

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Lea B. Vlajnić

Evolucija mito-jedarnih interakcija: „materinska kletva“ i „tehnika trojanskih ženki“ u regulisanju brojnosti populacija pasuljevog žiška
(*Acanthoscelides obtectus*, Say)

doktorska disertacija

Beograd, 2025.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Lea B. Vlajnić

Evolution of mito-nuclear interactions: „mother’s
curse“ and the „Trojan Female Technique“ for
biocontrol of seed beetle (*Acanthoscelides*
obtectus, Say) populations

doctoral dissertation

Belgrade, 2025

Mentori:

dr Mirko Đorđević, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

dr Biljana Stojković, redovna profesorka
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Mihailo Jelić, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

dr Uroš Savković, viši naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

dr Pavle Erić, naučni saradnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Mami i tati

Ova doktorska disertacija realizovana je u okviru projekta „Experimental evolution approach in developing insect pest control methods – ELEVATE“ programa IDEJE Fonda za nauku (rukovodilac dr Uroš Savković), projekta građanske nauke „Opasulji se“ finansiranog od strane Centra za promociju nauke i fonda „Pokreni se za nauku“ i projekta institucionalnog finansiranja zaključenog sa Ministarstvom nauke, tehnološkog razvoja i inovacija (51-03-137/2025-03/200178). Eksperimenti u okviru disertacije najvećim delom su rađeni na Odeljenju za evolucionu biologiju Instituta za Biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru dr Mirku Đorđeviću za svu podršku i strpljenje koje mi je ukazao. Njegova otvorenost učinila je da se uvek osećam prijatno dok učim, diskutujem, postavljam pitanja i, na kraju krajeva, dok pravim greške. Poverenje koje mi je ukazivao tokom celog procesa izrade disertacije bilo mi je neprocenjivo, a njegov temeljan pristup istraživanju biće mi uvek izvor inspiracije.

Mentorki prof. dr Biljani Stojković najviše hvala na tome što me je usmeravala kroz naučni (i nastavni) put, povremeno me izvodeći iz zone komfora, ali istovremeno pružajući mi veliku količinu autonomije. Hvala joj i na tome što me je svojim radom vodila ne samo kroz ovu disertaciju već mi i pokazala važnost društvene odgovornosti.

Dr Mihailu Jeliću, dr Urošu Savkoviću i dr Pavlu Eriću veliko hvala na svim sugestijama koje su doprinele finalnoj verziji ovog teksta.

Iako su dani u laboratoriji često dugi i naporni, eksperimenti repetitivni, a rokovi stresni, izrada ove disertacije bila je pre svega vedar i zabavan proces. Za to su zaslužni dr Uroš Savković, dr Sanja Budečević i dr Mirko Đorđević koji su uvek bili tu da me bodre, zasmehavaju i zbog kojih mi odlazak na posao (skoro) nikad nije teško padoao. Svoje znanje i iskustvo uvek su mi pružali bez rezerve, uključivali me u svaki aspekt rada laboratorije i od samog početka učinili da se osećam kao ravnopravni član tima. Na tome ću im uvek biti zahvalna.

Ogromnu zahvalnost dugujem i dr Jeleni Jović i njenom timu sa Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu, dr Kasji Pavlović i njenom timu sa Klinike za endokrinologiju, dijabetes i bolesti metabolizma Kliničkog centra Srbije i dr Oliveru Stojkoviću sa Instituta za sudsku medicinu Medicinskog fakulteta u Beogradu na pruženom vremenu i pomoći u toku izrade eksperimenata i pisanja ove teze.

Hvala i svim građanima i građankama koji su u okviru projekta „Opasulji se“ učestvovali u prikupljanju populacija pasuljevog žiška. Bez njihovog angažmana veliki deo ove teze bio bi neostvariv.

Konačno, beskrajno hvala porodici i prijateljima na ljubavi, razumevanju i strpljenju bez kojih bi ovaj proces bio nezamisliv. JMVMT(M).

Evolucija mito-jedarnih interakcija: „materinska kletva“ i „tehnika trojanskih ženki“ u regulisanju brojnosti populacija pasuljevog žiška (*Acanthoscelides obtectus*, Say)

SAŽETAK:

Evoluciona teorija predviđa da su mitohondrijski genomi skloni nakupljanju mutacija sa negativnim efektom za mužjake, a neutralnim ili pozitivnim za ženke, što predstavlja fenomen materinske kletve. Ovakve mutacije, ukoliko imaju negativan efekat na reproduktivni potencijal mužjaka, mogu biti iskorišćene u novopredloženoj metodi kontrole ekonomski štetnih vrsta insekata, tehnici trojanskih ženki (TTŽ). Ova metoda zasniva se na ubacivanju ženki nosilaca opisane mitohondrijske mutacije, trojanskih ženki, u prirodne populacije. Žensko potomstvo ovih ženki biće fertilno i prenosiće mutaciju niz generacije, dok će muško biti sterilno, što će za rezultat imati pad brojnosti populacije kroz generacije. Ipak, imajući u vidu da mitohondrijski i jedarni genom interaguju i koevoluiraju, selekcija će favorizovati jedarne kompenzacione mutacije koje maskiraju negativan efekat mitohondrijskih mutacija na mužjake. Vodeći se ovim teorijskim postavkama, u laboratorijskim populacijama pasuljevog žiška (*Acanthoscelides obtectus*) utvrđeno je postojanje efekta materinske kletve, tj. veće varijanse u osobinama životne istorije kod mužjaka različitih mitohondrijskih genotipova (mitotipova) u odnosu na ženke. Konkretno, identifikovan je i genetički okarakterisan specifičan MG3b mitotip koji dovodi do smanjenja ranog fekunditeta i fertiliteta mužjaka, a nema efekat na iste osobine kod ženki. Zbog svog uticaja na fertilitet mužjaka, MG3b mitotip označen je kao kandidat za primenu u TTŽ-u. Kod mužjaka ovog mitotipa, u odnosu na kontrolne mitotipove, demonstriran je pad respiratorne funkcije svih kompleksa mitohondrijskog sistema oksidativne fosforilacije (OXPHOS). Ovaj pad je najverovatniji uzrok smanjenja reproduktivne funkcije MG3b mužjaka budući da su spermatozoidi i muško germinativno tkivo posebno osetljivi na promene u aktivnosti OXPHOS. Pokazano je i da MG3b mitotip dovodi do pada fertiliteta mužjaka u jedarnim sredinama poreklom iz različitih prirodnih populacija i da ovaj efekat ne zavisi od mito-jedarnih interakcija. Međutim, na povišenu temperaturu MG3b mužjaci reaguju povećanjem fertiliteta, što ukazuje na potencijalni fenomen mitohormeze. Nakon ubacivanja trojanskih ženki MG3b mitotipa u prirodnu populaciju nije utvrđen pad brojnosti populacije kroz generacije. Populaciono-genetička analiza pokazala je da su populacije pasuljevog žiška slabo strukturirane što ih čini pogodnim za dalju potragu za mutacijama materinske kletve. Rezultati ove disertacije potvrdili su fenomen materinske kletve u populacijama pasuljevog žiška i upućuju na to da bi, uz detaljnija istraživanja, pronađene mutacije sa negativnim efektom na fertilitet mužjaka mogle da se koriste u TTŽ-u.

KLJUČNE REČI: mitohondrije, mitotip, materinska kletva, tehnika trojanskih ženki, mito-jedarne interakcije, reproduktivni potencijal, mitohondrijska funkcija, *Acanthoscelides obtectus*

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Evoluciona biologija

UDK: 575.827:576.311.347:575.113.3:57.017.5]:595.768.1(043.3)

Evolution of mito-nuclear interactions: „mother’s curse“ and the „Trojan Female Technique“ for biocontrol of seed beetle (*Acanthoscelides obtectus*, Say) populations

ABSTRACT:

The evolutionary theory posits that mitochondrial genomes are susceptible to accumulating mutations that can have detrimental effects on males, while being neutral or even beneficial for females. This phenomenon is known as the mother’s curse. Mutations that negatively impact male reproductive potential could be used in a newly proposed method for controlling economically damaging insect species, referred to as the Trojan Female Technique. This approach involves introducing females carrying the specified mitochondrial mutation, termed Trojan females, into natural populations. The female offspring of these Trojan females will be fertile and will transmit the mutation through subsequent generations, while their male offspring will be sterile, resulting in a gradual decline in population numbers over time. However, given the interaction and co-evolution of mitochondrial and nuclear genomes, nuclear compensatory mutations that mitigate the effects of mitochondrial mutations on males would likely be favored. Based on these theoretical foundations, the impact of the mother’s curse has been demonstrated in laboratory populations of the seed beetle (*Acanthoscelides obtectus*), revealing greater variance in life history traits among males with different mitochondrial genotypes (mitotypes) compared to females. Notably, a specific MG3b mitotype has been identified, which reduces early fecundity and fertility in males without affecting these traits in females. This mitotype has been genetically characterized and marked as a candidate for application in the Trojan Female Technique. In males with the MG3b mitotype, a decline in respiratory function across all complexes of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) has been observed, likely contributing to the reduction in reproductive function, as spermatozoa and male germinative tissue are particularly sensitive to changes in the oxidative phosphorylation system’s activity. Furthermore, it has been established that the MG3b mitotype leads to decreased male fertility in nuclear environments derived from various natural populations, and this effect is independent of mito-nuclear interactions. Interestingly, at elevated temperatures, MG3b males exhibit increased fertility, suggesting a potential phenomenon of mitohormesis. After the introduction of Trojan females carrying the MG3b mitotype into the natural population, no decline in population numbers across generations was noted. Population-genetic analysis indicated that seed beetle populations are poorly structured, making them ideal for further exploration of mother’s curse mutations. The findings of this dissertation confirm the existence of the mother’s curse in seed beetle populations and suggest that with more comprehensive research, the identified mutations affecting male fertility could be effectively utilized in the Trojan Female Technique.

KEY WORDS: mitochondria, mitotype, mother’s curse, Trojan Female Technique, mito-nuclear interactions, reproductive potential, mitochondrial function, *Acanthoscelides obtectus*

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Evolutionary biology

UDC: 575.827:576.311.347:575.113.3:57.017.5]:595.768.1(043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
1.1. Mitohondrije.....	1
1.1.1 Uniparentalno nasljeđivanje mitohondrija	1
1.1.2 Mitohondrijski genom.....	2
1.2 Mito-jedarna koevolucija	4
1.2.1 Sistem za oksidativnu fosforilaciju	5
1.2.2 Mito-jedarne interakcije.....	7
1.2.2.1 Koevolucija: adaptacija ili kompenzacija?	8
1.2.2.2 Arene mitohondrijskih interakcija	10
1.2.2.3 Interakcije genotipa sa životnom sredinom	11
1.3 „Materinska kletva“	11
1.3.1 „Slaba“ i „jaka“ „materinska kletva“	13
1.3.2 Kako mutacija može biti polno specifična?	14
1.3.3 Kako izbeći „kletvu“?	15
1.3.4 Eksperimentalni dokazi „materinske kletve“	16
1.3.4.1 „Materinska kletva“ kod biljaka – citoplazmatska muška sterilnost	16
1.3.4.1 „Materinska kletva“ kod životinja	17
1.4 Primena fenomena „materinske kletve“	17
1.4.1 Genetička biokontrola	18
1.4.1.1 „Tehnika trojanskih ženki“	19
2. CILJEVI	21
3. MATERIJAL I METODE	22
3.1 Osnovne odlike pasuljevog žiška	22
3.2 Laboratorijske i prirodne populacije.....	22
3.2.1 Formiranje mitohondrijskih linija	24
3.2.2 <i>Wolbachia</i>	24
3.3 Određivanje mitohondrijske i jedarne genetičke varijabilnosti.....	25
3.3.1 Ekstrakcija DNK.....	25
3.3.2. Umnožavanje mitohondrijskih gena	25
3.3.3 Analiza varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa prirodnih populacija pasuljevog žiška	29
3.4. Određivanje efekta mitohondrijskih haplotipova na osobine životne istorije.....	30
3.4.1. Pilot eksperiment – ispitivanje uticaja šest laboratorijskih mitotipova na osobine životne istorije.....	32
3.4.1.1 Testiranje preadultnog vijabiliteta	32

3.4.1.2 Testiranje totalnog fekunditeta i dužine života	32
3.4.2 Ispitivanje efekta kandidat TTŽ mitotipa i kontrolnih mitotipova na adultne osobine životne istorije.....	32
3.4.2.1 Testiranje ranog i totalnog fekunditeta i dužine života.....	33
3.4.2.2 Testiranje fertiliteta	33
3.5 Određivanje mitohondrijske funkcije kandidat TTŽ mitotipa i kontrolnih mitotipova.	33
3.5.1 Merenje mitohondrijske respiracije	34
3.5.1.1 Priprema uzoraka	34
3.5.1.2 Protokol za merenje mitohondrijske respiracije.....	34
3.5.2 Merenje aktivnosti citrat sintaze	36
3.5.2.1 Protokol za merenje aktivnosti CS.....	36
3.6 Testiranje efekta kandidat TTŽ mitotipa i kontrolnih mitotipova u različitim jedarnim sredinama i temperaturnim režimima	37
3.6.1 Merenje fertiliteta.....	38
3.7 Dinamika rasta i promena učestalosti kandidat TTŽ i kontrolnih mitotipova u populacijama sa različitim udelima trojanskih ženki	39
3.7.1. Analiza dinamike rasta populacija	40
3.7.1.1 Merenje preadultnih osobina životne istorije.....	40
3.7.1.2 Merenje adultnih osobina životne istorije.....	40
3.7.1.3 Računanje populaciono-ekoloških parametara rasta populacije	40
3.7.2 Analiza promene učestalosti mitohondrijskog haplotipa	43
3.8 Statistička obrada podataka.....	43
4. REZULTATI	45
4.1 Molekulska karakterizacija L laboratorijskih mitohondrijskih linija.....	45
4.1.1 Test na prisustvo Wolbachia	46
4.2 Određivanje efekta mitohondrijskih haplotipova na osobine životne istorije.....	46
4.2.1 Pilot ekspertiment ispitivanja efekta šest mitotipova na osobine životne istorije.....	46
4.2.2 Efekat kandidat TTŽ i dva kontrolna mitotipa na reproduktivni potencijal	47
4.2.3 Efekat kandidat TTŽ i kontrolnih mitotipova na dužinu života.....	48
4.2.4 Pirsonove fenotipske korelacije	48
4.3 Određivanje mitohondrijske funkcije kandidat TTŽ i kontrolnih mitotipova	49
4.3.1 Respiracija na nivou organizma.....	49
4.3.2 Količina mitohondrija	50
4.3.3 Respiracija na nivou mitohondrije	50
4.4 Određivanje genetičke strukture prirodnih populacija pasuljevog žiška.....	51
4.4.1 Genetička struktura prirodnih populacija na nivou mitohondrijskog genoma.....	51

4.4.2 Genetička struktura prirodnih populacija na nivou jedarnog genoma	52
4.5 Efekat kandidat TTŽ i kontrolnih mitotipova na fertilitet u različitim genetičkim i sredinskim kontekstima.....	53
4.5.1 Ispitivanje uticaja različitih jedarnih sredina na ispoljavanje efekta kandidata TTŽ i kontrolnih mitotipova na fertilitet na standardnoj temperaturi	53
4.5.2 Ispitivanje uticaja različitih jedarnih sredina na ispoljavanje efekta kandidata TTŽ i kontrolnih mitotipova na fertilitet na povišenoj temperaturi	54
4.5.3 Ispitivanje uticaja interakcija temperature, jedarne sredine i mitotipa na fertilitet kandidata TTŽ i kontrolnih mitotipova.....	55
4.6 Dinamika rasta i promena učestalosti mitotipova u populacijama sa različitim udelima trojanskih ženki	56
4.6.1 Promena učestalosti mitotipova kroz generacije.....	56
4.6.2 Populaciono-ekološki parametri rasta populacije	57
5. DISKUSIJA	58
5.1 „Materinska kletva“ u laboratorijskim populacijama pasuljevog žiška	58
5.1.1 Potraga za mitotipom sa negativnim polno specifičnim efektom na mužjake.....	58
5.1.2 MG3b mitotip – „materinska kletva“ i potencijalna primena u „tehničici trojanskih ženki“	59
5.2 Mehanizmi delovanja mutacija „materinske kletve“ na reproduktivni potencijal mužjaka	62
5.2.1. Efekti mitotipova na respiraciju i količinu mitohondrija	62
5.2.2 Reproductivno ponašanje MG3b mužjaka.....	64
5.2.3 Mitohondrijske mutacije i ekspresija gena.....	65
5.2.4 Smanjenje reproduktivnog potencijala kroz efekat na semenu tečnost	66
5.3 Genetička struktura populacije i „tehnika trojanskih ženki“	67
5.4 Mito-jedarne interakcije i „tehnika trojanskih ženki“	69
5.5 Uticaj životne sredine na efekat kandidat TTŽ mutacije.....	71
5.6 Introdukcija trojanskih ženki u prirodnu populaciju.....	73
5.6.1 Učestalost TTŽ mitotipa nakon introdukcije trojanskih ženki.....	73
5.6.2. Efekat TTŽ mitotipa na brojnost populacije	75
5.7 Budućnost „tehnike trojanskih ženki“	76
6. ZAKLJUČCI	78
7. TABELE	80
8. SLIKE	98
9. LITERATURA.....	116
10. PRILOZI.....	133

1. UVOD

1.1. Mitohondrije

Mitohondrije su organele koje zajedno sa jedrom predstavljaju ključnu odliku eukariotske ćelije. Prvi koji je shvatio značaj loptastih i tubularnih struktura koje se u ćeliji mogu videti pod svetlosnim mikroskopom bio je Ričard Altman koji ih je još 1886. nazvao bioblastima, to jest partikulama života¹. Današnji naziv mitohondrija opisuje njihov izgled na mikroskopskim preparatima (od grčkog *mitos* - konac i *chondros* – granula) i dao im ga je Karl Benda 1898. godine² (Lane, 2015a; Vyas i sar., 2016).

Glavna uloga mitohondrija je u ćelijskom disanju, to jest respiraciji, procesu katabolizma koji konvertuje energiju hemijskih veza iz makronutrijenta u energiju u obliku ATP-a. Pri ovom procesu se kiseonik redukuje do vode preko sistema za oksidativnu fosforilaciju (OXPHOS, engl. *oxidative phosphorylation system*). Na ovaj način se obezbeđuje najveća količina energije potrebna za ćelijske funkcije. Pored produkcije ATP-a, mitohondrije imaju ključnu ulogu i u procesima anabolizma, to jest stvaranja molekula od prekursora koji su nusprodukt ćelijskog disanja. Između ostalog, mitohondrije su odgovorne za sintezu nukleotida, lipida, hema i gvožđe-sumpor klastera (Vyas i sar., 2016; Vakifahmetoglu-Norberg i sar., 2017). Dodatno, u toku respiracije dolazi do produkcije reaktivnih vrsta molekulskog kiseonika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) poput superoksid anjon radikala ($O_2^{\cdot-}$), hidroksidnog anjona ($\cdot OH$) i vodonik peroksida (H_2O_2). Ovi molekuli su izuzetno reaktivni i oštećuju makromolekule sa kojima dođu u kontakt. Međutim, pokazano je da u malim količinama ROS-ovi predstavljaju signalne molekule koji služe za komunikaciju sa ostatkom ćelije. Upravo jedna od najvažnijih uloga mitohondrija jeste integracija signala iz spoljašnje sredine zbog čega ove organele regulišu diferencijaciju ćelija, regeneraciju tkiva, odgovor na stres i uslove spoljašnje sredine (Sena i Chandel, 2012). Dalje, pokazano je da mitohondrije imaju važnu ulogu u homeostazi kalcijuma, regulaciji ekspresije gena, apoptozi i konačno, samom procesu starenja (Vakifahmetoglu-Norberg i sar., 2017).

Najznačajnije osobine koje razlikuju mitohondrije (i plastide) u odnosu na druge organele jesu dve membrane koje se strukturno razlikuju od ćelijske membrane i membrane drugih organela (Gebert i sar., 2009; Oemer i sar., 2018), uniparentalno nasleđivanje i kružni genom. O poslednje dve karakteristike biće više reči u daljnjem tekstu.

1.1.1 Uniparentalno nasleđivanje mitohondrija

Mitohondrije se gotovo univerzalno nasleđuju uniparentalno i to preko majki (Birky, 2001). Izuzetaka je malo, poput biparentalnog nasleđivanja kod nekih gljiva (Doublet i sar., 2008) i brojnih školjki (Breton i sar., 2007) i striktno paternalnog nasleđivanja kod biljnih vrsta poput banane (Fauré i

¹ Interesantno je da su zapažanja Ričarda Altmana godinama bila odbacivana i čak ismevana. Naime, smatralo se da su strukture koje je on uočio samo veštački artefakti nastali tokom pripreme mikroskopskih preparata. Razlog nejasnom uočavanju mitohondrija pod mikroskopom je dvojak. Prvo, boje korišćene za vizuelizaciju hromozoma, za koje su se brojni citolozi tog vremena jako interesovali, kisele su i rastvaraju mitohondrije. Drugo, čak i kada su korišćene drugačije boje, one bi obojile mitohondriju na vrlo kratko, nakon čega bi postale bezbojne. Kasnije je postalo jasno da je to zbog oksidacije boje od strane samih mitohondrija.

² „Mitohondrija“ je samo jedan od mnogih naziva za ovu organelu u to vreme. Nazivane su još i eklektozomima, histomerama, hondriokontima, hondriozomima, mikrozmima, plastozomima...

sar., 1994) i krastavca (Havey i sar., 2004). Postavlja se pitanje zašto je ovakav specifičan način nasleđivanja uopšte evoluirao u gotovo svim taksonima. Razlog leži u velikoj autonomiji koje mitohondrije imaju, odnosno tome što se one replikuju nezavisno od ostatka ćelije. Dodatno je važno naglasiti da ćelije poseduju veliki broj mitohondrija od kojih svaka sadrži nekoliko kopija mitohondrijskog genoma (Stewart i sar., 2008). Dakle, ukoliko u okviru iste ćelije postoji dva ili više mitohondrijska genotipa (mitotipa) (fenomen poznat kao heteroplazmija) prirodna selekcija koja deluje na nivou ćelije favorizovala bi onaj mitotip koji se replikuje brže, bez obzira na potencijalne posledice po ostatak ćelije. Ovakav „sebični“ mitotip ubrzo bi preovladao u ćelijama pritom smanjujući adaptivnu vrednost organizma u celini. Smatra se da je uniparentalan način nasleđivanja mitohondrija evoluirao upravo da bi se sprečila pojava heteroplazmije, i samim tim kompeticije između mitohondrijske DNK (mtDNK) u zigotu (Cosmides i Tooby, 1981; Beekman i sar., 2014). Dodatno, u toku oogeneze, dešava se usko grlo brojnosti mitohondrija, gde prekursor zrele oocite ima samo oko 100 mitohondrija sa oko 200 molekula mtDNK. U toku daljeg razvika jajne ćelije mitohondrije se intenzivno replikuju i zrela oocita ima oko 100.000 mitohondrija i 250.000 mtDNK³. Usko grlo brojnosti dodatno smanjuje šansu za javljanje heteroplazmije u oociti i kasnije u zigotu (Stewart i sar., 2008). Nasleđivanje samo majčinih mitohondrija omogućeno je zahvaljujući degradaciji mitohondrija poreklom od oca. Ovaj proces se kod nekih grupa, poput insekata, vrši pre fertilizacije, u toku sazrevanja spermatozoida, dok se kod većine životinjskih taksona degradacija očevih mitohondrija vrši nakon oplodjenja, u zigotu (Sato i Sato, 2013).

1.1.2 Mitohondrijski genom

Kod najvećeg broja eukariota, mitohondrijski genomi su u vidu jednog kružnog hromozoma, sa samo nekoliko izuzetaka kod kojih se javljaju linerani genomi ili mitohondrijski genom podeljen u više hromozoma (Wu i sar., 2015). Mitohondrijski genomi, u poređenju sa jedarnim, izuzetno su mali.⁴ Primera radi, jedarni genom ljudi sadrži oko tri milijarde baznih parova, a mitohondrijski tipično 16.569. Ipak, bez obzira na svoju veličinu, genski sadržaj ovog genoma je evoluciono očuvan među eukariotima. Iako postoje razlike u broju protein-kodirajućih gena, od 97 kod protozoe *Reclinomas americana* do 3 protein-kodirajuća gena malaričnog parazita *Plasmodium falciparum* (Ballard i Rand, 2005), u suštini svi mitohondrijski genomi kodiraju neke ključne produkte (Burger i sar., 2003). Kod bilateralnih životinja to je 13 proteinskih subjedinica koje su deo OXPHOS kompleksa, 22 tRNK i 2 rRNK (Castellana i sar., 2011). Evoluciona očuvanost kodirajuće komponente mtDNK ukazuje na izuzetan značaj koji ovi geni imaju za funkcionisanje mitohondrija i ćelije u celini.

Mitohondrijski genom specifičan je i po tome što ga odlikuje jako varijabilna stopa mutacija u različitim evolucionim linijama. Kod sisara i insekata stopa mutacija ovog genoma mahom je značajno viša u odnosu na jedarni genom, dok je kod brojnih biljaka i dupljara situacija potpuno obrnuta (Smith i Keeling, 2015; Hill, 2019). Varijabilna stopa mutacija u različitim taksonima pripisuje se različitoj efikasnosti DNK reparacionih mehanizama. Dodatno, mitohondrijski genomi većine metazoa se ne rekombinuju (Stewart i sar., 2008; Hagström i sar., 2014). Ovo pak ne važi za mitohondrijske genome gljiva i biljaka kod kojih je rekombinacija uobičajena pojava (Barr i sar., 2005).

Imajući u vidu da se mitohondrije bilateralnih životinja nasleđuju samo preko majki i ne podležu rekombinacijama, prirodna selekcija čitav genom vidi kao jedan entitet, to jest ne može delovati nezavisno na pojedinačne gene. To znači da su mitohondrijski genomi skloni nakupljanju štetnih mutacija mehanizmom Milerovog zupčanika. Milerov zupčanik je model evolucije genoma prvobitno

³ Navedene brojke važe za miševе, ali usko grlo brojnosti mitohondrija pri oogenezi univerzalna je pojava (Stewart i sar., 2008).

⁴ Ovo važi za sve eukariote, ali treba naglasiti da se među biljkama mogu pronaći mitohondrijski genomi i do 1,6 Mb dužine poput onog kod krastavca (Smith i Keeling, 2015).

postavljen da objasni evoluciju obligatno aseksualnih organizama. Izostanak polnog razmnožavanja podrazumeva i izostanak rekombinacije, što znači da selekcija ne može da deluje na pojedinačne gene, već na čitave genome. U tim okolnostima, biće favorizovani oni genomi sa najmanjim brojem štetnih mutacija, ali kroz generacije će broj mutacija neminovno rasti što dovodi do pada adaptivne vrednosti u odnosu na prethodne generacije (Muller, 1964). Dodatno, geni sa negativnim efektom mogu biti favorizovani selekcijom jer su vezani za gene sa pozitivnim efektom. Dok god je neto efekat mutacija na celom genomu pozitivan, selekcija će povećavati učestalost datog mitotipa (Bachtrog i Gordo, 2004). Ovaj proces naziva se genetičko autostopiranje (engl. *genetic hitchhiking*). Dakle, kroz generacije se polako nakupljaju štetne mutacije (Lynch, 1996; Hill, 2020).

Dugo se smatralo da je sva varijabilnost mitohondrijskog genoma, prisutna u populacijama, selektivno neutralna ili skoro neutralna (Hill i sar., 2019; Dowling i Wolff, 2023) zbog čega je ovaj genom široko korišćen kao marker za filogenetske studije (Galtier i sar., 2009). Razlog pretpostavke neutralnosti leži u tome što mitohondrijski geni kodiraju za subjediničice proteinskog kompleksa koji je neophodan za sintezu skoro celokupne količine ATP-a potrebne ćeliji za obavljanje svih životnih funkcija. Shodno tome, pretpostavljalo se da bi efekat svake mutacije koja nije neutralna bio nužno negativan. Dodatno, kako je mtDNK haploidna, svaka mtDNK mutacija je odmah izložena dejstvu selekcije zbog toga što je u hemizigotnom stanju (Wolff i sar., 2014). Dakle, pretpostavljalo se da snažna purifikujuća selekcija odstranjuje sve mutacije sa negativnim efektom čime se suprotstavlja mehanizmu Milerovog zupčanika (Castellana i sar., 2011), a da se učestalost neutralnih varijanti održava delovanjem mutacija i genetičkog drifta. Pokazatelj delovanja purifikujuće selekcije jeste odnos nesinonimnih prema sinonimnim mutacijama (d_N/d_S) koji je manji od jedinice. Jedna od studija koja se bavila pitanjem neutralnosti mitohondrijskih varijanti testirala je ovaj odnos kod velikog broja životinjskih taksona i pokazala da kod svih on iznosi manje od jedan (Bazin i sar., 2006).

Ipak, u poslednjih nekoliko decenija dovodi se u pitanje pretpostavka selektivne neutralnosti mtDNK varijabilnosti. Naime, brojne studije pokazale su da mitohondrijske varijante prisutne u populacijama na različit način utiču na osobine životne istorije i metabolizam jedinki. Primera radi, jedna studija pokazala je da specifičan mitotip vrste *Drosophila simulans* dovodi do povećane aktivnosti citohrom c oksidaze i otpornosti na gladovanje, dok drugi mitotip povećava fekunditet i otpornost na hladnoću (Ballard i sar., 2007a). Nekoliko studija pokazalo je efekat mitotipa na dužinu života (Maklakov i sar., 2006; Clancy, 2008; Camus i sar., 2012; Nagarajan-Radha i sar., 2019), kao i na komponente fertiliteta jedinki (Towarnicki i Ballard, 2018; Vlajnić i sar., 2024). Postoje dokazi i o uticaju mitohondrijske varijabilnosti na lokomociju i san (Anderson i sar., 2022), ali i humoralni i ćelijski imunitet (Salminen i sar., 2024) kod vrste *Drosophila melanogaster*. Istraživanje Stojković i saradnika na pasuljevom žišku pokazalo je da linije ove vrste, koje su preko 190 generacija bile na selekcionom režimu za kratko i dugo vreme razvića (to jest kratak i dug život), a koje su poreklom od jedne, varijabilne predačke populacije, imaju potpuno divergirani pul mitotipova (Stojković i sar., 2017). Dakle, nakon početka delovanja selekcije, neke specifične varijante iz predačke populacije su se izgubile, a druge su povećale učestalost u svakom od selekcionih režima. Ovo nedvosmisleno ukazuje na postojanje selektivno prepoznatljive varijabilnosti u mitohondrijskom genomu ove vrste. Interesantna su i istraživanja koja su pokazala da se klinalna distribucija mitotipova kod nekih vrsta može objasniti termalnom selekcijom. Naime, na vinskoj mušici (Camus i sar., 2017) i jednoj vrsti rovčice (Fontanillas i sar., 2005) pokazano je da jedinke sa mitotipovima asociranim sa hladnijim regionima ispoljavaju veću otpornost na hladnoću (Camus i sar., 2017) i efikasniju nedrhteću termogenezu (Fontanillas i sar., 2005) u odnosu na jedinke sa mitotipovima zastupljenijim u toplijim regionima.

Postoji nekoliko objašnjenja kako se adaptivno značajna varijabilnost mitohondrijskog genoma može održavati u populaciji. Prvo objašnjenje sledi iz činjenice da je efektivna veličina populacije mitohondrijskog genoma četiri puta manja u odnosu na jedarni genom zbog toga što su ovi genomi haploidni i nasleđuju se samo preko majki, što povećava efekat genetičkog drifta na njihovu evoluciju i

smanjuje uticaj prirodne selekcije (Ballard & Whitlock, 2004; Beekman i sar., 2014). Dakle, smatra se da je efekat drifta na mtDNK toliko izražen da selekcija ima manji efekat na oblikovanje genoma zbog čega se štetne mutacije mogu nakupiti i dostići visoke učestalosti u populaciji (Wolff i sar., 2014). U nekim populacijama pokazano je i delovanje selekcije negativno zavisne od učestalosti koja favorizuje ređu mitohondrijsku varijantu (Arnqvist i sar., 2016). Još jedna mogućnost podrazumeva da efekti konkretnih mitotipova zavise od interakcije sa životnom sredinom, odnosno da su različite varijante prilagođene za različite uslove životne sredine (Dowling i sar., 2007b). Dodatno, mitotipovi sa različitim efektima na adaptivnu vrednost jedinki mogu se u populaciji odžavati i zbog diferencijalnog delovanja selekcije na njih u zavisnosti od pola u kom su ekspimirani (Babcock i Asmussen, 1996, 1998). Ipak, za najsveobuhvatnije i empirijski najubedljivije objašnjenje moraćemo da se vratimo dve milijarde godina u prošlost.

1.2 Mito-jedarna koevolucija

Pre oko dve milijarde godina desio se događaj koji je u potpunosti izmenio tok evolucije života na Zemlji. Naime, jedna prokariotska ćelija ušla je u drugu čime je pokrenula evoluciju mitohondrija i, posledično, evoluciju eukariotske ćelije (Margulis, 1970). Od kada je Lin Margulis objavila svoju hipotezu o endosimbiotskom poreklu mitohondrija (i hloroplasta) veliki broj radova bavio se potvrđivanjem (ali i opovrgavanjem) njene hipoteze, kao i pokušajima da se utvrdi poreklo ćelija koje su učestvovala u samom procesu endosimbioze i prednostima koje je od takvog „suživota“ svaka od ćelija imala. Danas se zna da je ćelija domaćin bila kompleksna arhea koja je već posedovala gene bakterijskog porekla, dok je simbiot bila ćelija srodna današnjim α -proteobakterijama (Pittis i Gabaldón, 2016). Prvobitna ideja o koristi koju su ove dve ćelije imale jedna od druge zasniva se na sposobnosti endosimbiotske bakterije da koristi kiseonik, smanjujući njegovo toksično dejstvo za ćeliju domaćina. Međutim, ova hipoteza ne objašnjava postojanje hidrogenozoma, anaerobnih formi mitohondrija (Martin i sar., 2015). Hipoteza koja objašnjava prisustvo ovih mitohondrijama sličnih organela u anaerobnim organizmima jeste hidrogenska hipoteza koju su formulisali Martin i Miler (Martin i Müller, 1998). Prema ovim autorima, domaćin je bila anaerobna arhea koja je u metaboličkim procesima koristila vodonik (H_2). S druge strane, bakterijska ćelija je bila fakultativni anaerob koja je koristila „otpadne“ produkte metabolizma domaćina i u procesu produkovala vodonik kojim je zauzvrat snabdevala domaćina. Pretpostavlja se da je samoj endosimbiozi prethodila veoma bliska komunikacija ove dve ćelije, gde su one živele u kontaktu, verovatno pilepljene jedna uz drugu.

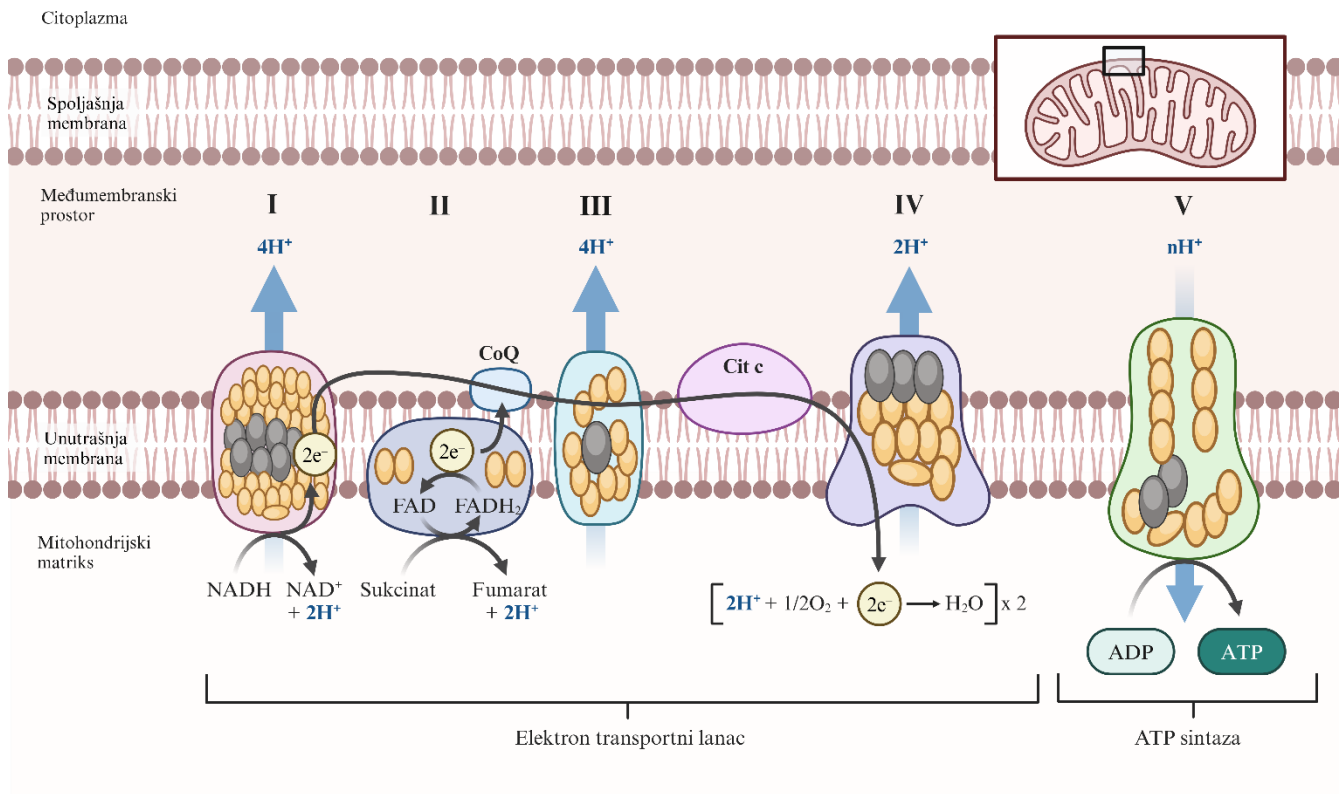
Genomska istraživanja pokazala su da eukarioti predstavljaju monofiletsku grupu, što znači da svi imaju jednog zajedničkog pretka (Derelle i sar., 2015). Međutim, iz teorijskih i empirijskih postavki evolucione biologije podrazumeva se da se endosimbioza kompleksne arhee i bakterije nije desila samo jednom. Neuporedivo je verovatnije da su se događaji endosimbioze dešavali nebrojeno puta, ali je održivost ovako složenog sistema bila uspešna samo jednom. Naime, da bi himera dve ćelije postala funkcionalna, morala se desiti evoluciona rekonstrukcija obe ćelije: od usaglašavanja deoba, obezbeđivanja resursa za dve fiziološki različite ćelije, do restrukturiranja genoma (Martin i sar., 2015).

Najveće promene desile su se na nivou genoma. Današnje α -proteobakterije imaju između 2.000 i 4.000 gena (Koonin i Wolf, 2008) dok mitohondrije većine životinja imaju samo 37. Dakle, u prethodnih dve milijarde godina mitohondrijski genom smanjio se za oko 99%! Ovo smanjenje dešavalo se na račun gubljenja mitohondrijskih gena koji endosimbiontu nisu više potrebni kada nije slobodno-živeći organizam, gubljenja mitohondrijskih gena zbog postojanja gena sa sličnom funkcijom u genomu domaćina i transfera mitohondrijskih gena u genom domaćina (jedarni genom) (Adams i Palmer, 2003). Sam transfer gena podrazumevao je velike izmene genoma domaćina: kada se gen inkorporirao na novu lokaciju, morao je da stekne regulatorne sekvence koje omogućavaju njegovu kontrolisanu transkripciju,

zatim protein-kodirajuće sekvence koje translacijom proteinu omogućavaju da se translocira u mitohondriju, kao i tačkaste mutacije koje omogućavaju pravilno čitanje sekvence s obzirom na razlike u genetičkom kodu mitohondrijskog i jedarnog genoma (Rand i sar., 2004). Smanjenje mitohondrijskog genoma pružilo je ogromnu količinu energije ćeliji koja više nije morala da se troši na održavanje velikih mtDNK. Dakle, gubitak i transfer mitohondrijskih gena bili su preduslov za povećanje količine dostupne energije i kasnije posleđično povećanje kompleksnosti genoma eukariotskih organizama (Lane i Martin, 2010; Lane, 2015b). Imajući to u vidu, zanimljivo je pitanje zašto današnje mitohondrije uopšte sadrže genome. Jedno od objašnjenja oslanjalo se na činjenicu da geni koji su zadržani u mitohondrijama kodiraju za proteine koji su smešteni u fosfolipidnom dvosloju unutrašnje mitohondrijske membrane. Postojala je ideja da takvi, hidrofobni proteini moraju biti sintetisani u blizini mesta na kom se inkorporiraju u membranu. Ova ideja je odbačena kada je pokazano da postoje hidrofobni proteini hloroplasta koji su kodirani jedarnim genomom. Još jedno objašnjenje ukazuje na to da neki proteini ne mogu biti transferovani kroz mitohondrijsku membranu zbog nedostatka membranskih transportera, međutim postojanje vezikularnog transporta obesmišljava ovu ideju (Allen, 2003). Trenutno je najšire prihvaćena CORR hipoteza (engl. *co-location for redox regulation*) prema kojoj se u mitohondrijskom genomu zadržavaju geni za proteine ključne za funkcionisanje i regulaciju aktivnosti sistema za oksidativnu fosforilaciju. Proteini koji su kodirani mitohondrijskom DNK formiraju katalitičke centre ugneždene u unutrašnju membranu mitohondrija za čiju je aktivnost izuzetno važno da budu u skladu sa mikrosredinskim uslovima u kojima se mitohondrija u određenom trenutku nalazi. Brz odgovor na promene uslova moguć je samo ako se protein sintetiše na mestu na kom ispoljava svoju funkciju (Allen, 2003, 2015, 2017). Dakle, iako su ovi ključni geni zadržani u mitohondrijskom genomu, većina proteina koji svoju funkciju ispoljavaju u mitohondrijama (između 1.200 i 1.500 njih (Gershoni i sar., 2009; Hill, 2020) kodirana je jedarnim genomom. Produkti gena mitohondrija i jedra su u stalnom kontaktu, interakcijama, što znači da genomi ove dve organele moraju koevoluirati da bi se održala pravilna mitohondrijska funkcija.

1.2.1 Sistem za oksidativnu fosforilaciju

Da bismo razumeli mito-jedarne interakcije i njihovu koevoluciju, moramo razumeti samu arenu u okviru koje ova dva genoma interaguju. Iako nije jedini nivo na kome se mito-jedarne interakcije ispoljavaju, sistem za oksidativnu fosforilaciju (OXPHOS) je najbolje proučen. Sistem se sastoji iz pet kompleksa (I-V) koji su locirani na unutrašnjoj mitohondrijskoj membrani. Kompleksi I-IV zovu se još i elektron-transportni lanac (ETL) jer transportuju elektrone od donora elektrona kroz svoje redoks centre do kiseonika redukujući ga do molekula vode. Prilikom prolaska kroz ETL elektroni odaju energiju koju koriste kompleksi I, III i IV da protone (H^+) iz mitohondrijskog matriksa pumpaju u međumembranski prostor (Rich i Marechal, 2010). Ovaj proces stvara elektrohemijski gradijent kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu – protoni teže da se vrate u elektronegativniji matriks, ali membrana je u suštini nepropustljiva za njih. Protoni u matriks prolaze kroz specijalizovani kompleks V. Energija protona koji prolaze niz elektrohemijski gradijent koristi se u ovom kompleksu za fosforilaciju ADP-a u ATP (Slika 1.2.1.1) (Brand i Nicholls, 2011). Zato se kompleks V zove ATP sintaza. Na ovaj način nastaje otprilike 90% ćelijskog ATP-a. Elektroni se sa jednog na drugi akceptor elektrona u ETL-u „kreću“ tzv. tunel efektom, kvantnim procesom gde suštinski nestaju iz jednog kompleksa i istog momenta se pojavljuju u drugom. Da li će elektron napraviti ovaj kvantni skok zavisi između ostalog i od udaljenosti dva kompleksa u ETL-u. Naime, pokazano je da se protok elektrona usporava 10 puta za svaki angstrom (0,1 nm) udaljenosti dva kompleksa, to jest njihovih katalitičkih centara (Lane, 2015b).



Slika 1.2.1.1. Shematski prikaz kompleksa sistema za oksidativnu fosforilaciju (OXPHOS). OXPHOS se sastoji iz pet kompleksa od kojih su kompleksi I-IV deo elektron transportnog lanca. Kompleksi I i II prenose elektrone sa donora (NADH i sukcinata) na koenzim Q (CoQ) koji ih dalje sprovodi do kompleksa III odakle se preko citohroma c (Cit c) i kompleksa IV konačno prebacuju na kiseonik redukujući ga do vode. U ovom procesu kompleksi I, III i IV pumpaju protone (H⁺) iz mitohondrijskog matriksa u međumembranski prostor čime stvaraju elektrohemijski gradijent. Nakupljeni protoni se niz elektrohemijski gradijent vraćaju u mitohondrijski matriks kroz kompleks V (ATP sintazu). Sila prolaska protona se konvertuje u mehaničku silu u subjedinicama ovog kompleksa koja se potom koristi za fosforilaciju ADP-a u ATP. Svi kompleksi se sastoje od subjedinica kodiranih sa mitohondrijskog (prikazane sivom bojom) i jedarnog genoma (prikazane žutom bojom). Jedini izuzetak je kompleks II čije su subjedinice isključivo kodirane jedarnim genomom.

Kompleks I najveći je i najsloženiji od svih u OXPHOS kompleksu (Slika 1.2.1.1). Sastoji se od oko 44 subjedinice, od kojih je 37 kodirano jedarnim genomom a sedam mitohondrijskim. Svih sedam mitohondrijskih i sedam jedarnih subjedinica predstavljaju centralne subjedinice koje vrše katalitičku funkciju. Ostalih 30 subjedinica su tzv. pomoćne subjedinice (Sánchez-Caballero i sar., 2016; Formosa i sar., 2018). Kompleks I prenosi elektrone sa NADH, donora elektrona koji nastaje u kataboličkim procesima, na koenzim Q, molekul koji se nalazi u unutrašnjoj membrani i prenosi elektrone na kompleks III. Zbog toga se kompleks I još zove i NADH dehidrogenaza. Kompleks I je takođe i protonska pumpa – za svaka dva elektrona koja prenese na ubikvinon ispumpa četiri protone u međumembranski prostor (Brandt, 2006). Smatra se da se na nivou kompleksa I produkuje najviše ROS-ova zbog učestalog „bežanja“ elektrona iz redoks centara (Murphy, 2009; Andreyev i sar., 2015).

Kompleks II je specifičan po tome što je u potpunosti kodiran jedarnim genomom (Slika 1.2.1.1). Sastoji se iz samo četiri subjedinice koje sadrže FAD i gvožđe-sumpor (Fe-S) klastere (Sceffler, 2008). Ovaj kompleks prima elektrone od sukcinata redukujući ga do fumarata, čime direktno učestvuje i u

Krebsovom ciklusu. Zbog ove svoje uloge zove se sukcinat dehidrogenaza. Elektrone, kao i kompleks I, prenosi na koenzim Q, ali ne pumpa protone u međumembranski prostor. Smatra se da reakcija redukcije sukcinata ne oslobađa dovoljno energije za pokretanje protonskih pumpi (Shultz i Chan, 2001).

Koenzim Q je hidrofobni molekul koji prima elektrone od kompleksa I i II, kao i direktno od još nekoliko klasa flavoproteina koji transportuju elektrone poreklom od različitih donora (Slika 1.2.1.1) (Lenaz i sar., 2007), i prenosi ih na kompleks III. U svom oksidovanom stanju poznat je kao ubikvinon, poliredukovanom kao semikvinon, a potpuno redukovano kao ubikvinol. U membrani se može nalaziti slobodan ili vezan za neku od proteinskih subjedinica.

Kompleks III, ili citohrom bc_1 , prenosi elektrone primljene od koenzima Q na citohrom c, a energiju oslobođenu ovim procesom koristi za pumpanje protona (Slika 1.2.1.1). Ovaj kompleks sastoji se od jedne subjedinice kodirane sa mtDNK i još ~10 kodiranih sa jedarnog genoma. Tri subjedinice (citohrom b poreklom sa mtDNK, citohrom c_1 i Reiskov Fe-S protein) sadrže hem grupe i Fe-S klastere koji formiraju redoks centre kroz koje elektroni prolaze. Jedarne subjedinice nemaju ulogu u transportu elektrona i pumpanju protona, već pre svega služe povećanju strukturne stabilnosti kompleksa (Crofts i sar., 2006).

Citohrom c je protein kodiran jedarnim genomom, lociran u unutrašnjoj membrani mitohondrija koji prenosi elektrone, jedan po jedan, sa kompleksa III na kompleks IV (Hüttemann i sar., 2011).

Kompleks IV, to jest citohrom c oksidaza, prima elektrone od citohroma c, oksidujući ga u ovom procesu, i prenosi ih na kiseonik (O_2) čime ga redukuje do molekula vode (Slika 1.2.1.1). Za redukciju jednog molekula kiseonika do vode potrebna su četiri elektrona. I ovaj kompleks je protonska pumpa koja transportuje protone iz matriksa u međumembranski prostor. Sastoji se iz tri glavne subjedinice, sve tri kodirane sa mtDNK (Cox1 čiji redoks centar sadrži dve hem grupe i jon bakra, Cox2 koja ima dva jona bakra i Cox3 o čijoj se katalitičkoj funkciji malo zna) i ~10 dodatnih subjedinica kodiranih jedarnom DNK (Mick i sar., 2011).

Kompleks V ili F_1F_0 ATP sintaza je enzim koji se sastoji iz dva dela: F_0 komponenta se nalazi u unutrašnjoj membrani i translocira protone, dok se F_1 komponenta nalazi u matriksu i vrši sintezu ATP-a (Slika 1.2.1.1). Ove dve komponente su povezane tzv. drškom. F_0 komponenta sadrži osam subjedinica koje formiraju kanal kroz koji protoni prolaze iz međumembranskog prostora u mitohondrijski matriks niz elektrohemijski gradijent. Mehaničku silu prolaska protona koristi F_1 komponenta, koja sadrži pet subjedinica, kako bi formirala fosfoanhidridnu vezu između ADP i P_i (Boyer, 1997). Dve subjedinice ovog kompleksa kodirane su sa mtDNK: a subjedinica (kodirana *atp6* genom) F_0 komponente koja igra ključnu ulogu u prenošenju energije prolaska protona na F_1 komponentu, i A6L subjedinica (kodirana *atp8* genom) koja je mali hidrofilni polipeptid u dršci enzima i povezuje dve komponente (Del Dotto i sar., 2024).

Organizacija respiratornih kompleksa u unutrašnjoj membrani mitohondrija dugo je bila naučna tema o kojoj su se vodile rasprave. Takozvani fluidni model organizacije bio je, izvesno vreme, široko prihvaćen i podrazumevao je da se kompleksi mogu kretati kroz membranu nezavisno jedni od drugih. Međutim, sa napretkom molekulsko-bioloških metoda, konkretno elektroforeze sa poliakrilamidnim gelom, omogućena je izolacija kompleksa bez narušavanja njihovih međusobnih interakcija. Postalo je jasno da se kompleksi zapravo nalaze u čvrstim međusobnim interakcijama, sklopljeni u superkomplekse. Najbolje proučeni superkompleksi su respirazomi koji sadrže komplekse I, III i IV (Bianchi i sar., 2004; Milenković i sar., 2017). Interesantno, kompleks II se skoro nikada ne nalazi u superkompleksima (Dudkina i sar., 2010).

1.2.2 Mito-jedarne interakcije

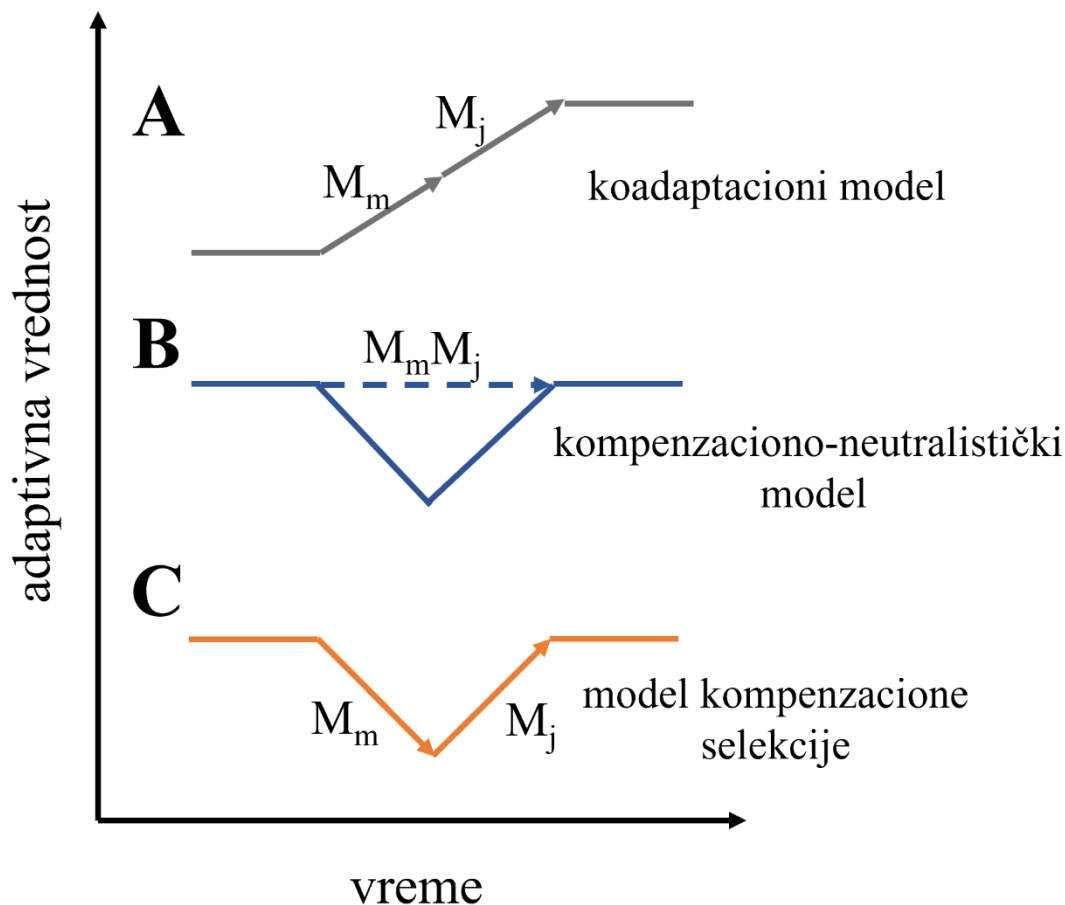
Budući da mitohondrije funkcionišu zahvaljujući aktivnosti i interakcijama velikog broja jedarnih i sopstvenih gena, jasno je da preduslov za njihovu efikasnost i integritet predstavljaju usaglašene, koevoluirane i koordinisane interakcije mitohondrijskog i jedarnog genoma. Rand i saradnici nazvali su mito-jedarne interakcije „najvažnijim koevoluiranim mutualističkim odnosom u istoriji života“ (Rand i sar., 2001). Empirijski se koevolucija i važnost mito-jedarnih interakcija mogu dokazati ukoliko se eksperimentalno naruši koevoluirana mito-jedarna interakcija, to jest eksprimiranjem mitohondrijskog genoma u novoj jedarnoj sredini. U takvim uslovima očekuje se da dođe do pada aktivnosti OXPHOS kompleksa što se nužno odražava na osobine životne istorije i adaptivnu vrednost organizma (Stojković i Đorđević, 2017). To je i pokazano i na hibridima različitih vrsta (McKenzie i sar., 2003; Sackton i sar., 2003; Hoekstra i sar., 2018; Moran i sar., 2024). Primera radi, Mekenzi i saradnici napravili su hibridne ćelijske linije, tzv. cibride, sa jedarnom sredinom domaćeg miša (*Mus musculus domesticus*) a mitohondrijama poreklom od vrsta iste familije ali različitih filogenetskih udaljenosti. Njihovi rezultati pokazali su progresivno smanjenje aktivnosti kompleksa III sa povećanjem evolucione udaljenosti između vrsta, zbog čega su pretpostavili da se kod miševa mito-jedarna koevolucija odigravala na račun citohroma b i subjedinica kompleksa III kodiranih jedarnim genomom (McKenzie i sar., 2003). S obzirom na stigmatu u vezi sa postojanjem funkcionalne, selektivno efektivne mitohondrijske varijabilnosti na intraspecijskom nivou, još su važniji eksperimenti koji pokazuju efekat narušavanja mito-jedarnih interakcija unutar jedne vrste (Rawson i Burton, 2002; Arnqvist i sar., 2010; Ellison i Burton., 2010; Đorđević i sar., 2015; Chang i sar., 2016; Đorđević i sar., 2017; Erić i sar., 2022; Betinazzi i sar., 2024). Dobar primer takvih istraživanja jesu radovi na pasuljevom žišku (*Acanthoscelides obtectus*). Istraživači su na ovoj vrsti koristili linije koje su prethodno metodologijom eksperimentalne evolucije održavali pod selekcijom za ranu i kasnu reprodukciju tokom više od 190 generacija (linije pod selekcijom za kasnu reprodukciju), to jest 280 generacija (linije pod selekcijom za ranu reprodukciju). Očekivano, ove linije su divergirale i imale svoj specifičan pul mitotipova (Stojković i sar., 2017). Upotrebom kontrolisanih ponovljenih ukrštanja između jedinki ove dve linije, autori ovih istraživanja dobili su hibride sa jedrom iz linije za ranu reprodukciju i mitohondrijom iz linije za kasnu reprodukciju (i obrnuto) i potom im merili osobine životne istorije (Đorđević i sar., 2015), kao i aktivnost OXPHOS kompleksa (Đorđević i sar., 2017). Hibridi sa narušenih mito-jedarnih interakcijama pokazali su značajno manji preadultni vijabilitet, dužinu života ukrštanih jedinki (Đorđević i sar., 2015), kao i aktivnost OXPHOS kompleksa (Đorđević i sar., 2017) u odnosu na jedinke sa koevoluiranim, tj. nenarušenim kombinacijama mitotipa i jedra. Interesantno, pokazani efekti bili su polno specifični što se ogledalo u izraženijem padu komponenti adaptivne vrednosti kod mužjaka u odnosu na ženke. Još jedan način na koji je dokazana koevolucija dva genoma zasniva se na korišćenju molekulsko-genetičkih i filogenetskih metoda analiza sekvenci sa idejom da postoje korelisane promene u sekvenci mitohondrijskih i jedarnih gena čiji se produkti nalaze u direktnim interakcijama (Goldberg i sar., 2003; Mishmar i sar., 2006; Gershoni i sar., 2010; Osada i Akashi, 2012; Low i sar., 2024). Primera radi, Osada i Akaši su proučavali evoluciju subjedinica kompleksa I kod primata. Koristeći se pomenutim metodama i 3D modelima kompleksa I pokazali su da je stopa mutacija jedarnih gena za subjedinice ovog kompleksa veća od proseka za ostale jedarne gene i da mutacije ovih gena uvek prate mutacije u mtDNK za subjedinice sa kojima su u fizičkom kontaktu (Osada i Akashi, 2012).

1.2.2.1 Koevolucija: adaptacija ili kompenzacija?

Jedan od modela koevolucije mitohondrije i jedra, **koadaptacioni**, podrazumeva da se svaka štetna mutacija u nekom od dva genoma vrlo brzo eliminiše iz populacije delovanjem prirodne selekcije. S druge strane, mutacija u mitohondrijskom genomu koja povećava efikasnost energetskog metabolizma, biće favorizovana isto kao i varijanta u jedarnom genomu sa kojom data mutacija ispoljava najpovoljniji

efekat. Dakle, ovaj model podrazumeva sve bolje optimizovanu mitohondrijsku funkciju kroz generacije (Wolff i sar., 2014) (Slika 1.2.2.1.1.A).

Međutim, imajući u vidu specifične osobine mitohondrijskog genoma zbog kojih je verovatnije da ga evoluciono oblikuju neadaptivni procesi poput genetičkog drifta i nakupljanja štetnih mutacija mehanizmom Milerovog zupčanika, kompenzacioni model predstavlja šire prihvaćeni opis koevolucije dva genoma. Postoje dva tipa kompenzacione evolucije. Prvi je tzv. **kompenzaciono-neutralistički model** koji podrazumeva postojanje dve mutacije koje su individualno štetne, ali se negativni efekat maskira kada se eksprimiraju zajedno (Osada i Akashi, 2012) (Slika 1.2.2.1.1.B). Drugi je tzv. **kompenzaciona selekcija** gde se pretpostavlja da pojava mutacije sa negativnim efektom u mitohondrijskom genomu indukuje snažan selekcionni pritisak na jedarni genom pri čemu će biti favorizovane one mutacije koje kompenzuju negativne efekte štetne mtDNK varijante (Dowling i sar., 2008). Prema ovom modelu, dakle, jedarni geni moraju „pratiti“ genomske promene u mitohondrijama kako ne bi došlo do dramatičnog pada adaptivne vrednosti. Može se reći da je univerzalna evolucionna hipoteza Crvene kraljice pokazana i na nivou koevolucije dva genoma eukariota, jer jedarni genom mora „trčati koliko god može da bi [efekti oba genoma] ostali na istom mestu“⁵ u kontekstu preživljavanja i reprodukcije organizama (Slika 1.2.2.1.1.C).



Slika 1.2.2.1.1. Shematski prikaz različitih modela koevolucije mitohondrijskog i jedarnog genoma. **A** predstavlja koadaptacioni model gde i mutacija u mitohondrijskom genomu (M_m) i mutacija u jedarnom genomu (M_j) povećavaju adaptivnu vrednost organizma. **B** predstavlja kompenzaciono-neutralistički model koji pretpostavlja da su i mitohondrijska i

⁵ Ovo je citat iz „Alise iza ogledala“ Luisa Kerola koji je Van Valen iskoristio da slikovito objasni proces koevolucije i koadaptacija (Van Valen, 1973).

jedarna mutacija individualno štetne, ali njihove epistatičke interakcije maskiraju negativne efekte te su u kombinaciji neutralne. C je prikaz modela kompenzacione selekcije koji tvrdi da je najverovatnije da štetna mitohondrijska mutacija dovodi do povećanja učestalosti jedarne varijante koja kompenzuje negativan efekat. Preuzeto i modifikovano iz Osada i Akashi (2012).

Svaki od modela evolucije mito-jedarnih interakcija pretpostavlja da će u različitim populacijama, sa specifičnim genetičkim strukturama i genofondom jedarnih i mitohondrijskih alela, evoluirati različite mito-jedarne kombinacije (Wolff i sar., 2014). Isto tako, različite mito-jedarne kombinacije mogu evoluirati i unutar jedne populacije u različitim životnim sredinama usled njihovih interakcija sa različitim sredinskim uslovima (Dowling i sar., 2007a; Dowling i sar., 2007b), polno specifičnog efekta (Rand i sar., 2001, Jelić i sar., 2015) ili zbog različitog efekta u različitim životnim dobima jedinke (Camus i Dowling, 2018). Dakle, upravo je evolucija mito-jedarnih interakcija jedno od najboljih objašnjenja za uočenu adaptivno značajnu intraspecijsku, to jest intrapopulacionu varijabilnost mitohondrijskog genoma – različite varijante postoje istovremeno u vrsti ili populaciji ne zato što nemaju efekat na adaptivnu vrednost organizma već zato što u specifičnim kombinacijama sa jedarnim varijantama omogućavaju nesmetano funkcionisanje mitohondrijskih procesa.

1.2.2.2 Arene mitohondrijskih interakcija

Imajući u vidu složenu strukturu OXPHOS kompleksa i činjenicu da su njihove komponente izgrađene od proteina poreklom i sa jedarnog i sa mitohondrijskog genoma, jasno je zašto se kroz aktivnost OXPHOS najjasnije uočavaju efekti mito-jedarnih interakcija (Wolff i sar., 2014). Promena aminokiselinske sekvence bilo koje subjedinice ovog kompleksa može dovesti do promene efikasnosti respiracije i uticati potom na sve ostale osobine organizama. Jedan od mogućih scenarija jeste da aminokiselinska zamena dovede do promene 3D strukture katalitičkih centara koja direktno utiče na aktivnost enzima, protok elektrona i elektrohemijski gradijent kroz membranu (Lane, 2011). Dodatno, čak i ako promena sekvence proteina ne utiče na katalitičku aktivnost enzima, može uticati na stabilnost kompleksa ili sklapanje proteinskih elemenata kompleksa (Lazarou i sar., 2009), ili formiranje superkompleksa. Primera radi, Moran i saradnici su kod hibrida dve vrlo srodne vrste životki, riba iz porodice Poeciliidae, utvrdili nekompatibilnost između dva jedarna gena koji kodiraju za subjedinice kompleksa I i mitohondrijskih gena za subjedinice istog kompleksa. Kako se pokazalo, hibridne jedinke homozigotne za bilo koji od dva jedarna gena jedne vrste, a sa mitohondrijskim genomom druge vrste, najčešće ne preživljavaju ni embrionalno razviće. Kod heterozigota za jedarne gene ne ispoljava se ovaj dramatični efekat nekompatibilnosti dva genoma, ali je utvrđeno da dolazi do smanjenja kapaciteta mitohondrijske respiracije vezane za kompleks I (Moran i sar., 2024).

Još jedan važan, mada nedovoljno istražen, nivo zajedničkog delovanja mitohondrijskog i jedarnog genoma jesu interakcije između jedarnih proteina i mitohondrijske DNK (protein-DNK interakcije), kao i protein-RNK interakcije između jedarnih proteina i mitohondrijske RNK. Činjenica da mtDNK kodira za samo 22 tRNK i dve rRNK (pored 13 proteina) znači da se za njenu replikaciju i ekspresiju gena mahom koristi proteinska mašinerija eksprimirana sa jedarnog genoma i da ova mašinerija mora koevoluirati sa mitohondrijskim produktima sa kojima dolazi u kontakt. Primera radi, Ellison i Burton su pokazali da hibridi sa nekoevoluiranom mitohondrijskom RNK polimerazom kodiranom sa jedarnog genoma imaju otežanu transkripciju i replikaciju mtDNK (Ellison i Burton, 2006, 2010). Translacija mitohondrijskih gena je takođe kompleksna arena za mito-jedarne interakcije. Prvo, tRNK kodirane sa mtDNK moraju pravilno interagovati sa aminoacil-tRNK sintetazama kodiranim sa jedarnog genoma. Ukoliko ovi molekuli nisu kompatibilni, može doći do grešaka u translaciji ili usporavanja čitavog procesa, što se odražava na adaptivnu vrednost organizma (Sissler i sar., 2017). Eksperimentalnu potvrdu mito-jedarne inkompatibilnosti na ovom nivou dali su Majkldžon i saradnici

pokazujući da specifične varijante u mitohondrijskoj tRNK za tirozin i aminoacil tRNK sintetazi za tirozin koje nisu koevoluirale u istoj populaciji, dovode do usporenog razvića i smanjenog fekunditeta vinske mušice kada se nađu u hibridu, tj. jednom organizmu (Meiklejohn i sar., 2013). Kasnije je pokazano da ova mito-jedarna kombinacija dovodi i do pada aktivnosti OXPHOS enzima i promene morfologije samih mitohondrija (Holmbeck i sar., 2015). Takođe, mitohondrijski ribozomi sastavljeni su od jedarnih ribozomalnih proteina i mitohondrijske rRNK, te je jasno da i ova dva tipa molekula moraju koevoluirati da bi se zadržala funkcija ribozoma. Bareto i Barton potvrdili su ovu pretpostavku u svom istraživanju gde su testirali hipotezu da je stopa mutacija i divergencije veća za jedarne gene čiji se produkti nalaze u interakciji sa mitohondrijskim genima u odnosu na druge jedarne gene čije proteinske funkcije nisu vezane za mitohondrije. Hipoteza je postavljena zbog potvrđene veće stope mutacija u mtDNK, a samim tim i povećanog selektivnog pritiska u koevolucionom procesu dva genoma. Ova hipoteza je potvrđena na ribozomalnim proteinima koji formiraju mitohondrijske ribosome – stopa divergencije ovih gena između vrsta je veća u odnosu na ribozomalne proteine koji formiraju ribosome u citoplazmi (Bareto i Burton, 2013).

