Mužjaci bez očeva i sinova: morfometrijska analiza asimetrije prednjih krila i glave papirnih osa roda *Polistes*

Sara Polašek, 4. razred

Prirodoslovna škola Vladimira Preloga, Zagreb
Mentor: *Gorica Grozdanić*

SAŽETAK
Cilj ovog istraživanja bio je primjenom morfometrijske analize izmjeriti i usporediti razinu asimetrije prednjih krila i glave mužjaka i ženki dvije vrste roda Polistes izložene različitim temperaturnim uvjetima. Pretpostavljeno je da će mužjaci imati veću razinu asimetrije prednjih krila u odnosu na ženke te da će i mužjaci i ženke uzgajane pri 12°C imati značajno veću razinu asimetrije krila i glave u odnosu na one ose uzgajane pri 25 °C. Mužjaci obje analizirane vrste imali su statistički značajno višu razinu asimetrije prednjih krila u odnosu na ženke. Za vrstu Polistes nimpha mužjaci uzgojeni pri niskoj temperaturi demonstrirali su višu razinu asimetrije krila u usporedbi s onima uzgojenima na sobnoj temperaturi, dok kod ženki takva razlika nije bila zabilježena. Razina asimetrije glave nije pokazala statistički značajne razlike ni u jednoj od testiranih skupina. Dodatno, utvrđena je statistički značajno viša razina rane smrtnosti mužjaka u odnosu na ženke. Prilikom mjerenja asimetrije na divljim populacijama potrebno je sagledati cijelu populaciju, ne samo aktivne odrasle jedinke.

Ključne riječi: *haploidna podložnost; spol; temperatura*

UVOD

Da bi mogle maksimizirati pokretljivost i proizvesti dovoljnu potisnu silu za kretanje, približno 99 % svih životinjskih vrsta razvilo je bilateralno simetrični oblik tijela, odnosno tijelo im se, površinski gledano, zamišljenom ravninom može podijeliti na dvije međusobno zrcalne polovice (Holló i Novák, 2012). Ove se dvije polovice razvijaju iz iste embrionalne osnove, ali se dalje razvijaju neovisno jedna o drugoj. Idealno, razvit će se organizam simetričnih obilježja (Holló i Novák, 2012). Međutim, djelovanjem različitih okolišnih i genetskih čimbenika može doći do odstupanja od makroskopske bilateralne simetrije tijela. Ovo odudaranje pojedine karakteristike od idealne simetrije za neku populaciju definira se kao fluktuirajuća asimetrija i moguće ju je mjeriti na bilo kojem simetričnom obilježju (fluktuirajuća asimetrija općenito se mjeri na razini populacije, ne na razini jedinke zbog mogućih devijacija fenotipa) (Møller, 1998). Povećana izloženost stresnim uvjetima u okolišu poput zagađenja teškim metalima, pesticidima i insekticidima, parazitizmu, nepovoljnim temperaturnim uvjetima, ali i pojavnosti križanja u srodstvu povećava vjerojatnost razvoja asimetrične osobine (Banaszak-Cibicka i sur., 2017). Upravo zato mjera asimetrije može služiti kao pokazatelj razvojne nestabilnosti (eng. *developmental instability*), odstupanja od prosječnog fenotipa uzrokovano nemogućnošću regulacije embrionalnog razvoja pod nepovoljnim utjecajem okoline (Møller, 1998).

Međutim, brojna su istraživanja čiji su rezultati mjerenja asimetrije kontradiktorni, implicirajući pitanje zašto stresni uvjeti u okolišu ne rezultiraju uvijek pojavom asimetrije (Lens i sur., 2002). Jedno je od ponuđenih odgovora bilo ispitivanje pojavnosti asimetrije na više karakteristika istog organizma. No, mjerenjem asimetrije različitih organa muhe *Sepsis cynipsea* pokazano je da u istoj populaciji neka svojstva mogu pokazivati izraženu asimetriju, dok druga ne (Blanckenhorn i sur., 2004).

Upravo se u zahtjevnim uvjetima okoliša, poput onih koji uzrokuju pojavu asimetrije, organizmi konstantno trebaju prilagođavati. Ovu sposobnost organizma da se prilagodi, preživi u svojemu okolišu te razmnožava stvarajući fertilno potomstvo moguće je definirati kao njegovu funkcionalnu sposobnost (eng. *fitness*) određenu međudjelovanjem okoliša i samoga genoma jedinke (Wadgymar i sur., 2024). Općenito,

Autori zadržavaju autorska prava te časopisu daju pravo prvog objavljivanja rada u skladu s licencijom CC BY 4.0, koja dopušta drugima dijeljenje rada uz navođenje autorstva i izvornog mjesta objavljivanja rada u časopisu.

nepovoljni okoliš će zahtijevati veću mogućnost prilagodbe na njega. Jedinka će se ovome stresu prilagođavati sve do teorijske točke u kojoj opseg stresa nadilazi njezin kapacitet prilagodbe, što će dovesti do manjka regulacije, povećane vjerojatnosti nastanka asimetrije ili čak ugibanja organizma (Graham i sur., 2010). Zbog toga je razlika u razini funkcionalne sposobnosti među jedinkama mehanizam kojim se postiže prirodna selekcija, odnosno opstanak najprilagođenijih jedinki koje će razmnožavanjem svoje osobine prenijeti potomstvu (Wadgymar i sur., 2024).

