu (St), što važi i za dve niže koncentracije, Pb2 i Pb1, odnosno 800 i 400 ppm, ( $p < 0.001$ , 0.01

i 0.05, respektivno). Za međusobne razlike između ostalih koncentracija kod kontrolne grupe nisu dobijene statistički značajne razlike. Kontrolna grupa gajena na najvišoj koncentraciji olova (Pb3) takođe pokazuje nižu vrednost preživljavanja u odnosu na grupu C na svim koncentracijama (Post-hoc Tukey test: poređenje sa C na St,  $p < 0.001$ ; sa C na Pb1,  $p < 0.001$ ; sa C na Pb2,  $p < 0.001$ ; sa C na Pb3,  $p < 0.01$ ).

Tabela 1. Dvofaktorska ANOVA za preživljavanje kod grupa K i C na različitim koncentracijama olova u supstratu

	df	MS	F	p
Grupa	1	0.172	11.04	0.001
Koncentracija	3	0.195	12.49	0.000
Gr. × Konc.	3	0.034	2.18	0.092

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



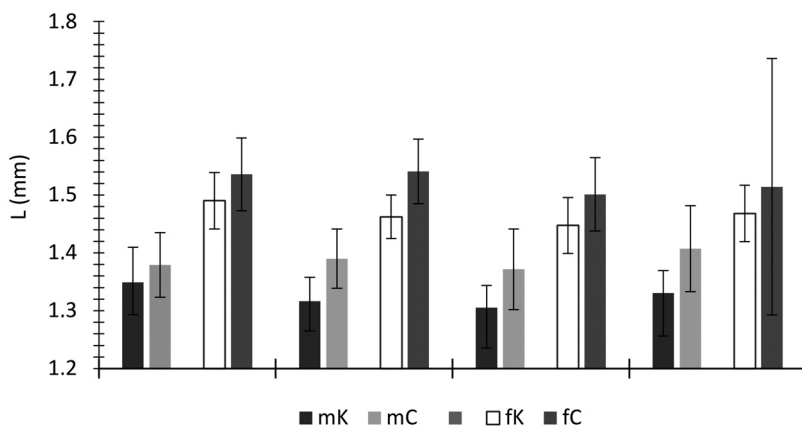
Slika 2. Odnos stope preživljavanja eksperimentalnih grupa K i C na različitim koncentracijama olova.

Figure 2. The ratio of the experimental groups K and C survival rate on different concentrations of lead

## Veličina krila

**Dužina krila (L).** Mužjaci grupe C imaju duža krila od mužjaka kontrolne grupe, na svim ispitivanim koncentracijama (slika 3), što je potvrđeno i post-hoc testom. Sama ANOVA je pokazala da samo faktor grupa ima značajan uticaj na dužinu krila kod mužjaka (tabela 2).

Kada su u pitanju ženke, uočeno je da na dužinu krila značajan uticaj imaju oba ispitivana faktora (grupa, koncentracija). Kao i kod mužjaka, ženke grupe C imaju duža krila od ženki kontrolne grupe, na svim ispitivanim koncentracijama, s tim što je ta razlika najizraženija na koncentraciji Pb1. Generalno, povišena koncentracija olova u supstratu kod ženki dovodi do smanjenja dužine krila (slika 3), iako odnos dužine krila i koncentracije olova u supstratu nije linearan.



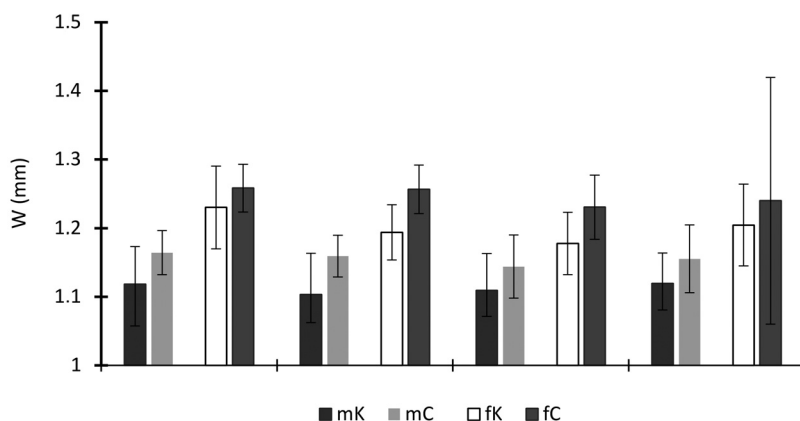
Slika 3.  
Dužina krila mužjaka na koncentracijama K (mK) i C (mC) i ženki (fK i fC)