1.2.2.3 Interakcije genotipa sa životnom sredinom

Fenotip je rezultat interakcija genotipa i sredine, zbog čega su i same mito-jedarne interakcije oblikovane životnom sredinom u kojoj su eksprimirane. Istraživanja u kojima su testirani efekti mito-jedarnih kombinacija u različitim uslovima životne sredine pokazala su značajan uticaj spoljašnjih uslova na ispoljavanje efekta dva genoma kod životinja (Willet i Burton, 2003; Dowling i sar., 2007b; Arnqvist i sar., 2010; Hoekstra i sar., 2013; Erić i sar., 2022), biljaka (Campbell i Waser, 2001) i plesni (Nagarajan-Radha i Beekman, 2023). S obzirom na to da spoljašnja temperatura značajno utiče na mitohondrijski metabolizam (Blier i Lemieux, 2001) ovaj faktor životne sredine je najviše proučen u kontekstu mito-jedarnih interakcija. Razlog osetljivosti mito-jedarnih interakcija na spoljašnju temperaturu jeste zavisnost hemijskih reakcija metabolizma od temperature, kao i uticaj temperature na energetske potrebe organizma (Hoekstra i sar., 2013). Ektotermni organizmi su posebno izloženi dejstvu ovog faktora na metabolizam budući da se njihove mitohondrije ne nalaze na konstantnoj telesnoj temperaturi. Primera radi, Arnqvist i saradnici pokazali su da temperatura i interakcije mitotipa, jedarne sredine i temperature imaju značajan efekat na stopu metabolizma kod hibrida vrste žiška *Calosobruchus maculatus* sa različitim mito-jedarnim kombinacijama (Arnqvist i sar., 2010), a Dowling i saradnici pokazali su uticaj ovih interakcija na brzinu razvića kod iste vrste (Dowling i sar., 2007b). Pokazano je, takođe, da temperatura predstavlja faktor spoljašnje sredine koji oblikuje klinalnu distribuciju mitotipova u prirodnim populacijama (Fontanillas i sar., 2005; Camus i sar., 2017).

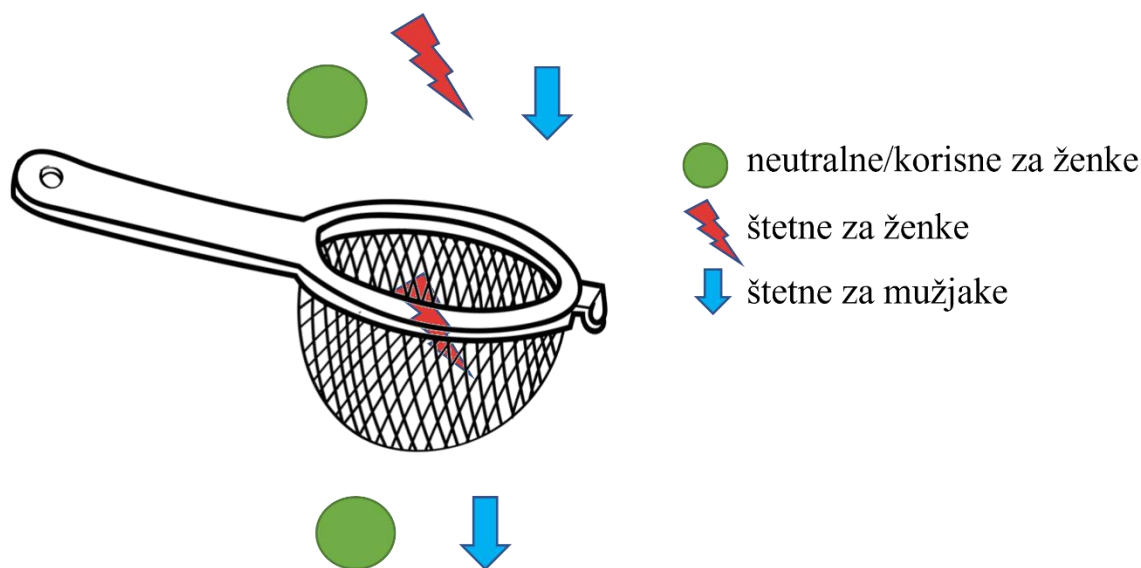
Postoje snažne eksperimentalne potvrde da ishrana takođe ima značajan uticaj na efekte mito-jedarnih interakcija na fenotipska svojstva i adaptivnu vrednost organizama (Zhu i sar., 2014; Mossman i sar., 2016a; Aw i sar., 2018; Towarnicki i Ballard, 2018; Camus i sar., 2020).

1.3 „Materinska kletva“

Do sada predstavljena koevolucija mito-jedarnih interakcija suštinski se oslanja na kooperaciju dva genoma. Kroz koevoluciju dva genoma povećavaju ili održavaju precizne i efikasne interakcije čime je omogućeno preživljavanje organizma. Međutim, kooperacija ne mora biti jedini pokretač koevolucije. Naime, postoji i genocentrično viđenje da svaki genom evoluira u skladu sa svojim interesima, a ne interesima organizma u celini (Wade i Drown, 2016). Kozmides i Tobi (1981) smatraju da je evolucija uniparentalnog nasleđivanja mitohondrija posledica sprečavanja širenja „sebičnih“ mitohondrijskih

varijanti u populaciji. Interesantno je da je upravo ovo ne-mendelovsko nasleđivanje mitohondrija omogućilo pojavu novog genomskog konflikta – ovog puta između polova.

Matrilinarno nasleđivanje mitohondrija dovodi do asimetričnog delovanja selekcije na mužjake. Kako se mitohondrije nasleđuju samo preko majki, selekcija je praktično „slepa“ za mitohondrijske mutacije koje su štetne samo za muški pol. S obzirom na to da su mitohondrije mužjaka „evolucionari ćorsokaci“, u mitohondrijskom genomu se mogu nakupljati mutacije sa negativnim efektom za mužjake sve dok nemaju (preveliki) negativan efekat na ženke (Slika 1.3.1) (Frank i Hurst, 1996). Ovo genetičko opterećenje mitohondrijskog genoma specifično za mužjake nazvano je **materinska kletva** (Gemmell i sar., 2004).



Slika 1.3.1 Delovanje prirodne selekcije na mitohondrijske mutacije. Selekcija deluje kao polno specifično sito koje eliminiše samo mutacije štetne po ženke dok ne prepoznaje one sa negativnim efektom samo po mužjake.

Frank i Hurst su prvi predložili postojanje ovog evolucionog fenomena 1996. godine baveći se mitohondrijskim bolestima koje su generalno prevalentnije kod muškaraca u odnosu na žene (Frank i Hurst, 1996). Primer je Leberova hereditarna optička neuropatija, neurodegenerativna bolest koja dovodi do gubitka vida izazvanog mutacijama u mitohondrijskom genu za subjedince kompleksa I (MacMillan i sar., 2000) i koja uglavnom pogađa muškarce⁶ (Hage i Vignal-Clermont, 2021). Isto tako, primećen je efekat mitohondrijskih varijanti na muški fertilitet. Ruiz-Pesini i saradnici pokazali su da mitohondrijske mutacije koje smanjuju fertilitet muškarcima kroz uticaj na pokretljivost spermatozoida segregiraju u ljudskim populacijama u visokim učestalostima (Ruiz-Pesini i sar., 2000).

Brojni radovi su radovi koji nisu direktno testirali postojanje materinske kletve, ali su detektovali polno specifični efekat mitohondrijskih varijanti na različite osobine organizama. Camus i saradnici su testirali efekat 13 mitotipova u jednoj homogenoj jedarnoj sredini na dužinu života mužjaka i ženki vinske mušice i ustanovili veću varijansu u dužini života mužjaka u odnosu na ženke (Camus i sar.,

⁶ Veoma je interesantan nalaz da je jedna mutacija koja izaziva Leberovu hereditarnu optičku neuropatiju jako česta kod francuskih Kanađana. Ispostavilo se da je ta mutacija poreklom od jedne žene, Francuskinje koja je došla u Kvebek zajedno sa još 767 sunarodnika, tzv. Kraljevih kćeri. Njihovo preseljenje je u periodu od 1663. do 1673. godine obezbedio i finansirao kralj Luj XIV sa ciljem da uravnoteži odnos polova u tadašnjoj francuskoj koloniji. Ova žena udala se i postala majka desetoro dece, od kojih šest kćeri. Njeni sinovi, i muški potomci u narednim generacijama, koji su nosili istu mitohondrijsku mutaciju, imali su smanjene adaptivne vrednosti, dok su ženski nosioci, štaviše, imali povećanu adaptivnu vrednost. Ovo je za rezultat imalo širenje konkretne mutacije u populaciji tako da se u današnjoj populaciji Kvebeka ova mutacija javlja jednom na svakih 2.000 individua (Milot i sar., 2017).

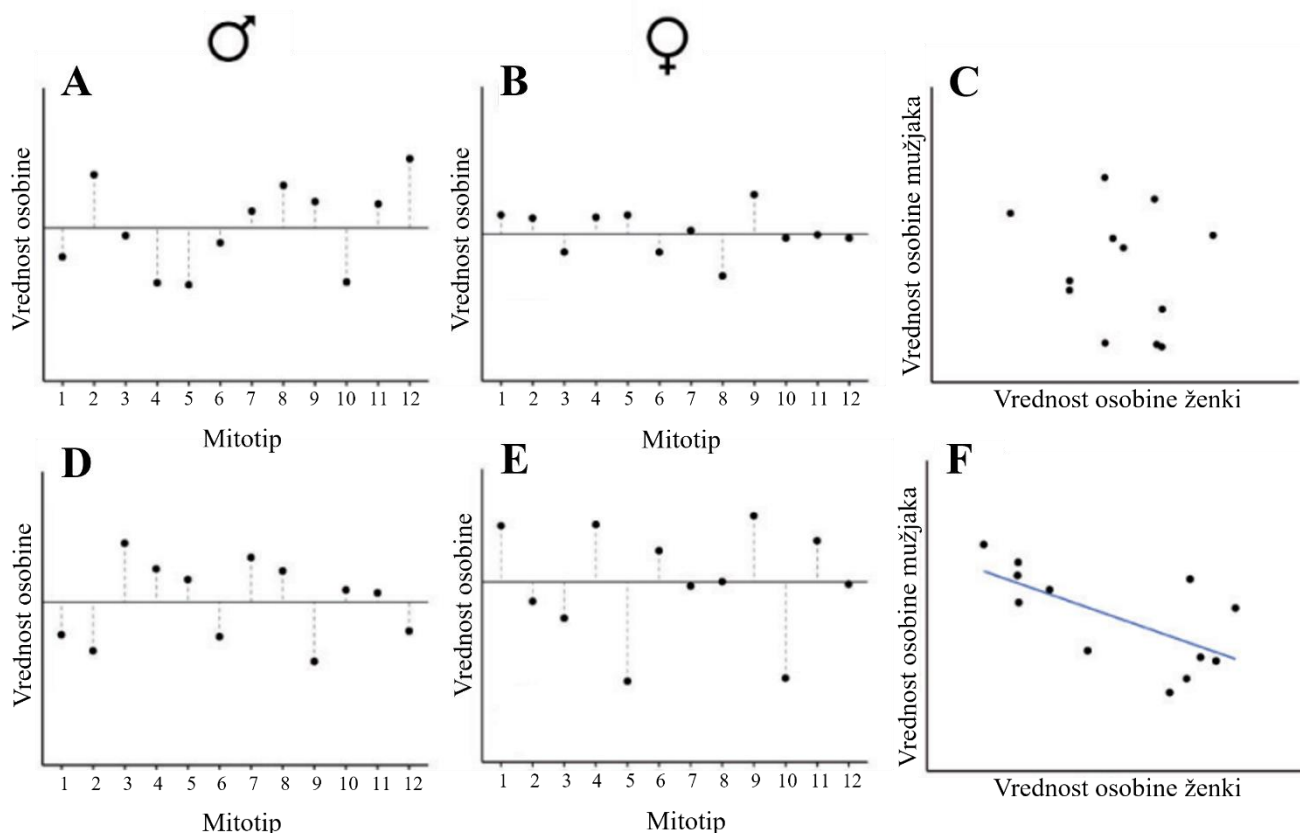
2012). Drugim rečima, mitotipovi su imali veći efekat na ovu osobinu kod mužjaka što se odrazilo kroz veliku varijabilnost dužine života mužjaka nosilaca različitih mitotipova. Jedno istraživanje je detektovalo smanjenje dužine života i fertiliteta mužjaka ali ne i ženki određenog mitotipa pri ishrani specifičnom dijetom kod mušice (Aw i sar., 2017). U drugom istraživanju, kada su ispitivani hibridi sa mitohondrijskim haplotipovima poreklom iz vrste *Drosophila simulans* eksprimiranim u jedarnoj sredini *D. mauritania*, pokazan je pad aktivnosti kompleksa IV koji je bio ograničen samo na muški pol (Sackton i sar., 2003). U već opisanim radovima Đorđevića i saradnika, pad dužine života ukrštanih jedinki i pad aktivnosti kompleksa kod hibrida dva selekciona režima bio je izraženiji kod mužjaka u odnosu na ženke (Đorđević i sar., 2015; Đorđević i sar., 2017).

1.3.1 „Slaba“ i „jaka“ „materinska kletva“

Materinska kletva, kako su je predstavili Frank i Hurst, podrazumeva nakupljanje mutacija štetnih po mužjake, a neutralnih ili blago štetnih po ženke u mitohondrijskom genomu (Frank i Hurst, 1996). To znači da se takve mutacije, jednom kad se pojave u populaciji, održavaju i menjaju učestalosti prevashodno zahvaljujući dejstvu genetičkog drifta. Ovaj modalitet delovanja materinske kletve nazvan je „slaba“ materinska kletva (Havird i sar., 2019).

Predložen je i drugi način delovanja ovog evolucionog fenomena, tzv. „jaka“ materinska kletva, koji podrazumeva postojanje mutacija u mtDNK sa polno antagonističkim dejstvom. Drugim rečima, „jaka“ materinska kletva predstavlja nakupljanje mutacija u mitohondrijskom genomu štetnih za mužjake, ali korisnih za ženke. U ovom slučaju, prirodna selekcija favorizuje takvu mutaciju zbog čega će se njena učestalost povećavati kroz generacije bez obzira na negativan efekat na adaptivnu vrednost mužjaka (Havird i sar., 2019).

Efekat mitohondrijskih mutacija sa polno specifičnim efektom nije lako eksperimentalno detektovati, kao ni način delovanja materinske kletve. Dawling i Adrian dali su istraživački okvir, to jest predviđanja koja bi trebalo da važe u slučaju „slabe“ ili „jake“ materinske kletve i način na koji se mogu testirati. U slučaju delovanja „slabe“ materinske kletve, u mitohondrijama dolazi do nakupljanja mutacija koje utiču na mužjake negativno, dok je njihov efekat na ženke beznačajan. To znači da bi genetička varijabilnost testiranih mitotipova trebalo da ima veći uticaj na mužjake nego na ženke. Dakle, očekuje se visoka varijansa testirane osobine za mužjake, a niska za ženke. S druge strane, ukoliko se mutacije nakupljaju u mtDNK pod delovanjem „jake“ materinske kletve, efekat genetičke varijabilnosti testiranih mitotipova biće visok u oba pola, s tim što mitotip koji dovodi do smanjenja adaptivne vrednosti mužjaka povećava adaptivnu vrednost ženki. To znači da bi trebalo da se detektuju negativne korelacije između dva pola za testiranu osobinu (Dawling i Adrian, 2019) (Slika 1.3.1.1).



Slika 1.3.1.1. Paneli A, B i C predstavljaju očekivane rezultate variranja merene osobine ukoliko deluje „slaba“ materinska kletva. Panel A je variranje osobine u zavisnosti od mitotipa kod mužjaka, dok je na panelu B prikazano značajno manje variranje osobine kod ženki. Panel C ilustruje nepostojanje korelacija između osobina mužjaka i ženki. Paneli D, E i F prikazuju očekivane rezultate variranja merene osobine ukoliko deluje „jaka“ materinska kletva. I kod mužjaka (panel D) i kod ženki (panel E) je evidentno značajno odstupanje vrednosti osobina od srednje vrednosti. Sa panela F se vidi negativna korelacija merene osobine kod mužjaka i ženki, to jest polno antagonistički efekat mitotipova. Horizontalna linija na panelima A, B, D i E predstavlja srednju vrednost, a vertikalne isprekidane linije veličinu odstupanja od srednje vrednosti. Preuzeto i modifikovano iz Dowling i Adrian, 2019.

1.3.2 Kako mutacija može biti polno specifična?

Interlokusni konflikt između polova, koji predstavlja polno antagonističku evoluciju različitih lokusa, dobro je opisan i zabeležen brojnim primerima. Konflikt na intralokusnom nivou, gde efekti varijante na jednom lokusu imaju polno specifičan efekat, slabije je istražen (Bonduriansky i Chenoweth, 2009). S obzirom na centralnu ulogu mitohondrija u produkciji energije i drugim ćelijskim procesima, očekivano je da mutacija sa fenotipskim efektom u mtDNK utiče na sličan način na oba pola, to jest da postoje pozitivne interseksualne korelacije za ispitivane osobine (Camus i Dowling, 2018). Materinska kletva, međutim, predviđa negativne korelacije između polova (u slučaju „jakog“ oblika), to jest nepostojanje korelacija (u slučaju „slabog“ oblika). Pojava mutacija sa različitim efektom na mužjake i ženke posledica je različitih metaboličkih potreba dva pola. Naime, mužjaci i ženke mogu se posmatrati kao dve različite sredine u kojima se ispoljava efekat mitohondrijskih mutacija (u interakciji sa jedrom i spoljašnjom sredinom). Razlike između dva pola su najevidentnije u osobinama koje su polno dimorfne ili karakteristične samo za jedan pol, za šta je najupečatljiviji primer reproduktivno tkivo (Dowling i Adrian, 2019; Havird i sar., 2019). Muške gonade, testisi, izuzetno su metabolički aktivni tokom celog života jedinke, proizvodeći ogromne količine spermatozoida na dnevnom nivou (Short, 1997). S druge

strane, ženske gonade, ovarijumi, proizvode relativno mali broj jajnih ćelija samo tokom embrionalnog razvića jedinke (Tosti i Ménéz, 2016). Stoga, zbog razlika u broju i vremenu produkcije gameta u reproduktivnim tkivima mužjaka i ženki, njihove energetske potrebe su značajno različite. Istraživanje Imonen i saradnika pokazalo je da se stopa metabolizma značajno povećava kod mužjaka žiška *Callosobruchus maculatus* nakon ukrštanja što ukazuje na povišene energetske potrebe usled produkcije sperme (Immonen i sar., 2016). Interesantno, nivo povećanja stope metabolizma zavisio je od mitohondrijskog genotipa. Dodatno, spermatozoidi sadrže značajno manje mitohondrija u odnosu na jajne ćelije. Primera radi, oocite sisara sadrže oko 200.000 mtDNK kopija, dok spermatozoidi mogu imati i manje od 100 (Havird i sar., 2019). Spermatozoidi su i izuzetno aktivne ćelije, koje za kretanje proizvode energiju produkovanu od strane malog broja mitohondrija lociranih u vratu spermatozoidea (Dowling i Adrian, 2019, ali videti Du Plessis i sar., 2015). Na osnovu ovih podataka očekivano je da spermatozoidi budu osetljiviji i na sasvim male promene u aktivnosti OXPHOS kompleksa, dok ženski gameti promene mogu kompenzovati pukom brojnošću mitohondrija (Vaught i Dowling, 2018). Pored mnogobrojnih studija koje su povezale deficite u spermatogenezi i funkcionisanju spermatozoidea sa mitohondrijskim mutacijama u našoj vrsti (Holoyake i sar., 2001; St. John i sar., 2005; Shamsi i sar., 2008; Al Zoubi i sar., 2021; Dzudzor i sar., 2021; Karimian i Babaei, 2021), slični rezultati su dobijeni i na životinjama. Primera radi, u jednoj studiji identifikovan je značajan efekat mitotipa (i mito-jedarnih interakcija) na vijabilitet i dužinu spermatozoidea kod žiška vrste *C. maculatus* (Dowling i sar., 2007b), dok je u studiji na petlovima povezana konkretna mitohondrijska mutacija sa značajno smanjenom pokretljivošću spermatozoidea (Froman i Kirby, 2005).

Osim reproduktivnog aspekta životne istorije, i za druge osobine je pokazan polni dimorfizam u metaboličkim potrebama, poput dužine života (Bonduriansky i sar., 2008; Maklakov i Lummaa, 2013) i prereproduktivnog ponašanja (Brand i sar., 2024), zbog čega se može pretpostaviti da evolucija ovih svojstava takođe može biti pod uticajem mtDNK mutacija sa negativnim efektom na mužjake.

1.3.3 Kako izbeći „kletvu“?

Iako vrlo nepovoljna za mužjake, „kletva“ može biti ublažena. Gemel i saradnici predložili su nekoliko kompenzacionih mehanizama kojima je moguće izbeći efekte materinske kletve (Gemmell i sar., 2004).

Prvi mehanizam podrazumeva rekombinacije mitohondrijskog genoma, koje bi povećale efikasnost prirodne selekcije na prisutne varijante. U takvim uslovima selekcija bi potencijalno mogla iz populacije ukloniti mutacije koje se inače održavaju delovanjem drifta – sa blago negativnim efektom po ženke a većim uticajem na mužjake (Gemmell i sar., 2004). Međutim, iako se mitohondrijski genomi biljaka rekombinuju (Barr i sar., 2005) to mahom nije slučaj za metazoe (Stewart i sar., 2008).

Drugi potencijalni mehanizam „spasa“ od materinske kletve predstavlja povremeno nasleđivanje očevih mitohondrija, tzv. paternalno curenje mitohondrija. Nasleđivanje mitohondrije i po očevoj liniji izložilo bi dejstvu selekcije one mutacije koje imaju efekat samo na mužjake i potencijalno dovelo do njihove eliminacije iz populacije. Međutim, paternalno curenje veoma je retko zbog čega je upitan i značaj ovog mehanizma na učestalost mutacija materinske kletve (Gemmell i sar., 2004; Sato i Sato, 2013).

Najverovatniji način izbegavanja efekta mtDNK mutacija sa negativnim efektom na mužjake oslanja se na koevoluciju mitohondrijskog i jedarnog genoma. Ukoliko se u jedarnom genomu pojave mutacije koje maskiraju efekat polno specifičnih mutacija u mtDNK, one će imati adaptivnu prednost u odnosu na varijante koje ne pružaju zaštitu od negativnog efekta mtDNK mutacija; takve mutacije nazvane su kompenzacione ili restorer (engl. *restorter*) varijante (Gemmell i sar., 2004; Havird i sar., 2019; Kyrgiafini i sar., 2022). Primera radi, pokazano je da se u testisima metazoa često javljaju tkivno-

specifični paralozni OXPHOS subjedinica kodirani jedarnim genomom (Sinkler i sar., 2017) koji potencijalno maskiraju negativni efekat mtDNK mutacija koje dovode do smanjenja aktivnosti OXPHOS proteinskih kompleksa (Havird i sar., 2019). Već pomenuta istraživanja u kojima je demonstriran veći negativan efekat na mužjake nakon narušavanja koevoluiranih mito-jedarnih interakcija (Sackton i sar., 2003; Đorđević i sar., 2015; Đorđević i sar., 2017) ukazuju na postojanje kompenzacionih mehanizama u jedarnoj sredini sa kojom je mitohondrijski genom bio eksprimiran i koevoluirao veći broj generacija. Dakle, da bi se uopšte detektovao efekat materinske kletve u populaciji neophodno je ispitivane mitotipove eksprimirati u novim jedarnim sredinama u kojima nisu prisutni restorer geni (Dowling i Adrian, 2019).

Predložen je još jedan način na koji bi se mutacije materinske kletve mogle izložiti dejstvu prirodne selekcije i biti uklonjene iz populacije. Naime, u malim populacijama sa povećanom stopom ukrštanja u srodstvu, velika je verovatnoća da će se brat i sestra nosioci mutacije materinske kletve ukrstiti. To za posledicu ima smanjenje adaptivne vrednosti ženke koja nosi mtDNK mutaciju zbog niskog reproduktivnog potencijala njenog brata. S obzirom na to da mutacija sada indirektno deluje i na ženke, prirodna selekcija je u stanju da prepozna negativan efekat mutacije i da joj kroz generacije smanji učestalost (Unckless i Herren, 2009; Hedrick, 2012). Slično se dešava i u uslovima selekcije u srodničkom krugu (tzv. kin selekcije) gde adaptivna vrednost jedinke ne zavisi samo od njenog genotipa i interakcija sa sredinom, već i od adaptivne vrednosti njenih rođaka (tzv. inkluzivna adaptivna vrednost). Drugim rečima, adaptivna vrednost ženke nosioca mutacije materinske kletve potencijalno bi mogla biti smanjena zbog negativnih posledica mutacije po njene muške srodnike (Connallon i sar., 2018).

1.3.4 Eksperimentalni dokazi „materinske kletve“

1.3.4.1 „Materinska kletva“ kod biljaka – citoplazmatska muška sterilnost

Fenomen materinske kletve, iako ne pod tim nazivom, već dugo je poznat kod biljaka kao citoplazmatska muška sterilnost (CMS) (Budar i sar., 2003). CMS predstavlja nemogućnost razvika muških polnih organa, to jest funkcionalnih muških cvetova, zbog negativnog efekta specifičnih mitotipova. Naime, veliki broj biljnih vrsta je ginodietsko⁷, to jest u populaciji postoje ili hermafroditne ili ženske biljke (Horn i sar., 2014). Procene su da je čak 7,5% evropskih skrivenosemenica ginodietsko, a kod većine je ova osobina povezana sa gubitkom funkcije muškog reproduktivnog tkiva usled mutacije u mtDNK (Budar i Pelletier, 2001).

Najčešće varijante u mitohondrijskom genomu koje izazivaju CMS jesu rekombinovani geni (Touzet i Budar, 2004). Ove varijante na dva načina mogu izazvati izostanak muških cvetova. Jedan način je homeoza, gde dovode do pretvaranja muškog reproduktivnog organa, prašnika, u latice ili u ženski reproduktivni organ, to jest tučak. Drugi način je prosta degeneracija prašnika, njegovih delova ili samog polena (Chase, 2007).

CMS se može smatrati primerom „jake“ materinske kletve, s obzirom na to da ženske biljke, nosioci CMS mutacije, imaju adaptivnu prednost u odnosu na hermafroditne biljke budući da kod mnogih vrsta one proizvode više semena. Kod onih vrsta kod kojih CMS nije povezan sa povišenom alokacijom resursa u seme, pokazano je da CMS mutacije u vegetativnim tkivima dovode do povećanja ekspresije jedarnih gena sa ulogom u odgovoru na stres.

Objašnjenje kako CMS mutacija utiče samo na muške cvetove slično je onom kod životinja. Procenjeno je da je za normalno razvike prašnika i polena potrebno da broj mitohondrija po ćeliji poraste

⁷ Ovaj termin uveo je Darwin 1877. godine (Darwin, 1877) i u svom radu argumentovao je da gubljenje muških organa na hermafroditnoj biljci igra važnu ulogu u evoluciji dvodnosti.

20-40 puta, što ukazuje na jako visoku energetska zahtevnost ovog procesa. Dakle, ukoliko CMS mutacija izaziva problem u efikasnosti respiracije ili sklapanja OXPHOS kompleksa, razviće muških polnih organa se ne može završiti (Warmke i Lee, 1977). Dodatno, ovoliko povećan broj mitohondrija može povećati i bilo kakvu neregularnost u njihovom funkcionisanju, npr. povišenu produkciju ROS-ova. Takođe, predložena je i mogućnost da genski produkti specifični za prašnike interaguju epistatički sa CMS mutacijom što dovodi do problema u razviću muških cvetova (Chase, 2007).

Kompenzaciona evolucija kod ovog fenomena dobro je proučena. Otkriven je veći broj različitih restorer gena koji funkcionišu prema jednom od dva modela. Prvi je sporofitni, u kom restorer alel ispoljava svoj efekat u diploidnoj biljci i u heterozigotnom stanju. Drugi je gametofitni, pri kom je neophodno da se restorer alel nađe u samom polenu da bi mu povratio funkciju (Horn i sar., 2014). Dodatno, često je potrebna interakcija nekoliko restorer alela da bi se ispoljio kompenzacioni efekat (Chase, 2007).

1.3.4.1 „Materinska kletva“ kod životinja

Iako je postojanje CMS kod biljaka dobro objašnjeno i prihvaćeno u naučnoj javnosti, dugo se smatralo da sličan fenomen ne može biti prisutan kod životinja zbog malog mitohondrijskog genoma koji se ne rekombinuje (Camus i Dowling, 2018). Ipak, dokazi koji se nakupljaju u poslednje dve decenije govore u prilog postojanju mutacionih opterećenja specifičnih za muški pol u mitohondrijskom genomu. Inosenti i saradnici su u svojoj studiji pokazali da varijabilnost u pet mitotipova eksprimiranih naspram homogene jedarne sredine dovodi do diferencijalne ekspresije čak 1.172 jedarna gena kod mužjaka, a samo sedam kod ženki (Innocenti i sar., 2011). Ovaj nalaz je u skladu sa predviđanjima da varijabilnost mitohondrijskog genoma ima veći uticaj na mužjake u odnosu na ženke (Dowling i Adrian, 2019). Interesantno je da veliki broj diferencijalno eksprimiranih gena ispoljava svoju ulogu u muškom reproduktivnom tkivu (Innocenti i sar., 2011). Nekoliko istraživačkih grupa identifikovalo je i specifične mitotipove koji se javljaju u prirodnim populacijama i dovode do ispoljavanja efekta materinske kletve na evropskim zečevima (Smith i sar., 2010) i vinskoj mušici (Clancy i sar., 2011; Yee i sar., 2013; Patel i sar., 2016). Najbolje proučen mitotip materinske kletve pronađen je u populaciji *Drosophila melanogaster* iz Braunsvila u Teksasu i nazvan BRO mitotip (od engl. *Brownsville*). Za ovaj mitotip pokazano je da naspram jedne, homogene jedarne sredine (izogena i homozigotna w1118 jedarna sredina (Clancy, 2008)) izaziva potpunu sterilnost mužjaka (Yee i sar., 2013), ali ne i ženki (Camus i Dowling, 2018). Patel i saradnici su na istoj vrsti identifikovali drugi mitotip, G177S, koji dovodi do pada fertiliteta mužjaka. Slično kao BRO mitotip, G177S dovodi do negativnog efekta na mužjake samo kada je eksprimiran u w1118 jedarnoj sredini. Pad u fertilitetu mužjaka ovog mitotipa dodatno je izražen na povišenoj temperaturi (Patel i sar., 2016).

1.4 Primena fenomena „materinske kletve“

Ekonomski štetne vrste predstavljaju globalnu pretnju po privredu (Paini i sar., 2016). Pesticidi su konvencionalno, široko korišćeno sredstvo za odbranu od štetočina. Njihova upotreba, međutim, ugrožava ljudsko zdravlje i biodiverzitet. Dodatno, pokazalo se da štetočine vrlo brzo evoluiraju rezistenciju na ove hemikalije (Bourtzis i sar., 2014). Navedeni problemi nametnuli su potrebu za pronalaskom alternativnih i bezbednijih metoda kontrole brojnosti populacija ekonomski štetnih vrsta.

Postojanje polno specifičnih genetičkih faktora koji negativno utiču na jedan pol, poput mutacija materinske kletve, prepoznato je kao potencijalno sredstvo za biološku kontrolu populacija ekonomski štetnih vrsta. Metode biokontrole koje podrazumevaju korišćenje genetičkih elemenata ili izmenu genoma zovu se genetička biokontrola.

1.4.1 Genetička biokontrola

Genetička biokontrola predstavlja širok pojam koji se odnosi na metode koje se služe editovanjem genoma, parazitima koji menjaju odnos polova u populaciji, genotoksičnim agensima, genetičkim varijantama koje se prirodno javljaju u populacijama, itd (Teem i sar., 2020). Osnovna ideja je generisanje sterilnih jedinki koje će se po puštanju u prirodne populacije neuspešno pariti i dovesti do smanjenja broja potomaka u narednoj generaciji. Ove metode mahom su koncipirane i korišćene na populacijama štetnih vrsta insekata i vektorima zaraznih bolesti (Klassen i Kurtis, 2005).

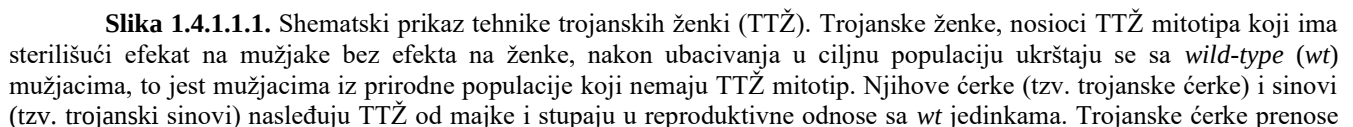
Najbolje istražena i najviše korišćena metoda genetičke biokontrole je metoda sterilnih insekata (engl. *sterile insect technique*, SIT). U svojoj izvornoj formi ona se zasniva na izlaganju jedinki gama zračenju koje dovodi do strukturnih hromozomskih mutacija u gametima jedinki što uzrokuje njihovu sterilnost (Alphey i Bonsall, 2018; Teem i sar., 2020). Kada se puste u populaciju, ozračeni mužjaci i ženke neće ostavljati potomstvo pri ukrštanju sa jedinkama iz prirodne populacije. Ova metoda uspešno je iskorišćena za istrebljivanje vrste *Cochliomyia hominivorax*, parazitske muve karakteristične za tropska područja Severne i Južne Amerike, iz Sjedinjenih Američkih Država i brojnih južnoameričkih država (Smith, 1963; Vargas-Teran i sar., 2005). Dodatno, upotrebljena je i za kontrolu drugih vrsta insekata poput šarenog jabukovog moljca (*Teia anartoides*) (Suckling i sar., 2007) i jedne vrste moljca čije larve se hrane pamukom (*Pectinophora gossypiella*) (Tabashnik i sar., 2010). Iako vrlo uspešna u svojoj primeni na navedene vrste, SIT ima i brojne nedostatke. Prvi je taj što je potrebno primeniti dovoljno zračenja da bi se izazvali strukturni rearanžmani hromozoma u germinativnom tkivu, a da se ne naruši kompetitivnost samih adulata koji će biti pušteni u prirodne populacije. Drugim rečima, zračenje ne sme imati efekat na osobine životne istorije jedinki koje utiču na njihovu šansu da stupe u reprodukciju poput dužine života i reproduktivnog ponašanja. Mnoge vrste insekata su veoma osetljive na zračenje te je ova metoda za njih neprimenjiva. Dodatno, potrebno je puštati veliki broj insekata veći broj generacija da bi se postigao efekat biološke kontrole. Gajenje i zračenje velikog broja insekata vrlo je zahtevno finansijski, a introdukovanje obimnog broja insekata u prirodnu populaciju privremeno povećava štetu koju insekti čine (Teem i sar., 2020). Konačno, zbog nedostatka brzog načina da se jedinke razvrstaju po polu, najčešće se mužjaci i ženke u prirodu puštaju istovremeno. Ovo predstavlja značajan nedostatak metode s obzirom na to da je pokazano da se ozračeni mužjaci i ženke često ukrštaju međusobno umesto sa zdravim jedinkama iz populacije čime smanjuju efikasnost tehnike (Rendón i sar., 2004).

Zbog navedenih mana SIT-a razvijena je alternativna varijanta koja podrazumeva otpuštanje transgenih insekata sa dominantnim letalnim alelom (engl. *release of insects carrying a dominant lethal*, RIDL). Metoda se zasniva na kreiranju insekata koji su homozigoti za dominantni letalni alel. Kada se ukrste sa jedinkama iz prirodne populacije, njihovo potomstvo biće heterozigotno za ovaj alel, što dovodi do njihove smrti (Alphey, 2014). U toku gajenja transgenih insekata efekat alela je suprimiran specijalnom ishranom (Alphey i Bonsall, 2018). RIDL rešava problem nemogućnosti korišćenja SIT-a za vrste osetljive na zračenje, ali i dalje podrazumeva otpuštanje velikog broja insekata svake generacije i bio bi efikasniji ukoliko bi se otpuštali samo mužjaci (Teem i sar., 2020).

Tehnika nekompatibilnih insekata, IIT (engl. *incompatible incest technique*) je još jedna varijanta SIT-a koja je u razvoju. IIT podrazumeva otpuštanje mužjaka zaraženih bakterijom *Wolbachia*, intracelularnom parazitskom bakterijom koja se prenosi samo preko majki. Specifičnost infekcije ovom bakterijom je ta da zaraženi mužjaci mogu uspešno da se ukrštaju sa ženkama koje su takođe zaražene istim sojem bakterije. Međutim, pri ukrštanju sa neinficiranim ženkama ili ženkama inficiranim drugim sojem iz prirodnih populacija ne može se produkovati potomstvo (Bourtzis i sar., 2014). Uspeh ove metode u potpunosti zavisi od preciznog razvrstavanja po polu i oslobađanja isključivo mužjaka. Naime,

Nedavno predložena metoda biokontrole ekonomski štetnih vrsta, koja se oslanja na fenomen materinske kletve i ima potencijal da prevaziđe nedostatke drugih tehnika, naziva se tehnika trojanskih ženki (TTŽ).

TTŽ je metoda biokontrole ekonomski štetinih vrsta koju su teorijski potkovali i matematički ovali Gemel i saradnici (Gemmell i sar., 2013). TTŽ se zasniva na postojanju mitohondrijskih gena koje dovode do sterilnosti/substerilnosti mužjaka, ali nemaju efekat na fertilitet ženki. Nasuprot drugim metodama biokontrole, TTŽ ne podrazumeva otpuštanje sterilnih mužjaka u prirodne populacije, već se koristi ženke nosilaca date mitohondrijske mutacije – takve ženke nazvane su trojanske ženke. U ciljnoj populaciji, trojanske ženke se uspešno pare sa mužjacima i ostavljaju potomstvo koje nasleđuje mutaciju od majke. Sinovi trojanskih ženki imaju smanjen fertilitet ili će biti sterilni (tzv. trojanski mužjaci) zbog negativnog uticaja mtDNK mutacije, dok će ćerke biti u potpunosti zdrave i sposobne da se razmnožavaju (Slika 1.4.1.1.1). Dakle, očekivana posledica otpuštanja trojanskih ženki jeste smanjenje veličine populacije zbog toga što je polovina njihovog potomstva sterilna. Dodatno, ogromnu prednost ove metode predstavlja to što žensko potomstvo nema smanjenu adaptivnu vrednost u prisustvu mutacije mtDNK zbog čega će ta mitohondrijska varijanta biti nesmetano prenošena u dalje generacije. Drugim rečima, TTŽ je, za razliku od drugih opisanih metoda, transgeneracijska tehnika kontrole brojnosti populacije te ima potencijal prevazilaženja najveće poteškoće drugih metoda genetičke biokontrole, a to je održavanje za konstantnim, ponovljenim otpuštanjima sterilnih jedinki iz godine u godinu (Gemmell i sar., 2013).



TTŽ mitotip dalje niz generacije, dok trojanski sinovi ne ostavljaju potomstvo. Negativni efekat TTŽ mitotipa na fertilitet muških potomaka trojanskih ženki dovodi do pada brojnosti populacije kroz generacije.

U modelu Gemela i saradnika pokazano je da jedno veliko oslobađanje trojanskih ženki (10% populacije) dovodi do značajnog smanjenja populacije, dok nekoliko manjih otpuštanja (1% populacije) potencijalno mogu i nadmašiti efekat velike introdukcije. Uz to, poređenjem metoda SIT i TTŽ zaključeno je da je za dugotrajnu supresiju populacije potreban manji broj oslobađanja i to značajno manjeg obima za TTŽ u odnosu na SIT (Gemmell i sar., 2013).

Još jedna velika prednost ove metode leži u pretpostavci, barem sudeći po ovom modelu, da nije potrebno razdvajanje polova pre otpuštanja trojanskih ženki. Štaviše, model predviđa da bi istovremeno puštanje oba pola doprinelo efektu smanjenja brojnosti populacije. Sterilni mužjaci bi, slično SIT-u, doveli do supresije već u prvoj generaciji pri otpuštanju, dok je efekat trojanskih ženki odložen za jednu generaciju, to jest dok ne produkuju muško potomstvo (Gemmell i sar., 2013). S obzirom na to da TTŽ zahteva otpuštanja značajno manjeg broja jedinki u odnosu na ostale varijante SIT-a, smanjena je verovatnoća ukrštanja trojanskih ženki i trojanskih mužjaka.

Dakle, TTŽ je samoodrživa metoda supresije populacije za čiju efikasnost je dovoljno jedno otpuštanje trojanskih ženki, ne zahteva odvajanje polova i ne podrazumeva genetičko modifikovanje organizama. Međutim, iako rešava brojne nedostatke drugih metoda genetičke biokontrole, i ova metoda ima svoje probleme. Najveće ograničenje TTŽ je nužnost pronalaska mitotipa sa sterilišućim efektom na mužjake, a bez efekta (ili pozitivnim efektom) na ženke. Iako su obećavajući podaci o pronalasku takvih mitotipova kod *Drosophila melanogaster* (Clancy i sar., 2011; Yee i sar., 2013; Patel i sar., 2016) i zečeva (Smith i sar., 2010), dodatno treba utvrditi da opisani mitotip ni na koji način ne smanjuje adaptivnu vrednost ženaka u odnosu na ženke drugih mitotipova. Ukoliko ovaj uslov nije zadovoljen, nakon otpuštanja trojanskih ženki, učestalost trojanskog mitotipa će se smanjivati kroz generacije i potencijalno potpuno nestati te se neće postići željeni efekat na brojnost populacije. Dalje, važno svojstvo kandidat TTŽ mitotipa je i odsustvo uticaja na kompetitivnost mužjaka u odnosu na mužjake drugih mitotipova. Drugim rečima, dužina života i reproduktivno ponašanje trojanskih mužjaka ne smeju biti negativno pogođeni mutacijom. TTŽ mitotip koji bi potencijalno mogao da se koristi u tehnici trojanskih ženki mora ispuniti navedene uslove (Gemmell i sar., 2013). Još jedno ograničenje metode podrazumeva da odgovarajući efekat TTŽ mitotipa ne sme zavisiti od jedarne sredine sa kojom je u interakciji, tj. da može biti upotrebljen u kontroli brojnosti različitih populacija ciljne vrste (Gemmell i sar., 2013; Dowling i sar., 2015; Wolff i sar., 2016a). Imajući u vidu da efekat mitotipa i jedarnog genotipa zavisi i od interakcija sa spoljašnjom sredinom, TTŽ mitotip takođe mora ostvarivati svoj sterilišući efekat na mužjake i u različitim uslovima životne sredine (Wolff i sar., 2016a).

Pre nego što je TTŽ teorijski formulisana, vrlo slična metoda predložena je za biokontrolu biljnih invazivnih vrsta. Metoda se zasniva na fenomenu citoplazmatske muške sterilnosti i podrazumeva ubacivanje biljaka sa genom koji izaziva CMS u populacije. Matematičko modelovanje ove metode pokazalo je da može biti veoma efikasna, ali da efekat na brojnost populacija veoma zavisi od biologije vrste i veličine polno antagonističkog efekta CMS mitotipa (Hodgins i sar., 2009).

2. CILJEVI

Glavni cilj ove doktorske disertacije jeste izučavanje fenomena materinske kletve na populacijama pasuljevog žiška (*Acanthoscelides obtectus*, Say). Razrada teorijskih postavki fenomena materinske kletve podrazumeva karakterizaciju polno specifičnih mitohondrijskih haplotipova sa negativnim efektom na mužjake i utvrđivanje njihovog uticaja na respiratornu funkciju mitohondrija i različite osobine životne istorije mužjaka i ženki u varijabilnim genetičkim i sredinskim kontekstima. Pored ispitivanja dejstva mitotipova na nivou jedinke, cilj je i izučiti njihovo dejstvo na populacionom nivou, čime će biti dobijen odgovor na pitanje koliko su pronađeni mitotipovi sa negativnim efektom za mužjake upotrebljivi u tehnici trojanskih ženki, metodi za biokontrolu ekonomski štetnih vrsta.

Radi ostvarivanja opisanih ciljeva, formulisani su specifični ciljevi disertacije:

- Genotipizacija svih mtDNK protein-kodirajućih gena mitohondrijskih laboratorijskih linija radi utvrđivanja postojeće mitotipske varijabilnosti i izbora mitotipa za dalja istraživanja.
- Ispitivanje efekata mitohondrijskih mitotipova na osobine mužjaka i ženki u jednoj varijabilnoj jedarnoj sredini sa kojom mitotipovi nisu koevoluirali.
- Analiza uticaja mitotipova na mitohondrijsku respiratornu funkciju mužjaka u varijabilnoj jedarnoj sredini sa kojom mitotipovi nisu koevoluirali.
- Sakupljanje prirodnih populacija pasuljevog žiška i utvrđivanje njihove genetičke strukture za jedarne (devet mikrosatelitskih lokusa) i mitohondrijske (barkoding region *cox1* gena) markere.
- Procena efekta mitotipova na osobine životne istorije mužjaka i ženki u različitim varijabilnim jedarnim sredinama poreklom iz odabranih prirodnih populacija i u različitim temperaturnim režimima.
- Izračunavanje populaciono-ekoloških parametara rasta populacije i utvrđivanje promene učestalosti alela kroz generacije nakon ubacivanja različitih udela trojanskih ženki u odabranu prirodnu populaciju.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 Osnovne odlike pasuljevog žižaka

Pasuljev žižak (*Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)) je kosmopolitska holometabolna vrsta insekta čiji je domaćin običan pasulj (*Phaseolus vulgaris* L.) ali može da se razvija i na drugim vrstama leguminoznih biljaka. Poreklom je iz današnjeg Meksika, a u Evropi se pojavio krajem XIX veka (Oliveira i sar., 2013). Nakon ukrštanja, ženke polažu jaja oblika zrna pirinča i veličine ~0,7 mm na ili u blizini semena biljke domaćina. Iz jaja posle nekoliko dana izlaze larve I stupnja koje se ubušavaju u zrna domaćina služeći se hitinizovanim mandibulom. U endospermu semena larve prolaze kroz ostale stupnjeve razvika (II-IV larveni stupanj i stupanj lutke). Čitavo larveno razviće traje otprilike mesec dana nakon čega se iz semena izležu adulti koji su fakultativno afagni. Sve funkcije u adultnom stupnju se odvijaju zahvaljujući energetske rezervama sakupljenim u toku larvenog razvika. Mužjaci ove vrste su protandrični, to jest imaju brže larveno razviće u odnosu na ženke. U prva dva sata po izleganju jedinke nisu reproduktivno aktivne. Pol je genetički određen XY sistemom hromozoma. Pored polnih, ova vrsta sadrži još devet pari autozomnih hromozoma (Rozek i sar., 1999). Razlikovanje polova je moguće zahvaljujući tome što ženke na kraju abdomena imaju beličastu šaru koja izostaje kod mužjaka. Ovaj insekt nema kompleksne obrasce ponašanja. Ne postoje rituali udvaranja, već se reproduktivno ponašanje ogleda u tome što mužjaci jure ženku. Kod ove vrste se javlja poliandrija iako su ženke nevoljne da stupe u ponovno ukrštanje prvih par dana nakon reprodukcije. Zbog korišćenja komercijalno bitnih biljnih produkata u svojoj ishrani, pasuljev žižak je ekonomski važna skladišna štetočina (Schmale i sar., 2002).

3.2 Laboratorijske i prirodne populacije

Sve laboratorijske populacije korišćene za izradu ove disertacije nastale su od jedne velike autbredovane, B (engl. *base*) populacije koja je dobijena spajanjem populacija sakupljenih 1983. godine iz tri skladišta pasulja u blizini Beograda (Tucić i sar., 1996). Naime, ona je predstavljala osnivačku populaciju za populacije selektovane za kasni početak reprodukcije, L (engl. *late reproduction*) populacije, od kojih su kasnije konstruisane mitohondrijske linije upotrebljavane u eksperimentima. Naime, za formiranje L populacija korišćen je metodološki pristup eksperimentalne evolucije, jedne od najvažnijih alatki u evolucionim istraživanjima. Eksperimentalna evolucija podrazumeva zadavanje uslova životne sredine u kojima populacije slobodno evoluiraju. Suštinski se razlikuje od veštačke selekcije gde istraživači aktivno biraju jedinke koje će doprineti genofondu naredne generacije (Garland, 2003).

L populacije održavane su pod selekcionim režimom za kasnu reprodukciju više od 250 generacija tako što su u svakoj generaciji izdvajane tek izležene jedinke i držane u epruvetama bez semena pasulja deset dana, nakon čega su stavljene na pasulj. Ovim je obezbeđeno da samo jaja položena nakon desetog dana života učestvuju u formiranju naredne generacije. U opisanom selekcionom režimu prirodna selekcija favorizuje jedinke koje se razvijaju sporije, koje su u kasnijem životnom dobu sposobne za reprodukciju i koje žive duže. Čitava procedura je paralelno obavljana u četiri replike da bi se mogao razgraničiti efekat prirodne selekcije u evoluciji ovih populacija od nasumičnih događaja usled delovanja genetičkog drifta i mutacija.

Prirodne populacije korišćene u eksperimentima sakupljene su od strane građana u okviru projekta građanske nauke „Opasulji se“. Građanska nauka predstavlja uključivanje javnosti u naučni proces, u prikupljanje, analizu i interpretaciju podataka. Naučnicima to omogućava brzo sakupljanje

podataka ili uzoraka sa širokog geografskog područja, dok građani zauzvrat dobijaju uvid i stiču poverenje u tok naučnog rada i metodologije i podiže se naučna pismenost (Brandt i sar., 2022). Građanska nauka kao pristup istraživanjima i dalje je tek u povoju. U okviru projekta „Opasulji se“, građani su učestvovali u pronalaženju i sakupljanju populacija pasuljevog žiška u Srbiji i regionu. Zahvaljujući njihovoj aktivnosti uspešno su sakupljene žive jedinke iz više od 30 populacija ove vrste, kao i veliki broj uzoraka mrtvih jedinki sa više od 120 lokacija koje su mogle biti korišćene za populaciono-genetičke analize. Najveći broj populacija poreklom je iz privatnih bašta. Pristigle populacije izuzetno male brojnosti nisu uključene u analize da bi se izbegao uticaj efekta uskog grla na rezultate populaciono-genetičkih istraživanja. Za potrebe ove teze korišćene su prirodne populacije poreklom iz Požarevca, Dubravice, Golupca, Ševice, Malog Jasenovca, Karbulova, Čapljina, Bele Palanke, Čukovca, Trebešinja, Arandelovca, Lunjevice, Donjih Branetića, Vrčina, Igroša, Srpske Crnje, Banatskog Velikog Sela, Sombora, Pivnica, Đurđeva, Kremne, Borka, Sirogojna, Kokinog Broda, Tekeriša, Mačvanskog Prčinovića, Matijevca, Ravnja, Bogutovačke banje, Ličke Jasenice, Zubinog Potoka i Trebinja (Slika 3.2.1, Tabela S1).



Slika 3.2.1. Mapa Balkana (levo) i Srbije (desno) sa lokalitetima sa kojih su sakupljene populacije pasuljevog žiška. 1 – Požarevac; 2 – Dubravica; 3 – Golubac; 4 – Ševica; 5 – Mali Jasenovac; 6 – Karbulovo; 7 – Čapljina; 8 – Bela Palanka; 9 – Čukovac; 10 – Trebešinja; 11 – Arandelovac; 12 – Lunjevica; 13 – Donji Branetići; 14 – Vrčina; 15 – Igroš; 16 – Srpska Crnja; 17 – Banatsko Veliko Selo; 18 – Sombor; 19 – Pivnice; 20 – Đurđevo; 21 – Kremna; 22 – Borak; 23 – Sirogojno; 24 – Kokin Brod; 25 – Tekeriš; 26 – Mačvanski Prčinović; 27 – Matijevac; 28 – Ravnje; 29 – Bogutovačka banja; 30 – Lička Jasenica (slika levo); 31 – Zubin Potok; 32 – Trebinje (slika levo). Preuzeto i modifikovano sa https://d-maps.com/carte.php?num_car=2070&lang=en i https://d-maps.com/carte.php?num_car=27550&lang=en.

Sve populacije održavane su u mračnim termostatima na konstantnoj temperaturi od 30°C. Kako su adulti fakultativno afagni, osim samih zrna pasulja, nikakva hrana i voda im nisu bili dostupni. Radi izbegavanja kontaminacije, pre prebacivanja na nova semena u svakoj generaciji, pasulj je zamrzavan na -20°C 24 sata čime su ubijeni insekti koji su se potencijalno nalazili u pasulju.

3.2.1 Formiranje mitohondrijskih linija

Da bi se analizirali efekti pojedinačnih mitohondrijskih haplotipova na različite osobine žižaka potrebno je eksprimirati ih naspram jedne, standardizovane jedarne sredine. Iz tog razloga napravljene su mitohondrijske linije (populacije u okviru kojih sve jedinke imaju istu mitohondrijsku DNK) sa drugačijim mitohondrijskim haplotipovima, ali sa istom, varijabilnom jedarnom sredinom. Sve mitohondrijske linije korišćene u eksperimentima poreklom su iz L selekcionog režima.

Pre formiranja linija, napravljena je populacija tzv. dvostrukih hibrida, to jest populacija nastala ukrštanjem četiri replike L populacija i to tako što su prvo ukrštane prva (L_1) i druga (L_2) replika, a sa njima paralelno treća (L_3) i četvrta (L_4), a zatim su hibridi iz ova dva ukrštanja opet ukršteni čime su se dobili dvostruki hibridi ($(L_1 \times L_2) \times (L_3 \times L_4)$). Time je u populacijama dvostrukih hibrida obuhvaćena celokupna genetička varijabilnost L selekcionog režima iz sve četiri replike.

Za konstruisanje mitohondrijskih linija iz populacija dvostrukih hibrida uzeto je 20 neukrštanih ženki i svaka je pojedinačno ukrštena sa pet neukrštanih mužjaka iz iste populacije. Ovim je započeto formiranje 20 mitohondrijskih linija u okviru kojih sve jedinke imaju istu mtDNK s obzirom na to da su poreklom od samo jedne ženke. U narednih 16 generacija, u svakoj generaciji su neukrštanje ženke iz svake mitohondrijske linije parene sa neukrštanim mužjacima iz populacije dvostrukih hibrida čime je osigurana skoro potpuna zamena (99,998%) originalnog jedarnog genoma sa jedarnim genomom koji reprezentuje celokupnu varijabilnost L selekcionog režima. Dodatno, stalnim povratnim ukrštanjima sa mužjacima iz populacije dvostrukih hibrida sprečeno je formiranje i evolucija specifičnih epistatičkih mito-jedarnih interakcija. Sve jedinke korišćenje u ukrštanjima birane su nasumično. Više detalja o formiranju populacija dvostrukih hibrida i mitohondrijskih linija može se naći u Đorđević i sar. (2015).

3.2.2 *Wolbachia*

Za mnogobrojne vrste insekata karakteristična je infekcija bakterijama kao što je *Wolbachia*, intracelularni patogen koji se prenosi preko majki citoplazmom jajne ćelije zajedno sa mitohondrijama. Ova bakterija utiče na reproduktivni potencijal svojih gomačina (Werren i sar., 2008) kao i na druge osobine životne istorije poput dužine života (Driver i sar., 2004). Zbog ove specifičnosti, kao i zbog matrilinearnog načina prenošenja ovog patogena, postojanje infekcije bi onemogućilo tumačenje rezultata eksperimenata koji za cilj imaju da odrede efekat mitohondrija na različite osobine organizama. Stoga je pre početka eksperimenata urađen test identifikacije prisustva *Wolbachia* u svim mitohondrijskim linijama i prirodnim populacijama korišćenim u toku izrade ove doktorske disertacije. Test je predstavljala identifikacija postojanja *ftsZ* gena karakterističnog za *Wolbachia* u uzorcima insekata korišćenjem *ftsZ*_{unif}/*ftsZ*_{nir} prajmera koji mogu da detektuju i male količine *Wolbachia* i čije su sekvence 5'-GGYAARGGTGCRGCAGAAGA-3' (*ftsZ*_{unif}) i 5'-ATCRATRCCAGTTGCAAG-3' (*ftsZ*_{nir}) (Lo i sar., 2002).

PCR smeša za amplifikaciju ovog gena data je u Tabeli 3.2.2.1. Kao pozitivna kontrola korišćen je uzorak insekta *Microplontus milefolii* koji je inficiran ovim patogenom. Na svakih deset uzoraka dodavana je negativna kontrola koja je sadržala sve elemente PCR smeše kao i uzorci sa izuzetkom DNK umesto koje je stavljena molekulska voda. Termalni protokol PCR reakcije se sastojao iz inicijalne denaturacije na 94°C 2 minuta a zatim su se u 37 ciklusa ponavljali denaturacija na 94°C 30 sekundi, hibridizacija prajmera na 56°C 1 minut i elongacija na 72°C 1 minut i 30 sekundi. Konačno, finalna elongacija vršena je na 72°C 10 minuta.

Tabela 3.2.2.1. PCR smeša za reakciju umnožavanja *ftsZ* gena za određivanje prisustva *Wolbachia*.

Sastojak	Koncentracija u štoku	Finalna koncentracija	Količina za 20 µl PCR miksa
----------	-----------------------	-----------------------	-----------------------------

H ₂ O			11,65 µl
Pufer	10×	1× 1,5 mM MgCl ₂	2 µl
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	2 µl
dNTPs	10 mM	0,8 mM	1,6 µl
F	10 µM	0,4 µM	0,8 µl
R	10 µM	0,4 µM	0,8 µl
Taq poli.	5 U/µl	0,375 U/µl	0,15 µl
DNK			1 µl

3.3 Određivanje mitohondrijske i jedarne genetičke varijabilnosti

3.3.1 Ekstrakcija DNK

Ekstrakcija mitohondrijske i jedarne DNK vršena je po TES (TRIS-EDTA-SDS) protokolu (Rees i sar., 2001). Najpre su pojedinačni insekti punktirani sterilnom medicinskom iglom u predelu torakalnog segmenta i stavljeni u 0,4 ml TES pufera za ekstrakciju (20 mM TRIS, 10 mM EDTA, 0,5% SDS) sa proteinazom K (200 µg/ml). Uzorci su inkubirani oko 16 sati na 56°C. Pufer je zatim prebačen u novu tubicu i dodato je 400 µl hloroforma. Uzorci su centrifugirani 10 minuta na 11.000 obrtaja na 4°C nakon čega je supernatant prebačen u novu tubicu i prethodni korak je ponovljen. Supernatant je ponovo izdvojen i dodato mu je 400 µl ledeno hladnog izopropanola, nakon čega su uzorci centrifugirani na 12.000 obrtaja pola sata na 4°C. U ovom koraku DNK se taloži na dnu tubice, te je tečna faza odlivena a talog ispran sa 1.000 µl ledeno hladnog etanola. Nakon ispiranja, talog je rastvoren u 50 µl TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6) i nakon rastvaranja u frižideru preko noći ekstrahovana DNK čuvana je na -20°C.

3.3.2. Umnožavanje mitohondrijskih gena

Barkoding region *cox1* gena umnožen je korišćenjem modifikovanih LCO1490/HCO2198 prajmera iz Folmer i sar. (1994) (Tabela 3.3.2.1). Ovaj region predstavlja sekvencu dužine 709 bp (baznih parova) sa prajmerima i mahom se koristi za utvrđivanje interspecijske varijabilnosti kod insekata (Hebert i sar., 2003, Hebert i sar., 2004). Analiza varijabilnosti barkoding regiona urađena je za sve korišćene prirodne populacije.

Preostali mitohondrijski protein-kodirajući geni umnoženi su korišćenjem prajmera prema Simon i sar., (2006), modifikovanim za pasuljevog žiška (Tabela 3.3.2.1). Analiza varijabilnosti barkoding regiona i ostalih mitohondrijskih protein-kodirajućih gena urađena je za mitohondrijske linije korišćene u izradi ove disertacije. U prvoj fazi molekulske karakterizacije linija, urađena je analiza osam mitohondrijskih protein-kodirajućih gena (*cox1*, *cox3*, *nad4*, *nad4l*, *nad6*, *cytb*, *nad1* i *cox2*) za svih 20 mitohondrijskih linija. U drugoj fazi, za odabrane tri mitohondrijske linije dodatno je genotipizirano preostalih pet protein-kodirajućih gena u mitohondrijskom genomu (*nad2*, *nad3*, *nad5*, *atp6* i *atp8*).

Sve reakcije amplifikacije rađene su u zapremini od 40 µl. PCR smeše korišćene pri amplifikaciji ovih regiona date su u Tabelama 3.3.2.2-3.3.2.5. Za sve reakcije umnožavanja korišćena je FastGene Taq polimeraza (NIPPON Genetics Europe). Za većinu reakcija upotrebljen je High Yield Reaction Buffer A, dok je za amplifikaciju *nad2*, *nad3* i *nad5* korišćen High Sensitive Reaction Buffer B. U smešu je dodavano 2 µl ekstrahovane DNK. Negativna kontrola stavljana je posle svakih deset uzoraka i sadržala je identične sastojke kao PCR smeša sa izuzetkom DNK, umesto koje je stavljana molekulska voda u istoj zapremini. Kao pozitivna kontrola korišćeni su uzorci koji su u prethodnim istraživanjima bili

uspešno umnožavani. Za PCR reakcije korišćeni su Mastercycler ep gradient S (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i GeneExplorer BYQ6631E (Hangzhou Bioer Technology, Kina) aparati. Inicijalna denaturacija vršena je na 95°C 5 minuta, zatim su se denaturacija na 95°C 1 minut, hibridizacija prajmera na 54°C 1 minut i elongacija na 72°C 1 minut i 30 sekundi ponavljali u 35 ciklusa. Na kraju, finalna elongacija vršena je na 72°C 7 minuta. Za amplifikaciju *nad2*, *nad3*, *nad5* i *atp8-atp6* regiona temperatura hibridizacije bila je 50°C, dok je za *nad4l-nad6* bila 52°C.

Tabela 3.3.2.1. Prajmeri korišćeni za određivanje sekvenci mitohondrijskih protein-kodirajućih gena.

Ciljani region		Prajmer	Sekvenca prajmera (5'-3')	Dužina (bp)	
Gen	Protein			PCR amplikon	Sekvenca gena
<i>cox1</i>	citohrom c oksidaza subjedinica 1	F: LCO1490-Ao R: HCO2198-Ao	TCTCTACGAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCAGGGTGGCCAAAAAATCA	709 bp	657 bp
<i>cox3</i>	citohrom c oksidaza subjedinica 3	F: C3-J4792-Ao R: C3-N5460-Ao	TAGATGTAAGACCCTGACC TCTACAAAATGYCAGTATCA	706 bp	621 bp
<i>nad4</i>	NADH dehidrogenaza subjedinica 4	F: N4-J8641-Ao R: N4-N9153-Ao	CCTGATGAACACAAACCATG TGAGGCTATCAACCAGAGCG	545 bp	474 bp
<i>cytb</i>	citohrom b	F: CB-J10933-Ao R: CB-N11526-Ao	GTTCTCCCCTGAGGGCAAATATC TTCTACAGGGCGTGCTCCAATTCA	639 bp	576 bp
<i>nad1</i>	NADH dehidrogenaza subjedinica 1	F: N1-J11876-Ao R: N1-N12595-Ao	CGAGGTAAAGTTCCCCGAACCCA GTGGCCTTTTTGACTTTATTAGAGCG	767 bp	678 bp
<i>nad4l</i> & <i>nad6</i>	NADH dehidrogenaza subjedinica 4L & NADH dehidrogenaza subjedinica 6	F: N4L-J9648-Ao R: CB-N10608-Ao	ACCTAGTACACCCTCACAAAC CCTAAAAGGGATCCAAAATTTCA	972 bp	153 bp <i>nad4l</i> & 509 bp <i>nad6</i>
<i>cox2</i>	citohrom c oksidaza subjedinica 2	F: TL2-J-3033-Ao R: TK-N-3782-Ao	TCTAATATGGCAGAGTAGTGCA AAGTTCATTGCTTACTTTCAGCCATCT	784 bp	688 bp
<i>nad2</i>	NADH dehidrogenaza subjedinica 2	F: TM-J210-Ao R: N2-N993-Ao	AATAAAGCTATTGGGTTTCATACCC GGAAGAAATCCTAAGAAAGGAGG	1011 bp	657 bp
<i>nad3</i>	NADH dehidrogenaza subjedinica 3	F: C3-J5470-Ao R: TN-N6160-Ao	GCTGCCGCTTGATACTGACA TCAATTTGATCATTAAACAGTGA	753 bp	354 bp
<i>nad5</i>	NADH dehidrogenaza subjedinica 5	F: N5-J7077-Ao R: N5-N7793-Ao	CTAAATCTTTAGAATAAAACCC TTAGGCTGAGATGGTTTAGG	754 bp	668 bp
<i>atp8</i> & <i>atp6</i>	ATP sintaza F0 subjedinica 8 & ATP sintaza F0 subjedinica 6	F: TK-J3790-Ao R: A6-N4552-Ao	CATTAGATGGCTGAAAGTAAGCA ATGGCCAGCGATTATATTAGC	795 bp	156 bp <i>atp8</i> & 488 bp <i>atp6</i>

Tabela 3.3.2.2. PCR smeša za amplifikaciju barkoding regiona *cox1* gena.

Sastojak	Koncentracija u štoku	Finalna koncentracija	Količina za 20 µl PCR miksa
H ₂ O			12,8 µl
Pufer	10×	1 × 1,5 mM MgCl ₂	2 µl
MgCl ₂	25 mM	1 mM	0,8 µl
dNTPs	10 mM	0,6 mM	1,2 µl
F	10 µM	0,5 µM	1 µl
R	10 µM	0,5 µM	1 µl
Taq poli.	5 U/µl	0,05 U/µl	0,2 µl

Tabela 3.3.2.3. PCR smeša za amplifikaciju *cox2*, *nad2* i *nad4l-nad6* genskih regiona.