Kao i gotovo svi drugi organizmi, papirne ose iz roda *Polistes* aktivno se prilagođavaju okolišu u kojemu žive. Sistematski, papirne ose svrstavamo u zadružne kukce iz reda opnokrilaca (Hymenoptera), skupine žalčara (Aculeata) i porodice prave ose (Vespidae), a karakterizira ih potpuna preobrazba. Žive u gnijezdima čiji materijal podsjeća na papir zbog čega su dobile trivijalni naziv papirne ose. Društvena hijerarhija iznimno je bitna u kolonijama sačinjenim od jedne ili više kraljica, radilica i mužjaka, ali za razliku od stvarno društvenih (eusocijalnih) kukaca poput pčela i mrava, papirne ose nemaju izražene morfološke razlike između kraljica i radilica zbog čega se njihove zajednice smatraju primitivno društvenima (Liebert i sur., 2005).

Godišnji ciklus kolonije papirnih osa roda *Polistes* moguće je podijeliti u četiri stadija; stadij osnivanja, stadij radilica, reproduktivni stadij i međustadij (Liebert i sur., 2005). Ciklus svake godine započinje u proljeće kada buduće kraljice, rođene krajem prošlogodišnjeg ciklusa, napuste stadij dijapauze, gotovo potpune redukcije metaboličke i reproduktivne aktivnosti (Stabentheiner i sur., 2024) i započinju s osnivanjem kolonije gradnjom gnijezda od usitnjenih biljnih vlakana pomiješanih sa slinom. Nakon stadija osnivanja, u rano ljeto započinje stadij radilica. Prve ženke koje se rode u ovom stadiju sterilne su radilice koje od kraljice preuzimaju ulogu brige o gnijezdu, potomstvu te prikupljanju hrane, dok kraljica sada preuzima pretežito reproduktivnu ulogu. Sterilnost ovih radilica određena je specifičnim feromonima koji sprječavaju oogenezu i razvoj jajnika, a izlučuje ih kraljica (Van Oystaeyen i sur., 2014). Tijekom razdoblja kasnog ljeta kolonija ulazi u reproduktivni stadij. Sada se pojavljuju dvije nove kaste, haploidni mužjaci i diploidne, fertilne ženke. Na vrhuncu razvoja kolonije ovi mužjaci i ženke napuštaju gnijezdo kako bi se parili. Dolaskom jeseni dolazi do međustadija ugibanjem radilica, mužjaka i stare kraljice, dok oplođene buduće kraljice traže mjesto pogodno prezimljavanju.

Papirne ose, zajedno s drugim pripadnicima reda opnokrilaca, mogu se razmnožavati posebnim oblikom partenogeneze iz neoplođene jajne stanice, arhenotokijom (Liebert i sur., 2005). Nakon parenja u jesen, buduće kraljice imaju pune spermateke, organe namijenjene skladištenju spermija te zrele oocite u jajnicima (Strassmann, 1991). Kraljice same biraju koja će jaja biti oplođena izravno određujući sastav kolonije; iz oplođenih jajašaca rodit će se radilice i buduće kraljice, dok će se iz neoplođenih jajašaca arhenotokijom roditi mužjaci. S obzirom na to da mužjaci nastaju nakon genetske rekombinacije u mejozi, oni nisu genetski klonovi kraljice. Ovakav haplodiploidni način razmnožavanja od presudne je važnosti za životni ciklus kukaca, ali i razumijevanje pojave složene hijerarhije kod zadružnih kukaca (Kennedy i Radford, 2020).

Haplodiploidija opisana je i kod pčela. U jednom istraživanju provedenom na solitarnim pčelama vrste *Osmia bicornis* u uvjetima povećanog okolišnog zagađenja izmjeren je veći opseg asimetrije krila mužjaka od ženki (Szentgyörgyi i sur., 2017). Najizglednije objašnjenje takvog rezultata proizlazi iz teorije haploidne podložnosti (eng. *haploid susceptibility theory*) (Wilson-Rich i sur., 2014). Prema ovoj teoriji, razvojna stabilnost organizma ovisi o njegovu genomu. Diploidne (2n) ženke zbog prisutnosti dva seta kromosoma mogu biti heterozigoti, odnosno posjedovati dvije različite kopije gena za bilo koje svojstvo. Ova raznolikost

na lokusima, lokacijama pojedinih gena, može inaktivirati ekspresiju štetnih recesivnih alela, potencijalno minimizirajući njihov negativni učinak tijekom razvoja. S obzirom na to da su mužjaci haploidni, odnosno imaju samo jedan set kromosoma, ukoliko naslijede štetni alel ne posjeduju drugi kojim bi ga inaktivirali. Ovaj manjak regulacijskog mehanizma potencijalno povećava vjerojatnost pojave asimetrije određenog obilježja (Szentgyörgyi i sur., 2017).

Osim kemijskih stresora, na ose također utječu temperaturni uvjeti u okolišu. Poznato je da smanjenje temperature dovodi do promjene u obojenju tijela odrasle ose (de Souza i sur., 2020). S obzirom na to da se temperaturni uvjeti različitih od optimalnih za pojedinu jedinku smatraju nepovoljnim okolišnim uvjetima, moguće je postaviti pitanje hoće li modifikacija temperature utjecati na promjenu morfologije i drugih sustava.

Primarna motivacija za odabir teme proizlazi iz razlike u percepciji osa i pčela u općoj populaciji. Budući da je pozornost javnosti i bivših pčelara u autorovoj obitelji pretežito usmjerena na pčele zbog ekonomski značajnih sirovina koje proizvode, ekološki doprinos osa često je zanemaren. Unatoč negativnoj javnoj percepciji, ose igraju važnu ulogu u biološkoj kontroli kukaca nametnika te pridonose procesima oprašivanja (Rayor i sur., 2007) zbog čega zaslužuju preispitivanje reputacije.