Figure 3.  
The length of wings of male drosophila on concentrations K (mK) and C (mC), and female drosophila (fK and fC)

**Širina krila (W).** Dvofaktorska ANOVA je pokazala da samo faktor grupa ima značajan uticaj na širinu krila kod mužjaka (tabela 2). Mužjaci C grupe imaju šira krila u odnosu na mužjake kontrolne grupe, bez obzira na koncentraciju olova (slika 4). Koncentracija olova nema uticaj na variranje širine krila kod mužjaka.

Odnos širine krila kod ženki je skoro identičan odnosu dužine krila. Analiza varijanse je i ovde pokazala da i faktor grupa i faktor koncentracija imaju značajan uticaj na variranje osobine (tabela 2). Ženke C grupe imaju šira krila u odnosu na ženke kontrolne grupe. Širina krila opada na prve dve koncentracije olova, dok na najvišoj koncentraciji ova osobina pokazuje blag porast vrednosti (slika 4).

Postoji značajna razlika u dužini i širini krila između polova, i to tako što ženke imaju duža i šira krila od mužjaka u obe grupe i na svim ispitivanim koncentracijama (ANOVA:  $p < 0.001$  za obe osobine) (slike 3 i 4).



Slika 4.  
Širine mužjaka na koncentracijama K (mK) i C (mC) i ženki (fK i fC)

Figure 4.  
The width of wings of male drosophila on concentrations K (mK) and C (mC), and female drosophila (fK and fC)

Tabela 2 . Dvofaktorska ANOVA za dužinu i širinu krila kod mužjaka i ženki u okviru grupa K i C na različitim koncentracijama olova u supstratu

	Dužina krila							
	Mužjaci				Ženke			
	df	MS	F	p-nivo	df	MS	F	p-nivo
Grupa	1	344571	94.70	0.000	1	229509	70.953	0.000
Koncentracija	3	4384	1.205	0.308	3	27457.4	8.489	0.000
Gr. × Konc.	3	7415	2.038	0.108	3	6202.7	1.918	0.127

	Širina krila							
	Mužjaci				Ženke			
	df	MS	F	p-nivo	df	MS	F	p-nivo
Grupa	1	194943.5	106.9	0.000	1	149458	78.974	0.000
Koncentracija	3	3353.661	1.838	0.140	3	161336	8.525	0.000
Gr. × Konc.	3	215.6241	0.118	0.949	3	3594.0	1.899	0.130

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

## Diskusija

Povećanje koncentracije olova u supstratu dovodi do povećane stope smrtnosti kod obe grupe jedinki *D. subobscura*. Taj efekat je izraženiji kod kontrolne grupe. Pri najvišoj koncentraciji olova preživljavanje je značajno smanjeno kod kontrolne grupe. To pokazuje da ova grupa nije stekla otpornost na prisustvo olova, za razliku od grupe C koja je gajena tokom većeg broja generacija na supstratu sa olovom. Može se pretpostaviti da je tretman olovom predstavljao selekcionu pritisak koji je eliminisao osetljive jedinke. To je rezultovalo populacijom u kojoj dominiraju otpornije jedinke. Mogući mehanizmi odbrane organizama od uticaja teških metala su detoksikacija i smanjeni unos teških metala (Sibly i Calow 1989). Otporne jedinke imaju sposobnost aktivacije jednog od ovih mehanizma, iako ne možemo znati koji je mehanizam od ta dva u pitanju.