Sastojak	Koncentracija u štoku	Finalna koncentracija	Količina za 20 µl PCR miksa
H ₂ O			10,8 µl
Pufer	10×	1 × 1,5 mM MgCl ₂	2 µl
MgCl ₂	25 mM	3,5 mM	2,8 µl
dNTPs	10 mM	0,6 mM	1,2 µl
F	10 µM	0,5 µM	1 µl
R	10 µM	0,5 µM	1 µl
Taq poli.	5 U/µl	0,05 U/µl	0,2 µl

Tabela 3.3.2.4. PCR smeša za amplifikaciju *atp6-atp8* genskog regiona.

Sastojak	Koncentracija u štoku	Finalna koncentracija	Količina za 20 µl PCR miksa
H ₂ O			11,8 µl
Pufer	10×	1 × 1,5 mM MgCl ₂	2 µl
MgCl ₂	25 mM	2,25 mM	1,8 µl
dNTPs	10 mM	0,6 mM	1,2 µl
F	10 µM	0,5 µM	1 µl
R	10 µM	0,5 µM	1 µl
Taq poli.	5 U/µl	0,05 U/µl	0,2 µl

Tabela 3.3.2.5. PCR smeša za amplifikaciju *cox3*, *cytb*, *nad1*, *nad3*, *nad4* i *nad5* gena.

Sastojak	Koncentracija u štoku	Finalna koncentracija	Količina za 20 µl PCR miksa
H ₂ O			12,4 µl
Pufer	10×	1 × 1,5 mM MgCl ₂	2 µl
MgCl ₂	25 mM	1,5 mM	1,2 µl
dNTPs	10 mM	0,6 mM	1,2 µl
F	10 µM	0,5 µM	1 µl
R	10 µM	0,5 µM	1 µl
Taq poli.	5 U/µl	0,05 U/µl	0,2 µl

Za proveru uspešnosti umnožavanja 1% agarozni gel sa interkalirajućom bojom DNA Stain G (Serva) i nalivenim uzorcima slikan je pod UV lampom. Koncentracija i veličina PCR produkta su određeni poređenjem sa markerom DNA 100 bp DNA ladder (SERVA). Uspešno umnoženi uzorci su poslani na sekvenciranje Sangerovom metodom u komercijalnu firmu (Macrogen Europe, Amsterdam, Holandija).

Za proveru kvaliteta dobijenih sekvenci korišćen je FinchTV softver (razvijen od strane Geospiza, Inc). MEGA 5.0 program (Tamura i sar., 2011) upotrebljen je za poravnanje sekvenci (pomoću implementiranog CLUSTAL W programa (Thompson i sar., 1994)), identifikovanje specifičnosti različitih haplotipova i računanje parametara mitohondrijskog diverziteta. Za računanje parnih distanci između mitotipova izabrani su najverodostojniji modeli nukleotidne supstitucije na osnovu veličine

Bajesovog informacionog kriterijuma. Sve sekvence su BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) analizom poravnate i upoređene sa dostupnim sekvencama odgovarajućih gena ove vrste u NCBI bazi.

Intraspecijska varijabilnost haplotipova i njihovi odnosi najbolje se prikazuju haplotipskim mrežama. TCS haplotipske mreže mitohondrijskih mitotipova konstruisane su u programu PopART v1.7 (Leigh i Bryant, 2015). Haplotipski odnosi su izračunati metodom statističke parsimonije (Templeton i sar., 1992) sa 95% intervalima poverenja.

Da bi se odredila haplotipska varijabilnost na različitim hijerarhijskim nivoima populacione strukture prirodnih populacija, upotrebljena je analiza molekulске varijanse (AMOVA) u programu Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer, 2010). Populacije poreklom sa svih lokaliteta opisanih u Tabeli S1 i prikazanih na Slici 3.2.1 grupisane su na sledeće načine: prema regionu Srbije kom pripadaju, prema rekama kao geografskim barijerama i prema tome da li pripadaju regionu u koji je u 16. veku pasulj stigao iz drugih delova tadašnje Austrougarske ili iz Turske (Otomanskog carstva) (Bellucci i sar., 2023) (podela na Vojvodinu i ostatak Srbije). Konačno, testirana je i hipoteza da nema viših nivoa hijerarhijske organizacije populacija. Da bi se izmerila diferencijacija pojedinačnih populacija, u istom programu izračunate su i parne vrednosti indeksa fiksacije (F_{ST}). F_{ST} može imati vrednosti od 0 (nema diferencijacije između populacija) do 1 (potpuna divergencija između populacija). U nekim slučajevima se mogu dobiti i negativne vrednosti koje se tumače kao 0.

3.3.3 Analiza varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa prirodnih populacija pasuljevog žiška

Mikrosateliti ili SSR (engl. *simple sequence repeat*) sekvence su lokusi u okviru kojih se aleli razlikuju u broju ponovaka određenih motiva dužine 1-6 bp (Ellegren, 2004). Zbog visoke varijabilnosti, mikrosateliti su široko korišćeni za opisivanje genetičke strukture populacije (Sunnucks, 2000). Za potrebe izrade ove disertacije korišćeno je devet mikrosatelitskih lokusa, *AcobtC12*, *AcobD04*, *AcobD06*, *AcobE01*, *AcobE04*, *AcobE07*, *AcobF01*, *AcobF09* i *AcobG08* (Alvarez i sar., 2004; Duan i sar., 2017), čije su karakteristike i prajmeri korišćeni za njihovo umnožavanje dati u Tabeli 3.3.3.1. Amplifikacija je rađena u multipleks reakcijama i to: *AcobD04*, *AcobD06*, *AcobE01* i *AcobE04* u multipleksu 1, *AcobE07* i *AcobF09* u multipleksu 2, *AcobC12* i *AcobG08* u multipleksu 3, dok se *AcobF01* umnožavao samostalno zbog specifične temperature hibridizacije. Smeše za PCR reakciju date su u Tabeli 3.3.3.2. Temperaturni protokol za amplifikaciju uključivao je inicijalnu denaturaciju na 95°C 10 minuta, zatim su se denaturacija na 94°C 30 sekundi, hibridizacija prajmera na 52°C (odnosno 57°C u slučaju *AcobF01*) 1 minut i 30 sekundi i elongacija na 72°C 1 minut ponavljali u 30 ciklusa. Na kraju, finalna elongacija vršena je na 72°C 10 minuta. Za sve reakcije korišćen je GeneExplorer BYQ6631E (Hangzhou Bioer Technology, Kina) aparat.

Tabela 3.3.3.1. Karakteristike mikrosatelitskih (SSR) lokusa i prajmera korišćenih za određivanje genetičkog diverziteta. SSR motiv – sekvenca koja se ponavlja u datom lokusu; boja – boja fluorofore kojom su obeleženi reverzni prajmeri na 5' kraju; T_a – temperatura hibridizacije prajmera.

SSR lokus	SSR motiv	Prajmeri (5'-3')	Dužina (bp)	Boja	T_a (°C)
AcobtC12	(TG) _x	F: GATCCTCTGATGCTACATTTGGTC R: GAGCACGAGCACACGCA	288-540	HEX	52
AcobD04	(AC) _x GC(AC) _x	F: CAGAAACAATTTGCACGAC R: CGGCTGAGACTATGAATCTG	178	6-FAM	52
AcobD06	(TG) _x C(TG) _x	F: ATTTACTGTCCTCGTTGTCG R: ATGCTTATCCGTTCTACTGC	346-350	HEX	52
AcobE01	(AC) _x (AT) _x AC(AT) _x (AC) _x AT(AG) _x	F: ATTTACTTAACCAACAATACG R: GCTCCTTGAACCTTCTAC	138-158	NED	52
AcobE04	(AT) _x (AC) _x C(CA) _x AAT(AC) _x (AT) _x (AC) _x ATAC(AT) _x AC(AT) _x (AC) _x CCGC(AC) _x	F: ACAGTGATGTTAAATAAAAA R: GGTTAGAGATAGGTTGAGTA	264-382	PET	52
AcobE07	(AG) _x	F: ACACAGTCATGATGACAGC	103-137	HEX	52

		R: AAGTAGAAAATGACGACGAC			
AcobtF01	(GT) _x	F: CATAAGGATATTGATTTCGTC R: TGTTCACAATTCACAGC	236	HEX	57
AcobtF09	(CA) _x	F: AGCAGACGACAAGCAGCACAC R: CGAGCCGCATACGCATTG	143-159	6-FAM	52
AcobtG08	(GT) _x	F: GGTGGAGGGACCGCACAC R: CCTTCGGAAATCGTGGATACCC	366	6-FAM	52

Tabela 3.3.3.2. Smeša za multipleks PCR. Sve hemikalije su iz Qiagen Multiplex PCR kita. MMM – Multiplex PCR Master Mix.

Sastojak	Koncentracija u štoku	Finalna koncentracija	Količina za 10 µl PCR miksa
H ₂ O			ostatak zapremine
MMM	2×	1× 1,5 mM MgCl ₂	2 µl
Q solution	1×	1,5 mM	1,2 µl
prajmeri	12,8 µM	0,32 µM	0,25 µl × x
DNK		5 ng	1 µl

Nakon amplifikacije, umnožena DNK je denaturisana dodavanjem formamida a zatim inkubiranjem na 94°C pet minuta i na ledu pet minuta. Potom su dužine fragmenata određene na automatskom sekvenatoru ABI Prsim 3130 (Applied Biosystems) poređenjem sa standardom za dužinu. Analiza dužine fragmenata i genotipizacija vršeni su u GeneMapper 6 (Applied Biosystems) softveru. Lokusi *AcobD04*, *AcobtF01* i *AcobtG08* su se pokazali kao monomorfni te su isključeni iz daljih analiza.

Analiza strukturiranosti prirodnih populacija na novu jedarnog genoma korišćenjem rezultata varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa urađena je u programu STRUCTURE v2.3.2 koji koristi metodu Bajesovog grupisanja (Pritchard i sar., 2000; Falush i sar., 2003). Ovaj program korišćen je da bi se utvrdio najverovatniji broj genetičkih klastera (K) bez prethodno postavljene hipoteze. Korišćen je model mešovitog porekla, koji podrazumeva da svaka individua može pripadati bilo kom genetičkom klasteru, i naznačeno je da su učestalosti alela između populacija korelisane. Ovakva podešavanja se koriste ukoliko očekujemo da populacije nisu snažno diferencirane i da barem u nekoj meri dolazi do njihovog mešanja i prikladna su za detekciju malih nivoa diferenciranosti populacija. Analiza je rađena 20 puta za svako K sa 50.000 *burn-in* perioda i 200.000 MCMC (Markovljev lanac Monte Karlo) iteracija. Rezultati su importovani u Structure Selector internet softver (Li i Liu, 2018) kojim je određen najverovatniji broj K Evanovom metodom na osnovu proračuna za ΔK (Evanno i sar., 2005), dok je za konstruisanje histograma za prikaz genetičkih klastera korišćen CLUMPAK (Kopelman i sar., 2015) softver integrisan u Structure Selector.

Analiza molekulske varijanse (AMOVA) i računanje parnih vrednosti F_{ST} rađeni su u programu Arlequin 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer, 2010) na isti način kao i za mitohondrijske haplotipove. Dodatno, u istom softveru izračunati su i parametri genetičke varijabilnosti prirodnih populacija za šest mikrosatelitskih lokusa: prosečan broj alela po lokusu (n_A), prosečna dobijena heterozigotnost (H_D), prosečna očekivana heterozigotnost (H_O) i indeks fiksacije unutar populacija (F_{IS}).

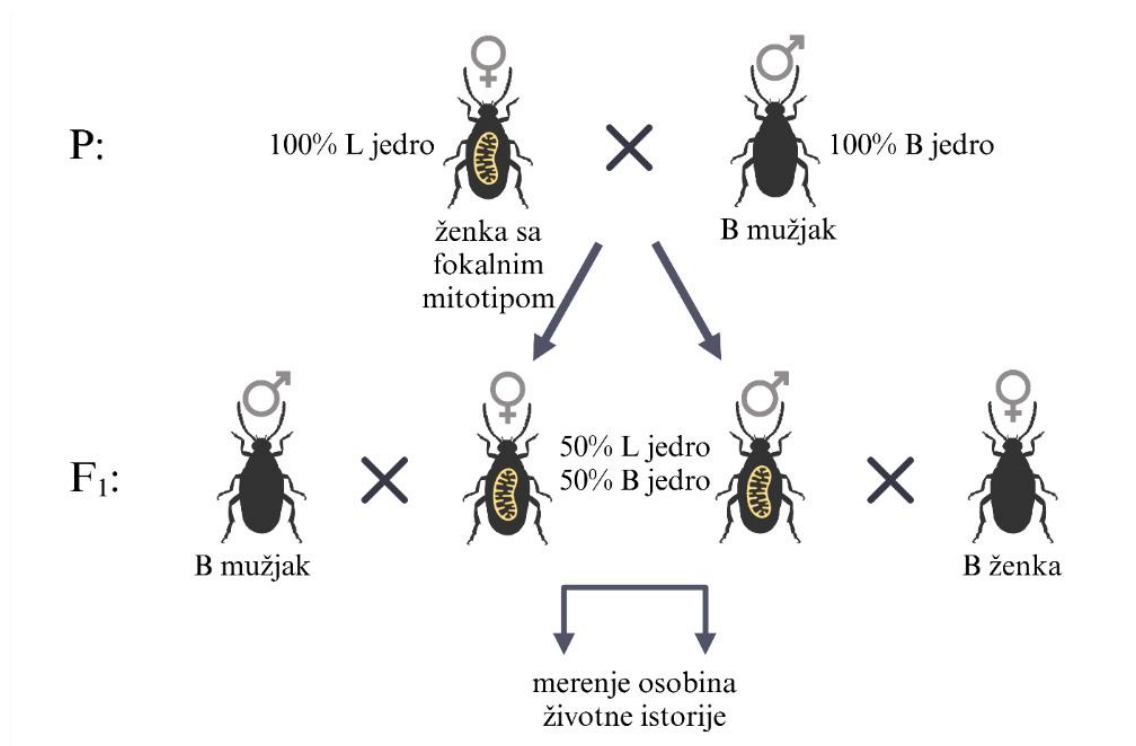
3.4. Određivanje efekta mitohondrijskih haplotipova na osobine životne istorije

Najvažniji cilj ove disertacije bio je da se odrede efekti različitih mitotipova na osobine životne istorije mužjaka i ženki i da se potencijalno identifikuje kandidat TTŽ mitotip. Da bi se ispitao efekat mitotipa poreklom iz neke od formiranih mitohondrijskih linija najpre je potrebno narušiti jedarnu sredinu u kojoj je mitotip eksprimiran. Razlog tome je taj što je moguće da se su u mitohondrijskim linijama evoluirale kompenzacione mutacije u jedarnom genomu koje maskiraju efekat mitotipova. Stoga su ženke iz specifičnih mitohondrijskih linija ukrštane sa mužjacima iz osnivačke, B populacije čime su mito-jedarne interakcije u F_1 potomstvu delimično narušene. Za formiranje F_1 generacije uzeto je ~30

neukrštanih ženki iz specifične mitohondrijske linije i spareno sa ~30 neukrštanih B mužjaka. Njihovi sinovi i kćerke imali su 50% jedra iz L jedarne sredine i 50% jedra iz B jedarne sredine i korišćeni su kao fokalne jedinice za eksperimente (Slika 3.4.1). Neukrštane ženke i mužjaci izdvajani su tako što se nakon početka izleganja sve jedinice izašle iz semena odstrane sa pasulja, a potom se pasulj pregleda na svaka dva sata. Sve izlegle jedinice u tom periodu se razdvajaju po polovima i čuvaju zasebno u staklenim epruvetama bez semena pasulja. Kako u prva dva sata nakon izleganja žišci nisu reproduktivno aktivni, ovim je zagarantovano izdvajanje neukrštanih jedinki.

Razlog zašto su u ovom, ali i ostalim eksperimentima ove disertacije, korišćene vrlo varijabilne jedarne sredine jeste taj što je cilj bio ispitati efekat mitotipa i njegovih različitih interakcija koje se mogu javiti pri njegovom ekspiriranju u nehomogenoj sredini. U slučaju ispitivanja mitotipa u inbredovanoj, homozigotizovanoj jedarnoj sredini dobila bi se informacija samo o efektu veoma specifičnih interakcija koji mitotip ostvaruje sa malim brojem alela u takvoj jedarnoj sredini. Dizajnom primenjenim u ovom istraživanju omogućavamo ispoljavanje mitohondrijskih haplotipova u punoj varijabilnosti neke jedarne sredine i samim tim dobijanje pune slike uticaja koji dati mitotip ima u ispitivanoj jedarnoj sredini.

Sve mitohondrijske linije bile su zastupljene u barem dve nezavisne replike (osnovane su od strane različitih ženki koje su nosile identičan mitotip). Korišćenjem replika omogućeno je da se razluči stvarni efekat mitohondrijskog haplotipa od efekta specifičnih epistatičkih interakcija koje su se potencijalno javile unutar pojedinačnih replika u toku održavanja ovih populacija (Dowling i Wolff, 2023). Jedini izuzetak je prvi eksperiment u kome je ispitivan efekat šest mitotipova na preadultne osobine životne istorije, gde je mitotip MG1c rađen u samo jednoj replici.



Slika 3.4.1. Shema eksperimentalnog dizajna za određivanje efekta mitohondrijskih haplotipova na osobine životne istorije pasuljevog žiška. L – populacija u L selekcionom režimu. B – osnivačka populacija. Žutom mitohondrijom predstavljen je fokalni mitotip.

3.4.1. Pilot eksperiment – ispitivanje uticaja šest laboratorijskih mitotipova na osobine životne istorije

Prvi eksperiment urađen u okviru ove disertacije bio je pilot eksperiment koji je za cilj imao da utvrdi da li neki od pronađenih laboratorijskih mitotipova ima potencijalan polno specifičan negativan efekat na mužjake. Konkretno, cilj je bio da se na osnovu ovog eksperimenta odredi potencijalni kandidat TTŽ mitotip i kontrolni mitotipovi na kojima će se raditi detaljnije analize.

Za ovaj pregled efekata mitohondrijskih haplotipova na osobine životne istorije pasuljevog žiška korišćeno je šest mitohondrijskih linija (MG1a, MG1b, MG1c, MG1d, MG3a i MG3b) (o karakterizaciji ovih linija biće više reči u odeljku Rezultati). Mužjacima i ženka ovih mitotipova u narušenim jedarnim sredinama (Slika 3.4.1) testirani su vijabilitet kao preadultna osobina životne istorije i totalni fekunditet i dužina života kao adultne osobine.

3.4.1.1 Testiranje preadultnog vijabiliteta

Za svaku liniju i pol, nakon ukrštanja sa B mužjacima, iz F₁ generacije uzeto je ~150 jedinki starih jedan dan i stavljene su u Petri šolju dijametra 9 cm sa nekoliko zrna pasulja da bi se podstakla ovipozicija. Jaja su svaki dan odstranjivana iz Petri šolje, prebrojavana i ~100 jaja je stavljano u nove Petri šolje napunjene zrnima pasulja. Na taj način je napravljeno u proseku oko 20 šolja po mitotipu po polu (ukupno 264). Nakon mesec dana prebrojan je broj svih adulata koji se izlegli iz zrna pasulja. **Vijabilitet** je računat kao odnos broja izleženih adulata i broja postavljenih jaja po Petri šolji.

3.4.1.2 Testiranje totalnog fekunditeta i dužine života

Za procenu adultnih osobina životne istorije nakon ukrštanja sa B mužjacima za svaku repliku, iz F₁ generacije uzeti su neukršćani mužjaci i ženke i spareni sa B jedinkama (Slika 3.4.1). Pojedinačni parovi su stavljeni u Petri šolje dijametra 5 cm sa po jednim zrnom pasulja. Broj položenih jaja je utvrđivan svaki dan nakon čega su sva jaja odbacivana. Na taj način je dobijena informacija o dinamici polaganja jaja. Jedinke su praćene svakodnevno dok i mužjak i ženka nisu uginuli. Za svaki mitotip napravljeno je ~90 parova po polu (ukupno 1097 parova).

Totalni fekunditet računat je kao ukupan broj položenih jaja, dok **dužina života** predstavlja vreme proteklo od izlaska jedinke iz zrna pasulja do njene smrti (u danima). S obzirom na to navedene adultne osobine životne istorije pozitivno korelišu sa masom jedinki, jedinke su izmerene odmah po izlasku iz pasulja na analitičkoj vagi.

Na osnovu podataka iz ovog eksperimenta (Slika 4), od šest mitohondrijskih haplotipova odabrana su tri koji će se koristiti u daljim analizama: MG3b koji dovodi do pada vijabiliteta i totalnog fekunditeta kod mužjaka u odnosu na mužjake drugih mitotipova, a nema negativan efekat na dužinu života mužjaka niti na osobine životne istorije ženki, i MG1a i MG1d, tzv. kontrolni mitotipovi, koji nemaju negativan efekat ni na mužjake ni na ženke.

3.4.2 Ispitivanje efekta kandidat TTŽ mitotipa i kontrolnih mitotipova na adultne osobine životne istorije

Efekat tri izabrana mitotipa (MG1a, MG1d, MG3b), zastupljena u po dve replike, na adultne osobine životne istorije pasuljevog žiška ispitan je u zasebnom eksperimentu sa većom veličinom uzorka pojedinačnih mitotipova u odnosu na pilot eksperiment.

3.4.2.1 Testiranje ranog i totalnog fekunditeta i dužine života

Eksperimentalni protokol za analizu fekunditeta i dužine života bio je u potpunosti identičan pilot eksperimentu. Za svaku repliku napravljeno je ~60 parova po polu (3 mitotipa $\times$ 2 replike $\times$ 2 pola $\times$ ~60 parova = ~720 parova).

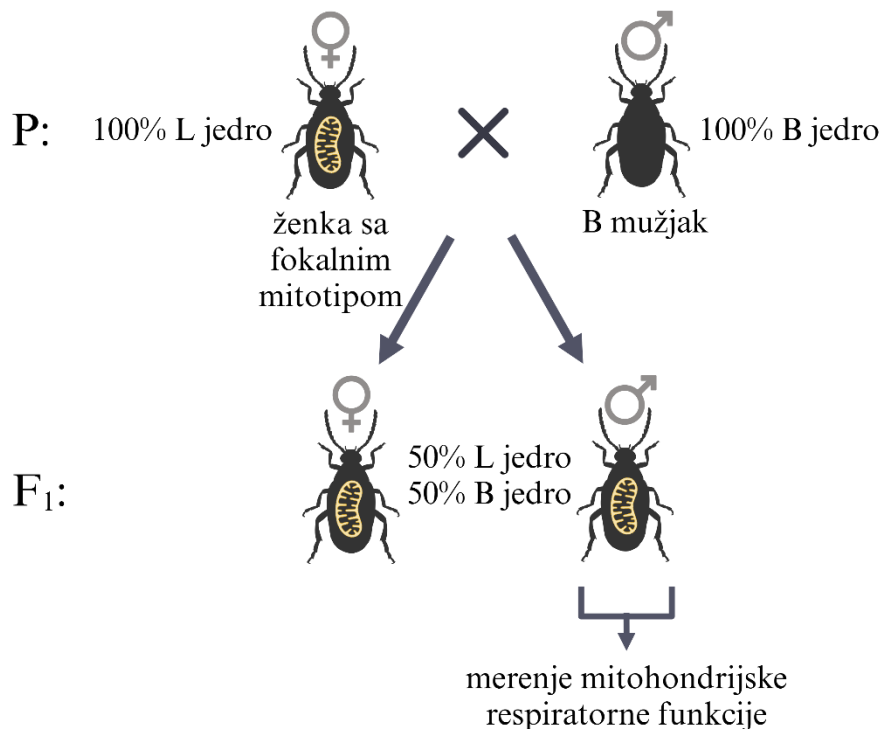
Rani fekunditet je procenjen kao broj jaja položen u prva dva dana života, dok su se **totalni fekunditet** i **dužina života** računali kao i u prethodnom eksperimentu.

3.4.2.2 Testiranje fertiliteta

Za merenje efekta mitotipova na fertilitet, nakon ukrštanja jedinki iz svake replike sa B mužjacima, uzete su F₁ kćerke i sinovi i ukršteni su sa B jedinkama. Pojedinačni parovi smešteni su u Petri šolje dijametra 5 cm napunjene zrnima pasulja. Za svaku repliku napravljeno je 60 parova po polu (3 mitotipa $\times$ 2 replike $\times$ 2 pola $\times$ 60 parova = 720 parova). **Fertilitet** je računat kao ukupan broj jedinki koji se izlegao iz svake Petri šolje.

3.5 Određivanje mitohondrijske funkcije kandidat TTŽ mitotipa i kontrolnih mitotipova

Ispitivanje efekta mitohondrijskog haplotipa na mitohondrijsku respiratornu funkciju kod mužjaka pasuljevog žiška predstavlja treći cilj ove disertacije. Kao i u prethodnom eksperimentu, i u ovom slučaju je neophodno narušiti varijabilnu jedarnu sredinu u kojoj se eksprimiraju ispitivani mitotipovi. Dakle, u eksperimentu je korišćeno muško potomstvo iz ukrštanja ženke sa fokalnim mitotipom i koevoluiranom L jedarnom sredinom i mužjaka sa B jedarnom sredinom (Slika 3.5.1).



Slika 3.5.1. Shema eksperimentalnog dizajna za određivanje efekta mitohondrijskih haplotipova na mitohondrijsku respiratornu funkciju. L – populacija u L selekcionom režimu. B – osnivačka populacija. Žutom mitohondrijom predstavljen je fokalni mitotip.

3.5.1 Merenje mitohondrijske respiracije

Mitohondrijska respiracija merena je metodom respirometrije visoke rezolucije korišćenjem OROBOROS Oxygraph-2k (OROBOROS Instruments Inc., Innsbruck, Austrija) aparata. Ovaj aparat meri stopu potrošnje (fluks) kiseonika od strane biološkog uzorka. Kiseonik se u uzorku troši kao posledica aktivnosti elektron transportnog lanca (ETL) na unutrašnjoj membrani mitohondrija koji prenosi elektrone sa donora elektrona na kiseonik redukujući ga do vode. Dakle, stopa potrošnje kiseonika, to jest respiracije zavisi od toga koliko su efikasni kompleksi koji primaju elektrone od supstrata (kompleks I koji prima elektrone od NADH i kompleks II koji prima elektrone od sukcinata), kao i od nivoa aktivnosti kompleksa III i IV koji dalje te elektrone prenose. Dodatno, kiseonik se u uzorku troši i na račun oksidacije molekula koja nije spregnuta sa procesom transporta elektrona u ETL. Primenom titracije supstrata i inhibitora kompleksa elektron transportnog lanca u ovom eksperimentu bilo je moguće odrediti vrednosti respiracije vezanu za komplekse I, II i IV.

3.5.1.1 Priprema uzoraka

Neukršteni mužjaci stari jedan dan su stavljeni u frižider na 4°C na pet minuta da bi se umirili radi preciznog merenja na analitičkoj vagi. Nakon toga su zasebno stavljeni u tubicu sa 200 µl ledeno hladnog medijuma za mitohondrijsku respiraciju 05 (MiR05; 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl₂•6H₂O, 60 mM K-laktobionska kiselina, 20 mM taurin, 10 mM KH₂PO₄, 20 mM HEPES, 110 mM saharoza i 1 g/L BSA bez masnih kiselina, pH = 7,1) a zatim homogenizovani na ledu sa pet kružnih pokreta štapićem za homogenizaciju.

3.5.1.2 Protokol za merenje mitohondrijske respiracije

U komore aparata dodato je 200 µl homogenata uz pažnju da se ne ubace komadići hitina. Respiracija izmerena nakon dodavanja homogenata posledica je pozadinskih procesa oksidacije. Zatim su Hamiltonovim špricovima titrirani supstrati i inhibitori:

a) 5 mM piruvat, 10 mM malat i 10 mM glutamat – supstrati za kompleks I. U ovom slučaju još nema ADP-a, te se sva potrošnja kiseonika vrši na račun curenja protona kroz unutrašnju mitohondrijsku membranu u mitohondrijski matriks, to jest nije spregnuta sa sintezom ATP-a.

b) 2,5 mM ADP (+ 1,5 mM MgCl₂) – kada se doda ADP kreće oksidativna fosforilacija. U ovom stadijumu elektroni u ETL ulaze samo kroz kompleks I, te je fluks kiseonika zavisen od aktivnosti ovog kompleksa.

c) 10 µM citohrom c – ovaj korak se radi da bi se proverila intaktnost spoljašnje mitohondrijske membrane. Citohrom c dovodi do porasta potrošnje kiseonika ako se nađe u međumembranskom prostoru mitohondrija, što je moguće samo ako membrana nije očuvana. Integritet membrane se smatra dobrim ukoliko respiracija ne poraste za više od 20%.

d) 10 mM sukcinata – supstrat za kompleks II. Sukcinat se redukuje do fumarata obezbeđujući elektrone za ETL. U ovom koraku meri se fluks kiseonika vezan za komplekse I i II.

e) 1 µM rotenon – inhibitor kompleksa I. Respiracija se odvija na osnovu transporta elektrona koji u ETL ulaze preko kompleksa II.

f) 2,5 μ M antimicin A – inhibitor kompleksa III. U ovom koraku je moguće izmeriti tzv. rezidualnu potrošnju kiseonika koja nije posledica aktivnosti ETL već aktivnosti različitih oksidoreduktaza.

g) 2 mM askorbat i 0,5 mM TMPD – TMPD (N,N,N',N'-tetraetil-p-fenilendiamin) je donor elektrona za kompleks IV, dok askorbat služi tome da spreči autooksidaciju TMPD-a i održi ga u redukovanom stanju. Dodavanjem ovih jedinjenja meri se aktivnost kompleksa IV izolovana od aktivnosti ostatka ETL.

h) 100 mM azid – u ovom koraku se meri potrošnja kiseonika poreklom od autooksidacije TMPD-a, što se naziva hemijskim pozadinskim šumom.

Nakon završetka merenja, homogenat iz komora je sakupljen i čuvan u zamrzivaču na -20°C za merenje aktivnosti citrat sintaze.

Treba imati na umu da su svi supstrati dodavani u katalitički-saturišućim, a ne fiziološkim koncentracijama. Ovo omogućava merenje maksimalne respiracije u svakom koraku, ali ne oslikava pravo stanje u *in vivo* ćelijskim procesima.

Dekuplujući agensi su slabe kiseline rastvorljive u lipidima koje funkcionišu kao prenosioci protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija čime omogućavaju protok protona niz gradijent koncentracije u mitohondrijski matriks. Ovo omogućava merenje maksimalne respiracije koja nije ograničena funkcijom ATP sintaze već odražava maksimalni kapacitet elektron transportnog lanca za prenos elektrona. Prethodna istraživanja na pasuljevom žišku su pokazala da dekuplujući agens DNP (dinitrofenol) ne dovodi do povećanja potrošnje kiseonika (Mast i sar., 2024), te nije korišćen u ovom eksperimentu.

Respiracija je merena u pikomolima kiseonika potrošenih u jednoj sekundi u jednom miligramu tkiva ($\text{pmol O}_2 \text{ s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Iz ovih sirovih podataka preračunavani su sledeći parametri:

1. **LEAK** – respiracija usled curenja protona. Dobija se kada se od respiracije izmerene nakon dodavanja piruvata, malata i glutamata oduzme respiracija izmerena pre dodavanja ova tri supstrata.

2. **Kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I (PCI)** – računa se kada se od respiracije izmerene nakon dodavanja ADP-a oduzme rezidualna respiracija (dobijena nakon dodavanja antamicina a).

3. **Kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za komplekse I i II (PCI+II)** – dobija se kada se od respiracije izmerene nakon dodavanja sukcinata oduzme rezidualna respiracija.

4. **Kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II (PCII)** – predstavlja razliku između respiracije izmerene nakon inhibiranja kompleksa I rotenonom i rezidualne respiracije.

5. **Aktivnost kompleksa IV** – računa se tako što se od respiracije izmerene nakon dodavanja TMPD-a i askorbata oduzme respiracija poreklom od autooksidacije TMPD-a (nakon dodavanja azida).

6. **Odnos respiratorne kontrole (RCR, engl. *respiratory control ratio*)** – predstavlja nivo efikasnosti korišćenja transporta elektrona za sintezu ATP-a i računa se kao:

$$1 - \frac{\text{respiracija pre dodavanja ADP}}{\text{respiracija nakon dodavanja ADP}}$$

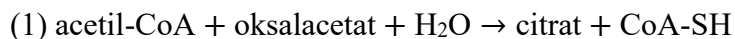
7. **Efekat citohroma c** – predstavlja procentualno povećanje respiracije nakon dodavanja citohroma c i računa se kao:

$$\frac{\text{respiracija nakon dodavanja citohroma c} - \text{respiracija pre dodavanja citohroma c}}{\text{respiracija nakon dodavanja citohroma c}} \times 100$$

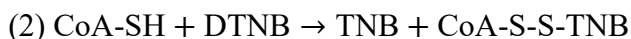
3.5.2 Merenje aktivnosti citrat sintaze

Da bi se dobili podaci o respiraciji po mitohondriji potrebno je dobijene parametre normalizovati na marker mitohondrijske količine. Za izradu ove disertacije kao marker izabrana je specifična aktivnost citrat sintaze.

Citrat sintaza (CS) je enzim kodiran jadarnim genom koji se transportuje u mitohondrijski matriks i tamo igra ključnu ulogu u Krebsovom ciklusu. CS katalizuje reakciju u kojoj od acetil-koenzima A i oksalacetata u prisustvu vode nastaju citrat i regenerisani koenzim A.



Specifična aktivnost citrat sintaze meri se spektrofotometrijskom metodom preko apsorbance molekula TNB (2-nitro-5-tiobenzoična kiselina) koji nastaje u reakciji regenerisanog koenzima A i DTNB (5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzoična kiselina)):



Naime, apsorbanca je jednaka proizvodu molarnog ekstinkcionog koeficijenta supstance (ϵ , $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) koji je specifičan za supstancu i talasnu dužinu, molarne koncentracije supstance (c , cm) i dužine optičkog puta (l , cm) koji je određen dimenzijama kivete:

$$(3) A = \epsilon \times c \times l$$

Stopa povećanja apsorbance je proporcionalna aktivnosti enzima i računa se formulom:

$$(4) r_A = \frac{dA}{dT}$$

Stopa promene koncentracije TNB-a (dc/dt) proporcionalna je specifičnoj aktivnosti enzima i izvodi se iz formula (3) i (4):

$$(5) \frac{dc}{dt} = \frac{dA}{dt \times l \times \epsilon} = \frac{r_A}{l \times \epsilon}$$

Specifična aktivnost enzima v je direktno proporcionalna stopi promene koncentracije TNB-a a obrnuto proporcionalna faktoru razređenja ($V_{\text{uzorak}}/V_{\text{kiveta}}$) i gustini uzorka (ρ , mg/ml) i izražava se u IU/mg. Dakle, specifična aktivnost enzima jednaka je:

$$(6) v = \frac{r_A}{l \times \epsilon} \times \frac{V_{\text{kiveta}}}{V_{\text{uzorak}} \times \rho}$$

TNB najbolje apsorbuje na talasnoj dužini od 412 nm, a molarni ekstinkcioni koeficijent ϵ mu iznosi $13,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Sva merenja izvedena su na konstantnoj temperaturi od 30°C u kivetama debljine 1 cm ($l = 1 \text{ cm}$).

3.5.2.1 Protokol za merenje aktivnosti CS

U kivetu je stavljano 700 μ l dejonizovane vode, 100 μ l DTNB (2 mg DTNB rastvorena u 1 M Tris-HCl puferu (pH = 8,1); finalna koncentracija u kiveti 0,1 mM), 25 μ l 10% rastvora Triton-X, 50 μ l oksalacetata (6,6 mg oksalacetata rastvorena u 5 ml 0,1 M trietanolamin-HCl-EDTA pufera (pH = 8,0); finalna koncentracija u kiveti 0,5 mM), 25 μ l acetil-CoA (25 mg acetil-CoA rastvoreno u 2,5 ml dejonizovane vode; finalna koncentracija u kiveti 0,31 nM) i 100 μ l homogenata tkiva (V_{uzorak}). Ukupna zapremina kivete (V_{kiveta}) je 1000 μ l.

Promena apsorbance u kiveti merena je na talasnoj dužini od 412 nm 180 sekundi sa integerom od 0,2 sekunde i ciklusom od 30 sekundi. Konačni rezultati stope povećanja apsorbance za svaki uzorak umanjani su za vrednost stope povećanja apsorbance blanka, to jest kivete u kojoj su se nalazila sva jedinjenja kao u kivetama sa uzorkom sem homogenata tkiva.

Da bi se rezultati respirometrije normalizovali na aktivnost citrat sintaze sve sirove vrednosti potrošnje kiseonika su podeljene sa specifičnom aktivnošću ovog enzima.

3.6 Testiranje efekta kandidat TTŽ mitotipa i kontrolnih mitotipova u različitim jedarnim sredinama i temperaturnim režimima

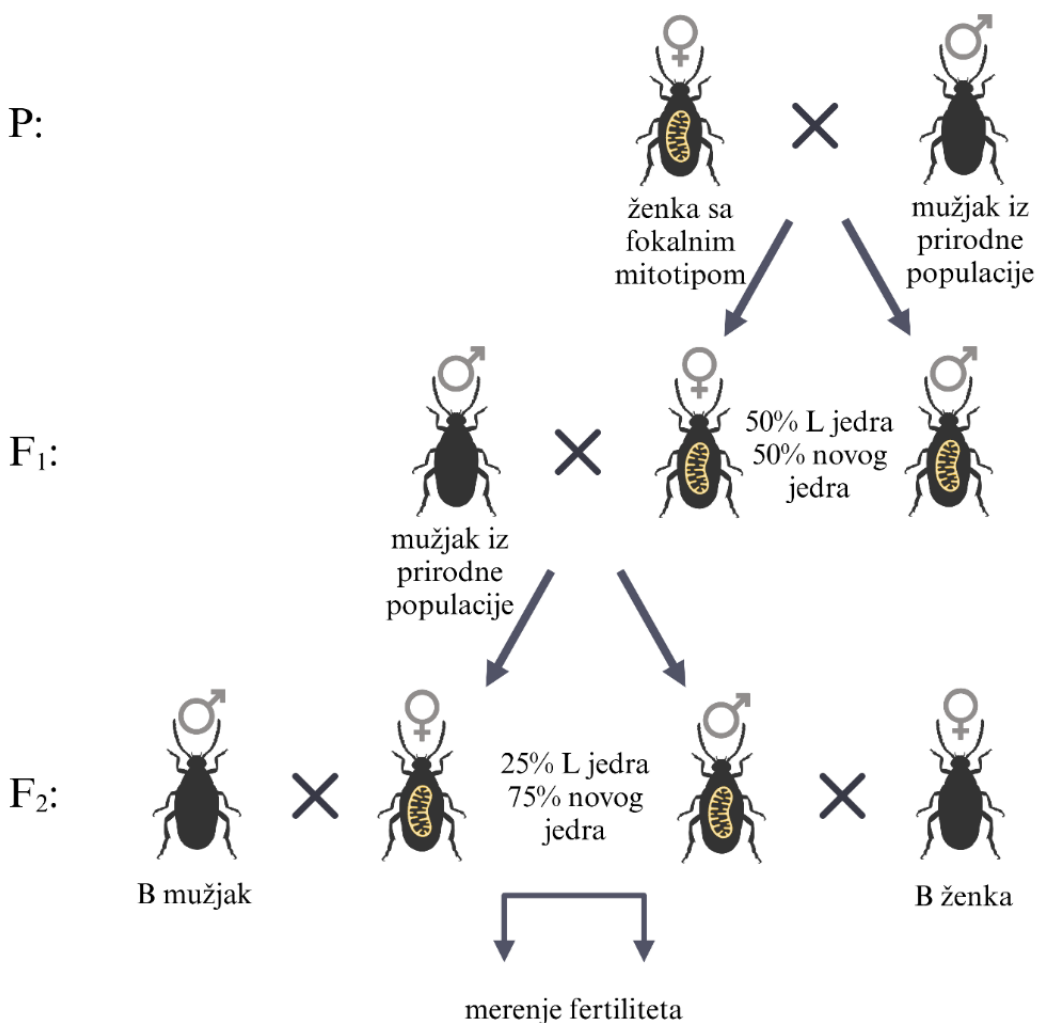
Cilj ove teze bio je i određivanje efekta TTŽ i kontrolnih mitotipova na fertilitet mužjaka i ženki pasuljevog žiška u različitim varijabilnim jedarnim sredinama poreklom iz prirodnih populacija. Kriterijum za izbor prirodnih populacija bio je da su parne vrednosti parametra F_{ST} izračunate za jedarne, mikrosatelitske lokuse između svake od populacija statistički značajne i da se nalaze na udaljenim lokacijama, to jest u različitim regionima Srbije. Dodatno, važan praktični kriterijum bio je da su to populacije koje su u laboratoriji uspešno održavane u velikoj brojnosti barem pet generacija pre početka eksperimenta, dakle da su se prilagodile na laboratorijske uslove sredine. Poštujući navedene kriterijume izabrane su populacija iz Bele Palanke (BP; južna Srbija), Srpske Crnje (SC; severna Srbija) i Ravnja (Ra; zapadna Srbija).

Da bi se ispitao efekat MG3b i dva kontrolna mitotipa, MG1a i MG1d, u različitim jedarnim sredinama, neophodno je kontrolisanim ukrštanjima zameniti njihovu staru jedarnu sredinu novim sredinama. Ovaj proces se vršio dve generacije za svaku od šest replika ova tri mitotipa. Naime, prvo su ženke fokalnog mitotipa ukrštene sa mužjacima iz željene prirodne populacije. Njihove F_1 kćerke su zatim ponovo ukrštene sa mužjacima iz iste populacije. Da bi se dobijenim F_2 mužjacima i ženkama nezavisno ispitao fertilitet, bilo je neophodno ukrstiti je sa referentnom populacijom, za šta je korišćena osnivačka, B populacija (Slika 3.6.1).

Testiranje efekta mitotipova vršeno je u F_2 generaciji zbog mogućnosti javljanja hibridnog vigora u prvoj generaciji nakon hibridizacije jedinki različitih jedarnih sredina. Naime, F_1 hibridi su heterozigotni za veliki broj jedarnih lokusa. To znači da je moguće da se efekti mnogih štetnih recesivnih alela ne ispoljavaju (Hill i sar., 2019). Dodatno, ukoliko u originalnoj jedarnoj sredini segregiraju kompenzacione mutacije koje maskiraju negativne efekte mitohondrijskih haplotipova, moguće je da će one i dalje ispoljavati svoj maskirajući efekat u heterozigotnom stanju. U F_2 generaciji je heterozigotnost mnogo niža te će tek u njoj dovoljno veliki broj jedinki biti homozigotan za jedarne alele koji maskiraju efekat mitotipova (Burton i sar., 2006; Rand i Mossman, 2020). Dakle, ako se u F_1 generaciji već ispolji negativan efekat mitohondrijskog mitotipa, kao što je to bio slučaj u eksperimentu opisanom u odeljku 4 ovog poglavlja, onda se može očekivati da će se efekat intenzivirati u daljim generacijama. Međutim, kako je moguće da efekat bude zamaskiran, u ovom eksperimentu je odmah testirana F_2 generacija.

Kako su brojna istraživanja pokazala da pored mito-jedarnih interakcija značajan uticaj na ispoljavanje osobina životne istorije imaju i interakcije sa životnom sredinom, pre svega temperaturom (Dowling i sar., 2007b; Arnqvist i sar., 2010; Hoekstra i sar., 2013), dodatni cilj ove disertacije bilo je utvrđivanje da li temperatura ima uticaj na efekat različitih mito-jedarnih kombinacija na fertilitet

mužjaka i ženki. Dakle, ovaj eksperiment je rađen paralelno na 30°C, što je temperatura na kojoj se standardno održavaju populacije pasuljevog žiška, i na 32°C, temperaturi koja se u prethodnom laboratorijskom iskustvu pokazala kao stresor za ovu vrstu. Odmah nakon ukrštanja F₂ jedinki sa B jedinkama, parovi su smešteni u termostatski podrešen na 32°C i držani unutra dok svo njihovo potomstvo nije izašlo iz semena pasulja.



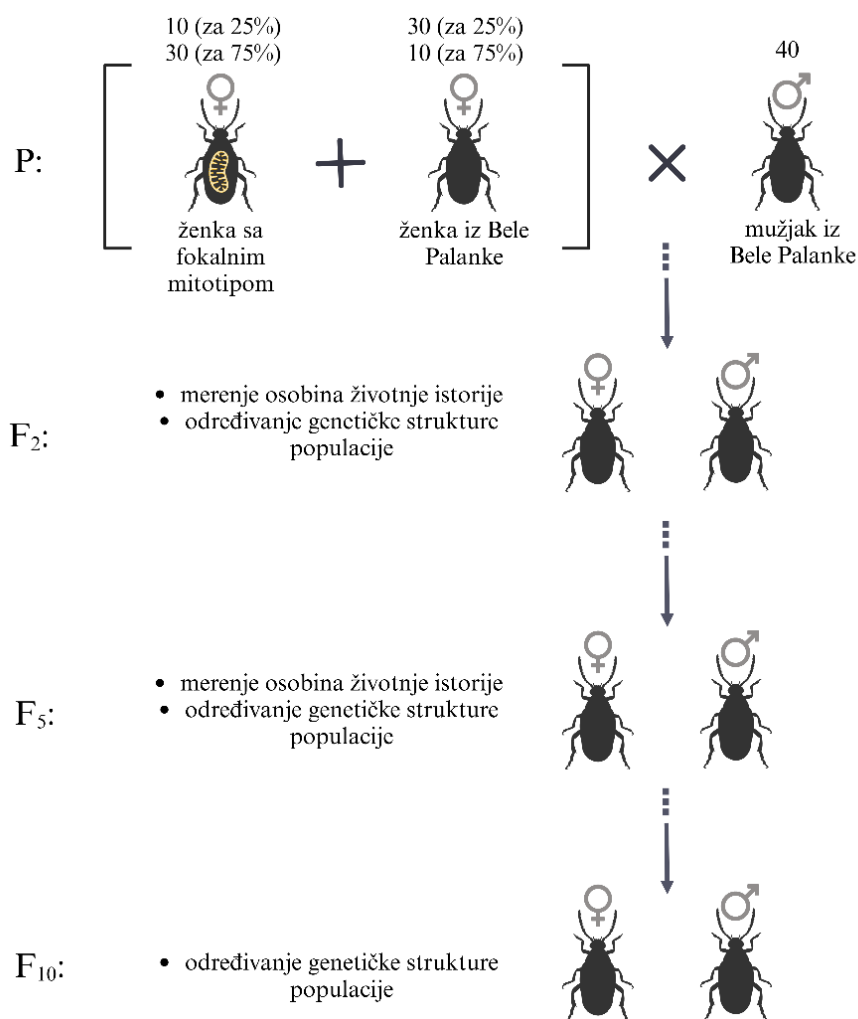
Slika 3.6.1. Shema eksperimentalnog dizajna za određivanje efekta mitotipova u različitim jedarnim sredinama. L jedro – jedro poreklom od populacija u L selekcionom režimu. B – osnivačka populacija. Žutom mitohondrijom predstavljen je fokalni mitotip. Preuzeto i modificirano od Vlajnić i sar. (2025).

3.6.1 Merenje fertiliteta

Za ispitivanje efekta tri mitotipa u tri jedarne sredine na fertilitet, F₂ jedinke iz kontrolisanih ukrštanja sa mužjacima iz prirodnih populacija sparene su sa B jedinkama. Pojedinačni parovi smešteni su u Petri šolje dijametara 5 cm napunjene zrnima pasulja. Za svaku repliku u svakoj jedarnoj i temperaturnoj sredini napravljeno je 60 parova po polu (3 mitotipa × 2 replike × 3 jedarne sredine × 2 pola × 60 parova × 2 temperature = 4.320 parova).

3.7 Dinamika rasta i promena učestalosti kandidat TTŽ i kontrolnih mitotipova u populacijama sa različitim udelima trojanskih ženki

Poslednji cilj ove disertacije bio je da se utvrdi kakav efekat na prirodnu populaciju ima introdukcija trojanskih ženki u različitim udelima. Ideja ovog eksperimenta bila je da se u laboratorijskim uslovima reprodukuje proces ubacivanja trojanskog mitotipa u populaciju sa ciljem kontrole brojnosti štetnih vrsta. U svrhu ostvarivanja ovog cilja zasnovane su populacije sa 25% i 75% ženki kandidat TTŽ ili kontrolnih mitotipova za sve replike. Ukupno je formirano 12 populacija (3 mitotipa $\times$ 2 replike $\times$ 2 udela), to jest eksperimentalnih grupa. Da bi se napravile populacije sa 25% ženki željenog mitotipa, za svaku repliku MG1a, MG1d i MG3b mitotipova uzeto je 10 ženki koje su zajedno sa 30 ženki i 40 mužjaka iz prirodne populacije formirale parentalnu generaciju novonastale populacije. Isto tako, za populacije sa 75% ženki željenog mitotipa, za svaku repliku tri mitotipa uzeto je 30 ženki koje su sa 10 ženki i 40 mužjaka iz prirodne populacije predstavljale parentalnu generaciju (Slika 3.7.1). U drugoj i u petoj generaciji su merene osobine životne istorije na osnovu kojih su računati populaciono-ekološki parametri, a u parentalnoj, drugoj, petoj i desetoj generaciji je određena genetička struktura populacije za *cox1* gen. Za sprovođenje ovog eksperimenta korišćena je prirodna populacija iz Bele Palanke.



Slika 3.7.1. Shema dizajna eksperimenta koji određuje dinamiku rasta i promenu učestalosti mitotipova u populacijama sa različitim startnim udelima fokalnih mitotipova. Iznad ženki i mužjaka u parentalnoj generaciji označeno je

koliko je jedinki korišćeno za formiranje populacija sa različitim startnim udelima. Žutom mitohondrijom predstavljen je fokalni mitotip.

3.7.1. Analiza dinamike rasta populacija

Za računanje populaciono-ekoloških (demografskih) parametara za svaki tretman korišćeni su podaci iz analiza preadultnih i adultnih osobina životne istorije. Analize su sprovedene u drugoj i u petoj generaciji.

3.7.1.1 Merenje preadultnih osobina životne istorije

Za svaku repliku iz svake eksperimentalne grupe (25% ili 75% startni udeo željenog mitotipa) korišćeno je ~150 F₂, odnosno F₅ jedinki starih jedan dan. Stavljene su u Petri šolju dijametra 9 cm sa nekoliko zrna pasulja da bi se podstakla ovipozicija. Jaja su svaki dan odstranjivana iz Petri šolje, prebrojavana i ~100 jaja je stavljano u nove Petri šolje napunjene zrnima pasulja. Za svaku repliku iz svake eksperimentalne grupe postavljeno je po 10 Petri šolja, ukupno 240 (3 mitotipa × 2 replike × 2 udela × 2 generacije × 10 Petri šolja). Nakon izleganja prve jedinke, otprilike mesec dana kasnije, svaki dan je prebrojavan broj mužjaka i ženki koji se izlegli iz zrna pasulja. **Vijabilitet** za svaku grupu je računat kao odnos broja izleženih adulata i broja postavljenih jaja po Petri šolji. **Odnos polova** u određenoj grupi, odnosno udeo ženskog potomstva u ukupnom potomstvu računat je kao količnik ukupnog broja ženki koje su se izlegle iz date Petri šolje i ukupnog broja jedinki. **Brzina razvića** je zabeležena kao broj dana koji je protekao od postavljanja jaja na zrna pasulja do izleganja jedinki.

3.7.1.2 Merenje adultnih osobina životne istorije

Da bi se ispitali fekunditet i dužina života, mužjaci i ženke jedan dan stari, koji su se izlegli iz Petri šolja postavljenih za merenje vijabiliteta, odnosa polova i brzine razvića za svaku grupu su ukrštani međusobno i pojedinačni parovi su smeštani u Petri šolje dijametra 5 cm sa po jednim zrnom pasulja. Za svaku eksperimentalnu grupu napravljeno je okvirno 60 parova (3 mitotipa × 2 replike × 2 udela × 2 generacije × 60 parova = 1.440 parova). Jaja su brojana svakodnevno i odbacivana nakon prebrojavanja. Petri šolje su praćene tokom celog života jedinki.

3.7.1.3 Računanje populaciono-ekoloških parametara rasta populacije

Na osnovu izmerenih osobina životne istorije mogu se izračunati različiti populaciono-ekološki (demografski) parametri. Oni su u ovom istraživanju procenjeni prema Maia i sar. (2000) statističkom paketu za SAS softverski paket koji omogućava računanje demografskih parametara i njihovu statističku obradu.

Izračunavanja demografskih parametara zasnivaju se na pretpostavci da populacija ima tendenciju da eksponencijalno raste što je opisano modelom:

$$(7) N(t) = N_0 \times e^{r_m \times t}$$

gde je $N(t)$ veličina populacije u vremenskom trenutku t ; N_0 početna veličina populacije a r_m intrinzička stopa rasta populacije.

U nastavku se nalazi detaljan opis računanja populaciono-ekoloških parametara rasta populacije.

1. **Neto stopa reprodukcije R_0** kvantifikuje koliko svaka ženka doprinosi narednoj generaciji ženskim potomstvom tokom trajanja ovipozicije. Da bi se izračunao ovaj demografski parametar, pre svega je potrebno imati informaciju o tome koliko ženskog potomstva nastaje u određenom vremenskom intervalu x unutar ispitivane eksperimentalne grupe g (m_{gx}). m_{gx} se dobija množenjem broja položenih jaja u datom vremenskom intervalu ($NEGG_{gx}$) i prosečne vrednosti proporcije ženki u potomstvu za tu eksperimentalnu grupu (SR_g) (8). Dakle, m_{gx} zapravo predstavlja očekivani broj ženki koji će se izleći iz jaja položenih u određenom vremenskom periodu. Dalje, za izračunavanje R_0 potreban je i podatak o stopi preživljavanja ženki (l_{gx}) date eksperimentalne grupe g u vremenskom intervalu x . l_{gx} predstavlja proizvod preživljavanja u preadultnoj ($SURV_g$) i adultnoj fazi razvića (9). $SURV_g$ je varijabilnost date eksperimentalne grupe g koji se računa kao prosečna vrednost količnika broja izleženih jedinki (NA_g) i broja položenih jaja od svake pojedinačne ženke (N_g) u grupi ($SURV_g = \frac{NA_g}{N_g}$). Preživljavanje na adultnom nivou jeste količnik broja preživelih ženki u datom intervalu x (NSF_{gx}) i ukupnog broja ženki u svakoj grupi g (NF_g) ($\frac{NSF_{gx}}{NF_g}$).

m_{gx} se izračunava kao:

$$(8) m_{gx} = NEGG_{gx} \times SR_g$$

l_{gx} izračunava kao:

$$(9) l_{gx} = SURV_g \times \frac{NSF_{gx}}{NF_g}$$

Formula za R_{0gx} je:

$$(10) R_{0gx} = m_{gx} \times l_{gx}$$

R_{0gx} predstavlja stopu neto reprodukcije u određenom vremenskom intervalu x za ispitivanu eksperimentalnu grupu g (10). Da bi se dobila ukupna stopa neto reprodukcije, za sve vremenske intervale, odnosno od prvog dana izlaska adultnih jedinki iz zrna pasulja ($min_i[x_{0gi}] = x_{0g}$) pa do poslednjeg dana života poslednje ženke u grupi ($max_i t_{f_{gi}} = \Omega_g$), potrebno je sabrati sve R_{0gx} vrednosti.

2. **Srednje vreme generacije populacije T** predstavlja srednje vreme koje protekne od izleganja adula u dve uzastopne generacije. Može se računati pomoću aproksimativne i iterativne metode. Prema aproksimativnoj metodi, T za određenu grupu g (T_g) računa se kao:

$$(11) T_g = \frac{\sum_{x=x_{0g}}^{\Omega_g} x \times l_{gx} \times m_{gx}}{\sum_{x=x_{0g}}^{\Omega_g} l_{gx} \times m_{gx}}$$

Prema iterativnoj metodi, T_g se računa iz modela eksponencijalnog rasta populacije (7) u kom je $t = T_g$ a $R_{0gx} = \frac{N_{Tg}}{N_0}$:

$$(12) T_g = \frac{\ln(R_{0g})}{r_{mg}}$$

3. **Vreme za koje populacija duplira brojnost Dt** se takođe računa iz modela eksponencijalnog rasta populacije (7) za koji se uzima da je $t = T_g$ a $\frac{N_{Tg}}{N_0} = 2$:

$$(13) Dt_g = \frac{\ln(2)}{r_{mg}}$$

4. **Konačna stopa rasta populacije λ** je parametar koji kvantifikuje koliko puta je populacija veća za svaki ispitivani vremenski interval u odnosu na početnu populaciju. Računa se iz formule:

$$(14) \lambda_g = e^{r_{mg}}$$

5. **Intrinzička stopa rasta populacije r_m** predstavlja trenutnu stopu rasta populacije i aproksimativnom metodom računa se iz modela eksponencijalnog rasta populacije u kom je $t = T_g$ a $R_{0gx} = \frac{N_{Tg}}{N_0}$:

$$(15) r_{mg} = \frac{\ln(R_{0g})}{T_g}$$

Iterativnom metodom računa se sledećom formulom:

$$(16) \sum_{x=x_{0g}}^{\Omega_g} e^{-rx} \cdot l_x \cdot m_x = 1$$

u kojoj se za vrednost r prvo uzima r_m izračunato aproksimativnom metodom, a onda se traži optimalna vrednost r u intervalu između 0,8 r_m i 1,2 r_m za koje je razlika između leve i desne strane jednačine najmanja.

Pri statističkoj analizi ovih parametara nemoguće je izračunati njihovu varijansu samo na osnovu podataka dobijenih korišćenjem opisanih formula. Razlog tome je što ovo nisu zasebne osobine već sintetički parametri izračunati korišćenjem podataka o većem broju osobina životne istorije. Zato ovaj model koristi *jackknife* proceduru. Naime, prvobitno se za svaki od parametara izračunavaju tzv. prave vrednosti korišćenjem formula 7-16. Takve procene parametara obeležavaju se $R_{0g}^{(0)}$, $r_{mg}^{(0)}$, $T_g^{(0)}$, $Dt_g^{(0)}$ i $\lambda_g^{(0)}$. Dalje se ovi parametri računaju po istim formulama, ali se u svakoj iteraciji iz proračuna izuzme po jedna ženka. Ovako procenjeni parametri obeležavaju se $R_{0g}^{(i)}$, $r_{mg}^{(i)}$, $T_g^{(i)}$, $Dt_g^{(i)}$ i $\lambda_g^{(i)}$ gde i označava pojedinačnu iteraciju. Ovaj proces se ponavlja dok se iz proračuna pojedinačno ne isključe sve ženke, to jest onoliko puta koliko ima ženki u eksperimentalnoj grupi g (n_g). Na osnovu pravih vrednosti i vrednosti izračunatih izuzimanjem ženki računaju se pseudovrednosti svakog od parametara po sledećoj formuli:

$$(17) PSVDt_g^{(i)} = n_g \times Dt_g^{(0)} - (n_g - 1) \times Dt_g^{(i)}$$

Formula je data za Dt , ali važi za sve demografske parametre. Kada se izračunaju sve i -te pseudovrednosti datog parametra formira se raspodela pseudovrednosti na osnovu koje se mogu računati srednja vrednost, varijansa i standardna greška konkretnog parametra.

Poređenje demografskih parametara između različitih eksperimentalnih grupa urađeno je Studentovim *t*-testom uz Welch-ovu korekciju za stepene slobode.

3.7.2 Analiza promene učestalosti mitohondrijskog haplotipa

U ovom eksperimentu praćena je promena učestalosti MG1a, MG1d i MG3b mitotipa kroz deset generacija nakon njihovog ubacivanja u prirodnu populaciju u dva eksperimentalna režima (25% ili 75% startni udeo fokalnog mitotipa). Učestalost mitotipova praćena je sekvenciranjem barkoding regiona *cox1* gena po istom protokolu opisanom u odeljku 3.2 ovog poglavlja. Korišćena prirodna populacija iz Bele Palanke izabrana je jer u njoj do sad nisu nađeni *cox1* haplotipovi karakteristični za MG1a, MG1d i MG3b mitotip (H1 i H3 haplotipovi, tabela 15) što je omogućilo jednostavno formiranje parentalnih populacija i praćenje učestalosti mitotipova. Radi provere ispravnosti konstruisanja parentalnih populacija sekvenciran je *cox1* barkoding region kod 40 parentalnih ženki iz svake eksperimentalne grupe. Nakon toga, po 24 jedinke uzorkovano je iz svake eksperimentalne grupe za sve replike u drugoj, petoj i desetoj generaciji i sekvenciran im je barkoding region. Ukupno, analizirano je 1.344 jedinki od čega je 1.320 uspešno sekvencirano.

3.8 Statistička obrada podataka

Analize varijanse urađene su unutar svakog pola. Poređenje između polova nije moguće zbog asimetrije samog dizajna. Primera radi, u eksperimentu u kom je određivan efekat mitotipova na osobine životne istorije, fokalni F₁ mužjaci i ženke ukršteni su sa B jedinkama. To znači da su u tim ukrštanjima ženke imale različite jedarne sredine. U ukrštanju fokalne F₁ ženke i B mužjaka, ženka ima 50% L jedarne sredine, za koju je u prethodnim istraživanjima pokazano da dovodi do povećanja broja položenih jaja i dužine života u odnosu na B jedarnu sredinu (Tucić i sar., 1996). Sa druge strane, u ukrštanju fokalnog F₁ mužjaka i B ženke, ženka ima B jedarnu sredinu. Dakle, razlike između mužjaka i ženki istog mitotipa u dužini života i broju položenih jaja potiču od razlika u jedarnim sredinama ženki u ukrštanjima. Eksperimenti i statistička analize su dizajnirani tako da se utvrdi postoje li razlike između mužjaka, to jest ženki, različitih mitotipova.

Za računanje srednjih vrednosti, standardnih grešaka i standardnih devijacija svih merenih osobina korišćena je PROC MEANS procedura u SAS softverskom paketu (SAS Institute, 2010). Poređenja između parova vrednosti osobina vršena su Scheffé i Tukey testovima pomoću PROC GLM procedure.

Za određivanje efekta šest mitohondrijskih haplotipova na preadultni vijabilitet, totalni fekunditet i dužinu života korišćena je jednofaktorska analiza varijanse posebno za svaki pol. Fiksirani faktor predstavljao je mitohondrijski haplotip, a zavisna varijabla bili su podaci o vijabilitetu, fekunditetu ili dužini života. Pre analize na podatke o vijabilitetu primenjena je arkus sinusna transformacija da bi bili zadovoljeni uslovi ove parametarske analize za normalnost podataka i homogenost varijanse za varijable čije vrednosti se nalaze u opsegu od 0 do 1. Dodatno, pri analizi totalnog fekunditeta i dužine života masa je modelovana kao kovarijabla, a pri analizi dužine života ženki kovarijablu je predstavljao i njihov totalni fekunditet.

Za statističku analizu uticaja tri mitohondrijska haplotipa na adultne osobine životne istorije korišćen je mešani model analize kovarijanse sa tipom III sume kvadrata zasebno za svaki pol. Fiksirani faktori bili su mitotip i replika, a masa je predstavljala kovarijablu. Dodatno, u analizi dužine života ženki i totalni fekunditet je modelovan kao kovarijabla. Replike su ugneždene u mitohondrijski haplotip kao nasumičan faktor. Pre analize, podaci o dužini života i fertilitetu su transformisani korišćenjem logaritma

sa bazom 10 da bi zadovoljili uslove testa. Parna poređenja za sve osobine rađena su Scheffé testom. Krive preživljavanja za mužjake i ženke različitih mitotipova konstruisane su tako što je tokom celog perioda života za određenu grupu (od prvog dana postavljanja parova u Petri šolje do smrti poslednje jedinke) za svaki dan računat procenat preživelih jedinki. Da bi se utvrdilo da li su efekti MG3b mitohondrijskog haplotipa nezavisni za svaki pol, izračunate su Pirsonove fenotipske korelacije između ranog fekunditeta i fertiliteta mužjaka i ranog fekunditeta, fertiliteta i dužine života ženki ovog mitotipa korišćenjem PROC CORR procedure u SAS softverskom paketu.

Statistička analiza rezultata merenja respiratornog kapaciteta i aktivnosti kompleksa oksidativne fosforilacije obavljena je korišćenjem mešanog modela varijanse sa tipom III sume kvadrata. Fiksirani faktor je bio mitohondrijski haplotip, a linije su ugneždene u mitotip i modelovane kao nasumičan faktor. Varijable čiji su uzroci variranja ispitani su respiracija u LEAK stanju, respiratorni kapacitet kompleksa I, respiratorni kapacitet kompleksa II, respiratorni kapacitet kompleksa I i II, aktivnost kompleksa IV. Vrednosti ovih varijabli normalizovane na vrednosti aktivnosti citrat sintaze takođe su modelovane kao varijable. Konačno, i sama specifična aktivnost citrat sintaze je analizirana kao varijabla. Pre početka analiza vrednosti respiracije u LEAK stanju normalizovane na aktivnost citrat sintaze, respiratornog kapaciteta kompleksa II normalizovanog na aktivnost citrat sintaze i specifične aktivnosti citrat sintaze logaritamski su transformisane (korišćenjem prirodnog logaritma) da bi zadovoljile uslove analize varijanse za normalnu distribuciju i homogenost varijanse podataka. Parna poređenja između mitotipova sprovedena su Tukey testom.

Za analizu efekta mitohondrijskih haplotipova u različitim jedarnim sredinama na standardnoj temperaturi od 30°C na fertilitet korišćen je mešani model analize varijanse sa tipom III sume kvadrata unutar svakog pola. Fiksirani faktori bili su mitohondrijski haplotip, jedarna sredina i njihova interakcija, dok su replike ugneždene u interakciju mitohondrije i jedra kao nasumičan faktor. Identična analiza iskorišćena je i za podatke o fertilitetu na 32°C. Analiza puliranih rezultata iz eksperimenta na 30°C i 32°C rađena je mešanim modelom varijanse gde su fiksirani faktori bili mitohondrijski haplotip, jedarna sredina, temperatura, i sve interakcije ova tri osnovna faktora. Ponovo, replike su modelovane kao nasumičan faktor ugneždene u interakciju mitotipa i jedarne sredine. U obe analize, parna poređenja unutar svakog pola rađena su Tukey testom. Konačno, poređenja između fertiliteta na dve temperature unutar svakog mitotipa urađena su Studentovim *t*-testom metodom prema Satervajtu.

Sve slike urađene su korišćenjem BioRender (<https://www.biorender.com>) programa sa akademskom individualnom licencom.