Sukladno navedenom, ciljevi ovog istraživanja bili su morfometrijskom analizom utvrditi razliku u opsegu asimetrije prednjih krila između mužjaka i ženki uzgojenih pri sobnoj temperaturi, izmjeriti opseg asimetrije krila i glave kod jedinki izloženih smanjenju temperature te ispitati postojanje povezanosti između okolišnog stresa uzrokovanog smanjenjem temperature i razine asimetrije kao pokazatelja razvojne nestabilnosti.

Temeljem postavljenog, pretpostavlja se da će haploidni mužjaci imati veći opseg asimetrije prednjih krila u odnosu na diploidne ženke pri sobnoj temperaturi. Dodatno, pretpostavlja se da će i mužjaci i ženke izloženi nižim temperaturnim uvjetima demonstrirati veći opseg asimetrije prednjih krila i glave u odnosu na one jedinke izložene sobnoj temperaturi.

U provedenom istraživanju nezavisne varijable bile su temperatura i spol dok su zavisne varijable bile opseg asimetrije prednjih krila i glave osa roda *Polistes.* S obzirom na to da su sve ose bile hranjene jednakom učestalošću i vrstom hrane, prikupljene u približno jednakom stadiju razvoja te da su dva različita lokaliteta i vrste bili parametri korišteni samo zbog replikacije rezultata, ne kao čimbenici koji utječu na asimetriju, sve su ove varijable kontrolne.

METODE RADA

Prikupljeno je ukupno 102 primjerka papirnih osa roda Polistes iz gnijezda u reproduktivnom stadiju s dva lokaliteta tijekom ranog kolovoza. Gnijezda s primarnog lokaliteta bila su prikupljena s tavana zapuštenog stambenog objekta na području sela Okunšćak (geolokacija 45.752405, 16.209025) prije provedbe opsežne dezinsekcije objekta. Nakon pretrage tavana prizemnice, pronađena su 42 aktivna gnijezda vrste Polistes nimpha C. te najmanje još toliko srušenih ili napuštenih gnijezda bez odraslih osa. Osam je gnijezda, zajedno s odraslim osama koje su bile na njima u trenutku, bilo prikupljeno i označeno oznakama od G01 do G08. Odrasle su ose odmah na lokaciji bile pohranjene u 70 % alkoholu etanolu. Osim ovih osam, prikupljena su i dva gnijezda iste vrste s livada u neposrednoj blizini lokaliteta (G14 – 45.754707, 16.207695; G15 – 45.755192, 16.206574) te 26 odraslih osa (19 ženki i 7 mužjaka) za koje je pretpostavljena dovoljna funkcionalna sposobnost da ih se može smatrati divljom kontrolnom populacijom. Dodatnih pet gnijezda bilo je prikupljeno na području grada Virovitice (G09 – 45.846184,

17.407202; G10 – 45.846472, 17.406482; G11 – 45.846717, 17.40585; G12 – 45.847029, 17.405821; G13 – 45.846697, 17.405661). Gnijezda G09, G10 i G13 pripadala su vrsti Polistes gallicus L., dok su gnijezda G11 i G12 pripadala vrsti P. nimpha. Sva su gnijezda bila prikupljena od strane autora uz korištenje potpune zaštitne pčelarske opreme. Određivanje vrsta provedeno je korištenjem ključa za rod Polistes (Schmid-Egger i sur., 2017).

Uzgoj, hranjenje i prikupljanje odraslih osa pri sobnoj temperaturi (25 °C)

Sva prikupljena gnijezda bila su pohranjena u prozirne plastične spremnike i prekrivena mrežicom od tila kako bi se osigurali primjereni uvjeti za kontrolirani uzgoj. Da bi se omogućio usporediv stadij razvoja svih jedinki, u istraživanju su korišteni samo organizmi u stadiju ličinke koje još nisu u tom trenutku sa svih strana ispunjavale ćeliju. S obzirom na to da se ličinke u prirodi hrane prožvakanim kukcima, nakon testiranja tri komercijalne vrste hrane sastava različitih mješavina crva i ličinki kupljenih u trgovini za kućne ljubimce odabrana je hrana *Insectivore diet, ReptiPlanet* sastava: ličinke crne vojničke muhe, rižino brašno, bjelančevine krumpira, crvi brašnari, kalcijev karbonat, krumpir, slatki krumpir, račići, guma rogačeve mahune, banane, jabuka, laneno sjeme, kokosovo mlijeko, maslačak, hibiskus, lucerna, pelud, med, vitamin Premix, Spirulina, probiotici, ekstrakt ružmarina te nutritivne vrijednosti: bjelančevine 33 %, sadržaj masti 10 %, sirova vlakna 9 %, sirovi pepeo 6 %.

Praškasta hrana i voda za svako su hranjenje bili pomiješani u omjeru približno 1:1 kako bi se dobio gusti tekući materijal.