Odgovor na stres se na molekulskom nivou ispoljava kroz proizvodnju heat shock proteina (HSP), koji mogu izazvati morfološke promene (Rutherford i Lindquist 1998). Istraživanja su pokazala da ovaj set proteina doprinosi variranju fenotipa veličine krila (Bitner-Mathe i Klaczko 1999). Na dužinu i širinu krila mužjaka olovo je uticalo samo kao selekcionu faktor, dok je kod ženki delovalo i kao selekcionu faktor, ali i kao sredinski akutni stresor. Iz ovoga proizilazi da je odgovor na olovo kao sredinski faktor polno specifičan. Moguće je da i seksualna i prirodna selekcija utiču

na evoluciju krila *D. subobscura*. Sam uticaj prirodne selekcije na ovu osobinu različit je kod polova, jer ženke i mužjaci koriste krila za drugačije potrebe. Ženkama je najvažnije da nađu mesto za polaganje jaja dok je kod mužjaka izražena potreba za ženkom koja je spremna za parenje, ali i korišćenje krila prilikom udvaranja (Gidaszewski *et al.* 2009). Kod ženki je najveća razlika u širini i dužini krila između grupa uočena na najnižoj koncentraciji olova zbog toga što se kod kontrolne grupe promene u dužini i širini krila dešavaju već na najnižoj koncentraciji olova, dok grupa C odgovor daje tek na višim koncentracijama. Uočeno je i da su krila šira i duža kod jedinki grupe C. Takođe, kod ženki, i dužina i širina krila opadaju sa povećanjem koncentracije olova u supstratu.

## Zaključak

Višegeneracijska selekcija olovom u okviru prethodno tretirane grupe dovela je do povećane otpornosti na prisustvo olova u supstratu, u čijoj su osnovi adaptivni procesi.

---

## Literatura

- Bitner-Mathe B. C., Klaczko L. B. 1999. Heritability, phenotypic and genetic correlations of size and shape of *Drosophila mediopunctata* wings. *Heredity*, **83** (6): 688.
- Bodar C.W.M., van der Sluis I., van Montfor J.C.P., Voogt P.A., Zandee D. I. 1990. Cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology*, **16** (1): 33.
- Dallinger R., Rainbow P. S. 1996. *Ecotoxicology of metals in invertebrates*. Lewis Publishers
- Debat V., Milton C. C., Rutherford S., Klingenberg C. P., Hoffmann A. A. 2006. HSP90 and the quantitative variation of wing shape in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, **60** (12): 29.
- De Celis J. F. 2003. Pattern formation in *Drosophila* wing: the development of the veins. *Bioessays*, **25** (5): 443.
- Frankham R. 2005. Stress and adaptation in conservation genetics. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**: 750.
- Gidaszewski N. A., Baylac M., Klingenberg C. P. 2009. Evolution of sexual dimorphism of wing shape in the *Drosophila melanogaster* subgroup. *BMC Evolutionary Biology*, **9** (1): 110.
- Hammer O., Harper D. A.T., Paul D. R. 2001. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, **4** (1): 9.
- Hoffmann A. A. 2010. Physiological climatic limits in *Drosophila*: patterns and implications. *Journal of Experimental Biology*, **213**: 878.