4. REZULTATI

4.1 Molekulska karakterizacija *L* laboratorijskih mitohondrijskih linija

Prvi cilj ovog rada bio je molekulska karakterizacija mitohondrijskih genotipova poreklom od konstruisanih mitohondrijskih linija poteklih od *L* laboratorijskih linija (linija koje su pod selekcionim režimom za kasnu reprodukciju). Karakteristika ovih linija jeste da sve jedinke u okviru njih dele istu mitohondrijsku DNK budući da je svaka linija potekla od samo jedne ženke. U prvoj fazi eksperimenta je za 20 konstruisanih mitohondrijskih linija sekvencirano osam mitohondrijskih protein-kodirajućih gena (*cox1*, *cox3*, *nad4*, *nad4l*, *nad6*, *cytb*, *nad1* i *cox2*). Za svaki gen pronađena su dva ili tri haplotipa, a najveću varijabilnost sekvenci pokazali su *nad4l* i *cox2* geni sa 1,89% i 1,17% varijabilnih nukleotidnih mesta (Tabela 1). Na osnovu sekvenci ovih gena identifikovano je šest multilokusnih genotipova (MG): MG1a, MG1b, MG1c, MG1d, MG3a i MG3b. Nukleotidne razlike između genotipova date su u Tabeli 2, a grafički prikazane haplotipskom mrežom na Slici 1. MG1a, MG1b, MG1c i MG1d su vrlo slični i razlikuju se u jednoj do dve nesinonimne nukleotidne zamene. MG3a i MG3b razlikuje jedna nesinonimna i jedna sinonimna razlika, ali od haplotipova iz grupe MG1 deli ih značajno veći broj mutacija. Naime, od MG1a mitotipa, kome su najbližiji, razlikuju se u 27 (MG3a) to jest 29 (MG3b) nukleotidnih zamena. Najveći broj opisanih nukleotidnih promena je sinoniman, to jest ne menja sekvencu kodiranog proteina. Nesinonimne promene nalaze se u pet gena. U *cox3* genu MG1a, MG3a i MG3b na poziciji 170 imaju aminokiselinu treonin, a MG1b, MG1c i MG1d izoleucin. Aminokiselinska zamena u *nad6* specifična je samo za MG1c mitotip koji na poziciji 36 ima aminokiselinu metionin umesto valina. U *cytb* genu MG3a i MG3b mitotipovi imaju valin na 334. poziciji, dok ostala četiri mitotipa sadrže izoleucin. MG1d se od ostalih mitotipova razlikuje u mutaciji u *nad1* genu koja je dovela do zamene asparaginske kiseline, koju sadrže ostali mitotipovi, asparaginom na 164. poziciji u proteinu. Konačno, u *cox2* genu nalazi se aminokiselinska zamena specifična za MG3b mitotip koji na 34. poziciji ima valin, dok preostali mitotipovi imaju izoleucin. Izračunata je i matrica parova distanci za ovih šest mitotipova koja jasno pokazuje da je MG3b mitotip najudaljeniji od MG1 mitotipova, sa distancama od 0,0067 od MG1a mitotipa, 0,0070 od MG1b mitotipa i 0,0072 od MG1c i MG1d mitotipova (Tabela 3).

Na osnovu stepena divergencije sekvence, broja nesinonimnih mutacija i efekta na preadultne i adultne osobine mužjaka i ženki (sekcija 4.2.1. Rezultata), MG3b mitotip izabran je za kandidat TTŽ mitotip, to jest mitotip koji bi se potencijalno mogao koristiti u tehnici trojanskih ženki zahvaljujući svom polno specifičnom dejstvu, a MG1a i MG1d za kontrolne mitotipove i oni su korišćeni u svim daljim eksperimentima.

Za ova tri mitotipa je naknadno sekvencirano i preostalih pet mitohondrijskih protein-kodirajućih gena (*nad2*, *nad3*, *nad5*, *atp6* i *atp8*). U Tabeli 4 date su sve pronađene nukleotidne zamene. Geni *nad3* i *nad5* pokazali su se kao evoluciono očuvani između tri mitotipa bez ijedne bazne supstitucije (Tabela 1). U *nad2* genu MG3b mitotipa pronađeno je šest nukleotidnih promena od kojih su dve nesinonimne (zamena izoleucina treoninom na poziciji 73 i zamena valina metioninom na poziciji 138). *atp6* gen ima četiri promene specifične za MG3b, dve sinonimne i dve nesinonimne. Naime, MG3b sadrži leucin na poziciji 45, dok MG1a sadrži glicin, a MG1d arginin, dok na poziciji 64 ima lizin, a kontrolni mitotipovi imaju serin. Konačno, u *atp8* genu identifikovane su dve supstitucije karakteristične za MG3b, od kojih je jedna dovela do zamene fenilalanina tirozinom na poziciji 20 proteinskog produkta (Tabela 5). Na slici 2 označene su sve OXPHOS subjedinice čiji geni sadrže nesinonimne promene. Ukupno, MG3b se od MG1a razlikuje u 45 nukleotidnih zamena, a od MG1d u 47, što je grafički prikazano haplotipskom mrežom na slici 3. Kada je reč o promenama u sekvenci proteina, od MG1a se MG3b razlikuje u sedam aminokiselina, a od MG1d u devet (Tabela 5). Kada se u račun genetičkih distanci uključi i pet naknadno sekvenciranih gena, divergencija MG3b mitotipa je još viša u odnosu na procenu sa osam sekvenci

protein kodirajućih gena: vrednost distance od MG1a mitotipa iznosi 0,0074, a od MG1d 0,0077. Udaljenost između kontrolnih mitotipova, MG1a i MG1d, je 0,0007 (Tabela 6).

4.1.1 Test na prisustvo *Wolbachia*

Prisustvo ovog intracelularnog parazita nije otkriveno ni u jednom uzorku što je u skladu i sa prethodnim analizama laboratorijskih populacija pasuljevog žiška (Đorđević i sar., 2017).

4.2 Određivanje efekta mitohondrijskih haplotipova na osobine životne istorije

Drugi, i najvažniji, cilj ove disertacije jeste testiranje hipoteze materinske kletve u laboratorijskim populacijama pasuljevog žiška, kao i identifikacija mitohondrijskog haplotipa koji ima negativan efekat na fertilitet mužjaka ali ne i na ženke i koji bi se potencijalno mogao koristiti u tehnici trojanskih ženki (kandidat TTŽ mitotip). U tu svrhu, prvo je ispitan efekat šest mitotipova na preadultni vijabilitet, totalni fekunditet i dužinu života mužjaka i ženki, a potom efekat odabranih mitotipova na rani i totalni fekunditet, dužinu života i fertilitet u jednoj, varijabilnoj i nekoevoluiranoj jedarnoj sredini.

4.2.1 Pilot ekspertiment ispitivanja efekta šest mitotipova na osobine životne istorije

Rezultati jednofaktorske analize varijanse za preadultni vijabilitet mužjaka i ženki šest različitih mitotipova za oba pola pokazali su da je efekat mitotipa na vijabilitet statistički značajan ($F_{5, 136} = 3,71$, $P = 0,0035$ za ženke; $F_{5, 116} = 8,51$, $P < 0,0001$ za mužjake) što ukazuje na to da kod oba pola mitohondrijski genotip igra važnu ulogu u ispoljavanju preadultnog vijabiliteta. Srednje vrednosti, standardne greške kao i rezultati parnih poređenja urađenih unutar svakog pola Scheffé metodom mogu se videti na Slici 4. Od šest ispitanih mitotipova, tri, MG1a, MG1d i MG3a, ne smanjuju vijabilitet ni mužjacima ni ženka u odnosu na druge mitotipove. Srednje vrednosti vijabiliteta ženki ova tri mitotipa su redom 0,572, 0,501 i 0,514 a mužjaka 0,438, 0,483 i 0,426. Posmatrano unutar pola, ove vrednosti nisu statistički značajno različite. Interesantno, MG1b mitotip ima negativan efekat kako na mužjake tako i na ženke. Naime, srednja vrednost vijabiliteta ženki nosilaca ovog mitotipa iznosi 0,409 a mužjaka 0,335. Konačno, MG1c i MG3b smanjuju vijabilitet samo mužjacima, dok vijabilitet ženki nije narušen. Kad je reč o MG1c mitotipu, srednja vrednost vijabiliteta ženki iznosi 0,446 a mužjaka 0,282, što je ujedno i najmanja zabeležena vrednost vijabiliteta. MG3b ženke imaju vrednosti vijabiliteta 0,512, dok su mužjaci statistički značajno pogođeni sa vrednošću od 0,31.

Analiza kovarijanse sa tipom III sume kvadrata totalnog fekunditeta takođe je pokazala da i kod ženki ($F_5 = 6,60$, $P < 0,0001$) i kod mužjaka ($F_5 = 13,59$, $P < 0,0001$) na variranje ove osobine značajan uticaj ima mitohondrijski haplotip. Masa je kod ženki imala značajan efekat na totalni fekunditet ($F_1 = 165,08$, $P < 0,0001$) dok kod mužjaka to nije bio slučaj ($F_1 = 0,53$, $P = 0,4651$). Rezultati Tukey parnih poređenja unutar pola prikazani su na slici 4. Rezultati eksperimenata za mitotipove MG1a i MG1d sa vrednostima totalnog fekunditeta od 62,38 i 62,85 položenih jaja za ženke i 42,07 i 43,54 jaja za ukrštanja u kojima su učestvovali mužjaci ovih haplotipova i u ovom slučaju ukazuju na to da MG1a i MG1d nemaju nepovoljan efekat ni na jedan pol. Vrednosti fekunditeta MG3a ženki od 53,28 iako se statistički ne razlikuju od vrednosti za MG1a i MG1d ženke, ipak ukazuju na trend smanjenja fekunditeta kod ovog mitotipa. MG1b mitotip se i za ovu osobinu pokazao kao nepovoljan za oba pola (vrednost totalnog fekunditeta za ženke 47,18, a za B ženke ukrštene sa MG1b mužjacima 31,53). Isto važi i za MG1c sa vrednostima od 49,75 jaja za ženke nosioce ovog haplotipa i 32,35 jaja za B ženke pri parenju sa MG1c

mužjacima. Jedino MG3b mitotip uzrokuje pad totalnog fekunditeta samo u ukrštanju u kom učestvuju mužjaci ovog mitotipa (35,94 jaja), dok ne utiče na ženke (59,2 jaja).

Konačno, variranje dužine života nije izazvano različitim mitotipovima kod ženki ($F_5 = 1,04$, $P = 0,3920$) (iako jeste masom ženki: $F_1 = 25,42$, $P < 0,0001$), dok jeste kod mužjaka ($F_5 = 14,08$, $P < 0,0001$). Masa mužjaka takođe značajno utiče na njihovu dugovečnost ($F_1 = 35,53$, $P < 0,0001$). Kada je reč o rezultatima parnih poređenja dobijenih Tukey testom, ženke različitih mitotipova ne pokazuju statistički značajne razlike u dužini života, koja varira od 11,45 dana kod MG3a ženki do 12,26 dana kod MG1d ženki. Kod mužjaka mitotipovi MG1b i MG1c opet dovode do pada vrednosti osobine (9,7 dana za MG1b mužjake i 9,55 dana za MG1c mužjake), dok ostali mitotipovi nemaju negativan efekat na dužinu života mužjaka sa vrednostima koje variraju od 10,36 dana za MG3a do 11,36 dana za MG1d (Slika 4).

Na osnovu ove analize i analize sekvenci osam protein-kodirajućih mitohondrijskih gena, izabran je kandidat TTŽ mitotip koji jedini ima negativan uticaj na vijabilitet i totalni fekunditet mužjaka ali ne i ženki i koji nema negativan efekat na dugovečnost jedinki nijednog pola – MG3b – kao i dva kontrolna mitotipa koja ne utiču štetno ni na mužjake ni na ženke (MG1a i MG1d). Ovi mitotipovi korišćeni su u svim daljim analizama.

4.2.2 Efekat kandidat TTŽ i dva kontrolna mitotipa na reproduktivni potencijal

Efekat tri mitotipa na reproduktivni potencijal određen je preko ranog fekunditeta, totalnog fekunditeta i fertiliteta. Kada je reč o **ranom fekunditetu**, koji predstavlja broj jaja položen u prva dva dana polaganja jaja, ni kod ženki ni kod mužjaka analiza kovarijanse nije identifikovala značajan efekat mitotipa ($F_{2, 3,03} = 0,42$, $P = 0,6883$ za ženke i $F_{2, 3,08} = 6,15$, $P = 0,0838$ za mužjake), iako je kod mužjaka P vrednost granična. Masa ni kod jednog pola nema značajan efekat na variranje osobine ($F_{1, 344} = 0,10$, $P = 0,7577$ za ženke i $F_{1, 322} = 0,58$, $P = 0,4483$ za mužjake). Replike ugneždene u mitotip su statistički značajan izvor variranja za ženke ($F_{3, 344} = 8,16$, $P < 0,0001$), a granično su beznačajne za mužjake ($F_{3, 322} = 2,47$, $P = 0,0619$) (Tabela 7). B ženke sparene sa MG3b mužjacima u proseku su polagale 35% manje jaja u prva dva dana polaganja jaja u poređenju sa ženkama sparenim sa MG1a i MG1d mužjacima. Naime, u ukrštanjima sa MG1a mužjacima u prva dva dana položeno je u proseku 10,26 jaja, a u ukrštanjima sa MG1d mužjacima 10,32 jaja, dok su ženke ukrštene sa MG3b mužjacima polagale statistički značajno manje – u proseku 6,72 jaja u ovoj ranoj fazi polaganja jaja. Sa druge strane, Scheffé *post-hoc* test pokazao je da MG3b ženke nemaju značajno niži fekunditet u odnosu na ženke kontrolnih mitotipova, iako vrednosti njihovog fekunditeta jesu niže (10,79 jaja u odnosu na 13,21 jaje koje polažu MG1a ženke i 12,16 jaja MG1d ženki) (Slika 5).

Ista analiza za **totalni fekunditet**, to jest ukupan broj jaja položen tokom celog života ženke, pokazala je da mitotip ni kod mužjaka ni kod ženki nije statistički značajan izvor variranja osobine ($F_{2, 3,08} = 0,18$, $P = 0,8436$ za ženke i $F_{2, 3,05} = 1,93$, $P = 0,2872$). Masa ima značajan efekat na osobinu kod ženki ($F_{1, 342} = 104,9$, $P < 0,0001$), a granično beznačajan efekat na mužjake ($F_{1, 316} = 3,27$, $P = 0,0715$). U ovom slučaju replike imaju značajan efekat na variranje osobine ($F_{3, 342} = 3,19$, $P = 0,0239$ za ženke i $F_{3, 316} = 3,80$, $P = 0,0106$) (Tabela 8). Odsustvo efekta mitotipa na totalni fekunditet i kod mužjaka i kod ženki ukazuje da on ne utiče na variranje ove osobine, mada Scheffé test ukazuje na to da MG1d ženke, kao i B ženke uparene sa MG1d mužjacima, ostavljaju više jaja u odnosu na MG1a i MG3b mitotip (Slika 5). MG3b ženke u toku života u proseku polažu 55,45 jaja, što je u slično broju jaja koje ostavljaju MG1a (52,75 jaja) i MG1d ženke (59,03 jaja). Za razliku od ranog fekunditeta, ukrštanja MG3b mužjaka ne rezultiraju statistički manjim ukupnim brojem položenih jaja (41,12) u odnosu na ukrštanja MG1a mužjaka (40,51).

Dvofaktorska ANCOVA za **fertilitet** kao najvažniju meru reproduktivnog potencijala jedinki utvrdila je da dok kod ženki mitotip nema značajan uticaj, kod mužjaka je ovaj efekat statistički značajan ($F_{2, 3,00} = 0,15$, $P = 0,8671$ za ženke i $F_{2, 3,00} = 35,39$, $P = 0,0082$ za mužjake). Kod ženki ($F_{3, 334} = 3,24$, $P = 0,0222$), ali ne i mužjaka ($F_{3, 333} = 1,02$, $P = 0,3849$), replike imaju značajan efekat. Fertilitet MG3b mužjaka iznosi u proseku 16,92 potomka po ukrštanju, dok je fertilitet mužjaka kontrolnih mitotipova 24,67 za MG1a haplotip i 26,99 za MG1d haplotip. Dakle, smanjenje fertiliteta MG3b mužjaka u proseku je 34% u odnosu na mužjake kontrolnih mitotipova, što je smanjenje skoro jednako smanjenju ranog fekunditeta ženki koje se ukrštaju sa MG3b mužjacima. Kada je reč o fertilitetu MG3b ženki, on se ne razlikuje od fertiliteta kontrolnih ženki (31,59 potomaka za MG1a ženke, 31,68 potomaka za MG1d ženke i 31,86 potomaka za MG3b ženke) (Slika 5).

Iz opisanih rezultata uticaja tri različita laboratorijska mitotipa na reproduktivni potencijal, MG3b je jasan kandidat za korišćenje u tehnici trojanskih ženki s obzirom na to da značajno smanjuje fertilitet mužjaka u odnosu na MG1a i MG1d mitotip, dok na osobine ženki ovaj mitotip nema negativan uticaj.

4.2.3 Efekat kandidat TTŽ i kontrolnih mitotipova na dužinu života

Mešani model analize kovarijanse za dužinu života mužjaka i ženki nosilaca tri različita mitohondrijska haplotipa (MG1a, MG1d i MG3b) pokazao je da efekat mitotipa nije značajan ni kod ženki ($F_{2, 3,01} = 1,12$, $P = 0,4322$) ni kod mužjaka ($F_{2, 3,02} = 2,11$, $P = 0,2668$) (Tabela 9). S obzirom na to da su mitotipovi za ovaj eksperiment između ostalog i birani prema svom efektu na dugovečnost i izabrani su oni koji ne smanjuju dužinu života ni mužjacima ni ženkama, izostanak efekta mitotipa koji je prisutan u prethodnom eksperimentu je očekivan. Kovarijabla masa statistički je značajna kod oba pola ($F_{1, 340} = 45,81$, $P < 0,0001$ za ženke i $F_{1, 322} = 29,04$, $P < 0,0001$ za mužjake), kao i kovarijabla totalni fekunditet specifična za ženke ($F_{1, 340} = 15,54$, $P < 0,0001$). I kod mužjaka i kod ženki replike ugneždene u mitotip su značajan izvor variranja dužine života ($F_{3, 340} = 16,02$, $P < 0,0001$ za ženke i $F_{3, 322} = 10,74$, $P < 0,0001$ za mužjake).

Iako dvofaktorska ANCOVA nije pokazala značajan efekat mitotipa na variranje dužine života, parno poređenje sprovedeno Scheffé *post-hoc* testom ukazuje na to da ženke MG1d mitotipa žive značajno duže u odnosu na MG1a i MG3b ženke. Njihove prosečne vrednosti dužine života iznose 13,02 dana, dok je za MG1a ženke to 11 dana a za MG3b ženke 11,5 dana. Isto tako, prema Scheffé testu postoje značajne razlike u dužini života mužjaka sva tri mitotipa gde i mužjaci MG1d mitotipa žive najduže (11,47 dana) a mužjaci MG1a mitotipa statistički najkraće (9,74 dana) (Slika 6). Prosečna dužina života MG3b mužjaka iznosi 10,71 dan. Dakle, jedinke MG1d mitotipa oba pola žive u proseku 12,4% duže od jedinki druga dva mitotipa, dok MG1a jedinke oba pola u proseku žive 12,05% kraće. Slično se može zaključiti i na osnovu krivi preživljavanja odakle se vidi da umiranje jedinki MG1d počinje kasnije u odnosu na jedinke druga dva mitotipa, a kod MG1a jedinki najranije (Slika 6).

4.2.4 Pirsonove fenotipske korelacije

Da bi se utvrdilo da li je efekat koji MG3b mitotip ispoljava na svoje nosioce u skladu sa jakim ili slabom materinskom kletvom, izračunate su Pirsonove korelacije između ranog fekunditeta, to jest, fertiliteta MG3b mužjaka i osobina životnih istorija MG3b ženki. Naime, ukoliko se javlja efekat jake materinske kletve, očekujemo da rezultati ove analize pokažu značajne negativne interseksualne korelacije između osobina. Drugim rečima, to bi ukazalo na polno antagonistički efekat MG3b mitotipa – istovremeno negativan efekat na mužjake a pozitivan na ženke. S druge strane, ukoliko MG3b ispoljava efekat slabe materinske kletve, statistički značajne korelacije se ne očekuju. To znači da dok ovaj haplotip

ima štetan efekat po mužjake, efekat na ženke je neutralan. Rezultati poređenja ranog fekunditeta MG3b mužjaka i ranog fekunditeta ($r = 0,138$, $P = 0,1391$), fertiliteta ($r = -0,019$, $P = 0,8441$) i dužine života ($r = 0,079$, $P = 0,3980$) MG3b ženki nisu pokazali statističku značajnost. Slično se može videti i kada se uporede fertilitet MG3b mužjaka i rani fekunditet ($r = -0,065$, $P = 0,4911$), fertilitet ($r = 0,111$, $P = 0,2515$) i dužina života ($r = 0,029$, $P = 0,7533$) MG3b ženki. Dakle, efekat MG3b mitotipa u skladu je sa hipotezom slabe materinske kletve.

4.3 Određivanje mitohondrijske funkcije kandidat TTŽ i kontrolnih mitotipova

Ispoljavanje osobina životne istorije zavisi od dostupne energije i energetskog metabolizma organizma (Ballard i sar., 2007b). Ovo posebno važi za osobine povezane sa reproduktivnim potencijalom mužjaka, s obzirom na to da su produkcija spermatozoida i njihova aktivnost izuzetno energetski zahtevni procesi (Vaught i Dowling, 2018). Iz tog razloga je treći cilj ove disertacije bio da se utvrdi energetski status MG1a, MG1d i MG3b mužjaka. Specifičnije, određeni su kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za komplekse I i II i aktivnost kompleksa IV.

U ovom eksperimentu dobijena su dva biološki relevantna seta podataka. Prvi su vrednosti respiracije po gramu tkiva, što nam daje uvid o funkcionisanju procesa oksidativne fosforilacije na nivou čitave jedinke. Drugi set podataka dobijen je normalizacijom prvog seta na aktivnost citrat sintaze, markera količine mitohondrija, i predstavlja respiraciju na nivou pojedinačnih mitohondrija.

Pre analize rezultata respiracije u različitim respiratornim stanjima bilo je neophodno potvrditi pouzdanost dobijenih podataka utvrđivanjem očuvanosti integriteta spoljašnje mitohondrijske membrane. Za to su upotrebljene vrednosti efekta citohroma c koje predstavljaju procentualno povećanje respiracije nakon dodavanja ovog jedinjenja. Povećanje do 20% se smatra normalnim fiziološkim odgovorom i kod ove vrste se toleriše. Rezultati su pokazali da je u većini naših uzoraka homogenizacija ispravno odrađena i da nije došlo do perforacije prevelikog broja mitohondrija u uzorku (Slika 7). Prosečne vrednosti efekta citohroma c bile su za MG1a mitotip 17,14%, za MG1d 12,70% a za MG3b 11,09%. Pojedinačni uzorci u kojima su vrednosti respiracije porasle preko granične vrednosti su isključeni iz daljih analiza.

4.3.1 Respiracija na nivou organizma

Mitohondrijska respiratorna funkcija na nivou organizma ispitana je kroz analizu različitih respiratornih stanja: LEAK stanje u kome se usled neaktivnosti ATP sintaze respiracija odvija samo na osnovu curenja protona kroz unutrašnju membranu mitohondrija, respiracija u prisustvu supstrata za kompleks I (kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I), respiracija u prisustvu supstrata za kompleks II (kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II), respiracija u prisustvu supstrata za komplekse I i II (kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za komplekse I i II) i respiracija u prisustvu sintetičkog supstrata za kompleks IV (aktivnost kompleksa IV).

Mešani model varijanse pokazao je da mitotip nema značajan efekat na respiraciju u LEAK stanju ($F_{2, 3,00} = 7,46$, $P = 0,0684$), mada je P vrednost niska i izostanak statističke značajnosti se može objasniti statistički značajnim variranjem ove osobine u okviru replika ugnežđenih u mitotip (Tabela 10). Na Slici 8.A dati su rezultati Tukey *post-hoc* testa koji su pokazali da se sva tri mitotipa međusobno značajno razlikuju, pri čemu je prosečna LEAK respiracija najveća za MG1a mitotip i iznosi $3,68 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$, statistički niža za MG1d ($2,44 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$) a najmanja za MG3b za koji je iznosi $1,63 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

Variranje kapaciteta oksidativne fosforilacije vezanog za kompleks I, kompleks II i komplekse I i II pokazalo je značajnu zavisnost od mitohondrijskog haplotipa ($F_{2, 3,00} = 20,62$, $P = 0,0176$ za kompleks

I; $F_{2, 3,00} = 19,70$, $P = 0,0286$ za kompleks II; $F_{2, 3,00} = 20,10$, $P = 0,0183$ za komplekse I i II). U sva tri slučaja su se replike između sebe značajno razlikovale (Tabela 10). Kapacitet vezan za kompleks I statistički je najveći za MG1a mitotip i iznosi u proseku $54 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$, a najmanji za MG3b, sa duplo manjom prosečnom vrednošću od $24,99 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$ (Slika 8.B). Isti trend primetan je i za kapacitet vezan za komplekse I i II (Slika 8.D). I u ovom slučaju je respiracija mužjaka MG1a mitotipa duplo veća ($71,66 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$) u odnosu na respiraciju MG3b mužjaka ($32,18 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$) koja je ujedno i najniža. Kapacitet vezan za komplekse I i II MG1d mužjaka iznosi u proseku $47,59 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$. Kada je reč o kapacitetu oksidativne fosforilacije vezanom za kompleks II, on je najveći za MG1a mužjake ($43,05 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$), dok se MG1d i MG3b ne razlikuju značajno među sobom ($20,12 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$ za MG1d, $18,85 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$ za MG3b mužjake) (Slika 8.C).

Aktivnost kompleksa IV se meri nakon egzogenog dodavanja donora elektrona te aktivnost ovog kompleksa ne zavisi od aktivnosti ostalih kompleksa u elektron transportnom lancu. Iz tog razloga su vrednosti respiracije pri ovom merenju mnogo više nego pri merenju respiratornog kapaciteta preostalih kompleksa (Slika 8.E). I u ovom slučaju respiracija je statistički značajno zavisna od mitotipa ($F_{2, 3,00} = 29,55$, $P = 0,0106$) dok replike bitno variraju među sobom (Tabela 10). Tukey test pokazao je da se svi mitotipovi značajno razlikuju u nivou respiracije kada se maksimalno aktivira kompleks IV i da postoji isti trend uočen i u analizi ostalih kompleksa: MG1a ima najvišu prosečnu respiraciju koja iznosi $237,5 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$, MG1d značajno nižu sa vrednošću $154,88 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$ a MG3b ponovo najnižu ($102,37 \text{ pmol/s}^{-1}\text{mg}^{-1}$) (Slika 8.E).

Odnos respiratorne kontrole (RCR), odnosno efikasnost korišćenja transporta elektrona za sintezu ATP-a, pokazala je značajno variranje u odnosu na mitotip mužjaka ($F_{2, 3,00} = 4,16$, $P = 0,0202$), dok se replike unutar mitotipova nisu značajno razlikovale (Tabela 10). Značajno variranje poreklom od mitotipa posledica je smanjene vrednosti ovog parametra kod MG3b mužjaka u odnosu na kontrole (Slika 9.A). Naime, prosečna vrednost RCR-a MG3b mužjaka je $0,846935$, dok je prosečna vrednost parametra za MG1a mužjake $0,872179$, a MG1d mužjake $0,874137$.

4.3.2 Količina mitohondrija

Promene u sekvenci mtDNK mogu dovesti i do promene u broju mitohondrija u ćeliji zbog nemogućnosti pravilnog sklapanja OXPHOS kompleksa ili promenjene količine ROS-a koji služe kao molekuli koji jedru mogu signalizirati potrebe za određenom količinom mitohondrija (Pichaud i sar., 2019). Marker za količinu mitohondrija korišćen u izradi ove teze je aktivnost enzima citrat sintaze. Rezultati mešanog modela analize varijanse pokazali su značajan efekat mitohondrijskog haplotipa na variranje specifične aktivnosti citrat sintaze ($F_{2, 3,00} = 10,17$, $P = 0,0460$) kao i na to da se replike unutar mitotipa značajno razlikuju u ovoj osobini (Tabela 10). Značajan efekat mitotipa poreklom je od toga što MG1a ima značajno veću aktivnost ovog enzima ($0,0219 \text{ IU/mg}$) u odnosu na druga dva mitotipa ($0,0083$ za MG1d i $0,0075$ za MG3b) (Slika 9.B). Dakle, može se zaključiti da MG1a ima duplo više mitohondrija u poređenju sa MG1d i MG3b mitotipom. Ovaj rezultat objašnjava uočeni trend da MG1a mitotip ima povišenu respiraciju izraženu po gramu tkiva u svim respiratornim stanjima.

4.3.3 Respiracija na nivou mitohondrije

Informacija o aktivnosti citrat sintaze po gramu uzorka, to jest o količini mitohondrija u gramu uzorka, omogućila je normalizaciju rezultata respiracije različitih stanja na količinu mitohondrija. Dakle, dobijeni su podaci o respiraciji pri aktivnosti različitih kompleksa na nivou pojedinačnih mitohondrija.

Kada je reč o ovako normalizovanim podacima, ni u jednom slučaju nije utvrđen statistički značajan efekat mitotipa na variranje osobina ($F_{2, 3,01} = 4,49$, $P = 0,1245$ za LEAK respiraciju; $F_{2, 3,01} = 5,17$, $P = 0,1063$ za respiratorni kapacitet kompleksa I; $F_{2, 3,01} = 1,03$, $P = 0,4564$ za respiratorni kapacitet kompleksa II; $F_{2, 3,01} = 6,33$, $P = 0,0835$ za respiratorni kapacitet kompleksa I i II; $F_{2, 3,01} = 7,43$, $P = 0,0685$ za aktivnost kompleksa IV) (Tabela 11). Iako ne postoji značajan efekat mitotipa kada se respiracija posmatra na nivou pojedinačnih mitohondrija, može se uočiti trend povišene respiracije kod mužjaka MG1d mitotipa. Naime, parna poređenja urađena Tukey testom pokazala su da MG1d mitotip ima statistički značajno višu LEAK respiraciju ($311,35 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$) u odnosu na MG1a ($176,14 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$) i MG3b ($246 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$) (Slika 10.A), kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I ($5.071,85 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$ u poređenju sa $2.665,25 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$ (MG1a) i $3.279,91 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$ (MG3b)) (Slika 10.B), kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za komplekse I i II ($6.360,83 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$, dok je respiracija MG1a mužjaka $3.459,49 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$ a MG3b mužjaka $4.761,46 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$) (Slika 10.D) i aktivnost kompleksa IV ($20.692,09 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$ u odnosu na MG1d mitotip sa respiracijom od $11.625,66 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$ i MG3b mitotip sa respiracijom od $14.771,81 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$) (Slika 10.E). Ovaj trend se jedino ne uočava za kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II gde su vrednosti respiratornih kapaciteta mužjaka sva tri mitotipa slične ($2.100,82 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$ za MG1a, $2.599,16 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$ za MG1d i $2.766,95 \text{ pmol/s}^{-1}\text{IU}^{-1}$ za MG3b) (Slika 10.C). Ovakvi rezultati su i očekivani s obzirom na to da je kompleks II jedini OXPHOS kompleks koji je u celosti kodiran sa jedarnog genoma.

Kada se rezultati ovog eksperimenta sumiraju, može se zaključiti da MG1d mužjaci imaju najbolji performans pojedinačnih mitohondrija. Međutim, na nivou organizma, u odnosu na količinu mitohondrija, najveća aktivnost i respiratorni kapacitet karakterišu MG1a mitotip, dok je stopa respiracije najmanja kod MG3b mužjaka.

4.4 Određivanje genetičke strukture prirodnih populacija pasuljevog žiška

Za određivanje genetičke strukture prirodnih populacija na nivou mitohondrijskog i jedarnog genoma pasuljevog žiška korišćene su jedinke prikupljene sa 32 lokaliteta širom Srbije i Balkana (Slika 3.2.1, Tabela S1).

4.4.1 Genetička struktura prirodnih populacija na nivou mitohondrijskog genoma

Na nivou mitohondrijskog genoma, genetička struktura prirodnih populacija određena je analizom barkoding regiona *cox1* gena. Ukupno je identifikovano 12 *cox1* haplotipova što uključuje i H2 haplotip poreklom iz laboratorijske B populacije. Svi ostali haplotipovi su pronađeni u prirodnim populacijama. Ovih 12 haplotipova razlikuje se na ukupno 17 nukleotidnih pozicija, to jest 2,587% sekvence (Tabela 12). Sve nukleotidne promene prikazane su u Tabeli 13, sa specificiranim nesinonimnim zamenama kojih ukupno ima četiri. H9 haplotip odlikuje se zamenom serina asparaginom na poziciji 116 proteinskog produkta. H12 je specifičan po tome što ima čak dve aminokiselinske zamene: na pozicijama 174 i 177 sadrži lizin, dok ostali mitotipovi sadrže asparagin i serin. Poslednja aminokiselinska promena karakteriše haplotip H13 koji na 207. poziciji ima serin umesto treonina koji imaju ostali haplotipovi. Distance između haplotipova date su u Tabeli 14. Haplotipovi H7 i H12 su najrazličitiji sa distancama koje dostižu vrednosti i do 0,011 za H7, to jest 0,014 za H12.

U Tabeli 15 prikazane su učestalosti 12 *cox1* haplotipova u 32 ispitivane prirodne populacije kao i u osnivačkoj, B populaciji koja je sakupljena iz tri skladišta iz okoline Beograda 1983. godine i od tad održavana u laboratorijskim uslovima. H3 i H7 su najzastupljeniji haplotipovi – javljaju se u 24 od 33 populacije (H3), to jest u 22 od 33 (H7). U najvećem broju slučajeva ova dva haplotipa javljaju se zajedno

kao jedini identifikovani mitotipovi u populaciji iako im je nukleotidna distanca relativno visoka – 0,008. Populacija sakupljena u Požarevcu je najvarijabilnija sa čak pet identifikovanih haplotipova (H3, H4, H5, H6 i H7). Neke populacije su vrlo specifične po svojoj genetičkoj strukturi ovog markera. Primera radi, populacija iz Sombora je jedina koja pored populacije iz Požarevca ima haplotip H6. Međutim, važno je naglasiti da je ova populacija sakupljena sa pasulja kupljenog na pijaci, a ne direktno od odgajivača pasulja, te je nemoguće tačno odrediti poreklo pasuljevog žiška sa ovog lokaliteta. Pored H6, ima još retkih mitotipova poput H1 koji se javlja samo u B laboratorijskoj populaciji i Zubinom Potoku na Kosovu i Metohiji, H2 koji je specifičan za B laboratorijsku populaciju, H5 specifičan za populaciju iz Požarevca, H9 pronađen samo u Beloj Palanci, H10 karakterističan za Srpsku Crnju i Ličku Jasenicu u Hrvatskoj, H11 pronađen u Zubinom Potoku i Trebinju, H12 koji se sa visokom učestalošću od 0,67 javlja samo u Bogutovačkoj banji i H13 koji je haplotip karakterističan za Matijevac. Na Slici 11 data je haplotipska mreža 12 haplotipova sa koje se može jasno videti njihova raznovrsnost.

Rezultati analize molekulske varijanse (AMOVA) za ovaj mitohondrijski marker prikazani u Tabeli 16 pokazali su da ne postoji grupisanje testiranih populacija višeg ranga. Jedna od hipoteza kojom se može objasniti uočena slika ukupne varijabilnosti podrazumevala je postojanje strukturiranosti populacija na nivou regiona Srbije (istočna, južna, centralna, severna i zapadna Srbija) uz pretpostavku da prenos pasulja može biti intenzivniji u okviru regiona nego između njih. Međutim, F_{CT} vrednost za ovako zadato grupisanje je -0,00260. Isto tako, odbačena je i hipoteza da su veliki rečni tokovi (Sava, Dunav, Morava) geografske barijere koje sprečavaju mešanje populacija s obzirom na to da je F_{CT} vrednost datog grupisanja 0,002990. Konačno, testirana je i hipoteza da postoji razlika između vojvođanskih populacija pasuljevog žiška i onih u ostatku Srbije, postavljena zbog podataka o specifičnim putevima dolaska pasulja u različite delove Srbije u 16. veku. Naime, moguće je da je pasulj u Vojvodinu stigao iz drugih delova tadašnje Austrougarske, dok je u ostatak Srbije došao iz Turske (Bellucci i sar., 2023). Ipak, kao i u prethodnim slučajevima, AMOVA ne potvrđuje ovu hipotezu – F_{CT} vrednost za odvajanje vojvođanskih od ostalih populacija je -0,00148. Dakle, postojeća varijabilnost analiziranih populacija ne može se objasniti postojanjem hijerarhijske strukture višeg ranga. Najveći deo varijabilnosti poreklom je od varijabilnosti unutar populacija (62,54% variranja), a manji između uzorkovanih populacija (37,46%; $F_{ST} = 0,37460$, $P < 0,0001$).

Matrica parnih F_{ST} vrednosti između svih populacija (Slika 12, Tabela S2) jasno pokazuje da postoje značajne razlike između određenih populacija, ali, u skladu sa rezultatima AMOVA, nivo razlika se ne povećava sa geografskom udaljenošću i ne odgovara obrascu nijednog specifičnog grupisanja. Iako F_{ST} vrednosti ukazuju na to da su pojedinačne populacije značajno diferencirane, treba imati na umu da je za sve populacije rađen samo jedan mitohondrijski marker za svega šest uzoraka po populaciji (Tabela S1) i da bi ove se razlike potencijalno mogle smanjiti dodavanjem još markera ili povećanjem uzorka.

4.4.2 Genetička struktura prirodnih populacija na nivou jedarnog genoma

Genetička struktura populacija pasuljevog žiška za jedarni genom određena je korišćenjem šest mikrosatelitskih lokusa čije su karakteristike date u Tabeli 3.3.3.1. Prosečan broj alela u populaciji kreće se od 2,5 do 4,6 (Tabela 17). Najveće razlike između očekivane i izmerene heterozigotnosti zabeležene su u populacijama iz Arandjelovca ($F_{IS} = 0,449$), Vrčina ($F_{IS} = 0,403$) i Pivnica ($F_{IS} = 0,359$). Pozitivne vrednosti ovog indeksa fiksacije unutar populacija ukazuju na procese koji dovode do smanjene učestalosti heterozigota u odnosu na očekivanu kada je populacija u genetičkoj ravnoteži, poput delovanja prirodne selekcije i asortativnog ukrštanja. S druge strane, negativne vrednosti, poput onih izmerenih u populacijama iz Bele Palanke ($F_{IS} = -0,098$), Srpske Crnje ($F_{IS} = -0,003$) i Ličke Jasenice ($F_{IS} = -0,271$) ukazuju na povećanje učestalosti heterozigota u odnosu na očekivanu, i može biti posledica

heterozisa i disasortativnog ukrštanja. Ipak, u većini populacija odstupanje dobijene od očekivane heterozigotnosti nije veliko (Tabela 17).

Rezultati Bajesovog grupisanja populacija u softveru STRUCTURE pokazali su da nema grupisanja populacija, to jest da ne postoje viši nivoi organizacije populacija. Vrednost ΔK bila je najviša (46,48297) za 32 klastera (Slika 13), što je ujedno i broj testiranih populacija. Na osnovu grafika pripadnosti klasterima (Slika 14) jasno je da su i same populacije vrlo varijabilne i da se većina ne izdvaja kao zaseban genetički klaster. Ovo ne važi samo za populaciju iz Sombora i Ličke Jasenice.

Analiza molekulske varijanse urađena na osnovu šest mikrosatelitskih lokusa dala je vrlo slične rezultate analizi mitohondrijskog *cox1* gena. Naime, sve testirane hipoteze (grupisanje po regionima Srbije, prema velikim rečnim tokovima, odvajanje populacija iz Vojvodine i ostatka Srbije) nisu potvrđene, što je i očekivano imajući u vidu rezultate Bajesovog grupisanja. F_{CT} vrednost za odvajanje po regionima je 0,00430 i ne pokazuje statističku značajnost. S druge strane, analiza za odvajanje prema velikim rečnim tokovima dala je F_{CT} vrednost 0,01382 niske statističke značajnosti ali dato odvajanje objašnjava samo 1,38% ukupne varijabilnosti. Isto tako, odvajanje vojvođanskih populacija od populacija iz ostatka Srbije pokazuje nisku značajnost sa vrednošću F_{CT} od 0,02849, ali, opet, objašnjava jako mali procenat varijabilnosti (2,85%). Najveći deo varijabilnosti pripada onoj unutar jedinki (72,32% od ukupne varijabilnosti), manji različitosti između jedinki unutar populacija (12,71%), dok na variranje između populacija odlazi 14,97% ukupne varijabilnosti (Tabela 18).

Na Slici 15 i Tabeli S3 data je matrica parnih F_{ST} vrednosti sa koje se može videti da je mala divergencija između većine parova populacija. Ipak, neke populacije izdvajaju se u odnosu na ostale, poput populacije iz Sombora, Kremne i Ličke Jasenice.

4.5 Efekat kandidat TTŽ i kontrolnih mitotipova na fertilitet u različitim genetičkim i sredinskim kontekstima

Kako efekat bilo kog mitohondrijskog haplotipa na osobine jedinki zavisi od interakcija sa jedarnom sredinom, to jest genetičkog konteksta u kojem je mitotip eksprimiran, ali i od interakcija sa životnom sredinom, pre svega temperaturom, peti cilj ovog istraživanja bio je da se ispita efekat kandidat MG3b i kontrolnih mitotipova na fertilitet mužjaka i ženki u različitim jedarnim i sredinskim uslovima.

Jedan od kriterijuma za izbor jedarnih sredina poreklom iz prirodnih populacija bio je da su F_{ST} vrednosti za jedarne lokuse između ovih populacija statistički značajne. Vodeći se time, i ostalim kriterijumima opisanim u sekciji 3.6 Materijala i Metoda izabrane su populacije sakupljene u Beloj Palanci (BP) koja predstavlja južnu Srbiju, Ravnju (Ra) koje predstavlja zapadnu Srbiju i Srpskoj Crnji (SC) kao reprezentu severne Srbije. S obzirom na veliku varijabilnost i nisku stopu diferencijacije lokalnih populacija, ove vrednosti su generalno niske, ali ispunjavaju navedeni kriterijum. F_{ST} vrednost za Belu Palanku i Ravnje je 0,089, za Belu Palanku i Srpsku Crnju 0,09 a za Ravnje i Srpsku Crnju 0,066 (Tabela S3). Dodatno, vrednosti F_{ST} dobijene analizom 12 mitohondrijskih haplotipova između ovih populacija su visoke i značajne za Belu Palanku i Ravnje (0,631), kao i za Belu Palanku i Srpsku Crnju (0,508), dok je ova vrednost za Ravnje i Srpsku Crnju niža (0,2) i nije statistički značajna (Tabela S2).

4.5.1 Ispitivanje uticaja različitih jedarnih sredina na ispoljavanje efekta kandidata TTŽ i kontrolnih mitotipova na fertilitet na standardnoj temperaturi

Polovina ovog eksperimenta rađena je na temperaturi od 30°C što predstavlja standardnu temperaturu na kojoj se održavaju sve laboratorijske populacije i linije pasuljevog žiška i imala je za cilj da ispita efekat mitotipova u tri varijabilne jedarne sredine.

Rezultati mešanog modela analize varijanse **za ženke** pokazali su da je efekat mitotipa na fertilitet statistički značajan ($F_{2,9} = 21,48$, $P = 0,0004$) (Tabela 19) što je posledica toga što ženke MG1a mitotipa imaju povišen fertilitet u odnosu na ženke druga dva mitotipa (Slika 16.A). Naime, MG1a ženke u proseku su imale 38,21 potomaka, dok su MG1d i MG3b ženke ostavljale značajno manje, 28,5 i 27,07 potomaka, redom. Dodatno, značajan je i efekat jedarne sredine ($F_{2,9} = 5,35$, $P = 0,0294$) zbog toga što jedinke sa jedrom iz Srpske Crnje ostavljaju manji broj potomaka (27,81) u odnosu na jedinke sa jedrima iz Bele Palanke (32,47) ili Ravnja (33,5). Konačno, efekat mito-jedarnih interakcija ($M \times J$ u Tabeli 19) nije pokazao statističku značajnost ($F_{4,9} = 0,81$, $P = 0,5518$). Varijabilnost između replika unutar mito-jedarnih interakcija (replika ($M \times J$) u Tabeli 19) je statistički značajna ($F_{9,1062} = 2,35$, $P = 0,0125$). Važno je naglasiti da MG3b ženke ni u jednoj sredini nemaju značajno manje vrednosti fertiliteta od kontrolnog MG1d mitotipa.

Rezultati mešanog modela analize varijanse za fertilitet **kod mužjaka** nosilaca različitih mito-jedarnih kombinacija pokazali su da MG3b mitotip u svim jedarnim sredinama dovodi do značajnog smanjenja fertiliteta u odnosu na kontrole (Slika 16.B). To se ogleda u značajnom efektu mitotipa ($F_{2,9} = 22,02$, $P = 0,0003$) prikazanom u Tabeli 19. MG1a mužjaci, kao i MG1a ženke, u proseku ostavljaju najviše potomaka (34,78), MG1d mužjaci manje (28,82) dok MG3b mužjaci statistički imaju najmanji fertilitet (18,09). Ovo smanjenje fertiliteta MG3b mužjaka u odnosu na kontrolne mužjake procentualno iznosi u proseku 40,84% (najmanje smanjenje iznosilo je 19,79% između MG3b i MG1d mužjaka sa jedrom iz Bele Palanke, a najveće 54,2% između MG3b i MG1a mužjaka sa jedrom iz Ravnja). Efekat jedarne sredine je takođe statistički značajan ($F_{2,9} = 5,84$, $P = 0,0236$) jer je fertilitet mužjaka najveći kada im je mitohondrijski haplotip eksprimiran u jedarnoj sredini poreklom iz Ravnja, sa prosečnom vrednošću broja potomaka od 31,88 (Slika 16.B). Sa druge strane, najmanje vrednosti fertiliteta imaju mužjaci sa jedarnom sredinom iz Bele Palanke (23,24). Efekat mito-jedarnih interakcija na fertilitet mužjaka nije pokazao statističku značajnost ($F_{4,9} = 2,27$, $P = 0,1409$) što ukazuje na to da efekat pojedinačnog mitotipa ne zavisi od toga u kojoj jedarnoj sredini je eksprimiran. Dodatno, varijabilnost replika ugnežđenih u mito-jedarne interakcije bila je statistički značajna ($F_{9,1062} = 6,70$, $P < 0,0001$).

4.5.2 Ispitivanje uticaja različitih jedarnih sredina na ispoljavanje efekta kandidata TTŽ i kontrolnih mitotipova na fertilitet na povišenoj temperaturi

Drugi deo eksperimenta pratio je istovetni dizajn, s tom razlikom da su parovi kojima je meren fertilitet držani na povišenoj temperaturi od 32°C od momenta kada su smešteni u Petri šolje do izlaska svog potomstva iz semena pasulja. Dakle, reprodukcija i celo razviće odvijali su se na temperaturi koja se u prethodnom laboratorijskom iskustvu pokazala kao stresna za ovu vrstu.

Mešani model analize varijanse za podatke o fertilitetu **ženki** na povišenoj temperaturi pokazao je bitno različite rezultate u odnosu na analizu podataka na temperaturi od 30°C. Naime, u ovom slučaju ni mitotip ni jedarna sredina nemaju značajan uticaj na variranje osobine ($F_{2,9} = 0,77$, $P = 0,4927$ za mitotip; $F_{2,9} = 1,04$, $P = 0,3916$ za jedarnu sredinu) (Tabela 20). Srednje vrednosti fertiliteta MG1a, MG1d i MG3b ženki su slične: 29,52 za MG1a ženke, 27,21 za MG1d ženke i 24,67 za MG3b ženke. Međutim, na osnovu Slike 16.C može se zaključiti da se i na ovoj temperaturi zadržava trend povećanog prosečnog fertiliteta MG1a ženki u svim jedarnim sredinama osim u Ravnju. Iako efekat jedra nije značajan, interesantno je primetiti da na povišenoj temperaturi jedinke sa jedarnom sredinom iz Ravnja imaju najmanje vrednosti fertiliteta, dok su na standardnoj temperaturi imale najviše. Naime, prosečne vrednosti njihovog fertiliteta su 24,76 potomaka, dok su za jedinke sa jedrom iz Srpske Crnje i Bele Palanke redom 26,66 i 30,32 potomaka. Mito-jedarne interakcije ni ovde ne pokazuju značajan efekat ($F_{4,9} = 1,05$, $P = 0,4348$) na variranje osobine, dok se replike unutar mito-jedarnih kombinacija značajno razlikuju među sobom ($F_{9,1047} = 9,27$, $P < 0,0001$).

Rezultati analize varijanse fertiliteta **mužjaka** na temperaturi od 32°C vrlo su slični onima kod ženki. Dakle, i u ovoj analizi su se mitotip i jedarna sredina pokazali kao nevažni izvori variranja osobine ($F_{2,9} = 0,65$, $P = 0,5456$ za mitotip; $F_{2,9} = 1,77$, $P = 0,8557$ za jedarnu sredinu) (Tabela 20), a u istoj analizi kod mužjaka na 30°C bili su statistički značajni. Ipak, vredno je zapažanja da iako vrlo slične vrednostima ostalih mužjaka, fertilitet MG3b mužjaka je najmanji i na povišenoj temperaturi (22,74 u odnosu na 25,73 MG1a mužjaka i 26,13 MG1d mužjaka) (Slika 16.D). Veoma je upečatljivo i to da, iako nema značajnog efekta jedarne sredine, jedinke sa jedrom iz Bele Palanke ostavljaju prosečno najviše potomaka (28,15) što je suprotno rezultatima na 30°C gde su ovi mužjaci ostavljali najmanje potomaka, a u skladu sa rezultatima kod ženki na 32°C. Takođe, mužjaci (kao i ženke) sa jedrom iz Ravnja na povišenoj temperaturi ostavljaju najmanje potomaka (22,09) a na standardnoj temperaturi ostavljali su najviše u odnosu na mužjake druga dva mitotipa. Ni u ovom slučaju nije uočen značajan efekat mito-jedarnih interakcija ($F_{4,9} = 0,32$, $P = 0,8557$) a jeste replika ugnežđenih u mito-jedarne interakcije ($F_{9,1062} = 11,79$, $P < 0,0001$).

4.5.3 Ispitivanje uticaja interakcija temperature, jedarne sredine i mitotipa na fertilitet kandidata TTŽ i kontrolnih mitotipova

Cilj ovakvog dizajna testiranja efekta mito-jedarnih kombinacija na fertilitet na standardnoj i stresnoj temperaturi bio je da se, poredeći rezultate iz prvog i drugog dela eksperimenta, razluči efekat koji ostvaruju interakcije mitotipa, jedra i temperaturne sredine na fertilitet mužjaka i ženki.

Kada je analiza varijanse urađena na podacima za fertilitet **ženki** na obe temperature rezultati su, slično i kada su analizirani samo podaci na 30°C, pokazali da je efekat mitotipa ($F_{2,9} = 10,08$, $P = 0,0050$) značajan izvor variranja ove osobine (Tabela 21). Ovaj efekat je posledica toga što su ženke MG1a mitotipa u proseku najuspešnije sa najvišim vrednostima fertiliteta na obe temperature. Ovo je najpre posledica razlika u mitotipovima na standardnoj temperaturi, s obzirom na to da su razlike u prosečnom fertilitetu ženki različitih mitotipova na povišenoj temperaturi znatno manje. Jedarna sredina, s druge strane, ne ostvaruje značajan uticaj na variranje fertiliteta ($F_{2,9} = 2,50$, $P = 0,1371$). Izostanak efekta jedra može se pripisati potpuno drugačijim trendovima na različitim temperaturama koji se onda poništavaju: na standardnoj temperaturi od 30°C najveće vrednosti fertiliteta imaju ženke sa jedrom iz Ravnja, a najmanje sa jedrom iz Srpske Crnje, dok na povišenoj temperaturi od 32°C ženke sa jedrom iz Ravnja su te sa najmanjim vrednostima prosečnog fertiliteta, dok najveće imaju ženke sa jedrom iz Bele Palanke. Temperatura je pokazala visoku statističku značajnost kao faktor koji najviše utiče na ispoljavanje fertiliteta ($F_{1,2118} = 32,71$, $P < 0,0001$). Očekivano, u proseku je fertilitet ženki bio viši na temperaturi od 30°C (31,26 potomaka) nego na povišenoj temperaturi (27,13 potomaka). Kada se razlika između vrednosti fertiliteta na dve temperature posmatra unutar svakog mitotipa zasebno, upečatljivo je da do statistički značajnog pada vrednosti dolazi samo kod MG1a (fertilitet sa 38,21 pada na 29,52; $t_{666,33} = 6,85$, $P < 0,0001$), dok je kod ženki druga dva mitotipa smanjenje fertiliteta mnogo manje i nije statistički značajno ($t_{702,31} = 1,00$, $P = 0,3164$ za MG1d; $t_{712,29} = 1,74$, $P = 0,0819$ za MG3b) (Slika 17). Kada je reč o interakcijama između različitih faktora, rezultati analize u skladu su sa analizama na temperaturama od 30°C i 32°C gde se ne uočava značajan efekat mito-jedarnih interakcija ($F_{4,9} = 1,94$, $P = 0,1873$). S druge strane, sve interakcije sa temperaturom pokazale su statističku značajnost ($F_{2,2118} = 10,88$, $P < 0,0001$ za interakcije mitotipa i temperature; $F_{2,2118} = 11,20$, $P < 0,0001$ za interakcije jedarne sredine i temperature; $F_{4,2118} = 2,40$, $P = 0,0481$ za interakcije mitotipa, jedarne sredine i temperature). Ovakvi rezultati nisu iznenađujući posmatrano u kontekstu prethodno obrazloženih rezultata. Naime, značajan efekat interakcija mitotipa i temperature može se pripisati antagonističkom dejstvu MG1a mitotipa u jedarnoj sredini iz Ravnja na dve temperature: na standardnoj temperaturi svojim nosiocima obezbeđuje najviše vrednosti fertiliteta, dok na povišenoj temperaturi dovodi do ispoljavanja najnižih vrednosti fertiliteta.

Statistički značajan efekat interakcije jedarne i temperaturne sredine poreklom je od već opisanih drugačijih trendova efekata različitih jedarnih sredina na fertilitet ženki na 30°C i 32°C, dok značajan efekat interakcije sva tri faktora ($M \times J \times T$) ukazuje na kompleksan odnos i uticaj koji ovi faktori imaju na formiranje fenotipa. Konačno, i replike ugneždene u mito-jedarne interakcije značajno su varirale između sebe ($F_{9, 1939} = 4,39$, $P < 0,0001$). Važno je naglasiti da bez obzira na temperaturu i jedarnu sredinu kojima su mitotipovi izloženi, ženke kandidat MG3b mitotipa nemaju statistički značajno smanjen fertilitet u odnosu na MG1d kontrolni mitotip (Slika 17).

Analiza varijanse fertiliteta **mužjaka** na standardnoj i povišenoj temperaturi takođe je pokazala da je mitohondrijski haplotip značajan izvor variranja ove osobine ($F_{2, 9} = 7,77$, $P = 0,0109$) (Tabela 21). Ovo je posledica velikih razlika u prosečnom broju potomaka mužjaka tri mitotipa na obe temperature: MG1a mužjaci ostavljaju 30,25 potomaka, MG1d 27,47 dok su MG3b mužjaci značajno pogođeni i ostavljaju u proseku samo 20,41 potomaka. Ipak, interesantno je naglasiti da iako MG3b mužjaci ostavljaju najmanje potomaka u proseku bez obzira na temperaturne uslove, dok se za mitotipove MG1a i MG1d fertilitet značajno smanjio pri povećanju temperature (sa 34,78 na 25,73, $t_{712,72} = 8,72$, $P < 0,0001$ za MG1a; sa 28,82 na 26,13, $t_{706,92} = 2,38$, $P = 0,0174$ za MG1d) fertilitet MG3b mužjaka se zapravo povećao sa povećanjem temperature (sa 18,09 na 22,74, $t_{708,37} = -4,94$, $P < 0,0001$) (Slika 17). Dakle, ne iznenađuje što je mešani model analize varijanse pokazao izuzetno značajan efekat interakcije mitotipa i temperature ($F_{2, 2133} = 49,65$, $P < 0,0001$). Efekat temperature je takođe značajan ($F_{1, 2133} = 17,73$, $P < 0,0001$) zbog toga što u proseku dolazi do značajnog smanjenja fertiliteta mužjaka pri povećanju temperature – sa 27,23 potomka koliko u proseku ostavljaju na 30°C fertilitet na pada na 24,87 potomaka 32°C. Efekat jedarne sredine na variranje fertiliteta mužjaka nije pokazao statistički značajan efekat ($F_{2, 9} = 0,21$, $P = 0,8174$). Slično ženka, nepostojanje značajnog efekta zapravo je poreklom od veoma interesantnog rezultata da se na dve temperature u potpunosti menja trend fertiliteta mužjaka sa različitim jedarnim sredinama. Ovi rezultati se uklapaju sa činjenicom da su interakcije između jedarne sredine i temperature statistički najznačajniji faktor koji utiče na variranje fertiliteta mužjaka ($F_{2, 2133} = 57,02$, $P < 0,0001$). Ni u puliranim podacima za obe temperature ne uočava se značajan efekat mito-jedarnih interakcija na fertilitet mužjaka ($F_{4, 9} = 0,69$, $P = 0,6143$). Dodatno, visoku statističku značajnost pokazuju interakcije mitotipa, jedra i temperature ($F_{4, 2133} = 9,50$, $P < 0,0001$). Replike ugneždene u $M \times J$ značajno su doprinele variranju fertiliteta mužjaka ($F_{9, 2133} = 14,00$, $P < 0,0001$).

Rezultati ovog eksperimenta pokazali su da mitohondrijski haplotip, jedarna sredina, temperatura i njihove interakcije na veoma kompleksan način oblikuju osobine životnih istorija mužjaka i ženki.

4.6 Dinamika rasta i promena učestalosti mitotipova u populacijama sa različitim udelima trojanskih ženki

Šesti i poslednji cilj ove disertacije bio je da se utvrde procesi na populacionom nivou nakon što se u prirodnu populaciju introdukuju ženke sa kandidat TTŽ, to jest kontrolnim mitotipovima u različitim učestalostima: 25% i 75% od ukupnog broja ženki u populaciji.

4.6.1 Promena učestalosti mitotipova kroz generacije

Učestalosti ubačenih mitohondrijskih haplotipova, MG1a, MG1d i kandidat TTŽ mitotipa MG3b zabeležene su u 2., 5., i 10. generaciji (Slika 18). Upečatljivo je to što je bez obzira na mitotip i njegovu startnu učestalost, u svim populacijama došlo do fiksacije ubačenog mitotipa. MG1a mitotip fiksiran je već u drugoj generaciji i u slučaju startne učestalosti od 25% i 75%. MG1d mitotip u drugoj generaciji u populaciji sa startnim udelom od 25% ima prosečnu učestalost od 91,6%, dok mu prosečna učestalost u

populaciji sa startnim udelom od 75% iznosi 83,3%. U petoj generaciji ovaj mitotip je fiksiran. Učestalost MG3b mitotipa takođe se povećala u drugoj generaciji: za udeo od 25% učestalost mu je bila 91,67% a za udeo od 75% iznosila je 89,58%. Kao i MG1d, u petoj generaciji je fiksiran (Slika 18). Zbog toga što su prosečne učestalosti mitotipova u populacijama sa 25% i 75% startnim udelima veoma slične u drugoj generaciji, a identične u petoj, u daljim analizama se faktor udela nije uzimao u obzir.

4.6.2 Populaciono-ekološki parametri rasta populacije

Za sve populacione parametre prave i pseudovrednosti dobijene *jackknife* procedurom bile su vrlo slične ili identične (Tabela 22). Ovakvi rezultati ukazuju na adekvatnost korišćenja *jackknife* procedure i utvrđenih parametara (Maia i sar., 2000) te su za grafički prikaz rezultata korišćene pseudovrednosti.

Parametri rasta populacije ukazuju na trend da, bez obzira na mitotip ubačen u prirodnu populaciju, stope rasta populacije veće su u petoj u odnosu na drugu generaciju (Tabela 22, Slika 19). Naime, u drugoj generaciji, vrednosti konačne stope rasta populacije (λ) su 1,09926 za MG1a, 1,09933 za MG1d i 1,09685 za MG3b, dok su vrednosti istog parametra u petoj generaciji više: 1,10826 za MG1a, 1,10765 za MG1d i 1,11083 za MG3b. Vrednosti između mitotipova unutar generacije nisu statistički značajne, dok između generacija jesu, iako je interesantno primetiti da MG3b ima najmanje vrednosti u drugoj generaciji a najviše u petoj u odnosu na ostale mitotipove (Slika 19, Tabela 22). Potpuno isti trend uočljiv je i za intrinzičku stopu rasta (r_m) i vreme za koje populacija udvostruči brojnost (Dt) (Slika 19, Tabela 22). Kada je reč o neto stopi reprodukcije ženki (R_0) populacija u koju je ubačen kandidat MG3b mitotip u drugoj generaciji ima statistički značajno nižu vrednost u odnosu na populaciju sa kontrolnim MG1a mitotipom (za MG3b $R_0 = 13,5434$, a za MG1a $R_0 = 15,0209$) (Slika 19, Tabela 22, Tabela 23). I u ovom slučaju vrednosti parametra u petoj generaciji značajno su više u odnosu na vrednosti u drugoj generaciji za sva tri mitotipa ((Slika 19, Tabela 22, Tabela 23), pri čemu MG3b ima najniže vrednosti i u drugoj i u petoj generaciji. Konačno, srednje vreme generacije T pokazuje drugačiji trend variranja vrednosti. Statistički najduže vreme generacije imaju jedinke iz populacije u koju je ubačen MG1a mitotip nakon dve generacije (28,6335 dana). U petoj generaciji skraćuje se razviće, te je srednje vreme generacije u ovoj populaciji 28,1189 dana (Slika 19, Tabela 22, Tabela 23). Kod MG1d mitotipa ne dolazi do značajne promene u prosečnom vremenu generacije u petoj u odnosu na drugu generaciju (Tabela 23). Međutim, MG3b mitotip je specifičan po tome što mu se u petoj generaciji vreme generacije intenzivno skraćuje – za ceo jedan dan. Naime, u drugoj generaciji srednje vreme generacije mu je 28,1925 dana, dok je u petoj generaciji ta vrednost 27,0874 dana (Slika 19, Tabela 22, Tabela 23).

Skraćivanje vremena generacije, to jest preadultnog razvića, MG3b mitotipa u petoj generaciji u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe vidi i se iz dinamike polaganja jaja ženki (Slika 20). Jedinke iz populacije sa MG1a mitotipom koje imaju najduže srednje vreme generacije u odnosu na ostale mitotipove karakteriše i najkasniji pik polaganja jaja – u 32. danu razvića i u drugoj i u petoj generaciji. Populaciji sa MG1d mitotipom pik je pomeren par dana ranije – između 30. i 32. dana razvića u F_2 generaciji i 30. i 31. dan u F_5 generaciji. U drugoj generaciji pik polaganja jaja populacije sa ubačenim MG3b mitotipom nije upečatljiv – kao i za MG1d traje od 30. do 32. dana razvića. Međutim, u petoj generaciji, broj položenih jaja najveći je u 28. i 29. danu razvića, značajno ranije u odnosu na sve ostale eksperimentalne grupe (Slika 20).

5. DISKUSIJA

5.1 „Materinska kletva“ u laboratorijskim populacijama pasuljevog žiška

Hipoteza materinske kletve predviđa da se u mitohondrijskim genomima nakupljaju mutacije sa negativnim efektima na adaptivnu vrednost mužjaka, a istovremeno neutralnim ili čak korisnim efektom na adaptivnu vrednost ženki. Nakupljanje takvih mutacija, štetnih za muški pol, omogućeno je činjenicom da prirodna selekcija na ovaj genom deluje isključivo preko ženske linije nasleđivanja (Gemmell i sar., 2004). Imajući u vidu da se u jedarnom genomu, koji je selektivno prepoznat i u muškoj liniji nasleđivanja, mogu pojaviti kompenzacione mutacije koje će biti selektivno favorizovane usled epistatičkih interakcija između mitohondrijskog i jedarnog genoma, jasno je da koevolucija dva genoma potencijalno može zamaskirati polno specifični efekat mtDNK varijabilnosti na adaptivnu vrednost mužjaka. Postojanje mutacija na mtDNK sa opisanim polno specifičnim štetnim efektom može biti utvrđeno ukoliko se „uklone“ kompenzacione mutacije u jedarnom genomu, odnosno kada se različiti mitotipovi ekspimiraju naspram jedarne sredine sa kojim mitohondrije nisu koevoluirale (Dowling i Adrian, 2019).

Iako hipoteza materinske kletve ima jaku teorijsku osnovu, dosadašnja istraživanja nisu uspela da je nesporno potvrde u velikom broju životinjskih taksona. Kod biljaka je ovaj fenomen dobro izučen i dokazan (Budar i sar., 2003; Chase i sar., 2007; Case i sar., 2016), dok su kod životinja dokazi ređi i ograničeni na mali broj model taksona, a rezultati istraživanja često oprečni (Edmands, 2024). Brojna su istraživanja koja su ustanovila veći efekat mitohondrijske varijabilnosti na variranje osobina ženki u odnosu na mužjake (Mossman i sar., 2016b; Mossman i sar., 2017; Hoekstra i sar., 2018; Nagarajan-Radha i sar., 2019; Anderson i sar., 2022; Betinazzi i sar., 2024), što je u suprotnosti sa očekivanjima hipoteze materinske kletve (Dowling i Adrian, 2019). Analize većeg broja kičmenjačkih vrsta pokazale su nepostojanje ili jako mali uticaj mutacija materinske kletve na osobine jedinki iz analiziranih populacija (Leeflang i sar., 2021; Cayuela i sar., 2023). Dodatno, raznolikost istraživanja po dizajnu i izboru statističkih metoda za analizu podataka predstavlja teškoću za poređenje različitih studija i taksona (Dowling i Adrian, 2019). S obzirom na veliki dijapazon veoma različitih rezultata i zaključaka, razumevanje fenomena materinske kletve zahteva analizu još većeg broja vrsta, uključujući i brojne taksona koji nisu model organizmi, kao i precizno formulisanje hipoteze koja će potom biti testirana vodeći se već uspostavljenim protokolima.