Dovođenje hrane do usta ličinke bilo je otežano zbog izuzetno male veličine ličinke. Ličinke su hranjene do zasićenja, tj. do trenutka kada više nisu aktivno otvarale usta prilikom približavanja s kapljicom hrane. U konačnici je hrana ličinkama do usta dostavljena zatupljenom entomološkom iglicom svakoj ličinki omogućujući jednu do tri kapljice po hranjenju. Ova je količina određena na temelju dvije ličinke koje su zbog nakupljanja i sušenja pretjerane količine hrane oko usne šupljine ugibale. Uz dostatnu količinu hrane, ličinkama je također bilo potrebno omogućiti dovoljnu količinu vode. Prve ličinke kojima dovoljna količina vode nije bila omogućena zaostajale su u rastu i dobivale staklast ili crvenkast izgled. Kasnijim dodavanjem kapljice vode u većem broju slučajeva rezultiralo je nastavkom rasta (dvije su ličinke uginule zbog ovoga, ostale koje su vidno zaostale u rastu nisu bile korištene u analizi asimetrije nervature krila). Odrasle ose bile su prikupljene s gnijezda otprilike 48 sati nakon napuštanja kukuljice da bi se osiguralo da im krila budu dovoljno razvijena za provedbu morfometrijske analize. Osim prikupljanja odraslih osa, na svakom je gnijezdu bilo prikupljeno nekoliko osa koje su uginule nakon završetka preobrazbe pa im je bilo moguće odrediti spol. U tu svrhu su otvorene sve kukuljice na gnijezdima iz kojih nisu izašle odrasle ose (smrt prije izlaska) te su i prikupljene ose koje su uginule unutar 24 sata od izlaska (prva skupina je na sebi zadržala ovojnicu, dok je druga bila bez nje).

Uzgoj, hranjenje i prikupljanje odraslih osa pri sniženoj temperaturi (12 °C)

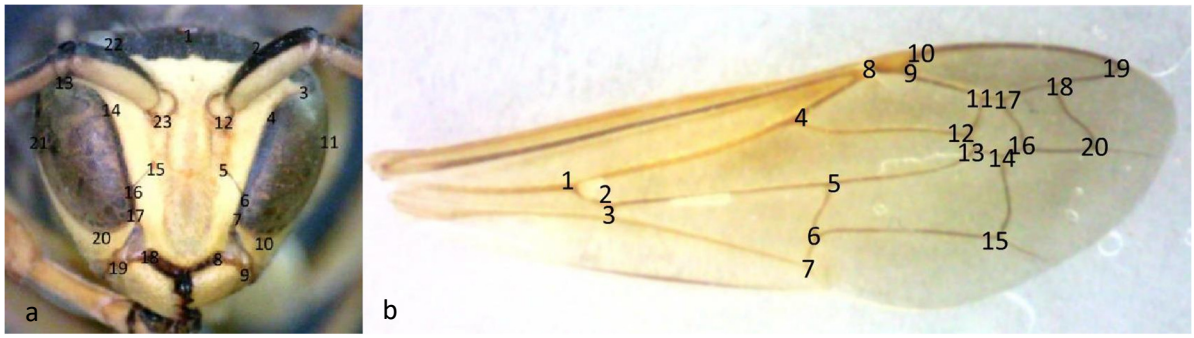
Svi su uvjeti osim temperature bili podjednaki i konstantni u obje skupine izložene različitim temperaturnim uvjetima. Tri gnijezda vrste *P. nimpha* s ukupno 26 jedinki u približno istom stadiju kao i u drugoj skupini bila su čuvana u hladnjaku na stalnoj temperaturi od 12 °C kako bi se minimizirala nanesena šteta uz osiguravanje dovoljnog temperaturnog odmaka prosječnim ljetnim temperaturama te dostatnog eksperimentalnog uzorka. Morfometrijska analiza krila i glave provedena je na 6 ženki i 4 mužjaka koja su u ovim uvjetima doživjela stadij adulta. Za sva tri gnijezda koja su bila izložena niskoj temperaturi postojali su odrasli primjerci ženki za usporedbu koji su bili prikupljeni prije početka mjerenja.

Prikupljanje preparata za morfometrijsku analizu

Anatomskim škaricama svakoj su osi bila odrezana prednja krila i pincetom prenesena na predmetno staklo na koje je prethodno bila nanesena kapljica vode. Zatim je preko krila bilo postavljeno pokrovno stakalce koje je omogućilo pravilno i potpuno širenje krila. Uz analizu krila, analizirane su i glave svih jedinki vrste *P. nimpha* koje su bile izložene niskoj temperaturi te nasumično odabranih 10 (5 ženki, 5 mužjaka) glava jedinki iste vrste držanih na sobnoj temperaturi za usporedbu. Kako bi se izradile čim ujednačenije slike glave, svaki je primjerak pažljivo postavljen u vidno polje osiguravajući da su oba oka i svi anatomski važni detalji u istoj ravnini. Sve su fotografije bile načinjene komercijalno kupljenim Dino-Lite digitalnim mikroskopom modela AM7515MT8A rezolucije 5 megapiksela.

Izrada morfometrijskog dokumenta u programu *tpsUtil*, označavanje krila u programu *tpsDig* i analiza podataka u programu *tpsRelw* (Rohlf, 2015)

Sve su slike bile uvrštene u dokument javno dostupnog programa *tpsUtil.* Mjerenje opsega asimetrije bilo je provedeno analizom tanke ploče označavajući 23 točke na svakoj slici glave (slika 1a; Oliveira i Gonçalves, 2023) i 20 točaka na svakoj slici krila (slika 1b; Owen, 2012) u programu *tpsDig*. Prilikom označavanja točaka, slike su bile nasumično poredane da se minimizira vjerojatnost pojave pogreške uzrokovane inicijalnom nepreciznošću.