- Ikeda M., Zhang Z.W., Shimbo S., Watanabe T., Nakatsuka H., Moon C.S., Matsuda-Inoguchi N., Higashikawa K. 2000. Urban population exposure to lead and cadmium in east and south-east Asia. *Science of the Total Environment*, **249**: 373.
- Klerks P. L., Weiss J. S. 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environmental Pollution*, **45**: 173.
- Klerks P. L., Levinton J. S. 1993. Evolution of resistance and changes in community-composition in metal-polluted environments: A case-study on Foundry Cove. U *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (ur. R. Dallinger i P.S. Rainbow). Boca Raton: CRC Press, str. 223-241.
- Krimbas C.B., Loukas M. 1980. Inversion polymorphism in *Drosophila subobscura*. *Evolutionary Biology*, **12**: 163.
- Kurbalija Novičić Z., Kenig B., Ludoški J., Stamenković-Radak M., Andjelković M. 2012. Lead-induced variation in Wing Shape and Size in Populations of *Drosophila subobscura*. *Environmental Entomology*, **41** (4): 979.
- Lindgren B., Laurila A. 2005. Proximate causes of adaptive growth rates: growth efficiency variation among latitudinal populations of *Rana temporaria*. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**: 820.
- Lin Y., Teng T., Chang T. 2002. Multivariate analysis of soil heavy metal pollution and landscape pattern in Changhua county in Taiwan. *Landscape and Urban Planning*, **62**: 19.
- Maltby L. 1991. Pollution as a probe of life-history adaptation in *Asellus aquaticus* (Isopoda). *Oikos*, **61**: 11.
- Morgan J., Kille A. J., Stuarzenbaum P. 2007. Microevolution and ecotoxicology of metals in invertebrates. *Environmental Science & Technology*, **41**: 1085.
- Nriagu J. O., Pacyna J. M. 1988. Quantitative assessment of world-wide contamination of the air, water and soils with trace metals. *Nature*, **333**: 134.
- Pauwels M., Frerot H., Bonnin I., Saumitou-Laprade P. 2006. A broad-scale analysis of population differentiation for Zn tolerance in an emerging model species for tolerance study: *Arabidopsis halleri* (Brassicaceae). *Journal of Evolutionary Biology*, **19** (6): 38.
- Reeve M. W., K. Fowler, L. Partridge. 2000. Increased body size confers greater fitness at lower experimental temperature in male *Drosophila melanogaster*. *Journal of Evolutionary Biology*, **13**: 836.
- Rutherford S. L., Lindquist S. 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological variation. *Nature*, **396**: 336.
- Sibly R. M., Calow P. 1989. A life-cycle theory of responses to stress. *Biological Journal of the Linnean Society*, **37**: 101.



- 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**: 193.
- Walther, G. R., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Beebee T. J. C. 2002. Ecological responses to recent climate change. *Nature*, **416**: 389.
- Xu J., Ke X., Krogh P. H., Wang Y., Luo Y. M., Song J. 2009. Evaluation of growth and reproduction as indicators of soil metal toxicity to the Collembolan, *Sinella curviseta*. *Insect Science*, **16**: 57.

---

Sanja Šajkunić and Anja Conev

## The Effect of Lead on Fitness Components in *D. subobscura*

The aim of the current study was to determine a possible evolution of lead resistance in individuals exposed to a multigenerational influence of lead. The design of the experiment is shown in Figure 1. Two experimental groups of *Drosophila subobscura* were developed. One group was reared on a standard medium (K), while the other was kept in a 100 ppm concentration of lead acetate (C2). After fifty generations, eggs from each group were transferred to four mediums with different concentrations of lead acetate (St, Pb1, Pb2, Pb3). Fitness components (egg-to-adult viability and wing-size) of the individuals developed in each sample were measured. When these results were compared, a significant difference in egg-to-adult viability was discovered both between groups and concentrations. Higher lead concentrations led to a decrease of egg-to-adult viability in both experimental groups (Figure 2). Post-hoc testing determined that the biggest decrease in viability took place in group K in the highest lead concentration. The wing width and height of both male and female individuals was influenced by the group factor. The concentration factor had an effect on female wings only. The C2 females had longer and wider wings than the K females in all four concentrations, with the biggest difference occurring in the lowest lead concentration (Pb1) (Figure 3 and 4). These results indicate that the evolution of the wings of *D. subobscura* may be influenced both by natural and sexual selection (Klerks & Weis 1987; Bodar *et al.* 1990; Xu *et al.* 2009). Our study showed that multigenerational selection caused by lead concentration in the group C2 led to a higher resistance to lead concentrations Pb1, Pb2 and Pb3.