5.1.1 Potraga za mitotipom sa negativnim polno specifičnim efektom na mužjake

U ranijim istraživanjima laboratorijskih populacija pasuljevog žiška ustanovljeno je da mitohondrijska varijabilnost jeste nesporno selektivno prepoznatljiva (Đorđević i sar., 2015; Đorđević i sar., 2017; Stojković i sar., 2017). Štaviše, rezultati ovih studija pokazali su da je efekat mitohondrijske varijabilnosti na fenotipsku polno specifičan, to jest ima veći negativni efekat na adaptivnu vrednost mužjaka u odnosu na ženke (Đorđević i sar., 2015; Đorđević i sar., 2017). Vodeći se ovim podacima, kao i Daulingovim i Adrijanovim smernicama za određivanje efekta materinske kletve (Dowling i Adrian, 2019), u prvoj fazi izrade ove disertacije ispitivan je efekat svih identifikovanih laboratorijskih mitotipova na osobine jedinki. Na osnovu sekvence osam mitohondrijskih protein-kodirajućih gena određeno je šest mitotipova (MG1a, MG1b, MG1c, MG1d, MG3a i MG3b) čiji je efekat na osobine životne istorije mužjaka i ženki pasuljevog žiška u delimično narušenoj, to jest nekoevoluiranoj, jedarnoj sredini potom testiran. Mitotipovi su pokazali značajnu divergenciju sekvenci (i do 0,72%) što prevazilazi divergencije mitotipova u sličnim istraživanjima *Drosophila melanogaster* koja su

detektovala mitohondrijske mutacije sa polno specifičnim efektom; kod ove vrste ispitivani mitotipovi su se razlikovali do 0,4% (Clancy, 2008; Innocenti i sar., 2011; Yee i sar., 2013; Carnegie i sar., 2021). Dakle, iako su svi korišćeni mitotipovi pasuljevog žiška u ovoj disertaciji poreklom iz laboratorijskih populacija, a ne prirodnih kao u navedenim radovima, pronađena varijabilnost je bila visoka i odgovarajuća za ispitivanje uticaja mitohondrijske na fenotipsku varijabilnost. Ustanovljeno je, takođe, da svi analizirani mitotipovi sadrže specifične nesinonimne supstitucije, to jest kodiraju za proteinske produkte specifičnih aminokiselinskih sekvenci. Imajući u vidu da materinska kletva predstavlja nakupljanje mtDNK mutacija štetnih po mužjake, malo je verovatno da bi samo jedna mutacija mogla izazvati efekte materinske kletve. Teorijska genetička predviđanja zasnivaju se na aditivnom modelu više mutacija sa manjim negativnim fenotipskim efektom na adaptivnu vrednost mužjaka (Camus i sar., 2012; Wolff i Gemmell, 2013). Šest ustanovljenih mitotipova u laboratorijskim populacijama pasuljevog žiška, sa različitim nivoima divergencije i brojnim sinonimnim i nesinonimnim razlikama, predstavljali su dobru osnovu za ispitivanje materinske kletve, evolucionog fenomena koji je predmet istraživanja ove disertacije.

Ukrštanjem ženki nosilaca specifičnog mitotipa i mužjaka sa novom, heterogenom jedarnom sredinom, delimično su narušene koevoluirane mito-jedarne interakcije (Slika 3.4.1). Jedinkama sa takvom kombinacijom mitohondrijskog i jedarnog genotipa merene su različite osobine životne istorije – preadultni vijabilitet, totalni fekunditet i dužina života. Rezultati su pokazali značajan efekat mitohondrijskog genoma i njegovih varijanti na variranje svih analiziranih osobina kod mužjaka, dok je kod ženki mitotip imao uticaj samo na variranje preadultnog vijabiliteta i fekunditeta. Komparativne analize osobina žižaka sa različitim mitotipovima, izdvojile su mitotip MG3b kao varijantu mitohondrijskog genoma sa očekivanim karakteristikama hipoteze materinske kletve, to jest smanjivao je adaptivnu vrednost mužjaka u odnosu na mužjake drugih mitotipova, dok na ženke nije imao uticaj. Ovaj mitotip smanjivao je kako preadultni vijabilitet potomaka MG3b mužjaka, tako i fekunditet ženki sa kojima su se ovi mužjaci parili, uz odsustvo negativnog efekta na dužinu života. Interesantno je da je MG3a mitotip, koji se od MG3b razlikuje u samo dve nukleotidne zamene, jednoj sinonimnoj u *nad4l* genu i jednoj nesinonimnoj u *cox2* genu, ispoljavao potpuno drugačiji efekat, ostvarujući pozitivan uticaj na vijabilitet i fekunditet mužjaka. Budući da su MG1b i MG1c mitotipovi doveli do pada adaptivne vrednosti i mužjaka i ženki, a da MG1a i MG1d mitotipovi nisu ispoljavali štetan efekat ni na mužjake ni na ženke, za detaljnije analize uticaja mitotipa na osobine životne istorije mužjaka i ženki pasuljevog žiška izabrani su MG3b, kao kandidat TTŽ mitotip, i MG1a i MG1d kao kontrolni mitotipovi.

Činjenica da mitotipska varijabilnost ima značajan efekat na variranje dužine života kod mužjaka, ali ne i ženki u potpunom je skladu sa rezultatima Kamus i saradnika, premda su ovi autori pokazali povezanost između broja razlika između mitotipova i razlika u njihovom efektu na dužinu života jedinki (Camus i sar., 2012). Kod pasuljevog žiška MG1b i MG1c mitotipovi značajno smanjuju dužinu života kod mužjaka u odnosu na MG1a i MG1d mitotipove od kojih se razlikuju u samo jednoj do dve nukleotidne zamene. Dodatno, razlika u efektima MG3a i MG3b mitotipova na reproduktivni potencijal mužjaka nesrazmerna je malom broju nukleotidnih razlika između njih. Prikazani rezultati nisu potvrdili predviđanja da su negativni efekti na mužjake a neutralni na ženke MG3b mitotipa posledica aditivnog efekta mutacija sa pojedinačno malim efektima, već su pokazali da pojedinačne sinonimne i/ili nesinonimne mutacije mogu ispoljiti značajan uticaj na osobine životne istorije.

5.1.2 MG3b mitotip – „materinska kletva“ i potencijalna primena u „tehnicu trojanskih ženki“

Pri testiranju osobina životne istorije izabrana su tri mitotipa (MG1a, MG1d i MG3b), a poseban fokus usmeren je na komponente reproduktivnog potencijala mužjaka i ženki, s obzirom na teorijska i empirijska predviđanja da je reproduktivno tkivo najpodložnije efektima mutacija materinske kletve

(Gemmell i sar., 2004; Dowling i Adrian, 2019). Ukoliko je dužina života kod većine vrsta polno dimorfna osobina, postavljena je hipoteza po kojoj bi materinska kletva mogla biti jedan od razloga ovog fenomena (Cayuela i sar., 2023). Iz tog razloga testiran je i efekat mitotipova i na dugovečnost žižaka. Dodatno, tehnika trojanskih ženki zasniva se na smanjenju isključivo reproduktivne funkcije mužjaka, dok ostale osobine životne istorije, poput dužine života, ne bi smele biti ugrožene.

Kod pasuljevog žižka, parenje podrazumeva deponovanje spermatofore mužjaka u ženski genitalni trakt. Ovaj čin stimuliše oogenezu i ovipoziciju i privremeno smanjuje receptivnost ženki za ponovno parenje (Huignard, 1982). Specifična odlika ponašanja ovih insekata podrazumeva da ženke vremenski odlažu polaganje jaja u nepovoljnim uslovima životne sredine, kao što je izostanak semena biljke domaćina ili fertilnog partnera koji je u stanju da jaja oplodi (Šešlija i sar., 2009a). Ukoliko se povoljni uslovi ne ostvare, ženke će pri kraju svog života položiti jaja, kako oplođena tako i neoplođena. Ovaj fenomen se označava kao napuštanje jaja (engl. *egg dumping*). Iz jaja položenih kasnije u toku života žižaka izleže se manji broj jedinki nego iz jaja položenih u prvim nekoliko dana ovipozicije (Parsons i Credland, 2003). Iz tog razloga rani fekunditet, a ne totalni, bolja je mera reproduktivnog uspeha ženki i mužjaka. Rezultati dobijeni na osnovu analize ranog i totalnog fekunditeta i fertiliteta ženki i mužjaka koji nose različite ispitivane mitotipove, upravo oslikavaju ovaj fenomen. Naime, najizraženiji rezultat ovog eksperimenta, koji se uklapa u očekivanja hipoteze materinske kletve, predstavlja pad u ranom fekunditetu ženki koje su se ukrštale sa MG3b mužjacima, a u odnosu na ženke ukrštane sa mužjacima drugih mitotipova, kao i u fertilitetu MG3b mužjaka u odnosu na druge mužjake. Pad fertiliteta i ranog fekunditeta iznosio je oko 35%. S druge strane, mitotip mužjaka nije uticao na promenu vrednosti totalnog fekunditeta, što se i očekuje imajući u vidu fenomen napuštanja jaja. Rezultati ukazuju da je pad fertiliteta, to jest ukupnog broja potomaka MG3b mužjaka uzrokovan smanjenjem broja oplođenih jaja, odnosno smanjenjem oplodne sposobnosti mužjaka i/ili kvaliteta njihove sperme. Kod ženki, variranje sve tri osobine nije zavisno od mitotipa, uključujući i MG3b mitotip.

Molekulsko-biološkim analizama MG3b i dva kontrolna mitotipa, MG1a i MG1d, dodatno su okarakterisane sekvence još pet protein-kodirajućih gena (čime je okarakterisano svih 13 mitohondrijskih protein-kodirajućih gena), i utvrđeno je da se MG3b mitotip razlikuje za 0,74%, tj. 0,77% od ostala dva mitotipa, što uključuje čak sedam aminokiselinskih promena u pet različitih gena: *nad2*, *cytb*, *cox2*, *atp6* i *atp8*, koji kodiraju proteinske komponente u kompleksima I, III, IV i V. Od pomenutih aminokiselinskih promena, u dva slučaja je aminokiselina drugačijih hemijskih svojstava u odnosu na onu koja se javlja kod kontrolnih mitotipova: u proteinskom produktu *atp6* gena kod MG3b mitotipa javlja se bazna aminokiselina lizin, dok se kod kontrola javlja neutralni serin i u produktu *nad2* gena za MG3b karakteristična je polarna aminokiselina treonin dok se kod druga dva mitotipa javlja nepolarni izoleucin. Interesantno je da se i u dva prethodno potvrđena i istražena mitotipa materinske kletve kod vrste *Drosophila melanogaster* takođe javljaju nesinonimne mutacije u *cytb* i *cox2* genima. Klensi i saradnici identifikovali su mutaciju u *cytb* genu BRO mitotipa za koji je utvrđeno da uzrokuje sterilnost mužjaka u specifičnoj jedarnoj sredini (Clancy, 2008; Yee i sar., 2013). Ova mutacija dovodi do aminokiselinske zamene (Ala-278-Thr) u regionu proteina koji katalizuje oksidaciju ubikvinola (Clancy i sar., 2011). Autori smatraju da opisana aminokiselinska zamena dovodi do produkcije veće količine reaktivnog superoksida čime objašnjavaju potencijalni mehanizam sterilišućeg efekta BRO mitotipa. Kako se pokazalo, testisi pogođenih mužjaka nisu formirali individualizacioni kompleks neophodan za formiranje spermatida. Umesto toga, u testisima su bile uočljive grupacije spojenih spermatida koje su vremenom degradirane. Imajući u vidu da su muške polne ćelije izuzetno osetljive na oksidativna oštećenja jer su im ćelijske membrane bogate polinezasićenim masnim kiselinama sklonima oksidaciji, uz odsustvo endogene katalaze i glutationa koji bi potencijalna oksidativna oštećenja sprečili (Agarwal i sar., 2003), upravo se kod ovih ćelija može očekivati najveća šteta poreklom od produkcije veće količine ROS-ova izazvane BRO mitotipom. Druga istraživačka grupa je na istoj vrsti pronašla još jedan mitotip, G177S,

koji u specifičnoj jedarnoj sredini dovodi do pada fertilnosti mužjaka, dok na ženke nema negativan efekat (Patel i sar., 2016). Upečatljivo je da i BRO i G177S mitotip štete mužjacima u istoj, w1118 jedarnoj sredini. G177S odlikuje se nesinonimnom mutacijom u *cox2* genu (Gly-177-Ser). Ženke koje su se parile sa mužjacima G177S mitotipa polagale su isti broj jaja kao i ženke parene sa drugim mužjacima, ali su ta jaja mahom bila neoplođena. Kao i kod BRO mitotipa, spermatide uglavnom nisu završavale proces individualizacije. Dodatno, spermatozoidi koji jesu završili razviće imali su smanjenu pokretljivost. Interesantno je da je ova mutacija asocirana sa smanjenim nivoom ROS-a kod pogođenih mužjaka (Patel i sar., 2016). Dakle, iako BRO i G117S mitotipovi dovode do vrlo sličnog fenotipa, mehanizmi njihovog delovanja su različiti.

Ni kod jednog pola pasuljevog žiška nije ustanovljeno statistički značajno variranje dužine života u odnosu na mitotip. Slične rezultate dobili su Votson i saradnici koji su testirali efekat četiri distinktna mitotipa na osobine životne istorije vrste *Tigriopus californicus* (Watson et al., 2022). S druge strane, istraživanja Kamus i saradnika (Camus i sar., 2012) i Av i saradnika (Aw i sar., 2017) utvrdila su značajan efekat mitotipa na dužinu života mužjaka, ali ne i ženki vinske mušice. Ipak, treba naglasiti da su u još jednoj studiji, koja je koristila identičan mitotipski panel kao u Camus i sar. (2012), dobijeni značajno drugačiji rezultati po kojima efekat mitotipa nije bio specifičan za mužjake, ali je pokazan za ženski pol (Nagarajan-Radha i sar., 2019). U nedavnoj studiji na 104 sisarske vrste ispitivana je veza između dužine života mužjaka i ženki i stope mutacija izazvanih oksidativnim oštećenjima usled negativnih efekata mutacija mitohondrijskog genoma. Utvrđeno je da ne postoji polno specifična korelacija između stope mutacija i dužine života, što ukazuje na činjenicu da materinska kletva ne oblikuje dužinu života mužjaka kod ovih vrsta (Cayuela i sar., 2023). Iz suprotstavljenih rezultata navedenih istraživanja proističe zaključak da još ne postoji jasan odgovor na pitanje na koji način i u kojoj meri mutacije materinske kletve utiču na dužinu života jedinki, ili da je prisustvo/odsustvo ovog fenomena specifično za takson.

Za primenu MG3b mitotipa u tehnici trojanskih ženki važan je nalaz da ovaj mitotip ne utiče negativno na dužinu života ni mužjaka ni ženki. Smanjenje dužine života mužjaka, nosilaca ovog mitotipa, podrazumevalo bi da su oni manje kompetitivni u odnosu na druge mužjake i, posledično, da imaju manju verovatnoću ukrštanja sa ženkama. Ispitivanja efekata do sad otkrivenih mutacija materinske kletve na dužinu života dala su, kako je pokazano, mešovite rezultate. S jedne strane, BRO mitotip vinske mušice (*Drosophila melanogaster*) nema negativan efekat na dužinu života mužjaka, ali kod ženki značajno smanjuje dugovečnost (Camus i sar., 2012; Nagarajan-Radha i sar., 2019). Skraćenje života ženki sa ovim mitotipom podrazumeva i smanjenja adaptivne vrednosti trojanskih ženki što ugrožava pretpostavke TTŽ-a i širenje takvog mitotipa kroz populaciju. S druge strane, G177S mitotip, slično MG3b, ne utiče na dugovečnost nijednog pola (Patel i sar., 2016).

Još jedan važan rezultat ovog eksperimenta je odsustvo negativnih interseksualnih interakcija između osobina koje su pogođene MG3b mitotipom kod mužjaka (rani fekunditet i fertilitet) i osobina životne istorije ženki. Zajedno sa činjenicom da je varijansa testiranih osobina veća kod mužjaka nego kod ženki, a u skladu sa predikcijama koje su dali Dauling i Adrian, u MG3b mitotipu mutacije sa negativnim efektom za mužjake nakupile su se pod dejstvom „slabe“ materinske kletve (Dowling i Adrian, 2019). Drugim rečima, MG3b mitotip ne pokazuje pozitivan efekat na adaptivnu vrednost ženki, i u populaciji ne menja svoju učestalost pod dejstvom pozitivne prirodne selekcije, već je njegova zastupljenost posledica delovanja genetičkog drifta (Frank i Hurst, 1996; Gemmell i sar., 2004). U suprotnosti sa ovim rezultatima, Kamus i Dauling utvrdili su postojanje negativnih interseksualnih korelacija za veliki broj osobina za panel od 13 mitotipova, što ukazuje na postojanje polno antagonističke varijabilnosti mitotipova i delovanje „jake“ materinske kletve. Štaviše, pokazali su da potomci ženki BRO mitotipa imaju najviše vrednosti preadultnog vijabiliteta (Camus i Dowling, 2018) i predlažu da je to potencijalni razlog održavanja ovog mitotipa u populaciji i pored toga što dovodi do smanjenja dužine života ženki (Camus i sar., 2012).

5.2 Mehanizmi delovanja mutacija „materinske kletve“ na reproduktivni potencijal mužjaka

5.2.1. Efekti mitotipova na respiraciju i količinu mitohondrija

Efikasnost sistema za oksidativnu fosforilaciju (OXPHOS) zavisi od preciznih interakcija mitohondrijskog i jedarnog genoma. OXPHOS funkcija može biti narušena mito-jedarnom nekompatibilnošću ili mtDNK mutacijama na nekoliko načina. Najpre, usled grešaka u prenosu elektrona između redoks centara kompleksa, oni mogu „bežati“ iz subjedinica u većoj meri i formirati ROS-ove čime se potencijalno povećava nivo oksidativnih oštećenja molekula u ćeliji. Dalje, suboptimalno funkcionisanje sistema dovodi do povećanog curenja protona kroz membranu nazad u matriks mitohondrija, čime se smanjuje elektrohemijski gradijent čija energija se koristi za sintezu ATP-a. Konačno, mitohondrije i jedro su u konstantnoj komunikaciji preko signalnih molekula (poput ROS-ova). Promene u mitohondrijskoj respiraciji, dakle, imaju direktan uticaj na ekspresiju jedarnih gena (Ballard i Melvin, 2010). I zaista, specifični mitotipovi (Pichaud i sar., 2010; Correa i sar., 2012; Pichaud i sar., 2013; Wolff i sar., 2016b; Aw i sar., 2017) i narušavanje koevoluiranih mito-jedarnih interakcija (Meiklejohn i sar., 2013; Đorđević i sar., 2017; Pichaud i sar., 2019) pokazali su se kao uzročnik promena funkcije različitih komponenti OXPHOS-a. Funkcionisanje OXPHOS, to jest energetski metabolizam, oblikuje ekspresiju osobina životne istorije i životne strategije organizama (Ballard i sar., 2007b). U skladu sa ovim teorijskim postavkama, sve su brojniji radovi koji pokazuju asocijaciju između promene u mitohondrijskoj funkciji i promena u ispoljavanju različitih osobina životne istorije (Meiklejohn i sar., 2013; Wolff i sar., 2016b; Đorđević i sar., 2017). Predviđa se da je muški reproduktivni sistem sa posebno metabolički zahtevnim tkivima glavna meta mutacija materinske kletve. Kako su ranije studije pokazale, male promene u funkcionisanju mitohondrija i OXPHOS-a odražavaju se na razviće i pokretljivost spermatozoida (Gemmell i sar., 2004; Beekman i sar., 2014; Vaught i Dowling, 2019). Dakle, da bi se ispitalo da li efekti koje MG3b mitotip ostvaruje na reproduktivni potencijal mužjaka potiču od njegovog uticaja na mitohondrijsku respiratornu funkciju, jedan od eksperimenata ove disertacije imao je za cilj utvrđivanje OXPHOS aktivnosti i brojnosti mitohondrija kod mužjaka sa MG3b mitotipom i kontrolnih mitotipova u varijabilnoj sredini jedra sa kojim mitohondrije nisu koevoluirale.

Rezultati su pokazali da MG3b mužjaci imaju smanjenu mitohondrijsku aktivnost preračunatu na gram tkiva, u odnosu na mužjake kontrolnih mitotipova, iako svaka pojedinačna mitohondrija MG1a i MG3b mužjaka ima slične vrednosti respiracije. Na osnovu ovih nalaza može se zaključiti da MG3b mužjaci imaju značajno manji broj mitohondrija, a samim tim i sniženu mitohondrijsku respiraciju u celini. Mitotip je imao značajan efekat na funkcionisanje svih ispitivanih OXPHOS kompleksa pojedinačnih mitohondrija osim kompleksa II, što je u skladu sa očekivanjem budući da kompleks II nije kodiran mtDNK genima (Rand i sar., 2004). Identičan obrazac variranja respiracije kompleksa dobijen je kod Majkldžona i saradnika (Meiklejohn i sar., 2013) gde je jedna nekompatibilna kombinacija tRNK kodirane mitohondrijskim genomom *D. simulans* i tRNK sintetaze kodirane jedarnim genomom *D. melanogaster* dovela do pada kapaciteta oksidativne fosforilacije vezanog za kompleks I i aktivnosti kompleksa IV, ali nije imala uticaj na kompleks II.

Važnost mito-jedarnih interakcija najizraženija je u kompleksu I. Studije su pokazale da je za sklapanje ovog kompleksa potrebna precizno regulisana interakcija 39 od 45 subjedinica (Gershoni i sar., 2014; Stroud i sar., 2016). Pored toga što aminokiselinske promene sa velikom verovatnoćom mogu dovesti do grešaka u sklapanju samog kompleksa, očekivana posledica je i povećana produkcija ROS-a u ćeliji, s obzirom na to da je kompleks I glavno mesto nastanka ovih reaktivnih molekula (Murphy, 2009; Andreyev i sar., 2015). Uočen pad u kapacitetu oksidativne fosforilacije kod MG3b mužjaka može se objasniti aminokiselinskom mutacijom u *nad2* genu uključenom u sintezu proteinske subjedinice kompleksa I. Budući da kompleks I predstavlja glavni izvor elektrona za elektron-transportni lanac kod

većine vrsta (Sunnucks i sar., 2017), ne iznenađuju zaključci da promene u načinu funkcionisanja ovog kompleksa jesu najčešći uzrok metaboličkih sindroma kod ljudi. Subjedinica kodirana *nad2* genom uključena je u proces sastavljanja ovog kompleksa i od velike je važnosti za njegovu stabilnost. Kod ljudi je utvrđeno da se kod pacijenata sa specifičnim mutacijama ovog gena formiraju respirazomi (superkompleksi koje formiraju kompleksi I, III i IV) bez funkcionalnog kompleksa I (Janssen i sar., 2006). Ukoliko i kod MG3b mužjaka dolazi do problema sa formiranjem respirazoma u unutrašnjoj membrani mitohondrija, to bi objasnilo i smanjenje funkcionalnosti kompleksa IV. Ipak, kompleks I bi mogao imati manju ulogu u oksidativnoj fosforilaciji kod pasuljevog žiška u odnosu na druge insekte (Sayadi i sar., 2017). Naime, višak energije dobijen konzumiranjem kotiledona u semenu larve ove vrste, u toku preadultnog razvića, skladište u vidu masnih rezervi koje su izvor energije u adultnom stadijumu (Immonen i sar., 2016). Pri ishrani bogatoj proteinima ili mastima, funkcionalnost OXPHOS-a je manje zavisna od kompleksa I nego što je to pri ishrani bogatoj ugljenim hidratima (Speijer i sar., 2014). Štaviše, pokazano je da je ekspresija subjedinica kompleksa I niska kod jedinki oba pola pasuljevog žiška, dok je ekspresija subjedinica ostalih OXPHOS kompleksa veća kod mužjaka u odnosu na ženke (Sayadi i sar., 2017) što je posledica više stope metabolizma mužjaka u odnosu na ženke (Arnqvist i sar., 2017). Dakle, relativna važnost pada aktivnosti kompleksa I kod MG3b mužjaka na ispoljavanje osobina životne istorije ne mora biti velika.

Pored uticaja navedenih mutacija u kompleksu I na sklapanje čitavog respirazoma, uočen je efekat MG3b mitotipa na aktivnost kompleksa IV potencijalno uzrokovanog aminokiselinskom zamenom u *cox2* genu. Kod vinske mušice je otkrivena mutacija u istom genu koja dovodi do pada aktivnosti kompleksa IV za oko 20% na povišenoj temperaturi, a ujedno je povezana sa smanjenjem broja i aktivnosti spermatozoida (Patel i sar., 2016). Sličan pad (28%) zabeležen je kod MG3b mitotipa u odnosu na kontrolni MG1d pasuljevog žiška. Kod ljudi, zabeležen je mitotip koji dovodi do smanjenja aktivnosti kompleksa I i IV, slično efektu MG3b mitotipa, a koji je asociran sa astenozoospermijom, to jest smanjenom pokretljivošću spermatozoida (Ruiz-Pesini i sar., 2000).

Još jedan mitotip sa polno specifičnim, negativnim efektom na mužjake, koji ima specifičnu nesinonimnu zamenu u istom genu kao MG3b, otkriven je kod vrste *D. melanogaster* – BRO mitotip. Naime, MG3b i BRO odlikuju se mutacijom u *cytb* genu koji kodira za subjedinicu kompleksa III. Respirometrijska metoda primenjena u eksperimentima na pasuljevom žišku nije utvrđivala aktivnost ovog kompleksa. Ipak, nekoliko istraživanja na BRO mitotipu može pružiti uvid u potencijalni način delovanja mutacije u ovom genu na energetske metabolizam mužjaka. Volf i saradnici testirali su efekat 12 mitohondrijskih haplotipova, uključujući i BRO, na ukupnu respiratornu aktivnost OXPHOS kompleksa u homogenoj jedarnoj sredini. BRO mitotip nije doveo do smanjenja aktivnosti OXPHOS kompleksa, već, nasuprot, BRO mužjaci imali su najviše vrednosti u odnosu na ostale mužjake i u odnosu na BRO ženke (Wolff i sar., 2016b). Međutim, pokazano je da je stopa metabolizma BRO mužjaka, merena preko potrošnje CO₂, niža u odnosu na druge mužjake (Nagarajan-Radha i sar., 2020). Ovaj nalaz čini se kontraintuitivnim, imajući u vidu da OXPHOS kompleksi stvaraju energiju čije korišćenje na nivou organizma karakteriše stopu metabolizma. Naizgled kontradiktorni rezultati različitih studija pokazuju da veza između ćelijskog disanja i stope metabolizma i dalje ostaje nejasna. Jedan od retkih radova koji se bavio ovim problemom pokazao je da ne postoji korelacija između ove dve metaboličke karakteristike kada se nivo respiracije procenjuje na intaktnim ćelijama velikih senica (*Parus major*). U permeabilizovanim ćelijama ustanovljeno je da se samo mali deo variranja stope metabolizma može pripisati variranju mitohondrijske respiracije (Thoral i sar., 2024). Kod pasuljevog žiška pokazano je da mužjaci imaju višu stopu metabolizma u odnosu na ženke (Arnqvist i sar., 2017) a manju aktivnost OXPHOS kompleksa (Đorđević i sar., 2017). Dakle, s obzirom na ograničen broj studija, izvođenje jasnih zaključaka o potencijalnom uticaju mutacija materinske kletve na stopu metabolizma nije moguće (Sunnucks i sar., 2017). Međutim, kada je reč o efektu BRO mitotipa na fertilitet mužjaka, povećana aktivnost OXPHOS kompleksa mogla bi biti uzrok povećane proizvodnje ROS-a za koju su Klensi i

saradnici predvideli da dovodi do oštećenja i sprečava proces individualizacije spermatozoida (Clancy i sar., 2011).

Jedna studija ukazuje na dodatni mehanizam polno specifičnog delovanja mutacija materinske kletve (Aw i sar., 2017). Naime, pokazano je da se mitohondrijska respiratorna funkcija specifičnog mitotipa, koji je prethodno asociran sa smanjenjem dužine života mužjaka, brže smanjuje sa starenjem kod mužjaka u odnosu na ženke. Ženke ovog mitotipa su, slično mužjacima, imale sniženu aktivnost respiratornih kompleksa, ali, za razliku od mužjaka, kod njih nije detektovana povećana koncentracija ROS-ova. Dakle, ženke su uspevale da kompenzuju promenu aktivnosti sistema za respiraciju, dok je kod mužjaka ona potencijalno dovodila do oksidativnih oštećenja i daljeg gubitka funkcije. Opisani rezultati daju uvid u to da je moguće da oštećenja OXPHOS-a izazvana mitohondrijskim mutacijama ne utiču podjednako na ćelijske funkcije oba pola.

Upečatljiv nalaz eksperimenata na pasuljevom žišku jeste i rezultat da mužjaci sa MG1a mitotipom imaju najnižu aktivnost respiratorne funkcije pojedinačnih mitohondrija (sličnu onoj kod MG3b mužjaka), ali najvišu aktivnost na nivou celog organizma (ili, specifičnije, grama tkiva). Ova diskrepancija posledica je čak duplo povećanog broja mitohondrija u odnosu na MG1d i MG3b mužjake. Povećanje brojnosti mitohondrija tumači se kao kompenzacioni mehanizam za oštećujući efekat koji mitotip ostvaruje na mitohondrijsku respiratornu funkciju (Ballard i Melvin, 2010). Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da iako MG1a i MG3b mitotipovi na sličan način deluju na aktivnost OXPHOS-a mužjaka, kod MG3b izostaje kompenzacioni mehanizam putem povećanja brojnosti mitohondrija, odnosno stvaranja dodatnih kompleksa koji nadomešćuju smanjenje aktivnosti pojedinačnih kompleksa.

U svetlu činjenice da mužjaci MG3b mitotipa imaju smanjenu mitohondrijsku respiratornu funkciju, smanjeni rani fekunditet ženki koje se ukrštaju sa MG3b mužjacima može se razumeti kao posledica uticaja respiratornog metabolizma na sazrevanje i pokretljivost spermatozoida. Drugim rečima, mehanizam smanjenja reproduktivnog potencijala MG3b mužjaka sličan je efektima opisanim kod drugih mutacija materinske kletve (Clancy i sar., 2011; Patel i sar., 2016) i efektima mutacija u mitohondrijskom genomu ljudi koje uzrokuju astenozoospermiju kod muškaraca (Ruiz-Pesini i sar., 2000). Buduća istraživanja trebalo bi da se fokusiraju na merenje brojnosti, vijabiliteta i pokretljivosti spermatozoida MG3b i kontrolnih mužjaka pasuljevog žiška.

5.2.2 Reproductivno ponašanje MG3b mužjaka

Mutacije materinske kletve podrazumevaju polno specifičan efekat na osobine mužjaka i ženki, kao što je reproduktivno ponašanje (Brand, 2024). Kod velikog broja životinjskih vrsta mužjaci pokazuju specifične oblike ponašanja prilikom pristupanja ženkama (Koch i Hill, 2018) – od jednostavnog jurenja ženki kod pasuljevog žiška do kompleksnih „svadbenih igara“ i oglašavanja kod ptica. Budući da je borba za pristup ženkama energetski skup proces, posebno u uslovima kompeticije sa drugim mužjacima, jasna je pretpostavka je da bi mitohondrijski metabolizam mogao značajno uticati na reproduktivni uspeh mužjaka (Hill, 2011). Drugim rečima, još jedan način na koji polno specifične mitohondrijske mutacije dovode do pada reproduktivnog kapaciteta mužjaka jeste uticaj na reproduktivno ponašanje.

Dobro je poznata uloga mitohondrija u razviću i funkcionisanju nervnog sistema. Nervno tkivo spada među energetski najzahtevnije, pa je i njegova funkcionalnost direktno zavisna od efikasnosti OXPHOS-a. Isto tako, signalizacija putem ROS-a važna je za funkcionisanje i plastičnost sinapsi. Nervne stem ćelije oslanjaju se na anaerobnu respiraciju, zahvaljujući čemu je produkcija ROS-a svedena na minimum, a omogućena deoba veliki broj puta. Međutim, za diferencijaciju u nervne ćelije ključan je prelazak na aerobnu respiraciju zavisnu od OXPHOS-a. Iako ovo nije karakteristika samo nervnih stem ćelija, pokazalo se da je precizna regulacija ovog procesa za njih od posebne važnosti (Koch i Hill, 2018).

U evolucionoj ekologiji velika pažnja se pridaje tzv. *pace-of-life* sindromu (sindromu „ritma života“) koji predstavlja korelaciju između karakteristika metabolizma, ponašanja i osobina životnih istorija jedinki (Réale i sar., 2010; Laskowski i sar., 2021). Jedna meta analiza utvrdila je pozitivnu korelaciju između stope metabolizma i energetski skupih oblika ponašanja (Mathot i sar., 2019). U drugoj studiji pokazano je da agresivne jedinke u principu imaju veću stopu metabolizma, ali da veza između metabolizma i ponašanja nije jednoznačna (Niemelä i Dingemanse, 2018). Inspirisani ulogom mitohondrija u razviću nervnog sistema, produkcije ATP-a i delimičnom oblikovanju stope metabolizma, nekoliko istraživačkih grupa ispitalo je uticaj mitohondrijske (i mito-jedarne) varijabilnosti na različite oblike ponašanja (Clark i sar., 2010; Løvlie i sar., 2014; Ueno i Takahashi, 2021; Anderson i sar., 2022).

Lovli i saradnici ispitali su efekat tri mitotipa u tri jedarne sredine (ukupno devet mito-jedarnih interakcija) na fizičku aktivnost nakon tanatozisa kod pasuljevog žiška vrste *C. maculatus* (Løvlie i sar., 2014). Rezultati su pokazali da mito-jedarne interakcije imaju značajan efekat na ovu osobinu. Posebno je interesantan nalaz da su mužjaci, nosilaci narušene mito-jedarne interakcije, pokazivali povišen nivo kretanja u odnosu na druge mužjake. U drugoj studiji u kojoj je ispitivan efekat mito-jedarnih interakcija na aktivnost *D. melanogaster* utvrđeno je postojanje efekta mitotipa i mito-jedarnih interakcija na fizičku aktivnost i vreme provedeno u snu, a ovi efekti bili su izraženiji kod ženki u odnosu na mužjake (Anderson i sar., 2022). Istraživanje urađeno na dve vrste parazitoidne ose, *Nasonia vitripennis* i *N. giraulti*, pokazalo je da se muški hibridi obe vrste ređe udvaraju ženkama, kao i da imaju smanjenu proizvodnju spermatozoida (Clark i sar., 2010).

U studiji na pasuljevom žišku (*A. obtectus*) testiran je efekat pet mitohondrijskih mitotipova, uključujući i MG3b, na osobine reproduktivnog ponašanja mužjaka – početak i trajanje kopulacije i procentualna uspešnost ukrštanja. Iako nije ustanovljen efekat mitotipa na početak i trajanje kopulacije, MG3b mitotip pokazao je značajno povišen procenat ukrštanja. Drugim rečima, ovi mužjaci bili su uspešniji u svom „jurenju“ ženki i češće su uspevali da započnu kopulaciju (Biočanin, 2023) što ukazuje na zaključak da pad fertiliteta MG3b mužjaka nije uzrokovan pasivnošću reproduktivnog ponašanja. Ovaj nalaz, iako u suprotnosti sa rezultatima koji su pronašli pozitivnu korelaciju između stope metabolizma i energetski skupljih oblika ponašanja (Mathot i sar., 2018), sličan je rezultatu Lovlija i saradnika gde su hibridni mužjaci pokazivali veći nivo aktivnosti (Løvlie i sar., 2014). Imajući u vidu postojeću literaturu koja je potvrdila efekat mitohondrijske varijabilnosti na fizičku aktivnost insekata (Løvlie i sar., 2014; Ueno i Takahashi, 2021; Anderson i sar., 2022) može se zaključiti da je povećan procenat ukrštanja MG3b mužjaka pasuljevog žiška posledica njihove povećane fizičke aktivnosti. Iako su eksperimenti na pasuljevom žišku rađeni u nekompetitivnom kontekstu (Biočanin, 2023), rezultati opisane studije su važan pokazatelj da MG3b mužjaci nisu kompetitivno inferiorni u odnosu na druge mužjake. Ovaj nalaz je od izuzetne važnosti za uspešnost i efikasnost tehnike trojanskih ženki u prirodnim populacijama.

5.2.3 Mitohondrijske mutacije i ekspresija gena

Mitohondrijske mutacije mogu ostvarivati efekat na adaptivnu vrednost mužjaka preko promene u regulaciji ekspresije jedarnih i mitohondrijskih gena. Epigenetičke modifikacije, poput metilacije DNK i metilacije, fosforilacije i acetilacije histonskih repova, modulirane su količinom dostupnog ATP-a, kao i derivatima energetskog metabolizma (Wallace i Fan, 2010), što predstavlja direktnu vezu između respiratorne aktivnosti mitohondrija i genske ekspresije. Dodatno, ROS-ovi imaju poznatu ulogu u regulaciji ekspresije gena kao signalni molekuli (O'Hagan i sar., 2011; Picard i Shirihai, 2022). Postoje studije koje su pokazale vezu između metilacionog statusa jedarne DNK, s jedne, i broja mitohondrija (Smiraglia i sar., 2008) i specifičnih mitotipova (Bellizzi i sar., 2012), s druge strane. Dodatno, poznato je da je i sama mitohondrijska DNK metilovana (Shock i sar., 2011), kao i da mitohondrijski haplotip

utiče na nivo ekspresije mitohondrijskih protein-kodirajućih gena (Camus i sar., 2015). Kod ljudi su otkrivene i male nekodirajuće RNK koje nastaju od mitohondrijskih tRNK, takozvane mitohondrijske tsRNK (Mercer i sar., 2011), za koje se smatra da imaju ulogu u regulaciji ekspresije drugih nekodirajućih RNK (Haussecker i sar., 2010). Svakako je jasno da tsRNK imaju kompleksnu funkciju u genomskoj regulatornoj mreži i potencijalno plejotropno dejstvo. U poslednje dve decenije pronađena je i nova klasa mitohondrijskih peptida, nazvana mitokini, koji predstavljaju kratke peptide kodirane sa mitohondrijskih gena za ribozomalnu RNK. Do sada ih je pronađeno osam i smatra se da igraju važnu ulogu u apoptozi i starenju kod kičmenjaka i beskičmenjaka (Picard i Shirihai, 2022).

Mitohondrijski genom pasuljevog žiška specifične je građe. Svojom dužinom od 26.613 baznih parova predstavlja jedan od najvećih do sada sekvenciranih životinjskih mitohondrijskih genoma. Pored gena za 13 proteinskih produkata, 22 tRNK, dve rRNK i kontrolnog regiona standardnih za sve bilateralno simetrične organizme, sadrži i dva duga intergenska regiona sastavljena od velikog broja tandemskih ponovaka (Sayadi i sar., 2017). S obzirom na to da je evolucija mitohondrijskog genoma tekla u pravcu njegovog smanjivanja (Adams i Palmer, 2003), činjenica da su ovi intergenski regioni zadržani u genomu pasuljevog žiška ukazuje na to da oni nisu selektivno neutralni, to jest da imaju neke funkcije. Budući da sekvenca ovih regiona nije evoluciono očuvana ni između veoma srodnih vrsta, a dužina jeste, i da su bogati AT baznim parovima, pretpostavlja se da mogu formirati različite sekundarne strukture i time regulisati transkripciju mitohondrijskih gena. Uz to, sa ova dva intergenska regiona transkribuju se duge, a vrlo verovatno i kratke nekodirajuće RNK (Sayadi i sar., 2017).

Dakle, kumulativno dejstvo identifikovanih mtDNK mutacija u subjedinicama kompleksa I i III MG3b mitotipa, koje rezultuje promenjenom količinom produkovanog ROS-a (Murphy, 2009), i promena u sekvencama sa kojih se transkribuju nekodirajuće RNK, moglo bi uticati na ekspresiju jedarnih (i mitohondrijskih gena), a potencijalno dovoditi i do polno specifičnih razlika u delovanju mitotipa. Ovu predikciju potkrepljuju rezultati istraživanja Inosentija i saradnika koji su pokazali da mitohondrijski haplotipovi dovode do diferencijalne ekspresije velikog broja jedarnih gena kod mužjaka, ali ne i kod ženki, kao i da geni sa izmenjenom ekspresijom uglavnom ispoljavaju svoju funkciju u muškom reproduktivnom tkivu (Innocenti i sar., 2011).

5.2.4 Smanjenje reproduktivnog potencijala kroz efekat na semenu tečnost

Još jedan mogući mehanizam preko kojih bi mitohondrijske varijante mogle uticati na reproduktivni potencijal mužjaka jeste efekat na seminalne proteine. Naime, pokazano je da kod insekata semena tečnost sadrži proteine koji imaju ulogu u podsticanju oogeneze, polaganja jaja, kratkotrajno smanjuju receptivnost ženki za ponovno parenje čime se povećava kompetitivnost sperme u poliandričnim vrstama, utiču na ishranu ženki, i čak smanjuju dužinu života ženki (Ram i Wolfner, 2007; Avila i sar., 2011; Xu i Wang, 2011). Smatra se da mužjaci i ženke imaju različite interese kad je reč o sadržaju semene tečnosti, to jest da postoji interlokusni seksualni konflikt između gena za semene proteine mužjaka i gena koji kodiraju za produkte koji sa ovim proteinima interaguju kod ženki. U prilog ovoj hipotezi idu podaci da veliki broj gena za semene proteine vrlo brzo evoluirao, što ukazuje na postojanje „trke u naoružanju“ između mužjaka i ženki (Ram i Wolfner, 2007). Imajući u vidu ovaj konflikt između polova i da se u mitohondrijskim genomima mogu nakupljati mutacije negativne po mužjake, logična je pretpostavka da jedan od mehanizama delovanja mutacija materinske kletve predstavlja smanjenje efekta seminalnih proteina na komponente adaptivne vrednosti ženki. Iako do sada nije testiran efekat mitohondrijske varijabilnosti na ovu klasu proteina, zna se da je aktivnost OXPHOS kompleksa pozitivno korelisana sa koncentracijom drugih elemenata semene tečnosti poput L-karnitina (Ruiz-Pesini i sar., 2001), aminokiseliniskog derivata pozitivno asociranog sa brojnošću, pokretljivošću i vijabiletom spermatozoida kod ljudi (Iliceto i sar., 2024). Dakle, imajući u vidu uticaj mitotipova na

ekspresiju polno specifičnih gena (Innocenti i sar., 2011), mitotipovi bi svoj efekat na proteine semene tečnosti mogli ispoljavati kroz smanjenje nivoa ekspresije kod mužjaka uzrokujući smanjenje reproduktivnog ulaganja ženki pri ukrštanju sa takvim mužjacima.

5.3 Genetička struktura populacije i „tehnika trojanskih ženki“

Poznavanje genetičke strukture populacija pruža razumevanje rasprostranjenosti i disperzione sposobnosti ekonomski štetnih vrsta te može poslužiti kao sredstvo za praćenje zaraženih područja, predviđanje rizika od širenja areala populacija, kao i procenu efektivnosti metoda kontrole štetočina (Kirk i sar., 2013). Primera radi, poznavanje genetičke strukture populacije za gene koji se nalaze u osnovi rezistencije na insekticide omogućava kreiranje i testiranje modela evolucije rezistencije u populacijama (Jin i sar., 2015). Isto tako, genetička struktura populacija igra ključnu ulogu u određivanju aplikativnog potencijala tehnike trojanskih ženki.

Evoluciona teorija ukazuje na očekivanje da nivo strukturiranosti populacije utiče na evoluciju mitohondrijskih varijanti, kao i na mito-jedarnu evoluciju. U strukturiranim populacijama, sa ograničenim protokom gena, očekuje se manja varijabilnost mitohondrijskih i jedarnih varijanti, zbog čega u takvim populacijama postojeći mitotipovi interaguju sa manjim brojem jedarnih sredina što olakšava njihovu koevoluciju. S druge strane, u manje strukturiranim populacijama brojniji mitotipovi interaguju sa velikim brojem jedarnih sredina usled čega prirodna selekcija manje efikasno favorizuje specifične kombinacije. Iz tog razloga, očekuje se da će kod vrsta sa diferenciranim populacijama ukrštanje jedinki iz različitih populacija dovesti do većih nivoa nekompatibilnosti i posledica po adaptivnu vrednost jedinki (Rand i Mossman, 2020). Dodatno, u manjim i/ili strukturiranim populacijama efekat drifta je snažniji i očekuje se brža akumulacija štetnih varijanti (Rand i sar., 2004).

Da bi TTŽ bila upotrebljiva metoda kontrole brojnosti štetnih vrsta insekata, pre svega je neophodno pronaći mtDNK mutaciju sa negativnim efektom na fertilitet mužjaka, a koja ne utiče na adaptivnu vrednost ženki. Nakon što je introdukovana, ova se mutacija mora održavati u populaciji, to jest selekcija ne sme delovati protiv nje. Kako je identifikacija TTŽ mutacija mukotrpan i dugačak proces, znanje o tome u kakvim je populacijama pronalazak ovakvih mutacija najverovatniji od ključnog je značaja za ubrzavanje razvoja ove metode.

Polazeći od modela odnosa genetičkog drifta, prirodne selekcije i mutacija, prvobitno je ravnotežna učestalost TTŽ mutacija modelovana samo kao funkcija količnika njihove stope mutacija u i koeficijenta selekcije s_f (koja deluje na ženke) (Frank i Hurst, 1996). Dalje je pretpostavljeno da zbog velikog efekta drifta i nakupljanja štetnih mutacija (Rand i sar., 2004) veća verovatnoća nakupljanja mutacija materinske kletve, to jest kandidat TTŽ mutacija, postoji u malim populacijama (Gemmell i Allendorf, 2001; Gemmell i sar., 2004). Ipak, noviji modeli, koji matematički opisuju različite tipove populacione strukture i simuliraju ponašanje mutacija sa polno specifičnim efektima, pokazali su da se ova pretpostavka mora preispitati. Naime, nekoliko istraživačkih grupa napravilo je matematičke modele za istraživanje promene učestalosti mutacije sa negativnim efektom na mužjake, a neutralnim ili pozitivnim na ženke u malim diferenciranim populacijama (visoke vrednosti F_{ST}) (Unckless i Herren, 2009; Wade i Brandvain, 2009; Hedrick, 2012; Zhang i sar., 2012). Iako su se parametri i detalji postavke ovih modela razlikovali, svima je zajedničko da su pokazali da se u malim populacijama smanjuje učestalost mutacija materinske kletve. Objašnjenje se krije u procesima ukrštanja u srodstvu i kin selekcije. U malim populacijama verovatnoća reprodukcije sa genetički srodnom jedinkom je povećana. Dakle, ukoliko se brat i sestra, nosioci mutacije materinske kletve, ukrste, zbog negativnih efekata mutacije na komponente fertiliteta mužjaka, i njegovoj sestri biće smanjena adaptivna vrednost. Isto tako, ukoliko ženkama adaptivna vrednost zavisi od adaptivne vrednosti njenih muških srodnika (inkluzivna adaptivna vrednost) mutacija materinske kletve koja pogađa muške srodnike imaće direktan efekat i na

ženke (kin selekcija). Posledica ovih fenomena je selektivno smanjenje učestalosti mutacija materinske kletve (Unckless i Herren, 2009; Wade i Brandvain, 2009; Hedrick, 2012; Zhang i sar., 2012). S druge strane, modeli koji su se bavili promenama učestalosti mtDNK mutacija sa polno specifičnim efektom u velikim populacijama, pokazali su da mušjaci sa mutacijom materinske kletve zapravo imaju veću šansu da se ukrste sa ženkom sa kojom nisu u srodstvu. Pri takvom, genotipski disasortativnom, ukrštanju smanjuje se adaptivna vrednost, tj. broj fertilnih potomaka nesrodne ženke, ali će biti povećana relativna adaptivna vrednost njihovih sestara sa mutacijama materinske kletve, a koje se ukrštaju sa nesrodnim mušjacima. Dakle, u ovom slučaju očekivano je da prirodna selekcija povećava učestalost mitotipa materinske kletve (Engelstädter and Charlat, 2006; Hedrick, 2012). Ultimativno, ovi modeli predviđaju da je mnogo veća verovatnoća da mtDNK mutacije sa negativnim efektima na mušjake budu pronađene sa visokim učestalostima u nestrukturiranim populacijama sa visokom stopom protoka gena (Zhang i sar., 2012). Uzimajući u obzir ovakve pretpostavke, zaključuje se da su beskičmenjačke populacije potencijalno sklonije nakupljanju mutacija materinske kletve, budući da su uglavnom brojnije od kičmenjačkih i sa jedinkama koje imaju veće disperzione sposobnosti (Smith i Connallon, 2017). Vodeći se istom logikom, TTŽ mutacija će biti efikasnija u velikim nestrukturiranim populacijama u odnosu na male u kojima bi mogla biti eliminisana za kratko vreme usled delovanja selekcije i/ili genetičkog drifta. U skladu sa ovim predikcijama, istraživanja koja su pokušala da utvrde postojanje efekta materinske kletve na kičmenjačkim populacijama, utvrdila su da mutacije materinske kletve u ovim populacijama nisu česte i ne igraju važnu ulogu u oblikovanju osobina životne istorije jedinki (Leeftang i sar., 2021; Cayuela i sar., 2023).

S obzirom na to da pasuljev žižak predstavlja kosmopolitsku, ekonomski važnu vrstu, jedno od pitanja u ovoj disertaciji jeste i podobnost prirodnih populacija za pronalazak TTŽ mutacija i njihovu upotrebu u kontroli brojnosti populacija.

U analiziranim prirodnim populacijama pasuljevog žiška pronađeno je 12 mitohondrijskih haplotipova na osnovu sekvence barkoding regiona *cox1* gena sa međusobnom divergencijom i do 1,4%. Ovaj nivo divergencije, uočen na relativno maloj teritoriji Srbije, veoma je visok. Primera radi, kod populacija vrste *Drosophila simulans* uzorkovanih širom sveta (Baba-Aïssa i sar., 1988), tri pronađene haplogrupe pokazuju nivo divergencije od 3% (izračunato analizom polimorfnosti mesta sečenja restrikcioni enzima) i karakteristične su za različite geografske regione, dok je varijabilnost unutar haplogrupa mnogo manja (0,06%) (James i Ballard, 2003). S druge strane, divergencija mitotipova vrste *D. melanogaster* koji su i najčešće korišćeni u istraživanjima materinske kletve, iznosi oko 0,4%. Vrlo slična je i divergencija glavnih ljudskih mitohondrijskih haplogrupa (Morrow i sar., 2015). Nasuprot tome, divergencija mitohondrijskih haplotipova vrste račića *Tigriopus californicus* dostiže i 20% između nekih alopatričkih populacija (Watson i sar., 2022). Važno je ipak naglasiti da je ova vrsta karakteristična po visokoj strukturiranosti i izolovanosti populacija. U skladu sa pretpostavkama modela o evoluciji mutacija materinske kletve, u populacijama ove vrste, i pored velike mitohondrijske divergencije, nije utvrđeno postojanje efekta materinske kletve (Watson i sar., 2022). Činjenica da u populacijama pasuljevog žiška postoji velika varijabilnost mitotipova, i da oni nisu geografski jasno raspoređeni (Slika 11, Tabela 15) govori u prilog postojanju intenzivnog protoka gena. Na isti zaključak navodi i podatak da je dobijena heterozigotnost mikrosatelitskih lokusa u većini populacija slična očekivanoj, ili je čak i prevazilazi.

Analiza strukturiranosti populacija pasuljevog žiška urađena i na mitohondrijskom i na jedarnim markerima ukazala je na to da ne postoje viši nivoi hijerarhijske strukture populacije. Naime, iako su neke od populacija prostorno vrlo udaljene i odvojene različitim geografskim barijerama, većina populacija nije značajno genetički diferencirana na nivou jedarnog genoma. Na varijabilnost unutar populacije i divergenciju između njih utiču evolucionarni mehanizmi i različiti tipovi neslučajnog ukrštanja (Pinho i Hey, 2010). Kod herbivornih insekata, poput pasuljevog žiška, pokazalo se da je njihova sposobnost disperzije jedan od glavnih faktora koji određuje strukturiranost populacije (Mazzi i Dorn,

2012). Ukoliko je disperziona moć velika, stopa protoka gena između različitih populacija biće značajna što smanjuje strukturiranost metapopulacije (Kim i Sappington, 2013). Dodatno, abiotički faktori, poput strukture reljefa, postojanja različitih geografskih barijera (npr. velikih vodenih površina) i klimatskih uslova mogu značajno uticati na disperziju jedinki. Imajući sve ovo u vidu, očekivano je da geografska udaljenost između populacija koreliše sa njihovom divergencijom (Bessette i sar., 2022). Jedno istraživanje na šargarepinom žišku pokazalo je visok stepen diferencijacije između udaljenih populacija ove vrste, kao i značajno smanjenu heterozigotnost u okviru svih testiranih populacija. Ovakav rezultat u skladu je sa činjenicom da su jedinke šargarepinog žiška slabi letači i da se uglavnom kreću hodanjem, što uveliko smanjuje njihovu disperzionu sposobnost (Bessette i sar., 2022). Pasuljev žižak je takođe slab letač (Oliveira i sar., 2013), te je malo verovatno da je uočeno mešanje populacija rezultat migracija adulata ove vrste. Najveći udeo u ukupnom protoku gena između populacija ove vrste dešava se zahvaljujući ljudskoj aktivnosti, i to u toku larvenog razvića kada se jedinke nalaze unutar semena pasulja i drugih mahunarki (Oliveira i sar., 2013). Rezultati ove teze u potpunosti odgovaraju istraživanju Alvareza i saradnika koje je pokazalo da jedinke pasuljevog žiška na divljem pasulju, koji se ne koristi široko u poljoprivredi i ljudskoj ishrani, pokazuju očekivanu strukturiranost populacije za vrste sa niskom disperzivnom moći – sa udaljenošću povećava se divergencija populacija (model izolacije putem distance). Međutim, populacije pasuljevog žiška koje su naselile polja i skladišta domaćeg pasulja ne divergiraju u skladu sa geografskom udaljenošću, jer se intenzivni protok gena ostvaruje uglavnom ljudskim transportom zaraženih zrna pasulja (Alvarez i sar., 2007). U drugom istraživanju, analizirana je genetička struktura populacija ove vrste uzorkovanih iz Meksika i Evrope i pokazano je da postoji jasno razdvajanje meksičkih i evropskih populacija, dok unutar ovih regiona nema diferencijacije populacija (Restoux i sar., 2010). Još jedno istraživanje na ovoj vrsti uočilo je veliku stopu protoka gena u Meksiku u okviru testiranih regiona, dok je na većim geografskim skalama ustanovljena značajnija divergencija (González-Rodríguez i sar., 2000). Istraživanje rađeno na populacijama ove vrste iz Kine pokazalo je divergenciju populacija povezanu sa izostankom transporta pasulja između udaljenih regiona (Duan i sar., 2017). Izostanak značajne genetičke diferencijacije populacija uzorkovanih na domaćem pasulju u baštama i skladištima na geografskom području Srbije u skladu je sa očekivanjima. Jedino odstupanje pokazuju populacije iz Ličke Jasenice i Sombora. Lička Jasnica, pored toga što je najudaljenija od svih populacija u odnosu na druge populacije, pripada teritoriji druge države pa je transport zaraženog pasulja ograničen. Populacija iz Sombora, s druge strane, ne potiče od uzgajivača pasulja, već je uzorkovana iz zaraženog pasulja kupljenog na pijaci i nije poznato da li je pasulj, to jest ova populacija žiška, vodi poreklo iz Srbije.

Opisana genetička struktura analiziranih populacija pasuljevog žiška iz Srbije podržava model akumulacije mutacija materinske kletve po kom izostanak jake strukturiranosti i visoka stopa protoka gena sprečavaju ukrštanje u srodstvu i dejstvo prirodne selekcije protiv takvih mutacija. Dodatno, veliki broj i stepen divergencije između uočenih mitotipova ukazuju na varijabilnost čiji se polno specifični efekat može testirati u laboratoriji. Konačno, mešanje populacija povećava jedarnu genetičku varijabilnost što usporava koevoluciju specifičnih mito-jedarnih kombinacija koje bi mogle kompenzovati efekat TTŽ mutacija i smanjiti efikasnost ove tehnike.

5.4 Mito-jedarne interakcije i „tehnika trojanskih ženki“

Tehnika trojanskih ženki zasniva se na ubacivanju u prirodne populacije mitohondrijskih haplotipova koji smanjuju fertilitet mužjaka, a sa ciljem smanjenja brojnosti populacija ekonomski štetnih vrsta (Gemmell i sar., 2013). Imajući u vidu da mitotipovi ne utiču nezavisno na ekspresiju osobina organizama, već njihov efekat zavisi od interakcije sa jedarnim genomom, efikasnost TTŽ-a

uslovljena je potencijalom mtDNK mutacije da utiče na fertilitet u različitim jedarnim sredinama (Dowling i sar., 2015).

Shodno tome, jedan od sprovedenih eksperimenata za cilj je imao testiranje efekta MG3b, kandidata za TTŽ metodu, i dva kontrolna mitotipa na fertilitet mužjaka i ženki u tri različite jedarne sredine poreklom iz prirodnih populacija u Srbiji. Rezultati su pokazali da MG3b mužjaci u svim jedarnim sredinama imaju smanjene vrednosti fertiliteta u odnosu na ostale mužjake. U proseku, ovo smanjenje iznosilo je 41%, što je slično rezultatima prvog eksperimenta ove teze, gde su efekti tri mitotipa testirani u jednoj varijabilnoj jedarnoj sredini sa kojom nisu koevoluirali, gde je MG3b mitotip uslovljavao pad fertiliteta od oko 35% u odnosu na kontrole. Važno je naglasiti da i u ovom, kao i prvom eksperimentu, jedarne sredine nisu homogene već vrlo varijabilne, što ukazuje na robusnost efekta mitotipa, to jest potvrđuje da efekat mitotipa nije posledica specifičnih epistatičkih interakcija (Wolff i sar., 2016a). Slične rezultate dobili su Dauling i saradnici (Dowling i sar., 2015) i Volf i saradnici (Wolff i sar., 2016a) koji su testirali fertilitet mužjaka BRO mitotipa u različitim jedarnim sredinama i ustanovili smanjenje fertiliteta koje je posebno bilo izraženo u kompetitivnom kontekstu kada su se mužjaci parili sa ženkama koje su prethodno bile ukrštane (Dowling i sar., 2015). Ukoliko mitohondrijska mutacija deluje tako što smanjuje kompetitivnost sperme mužjaka, bilo kroz uticaj na same spermatozoide ili na komponente seminalne tečnosti, očekivano je da pogođeni mužjaci u kompeticiji sa onima bez mutacije imaju dodatno smanjene vrednosti fertiliteta. Ovo je posebno važno za poliandrične vrste, poput pasuljevog žiška (Šešlija i sar., 2009b), gde se ženke pare sa više mužjaka u toku života.

Pri upoređivanju rezultata testiranja fertiliteta mužjaka MG3b i BRO mitotipa treba imati na umu jedarne sredine korišćene u istraživanju. Dok je u eksperimentima na pasuljevom žišku fertilitet jedinki meren u F₂ generaciji, u kojoj su jedinke imale 75% potpuno nove jedarne sredine poreklom iz prirodne populacije i 25% svoje koevoluirane jedarne sredine, u testovima kod mušice na BRO mitotipu, testiran je fertilitet mužjaka u F₁ generaciji koji imaju 50% nove, varijabilne jedarne sredine iz prirodne populacije i 50% w1118 jedarne sredine. Razlog zašto je ovo važno je taj što je sterilišući efekat BRO mitotipa upravo i ustanovljen u w1118 jedarnoj sredini, te je verovatnije da je smanjenje fertiliteta kod BRO mužjaka u pet (Dowling i sar., 2015) odnosno tri (Wolff i sar., 2016a) jedarne sredine rezultat epistatičkih interakcija sa w1118 sredinom, a ne pravi pokazatelj doslednog dejstva BRO mitotipa na fertilitet mužjaka.

Važan rezultat analize na prirodnim populacijama pasuljevog žiška jeste izostanak značajnih mito-jedarnih interakcija na variranje fertiliteta mužjaka i ženki. Ovo je interesantno budući da je veliki broj radova utvrdio da na variranje osobina životne istorije jedinki sa mitotipovima eksprimiranim u novoj jedarnoj sredini značajno utiču mito-jedarne interakcije (Ellison i Burton, 2008; Chang i sar., 2016; Rank i sar., 2020; Betinazzi i sar., 2024). Zbog važnosti mito-jedarnih interakcija očekuje se pojava jedarnih kompenzacionih mutacija koje maskiraju efekat štetnih mitohondrijskih mutacija. Štaviše, ovo se smatra jednim od retkih načina na koji mužjaci mogu da izbegnu efekte materinske kletve (Gemmell i sar., 2004). Izostanak uticaja mito-jedarnih interakcija, to jest slično smanjenje fertiliteta MG3b mužjaka u odnosu na kontrole bez obzira na jedarnu sredinu, sugerise da se u ispitivanim jedarnim sredinama ne nalaze varijante koje bi kompenzovala efekat materinske kletve. Ovaj zaključak u skladu je sa evolucionim modelima koje su predložili Vejd (Wade, 2014) i Konalon i saradnici (Connallon i sar., 2018). Kako su ovi modeli pokazali, efikasnost selekcije na jedarne kompenzacione mutacije može biti smanjena iz nekoliko razloga. Najpre, samo mužjaci imaju korist od takvih mutacija, što znači da selekcija deluje samo na polovinu populacije. Drugim rečima, prosečna adaptivna vrednost na nivou populacije biće smanjena. Smanjenje prosečne adaptivne vrednosti usled prisustva kompenzacione mutacije biće još veće ukoliko ona ima polno antagonistički efekat, to jest ako šteti ženkama. Dodatno, česta je pojava da nove mutacije moraju biti u homozigotnom stanju da bi ispoljile efekat, što dodatno usporava njihovo širenje u populaciji. Čak i ako se nađe u homozigotnom stanju, kompenzaciona varijanta mora biti eksprimirana zajedno sa mitotipom koji ostvaruje negativan efekat na mužjake.

Konačno, ukoliko je potrebno više mutacija za ostvarivanje kompenzacionog efekta, delovanje selekcije je dodatno otežano. Procenjeno je da stopa pojave i verovatnoća širenja jedarnih kompenzacionih mutacija iznosi samo 25% verovatnoće pojave i širenja mutacija materinske kletve u mitohondrijama (Wade, 2014). Neki od novijih modela predviđaju da je ovaj odnos i manji od $\frac{1}{4}$ (Dapper i sar., 2023). Dakle, činjenica da su istraživanja na BRO mitotipu mušica pokazala značajan efekat mito-jedarnih interakcija na fertilitet mužjaka (Dowling i sar., 2015; Wolff i sar., 2016a) mogla bi ukazivati na postojanje kompenzacionih mutacija u prirodnim populacijama *D. melanogaster*. Takav nalaz je u saglasnosti i sa rezultatima na G177S mitotipu koji šteti fertilitetu mužjaka u w1118 jedarnoj sredini. U drugim jedarnim sredinama, negativni efekat ovog mitotipa na mužjake u potpunosti se gubi (Patel i sar., 2016). S druge strane, rezultati eksperimenata na pasuljevom žišku u saglasju su sa predstavljanim evolucionim modelima i sugerišu da, makar u ispitanim prirodnim populacijama, nisu prisutne jedarne varijante koje bi maskirale efekat MG3b mitotipa na fertilitet mužjaka. Dodatno, izostanak kompenzacionih varijanti u testiranim prirodnim populacijama slaže se sa očekivanjima koja proizilaze iz populaciono-genetičkih analiza koja ukazuju na veliku stopu protoka gena između populacija žiška u Srbiji što usporava kompenzaciju koevoluciju (Rand i Mossman, 2020). Ovo je još jedan u nizu rezultata koji ukazuju da bi MG3b mogao biti prvi mitotip otkriven na ekonomski štetnoj vrsti koji ima potencijal da se koristi u tehnici trojanskih ženki.

I pored obećavajućih rezultata u vezi sa fertilitetom mužjaka, upotrebljivost MG3b mitotipa u tehnici trojanskih ženki bila bi upitna ukoliko bi ta mitohondrijska varijanta uticala negativno na ženke u interakcijama sa različitim jedarnim sredinama. Dobijeni rezultati eksperimenata na prirodnim populacijama u saglasnosti su sa prvim analizama efekata MG3b mitotipa na osobine životne istorije ženki u jednoj varijabilnoj jedarnoj sredini. Drugim rečima, MG3b ženke su u svim jedarnim sredinama ispoljavale vrednosti fertiliteta slične kontrolnim ženkama i nije utvrđen značajan efekat mito-jedarnih interakcija na ovu osobinu. MG3b ženke nisu ispoljile ni povišene vrednosti fertiliteta (štaviše, MG1a ženke su te koje su imale najviše vrednosti) što potvrđuje da MG3b nema polno antagonističko dejstvo, to jest da je reč o delovanju „slabe“ materinske kletve (Dowling i Adrian, 2019).

5.5 Uticaj životne sredine na efekat kandidat TTŽ mutacije

Dobro je poznata činjenica da faktori spoljašnje sredine, pre svega temperatura, imaju uticaj na funkcionisanje mitohondrija i sistema oksidativne fosforilacije (Blier i Lemieux, 2001; Pichaud i sar., 2010). Uzimajući u obzir brojne radove koji su demonstrirali efekat temperature sredine na dejstvo mito-jedarnih interakcija (Dowling i sar., 2007b; Arnqvist i sar., 2010; Hoekstra i sar., 2013), opravdano je razmatrati efikasnost tehnike trojanskih ženki u kontekstu ovog faktora životne sredine. Iz tog razloga, važan aspekt ove teze jeste eksperiment u kom je testiran efekat tri mitotipa (kandidat TTŽ MG3b mitotipa i dva kontrolna) u jedarnim sredinama iz prirodnih populacija na dve temperature – standardnoj na kojoj se održavaju laboratorijske populacije (30°C), i povišenoj (32°C), koja predstavlja sredinski stresor.

Glavni rezultat ovog eksperimenta je taj da se na povišenoj temperaturi u najvećem obimu gube razlike između mitotipova. Mužjaci sa MG3b mitotipom i na povišenoj temperaturi imaju najmanje vrednosti fertiliteta, ali razlike između mitotipova su manje nego pri standardnoj temperaturi gajenja. Fertilitet MG3b ženki ostao je sličan ženkama nosiocima dva kontrolna mitotipa. Najinteresantniji rezultat je potpuno različit način reagovanja mužjaka i ženki tri mitotipa na povećanje temperature. MG1a mužjacima i ženkama fertilitet na povišenoj temperaturi značajno opada, MG1d mužjacima i ženkama smanjenje fertiliteta je neznatno u odnosu na fertilitet na standardnoj temperaturi, dok MG3b jedinke imaju vrlo idiosinkratičnu reakciju. Dok ženkama fertilitet blago opada, mužjacima se povećava! Ovi rezultati u skladu su sa radovima koji su pokazali da specifični mitotipovi i mito-jedarne interakcije

mogu različito reagovati na povećanje temperature. Primera radi, istraživanje na pasuljevom žišku *C. maculatus* pokazalo je da se jedinke nekih mito-jedarnih genotipova razvijaju brže, a nekih sporije na povišenoj temperaturi (Dowling i sar., 2007b). Isto tako, pokazano je da larve *D. melanogaster* sa specifičnom nekoevoluiranom mito-jedarnom kombinacijom bolje reaguje na sredinski stres nego larve sa mitohondrijskim i jedarnim genomom koji su koevoluirali u jednoj populaciji (Rodríguez i sar., 2021), slično mužjacima MG3b mitotipa. U već pomenutom istraživanju Volfa i saradnika, u kom su testirali efekat BRO mitotipa u različitim jedarnim sredinama, ispitan je i uticaj tri različita temperaturna režima na fertilitet mužjaka sa različitim mito-jedarnim kombinacijama. I u ovom istraživanju temperatura je imala različit efekat na različite kombinacije – kontrolnim mitotipovima se fertilitet povećavao sa povećanjem temperature, dok je BRO mitotip imao najniže vrednosti fertiliteta na najnižoj temperaturi, a najviše na srednjoj (Wolff i sar., 2016a).