Slika 1 (a) Glava mužjaka vrste P. nimpha s 23 morfometrijske oznake; (b) Krilo mužjaka vrste P. nimpha s 20 morfometrijskih oznaka

Ovdje je svaka točka na svakom krilu i na svakoj glavi dobila svoju x i y koordinatu na odvojenim koordinatnim sustavima. U posljednjem koraku provedena je analiza krila u programu *tpsRelw* (Rohlf, 2015). Udaljenost između dvije točke koje su predstavljale krila iste ose ili lijevu i desnu polovicu glave korištena je kao mjera opsega asimetrije u ovom istraživanju (Rohlf, 2015; Oliveira i Gonçalves, 2023). Asimetrija glava bila je izmjerena na pojedinim uzorcima na kojima je već mjerena asimetrija krila. Kao mjera asimetrije korištena je *procrustes* udaljenost (usporedba nakon usklađivanja po veličini, položaju i rotaciji koja osigurava izravnu usporedivost različitih objekata) između lijevog i desnog krila ili lijeve i desne strane glave, izračunata pomoću *tpsRelw* programa.

Provjera pogreške mjerenja provedena je za postupak označavanja točaka na krilima s obzirom na neautomatiziranu prirodu procesa. Na svakom je od dvadeset nasumično odabranih slika krila proces označavanja svih točaka bio neovisno ponovljen tri puta. Krila su zatim analizirana istim principom kao i u glavnom mjerenju asimetrije uspoređivanjem samo s identičnim primjercima fotografije krila, ne međusobno.

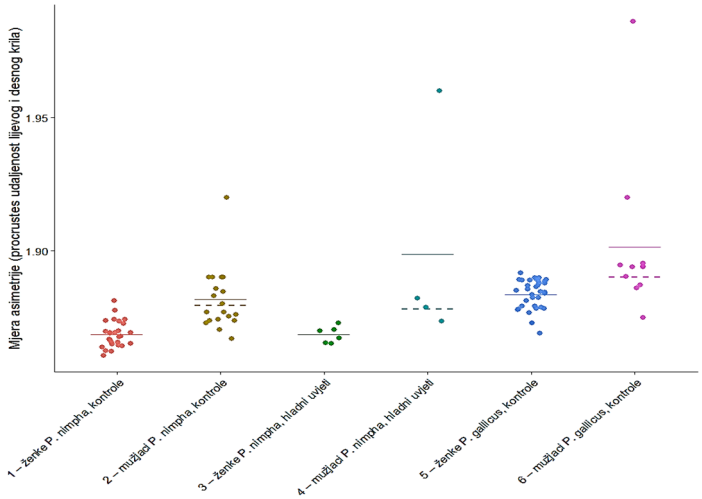
Statistička analiza provedena je izračunom prosječne vrijednosti, standardne devijacije te provedbom t-testa za brojčane i hi-kvadrat testa za kategorijske podatke u programu MS Excel uz razinu statističke značajnosti od $p < 0,05$. Grafički prikaz (slika 2) izrađen je u programu Datanovia (*online R console*).

REZULTATI

U ovom istraživanju analizirana su prednja krila ukupno 102 jedinke papirnih osa (68 ženki i 34 mužjaka) od kojih je za 20 jedinki bila izmjerena i asimetrija glave. Uz mjerenje asimetrije koje je u ovom istraživanju služilo kao glavni pokazatelj razvojne nestabilnosti također je analiziran 21 slučaj smrti tijekom ili neposredno nakon izlaska iz kukuljice (16 mužjaka i 5 ženki) koje nisu bile korištene pri mjerenju asimetrije krila i glave. Ovo je bio statistički značajan rezultat koji je ukazivao na izraženo veću smrtnost mužjaka u ovom stadiju razvoja, u odnosu na dobiveni omjer spolova (χ^2 = 17,36; p < 0,001). Osim navedenih primjeraka papirnih osa, u ovom radu je prikupljeno i 8 primjeraka parazitske ose *Latibulus argiolus* L. određenih ključem za rod *Latibulus* (Oh i sur., 2012), od kojih je jedan primjerak dobiven s gnijezda koje je bilo izloženo niskoj temperaturi.

Poput veće učestalosti ranih smrti, mužjaci obje analizirane vrste imali su izraženiju asimetriju prednjih krila od ženki (slika 2). Kod vrste *P. nimpha* dobiven je statistički značajan rezultat pri usporedbi asimetrije krila mužjaka koja je iznosila 1,881 ± 0,012, a za ženke 1,869 ± 0,005 (p < 0,001). Za mužjake vrste *P. gallicus* zabilježena je asimetrija iznosila 1,901 ± 0,030 što je bilo statistički značajno u usporedbi sa ženkama čija je razina asimetrije iznosila 1,884 ± 0,006 (p = 0,001).

Analiza krila osa vrste *P. nimpha* koje su bile uzgojene pri niskoj temperaturi također je pokazala zanimljiv rezultat (slika 2). Krila mužjaka uzgojenih pri 12 °C bila su statistički značajno veće razine asimetrije od onih mužjaka uzgajanih pri 25 °C (1,899 ± 0,041 za eksperimentalnu skupinu u usporedbi s 1,882 ± 0,041 za kontrolnu; p = 0,029). Istovremeno, ženke nisu pokazale gotovo nikakav opseg razlike s obzirom na to da je razina asimetrije onih ženki uzgajanih pri 12 °C iznosila 1,869 ± 0,003, a za one jedinke uzgajane pri 25 °C 1,869 ± 0,016 (p = 0,314).