S druge strane, u brojnim istraživanjima je ustanovljeno da toplotni stres dovodi do dodatnog pada adaptivne vrednosti jedinki sa narušenim mito-jedarnim interakcijama (Hoekstra i sar., 2013; Patel i sar., 2016), što se objašnjava mogućnošću da stres samo dodatno razotkriva smanjenu efikasnost OXPHOS-a sastavljenog od nekompatibilnih subjedinica. Mina i saradnici pokazali su da akutni toplotni stres kod *D. melanogaster* dovodi do pada fertiliteta mužjaka zbog osetljivosti procesa spermatogeneze na povišenu temperaturu (Meena i sar., 2024).

Dakle, iako je očigledno da su plastični odgovori na povišenu temperaturu veoma varijabilni (Immonen i sar., 2020), postavlja se pitanje zašto mužjaci MG3b mitotipa pokazuju povećane vrednosti fertiliteta u stresnim uslovima sredine. Postoji nekoliko potencijalnih objašnjenja.

Različite mitohondrijske varijante i mito-jedarne kombinacije mogu biti u različitom stepenu prilagođene na specifične temperaturne uslove (Fontanillas i sar., 2005; Camus i sar., 2017). Mitohondrije prilagođene na hladnije uslove životne sredine pokazuju manji stepen korelisanosti procesa transfera elektrona sa proizvodnjom ATP-a, jer se protoni nakupljeni u međumembranskom prostoru ne vraćaju u matriks kroz ATP sintazu, već pomoću tzv. dekuplujućih proteina koji u tom procesu stvaraju toplotu. Ovakva mitohondrija bila bi štetna u toplijim uslovima, gde nema potrebe za produkcijom toplote. Isto tako, mitohondrije sa bolje povezanim procesima transporta elektrona i sinteze ATP-a korisnije su u toplijim uslovima, ali štetne u hladnijim (Sunnucks i sar., 2017). Dodatno, ovakve mitohondrije povezane su sa povećanom produkcijom ROS-a, što im dodatno smanjuje adaptivnu vrednost na nižoj temperaturi (Stier i sar., 2014). Jedno od mogućih objašnjenja za različit efekat MG3b mitotipa zavisano od temperature podrazumeva da, iako ovaj mitotip ima snižene vrednosti aktivnosti OXPHOS-a, procesi transporta elektrona i sinteze ATP-a su više spregnuti. Rezultati, međutim, ukazuju da ovo objašnjenje nije validno. Naime, vrednosti odnosa respiratorne kontrole, iako ne daju informaciju o proizvodnji toplote na račun dekuplujućih proteina, ipak daju uvid u efikasnost korišćenja transporta elektrona za sintezu ATP-a. Ove vrednosti najniže su za MG3b mitotip, što ukazuje na manju povezanost procesa i ne pruža objašnjenje povećanog fertiliteta MG3b mužjaka na višim temperaturama.

Rodríguez i saradnici objasnili su povećanu adaptivnu vrednost larvi mušica *D. melanogaster* sa narušenim mito-jedarnim kombinacijama u stresnim uslovima sredine fenomenom koji se označava kao mitohormeza (Rodríguez i sar., 2021). Hormeza predstavlja pojavu u kojoj prethodno doživljen stres povećava otpornost na budući stres. Mitohormeza je, saglasno tome, pojava koja predviđa da će bilo koji stres koji iskusi mitohondrija (u slučaju MG3b mitotipa je to genomski stres poreklom od mtDNK mutacija u nekoevoluiranoj jedarnoj sredini) aktivirati jedarni odgovor (Epsetin i sar., 2001). Ovaj odgovor može uključivati velike metaboličke i biohemijske promene koje mogu da pruže i dugotrajnu zaštitu od različitih novih stresora (Yun i Finkel, 2014). Može se pretpostaviti, na osnovu navedenih objašnjenja i detektovanih efekata MG3b mitotipa na adaptivnu vrednost mužjaka pasuljevog žiška, da deficitarna OXPHOS funkcija izaziva globalni ćelijski odgovor. Iako reakcija jedra na mitohondrijski stres nije dovoljna da kompenzuje negativne efekte mitotipa, što je nesporno očigledno na nivou

fertiliteta mužjaka na standardnoj temperaturi, ona uspeva da kompenzuje negativne efekte povišene temperature.

Proteini toplotnog šoka (HSP, engl. *heat-shock proteins*) jedan su od najznačajnijih i najbolje izučenih mehanizama zaštite protiv toplotnog stresa kod insekata. Nivo njihove ekspresije se menja pri porastu temperature i specifičan je za različita tkiva (González-Tokman i sar., 2020). Pored tkivne specifičnosti, ekspresija HSP gena pokazuje i polnu specifičnost. Jedno nedavno istraživanje na mužjacima i ženka moljca vrste *Spodoptera frugiperida* pokazalo je različit transkripcioni odgovor polova na povećanje temperature. Pored različite ekspresije proteina toplotnog stresa, čitav niz drugih gena asociраних sa odgovorom na stres bio je takođe diferencijalno eksprimiran. U svetlu činjenice da mitotipovi mogu izazvati potpuno različitu ekspresiju jedarnih gena kod mužjaka i ženki (Innocenti i sar., 2011), moguće je da MG3b mitotip dovodi do povećane ekspresije HSP-a kod mužjaka u toplotnom stresu.

Činjenica da se na povišenoj temperaturi smanjuje negativan efekat MG3b mitotipa na fertilitet mužjaka ukazuje na važnost ovakvih eksperimenata pri utvrđivanju kandidat TTŽ mitotipova. S obzirom na to da pasuljev žižak najveću ekonomsku štetu na kvalitet semena mahunarki ostvaruje u skladištima pasulja u kojima se mogu kontrolisati abiotički faktori sredine, povoljan efekat povišene temperature na TTŽ mužjake može se sprečiti održavanjem konstantne temperature na kojoj ovi mužjaci imaju najmanje vrednosti fertiliteta. Iz tog razloga, budući eksperimenti trebalo bi da testiraju efekat mitohondrijskih haplotipova u većem opsegu temperatura i odrede onu na kojoj je efekat na mužjake najveći.

5.6 Introdokcija trojanskih ženki u prirodnu populaciju

Tehnika trojanskih ženki zasniva se, kako je već naglašeno, na ubacivanju u prirodne populacije ženki nosilaca specifičnog mitotipa koji šteti samo reproduktivnom potencijalu mužjaka. Teorijska pretpostavka je da bi kroz generacije trebalo da dođe do održivog pada brojnosti populacije usled produkcije sterilnih mužjaka u svakoj generaciji (Gemmell i sar., 2013). Matematički modeli podržali su teorijske postavke ove metode. Naime, pokazano je da ukoliko korišćeni mitotip izaziva potpunu sterilnost mužjaka, dolaziće do značajnog pada brojnosti populacije nakon samo jednog otpuštanja trojanskih ženki u kom je proporcija introdukovanih ženki 10% (Gemmell i sar., 2013). Ipak, kako su istraživanja u poslednje dve decenije uspela da identifikuju samo mitotipove koji smanjuju muški reproduktivni potencijal, tj. ne postižu sterilišući efekat, javila se potreba za modifikovanim modelima. Tako, Volf i saradnici u svom modelu demonstriraju da je i parcijalni efekat na reproduktivni kapacitet mužjaka dovoljan za supresiju populacije, ali da udeo trojanskih ženki koje je neophodno introdukovati u populaciju mora biti veći (Wolff i sar. 2016a). Ipak, sudeći po već postojećem modelu Gemela i saradnika, za ovu tehniku to ne bi trebalo da predstavlja problem jer manje, sukcesivne introdukcije imaju aditivan efekat i potencijal da izazovu i značajnije smanjenje brojnosti populacije od jednog velikog otpuštanja trojanskih ženki (Gemmell i sar., 2013).

Vodeći se opisanom teorijom i modelima, u poslednjem eksperimentu na pasuljevom žišku je repliciran proces primene tehnike trojanskih ženki u skladišnim populacijama. Ženke sa MG3b mitotipom (trojanske ženke) ubačene su u populaciju u dva različita odnosa: 25% i 75% od ukupnog broja ženki. Po istom principu formirane su i kontrolne populacije u kojima su ubačene ženke posedovale neki od dva kontrolna mitotipa. Kroz generacije praćena je učestalost ubačenih mitotipova i mereni su parametri stope rasta populacije (Slika 3.7.1).

5.6.1 Učestalost TTŽ mitotipa nakon introdukcije trojanskih ženki

Promene učestalosti kandidat TTŽ mitotipa u prirodnoj populaciji daju uvid u način delovanja selekcije na fenotipske efekte tog mitotipa. Ukoliko mu se brojnost smanjuje, trojanske ženke nisu kompetitivne u odnosu na one iz prirodne populacije, to jest imaju manju adaptivnu vrednost. U tom slučaju, kandidat TTŽ mitotip se ne može koristiti u tehnici trojanskih ženki u testiranoj prirodnoj populaciji. Ukoliko učestalost raste, mitotip povećava adaptivnu vrednost ženkama i širi se kroz populaciju. U tom slučaju povećava se i brojnost trojanskih sinova, što je najbolji scenario za TTŽ. Konačno, ukoliko mitotip nema nikakav efekat na ženke, očekivano je da se njegova učestalost menja prvenstveno pod dejstvom genetičkog drifta. Za MG3b mitotip nisu detektovani polno antagonistički efekti (videti ranije). Ženke MG3b mitotipa sa jedarnom sredinom iz Bele Palanke imale su slične vrednosti fertiliteta u odnosu na kontrolni MG1d mitotip, zbog čega se može pretpostaviti da će se kroz generacije uočiti fluktuacije učestalosti samo usled delovanja drifta. Međutim, rezultati su pokazali da je u svim formiranim populacijama (i replikama), već posle dve generacije, ubačeni mitotip bio fiksiran (u slučaju MG1a) ili se približio fiksaciji (u slučaju MG1d i MG3b) (Slika 18).

Ishod ovog eksperimenta mogao je biti očekivan samo za MG1a mitotip čije su ženke pokazale povišene vrednosti prosečnog fertiliteta u jedarnoj sredini iz Bele Palanke u poređenju sa ženkama druga dva mitotipa (Slika 16.A). U slučaju MG1d i MG3b mitotipa, jedino objašnjenje brzog povećanja učestalosti jeste ekstremni efekat genetičkog drifta u populacijama sa malom inicijalnom veličinom. U sličnom eksperimentu Volfa i saradnika na *D. melanogaster* sa istom početnom brojnošću populacije, BRO mitotip je blago povećao učestalosti kroz generacije (ovo jedino nije važno za startni udeo od 25% trojanskih ženki gde se učestalost BRO mitotipa neznatno smanjila). Međutim, u nekim replikama došlo je do fiksacije ili eliminacije ovog mitohondrijskog haplotipa (Wolff i sar., 2017). Nedovoljan broj replika u eksperimentu iz ove disertacije i mala početna brojnost populacije onemogućili su sticanje prave slike o dinamici promene učestalosti TTŽ i kontrolnih mitotipova. Ipak, činjenica da je identičan trend izuzetno brze fiksacije uočen u populacijama svih mitotipova, bez obzira na njihov početni udeo, u svim replikama, čini genetički drift malo verovatnim jednim krivcem za uočenu fiksaciju.

S obzirom na to da se mitotipovi specifični za populaciju iz Bele Palanke (H7 i H9) u potpunosti gube iz svih formiranih populacija do pete generacije eksperimenta, govori u prilog negativnim adaptivnim efektima u novim laboratorijskim uslovima. Pored selektivnog smanjenja učestalosti mitotipova H7 i H9, njihova rapidna eliminacija uzrokovana je udruženim delovanjem prirodne selekcije i genetičkog drifta. Belopalanačka populacija održavana je u laboratoriji najmanje pet generacija pred početak eksperimenata, dovoljno da se populacija aklimatizuje na nove, stabilne uslove sredine (Hoffmann i Ross, 2018), ali ne i da se evoluciono (genetički) adaptira, posebno ukoliko selekcionarni pritisak nije veliki. Budući da je ova populacija osnovana od jedinki uzorkovanih iz bašte odgajivača, a ne iz skladišta, laboratorijski uslovi jesu značajno drugačiji od originalnog staništa populacije. Ne može se isključiti mogućnost da je u belopalanačkoj populaciji pasuljevog žiška već u prvoj generaciji eksperimenta došlo do smanjenja učestalosti jedinki sa jedarnom sredinom iz Bele Palanke koja nije prilagođena na opisani režim, a samim tim i do postepene eliminacije H7 i H9 mitotipova asociраних sa datom jedarnom sredinom. Još jedno potencijalno objašnjenje daju rezultati istraživanja na žišku slatkog krompira (*Cylas formicarius*) koje je pokazalo da ženke laboratorijskih populacija imaju značajno smanjen otpor prema pokušajima mužjaka da sa njima stupe u reprodukciju u odnosu na ženke iz prirodnih populacija (Kuriwada i sar., 2014). Navedena hipoteza koja podrazumeva i ulogu seksualne selekcije, mogla je već u prvoj generaciji drastično povećati učestalost MG1a, MG1d i MG3b mitotipova usled toga što L žišci, od kojih svi mitotipovi vode poreklo, karakteriše češće stupanje u reprodukciju (Stojković i sar., 2011). Nakon početnog selektivnog uvećanja učestalosti, verovatnoća fiksacije najčešćeg mitotipa se uvećava usled delovanja genetičkog drifta. Bez obzira na selektivni pritisak koji stoji iza smanjenja učestalosti mitotipova iz prirodne populacije, činjenica da kandidat TTŽ MG3b mitotip povećava učestalost zadovoljava jednu od najvažnijih pretpostavki tehnike trojanskih ženki.

Konačno, činjenica da dolazi od fiksacije TTŽ mitotipa čak i pri njegovim niskim početnim udelima ukazuje na to da bi ova metoda mogla biti efikasna i pri ubacivanju manjeg broja jedinki.

5.6.2. Efekat TTŽ mitotipa na brojnost populacije

Volf i saradnici razvili su model tehnike trojanskih ženki kojim su predvideli opadanje brojnosti populacije proporcionalno stepenu smanjenja fertiliteta trojanskih sinova i udelu introdukovanog trojanskog mitotipa u prirodnoj populaciji (Wolff i sar., 2016a). Važno je naglasiti da se procentualna zastupljenost TTŽ mitotipa u navedenom modelu odnosi na zastupljenost mitotipa u celoj populaciji, dok se u eksperimentu na pasuljevom žišku odnosi na zastupljenost TTŽ mitotipa kod ženki. Dakle, zbog toga što su početne generacije tretmana formirane sa po 40 ženki i mužjaka, početne učestalosti MG3b i kontrolnih mitotipova u ukupnoj populaciji su 12,5% (za tretman sa 25% trojanskih ženki) i 37,5% (za tretman sa 75% trojanskih ženki). Za ove vrednosti početnih učestalosti i uočeno prosečno smanjenje fertiliteta MG3b mužjaka od oko 35%, očekivan je pad brojnosti populacije za oko 4% (za tretman sa 25% trojanskih ženki), tj. 14% (za tretman sa 75% trojanskih ženki) (Wolff i sar., 2016a).

Rezultati na populacijama pasuljevog žiška pokazali su da se ekološki parametri (stope rasta) populacija sa različitim početnim učestalostima trojanskih ženki ne razlikuju međusobno u drugoj i u petoj generaciji. Takav nalaz nije iznenađujuć u svetlu činjenice da su se učestalosti testiranih haplotipova u drugoj generaciji izjednačile i dostigle visoke vrednosti. Najznačajniji rezultat ovog eksperimenta jeste da brojnost populacije u koju su introdukovane MG3b ženke blago opada u drugoj generaciji (vrednosti R_0 za oko 10% niže u odnosu na MG1a mitotip), ali u petoj generaciji se ovaj efekat ne pojačava. Štaviše, stope rasta populacije više su u petoj generaciji u odnosu na drugu i ne razlikuju se u odnosu na populacije sa introdukovanim kontrolnim mitotipovima. Sličan rezultat dobijen je i u već pomenutom istraživanju u kom je ispitivan efekat BRO mitotipa na pad brojnosti populacije (Wolff i sar., 2017). Za razliku od eksperimenta iz ove disertacije, pomenuto istraživanje kao meru brojnosti nije koristilo populacione parametre rasta populacije, već procenat izleženih jedinki iz jaja (vijabilitet). Uprkos tome, u jednom eksperimentu na vinskoj mušici dobili su značajno niže smanjenje brojnosti populacije sa BRO mitotipom od matematički modelovanog, a u drugom, u kom su dozvoljene veće fluktuacije u promeni brojnosti populacije, supresivni efekat je potpuno izostao (Wolff i sar., 2017). Dakle, iako i MG3b i BRO mitotip u jedarnoj sredini u koju su introdukovani u ovim eksperimentima mužjacima smanjuju fertilitet, to nije pokazalo efekat na brojnost populacije.

Manja stopa rasta u drugoj u odnosu na petu generaciju ukazuje na potencijalnu selekciju jedarnih kompenzacionih mutacija (Wolff i sar., 2017). Iako se očekuje da je kompenzaciona evolucija u prirodnim populacijama neefikasna (Wade, 2014; Connallon i sar., 2018; Dapper i sar., 2023), posebno imajući u vidu izostanak značajnih mito-jedarnih interakcija pri ispoljavanju različitih mitotipova u jedrima iz prirodnih populacija pasuljevog žiška (Tabela 19; Vlainić i sar., 2025), postojanje jedarnih kompenzacionih mutacija utvrđeno je u prirodnim populacijama *D. melanogaster* (Dowling i sar., 2015; Patel i sar., 2016; Wolff i sar., 2016a). Jedan od razloga zašto se delovanje selekcije na kompenzacione mutacije smatra manje efikasnim jeste taj što se takva mutacija mora naći u kombinaciji sa mitohondrijom čiji efekat maskira kako bi ispoljila pozitivan efekat na fenotip i bila favorizovana selekcijom (Connallon i sar., 2018). U prirodnim populacijama ovo zaista jeste otežavajuća okolnost, ali u laboratorijskim populacijama testirani mitotipovi su već posle dve generacije postali prevalentni. U datoj situaciji, prirodna selekcija mogla je efikasno da deluje na postojeće kompenzacione varijante i poveća im učestalost. U petoj generaciji stope rasta populacije rastu, u čemu se ogleda efekat delovanja ovih jedarnih varijanti. Interesantan rezultat da se populacijama sa MG3b mitotipom kroz generacije ubrzava razviće, pomera pik ovipozicije par dana ranije i skraćuje vreme generacije zbog čega se i procene stope rasta povećava, a može se objasniti promenama interakcije ovog mitotipa sa specifičnim

jedarnim varijantama. Rezultat je u skladu sa ranijim istraživanjima koja su pokazala da neke mitojedarne kombinacije dovode do ubrzavanja preadultnog razvića (Dowling i sar., 2007b; Hoekstra i sar., 2013; Jelić i sar. 2015).

Dodatni važan aspekt u razmatranju dobijenih rezultata jeste učestalost ponovnog parenja ženki. Naime, pasuljev žižak je poliandrična vrsta insekta, to jest vrsta kod koje se ženke mogu pariti sa više mužjaka u toku života. Ova karakteristika vrste predstavlja potencijalan način prevazilaženja negativnih efekata mutacija materinske kletve s obzirom na to da ženke mogu sakupiti više kvalitetnih spermatozoida (Gemmell i sar., 2004), kroz parenje sa istim ili različitim mužjacima (Wolff i sar., 2017). U vezi s tim, pokazano je da su, barem kod nekih vrsta, ženke sklonije da se ukrštaju sa novim mužjacima u odnosu na mužjake sa kojima su se već parile (Zeh i sar., 1998). Ukoliko je razlog izostanka supresije brojnosti populacija sa ubačenim MG3b ženkama to što ženke imaju povećanu stopu ponovnog parenja u odnosu na onu koja je predviđena modelima (Wolff i sar., 2016a), očekuje se evidentnije smanjenje brojnosti u prirodnim populacijama, koje su po pravilu manje gustine od laboratorijskih i u kojima je stopa ponovnog parenja značajno niža (Gemmell i sar., 2004; Wolff i sar., 2017). Manja verovatnoća evolucije kompenzacionih mutacija još je jedan razlog zašto bi se u velikim prirodnim populacijama mogao očekivati veći supresivni efekat od procenjenog u opisanom eksperimentu.

5.7 Budućnost „tehnike trojanskih ženki“

Predstavljeni rezultati ove disertacije prvi su nalazi koji ukazuju na postojanje mitohondrijske varijante koja smanjuje fertilitet mužjaka kod ekonomski važne vrste insekta, a u skladu sa predikcijama materinske kletve, zbog čega bi se takva varijanta mogla primeniti u kontroli brojnosti populacija. Podrobne analize pokazale su da bi potencijalna upotreba pronađenog kandidat TTŽ mitotipa mogla biti ograničena zbog delovanja kompenzacionih jedarnih mutacija ili specifičnih uslova životne sredine koji menjaju efekat mitotipa na fertilitet mužjaka. Ipak, značaj pronalaska MG3b mitohondrijske varijante, pored njene nezavisne primene u tehnici trojanskih ženki, ogleda se u njenom korišćenju u genetički modifikovanim TTŽ mitotipovima. Naime, jedna od najvećih prepreka razvoju TTŽ-a je ta što nijedan do sad pronađen mitotip ne izaziva kompletnu sterilnost mužjaka u različitim jedarnim i sredinskim okruženjima. Iz tog razloga, budućnost ove metode mogla bi da leži u integrisanju metoda biokontrole kao i u dizajniranju mitohondrijskih konstrukata koji sadrže mutacije sa već utvrđenim polno specifičnim dejstvom na reproduktivni potencijal mužjaka (Wolff i sar., 2017), poput mutacija u MG3b mitotipu kod pasuljevog žižka ili BRO mitotipa *D. melanogaster*.

Integrisana metoda brojnosti ekonomski štetnih vrsta podrazumeva kombinovanje više postojećih metoda da bi se postigao zadovoljavajući efekat na smanjenje brojnosti populacije (Kogan, 1998). Istovremeno korišćenje različitih metoda biokontrole, poput SIT-a i IIT-a, već je predloženo kao najefektivniji način smanjenja brojnosti populacija koji ne podrazumeva upotrebu pesticida (Zhang i sar., 2016). Imajući u vidu da je jedna od najvećih prepreka u širokoj upotrebi SIT-a štetan efekat koji zračenje ima na različite komponente adaptivne vrednosti jedinki (Teem i sar., 2020), ova metoda bi se mogla uspešno primenjivati sa TTŽ-om. Kako MG3b mitotip smanjuje fertilitet mužjaka za 35% (Slika 5; Vlajnić i sar., 2024), količina zračenja koja bi morala biti upotrebljena da se ovi mužjaci sterilišu mogla bi biti značajno manja od one koja se koristi pri sterilizaciji mužjaka kojima fertilitet nije smanjen. Na ovaj način bi se mogle prevazići najveće prepreke za upotrebu obe metode.

Kada je reč o formiranju veštačkih mtDNK konstrukata, već postoje primeri istraživanja koja su pokazala da je moguće kreirati mtDNK genotip sa negativnim efektom na fertilitet mužjaka. Trifunović i saradnici napravili su mišve koje je genetički modifikovana mtDNK polimeraza na takav način da joj je oštećena 3'-5' egzonukleazna aktivnost (Trifunović i sar., 2004). Dakle, dok je normalno obavljala 5'-3' replikaciju DNK, neuspešno je ispravljala greške u replikaciji. Miševima sa ovakvom mtDNK

polimerazom značajno češće su se javljale mitohondrijske mutacije, zbog čega im je i nadenut naziv „mutator miševi“. Efekat nakupljenih mutacija bio je višestruk i sve izraženiji sa starenjem. Kao interesantan posebno se pokazao uticaj akumuliranih promena na fertilitet mužjaka i ženki. Dok su i ženke bile pogođene mutacijama i posle 20. nedelje života nisu mogle da iznesu trudnoću, skoro svi testirani mužjaci bili su potpuno sterilni. Ovo je povezano sa smanjenom količinom sperme u epididimisu mužjaka i degradacijom tkiva testisa (Trifunović i sar., 2004). Ksu i saradnici imali su drugačiji pristup. Navedeni istraživači napravili su jedinke *D. melanogaster* sa genskim konstruktom zbog kog se u mitohondrijama eksprimirao restrikcioni enzim koji prepoznaje samo jedno restrikciono mesto u okviru *cox1* gena, a uslovljava nemogućnost dobijanja potomstva. Ovakve jedinke uspešno su završavale razviće, međutim mužjaci su bili potpuno sterilni, najverovatnije usled smanjenja brojnosti spermatozoida (Xu i sar., 2008). Pored mutacija materinske kletve koje se prirodno nalaze u populacijama, i ovako identifikovane mutacije mogle bi se iskoristiti za dizajniranje genetičkih konstrukata sa većim brojem polno specifičnih varijanti čije bi udruženo dejstvo potencijalno dovelo do potpune sterilnosti mužjaka bez negativnog uticaja na ženke.

Metode dirigovanog genetičkog editovanja mitohondrijskog genoma još uvek su u razvoju. Selektivno odstranjivanje mutiranih mitohondrija uspešno se radi korišćenjem restrikcioni endonukleaza, nukleaza sličnim aktivatorima transkripcije (Reddy i sar., 2015) i nukleaza sa cinkanim prstima (Gammage i sar., 2018a). Međutim, precizno ubacivanje željenih varijanti u mitohondrijski genom mnogo je veći izazov. Iako se ovakvo ubacivanje već uveliko izvodi CRISPR/Cas9 metodom na jedarnom genomu, mitohondrijski genomi i dalje većinom ostaju zaključani za primenu ove metode zato što se CRISPR/Cas9 oslanja na upotrebu malih nekodirajućih RNK molekula, a još nije otkriven mehanizam prolaska RNK kroz mitohondrijsku membranu (Wisnovsky i sar., 2016; Gammage i sar., 2018b). Ipak, nekoliko studija pokazalo je uspeh u editovanju mtDNK korišćenjem ove tehnike (Jo i sar., 2015; Hussain i sar., 2021), što ukazuje na to da je skorašnji proboj u ovom polju izvestan.

Razumevanje fenomena materinske kletve i mutacija sa negativnim efektom na mužjake ne mora imati značaj samo za razvoj tehnika biokontrole ekonomski štetnih vrsta. Pojavila su se mišljenja da upoznavanje zastupljenosti ovog fenomena, mehanizma delovanja mutacija i razvoj genetičkog editovanja mtDNK mogu pronaći upotrebu i u programima zaštite ugroženih vrsta (Leefflang i sar., 2021; Iverson, 2024).

6. ZAKLJUČCI

Iz rezultata testiranja hipoteze materinske kletve i primenjivosti mitohondrijskih varijanti u tehnici trojanskih ženki kod pasuljevog žiška (*Acanthoscelides obtectus*, Say) izvedeni su sledeći zaključci:

- Identifikacija mitotipa, koji dovodi do pada reproduktivnog potencijala mužjaka a ne utiče na ženke, MG3b mitotipa, u laboratorijskim populacijama pasuljevog žiška, potvrđuje pretpostavku hipoteze materinske kletve da se u populacijama nakupljaju polno specifične mutacije sa negativnim efektom na mužjake.
- Testirani mitotipovi pokazali su veći efekat na variranje osobina kod mužjaka u odnosu na ženke, dok su negativne interseksualne korelacije osobina životne istorije izostale, što je u skladu sa hipotezom „slabe“ forme materinske kletve. Specifično, pronađeni MG3b mitotip ostvaruje negativan efekat na mužjake, dok ima neutralan efekat na ženke.

MG3b mitotip smanjuje fertilitet mužjaka tako što im smanjuje oplodnu sposobnost, što je evidentno iz manjeg broja jaja koja polažu ženke u prva dva dana pri ukrštanju sa mužjacima nosiocima ovog mitotipa.

Iako mitotipska varijabilnost utiče na variranje dužine života mužjaka, MG3b mitotip nema negativan efekat na ovu osobinu ni kod mužjaka ni kod ženki, što ga čini dobrim kandidatom za primenu u tehnici trojanskih ženki (kandidat TTŽ mitotip).

- Mitohondrijska respiratorna funkcija mužjaka MG3b mitotipa smanjena je u odnosu na mužjake druga dva mitotipa, što potencijalno dovodi do uočenog pada oplodne sposobnosti mužjaka. Ovi rezultati ukazuju na potrebu da se detaljnije analiziraju osobine spermatozoida i kvalitativni sastav ejakulata MG3b mužjaka.
- Analiza genetičke strukture prirodnih populacija pasuljevog žiška sa teritorije Srbije pokazala je izostanak viših nivoa populacione organizacije i ukazuje na postojanje visoke stope protoka gena. Ovo je u skladu sa drugim populaciono-genetičkim istraživanjima ove vrste i objašnjava se intenzivnim mešanjem populacija kao posledica transporta semena pasulja i drugih leguminoza.

Velika varijabilnost na nivou mitohondrijskog genoma i mešanje populacija ukazuju na to da u prirodnim populacijama pasuljevog žiška postoji visoka verovatnoća nakupljanja mutacija materinske kletve, kao i na to da selekcija neće delovati protiv TTŽ mitotipa nakon njegove introdukcije u prirodne populacije.

- Analiza efekta MG3b i kontrolnih mitotipova na fertilitet mužjaka i ženki u različitim jedarnim sredinama pokazala je da se smanjenje fertiliteta mužjaka održava u različitim jedarnim sredinama, dok efekat na ženke konzistentno izostaje, što je od izuzetnog značaja za primenu materinske kletve.

Izostanak značajnog efekta mito-jedarnih interakcija na fertilitet mužjaka ukazuje na to da u testiranim jedarnim sredinama kompenzacione mutacije ne segregiraju u visokim učestalostima, što je u skladu sa predikcijama modela evolucije ovakvih mutacija.

Povišena temperatura ima značajan efekat na fertilitet mužjaka i ženki. Od posebnog značaja je podatak da se MG3b mužjacima povećao prosečan fertilitet, dok je kod kontrolnih mužjaka smanjen, što ukazuje na proces mitohormeze kod MG3b mitotipa. Sa stanovišta primenljivosti u TTŽ-u, ovaj rezultat demonstrirao je potrebu za testiranjem efekata različitih sredinskih faktora pre primene mitotipova u kontroli brojnosti populacija.

- Fiksiranje MG3b i kontrolnih mitotipova nakon njihove introdukcije u prirodnu populaciju najverovatnije je posledica snižene adaptivne vrednosti mitotipova iz prirodne populacije usled lošije prilagođenosti na laboratorijske uslove sredine kao i njihovih osobina reproduktivnog ponašanja karakterističnih za žiške poreklom od L linija.

Izostanak smanjenja brojnosti populacije nakon ubacivanja MG3b mitotipa, uprkos njegovom utvrđenom efektu na fertilitet mužjaka, ukazuje na kompleksnost procesa koji određuju populacionu dinamiku. Bilo da je ovaj rezultat posledica ograničenosti dizajna samog eksperimenta, evolucije kompenzacionih mutacija ili nekih drugih, kriptičnih procesa koji nadomešćuju smanjenje fertiliteta mužjaka, neophodne su detaljnije populacione studije koje će verno simulirati introdukciju TTŽ mitotipa u prirodne populacije.

Konačno, činjenica da MG3b mitotip ne dovodi do sterilnosti mužjaka i da nije izazvao smanjenje brojnosti populacije, govori da je budućnost TTŽ-a najverovatnije u integrisanoj kontroli ekonomskih štetočina, koje uključuje i genetičko editovanje mitohondrijskog genoma.

7. TABELE

Tabela 1. Parametri mitohondrijskog diverziteta L mitotipova na osnovu 13 mitohondrijskih protein-kodirajućih gena. Iznad deblje linije nalaze se podaci za svih šest mitotipova, a ispod linije su podaci samo za MG1a, MG1d i MG3b mitotip. Pi – mesta informativna za parsimoniju; S – singleton mesta.

Lokus	Broj haplotipova	Varijabilna mesta	Varijabilna mesta (%)	Pi	S	Aminokiselinske razlike	Aminokiselinske razlike (%)
<i>cox1</i>	3	3	0,46	0	3	0	0
<i>cox2</i>	3	8	1,17	7	1	1	0,44
<i>cox3</i>	3	3	0,48	3	0	1	0,48
<i>nad1</i>	3	2	0,29	1	1	1	0,44
<i>nad4</i>	2	4	0,85	4	0	0	0
<i>nad4l</i>	3	3	1,89	2	1	0	0
<i>nad6</i>	3	5	0,98	4	1	1	0,51
<i>cytb</i>	2	4	0,69	4	0	1	0,52
<i>nad2</i>	2	6	0,91	0	6	2	0,91
<i>nad3</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>nad5</i>	1	0	0	0	0	0	0
<i>atp6</i>	3	4	0,82	0	4	2	1,23
<i>atp8</i>	2	2	1,28	0	2	1	1,92

Tabela 2. Sve nukleotidne zamene u osam mitohondrijskih gena za šest mitohondrijskih haplotipova. Nesinonimne zamene su podebljane, obeležene zvezdicom i okarakterisane u poslednjem redu; a.k. zamena – aminokiselinska zamena. Korišćene su standarne oznake za aminokiseline.

	cox1				cox3			nad4				nad4l		nad6						cytb				nad1		cox2									
Pozicija	279	387	393	531	159	399	509	490	545	695	707	166	214	72	106	183	210	318	507	786	858	1000	382	761	100	300	372	390	396	582	603	663			
MG1a	C	C	T	G	G	G	T	G	T	T	G	G	A	T	G	A	G	C	C	G	G	A	C	G	A	C	T	C	C	A	G	A			
MG1b	C	C	T	G	G	G	C*	G	T	T	G	G	A	T	G	A	G	C	C	G	G	A	C	G	A	C	T	C	C	A	G	A			
MG1c	C	C	T	G	G	G	C*	G	T	T	G	G	A	T	A*	A	G	C	C	G	G	A	C	G	A	C	T	C	C	A	G	A			
MG1d	C	C	T	G	G	G	C*	G	T	T	G	G	A	T	G	A	G	C	C	G	G	A	T*	G	A	C	T	C	C	A	G	A			
MG3a	C	T	C	A	A	A	T	A	C	C	A	A	A	A	G	G	A	T	T	A	A	G*	C	A	A	T	C	T	T	G	A	G			
MG3b	C	T	C	A	A	A	T	A	C	C	A	A	G	A	G	G	A	T	T	A	A	G*	C	A	G*	T	C	T	T	G	A	G			
a.k. zamena	/	/	/	/	/	/	Ile-170-Thr	/	/	/	/	/	/	/	Val-36-Met	/	/	/	/	/	/	Ile-334-Val	Asp-164-Asn	/	Ile-34-Val	/	/	/	/	/	/	/			

Tabela 3. Matrica parova distanci između šest laboratorijskih mitotipova izračunata korišćenjem Tamura-Nei modela nukleotidne supstitucije (Tajima i Nei, 1984) na osnovu sekvenci osam mitohondrijskih gena. Iznad dijagonale date su procene standardne greške dobijene *bootstrap* metodom sa 500 ponavljanja. Podebljane su genetičke distance između mitotipova korišćenih u daljim eksperimentima: MG1a, MG1d i MG3b.

	MG1a	MG1b	MG1c	MG1d	MG3a	MG3b
MG1a	-	0,0002	0,0003	0,0003	0,0012	0,0013
MG1b	0,0002	-	0,0002	0,0002	0,0013	0,0014
MG1c	0,0005	0,0002	-	0,0003	0,0013	0,0014
MG1d	0,0005	0,0002	0,0005	-	0,0013	0,0013
MG3a	0,0063	0,0065	0,0068	0,0067	-	0,0003
MG3b	0,0067	0,0070	0,0072	0,0072	0,0005	-

Tabela 4. Nukleotidne zamene u *nad2*, *atp6* i *atp8* genu za tri mitohondrijska haplotipa (MG1a, MG1d i MG3b). Nesinonimne zamene su obeležene zvezdicom.

	<i>nad2</i>						<i>atp6</i>				<i>atp8</i>	
Pozicija	192	218	294	412	567	603	134	191	270	360	3	59
MG1a	T	T	T	G	A	T	A	G	T	A	T	T
MG1d	T	T	T	G	A	T	G*	G	T	A	T	T
MG3b	C	C*	C	A*	G	C	T*	A*	C	G	C	A*

Tabela 5. Pozicija i vrsta aminokiselinskih zamena u svim protein-kodirajućim mitohondrijskim genima za tri mitotipa (MG1a, MG1d i MG3b). Kosom crtom obeleženi su geni u kojima nema nesinonimnih mutacija, dok su aminokiselinske supstitucije specifične za MG3b mitotip podebljane. Korišćene su standardne oznake za aminokiseline.

	<i>cox1</i>	<i>cox2</i>	<i>cox3</i>	<i>nad4</i>	<i>nad4L</i>	<i>nad6</i>	<i>cytb</i>	<i>nad1</i>	<i>nad3</i>	<i>nad5</i>	<i>atp8</i>	<i>atp6</i>		<i>nad2</i>	
pozicija u proteinu		34	169				334	171			20	45	64	73	138
MG1a	/	Ile	Ile	/	/	/	Ile	Asp	/	/	Phe	Gln	Ser	Ile	Val
MG1d	/	Ile	Thr	/	/	/	Ile	Asn	/	/	Phe	Arg	Ser	Ile	Val
MG3b	/	Val	Ile	/	/	/	Val	Asp	/	/	Tyr	Leu	Lys	Thr	Met

Tabela 6. Matrica parova distanci između tri laboratorijska mitotipa izračunata korišćenjem Tamura-Nei modela nukleotidne supstitucije (Tajima i Nei, 1984) na osnovu sekvenci 13 mitohondrijskih gena. Iznad dijagonale date su procene standardne greške dobije *bootstrap* metodom sa 500 ponavljanja.

	MG1a	MG1d	MG3b
MG1a	-	0,0003	0,0010
MG1d	0,0007	-	0,0011
MG3b	0,0074	0,0077	-

Tabela 7. Mešani model analize kovarijanse za rani fekunditet kod mužjaka i ženki TTŽ kandidata i kontrola. Mitotip i replika su fiksirani faktori, a masa je modelovana kao kovarijabla. Replika je ugnežđena u mitotip i predstavlja nasumičan faktor u analizi. dF – stepeni slobode, F – F-odnos, P – statistička značajnost.

Izvor variranja	dF	F	P
Ženke			
mitotip	2, 3,03	0,42	0,6883
masa tela	1, 344	0,10	0,7577
replika (mitotip)	3, 344	8,16	<0,0001
Mužjaci			
mitotip	2, 3,08	6,15	0,0838
masa tela	1, 322	0,58	0,4483
replika (mitotip)	3, 322	2,47	0,0619

Tabela 8. Mešani model analize kovarijanse za totalni fekunditet kod mužjaka i ženki TTŽ kandidata i kontrola. Mitotip i replika su fiksirani faktori, a masa je modelovana kao kovarijabla. Replika je ugnežđena u mitotip i predstavlja nasumičan faktor u analizi. dF – stepeni slobode, F – F-odnos, P – statistička značajnost.

Izvor variranja	dF	F	P
Ženke			
mitotip	2, 3,08	0,18	0,8436
masa tela	1, 342	104,90	<0,0001
replika (mitotip)	3, 342	3,19	0,0239
Mužjaci			
mitotip	2, 3,05	1,93	0,2872
masa tela	1, 316	3,27	0,0715
replika (mitotip)	3, 316	3,80	0,0106

Tabela 9. Mešani model analize kovarijanse za dužinu života kod mužjaka i ženki TTŽ kandidata i kontrola. Mitotip i replika su fiksirani faktori, masa kovarijabla u kod mužjaka i ženki, a totalni fekunditet dodatna kovarijabla u analizi za ženke. Replika je ugnežđena u mitotip i predstavlja nasumičan faktor u analizi. dF – stepeni slobode, F – F-odnos, P – statistička značajnost.

Izvor variranja	dF	F	P
Ženke			
mitotip	2, 3,01	1,12	0,4322
masa tela	1, 340	45,81	<0,0001
totalni fekunditet	1, 340	15,54	<0,0001
replika (mitotip)	3, 340	16,02	<0,0001
Mužjaci			
mitotip	2, 3,02	2,11	0,2668
masa tela	1, 322	29,04	<0,0001
replika (mitotip)	3, 322	10,74	<0,0001

Tabela 10. Mešani model analize varijanse za respiraciju u LEAK stanju, kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I, kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I i II, kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II, aktivnost kompleksa IV, specifičnu aktivnost citrat sintaze i odnos respiratorne kontrole (RCR) kod MG1a, MG1d i MG3b mužjaka. Mitotip je fiksiran faktor, a replika je nasumičan faktor ugnježđen u mitotip. dF – stepeni slobode, F – F-odnos, P – statistička značajnost.

Izvor variranja	dF	F	P
LEAK respiracija			
mitotip	2, 3,00	7,46	0,0684
replika (mitotip)	3, 62	3,39	0,0235
Kapacitet kompleksa I			
mitotip	2, 3,00	20,62	0,0176
replika (mitotip)	3, 62	3,14	0,0314
Kapacitet kompleksa I i II			
mitotip	2, 3,00	20,10	0,0183
replika (mitotip)	3, 62	3,25	0,0275
Kapacitet kompleksa II			
mitotip	2, 3,00	19,70	0,0188
replika (mitotip)	3, 62	3,22	0,0286
Aktivnost kompleksa IV			
mitotip	2, 3,00	29,55	0,0106
replika (mitotip)	3, 62	3,15	0,0311
Aktivnost citrat sintaze			
mitotip	2, 3,00	10,17	0,0460
replika (mitotip)	3, 59	7,15	0,0004
RCR			
mitotip	2, 3	4,16	0,0202
replika (mitotip)	3, 62	1,33	0,2742

Tabela 11. Mešani model analize varijanse za podatke normalizovane na specifičnu aktivnost citrat sintaze za respiraciju u LEAK stanju, kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I, kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za komplekse I i II, kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II i aktivnost kompleksa IV kod MG1a, MG1d i MG3b mužjaka. Mitotip je fiksiran faktor, a replika je nasumičan faktor ugnježđen u mitotip. dF – stepeni slobode, F – F-odnos, P – statistička značajnost.

Izvor variranja	dF	F	P
LEAK respiracija (norm.)			
mitotip	2, 3,01	4,49	0,1245
replika (mitotip)	3, 59	1,48	0,2294
Kapacitet kompleksa I (norm.)			
mitotip	2, 3,01	5,17	0,1063
replika (mitotip)	3, 59	3,84	0,0141
Kapacitet kompleksa I i II (norm.)			
mitotip	2, 3,01	6,33	0,0835
replika (mitotip)	3, 59	3,24	0,0284
Kapacitet kompleksa II (norm.)			
mitotip	2, 3,01	1,03	0,4564
replika (mitotip)	3, 59	4,33	0,0079
Aktivnost kompleksa IV (norm.)			
mitotip	2, 3,01	7,43	0,0685
replika (mitotip)	3, 59	2,69	0,0546

Tabela 12. Parametri mitohondrijskog diverziteta za 12 mitotipova *cox1* gena. Pi – mesta informativna za parsimoniju; S – singleton mesta.

Lokus	Broj haplotipova	Varijabilna mesta	Varijabilna mesta (%)	Pi	S	Aminokiselinske razlike	Aminokiselinske razlike (%)
<i>cox1</i>	12	17	2,587	7	10	4	1,826

Tabela 13. Sve nukleotidne zamene u barkoding regionu *cox1* gena za 12 mitohondrijskih haplotipova pronađenih u prirodnim i laboratorijskim populacijama. Nesinonimne zamene su obeležene zvezdicom i okarakterisane u poslednjem redu; a.k. zamena – aminokiselinska zamena. Korišćene su standardne oznake za aminokiseline.

pozicija u <i>cox1</i>	102	168	228	276	279	327	347	364	381	384	387	393	402	411	522	530	531	585	619	669	678
H1	A	G	G	A	C	A	G	G	T	C	C	T	T	C	T	G	G	G	A	G	G
H2	A	G	G	A	T	A	G	G	T	C	C	T	T	C	T	G	G	G	A	G	G
H3	A	G	G	A	C	A	G	G	T	C	T	C	T	C	T	G	A	G	A	G	G
H4	A	G	G	A	C	A	G	G	T	C	T	T	T	C	T	G	G	G	A	G	G
H5	A	G	G	A	C	G	G	G	T	C	C	C	T	C	T	G	A	G	A	G	G
H6	A	G	G	A	C	A	G	G	T	C	T	C	A	C	T	G	A	A	A	G	G
H7	A	A	A	G	C	A	G	G	T	C	T	C	T	T	T	G	G	G	A	G	G
H9	A	G	G	A	C	A	A*	G	T	C	T	T	T	C	T	G	G	G	A	G	G
H10	A	G	G	A	C	A	G	G	T	C	T	C	T	C	T	G	G	G	A	A	G
H11	A	G	G	A	C	A	G	G	T	T	T	C	T	C	T	G	G	G	A	G	G
H12	A	A	A	G	C	A	G	G	T	C	T	C	T	T	A*	A*	G	G	A	G	G
H13	A	G	G	A	C	A	G	G	T	C	T	T	T	C	T	G	G	G	T*	G	G
a.k. zamena	/	/	/	/	/	/	Ser-116-Asn	/	/	/	/	/	/	/	Asn-174-Lys	Ser-177-Lys	/	/	Thr-207-Ser	/	/

Tabela 14. Matrica parova distanci između 12 haplotipova izračunata korišćenjem Tamura 3-parametar modela nukleotidne supstitucije (Tamura, 1992) na osnovu sekvenci *cox1* barkoding regiona. Procene standardne greške date su iznad dijagonale i izračunate *bootstrap* procedurom sa 500 ponavljanja.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H9	H10	H11	H12	H13
H1	-	0,001	0,003	0,001	0,003	0,003	0,004	0,002	0,003	0,003	0,004	0,002
H2	0,002	-	0,003	0,002	0,003	0,004	0,004	0,003	0,003	0,003	0,005	0,003
H3	0,005	0,006	-	0,002	0,002	0,002	0,004	0,003	0,002	0,002	0,004	0,003
H4	0,002	0,003	0,003	-	0,003	0,003	0,003	0,001	0,002	0,002	0,004	0,001
H5	0,005	0,006	0,003	0,006	-	0,003	0,004	0,003	0,003	0,003	0,005	0,003
H6	0,008	0,009	0,003	0,006	0,006	-	0,004	0,003	0,003	0,003	0,005	0,003
H7	0,009	0,011	0,008	0,008	0,011	0,011	-	0,004	0,004	0,004	0,002	0,004
H9	0,003	0,005	0,005	0,002	0,008	0,008	0,009	-	0,003	0,003	0,004	0,002
H10	0,005	0,006	0,003	0,003	0,006	0,006	0,008	0,005	-	0,002	0,004	0,003
H11	0,005	0,006	0,003	0,003	0,006	0,006	0,008	0,005	0,003	-	0,004	0,003
H12	0,012	0,014	0,011	0,011	0,014	0,014	0,003	0,012	0,011	0,011	-	0,004
H13	0,003	0,005	0,005	0,002	0,008	0,008	0,009	0,003	0,005	0,005	0,012	-

Tabela 15. Učestalost svih 12 *cox1* haplotipova u laboratorijskoj Base populaciji i u prirodnim populacijama.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H9	H10	H11	H12	H13
Beograd (B, base)	0,65	0,35	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Požarevac	-	-	0,19	0,19	0,16	0,03	0,44	-	-	-	-	-
Dubravica	-	-	0,5	0,33	-	-	0,17	-	-	-	-	-
Golubac	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Ševica	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Mali Jasenovac	-	-	0,5	-	-	-	0,5	-	-	-	-	-
Karbulovo	-	-	0,83	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-
Čapljina	-	-	0,17	-	-	-	0,83	-	-	-	-	-
Bela Palanka	-	-	-	-	-	-	0,67	0,33	-	-	-	-
Čukovac	-	-	0,83	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-
Trebešnje	-	-	0,25	-	-	-	0,75	-	-	-	-	-
Arandelovac	-	-	0,33	-	-	-	0,67	-	-	-	-	-
Lunjevica	-	-	0,5	0,17	-	-	0,33	-	-	-	-	-
Donji Branetići	-	-	0,17	0,5	-	-	0,33	-	-	-	-	-
Vrčin	-	-	0,67	0,17	-	-	0,17	-	-	-	-	-
Igroš	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Srpska Crnja	-	-	0,67	-	-	-	-	-	0,33	-	-	-
Banatsko Veliko Selo	-	-	0,17	0,5	-	-	0,33	-	-	-	-	-
Sombor	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-
Pivnice	-	-	0,67	0,33	-	-	-	-	-	-	-	-
Đurđevo	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Kremna	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Borak	-	-	0,83	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-
Sirogojno	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kokin Brod	-	-	0,83	-	-	-	0,17	-	-	-	-	-
Tekeriš	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mačvanski Prčinoić	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Matijevac	-	-	0,33	-	-	-	0,17	-	-	-	-	0,5
Ravnje	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bogutovačka banja	-	-	0,33	-	-	-	-	-	-	-	0,67	-
Lička Jasenica	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Zubin Potok	0,17	-	0,17	-	-	-	0,5	-	-	0,17	-	-
Trebinje	-	-	-	-	-	-	0,5	-	-	0,5	-	-

Tabela 16. Rezultati analize molekulske varijanse za *cox1* mitohondrijski marker za različite hipoteze o grupisanju populacija. dF – stepeni slobode; % variranja – procenat variranja objašnjen hipotezom; F_{CT} – indeks fiksacije između grupa; F_{SC} – indeks fiksacije između populacija unutar grupa; *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Grupisanje	Izvor variranja	dF	% variranja	Interpopulacioni indeksi fiksacije	
				F _{CT}	F _{SC}
Po regionima	Između grupa	4	-0,26	-0,00260	0.37661***
	Unutar grupa	24	37,76		
	Unutar populacija	165	62,50		
Po razdvojenosti velikim rečnim tokovima	Između grupa	3	2,99	0.02990	0.34563***
	Unutar grupa	26	33,53		
	Unutar populacija	170	63,48		
Vojvodina i ostatak Srbije	Između grupa	1	-0,97	-0,00148	0.36108***
	Unutar grupa	30	37,96		
	Unutar populacija	180	63,01		
Bez grupisanja	Između grupa	-	-	-	0.37460***
	Između populacija	31	37,46		
	Unutar populacija	180	62,54		

Tabela 17. Parametri genetičke varijabilnosti prirodnih populacija za šest mikrosatelitskih lokusa (*AcobtC12*, *AcobD06*, *AcobtE01*, *AcobE04*, *AcobtE07* i *AcobtF09*). N – prosečan broj genskih kopija po lokusu; n_A – prosečan broj alela po lokusu; H_D – prosečna dobijena heterozigotnost; H_O – prosečna očekivana heterozigotnost; F_{IS} – indeks fiksacije unutar populacija. Statistički značajne vrednosti F_{IS} su podebljane.

Populacija	N	n _A	H _D	H _O	F _{IS}
Požarevac	12,00	3,500	0,555	0,591	0,065
Dubravica	12,00	3,833	0,611	0,664	0,087
Golubac	12,00	4,167	0,528	0,616	0,156
Ševica	12,00	3,000	0,417	0,513	0,202
Mali Jasenovac	12,00	4,167	0,555	0,674	0,190
Karbulovo	12,00	3,167	0,389	0,561	0,327
Čapljinac	12,00	4,000	0,500	0,679	0,283
Bela Palanka	12,00	3,333	0,667	0,649	-0,030
Čukovac	12,00	5,000	0,733	0,764	0,043
Trebešnje	12,00	4,600	0,600	0,648	0,082
Arandelovac	12,00	4,400	0,367	0,667	0,474
Lunjevica	12,00	4,000	0,528	0,649	0,202
Donji Branetići	12,00	3,333	0,417	0,520	0,215
Vrčin	12,00	3,833	0,417	0,649	0,380
Igroš	12,00	3,400	0,433	0,579	0,270
Srpska Crnja	12,00	4,000	0,667	0,623	-0,076
Banatsko Veliko Selo	12,00	3,333	0,611	0,646	0,060
Sombor	12,00	2,500	0,458	0,538	0,160
Pivnice	10,00	3,333	0,467	0,644	0,300
Đurđevo	11,67	2,500	0,472	0,483	-0,018
Kremna	12,00	2,750	0,542	0,572	0,058
Borak	12,00	3,333	0,417	0,550	0,261
Sirogojno	12,00	3,333	0,472	0,538	0,133
Kokin Brod	12,00	4,167	0,389	0,609	0,383
Tekeriš	12,00	3,000	0,500	0,556	0,109
Mačvanski Prčinović	12,00	3,200	0,533	0,636	0,175
Matijevac	12,00	3,333	0,556	0,593	0,070
Ravnje	12,00	3,500	0,722	0,609	-0,209
Bogutovačka banja	12,00	3,333	0,444	0,576	0,245
Lička Jasenica	12,00	2,500	0,583	0,462	-0,296
Zubin Potok	11,67	4,000	0,623	0,676	0,052
Trebinje	12,00	2,667	0,417	0,508	0,193

Tabela 18. Rezultati analize molekulske varijanse za šest mikrosatelitskih jedarnih markera različite hipoteze o grupisanju populacija. dF – stepeni slobode; % variranja – procenat variranja objašnjen hipotezom; F_{CT} – indeks fiksacije između grupa; F_{SC} – indeks fiksacije između populacija unutar grupa; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Grupisanje	Izvor variranja	dF	% variranja	Interpopulacioni indeksi fiksacije	
				F_{CT}	F_{SC}
Po regionima	Između grupa	4	0,43	0,00430	0,13214***
	Unutar grupa	24	13,16		
	Unutar populacija	144	13,82		
	Unutar jedinki	173	72,60		
Po razdvojenosti velikim rečnim tokovima	Između grupa	3	1,38	0.01382*	0.12012***
	Unutar grupa	26	11,85		
	Unutar populacija	149	13,53		
	Unutar jedinki	179	73,24		
Vojvodina i ostatak Srbije	Između grupa	1	2,85	0.02849*	0.14306***
	Unutar grupa	30	13,90		
	Unutar populacija	159	12,45		
	Unutar jedinki	191	70,81		
Bez grupisanja	Između grupa	-	-	-	0,14969***
	Između populacija	31	14,97		
	Unutar populacija	159	12,71		
	Unutar jedinki	191	72,32		

Tabela 19. Mešan model analize varijanse fertiliteta za mušjake i ženke sa različitim mitotipovima i jedarnim sredinama na temperaturi od 30°C. Mitotip, jedarna sredina i interakcija između njih (M×J) su fiksirani faktori dok su replike modelovane kao nasumičan faktor ugnježđen u M×J. dF – stepeni slobode, F – F-odnos, P – statistička značajnost.

Izvor variranja	dF	F	P
Ženke			
mitotip	2, 9	21,48	0,0004
jedarna sredina	2, 9	5,35	0,0294
M×J	4, 9	0,81	0,5518
replika (M×J)	9, 1062	2,35	0,0125
Mušjaci			
mitotip	2, 9	22,02	0,0003
jedarna sredina	2, 9	5,84	0,0236
M×J	4, 9	2,27	0,1409
replika (M×J)	9, 1062	6,70	<0,0001

Tabela 20. Mešan model analize varijanse fertiliteta za mužjake i ženke sa različitim mitotipovima i jedarnim sredinama na temperaturi od 32°C. Mitotip, jedarna sredina i interakcija između njih (M×J) su fiksirani faktori dok su replike modelovane kao nasumičan faktor ugnježđen u M×J. dF – stepeni slobode, F – F-odnos, P – statistička značajnost.

Izvor variranja	dF	F	P
Ženke			
mitotip	2, 9	0,77	0,4927
jedarna sredina	2, 9	1,04	0,3916
M×J	4, 9	1,05	0,4348
replika (M×J)	9, 1047	9,27	<0,0001
Mužjaci			
mitotip	2, 9	0,65	0,5456
jedarna sredina	2, 9	1,77	0,2254
M×J	4, 9	0,32	0,8557
replika (M×J)	9, 1062	11,79	<0,0001

Tabela 21. Mešani model analize varijanse fertiliteta za mužjake i ženke sa različitim mitotipovima i jedarnim sredinama na dve temperature. Mitotip, jedarna sredina, temperatura, interakcija između mitotipa i jedra (M×J), interakcija između mitotipa i temperature (M×T), interakcija između jedra i temperature (J×T) i interakcija između mitotipa, jedra i temperature (M×J×T) su fiksirani faktori dok su replike modelovane kao nasumičan faktor ugnježđen u M×J interakciju. dF – stepeni slobode, F – F-odnos, P – statistička značajnost.

Izvor variranja	dF	F	P
Ženke			
mitotip	2, 9	10,08	0,0050
jedarna sredina	2, 9	2,50	0,1371
temperatura	1,2118	32,71	<0,0001
M×J	4, 9	1,94	0,1873
M×T	2, 2118	10,88	<0,0001
J×T	2, 2118	11,20	<0,0001
M×J×T	4, 2118	2,40	0,0481
replika (M×J)	9, 2118	4,48	<0,0001
Mužjaci			
mitotip	2, 9	7,77	0,0109
jedarna sredina	2, 9	0,21	0,8174
temperatura	1, 2133	17,73	<0,0001
M×J	4, 9	0,69	0,6143
M×T	2, 2133	49,65	<0,0001
J×T	2, 2133	57,02	<0,0001
M×J×T	4, 2133	9,50	<0,0001
replika (M×J)	9, 2133	14,00	<0,0001

Tabela 22. Srednje vrednosti populaciono-ekoloških parametara izračunate na osnovu celog seta podataka (prava vrednost) i *jackknife* metodom (pseudovrednost) sa 95 % intervalima poverenja (CL) za populacije sa startnim udelom MG1a, MG1d i MG3b mitotipa u drugoj i petoj generaciji. R_0 – neto stopa reprodukcije; r_m – intrinzička stopa rasta; T – srednje vreme generacije; Dt – vreme za koje populacija udvostruči brojnost; λ – konačna stopa rasta populacije.

MG1a			
Parametar	G ₂		
	Prava vrednost	Pseudovrednost	95 % CL
R_0	15,0209	15,0209	14,3164 – 15,7254
r_m	0,09462	0,09463	0,09290 – 0,09637
T	28,6335	28,6335	28,4568 – 28,8102
Dt	7,32520	7,32388	7,18980 – 7,45796
λ	1,09925	1,09926	1,09735 – 1,10116
Parametar	G ₅		
	Prava vrednost	Pseudovrednost	95 % CL
R_0	17,9943	17,9975	17,2093 – 18,7858
r_m	0,10279	0,10279	0,10104 – 0,10455
T	28,1166	28,1189	27,9407 – 28,2971
Dt	6,74344	6,74259	6,62734 – 6,85784
λ	1,10826	1,10826	1,10631 – 1,11021
MG3b			
Parametar	G ₂		
	Prava vrednost	Pseudovrednost	95 % CL
R_0	13,5434	13,5434	12,7805 – 14,3062
r_m	0,09243	0,09245	0,09029 – 0,09460
T	28,1928	28,1925	27,9884 – 28,3967
Dt	7,49905	7,49688	7,32193 – 7,67183
λ	1,09684	1,09685	1,09449 – 1,09922
Parametar	G ₅		
	Prava vrednost	Pseudovrednost	95 % CL
R_0	17,2262	17,2311	16,3109 – 18,1513
r_m	0,10509	0,10510	0,10274 – 0,10747
T	27,0850	27,0874	26,8207 – 27,3540
Dt	6,59558	6,59401	6,44544 – 6,74257
λ	1,11081	1,11083	1,10819 – 1,11346

MG1d			
Parametar	G ₂		
	Prava vrednost	Pseudovrednost	95 % CL
R_0	13,8307	13,8307	13,0726 – 14,5888
r_m	0,09469	0,09470	0,09240 – 0,09700
T	27,7425	27,7416	27,5401 – 27,9430
Dt	7,32031	7,31806	7,14043 – 7,49570
λ	1,09932	1,09933	1,09680 – 1,10186
Parametar	G ₅		
	Prava vrednost	Pseudovrednost	95 % CL
R_0	17,3521	17,3521	16,3685 – 18,3358
r_m	0,10223	0,10224	0,09975 – 0,10474
T	27,9152	27,9139	27,6839 – 28,1438
Dt	6,78041	6,77829	6,61256 – 6,94402
λ	1,10764	1,10765	1,10488 – 1,11042

Tabela 23. Parna poređenja konačne stope rasta (λ), neto stope reprodukcije (R_0), intrinzičke stope rasta (r_m), vremena dupliranja (Dt) i srednjeg vremena generacije jedinki (T) populacija sa različitim startnim mitotipovima (MG1a, MG1d i MG3b) u drugoj i petoj generaciji. Izračunavanja su urađena Studentovim bilateralnim t testom (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

λ		MG1a		MG1d		MG3b	
		G ₂	G ₅	G ₂	G ₅	G ₂	G ₅
MG1a	G ₂	/					
	G ₅	***	/				
MG1d	G ₂	ns	***	/			
	G ₅	***	ns	***	/		
MG3b	G ₂	ns	***	ns	***	/	
	G ₅	***	ns	***	ns	***	/

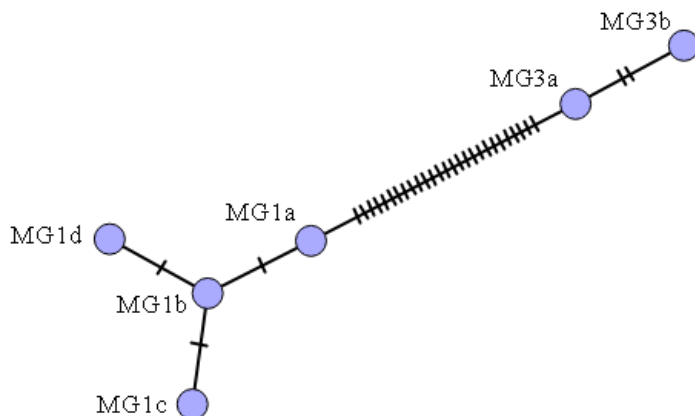
r_m		MG1a		MG1d		MG3b	
		G ₂	G ₅	G ₂	G ₅	G ₂	G ₅
MG1a	G ₂	/					
	G ₅	***	/				
MG1d	G ₂	ns	***	/			
	G ₅	***	ns	***	/		
MG3b	G ₂	ns	***	ns	***	/	
	G ₅	***	ns	***	ns	***	/

T		MG1a		MG1d		MG3b	
		G ₂	G ₅	G ₂	G ₅	G ₂	G ₅
MG1a	G ₂	/					
	G ₅	***	/				
MG1d	G ₂	***	**	/			
	G ₅	***	ns	ns	/		
MG3b	G ₂	**	ns	**	ns	/	
	G ₅	***	***	***	***	***	/

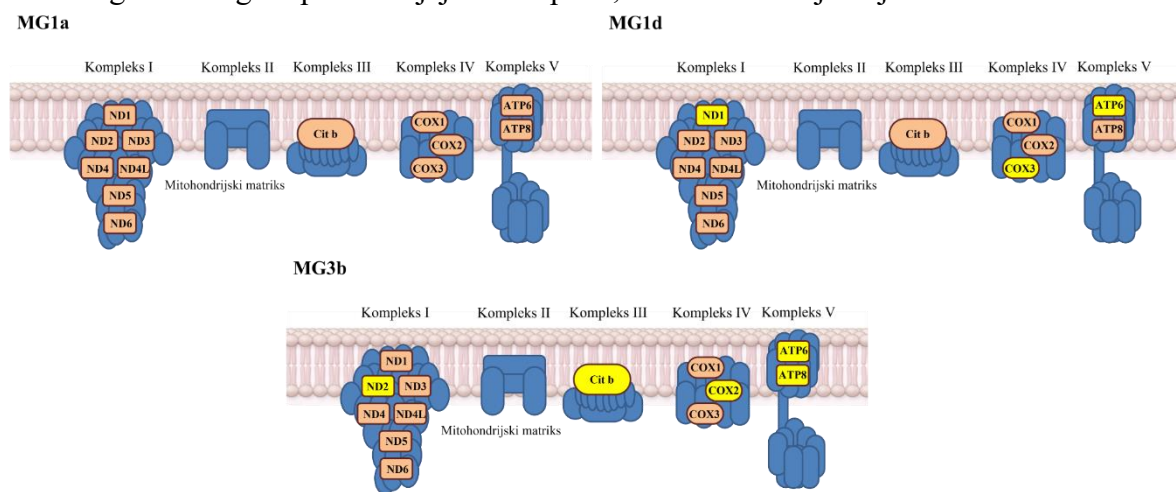
R_0		MG1a		MG1d		MG3b	
		G ₂	G ₅	G ₂	G ₅	G ₂	G ₅
MG1a	G ₂	/					
	G ₅	***	/				
MG1d	G ₂	*	***	/			
	G ₅	***	ns	***	/		
MG3b	G ₂	**	***	ns	***	/	
	G ₅	***	ns	***	ns	***	/

Dt		MG1a		MG1d		MG3b	
		G ₂	G ₅	G ₂	G ₅	G ₂	G ₅
MG1a	G ₂	/					
	G ₅	***	/				
MG1d	G ₂	ns	***	/			
	G ₅	***	ns	***	/		
MG3b	G ₂	ns	***	ns	***	/	
	G ₅	***	ns	***	ns	***	/

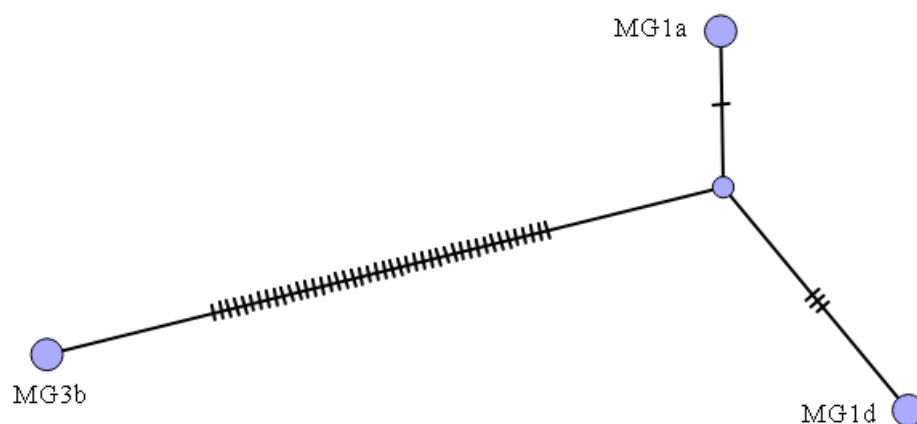
8. SLIKE



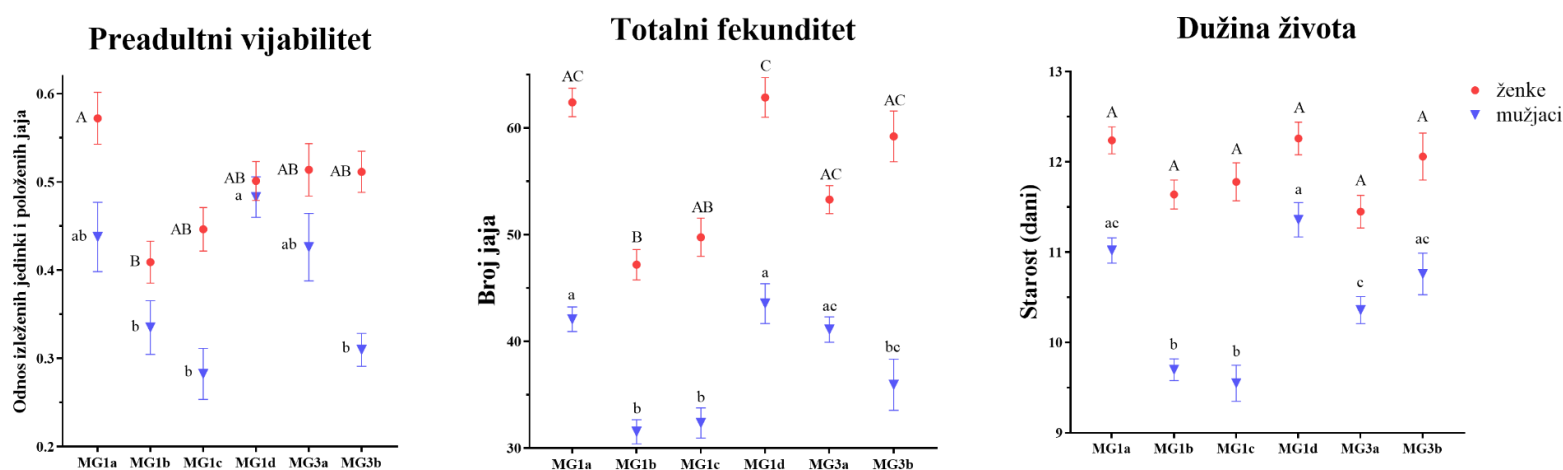
Slika 1. TCS haplotipska mreža šest laboratorijskih mitohondrijskih haplotipova na osnovu sekvence osam gena. Krugovi predstavljaju mitotipove, a crtice mutacije koje ih međusobno razlikuju.



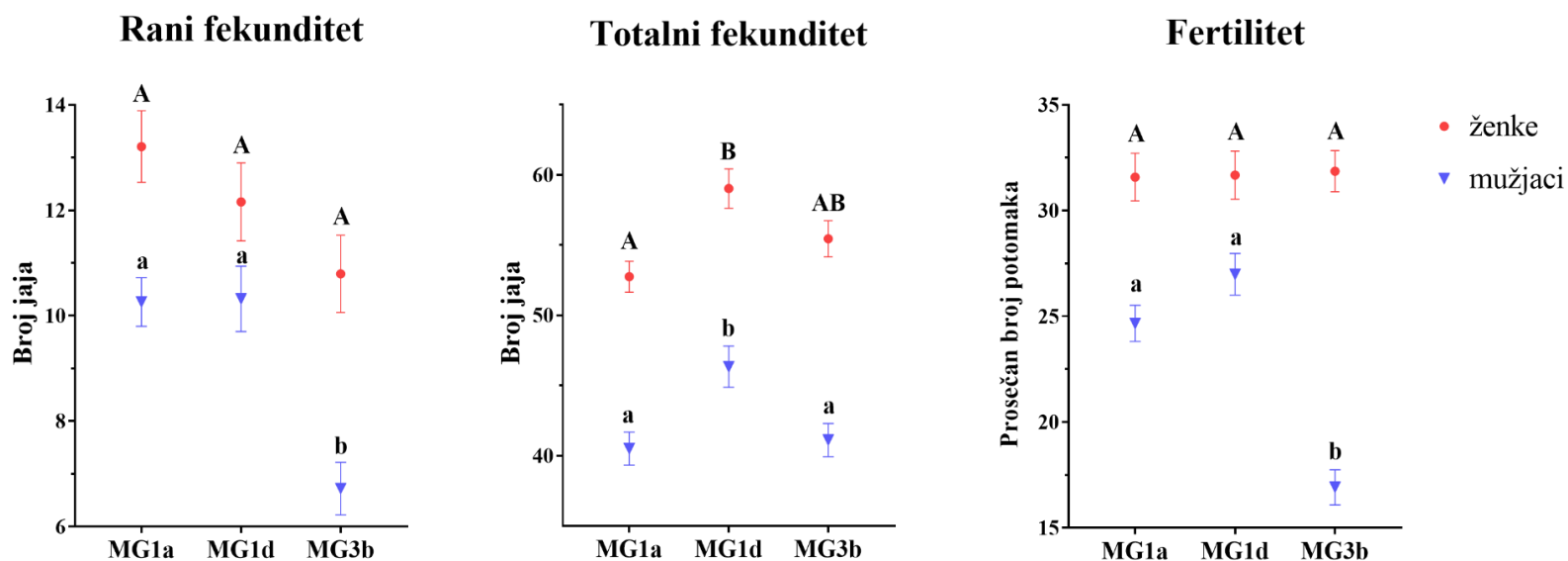
Slika 2. Shematski prikaz aminokiselinskih razlika u subjedinicama OXPHOS kompleksa tri mitotipa (MG1a, MG1d, MG3b). Žutom bojom naznačene su subjedinice čija se aminokiselinska sekvenca razlikuje u odnosu na istu subjedinicu MG1a mitotipa.



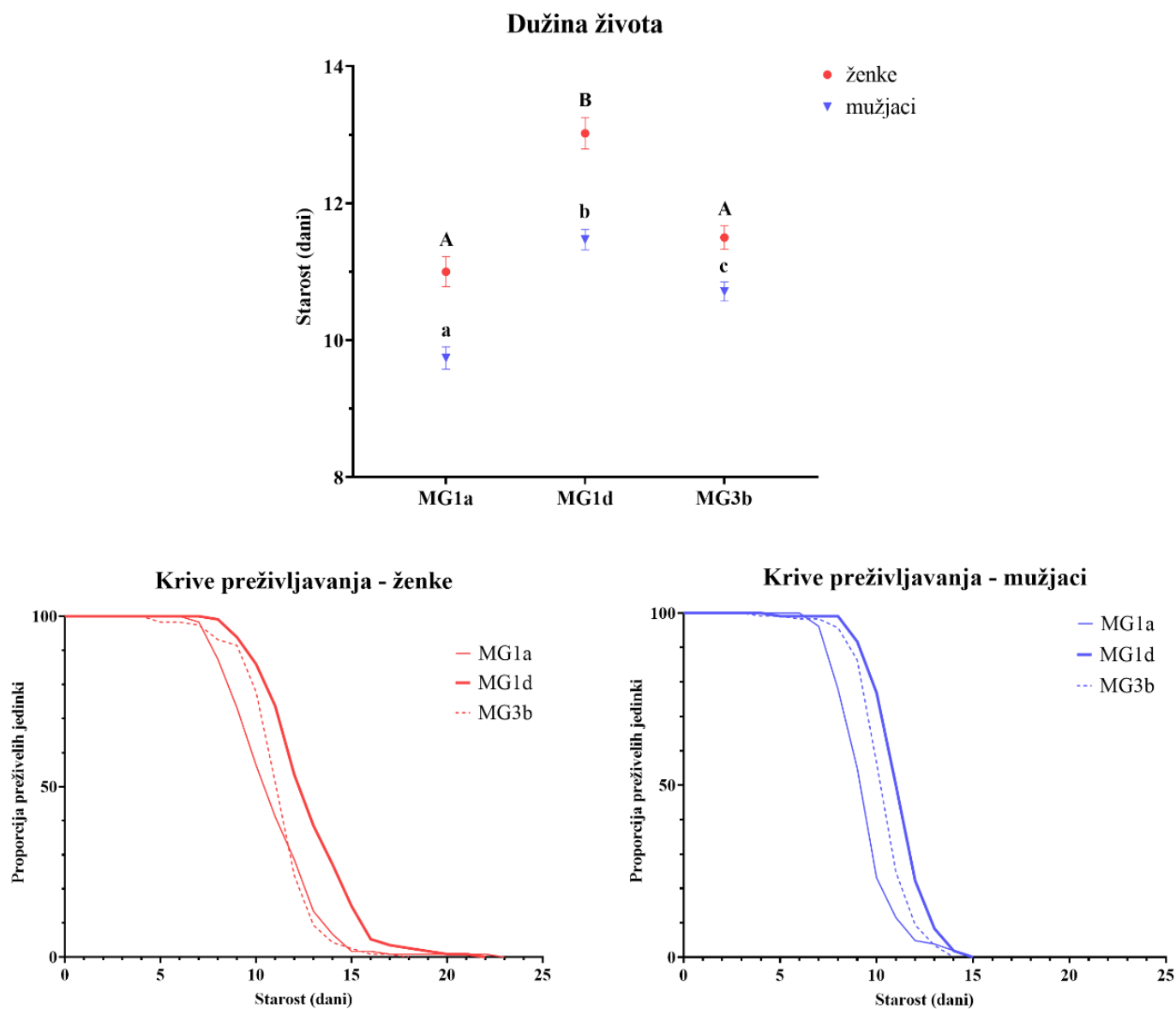
Slika 3. TCS haplotipska mreža tri laboratorijska mitohondrijska haplotipa na osnovu sekvence 13 mitohondrijskih gena. Krugovi predstavljaju mitotipove, a crtice mutacije koje ih međusobno razlikuju. Neobeleženi krug je hipotetički prelazni mitotip.



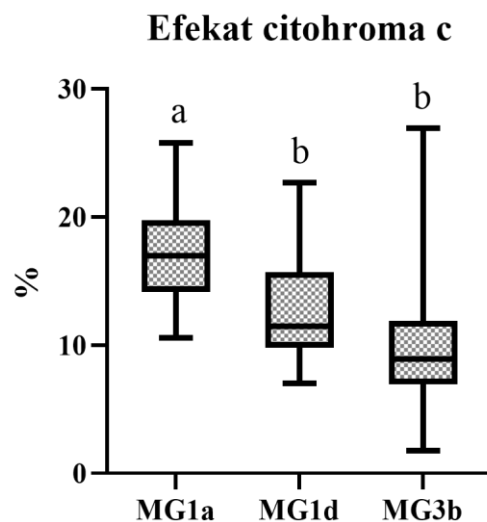
Slika 4. Srednje vrednosti i standardne greške ($\pm$ SE) vrednosti preadultnog vijabiliteta, totalnog fekunditeta i dužine života ženki (crveni krugovi) i mužjaka (plavi trouglovi) šest različitih mitohondrijskih haplotipova. Statistički značajne razlike između mitotipova unutar pola prikazane su velikim (ženke) i malim (mužjaci) slovima i izračunate su Scheffé (za preadultni vijabilitet) i Tukey testom (za totalni fekunditeta i dužinu života) ($P < 0,05$).



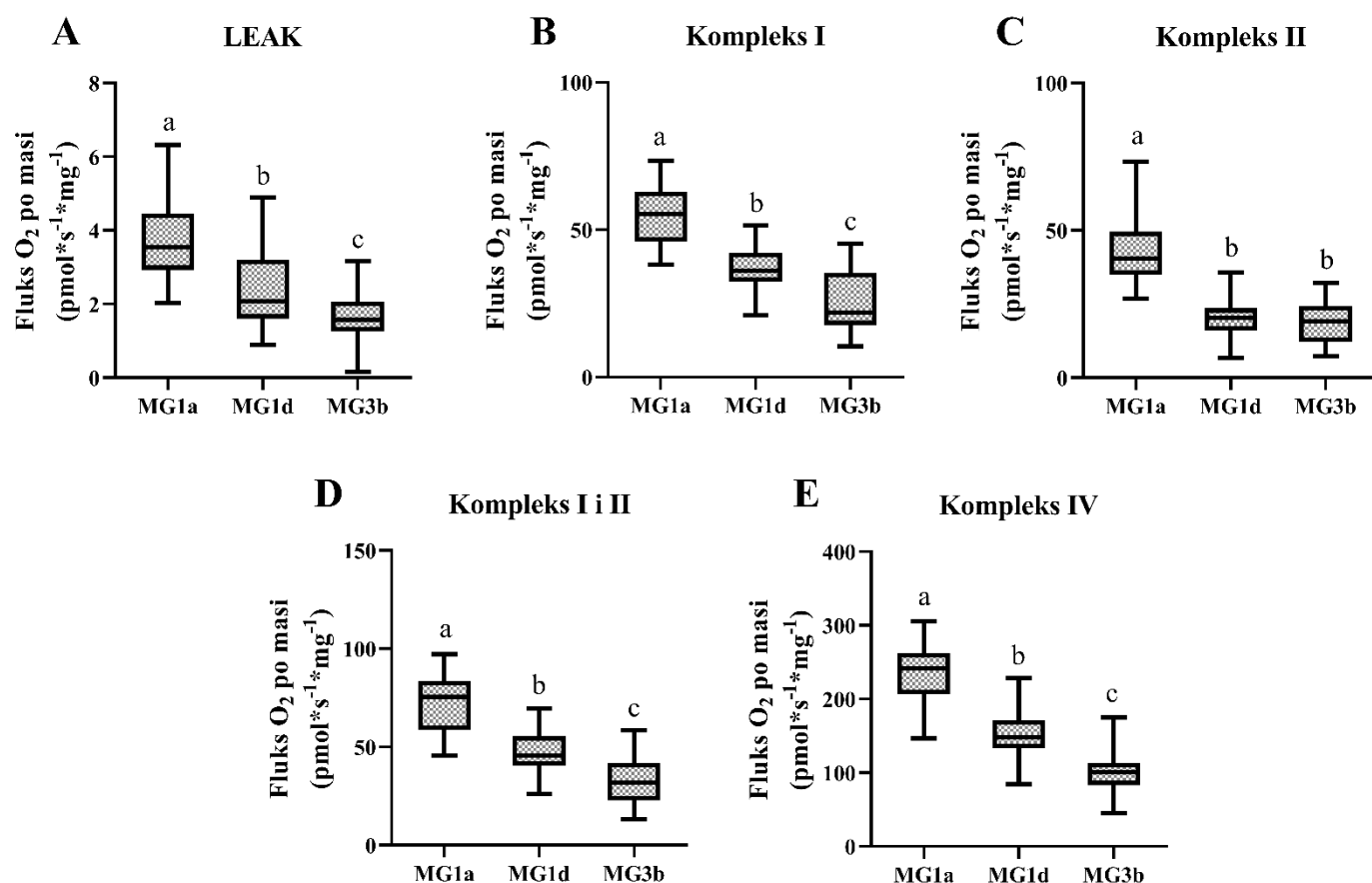
Slika 5. Srednje vrednosti i standardne greške ($\pm$ SE) ranog fekunditeta, totalnog fekunditeta i fertiliteta za ženke (crveni krugovi) i mužjake (plavi trouglovi) tri različita mitotipa (MG1a, MG1d i MG3b). Statistički značajne razlike između mitotipova prikazane su velikim slovima za ženke i malim slovima za mužjake i izračunate su Scheffé testom ($P < 0,05$). Prema Vlajnić i sar, 2024.



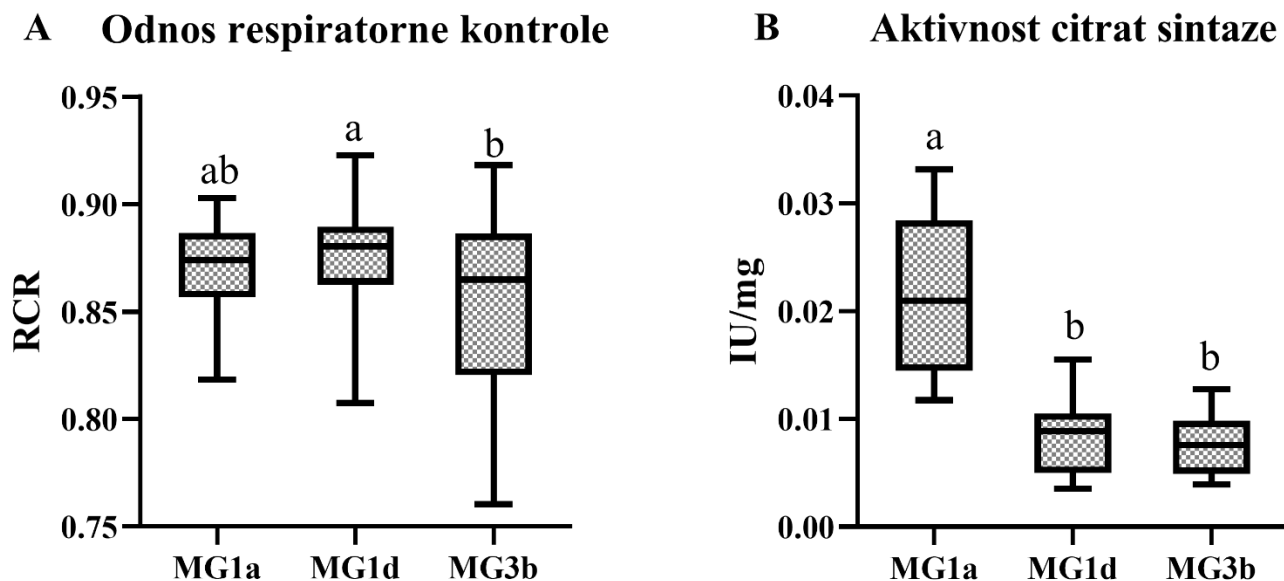
Slika 6. Gornji panel: srednje vrednosti i standardne greške ($\pm$ SE) dužine života (u danima) za ženke (crveni krugovi) i mužjake (plavi trouglovi) tri različita mitotipa (MG1a, MG1d i MG3b). Statistički značajne razlike između mitotipova prikazane su velikim slovima za ženke i malim slovima za mužjake i izračunate su Scheffé testom ($P < 0,05$). Donji paneli: Krive preživljavanja ženki (levo) i mužjaka (desno) tri različita mitotipa (MG1a, MG1d i MG3b). Kriva za MG1a mitotip data je tanjom linijom, za MG1d mitotip debljom linijom a za MG3b mitotip isprekidanom linijom. Prema Vlajnić i sar, 2024.



Slika 7. Efekat citohroma c mužjaka različitih mitotipova (MG1a, MG1d i MG3b). Rezultati su prikazani u boks plotovima iz kojih se mogu videti minimalna vrednost, prvi kvartil, medijana, drugi kvartil i maksimalna vrednost. Statistički značajne razlike između mitotipova prikazane su različitim malim slovima i izračunate su Tukey testom ($P < 0,05$).

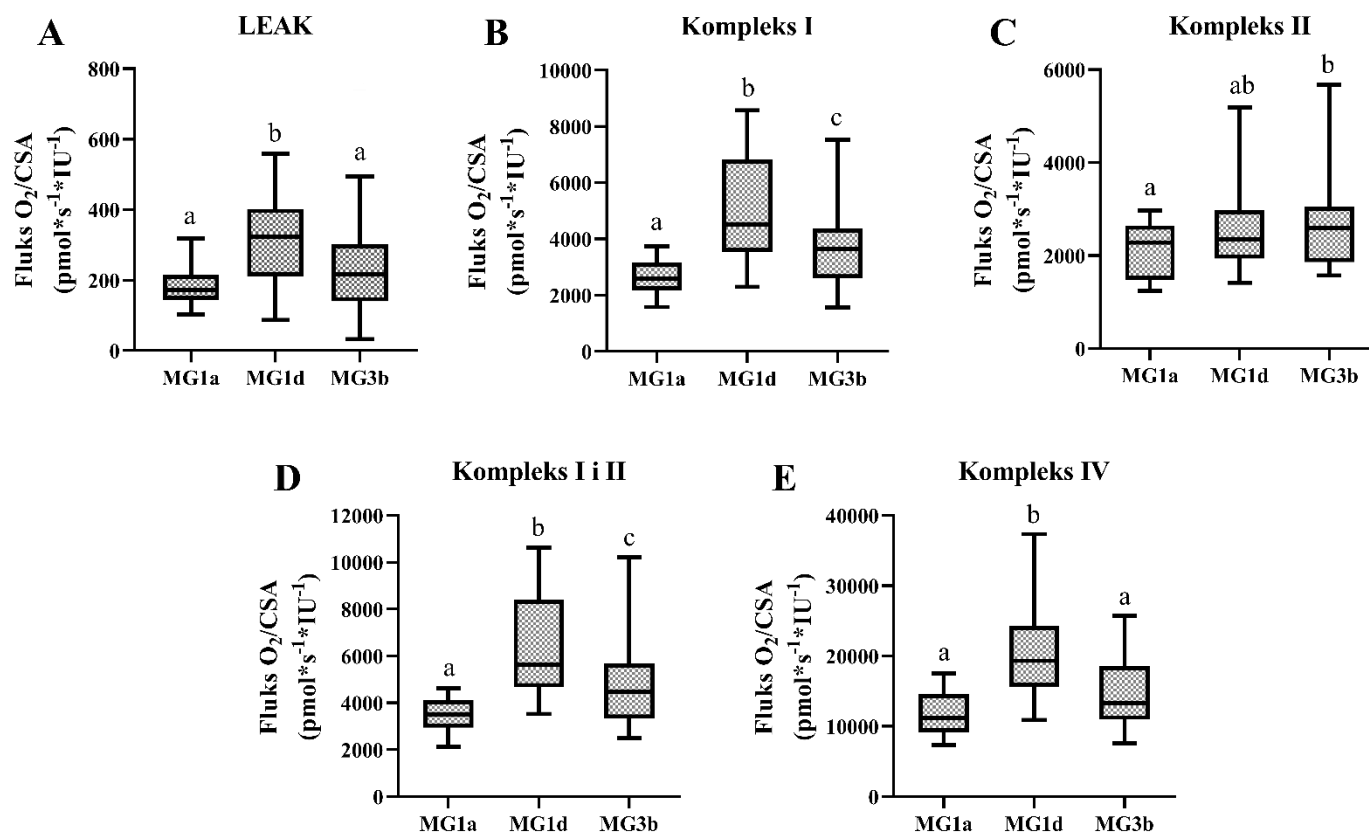


Slika 8. LEAK respiracija (A), kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I (B), kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II (C), kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za komplekse I i II (D) i aktivnost kompleksa IV (E) mužjaka različitih mitotipova (MG1a, MG1d i MG3b). Rezultati su prikazani u boks plotovima iz kojih se mogu videti minimalna vrednost, prvi kvartil, medijana, drugi kvartil i maksimalna vrednost. Statistički značajne razlike između mitotipova prikazane su različitim malim slovima i izračunate su Tukey testom ($P < 0,05$).

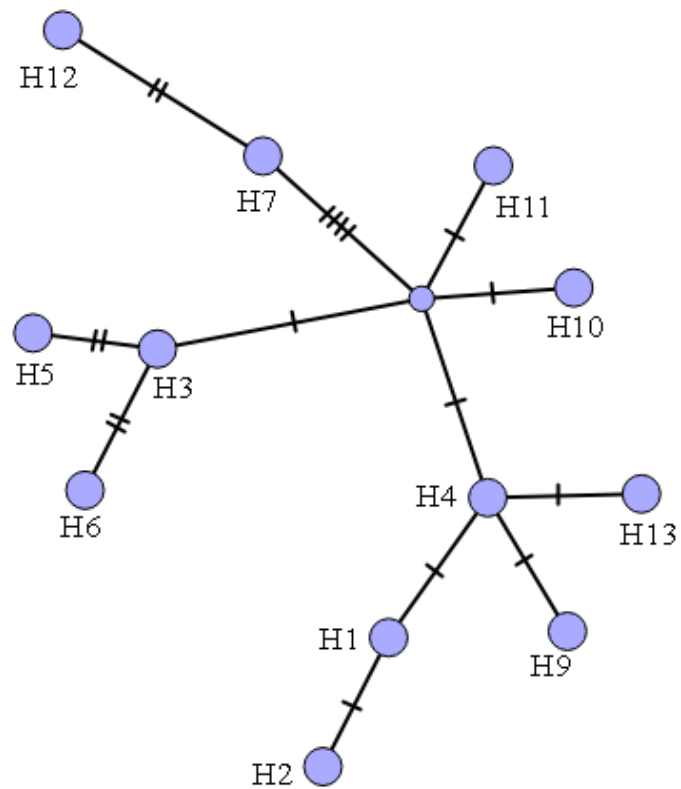


Slika 9. Odnos respiratorne kontrole (RCR) (A) i specifična aktivnost citrat sintaze (B) mužjaka različitih mitotipova (MG1a, MG1d i MG3b). Rezultati su prikazani u boks plotovima iz kojih se mogu videti minimalna vrednost, prvi kvartil, medijana, drugi kvartil i maksimalna vrednost. Statistički značajne razlike između mitotipova prikazane su različitim malim slovima i izračunate su Tukey testom ($P < 0,05$).

Podaci normalizovani na aktivnost citrat sintaze

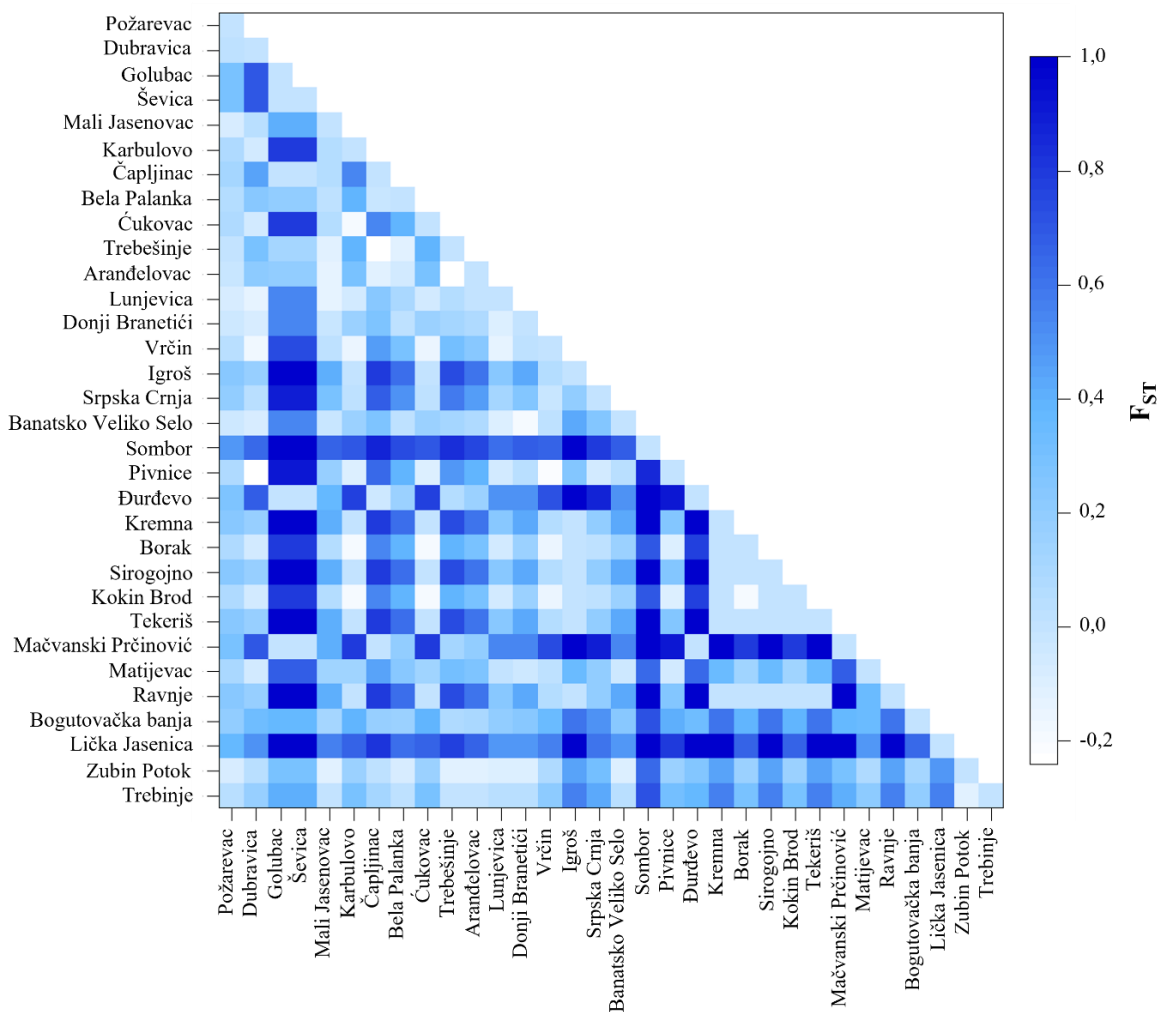


Slika 10. Podaci normalizovani na specifičnu aktivnost citrat sintaze (CSA) za LEAK respiraciju (A), kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks I (B), kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za kompleks II (C), kapacitet oksidativne fosforilacije vezan za komplekse I i II (D) i aktivnost kompleksa IV (E) mužjaka različitih mitotipova (MG1a, MG1d i MG3b). Rezultati su prikazani u boks plotovima iz kojih se mogu videti minimalna vrednost, prvi kvartil, medijana, drugi kvartil i maksimalna vrednost. Statistički značajne razlike između mitotipova prikazane su različitim malim slovima i izračunate su Tukey testom ($P < 0,05$).

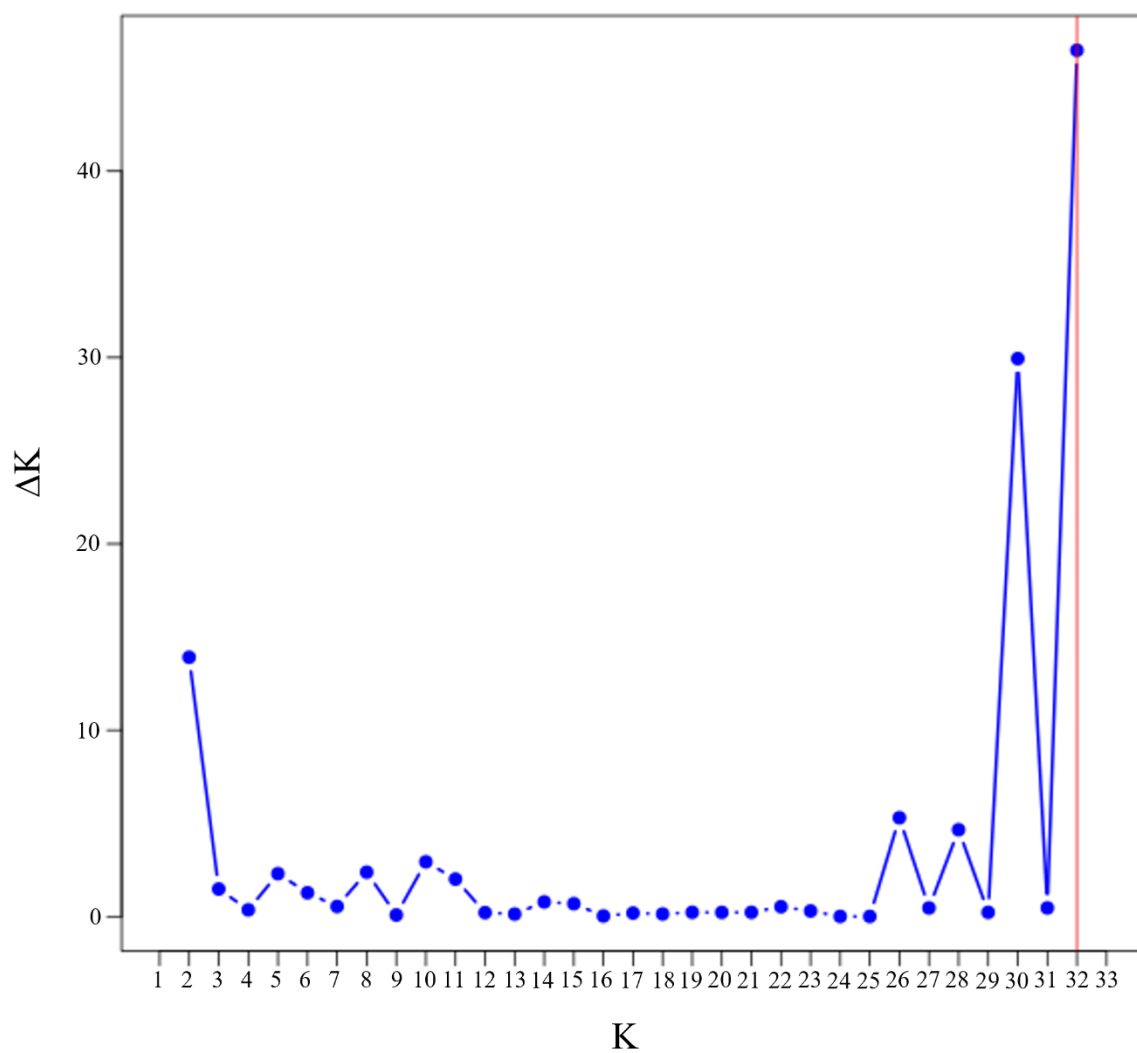


Slika 11. Haplotipska mreža 12 *cox1* haplotipova pronađenih u prirodnim populacijama i laboratorijskoj populaciji poreklom iz Beograda.

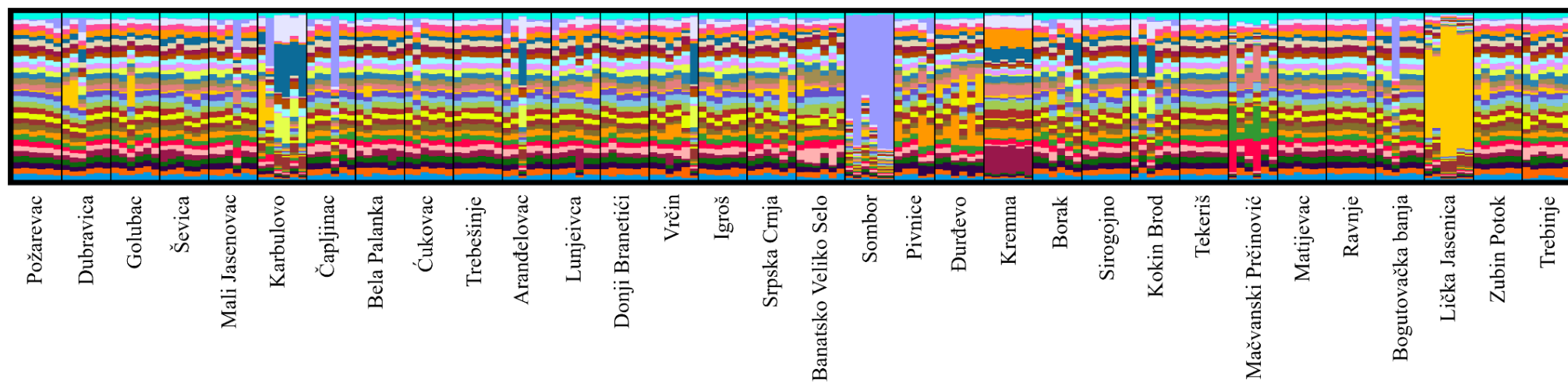
Matrica parnih F_{ST} vrednosti na osnovu mitohondrijskog markera



Slika 12. Matrica parnih F_{ST} vrednosti izračunatih na osnovu učestalosti *cox1* mitotipova pronađenih u prirodnim populacijama pasuljevog žiška.

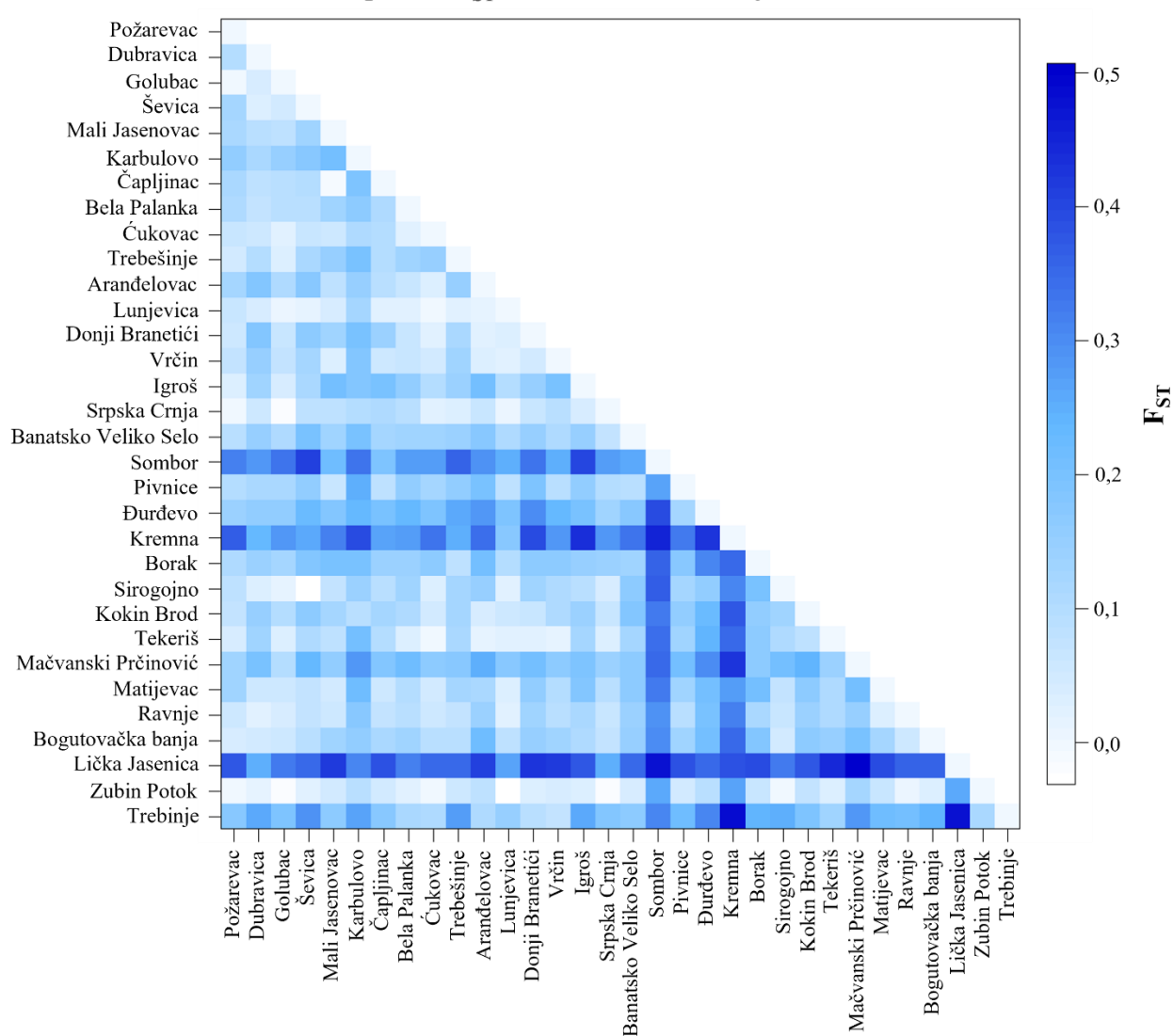


Slika 13. Vrednosti ΔK za svaki testirani broj genetičkih klastera (K).



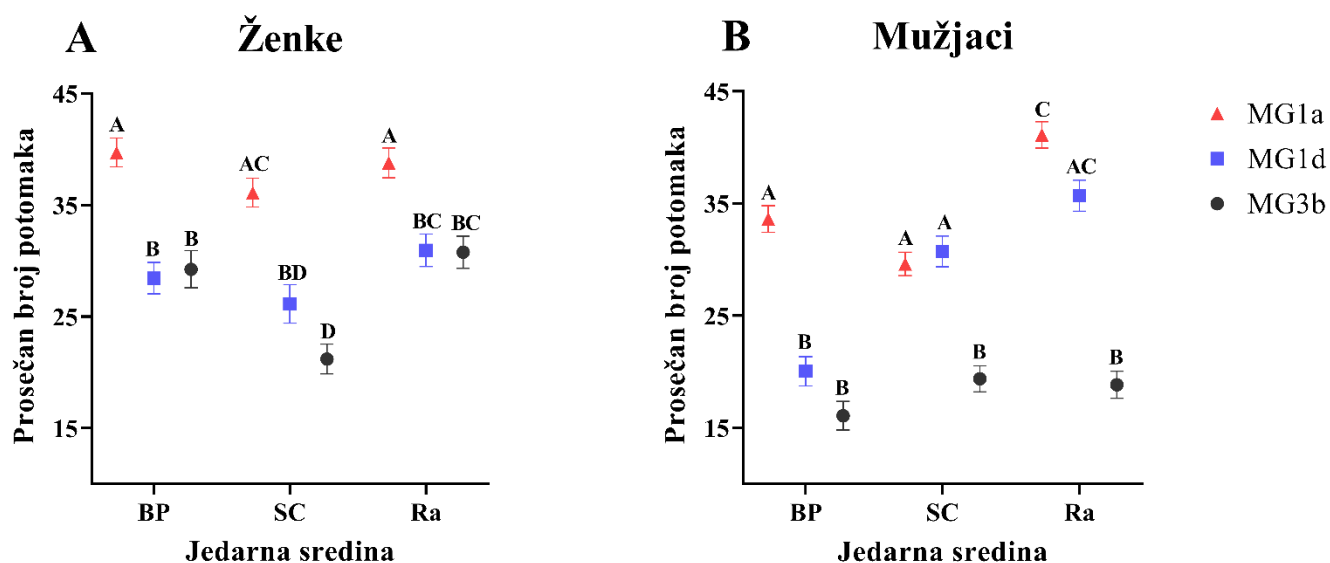
Slika 14. Grafički prikaz rezultata Bajesovog grupisanja za $K = 32$.

Matrica parnih F_{ST} vrednosti na osnovu jedarnih markera

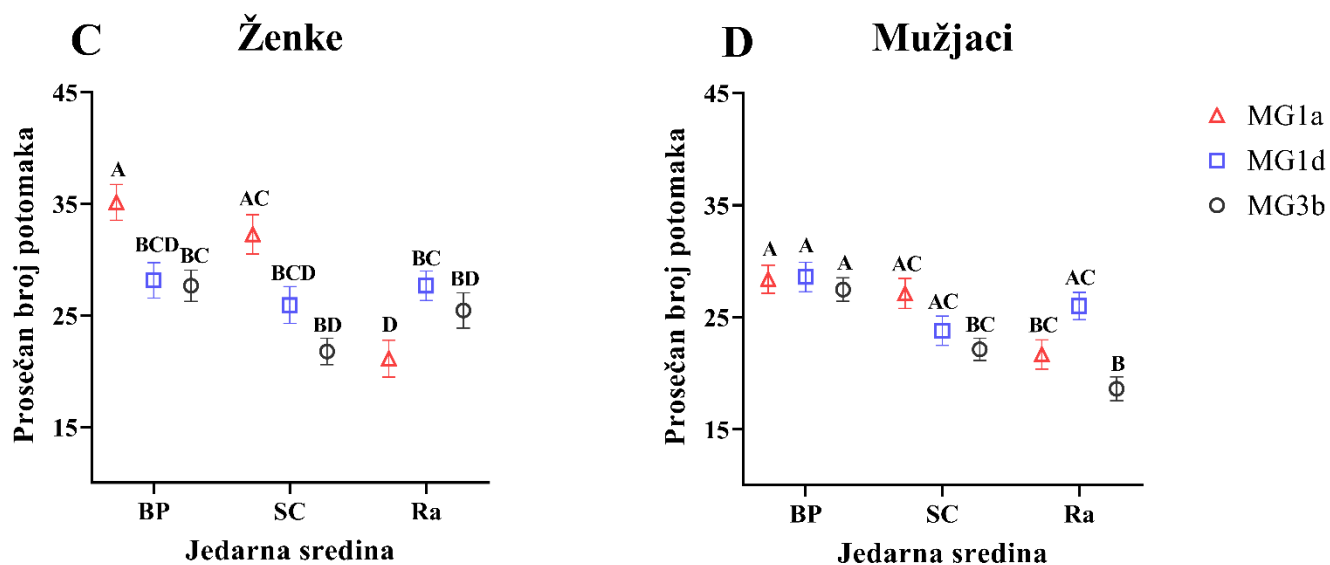


Slika 15. Matrica parnih F_{ST} vrednosti izračunatih na osnovu učestalosti alela šest mikrosatelitskih lokusa pronađenih u prirodnim populacijama pasuljevog žiška.

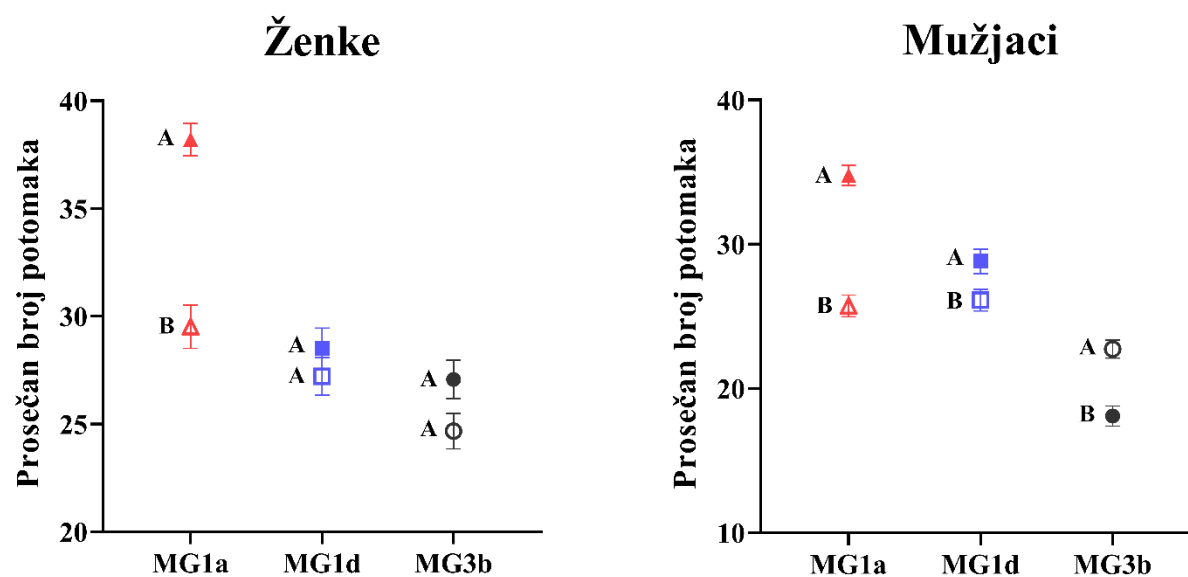
30°C



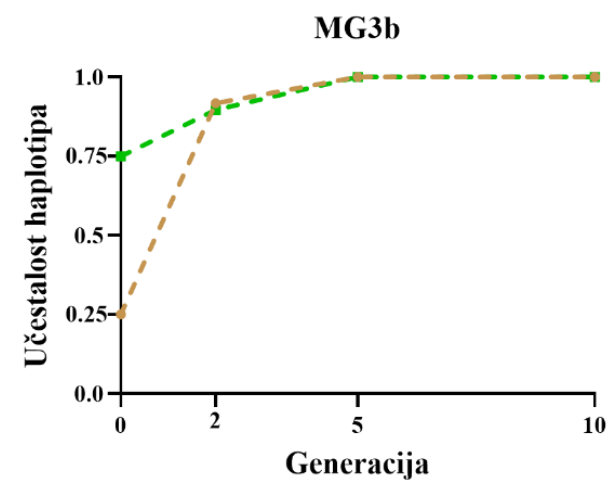
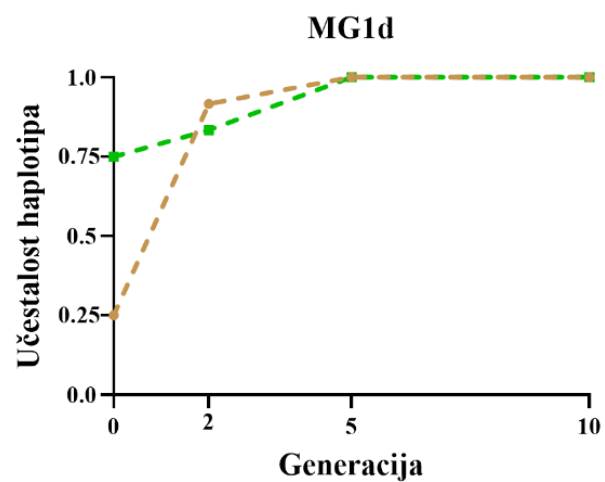
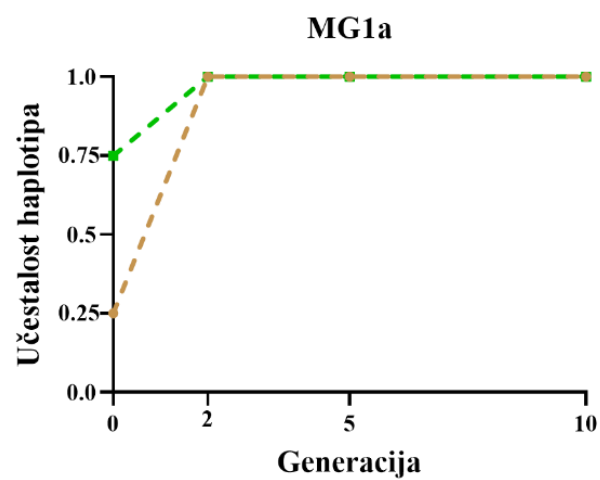
32°C



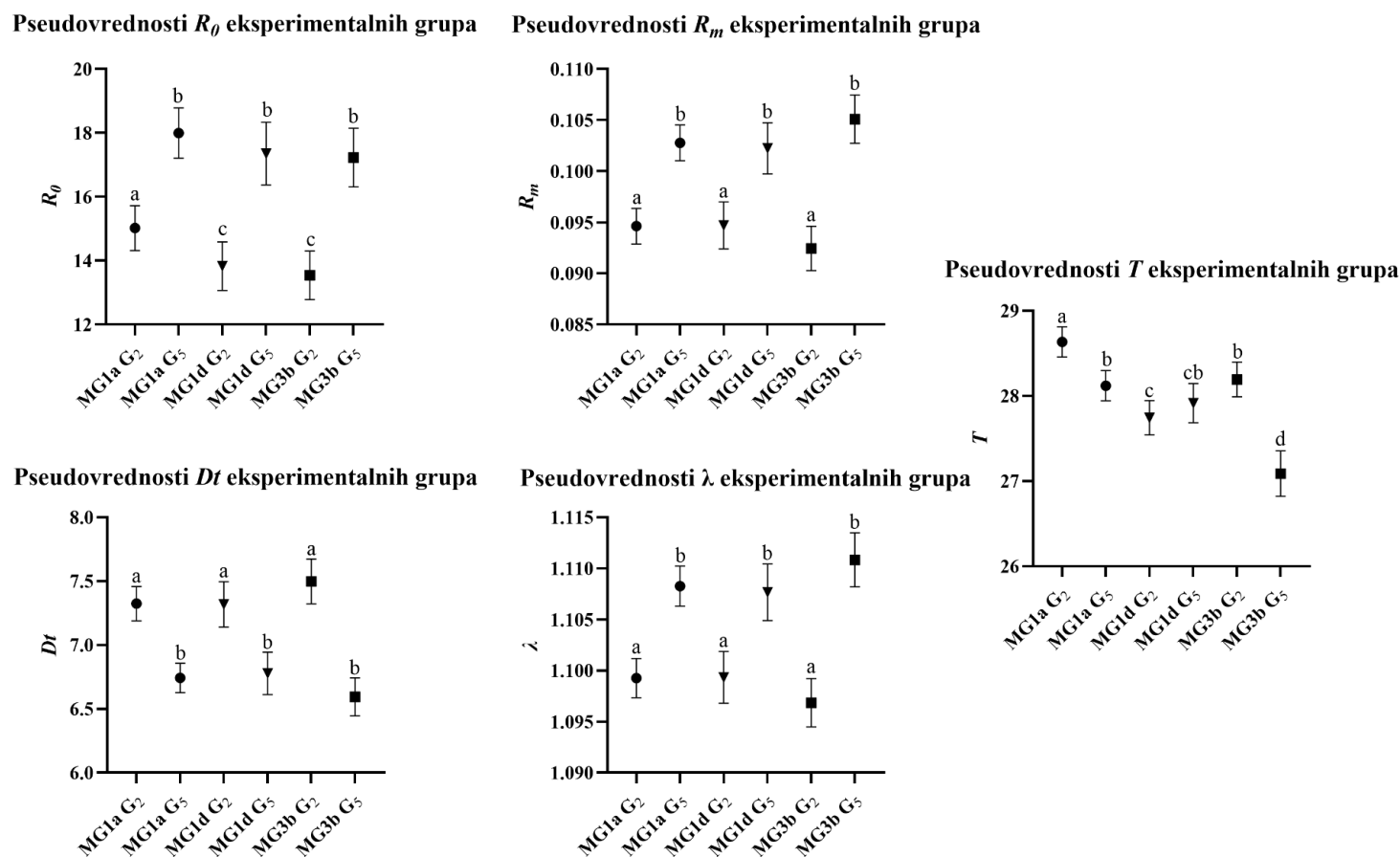
Slika 16. Srednje vrednosti i standardne greške ($\pm$ SE) vrednosti fertiliteta ženki i mužjaka sa različitim mitotipovima i jedarnim sredinama na 30°C (A i B) i 32°C (C i D). MG1a mitotip predstavljen je crvenim trouglovima, MG1d plavim kvadratima a MG3b crnim krugovima. Vrednosti fertiliteta na 30°C predstavljene su punim simbolima, a na 32°C praznim. BP – Bela Palanka, SC – Srpska Crnja, Ra – Ravnje. Statistički značajne razlike između grupa prikazane su velikim slovima i izračunate su Tukey testom ($P < 0,05$). A i B paneli su preuzeti i modifikovani od Vlajnić i sar, 2025.



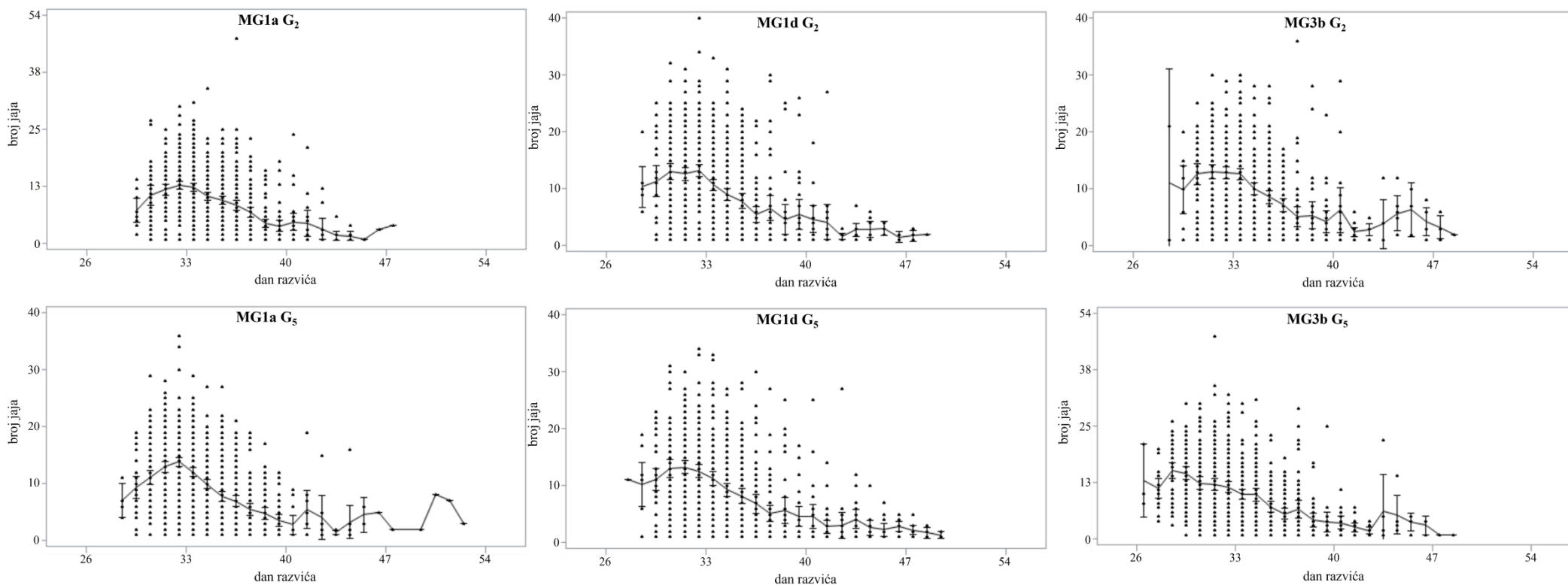
Slika 17. Srednje vrednosti i standardne greške ($\pm$ SE) vrednosti fertiliteta ženki i mužjaka različitih mitotipova na 30°C (puni simboli) i 32°C (prazni simboli). MG1a mitotip predstavljen je crvenim trouglovima, MG1d plavim kvadratima a MG3b crnim krugovima. Statistički značajne razlike između fertiliteta na dve temperature unutar svakog mitotipa prikazane su velikim slovima i izračunate su Studentovim *t*-testom ($P < 0,05$).



Slika 18. Prosečne učestalosti MG1a, MG1d i MG3b mitotipa u populacijama sa startnim udelima (generacija 0) ovih mitohondrijskih varijanti od 25% i 75% u drugoj, petoj i desetoj generaciji.



Slika 19. Srednje vrednosti i 95% intervali poverenja pseudovrednosti demografskih parametara izračunate *jackknife* procedurom za šest eksperimentalnih grupa (populacije sa startnim udelima MG1a, MG1d ili MG3b mitotipa u drugoj (G₂) i petoj generaciji (G₅)). Slovim su predstavljene statistički značajne razlike između grupa izračunate bilateralnim Studentovim *t* testom. R_0 – neto stopa reprodukcije; r_m – intrinzička stopa rasta; Dt – vreme za koje populacija udvostruči brojnost; λ – konačna stopa rasta populacije; T – srednje vreme generacije.



Slika 20. Dinamika polaganja jaja tokom života ženki iz različitih eksperimentalnih grupa (sa startnim udelima MG1a, MG1d ili MG3b mitotipa) u drugoj (G₂) i petoj (G₅) generaciji. Puna linija povezuje srednje vrednosti broja položenih jaja za svaki dan razvica.

9. LITERATURA

- Adams, K. L., & Palmer, J. D. (2003). Evolution of mitochondrial gene content: Gene loss and transfer to the nucleus. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**(3), 380–395.
- Agarwal, A., Saleh, R. A., & Bedaiwy, M. A. (2003). Role of reactive oxygen species in the pathophysiology of human reproduction. *Fertility and sterility*, **79**(4), 829–843.
- Al Zoubi, M. S., Al-Talafha, A. M., Al Sharu, E., Al-Trad, B., Alzu'bi, A., AbuAlarjah, M. I., Shehab Q., Alsmadi M., & Al-Batayneh, K. M. (2021). Correlation of Sperm Mitochondrial DNA 7345 Bp and 7599 Bp Deletions with Asthenozoospermia in Jordanian Population. *Journal of Reproduction & Infertility*, **22**(3), 165.
- Allen, J. F. (2003). Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comparative and Functional Genomics*, **4**(1), 31–36.
- Allen, J. F. (2015). Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: colocation for redox regulation of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(33), 10231–10238.
- Allen, J. F. (2017). The CoRR hypothesis for genes in organelles. *Journal of theoretical biology*, **434**, 50–57.
- Alphey, L. (2014). Genetic control of mosquitoes. *Annual review of entomology*, **59**(1), 205–224.
- Alphey, N., & Bonsall, M. B. (2018). Genetics-based methods for agricultural insect pest management. *Agricultural and Forest Entomology*, **20**(2), 131–140.
- Alvarez, N., Born, C., Risterucci, A. M., Sourrouille, P., Benrey, B., & Hossaert-Mckey, M. (2004). Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae). *Molecular Ecology Notes*, **4**(4), 683–685.
- Alvarez, N., Hossaert-McKey, M., Restoux, G., Delgado-Salinas, A., & Benrey, B. (2007). Anthropogenic effects on population genetics of phytophagous insects associated with domesticated plants. *Evolution*, **61**(12), 2986–2996.
- Anderson, L., Camus, M. F., Monteith, K. M., Salminen, T. S., & Vale, P. F. (2022). Variation in mitochondrial DNA affects locomotor activity and sleep in *Drosophila melanogaster*. *Heredity*, **129**(4), 225–232.
- Andreyev, A. Y., Kushnareva, Y. E., Murphy, A. N., & Starkov, A. A. (2015). Mitochondrial ROS metabolism: 10 Years later. *Biochemistry (Moscow)*, **80**(5), 517–531.
- Arnqvist, G., Dowling, D. K., Eady, P., Gay, L., Tregenza, T., Tuda, M., & Hosken, D. J. (2010). Genetic architecture of metabolic rate: Environment specific epistasis between mitochondrial and nuclear genes in an insect. *Evolution*, **64**(12), 3354–3363.
- Arnqvist, G., Novičić, Z. K., Castro, J. A., & Sayadi, A. (2016). Negative frequency dependent selection on sympatric mtDNA haplotypes in *Drosophila subobscura*. *Hereditas*, **153**, 1–6.
- Arnqvist, G., Stojković, B., Rönn, J. L., & Immonen, E. (2017). The pace-of-life: A sex-specific link between metabolic rate and life history in bean beetles. *Functional Ecology*, **31**(12), 2299–2309.
- Avila, F. W., Sirot, L. K., Laflamme, B. A., Rubinstein, C. D., & Wolfner, M. F. (2011). Insect seminal fluid proteins: Identification and function. *Annual Review of Entomology*, **56**, 21–40.
- Aw, W. C., Garvin, M. R., Melvin, R. G., & Ballard, J. W. O. (2017). Sex-specific influences of mtDNA mitotype and diet on mitochondrial functions and physiological traits in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*, **12**(11), e0187554.
- Aw, W. C., Towarnicki, S. G., Melvin, R. G., Youngson, N. A., Garvin, M. R., Hu, Y., Nielsen, S., Thomas, T., Pickford, R., Bustamante, S., Vila-Sanjurjo, A., Smyth, G. K., & Ballard, J. W. O. (2018). Genotype to phenotype: Diet-by-mitochondrial DNA haplotype interactions drive metabolic flexibility and organismal fitness. *PLoS Genetics*, **14**(11), e1007735.

- Baba-Aïssa, F., Solignac, M., Dennebouy, N., & David, J. R. (1988). Mitochondrial DNA variability in *Drosophila simulans*: quasi absence of polymorphism within each of the three cytoplasmic races. *Heredity*, **61**(3), 419-426.
- Babcock, C. S., & Asmussen, M. A. (1996). Effects of differential selection in the sexes on cytonuclear polymorphism and disequilibria. *Genetics*, **144**(2), 839-853.
- Babcock, C. S., & Asmussen, M. A. (1998). Effects of differential selection in the sexes on cytonuclear dynamics: life stages with sex differences. *Genetics*, **149**(4), 2063-2077.
- Bachtrog, D., & Gordo, I. (2004). Adaptive evolution of asexual populations under Muller's ratchet. *Evolution*, **58**(7), 1403-1413.
- Ballard, J. W. O., & Melvin, R. G. (2010). Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype. *Molecular Ecology*, **19**(8), 1523-1539.
- Ballard, J. W. O., & Rand, D. M. (2005). The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **36**, 621-642.
- Ballard, J. W. O., & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology*, **13**(4), 729-744.
- Ballard, J. W. O., Melvin, R. G., Katewa, S. D., & Maas, K. (2007a). Mitochondrial DNA variation is associated with measurable differences in life-history traits and mitochondrial metabolism in *Drosophila simulans*. *Evolution*, **61**(7), 1735-1747.
- Ballard, J. W. O., Melvin, R. G., Miller, J. T., & Katewa, S. D. (2007b). Sex differences in survival and mitochondrial bioenergetics during aging in *Drosophila*. *Aging Cell*, **6**(5), 699-708.
- Barr, C. M., Neiman, M., & Taylor, D. R. (2005). Inheritance and recombination of mitochondrial genomes in plants, fungi and animals. *New Phytologist*, **168**(1), 39-50.
- Barreto, F. S., & Burton, R. S. (2013). Evidence for compensatory evolution of ribosomal proteins in response to rapid divergence of mitochondrial rRNA. *Molecular Biology and Evolution*, **30**(2), 310-314.
- Bazin, E., Glémin, S., & Galtier, N. (2006). Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, **312**(5773), 570-572.
- Beekman, M., Dowling, D. K., & Aanen, D. K. (2014). The costs of being male: Are there sex-specific effects of uniparental mitochondrial inheritance? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **369**(1646), 20130440.
- Bellizzi, D., Daquila, P., Giordano, M., Montesanto, A., & Passarino, G. (2012). Global DNA methylation levels are modulated by mitochondrial DNA variants. *Epigenomics*, **4**(1), 17-27.
- Bellucci, E., Benazzo, A., Xu, C., Bitocchi, E., Rodriguez, M., Alseekh, S., Vittori, V. Di, Gioia, T., Neumann, K., Cortinovis, G., Frascarelli, G., Murube, E., Trucchi, E., Nanni, L., Ariani, A., Logozzo, G., Shin, J. H., Liu, C., Jiang, L., Ferreira J. J., Campa A., Attene G., Morrell P. L., Bertorelle G., Graner A., Gepts P., Fernie A. R., Jackson S. A., & Papa, R. (2023). Selection and adaptive introgression guided the complex evolutionary history of the European common bean. *Nature Communications*, **14**(1), 1908.
- Bessette, M., Ste-Croix, D. T., Brodeur, J., Mimee, B., & Gagnon, A. È. (2022). Population genetic structure of the carrot weevil (*Listronotus oregonensis*) in North America. *Evolutionary Applications*, **15**(2), 300-315.
- Bettinazzi, S., Liang, J., Rodriguez, E., Bonneau, M., Holt, R., Whitehead, B., Dowling D. K., Lane N., & Camus, M. F. (2024). Assessing the role of mitonuclear interactions on mitochondrial function and organismal fitness in natural *Drosophila* populations. *Evolution Letters*, **8**(6), 916-926.
- Bianchi, C., Genova, M. L., Castelli, G. P., & Lenaz, G. (2004). The mitochondrial respiratory chain is partially organized in a supercomplex assembly: kinetic evidence using flux control analysis. *Journal of Biological Chemistry*, **279**(35), 36562-36569.
- Biočanin L. (2023). Uticaj mitohondrijske varijabilnosti na reproduktivno ponašanje pasuljevog žiška *Acanthoscelides obtectus*. Master rad – Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.