Slika 2 Mjere asimetrije prednjih krila za šest analiziranih skupina određenih temeljem vrste, spola i temperaturnih uvjeta u kojima su ose uzgajane (pune horizontalne crte označavaju prosječnu vrijednost asimetrije, iscrtane crte prosječnu vrijednost nakon uklanjanja četiri vrlo visoke vrijednosti, a točke predstavljaju pojedinu jedinku)

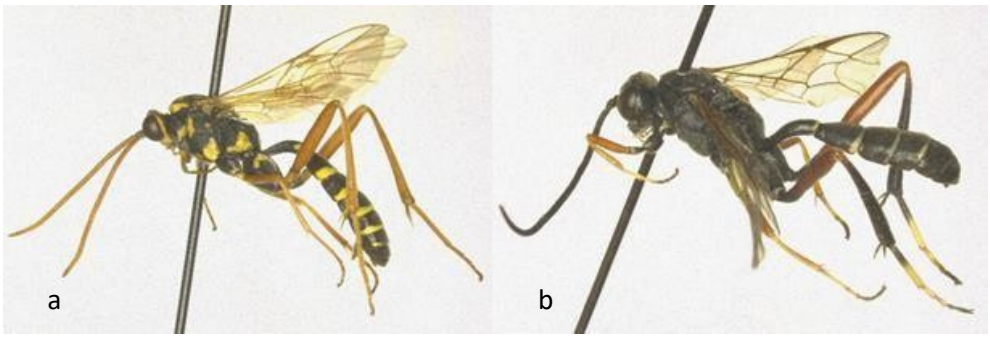
Analiza asimetrije glave nije pokazala ni jednu statistički značajnu razliku. Mužjaci uzgojeni pri niskoj temperaturi imali su prosječnu vrijednost asimetrije od 13,836 ± 0,591 dok su mužjaci uzgojeni pri sobnoj temperaturi imali prosječnu vrijednost od 13,641 ± 0,321 (p = 0,545). Ženke uzgojene pri niskoj temperaturi imale su usporedivu razinu asimetriju sa ženkama uzgojenim na sobnoj temperaturi (13,513 ± 0,201 za eksperimentalnu u usporedbi s 13,691 ± 0,225 za kontrolnu; p = 0,200). Unatoč tome, nije zabilježena statistički značajna razina asimetrije prilikom usporedbe mužjaka i ženki uzgojenih pri temperaturi od 12°C (p = 0,241) kao ni mužjaka i ženki uzgojenih pri 25 °C (p = 0,900).

Za 12 je odraslih ženki prikupljenih iz okoliša (divlja populacija) na krilima u području stigme, pigmentiranog zadebljanja krila, zabilježena hiperpigmentacija (slika 3), dok su za 16 mužjaka i 23 ženke zabilježene manje promjene nervaturnog sustava krila (nepotpuni spoj ili pomak pojedine žilice).



Slika 3 Hiperpigmentacija prednjeg krila ženke vrste *P. gallicus* oko područja stigme

Dodatno, opažena je fenotipska varijacija i parazitske ose *Latibulus argiolus* uzgojene pri niskoj temperaturi na gnijezdu vrste *P. nimpha* držane na temperaturi od 12 °C (slika 4). Jedinka koja je neplanirano bila uzgojena zajedno s ostalim uzorcima u ovoj skupini razvila je tamnije tjelesno obojenje (slika 4b) u odnosu na druge jedinke *L. argiolus* uzgojene pri sobnoj temperaturi (slika 4a).



Slika 4 (a) Primjerak parazitske ose *L. argiolus* sa svjetlijim obrascem obojenosti tijela; (b) primjerak parazitske ose *L. argiolus* s tamnijim obrascem obojenosti

Od 21 primjerka osa koje su uginule nakon završetka procesa preobrazbe, njih je 12 uginulo prije izlaska iz kukuljice još uvijek unutar ovojnice (slike 5a, b), dok ih je devet uginulo nakon izlaska iz kukuljice (ovojnica odsutna; slika 5c). Pri tome je smrt prije izlaska iz kukuljice bila zabilježena za ukupno dvije ženke i 10 mužjaka (χ^2 = 13,50; p < 0,001), dok je nakon izlaska iz kukuljice zabilježeno tri smrti ženki i šest smrti mužjaka (χ^2 = 4,50; p = 0,034). Od mužjaka koji su uginuli u ova dva stadija tri su imala vidljive makroskopske malformacije. Dva su bila ispravne anatomske građe uz iznimno izraženu asimetriju krila, dok je kod jednog zabilježeno više morfoloških odstupanja, uključujući skraćene noge, deformirana ticala te nedovoljno razvijena krila (slika 5b).



Slika 5 (a) Mužjak vrste *P. nimpha* koji je uginuo prije izlaska iz kukuljice; (b) mužjak vrste *P. nimpha* s višestrukim morfološkim odstupanjima; (c) mužjak vrste *P. nimpha* koji je uginuo nakon izlaska iz kukuljice

Konačno, bila je određena pogreška mjerenja za proces postavljanja morfometrijskih oznaka. Za dvadeset nasumično odabranih krila je pogreška u mjerenju i izračunu asimetrije iznosila u prosjeku 0,173 ± 0,012, što je bilo znatno manje od prosječne vrijednosti asimetrije pojedinih primjeraka.

RASPRAVA

Rezultati ovog istraživanja potvrdili su da mužjaci obje od ispitivanih vrsta pokazuju značajno višu razinu asimetrije prednjih krila u usporedbi sa ženkama. Ovakav rezultat podupire teoriju haploidne podložnosti, odnosno pretpostavke da su haploidni organizmi, poput mužjaka analiziranih osa, podložniji nepovoljnom utjecaju okoliša kojeg je moguće izmjeriti na fenotipu. Ovime je prva hipoteza potvrđena, odnosno viši stupanj asimetrije krila analiziranih mužjaka može služiti kao dokaz njihove smanjene funkcionalne sposobnosti.

Uzgojem jedinki vrste *P. nimpha* na niskoj temperaturi nije dobivena statistički značajna razlika u razini asimetrije prednjih krila ženki u odnosu na ženke uzgojene na sobnoj temperaturi. Za razliku od ženki, kod mužjaka je zabilježena statistički značajna razlika ponovno ukazujući na njihovu smanjenu sposobnost kompenziranja utjecaja nepovoljnog okoliša. Ovime je dio druge hipoteze koji se odnosio na opseg asimetrije prednjih krila djelomično potvrđen.

Međutim, analiza asimetrije glave nije pokazala statistički značajne razlike ni u odnosu na temperaturu ni između spolova čime je dio druge hipoteze u potpunosti opovrgnut. Ovaj rezultat moguće je interpretirati na više načina. Moguće je da je glava u razvojnom smislu stabilnija i da se njezina razvojna regulacija snažnije održava prilikom izloženosti stresnim uvjetima za razliku od krila koja su potencijalno osjetljivija na razvojne poremećaje (Graham i sur., 2010). Dodatno, u obzir treba uzeti manji uzorak glava u usporedbi s krilima te složeniju prirodu procesa fotografiranja trodimenzionalne glave u usporedbi s dvodimenzionalnim krilom. Moguće je da bi na većem ispitivanom uzorku rezultati opsega asimetrije glave odstupali od rezultata dobivenih u ovom istraživanju. Sve ovo ide u prilog činjenici da je mjerenje utjecaja stresa i asimetrije na jedinki, a time i u populaciji, složenije od uspostavljanja jednostavnog uzročno-posljedičnog odnosa (De Coster i sur., 2013).

Jedna od glavnih spoznaja ovog istraživanja potreba je za proširivanjem testiranog uzorka pri mjerenju funkcionalne sposobnosti na razini populacije. Mjerenje funkcionalne sposobnosti isključivo na aktivnim, odraslim jedinkama može dovesti do pogrešnih zaključaka o ekološkoj stabilnosti vrste s obzirom na to da takav pristup zanemaruje smrtnost u ranijim razvojnim stadijima. Pri tome je u ovom istraživanju pokazano da je rana smrtnost statistički značajno češća kod mužjaka, što dodatno potvrđuje teoriju haploidne podložnosti. Ovo se može smatrati preciznom mjerom stresa u koloniji s obzirom na to da visoka stopa smrtnosti ukazuje na narušenu funkcionalnu sposobnost populacije. Stoga je za potpunu evaluaciju funkcionalne sposobnosti nužno analizirati cijelo gnijezdo, idealno za vrijeme trajanja godišnjeg ciklusa od njegova početka do kraja, uključujući i nerazvijene stadije.

Na nekima je od analiziranih krila jedinki koje su iz okoliša bile prikupljene u odraslom stadiju oko područja stigme, pigmentiranog zadebljanja krila, uočeno zatamnjenje, tj. pojava hiperpigmentacije. Jedno je od mogućih objašnjenja ove hiperpigmentacije oštećenje uzrokovano sunčevim zračenjem. S obzirom na to da ne postoji dovoljan broj uzoraka koji imaju ovo fenotipsko obilježje te da nije poznato u kojim su uvjetima jedinke s tim obilježjem živjele prije nego što su bile prikupljene, nije moguće sigurno tvrditi da je ova hiperpigmentacija uzrokovana utjecajem sunčeva zračenja.

Osim svih rezultata zabilježenih za ose roda *Polistes,* opažene su fenotipske varijacije i parazitske ose

Latibulus argiolus uzgojene pri niskoj temperaturi na gnijezdu vrste *P. nimpha* u vidu tamnijeg obojenja tijela u odnosu na parazitske ose uzgojene pri sobnoj temperaturi. Ovaj fenomen, termalni melanizam, zabilježen je i kod ženki papirnih osa roda *Polistes* pojavom tamnijeg obojenja abdomena radi učinkovitije apsorpcije sunčeva zračenja i bržeg postizanja radne temperature tijela (De Souza i sur., 2017). Ova prilagodba boje sugerira da hladnoća na sličan način utječe i na ose drugih vrsta, potičući prilagodbu uvjetima okoliša.

Konačno, iako rezultati ovog istraživanju djelomično potvrđuju hipoteze, potrebno ih je sagledati kroz nekoliko ograničenja. Prvo, opseg asimetrije izmjeren je na ograničenom broju uzoraka samo dvije vrste, čime se valjanost rezultata ne može izravno primijeniti na druge vrste. Dodatno, u ovom je istraživanju izmjeren utjecaj samo jednog okolišnog stresora u mjeri koja je učinak pokazala pretežito na mužjacima. Različiti okolišni čimbenici mogli bi uzrokovati drugačije ishode.

ZAKLJUČCI

Temeljem rezultata provedenog istraživanja moguće je zaključiti sljedeće:

- mužjaci vrste P. nimpha i P. gallicus imaju veći opseg asimetrije prednjih krila od ženki uzgojenih pri sobnoj temperaturi;
- mužjaci vrste P. nimpha uzgojeni pri 12 °C imaju statistički značajno veću razinu asimetrije od mužjaka uzgojenih na sobnoj temperaturi, dok za ženke uzgojene u istim kontrolnim i eksperimentalnim uvjetima nije zabilježena statistički značajna razlika;
- asimetrija glave mužjaka i ženki nije se statistički značajno razlikovala između skupina uzgojenih pri sobnoj temperaturi i na niskoj temperaturi;
- stopa rane smrtnosti bila je statistički značajno veća za mužjake u odnosu na ženke;
- mjerenje opsega asimetrije isključivo na aktivnim odraslim jedinkama uhvaćenima u prirodi nije dovoljno za cjelovitu analizu asimetrije, potrebno je sagledati koloniju u cijelosti, uključujući i stope rane smrtnosti.

LITERATURA

Banaszak-Cibicka W., Fliszkiewicz M., Langowska A., Żmihorski M. 2017. Body size and wing asymmetry in bees along an urbanization gradient. Apidologie 49: 297–306.

Blanckenhorn W. U., Kraushaar U. R., Teuschl Y., Reim C. 2004. Sexual selection on morphological and physiological traits and fluctuating asymmetry in the black scavenger fly Sepsis cynipsea. Journal of evolutionary biology 17: 629–641.

De Coster G., Van Dongen S., Malaki P., Muchane M., Alcántara-Exposito A., Matheve H., Lens L. 2013. Fluctuating asymmetry and environmental stress: understanding the role of trait history. PloS one 8: e57966.

De Souza A., Turillazzi S., Lino-Neto J., Santini G. 2017. Colder environments may select for darker paper wasps. Biological journal of the Linnean Society 120.

de Souza A. R., Mayorquin A. Z., Sarmiento C. E. 2020. Paper wasps are darker at high elevation. Journal of thermal biology 89: 102535.

Graham J. H., Raz S., Hel-Or H., Nevo E. 2010. Fluctuating Asymmetry: Methods, Theory, and Applications. Symmetry 2: 466–540.

Holló G. i Novák M. 2012. The manoeuvrability hypothesis to explain the maintenance of bilateral symmetry in animal evolution. Biology direct 7: 22.

Kennedy P., Radford A. N. 2020. Sibling quality and the haplodiploidy hypothesis. Biology Letters 16: 20190764.

Lens L., Van Dongen S., Kark S., Matthysen E. 2002. Fluctuating asymmetry as an indicator of fitness: can we bridge the gap between studies? Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society 77: 27–38.

Liebert A. E., Sumana A., Starks P. T. 2005. Diploid males and their triploid offspring in the paper wasp Polistes dominulus. Biology letters 1: 200–203.

Møller A. P. 1998. Developmental instability as a general measure of stress. U: Møller A. P., Milinski M., Slater P. J. B., Stress and Behavior. Academic Press, San Diego, str. 181–213.

Oh S. H., An S. L., Lee J. W. 2012. Review of Korean Latibulus (Hymenoptera: Ichneumonidae: Cryptinae) and a key to the world species. The Canadian entomologist 144: 509–525.

Oliveira P. S., Gonçalves R. B. 2023. Head geometric morphometrics as a reliable method to discriminate sexes and species of Megalopta, a nocturnal bee genus (Hymenoptera, Apoidea). Apidologie 54: 44.

Owen R. 2012. Applications of morphometrics to the Hymenoptera, particularly bumble bees (Bombus, Apidae). InTech doi: 10.5772/34745

Rayor L. S., Mooney L. J., Renwick J. A. 2007. Predatory behavior of Polistes dominulus wasps in response to cardenolides and glucosinolates in Pieris napi caterpillars. Journal of chemical ecology 33: 1177–1185.

Rohlf J. F. 2015. The tps series of software. Hystrix, the Italian journal of mammalogy 26: 9–12.

Schmid-Egger C., van Achterberg K., Neumeyer R., Morinière J., Schmidt S. 2017. Revision of the West Palaearctic Polistes Latreille, with the descriptions of two species – an integrative approach using morphology and DNA barcodes (Hymenoptera, Vespidae). Pensoft Publishers 713: 53–112.

Stabentheiner A., Mauerhofer T., Willfurth R., Kovac H., Stabentheiner E., Käfer H., Petrocelli I. 2024. The costs of overwintering in paper wasps (Polistes dominula and Polistes gallicus): the use of energy stores. Journal of comparative physiology B 194: 131–144.

Strassmann J. E. 1991. Costs and benefits of colony aggregation in the social wasp, Polistes annularis. Behavioral ecology 2: 204–209.

Szentgyörgyi H., Moroń D., Nawrocka A., Tofilski A., Woyciechowski M. 2017. Forewing structure of the solitary bee Osmia bicornis developing on heavy metal pollution gradient. Ecotoxicology 26: 1031–1040.

Van Oystaeyen A., Oliveira R.C., Holman L., van Zweden J.S., Romero C., Oi C.A., d'Ettorre P., Khalesi M., Billen J., Wäckers F., Millar J.G., Wenseleers T. 2014. Conserved class of queen pheromones stops social insect workers from reproducing. Science 343: 287–290.

Wadgymar S.M., Sheth S., Josephs E., DeMarche M., Anderson J. 2024. Defining fitness in evolutionary ecology.
International journal of plant sciences 185: 218–227.

Wilson-Rich N., Pilowsky J.A., Foo B., Tien T., Hester F., Starks P.T. 2014. A test of the haploid susceptibility hypothesis using a species with naturally occurring variation in ploidy. Insectes Sociaux 61: 163–169.