- Birky, C. W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. *Annual review of genetics*, **35**(1), 125-148.
- Blier, P. U., & Lemieux, H. (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *Journal of Comparative Physiology - B Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, **171**(3), 247–253.
- Bonduriansky, R., & Chenoweth, S. F. (2009). Intralocus sexual conflict. *Trends in Ecology and Evolution*, **24**(5), 280–288.
- Bonduriansky, R., Maklakov, A., Zajitschek, F., & Brooks, R. (2008). Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. *Functional ecology*, **22**(3), 443-453.
- Bourtzis, K. (2008). Wolbachia-based technologies for insect pest population control. U Transgenesis and the management of vector-borne disease, *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **627**, 104-113.
- Bourtzis, K., Dobson, S. L., Xi, Z., Rasgon, J. L., Calvitti, M., Moreira, L. A., Bossin, H. C., Moretti, R., Baton, L. A., Hughes, G. L., Mavingui, P., & Gilles, J. R. L. (2014). Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica*, **132**(1), S150-S163.
- Boyer, P. D. (1997). The ATP synthase - a splendid molecular machine. *Annual review of biochemistry*, **66**(1), 717-749.
- Brand, J. A., Garcia-Gonzalez, F., Dowling, D. K., & Wong, B. B. (2024). Mitochondrial genetic variation as a potential mediator of intraspecific behavioural diversity. *Trends in ecology & evolution*, **39**(2), 199-212.
- Brand, M. D., & Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochemical Journal*, **435**(2), 297-312.
- Brandt, M., Groom, Q., Magro, A., Mišević, D., Narraway, C. L., Bruckermann, T., Beniermann A., Børsen T., González J., Meeus S., Roy H. E., Sá-Pinto X., Torres J. R., & Jenkins, T. (2022). Promoting scientific literacy in evolution through citizen science. *Proceedings of the Royal Society B*, **289**(1980), 20221077.
- Brandt, U. (2006). Energy converting NADH: quinone oxidoreductase (complex I). *Annual Review of Biochemistry*, **75**(1), 69-92.
- Breton, S., Beaupre, H. D., Stewart, D. T., Hoeh, W. R., & Blier, P. U. (2007). The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? *Trends in genetics*, **23**(9), 465-474.
- Budar, F., & Pelletier, G. (2001). Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences-Series III-Sciences de la Vie*, **324**(6), 543-550.
- Budar, F., Touzet, P., & De Paepe, R. (2003). The nucleo-mitochondrial conflict in cytoplasmic male sterilities revisited. *Genetica*, **117**, 3-16.
- Burger, G., Gray, M. W., & Lang, B. F. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends in genetics*, **19**(12), 709-716.
- Burton, R. S., Ellison, C. K., & Harrison, J. S. (2006). The sorry state of F₂ hybrids: consequences of rapid mitochondrial DNA evolution in allopatric populations. *The American Naturalist*, **168**(S6), S14-S24.
- Campbell, D. R., & Waser, N. M. (2001). Genotype-by-environment interaction and the fitness of plant hybrids in the wild. *Evolution*, **55**(4), 669–676.
- Camus, M. F., & Dowling, D. K. (2018). Mitochondrial genetic effects on reproductive success: signatures of positive intrasexual, but negative intersexual pleiotropy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **285**(1879), 20180187.
- Camus, M. F., Clancy, D. J., & Dowling, D. K. (2012). Mitochondria, maternal inheritance, and male aging. *Current Biology*, **22**(18), 1717–1721.

Camus, M. F., O'Leary, M., Reuter, M., & Lane, N. (2020). Impact of mitonuclear interactions on life-history responses to diet. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **375**(1790), 20190416.

Camus, M. F., Wolf, J. B. W., Morrow, E. H., & Dowling, D. K. (2015). Single nucleotides in the mtDNA sequence modify mitochondrial molecular function and are associated with sex-specific effects on fertility and aging. *Current Biology*, **25**(20), 2717–2722.

Camus, M. F., Wolff, J. N., Sgrò, C. M., & Dowling, D. K. (2017). Experimental support that natural selection has shaped the latitudinal distribution of mitochondrial haplotypes in Australian *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*, **34**(10), 2600–2612.

Carnegie, L., Reuter, M., Fowler, K., Lane, N., & Camus, M. F. (2021). Mother's curse is pervasive across a large mitonuclear *Drosophila* panel. *Evolution letters*, **5**(3), 230–239.

Case, A. L., Finseth, F. R., Barr, C. M., & Fishman, L. (2016). Selfish evolution of cytonuclear hybrid incompatibility in *Mimulus*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **283**(1838), 20161493.

Castellana, S., Vicario, S., & Saccone, C. (2011). Evolutionary patterns of the mitochondrial genome in Metazoa: Exploring the role of mutation and selection in mitochondrial protein-coding genes. *Genome Biology and Evolution*, **3**(1), 1067–1079.

Cayuela, H., Gaillard, J. M., Vieira, C., Ronget, V., Gippet, J. M., García, T. C., Marais G. A. B., & Lemaître, J. F. (2023). Sex differences in adult lifespan and aging rate across mammals: A test of the 'Mother Curse hypothesis'. *Mechanisms of ageing and development*, **212**, 111799.

Chang, C. C., Rodriguez, J., & Ross, J. (2016). Mitochondrial-nuclear epistasis impacts fitness and mitochondrial physiology of interpopulation *Caenorhabditis briggsae* hybrids. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, **6**(1), 209–219.

Chase, C. D. (2007). Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial–nuclear interactions. *TRENDS in Genetics*, **23**(2), 81–90.

Clancy, D. J. (2008). Variation in mitochondrial genotype has substantial lifespan effects which may be modulated by nuclear background. *Aging Cell*, **7**(6), 795–804.

Clancy, D. J., Hime, G. R., & Shirras, A. D. (2011). Cytoplasmic male sterility in *Drosophila melanogaster* associated with a mitochondrial CYTB variant. *Heredity*, **107**(4), 374–376.

Clark, M. E., O'Hara, F. P., Chawla, A., & Werren, J. H. (2010). Behavioral and spermatogenic hybrid male breakdown in *Nasonia*. *Heredity*, **104**(3), 289–301.

Connallon, T., Camus, M. F., Morrow, E. H., & Dowling, D. K. (2018). Coadaptation of mitochondrial and nuclear genes, and the cost of mother's curse. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **285**(1871), 20172257.

Correa, C. C., Aw, W. C., Melvin, R. G., Pichaud, N., & Ballard, J. W. O. (2012). Mitochondrial DNA variants influence mitochondrial bioenergetics in *Drosophila melanogaster*. *Mitochondrion*, **12**(4), 459–464.

Cosmides, L. M., & Tooby, J. (1981). Cytoplasmic inheritance and intragenomic conflict. *Journal of theoretical biology*, **89**(1), 83–129.

Crofts, A. R., Lhee, S., Crofts, S. B., Cheng, J., & Rose, S. (2006). Proton pumping in the bc1 complex: a new gating mechanism that prevents short circuits. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1757**(8), 1019–1034.

Dapper, A. L., Diegel, A. E., & Wade, M. J. (2023). Relative rates of evolution of male-beneficial nuclear compensatory mutations and male-harming Mother's Curse mitochondrial alleles. *Evolution*, **77**(9), 1945–1955.

Darwin C. (1877). The different forms of flowers on plants of the same species. Murray, London.

- Del Dotto, V., Musiani, F., Baracca, A., & Solaini, G. (2024). Variants in human ATP synthase mitochondrial genes: biochemical dysfunctions, Associated Diseases, and Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, **25**(4), 2239.
- Derelle, R., Torruella, G., Klimeš, V., Brinkmann, H., Kim, E., Vlček, Č., Lang, B. F., & Eliáš, M. (2015). Bacterial proteins pinpoint a single eukaryotic root. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(7), E693-E699.
- Doublet, V., Souty-Grosset, C., Bouchon, D., Cordaux, R., & Marcadé, I. (2008). A thirty million year-old inherited heteroplasmy. *PLoS One*, **3**(8), e2938.
- Dowling, D. K., & Adrian, R. E. (2019). Challenges and prospects for testing the Mother's Curse hypothesis. *Integrative and Comparative Biology*, **59**(4), 875–889.
- Dowling, D. K., & Wolff, J. N. (2023). Evolutionary genetics of the mitochondrial genome: insights from *Drosophila*. *Genetics*, **224**(3), iyad036.
- Dowling, D. K., Abiega, K. C., & Arnqvist, G. (2007b). Temperature-specific outcomes of cytoplasmic-nuclear interactions on egg-to-adult development time in seed beetles. *Evolution*, **61**(1), 194–201.
- Dowling, D. K., Friberg, U., & Lindell, J. (2008). Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends in ecology & evolution*, **23**(10), 546-554.
- Dowling, D. K., Friberg, U., Hailer, F., & Arnqvist, G. (2007a). Intergenomic epistasis for fitness: Within-population interactions between cytoplasmic and nuclear genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **175**(1), 235–244.
- Dowling, D. K., Tompkins, D. M., & Gemmell, N. J. (2015). The Trojan Female Technique for pest control: A candidate mitochondrial mutation confers low male fertility across diverse nuclear backgrounds in *Drosophila melanogaster*. *Evolutionary Applications*, **8**(9), 871–880.
- Driver, C., Georgiou, A., & Georgiou, G. (2004). The contribution by mitochondrially induced oxidative damage to aging in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology*, **5**, 185-192.
- du Plessis, S. S., Agarwal, A., Mohanty, G., & Van der Linde, M. (2015). Oxidative phosphorylation versus glycolysis: what fuel do spermatozoa use? *Asian journal of andrology*, **17**(2), 230-235.
- Duan, C., Zhu, Z., Li, W., Bao, S., & Wang, X. (2017). Genetic diversity and differentiation of *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae) populations in China. *Agricultural and Forest Entomology*, **19**(2), 113–121.
- Dudkina, N. V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H. P., & Boekema, E. J. (2010). Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1797**(6-7), 664-670.
- Dzudzor, B., Bimah, B., Amarh, V., & Ocloo, A. (2021). Sperm parameters and mitochondrial DNA sequence variants among patients at a fertility clinic in Ghana. *PloS one*, **16**(6), e0252923.
- Dorđević, M., Savković, U., Lazarević, J., Tucić, N., & Stojković, B. (2015). Intergenomic interactions in hybrids between short-lived and long-lived lines of a seed beetle: Analyses of life history traits. *Evolutionary Biology*, **42**, 461-472.
- Dorđević, M., Stojković, B., Savković, U., Immonen, E., Tucić, N., Lazarević, J., & Arnqvist, G. (2017). Sex-specific mitonuclear epistasis and the evolution of mitochondrial bioenergetics, ageing, and life history in seed beetles. *Evolution*, **71**(2), 274–288.
- Edmands, S. (2024). Mother's Curse effects on lifespan and aging. *Frontiers in Aging*, **5**, 1361396.
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature reviews genetics*, **5**(6), 435-445.
- Ellison, C. K., & Burton, R. S. (2006). Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*. *Evolution*, **60**(7), 1382-1391.

- Ellison, C. K., & Burton, R. S. (2008). Interpopulation hybrid breakdown maps to the mitochondrial genome. *Evolution*, **62**(3), 631–638.
- Ellison, C. K., & Burton, R. S. (2010). Cytonuclear conflict in interpopulation hybrids: the role of RNA polymerase in mtDNA transcription and replication. *Journal of evolutionary biology*, **23**(3), 528–538.
- Engelstädter, J., & Charlat, S. (2006). Outbreeding selects for spiteful cytoplasmic elements. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **273**(1589), 923–929.
- Epstein, C. B., Waddle, J. A., Iv, W. H., Davé, V., Thornton, J., Macatee, T. L., Garner, H. R., & Butow, R. A. (2001). Genome-wide Responses to Mitochondrial Dysfunction. *Molecular Biology of the Cell*, **12**(2), 297–308.
- Erić, P., Patenković, A., Erić, K., Tanasković, M., Davidović, S., Rakić, M., Savić Veselinović M., Stamenković-Radak M., & Jelić, M. (2022). Temperature-specific and sex-specific fitness effects of sympatric mitochondrial and mito-nuclear variation in *Drosophila obscura*. *Insects*, **13**(2), 139.
- Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular ecology*, **14**(8), 2611–2620.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, **10**(3), 564–567.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**(4), 1567–1587.
- Fauré, S., Noyer, J. L., Carreel, F., Horry, J. P., Bakry, F., & Lanaud, C. (1994). Maternal inheritance of chloroplast genome and paternal inheritance of mitochondrial genome in bananas (*Musa acuminata*). *Current Genetics*, **25**(3), 265–269.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, **3**, 294–299
- Fontanillas, P., Dépraz, A., Giorgi, M. S., & Perrin, N. (2005). Nonshivering thermogenesis capacity associated to mitochondrial DNA haplotypes and gender in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Molecular Ecology*, **14**(2), 661–670.
- Formosa, L. E., Dibley, M. G., Stroud, D. A., & Ryan, M. T. (2018). Building a complex complex: Assembly of mitochondrial respiratory chain complex I. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **76**, 154–162.
- Frank, S. A., & Hurst, L. D. (1996). Mitochondria and male disease. *Nature*, **383**(6597), 224–224.
- Froman, D. P., & Kirby, J. D. (2005). Sperm mobility: phenotype in roosters (*Gallus domesticus*) determined by mitochondrial function. *Biology of reproduction*, **72**(3), 562–567.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, **18**(22), 4541–4550.
- Gammage, P. A., Moraes, C. T., & Minczuk, M. (2018b). Mitochondrial genome engineering: the revolution may not be CRISPR-ized. *Trends in Genetics*, **34**(2), 101–110.
- Gammage, P. A., Viscomi, C., Simard, M. L., Costa, A. S. H., Gaude, E., Powell, C. A., Van Haute, L., McCann, B. J., Rebelo-Guimar, P., Cerutti, R., Zhang, L., Rebar, E. J., Zeviani, M., Frezza, C., Stewart, J. B., & Minczuk, M. (2018a). Genome editing in mitochondria corrects a pathogenic mtDNA mutation in vivo. *Nature Medicine*, **24**(11), 1691–1695.
- Garland, T. 2003. Selection experiments: An underutilized tool in biomechanics and organismal biology. In: *Vertebrate Biomechanics and Evolution* (J. P. Gasc i sar., eds), pp. 23–56. BIOS Scientific, Oxford.
- Gebert, N., Joshi, A. S., Kutik, S., Becker, T., McKenzie, M., Guan, X. L., Mooga, V. P., Stroud, D. A., Kulkarni, G., Wenk, M. R., Rehling, P., Meisinger, C., Ryan, M. T., Wiedemann, N., Greenberg,

- M. L., & Pfanner, N. (2009). Mitochondrial cardiolipin involved in outer-membrane protein biogenesis: Implications for Barth syndrome. *Current Biology*, **19**(24), 2133–2139.
- Gemmell, N. J., & Allendorf, F. W. (2001). Mitochondrial mutations may decrease population viability. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**(3), 115–117.
- Gemmell, N. J., Jalilzadeh, A., Didham, R. K., Soboleva, T., & Tompkins, D. M. (2013). The Trojan female technique: a novel, effective and humane approach for pest population control. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **280**(1773), 20132549.
- Gemmell, N. J., Metcalf, V. J., & Allendorf, F. W. (2004). Mother's curse: The effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**(5), 238–244.
- Gershoni, M., Fuchs, A., Shani, N., Fridman, Y., Corral-Debrinski, M., Aharoni, A., Frishman, D., & Mishmar, D. (2010). Coevolution predicts direct interactions between mtDNA-encoded and nDNA-encoded subunits of oxidative phosphorylation complex I. *Journal of Molecular Biology*, **404**(1), 158–171.
- Gershoni, M., Levin, L., Ovadia, O., Toiw, Y., Shani, N., Dadon, S., Barzilai, N., Bergman, A., Atzmon, G., Wainstein, J., Tsur, A., Nijtmans, L., Glaser, B., & Mishmar, D. (2014). Disrupting mitochondrial-nuclear coevolution affects OXPHOS complex i integrity and impacts human health. *Genome Biology and Evolution*, **6**(10), 2665–2680.
- Gershoni, M., Templeton, A. R., & Mishmar, D. (2009). Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *BioEssays*, **31**(6), 642–650.
- Goldberg, A., Wildman, D. E., Schmidt, T. R., Hüttemann, M., Goodman, M., Weiss, M. L., & Grossman, L. I. (2003). Adaptive evolution of cytochrome c oxidase subunit VIII in anthropoid primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**(10), 5873–5878.
- González-Rodríguez, A., Benrey, B., Castañeda, A., & Oyama, K. (2000). Population genetic structure of *Acanthoscelides obtectus* and *A. obvelatus* (Coleoptera: Bruchidae) from wild and cultivated *Phaseolus* spp. (Leguminosae). *Annals of the Entomological Society of America*, **93**(5), 1100–1107.
- González-Tokman, D., Córdoba-Aguilar, A., Dáttilo, W., Lira-Noriega, A., Sánchez-Guillén, R. A., & Villalobos, F. (2020). Insect responses to heat: physiological mechanisms, evolution and ecological implications in a warming world. *Biological Reviews*, **95**(3), 802–821.
- Hage, R., & Vignal-Clermont, C. (2021). Leber hereditary optic neuropathy: review of treatment and management. *Frontiers in Neurology*, **12**, 651639.
- Hagström, E., Freyer, C., Battersby, B. J., Stewart, J. B., & Larsson, N. G. (2014). No recombination of mtDNA after heteroplasmy for 50 generations in the mouse maternal germline. *Nucleic acids research*, **42**(2), 1111–1116.
- Haussecker, D., Huang, Y., Lau, A., Parameswaran, P., Fire, A. Z., & Kay, M. A. (2010). Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA*, **16**(4), 673–695.
- Havey, M. J., Park, Y. H., & Bartoszewski, G. (2004). The Psm locus controls paternal sorting of the cucumber mitochondrial genome. *Journal of Heredity*, **95**(6), 492–497.
- Havird, J. C., Forsythe, E. S., Williams, A. M., Werren, J. H., Dowling, D. K., & Sloan, D. B. (2019). Selfish mitonuclear conflict. *Current Biology*, **29**(11), R496–R511.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **270**(1512), 313–321.
- Hebert, P. D. N., Stoeckle, M. Y., Zemlak, T. S., & Francis, C. M. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS biology*, **2**(10), e312.
- Hedrick, P. W. (2012). Reversing mother's curse revisited. *Evolution*, **66**(2), 612–616.
- Hill, G. E. (2011). Condition-dependent traits as signals of the functionality of vital cellular processes. *Ecology Letters*, **14**(7), 625–634.
- Hill, G. E. (2019). *Mitonuclear ecology*. Oxford University Press.
- Hill, G. E. (2020). Mitonuclear compensatory coevolution. *Trends in Genetics*, **36**(6), 403–414.

- Hill, G. E., Havird, J. C., Sloan, D. B., Burton, R. S., Greening, C., & Dowling, D. K. (2019). Assessing the fitness consequences of mitonuclear interactions in natural populations. *Biological Reviews*, **94**(3), 1089–1104.
- Hodgins, K. A., Rieseberg, L., & Otto, S. P. (2009). Genetic control of invasive plants species using selfish genetic elements. *Evolutionary Applications*, **2**(4), 555–569.
- Hoekstra, L. A., Julick, C. R., Mika, K. M., & Montooth, K. L. (2018). Energy demand and the context-dependent effects of genetic interactions underlying metabolism. *Evolution Letters*, **2**(2), 102–113.
- Hoekstra, L. A., Siddiq, M. A., & Montooth, K. L. (2013). Pleiotropic effects of a mitochondrial-nuclear incompatibility depend upon the accelerating effect of temperature in *Drosophila*. *Genetics*, **195**(3), 1129–1139.
- Hoffmann, A. A., & Ross, P. A. (2018). Rates and patterns of laboratory adaptation in (mostly) insects. *Journal of Economic Entomology*, **111**(2), 501–509.
- Holmbeck, M. A., Donner, J. R., Villa-Cuesta, E., & Rand, D. M. (2015). A *Drosophila* model for mito-nuclear diseases generated by an incompatible interaction between tRNA and tRNA synthetase. *DMM Disease Models and Mechanisms*, **8**(8), 843–854.
- Holyoake, A. J., McHugh, P., Wu, M., O'carroll, S., Benny, P., Sin, I. L., & Sin, F. Y. T. (2001). High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is associated with poor semen parameters in men. *International journal of andrology*, **24**(3), 175–182.
- Horn, R., Gupta, K. J., & Colombo, N. (2014). Mitochondrion role in molecular basis of cytoplasmic male sterility. *Mitochondrion*, **19**, 198–205.
- Huignard, J. (1983). Transfer and fate of male secretions deposited in the spermatophore of females of *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera Bruchidae). *Journal of Insect Physiology*, **29**(1), 55–63.
- Hussain, S. R. A., Yalvac, M. E., Khoo, B., Eckardt, S., & McLaughlin, K. J. (2021). Adapting CRISPR/Cas9 system for targeting mitochondrial genome. *Frontiers in genetics*, **12**, 627050.
- Hüttemann, M., Pecina, P., Rainbolt, M., Sanderson, T. H., Kagan, V. E., Samavati, L., Doan, J. W., & Lee, I. (2011). The multiple functions of cytochrome c and their regulation in life and death decisions of the mammalian cell: From respiration to apoptosis. *Mitochondrion*, **11**(3), 369–381.
- Iliceto, M., Andersen, J. M., Stensen, M. H., Haugen, T. B., & Witczak, O. (2024). Association of endogenous seminal L-carnitine levels with post-thaw semen parameters in humans. *Andrologia*, **1**, 4327010.
- Immonen, E., Berger, D., Sayadi, A., Liljestrand-Rönn, J., & Arnqvist, G. (2020). An experimental test of temperature-dependent selection on mitochondrial haplotypes in *Callosobruchus maculatus* seed beetles. *Ecology and Evolution*, **10**(20), 11387–11398.
- Immonen, E., Rönn, J., Watson, C., Berger, D., & Arnqvist, G. (2016). Complex mitonuclear interactions and metabolic costs of mating in male seed beetles. *Journal of Evolutionary Biology*, **29**(2), 360–370.
- Innocenti, P., Morrow, E. H., & Dowling, D. K. (2011). Experimental evidence supports a sex-specific selective sieve in mitochondrial genome evolution. *Science*, **332**(6031), 845–848.
- Iverson, E. N. (2024). Conservation Mitonuclear Replacement: Facilitated mitochondrial adaptation for a changing world. *Evolutionary Applications*, **17**(3), e13642.
- James, A. C., & Ballard, J. W. O. (2003). Mitochondrial genotype affects fitness in *Drosophila simulans*. *Genetics*, **164**(1), 187–194.
- Janssen, R. J., Nijtmans, L. G., Heuvel, L. P. V. D., & Smeitink, J. A. (2006). Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism*, **29**(4), 499–515.

- Jelić, M., Arnqvist, G., Kurbalija Novičić, Z., Kenig, B., Tanasković, M., Anđelković, M., & Stamenković-Radak, M. (2015). Sex-specific effects of sympatric mitonuclear variation on fitness in *Drosophila subobscura*. *BMC evolutionary biology*, **15**, 1-9.
- Jin, L., Zhang, H., Lu, Y., Yang, Y., Wu, K., Tabashnik, B. E., & Wu, Y. (2015). Large-scale test of the natural refuge strategy for delaying insect resistance to transgenic Bt crops. *Nature biotechnology*, **33**(2), 169-174.
- Jo, A., Ham, S., Lee, G. H., Lee, Y. I., Kim, S., Lee, Y. S., Shin J. H., & Lee, Y. (2015). Efficient mitochondrial genome editing by CRISPR/Cas9. *BioMed research international*, **1**, 305716.
- John, J. C. S., Jokhi, R. P., & Barratt, C. L. (2005). The impact of mitochondrial genetics on male infertility. *International Journal of Andrology*, **28**(2), 65-73.
- Karimian, M., & Babaei, F. (2020). Large-scale mtDNA deletions as genetic biomarkers for susceptibility to male infertility: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Biological Macromolecules*, **158**, 85-93.
- Kim, K. S., & Sappington, T. W. (2013). Population genetics strategies to characterize long-distance dispersal of insects. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, **16**(1), 87-97.
- Kirk, H., Dorn, S., & Mazzi, D. (2013). Molecular genetics and genomics generate new insights into invertebrate pest invasions. *Evolutionary Applications*, **6**(5), 842-856.
- Klassen, W., Curtis, E. C., & Hendrichs, J. (2021). History of the sterile insect technique. In *Sterile insect technique*, 1-44. CRC Press.
- Koch, R. E., & Hill, G. E. (2018). Behavioural mating displays depend on mitochondrial function: a potential mechanism for linking behaviour to individual condition. *Biological Reviews*, **93**(3), 1387-1398.
- Kogan, M. (1998). Integrated pest management: historical perspectives and contemporary developments. *Annual review of entomology*, **43**(1), 243-270.
- Koonin, E. V., & Wolf, Y. I. (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic acids research*, **36**(21), 6688-6719.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular ecology resources*, **15**(5), 1179-1191.
- Kuriwada, T., Kumano, N., Shiromoto, K., & Haraguchi, D. (2014). Laboratory adaptation reduces female mating resistance in the sweet potato weevil. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, **152**(1), 77-86.
- Kyrgiafini, M. A., Giannoulis, T., Moutou, K. A., & Mamuris, Z. (2022). Investigating the impact of a curse: diseases, population isolation, evolution and the Mother's Curse. *Genes*, **13**(11), 2151.
- Lane, N. (2011). Mitonuclear match: Optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations. *BioEssays*, **33**(11), 860-869.
- Lane, N. (2015a). *Vital Question: Energy, Evolution, and the Origins of Complex Life*. WW Norton & Company, New York.
- Lane, N. (2015b). Life force: why energy shapes evolution. *The Biochemist*, **37**(5), 6-11.
- Lane, N., & Martin, W. (2010). The energetics of genome complexity. *Nature*, **467**(7318), 929-934.
- Laskowski, K. L., Moiron, M., & Niemelä, P. T. (2021). Integrating behavior in life-history theory: allocation versus acquisition? *Trends in Ecology & Evolution*, **36**(2), 132-138.
- Lazarou, M., Thorburn, D. R., Ryan, M. T., & McKenzie, M. (2009). Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1793**(1), 78-88.

- Leeftang, H. L., Van Dongen, S., & Helsen, P. (2022). Mother's curse on conservation: assessing the role of mtDNA in sex-specific survival differences in ex-situ breeding programs. *Animal Conservation*, **25**(3), 342-351.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, **6**(9), 1110–1116.
- Lenaz, G., Fato, R., Formiggini, G., & Genova, M. L. (2007). The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion*, **7**, S8-S33.
- Li, Y. L., & Liu, J. X. (2018). StructureSelector: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods. *Molecular ecology resources*, **18**(1), 176-177.
- Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C., & Bandi, C. (2002). How many *Wolbachia* supergroups exist? *Molecular biology and evolution*, **19**(3), 341-346.
- Løvlie, H., Immonen, E., Gustavsson, E., Kazancıoğlu, E., & Arnqvist, G. (2014). The influence of mitonuclear genetic variation on personality in seed beetles. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**(1796), 20141039.
- Low, G. W., Pavlova, A., Gan, H. M., Ko, M. C., Sadanandan, K. R., Lee, Y. P., Amos, J. N., Austin, L., Falk, S., Dowling, D. K., & Sunnucks, P. (2024). Accelerated differentiation of neo-W nuclear-encoded mitochondrial genes between two climate-associated bird lineages signals potential co-evolution with mitogenomes. *Heredity*, **133**(5), 342-354.
- Lynch, M. (1996). Mutation accumulation in transfer RNAs: molecular evidence for Muller's ratchet in mitochondrial genomes. *Molecular biology and evolution*, **13**(1), 209-220.
- Macmillan, C., Johns, T. A., Fu, K., & Shoubridge, E. A. (2000). Predominance of the T14484C mutation in French-Canadian families with Leber hereditary optic neuropathy is due to a founder effect. *The American Journal of Human Genetics*, **66**(1), 332-335.
- Maia, A. D. H., Luiz, A. J., & Campanhola, C. (2000). Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. *Journal of Economic Entomology*, **93**(2), 511-518.
- Maklakov, A. A., & Lummaa, V. (2013). Evolution of sex differences in lifespan and aging: causes and constraints. *BioEssays*, **35**(8), 717-724.
- Maklakov, A. A., Friberg, U., Dowling, D. K., & Arnqvist, G. (2006). Within-population variation in cytoplasmic genes affects female life span and aging in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, **60**(10), 2081-2086.
- Margulis L. (1970). Origin of eukaryotic cells. New Haven, CT: Yale University Press
- Martin, W. F., Garg, S., & Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **370**(1678), 20140330.
- Martin, W., & Müller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature*, **392**(6671), 37-41.
- Mast, H. E., Blier, P. U., Đorđević, M., Savković, U., Holody, C. D., Bourque, S. L., & Lemieux, H. (2024). Selection for late reproduction leads to loss of complex I mitochondrial capacity and associated increased longevity in seed beetles. *The Journals of Gerontology, Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, **79**(11), glae208.
- Mathot, K. J., Dingemanse, N. J., & Nakagawa, S. (2019). The covariance between metabolic rate and behaviour varies across behaviours and thermal types: meta-analytic insights. *Biological Reviews*, **94**(3), 1056–1074.
- Mazzi, D., & Dorn, S. (2012). Movement of insect pests in agricultural landscapes. *Annals of Applied Biology*, **160**(2), 97-113.
- McKenzie, M., Chiotis, M., Pinkert, C. A., & Trounce, I. A. (2003). Functional respiratory chain analyses in murid xenomitochondrial cybrids expose coevolutionary constraints of cytochrome b and nuclear subunits of complex III. *Molecular Biology and Evolution*, **20**(7), 1117–1124.

- Meena, A., De Nardo, A. N., Maggu, K., Sbilordo, S. H., Roy, J., Snook, R. R., & Lüpold, S. (2024). Fertility loss and recovery dynamics after repeated heat stress across life stages in male *Drosophila melanogaster*: patterns and processes. *Royal Society Open Science*, **11**(10), 241082.
- Meiklejohn, C. D., Holmbeck, M. A., Siddiq, M. A., Abt, D. N., Rand, D. M., & Montooth, K. L. (2013). An incompatibility between a mitochondrial tRNA and its nuclear-encoded tRNA synthetase compromises development and fitness in *Drosophila*. *PLoS genetics*, **9**(1), e1003238.
- Mercer, T. R., Neph, S., Dinger, M. E., Crawford, J., Smith, M. A., Shearwood, A. M. J., Haugen, E., Bracken, C. P., Rackham, O., Stamatoyannopoulos, J. A., Filipovska, A., & Mattick, J. S. (2011). The human mitochondrial transcriptome. *Cell*, **146**(4), 645–658.
- Mick, D. U., Fox, T. D., & Rehling, P. (2011). Inventory control: cytochrome c oxidase assembly regulates mitochondrial translation. *Nature reviews Molecular cell biology*, **12**(1), 14–20.
- Milenković, D., Blaza, J. N., Larsson, N. G., & Hirst, J. (2017). The enigma of the respiratory chain supercomplex. *Cell metabolism*, **25**(4), 765–776.
- Milot, E., Moreau, C., Gagnon, A., Cohen, A. A., Brais, B., & Labuda, D. (2017). Mother's curse neutralizes natural selection against a human genetic disease over three centuries. *Nature Ecology and Evolution*, **1**(9), 1400–1406.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Mondragon-Palomino, M., Procaccio, V., Gaut, B., & Wallace, D. C. (2006). Adaptive selection of mitochondrial complex I subunits during primate radiation. *Gene*, **378**(1–2), 11–18.
- Moran, B. M., Payne, C. Y., Powell, D. L., Iverson, E. N. K., Donny, A. E., Banerjee, S. M., Langdon, Q. K., Gunn, T. R., Rodriguez-Soto, R. A., Madero, A., Baczenas, J. J., Kleczko, K. M., Liu, F., Matney, R., Singhal, K., Leib, R. D., Hernandez-Perez, O., Corbett-Detig, R., Frydman, J., Gifford C., Scharl M., Havird J. C., & Schumer, M. (2024). A lethal mitonuclear incompatibility in complex I of natural hybrids. *Nature*, **626**(7997), 119–127.
- Morrow, E. H., Reinhardt, K., Wolff, J. N., & Dowling, D. K. (2015). Risks inherent to mitochondrial replacement. *EMBO Reports*, **16**(5), 541–544. h
- Mossman, J. A., Biancani, L. M., Zhu, C. T., & Rand, D. M. (2016a). Mitonuclear epistasis for development time and its modification by diet in *Drosophila*. *Genetics*, **203**(1), 463–484.
- Mossman, J. A., Tross, J. G., Jourjine, N. A., Li, N., Wu, Z., & Rand, D. M. (2017). Mitonuclear interactions mediate transcriptional responses to hypoxia in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, **34**(2), 447–466.
- Mossman, J. A., Tross, J. G., Li, N., Wu, Z., & Rand, D. M. (2016b). Mitochondrial-nuclear interactions mediate sex-specific transcriptional profiles in *Drosophila*. *Genetics*, **204**(2), 613–630.
- Muller, H. J. (1964). The relation of recombination to mutational advance. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **1**(1), 2–9.
- Murphy, M. P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical journal*, **417**(1), 1–13.
- Nagarajan-Radha, V., & Beekman, M. (2023). G×G×E effect on phenotype expression in a non-conventional model organism, the unicellular slime mould *Physarum polycephalum*. *Biology Letters*, **19**(2), 20220494.
- Nagarajan-Radha, V., Aitkenhead, I., Clancy, D. J., Chown, S. L., & Dowling, D. K. (2020). Sex-specific effects of mitochondrial haplotype on metabolic rate in *Drosophila melanogaster* support predictions of the Mother's Curse hypothesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **375**(1790), 20190178.
- Nagarajan-Radha, V., Rapkin, J., Hunt, J., & Dowling, D. K. (2019). Interactions between mitochondrial haplotype and dietary macronutrient ratios confer sex-specific effects on longevity in *Drosophila melanogaster*. *Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences*, **74**(10), 1573–1581.

- Niemelä, P. T., & Dingemanse, N. J. (2018). Meta-analysis reveals weak associations between intrinsic state and personality. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **285**(1873), 20172823.
- Oemer, G., Lackner, K., Muigg, K., Krumschnabel, G., Watschinger, K., Sailer, S., Lindner, H., Gnaiger, E., Wortmann, S. B., Werner, E. R., Zschocke, J., & Keller, M. A. (2018). Molecular structural diversity of mitochondrial cardiolipins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**(16), 4158-4163.
- O'Hagan, H. M., Wang, W., Sen, S., Shields, C. D., Lee, S. S., Zhang, Y. W., Celements E. G., Cai Y., Van Neste L., Easwaran H., Casero R. A., Sears C. L., & Baylin, S. B. (2011). Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer cell*, **20**(5), 606-619.
- Oliveira, M. R. C., Correˆa, A. S., Souza, G. A. D., Guedes, R. N. C., & Oliveira, L. O. D. (2013). Mesoamerican origin and pre-and post-Columbian expansions of the ranges of *Acanthoscelides obtectus* Say, a cosmopolitan insect pest of the common bean. *PloS one*, **8**(7), e70039.
- Osada, N., & Akashi, H. (2012). Mitochondrial-nuclear interactions and accelerated compensatory evolution: Evidence from the primate cytochrome c oxidase complex. *Molecular Biology and Evolution*, **29**(1), 337–346.
- Paini, D. R., Sheppard, A. W., Cook, D. C., De Barro, P. J., Worner, S. P., & Thomas, M. B. (2016). Global threat to agriculture from invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113**(27), 7575–7579.
- Parsons, D. M. J., & Credland, P. F. (2003). Determinants of oviposition in *Acanthoscelides obtectus*: A nonconformist bruchid. *Physiological Entomology*, **28**(3), 221–231.
- Patel, M. R., Miriyala, G. K., Littleton, A. J., Yang, H., Trinh, K., Young, J. M., Kennedy, S. R., Yamashita, Y. M., Pallanck, L. J., & Malik, H. S. (2016). A mitochondrial DNA hypomorph of cytochrome oxidase specifically impairs male fertility in *Drosophila melanogaster*. *eLife*, **5**, e16923.
- Picard, M., & Shirihai, O. S. (2022). Mitochondrial signal transduction. *Cell metabolism*, **34**(11), 1620-1653.
- Pichaud, N., Bérubé, R., Côté, G., Belzile, C., Dufresne, F., Morrow, G., Tanguay, R. M., Rand, D. M., & Blier, P. U. (2019). Age dependent dysfunction of mitochondrial and ROS metabolism induced by mitonuclear mismatch. *Frontiers in Genetics*, **10**, 130.
- Pichaud, N., Chatelain, E. H., Ballard, J. W. O., Tanguay, R., Morrow, G., & Blier, P. U. (2010). Thermal sensitivity of mitochondrial metabolism in two distinct mitotypes of *Drosophila simulans*: evaluation of mitochondrial plasticity. *Journal of Experimental Biology*, **213**(10), 1665-1675.
- Pichaud, N., Messmer, M., Correa, C. C., & Ballard, J. W. O. (2013). Diet influences the intake target and mitochondrial functions of *Drosophila melanogaster* males. *Mitochondrion*, **13**(6), 817–822.
- Pinho, C., & Hey, J. (2010). Divergence with gene flow: Models and data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **41**, 215–230.
- Pittis, A. A., & Gabaldón, T. (2016). Late acquisition of mitochondria by a host with chimaeric prokaryotic ancestry. *Nature*, **531**(7592), 101–104.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**(2), 945-959.
- Ram, K. R., & Wolfner, M. F. (2007). Seminal influences: *Drosophila* Acps and the molecular interplay between males and females during reproduction. *Integrative and Comparative Biology*, **47**(3), 427–445.
- Ramadani, S. D., Corebima A. D., & Zubaidah, S. (2016). The effect of dark condition on the fecundity and development time of *Drosophila melanogaster*, strains of *wild type*, *white* and *ebony* for several generations. *Journal of Research in Agriculture and Animal Science*, **4**(2), 1–10.

Rand, D. M., & Mossman, J. A. (2020). Mitonuclear conflict and cooperation govern the integration of genotypes, phenotypes and environments. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **375**(1790), 20190188.

Rand, D. M., Clark, A. G., & Kann, L. M. (2001). Sexually antagonistic cytonuclear fitness interactions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, **159**(1), 173-187.

Rand, D. M., Haney, R. A., & Fry, A. J. (2004). Sex-specific cytonuclear interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, **19**(12), 645-653.

Rank, N. E., Mardulyn, P., Heidl, S. J., Roberts, K. T., Zavala, N. A., Smiley, J. T., & Dahlhoff, E. P. (2020). Mitonuclear mismatch alters performance and reproductive success in naturally introgressed populations of a montane leaf beetle. *Evolution*, **74**(8), 1724–1740.

Rawson, P. D., & Burton, R. S. (2002). Functional coadaptation between cytochrome c and cytochrome c oxidase within allopatric populations of a marine copepod. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **99**(20), 12955-12958.

Réale, D., Garant, D., Humphries, M. M., Bergeron, P., Careau, V., & Montiglio, P. O. (2010). Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **365**(1560), 4051-4063.

Reddy, P., Ocampo, A., Suzuki, K., Luo, J., Bacman, S. R., Williams, S. L., Sugawara, A., Okamura, D., Tsunekawa, Y., Wu, J., Lam, D., Xiong, X., Montserrat, N., Esteban, C. R., Liu, G. H., Sancho-Martinez, I., Manau, D., Civico, S., Cardellach, F., O’Callaghan M. D. M., Campistol J., Zhao H., Campistol J. M., Moraes C. T., & Izpisua Belmonte, J. C. (2015). Selective elimination of mitochondrial mutations in the germline by genome editing. *Cell*, **161**(3), 459–469.

Rees, D. J., Emerson, B. C., Oromi, P., & Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial DNA, ecology and morphology: interpreting the phylogeography of the *Nesotes* (Coleoptera: Tenebrionidae) of Gran Canaria (Canary Islands). *Molecular Ecology*, **10**(2), 427-434.

Rendón, P., McInnis, D., Lance, D. & Stewart, J. (2004) Medfly (Diptera: Tephritidae) genetic sexing: large-scale field comparison of males-only and bisexual sterile fly releases in Guatemala. *Journal of Economic Entomology*, **97**, 1547–1553.

Restoux, G., Hossaert-Mckey, M., Benrey, B., & Alvarez, N. (2010). The effect of host plant and isolation on the genetic structure of phytophagous insects: A preliminary study on a bruchid beetle. *European Journal of Entomology*, **107**(3), 299-304.

Rich, P. R., & Maréchal, A. (2010). The mitochondrial respiratory chain. *Essays in biochemistry*, **47**, 1-23.

Rodríguez, E., Grover Thomas, F., Camus, M. F., & Lane, N. (2021). Mitonuclear interactions produce diverging responses to mild stress in *Drosophila* larvae. *Frontiers in genetics*, **12**, 734255.

Rozek, M., Holecová, M., & Lachowska, D. (1999). Karyological notes on *Acanthoscelides obtectus* (Say 1859) (Coleoptera, Bruchidae). *Cytologia*, **64**(4), 367-369.

Ruiz-Pesini, E., Alvarez, E., Enríquez, J. A., & López-Pérez, M. J. (2001). Association between seminal plasma carnitine and sperm mitochondrial enzymatic activities. *International Journal of Andrology*, **24**(6), 335-340.

Ruiz-Pesini, E., Lapeña, A.-C., Díez-Sánchez, C., Pérez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E., Díaz, M., Urriés, A., Montoro, L., López-Pérez, M. J., & Enríquez, J. A. (2000). Human mtDNA haplogroups associated with high or reduced spermatozoa motility. *The American Journal of Human Genetics*, **67**(3), 682-696.

Sackton, T. B., Haney, R. A., & Rand, D. M. (2003). Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: disruption of cytochrome c oxidase activity in backcross genotypes. *Evolution*, **57**(10), 2315-2325.

Salminen, T. S., Vesala, L., Basikhina, Y., Kutzer, M., Tuomela, T., Lucas, R., Monteith, K., Prakash, A., Tietz, T., & Vale, P. F. (2024). A naturally occurring mitochondrial genome variant confers broad protection from infection in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, **20**(11), e1011476.

- Sánchez-Caballero, L., Guerrero-Castillo, S., & Nijtmans, L. (2016). Unraveling the complexity of mitochondrial complex I assembly: A dynamic process. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, **1857**(7), 980–990.
- SAS Institute Inc, 2010. The SAS System for Windows. Release 9.3. SAS Institute, Cary.
- Sato, M., & Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, **1833**(8), 1979–1984.
- Sayadi, A., Immonen, E., Tellgren-Roth, C., & Arnqvist, G. (2017). The evolution of dark matter in the mitogenome of seed beetles. *Genome Biology and Evolution*, **9**(10), 2697–2706.
- Scheffler, I.E. 2008. *Mitochondria*. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Schmale, I., Wäckers, F. L., Cardona, C., & Dorn, S. (2002). Field infestation of *Phaseolus vulgaris* by *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Bruchidae), parasitoid abundance, and consequences for storage pest control. *Environmental Entomology*, **31**(5), 859–863.
- Schultz, B. E., & Chan, S. I. (2001). Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes. *Annual review of biophysics and biomolecular structure*, **30**(1), 23–65.
- Sena, L. A., & Chandel, N. S. (2012). Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Molecular cell*, **48**(2), 158–167.
- Shamsi, M.B., Kumar, R., Bhatt, A., Bamezai, R.N.K., Kumar, R., Gupta, N.P., Das, T.K., & Dada, R. Mitochondrial DNA mutations in etiopathogenesis of male infertility. *Indian Journal of Urology*, **24**(2), 150–154.
- Shock, L. S., Thakkar, P. V., Peterson, E. J., Moran, R. G., & Taylor, S. M. (2011). DNA methyltransferase 1, cytosine methylation, and cytosine hydroxymethylation in mammalian mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**(9), 3630–3635.
- Short, R. V. (1997). The testis: the witness of the mating system, the site of mutation and the engine of desire. *Acta Paediatrica*, **86**(S422), 3–7.
- Simon, C., Buckley, T. R., Frati, F., Stewart, J. B., & Beckenbach, A. T. (2006). Incorporating molecular evolution into phylogenetic analysis, and a new compilation of conserved polymerase chain reaction primers for animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **37**(1), 545–579.
- Sinkler, C. A., Kalpage, H., Shay, J., Lee, I., Malek, M. H., Grossman, L. I., & Hüttemann, M. (2017). Tissue- and condition-specific isoforms of mammalian cytochrome c oxidase subunits: from function to human disease. *Oxidative medicine and cellular longevity*, **1**, 1534056.
- Sissler, M., González-Serrano, L. E., & Westhof, E. (2017). Recent advances in mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases and disease. *Trends in molecular medicine*, **23**(8), 693–708.
- Smiraglia, D. J., Kulawiec, M., Bistulfi, G. L., Gupta, S. G., & Singh, K. K. (2008). A novel role for mitochondria in regulating epigenetic modification in the nucleus. *Cancer Biology and Therapy*, **7**(8), 1182–1190.
- Smith, C. N. (1963). Prospects for vector control through sterilization procedures. *Bulletin of the World Health Organization*, **29**, 99.
- Smith, D. R., & Keeling, P. J. (2015). Mitochondrial and plastid genome architecture: reoccurring themes, but significant differences at the extremes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(33), 10177–10184.
- Smith, S. R. T., & Connallon, T. (2017). The contribution of the mitochondrial genome to sex-specific fitness variance. *Evolution*, **71**(5), 1417–1424.
- Smith, S., Turbill, C., & Suchentrunk, F. (2010). Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Molecular ecology*, **19**(1), 36–43.

Speijer, D., Manjeri, G. R., & Szklarczyk, R. (2014). How to deal with oxygen radicals stemming from mitochondrial fatty acid oxidation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **369**(1646), 20130446.

Stewart, J. B., Freyer, C., Elson, J. L., & Larsson, N. G. (2008). Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. *Nature Reviews Genetics*, **9**(9), 657–662.

Stier, A., Bize, P., Roussel, D., Schull, Q., Massemin, S., & Criscuolo, F. (2014). Mitochondrial uncoupling as a regulator of life-history trajectories in birds: An experimental study in the zebra finch. *Journal of Experimental Biology*, **217**(19), 3579–3589.

Stojković, B., & Đorđević, M. (2017). Interaction between mitochondrial and nuclear genomes: the role in life-history evolution. *Biologia Serbica*, **39**(1), 32–40.

Stojković, B., Jovanović, D. Š., Perovanović, J., & Tucić, N. (2011). Sexual activity and reproductive isolation between age-specific selected populations of seed beetle. *Ethology*, **117**(9), 812–821.

Stojković, B., Sayadi, A., Đorđević, M., Jović, J., Savković, U., & Arnqvist, G. (2017). Divergent evolution of life span associated with mitochondrial DNA evolution. *Evolution*, **71**(1), 160–166.

Stroud, D. A., Surgenor, E. E., Formosa, L. E., Reljic, B., Frazier, A. E., Dibley, M. G., Osellame, L. D., Stait, T., Beilharz, T. H., Thorburn, D. R., Salim, A., & Ryan, M. T. (2016). Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I. *Nature*, **538**(7623), 123–126.

Suckling, D. M., Barrington, A. M., Chhagan, A., Stephens, A. E. A., Burnip, G. M., Charles, J. G., & Wee, S. L. (2007). Eradication of the Australian painted apple moth *Teia anartoides* in New Zealand: trapping, inherited sterility, and male competitiveness. U *Area-wide control of insect pests: from research to field implementation*, 603–615. Dordrecht: Springer Netherlands.

Sunnucks, P. (2000). Efficient genetic markers for population biology. *Trends in ecology & evolution*, **15**(5), 199–203.

Sunnucks, P., Morales, H. E., Lamb, A. M., Pavlova, A., & Greening, C. (2017). Integrative approaches for studying mitochondrial and nuclear genome co-evolution in oxidative phosphorylation. *Frontiers in Genetics*, **8**, 25.

Šešlija, D., Lazarević, J., Janković, B., & Tucić, N. (2009b). Mating behavior in the seed beetle *Acanthoscelides obtectus* selected for early and late reproduction. *Behavioral Ecology*, **20**(3), 547–552.

Šešlija, D., Stojković, B., Tucić, B., & Tucić, N. (2009a). Egg-dumping behaviour in the seed beetle *Acanthoscelides obtectus* (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae) selected for early and late reproduction. *European Journal of Entomology*, **106**(4), 557–563.

Tabashnik, B. E., Sisterson, M. S., Ellsworth, P. C., Dennehy, T. J., Antilla, L., Liesner, L., Whitlow M., Staten R. T., Fabrick J. A., Unnithan G. C., Yelich A. J., Ellers-Kirk C., Harpold V. S., Li X., & Carrière, Y. (2010). Suppressing resistance to Bt cotton with sterile insect releases. *Nature biotechnology*, **28**(12), 1304–1307.

Tajima, F., & Nei, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Molecular biology and evolution*, **1**(3), 269–285.

Tamura, K. (1992). Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G+ C-content biases. *Molecular biology and evolution*, **9**(4), 678–687.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular biology and evolution*, **28**(10), 2731–2739.

Teem, J. L., Alphey, L., Descamps, S., Edgington, M. P., Edwards, O., Gemmell, N., Harvey-Samuel, T., Melnick, R. L., Oh, K. P., Piaggio, A. J., Saah, J. R., Schill, D., Thomas, P., Smith, T., & Roberts, A. (2020). Genetic biocontrol for invasive species. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, **8**, 452.

- Templeton, A. R., Crandall, K. A., & Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**(2), 619-633.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, **22**(22), 4673-4680.
- Thoral, E., García-Díaz, C. C., Persson, E., Chamkha, I., Elmér, E., Ruuskanen, S., & Nord, A. (2024). The relationship between mitochondrial respiration, resting metabolic rate and blood cell count in great tits. *Biology Open*, **13**(3), bio060302.
- Tosti, E., & Ménéz, Y. (2016). Gamete activation: Basic knowledge and clinical applications. *Human Reproduction Update*, **22**(4), 420–439.
- Touzet, P., & Budar, F. (2004). Unveiling the molecular arms race between two conflicting genomes in cytoplasmic male sterility? *Trends in plant science*, **9**(12), 568-570.
- Towarnicki, S. G., & Ballard, J. W. O. (2018). Mitotype interacts with diet to influence longevity, fitness, and mitochondrial functions in adult female drosophila. *Frontiers in genetics*, **9**, 593.
- Trifunović, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly-Y M., Gidlöf S., Oldfors A., Wibom R., Törnell J., Jacobs H. T., & Larsson, N. G. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, **429**(6990), 417-423.
- Tucić, N., Gliksman, I., Šešlija, D., Milanović, D., Mikuljanac, S., & Stojković, O. (1996). Laboratory evolution of longevity in the bean weevil (*Acanthoscelides obtectus*). *Journal of Evolutionary Biology*, **9**(4), 485-503.
- Ueno, T., & Takahashi, Y. (2021). Mitochondrial polymorphism shapes intrapopulation behavioural variation in wild *Drosophila*. *Biology Letters*, **17**(7), 20210194.
- Unckless, R. L., & Herren, J. K. (2009). Population genetics of sexually antagonistic mitochondrial mutants under inbreeding. *Journal of Theoretical Biology*, **260**(1), 132–136.
- Vakifahmetoglu-Norberg, H., Ouchida, A. T., & Norberg, E. (2017). The role of mitochondria in metabolism and cell death. *Biochemical and biophysical research communications*, **482**(3), 426-431.
- Van, V. (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary theory*, **1**, 1.
- Vargas-Terán, M., Spradbery J. P., Hofmann, H.C., & Tweddle, N.E. (2021) Impact of screwworm eradication programmes using the sterile insect technique. In *Sterile insect technique*, 949-978. CRC Press.
- Vaught, R. C., & Dowling, D. K. (2018). Maternal inheritance of mitochondria: implications for male fertility? *Reproduction*, **155**(4), R159-R168.
- Vlajnić, L., Savković, U., Jović, J., Budečević, S., Stojković, B., & Đorđević, M. (2024). Toward the development of the Trojan Female Technique in pest insects: male-specific influence of mitochondrial haplotype on reproductive output in the seed beetle *Acanthoscelides obtectus*. *Evolutionary applications*, **17**(12), e70065.
- Vlajnić, L., Vukajlović, F., Budečević, S., Savković, U., Stojković, B., & Đorđević, M. (2025). Implications of mitonuclear interactions for the Trojan Female Technique in pest biocontrol: A case study on the seed beetle *Acanthoscelides obtectus*. *Journal of Stored Products Research*, **112**, 102595.
- Vyas, S., Zaganjor, E., & Haigis, M. C. (2016). Mitochondria and cancer. *Cell*, **166**(3), 555-566.
- Wade, M. J. (2014). Paradox of mother's curse and the maternally provisioned offspring microbiome. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **6**(10), a017541.
- Wade, M. J., & Brandvain, Y. (2009). Reversing mother's curse: Selection on male mitochondrial fitness effects. *Evolution*, **63**(4), 1084–1089.
- Wade, M. J., & Drown, D. M. (2016). Nuclear–mitochondrial epistasis: a gene's eye view of genomic conflict. *Ecology and Evolution*, **6**(18), 6460–6472.

- Wallace, D. C., & Fan, W. (2010). Energetics, epigenetics, mitochondrial genetics. *Mitochondrion*, **10**(1), 12-31.
- Warmke, H.E. and Lee, S-L. J. (1977) Mitochondrial degeneration in Texas cytoplasmic male-sterile corn anthers. *Journal of Heredity*, **68**(4), 213–222.
- Watson, E. T., Flanagan, B. A., Pascari, J. A., & Edmands, S. (2022). Mitochondrial effects on fertility and longevity in *Tigriopus californicus* contradict predictions of the mother's curse hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B*, **289**(1987), 20221211.
- Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, **6**(10), 741-751.
- Willett, C. S., & Burton, R. S. (2003). Environmental influences on epistatic interactions: viabilities of cytochrome c genotypes in interpopulation crosses. *Evolution*, **57**(10), 2286-2292.
- Wisnovsky, S., Lei, E. K., Jean, S. R., & Kelley, S. O. (2016). Mitochondrial chemical biology: new probes elucidate the secrets of the powerhouse of the cell. *Cell chemical biology*, **23**(8), 917-927.
- Wolff, J. N., & Gemmell, N. J. (2013). Mitochondria, maternal inheritance, and asymmetric fitness: Why males die younger. *BioEssays*, **35**(2), 93–99.
- Wolff, J. N., Ladoukakis, E. D., Enríquez, J. A., & Dowling, D. K. (2014). Mitonuclear interactions: evolutionary consequences over multiple biological scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **369**(1646), 20130443.
- Wolff, J. N., Pichaud, N., Camus, M. F., Côté, G., Blier, P. U., & Dowling, D. K. (2016b). Evolutionary implications of mitochondrial genetic variation: Mitochondrial genetic effects on OXPHOS respiration and mitochondrial quantity change with age and sex in fruit flies. *Journal of Evolutionary Biology*, **29**(4), 736–747.
- Wolff, J. N., Tompkins, D. M., Gemmell, N. J., & Dowling, D. K. (2016a). Mitonuclear interactions, mtDNA-mediated thermal plasticity and implications for the Trojan Female Technique for pest control. *Scientific reports*, **6**(1), 30016.
- Wu, Z., Cuthbert, J. M., Taylor, D. R., & Sloan, D. B. (2015). The massive mitochondrial genome of the angiosperm *Silene noctiflora* is evolving by gain or loss of entire chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **112**(33), 10185-10191.
- Xu, H., DeLuca, S. Z., & O'Farrell, P. H. (2008). Manipulating the metazoan mitochondrial genome with targeted restriction enzymes. *Science*, **321**(5888), 575-577.
- Xu, J., & Wang, Q. (2011). Seminal fluid reduces female longevity and stimulates egg production and sperm trigger oviposition in a moth. *Journal of Insect Physiology*, **57**(3), 385–390.
- Yee, W. K., Sutton, K. L., & Dowling, D. K. (2013). In vivo male fertility is affected by naturally occurring mitochondrial haplotypes. *Current Biology*, **23**(2), R55-R56.
- Yun, J., & Finkel, T. (2014). Mitohormesis. *Cell metabolism*, **19**(5), 757-766.
- Zeh, J. A., Newcomer, S. D., & Zeh, D. W. (1998). Polyandrous females discriminate against previous mates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(23), 13732-13736.
- Zhang, D., Lees, R. S., Xi, Z., Bourtzis, K., & Gilles, J. R. (2016). Combining the sterile insect technique with the incompatible insect technique: III-robust mating competitiveness of irradiated triple *Wolbachia*-infected *Aedes albopictus* males under semi-field conditions. *PloS one*, **11**(3), e0151864.
- Zhang, H., Guillaume, F., & Engelstädter, J. (2012). The dynamics of mitochondrial mutations causing male infertility in spatially structured populations. *Evolution*, **66**(10), 3179–3188.
- Zhu, C. T., Ingelmo, P., & Rand, D. M. (2014). G×G×E for lifespan in *Drosophila*: mitochondrial, nuclear, and dietary interactions that modify longevity. *PLoS genetics*, **10**(5), e1004354.

10. PRILOZI

Tabela S1. Opis lokaliteta sa kog su uzorkovane jedinke sa naznačenom godinom uzorkovanja, veličinom uzorka kome je izvršena genotipizacija *cox1* barkoding regiona i brojnošću pronađenih mitotipova. Brojevi u prvoj koloni odgovaraju brojevima sa Slike 3.2.1. KiM – Kosovo i Metohija; BiH – Bosna i Hercegovina.

	Lokalitet	Region	Okrug	Godina	Uzorak	Mitotip (brojnost)
1	Požarevac	istočna Srbija	Braničevski	2021.	32	H3 (6), H4 (6), H5 (5), H6 (1), H7 (14)
2	Dubravica			2021.	6	H3 (3), H4 (2), H7 (1)
3	Golubac			2022.	6	H7 (6)
4	Ševica			2022.	6	H7 (6)
5	Mali Jasenovac		Zaječarski	2020.	6	H3 (3), H7 (3)
6	Karbulovo	južna Srbija	Borski	2022.	6	H3 (5), H7 (1)
7	Čapljina		Nišavski	2021.	6	H3 (1), H7 (5)
8	Bela Palanka		Pirotski	2021.	6	H7 (4), H9 (2)
9	Čukovac		Pčinjski	2021.	6	H3 (5), H7 (1)
10	Trebešnje			2021.	4	H3 (1), H7 (3)
11	Arandelovac	centralna Srbija	Šumadijski	2021.	6	H3 (2), H7 (4)
12	Lunjevica		Moravički	2021.	6	H3 (3), H4 (1), H7 (2)
13	Donji Branetići		Moravički	2022.	6	H3 (1), H4 (3), H7 (2)
14	Vrčin		Beograd	2020.	6	H3 (4), H4 (1), H7 (1)
15	Igroš		Rasinski	2022.	6	H3 (6)
16	Srpska Crnja	severna Srbija	Srednjobanatski	2021.	6	H3 (4), H10 (2)
17	Banatsko Veliko Selo		Severnobanatski	2024.	6	H3 (1), H4 (3), H7 (2)
18	Sombor		Zapadnobački	2021.	6	H6 (6)
19	Pivnice		Južnobački	2024.	3	H3 (2), H4 (1)
20	Đurđevo			2024.	5	H7 (5)
21	Kremna	zapadna Srbija	Zlatiborski	2024.	6	H3 (6)
22	Borak			2024.	6	H3 (5), H7 (1)
23	Sirogojno			2024.	6	H3 (6)
24	Kokin Brod			2021.	6	H3 (5), H7 (1)
25	Tekeriš		Mačvanski	2022.	6	H3 (6)
26	Mačvanski Prčinović			2022.	6	H7 (6)
27	Matijevac			2022.	6	H3 (2), H7 (1), H13 (3)
28	Ravnje		Sremski	2021.	6	H3 (6)
29	Bogutovačka banja		Raški	2021.	6	H3 (2), H12 (4)
30	Lička Jasenica	Hrvatska	Karlovačka županija	2021.	6	H10 (6)
31	Zubin Potok	KiM	Kosovskomitrovački	2021.	6	H1 (1), H3 (1), H7 (3), H11 (1)
32	Trebinje	BiH	Republika Srpska	2022.	6	H7 (3), H11 (3)

Tabela S2. Rezultati vrednosti parnih F_{ST} indeksa za mađupopulaciona poređenja dobijenih na osnovu analize varijabilnosti *cox1* gena. Statistički značajne vrednosti su podebljane. 1 – Požarevac; 2 – Dubravica; 3 – Golubac; 4 – Ševica; 5 – Mali Jasenovac; 6 – Karbulovo; 7 – Čapljinac; 8 – Bela Palanka; 9 – Čukovac; 10 – Trebešinje; 11 – Arandelovac; 12 – Lunjevica; 13 – Donji Branetići; 14 – Vrčin; 15 – Igroš; 16 – Srpska Crnja; 17 – Banatsko Veliko Selo; 18 – Sombor; 19 – Pivnice; 20 – Đurđevo; 21 – Kremna; 22 – Borak; 23 – Sirogojno; 24 – Kokin Brod; 25 – Tekeriš; 26 – Mačvanski Prčinović; 27 – Matijevac; 28 – Ravnje; 29 – Bogutovačka banja; 30 – Lička Jasenica; 31 – Zubin Potok; 32 – Trebinje.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1																																
2	0,014																															
3	0,284	0,704																														
4	0,284	0,704	0,000																													
5	-0,069	0,035	0,400	0,400																												
6	0,076	-0,063	0,800	0,800	0,067																											
7	0,118	0,445	-0,000	-0,000	0,067	0,538																										
8	0,052	0,239	0,200	0,200	0,021	0,383	-0,019																									
9	0,076	-0,063	0,800	0,800	0,067	-0,200	0,538	0,383																								
10	0,004	0,291	0,111	0,111	-0,108	0,394	-0,236	-0,113	0,394																							
11	-0,011	0,217	0,200	0,200	-0,133	0,291	-0,114	-0,056	0,291	-0,242																						
12	-0,071	-0,132	0,540	0,540	-0,137	-0,065	0,239	0,090	-0,065	0,062	0,008																					
13	-0,031	-0,083	0,540	0,540	-0,011	0,148	0,265	0,028	0,148	0,111	0,079	-0,104																				
14	0,030	-0,167	0,736	0,736	0,025	-0,160	0,473	0,296	-0,160	0,318	0,232	-0,129	0,012																			
15	0,238	0,178	1,000	1,000	0,400	-0,000	0,800	0,631	-0,000	0,736	0,600	0,233	0,425	0,057																		
16	0,189	0,036	0,893	0,893	0,282	0,016	0,680	0,508	0,016	0,578	0,475	0,114	0,256	-0,014	0,200																	
17	-0,031	-0,083	0,540	0,540	-0,011	0,148	0,265	0,028	0,148	0,111	0,079	-0,104	-0,200	0,012	0,425	0,256																
18	0,483	0,648	1,000	1,000	0,667	0,706	0,865	0,747	0,706	0,831	0,750	0,617	0,671	0,653	1,000	0,800	0,671															
19	0,084	-0,227	0,921	0,921	0,167	-0,100	0,636	0,385	-0,100	0,489	0,385	-0,059	0,030	-0,218	0,250	-0,059	0,030	0,848														
20	0,268	0,678	0,000	0,000	0,362	0,781	-0,034	0,161	0,781	0,062	0,161	0,506	0,506	0,712	1,000	0,882	0,506	1,000	0,909													
21	0,238	0,178	1,000	1,000	0,400	-0,000	0,800	0,631	-0,000	0,736	0,600	0,233	0,425	0,057	0,000	0,200	0,425	1,000	0,250	1,000												
22	0,076	-0,063	0,800	0,800	0,067	0,200	0,538	0,383	-0,200	0,394	0,291	-0,065	0,148	-0,160	-0,000	0,016	0,148	0,706	-0,100	0,781	-0,000											
23	0,238	0,178	1,000	1,000	0,400	-0,000	0,800	0,631	-0,000	0,736	0,600	0,233	0,425	0,057	0,000	0,200	0,425	1,000	0,250	1,000	0,000	-0,000										
24	0,076	0,063	0,800	0,800	0,067	-0,200	0,538	0,383	-0,200	0,394	0,291	-0,065	0,148	-0,160	-0,000	0,016	0,148	0,706	-0,100	0,781	-0,000	-0,200	-0,000									
25	0,238	0,178	1,000	1,000	0,400	-0,000	0,800	0,631	-0,000	0,736	0,600	0,233	0,425	0,057	0,000	0,200	0,425	1,000	0,250	1,000	0,000	-0,000	0,000	-0,000								
26	0,284	0,704	0,000	0,000	0,400	0,800	-0,000	0,200	0,800	0,111	0,200	0,540	0,540	0,736	1,000	0,893	0,540	1,000	0,921	0,000	1,000	0,800	1,000	0,800	1,000							
27	0,093	-0,060	0,671	0,671	0,133	0,131	0,447	0,238	0,131	0,308	0,263	-0,004	-0,041	0,012	0,343	0,191	-0,041	0,646	-0,059	0,644	0,343	0,131	0,343	0,131	0,343	0,131	0,343	0,671				
28	0,238	0,178	1,000	1,000	0,400	-0,000	0,800	0,631	-0,000	0,736	0,600	0,233	0,425	0,057	0,000	0,200	0,425	1,000	0,250	1,000	0,000	-0,000	0,000	-0,000	0,000	1,000	0,343					
28	0,192	0,328	0,378	0,378	0,122	0,385	0,176	0,157	0,385	0,069	0,100	0,195	0,235	0,341	0,600	0,509	0,235	0,720	0,411	0,339	0,600	0,385	0,600	0,385	0,600	0,378	0,349	0,600				
30	0,360	0,507	1,000	1,000	0,571	0,667	0,815	0,631	0,667	0,769	0,667	0,489	0,489	0,560	1,000	0,600	0,489	1,000	0,793	1,000	1,000	0,667	1,000	0,667	1,000	1,000	0,489	1,000	0,650			
31	-0,071	0,038	0,300	0,300	-0,122	0,162	0,028	-0,076	0,162	-0,116	-0,108	-0,093	-0,093	0,079	0,440	0,303	-0,093	0,650	0,158	0,261	0,440	0,162	0,440	0,162	0,440	0,300	0,087	0,440	0,116	0,491		
32	0,043	0,180	0,400	0,400	0,000	0,300	0,125	0,021	0,300	-0,000	-0,000	0,042	0,042	0,220	0,571	0,419	0,042	0,727	0,318	0,362	0,571	0,300	0,571	0,300	0,571	0,400	0,209	0,571	0,192	0,571	-0,122	

Tabela S3. Rezultati vrednosti parnih F_{ST} indeksa za međupopulaciona poređenja dobijenih na osnovu analize varijabilnosti šest mikrosatelitskih lokusa. Statistički značajne vrednosti su podebljane. 1 – Požarevac; 2 – Dubravica; 3 – Golubac; 4 – Ševica; 5 – Mali Jasenovac; 6 – Karbulovo; 7 – Čapljinac; 8 – Bela Palanka; 9 – Čukovac; 10 – Trebešinje; 11 – Arandelovac; 12 – Lunjevica; 13 – Donji Branetići; 14 – Vrčin; 15 – Igroš; 16 – Srpska Crnja; 17 – Banatsko Veliko Selo; 18 – Sombor; 19 – Pivnice; 20 – Đurđevo; 21 – Kremna; 22 – Borak; 23 – Sirogojno; 24 – Kokin Brod; 25 – Tekeriš; 26 – Mačvanski Prčinović; 27 – Matijevac; 28 – Ravnje; 29 – Bogutovačka banja; 30 – Lička Jasenica; 31 – Zubin Potok; 32 – Trebinje.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
1																																
2	0,101																															
3	-0,005	0,036																														
4	0,122	0,033	0,046																													
5	0,118	0,091	0,085	0,132																												
6	0,160	0,120	0,146	0,171	0,205																											
7	0,116	0,083	0,094	0,098	-0,012	0,188																										
8	0,107	0,070	0,091	0,089	0,133	0,163	0,105																									
9	0,063	0,054	0,020	0,065	0,059	0,107	0,096	0,024																								
10	0,047	0,100	0,034	0,117	0,149	0,197	0,099	0,133	0,147																							
11	0,122	0,180	0,106	0,171	0,086	0,151	0,094	0,069	0,028	0,148																						
12	0,062	0,040	0,008	0,018	0,041	0,128	0,027	0,020	0,001	0,023	0,018																					
13	0,059	0,185	0,068	0,168	0,133	0,202	0,138	0,068	0,026	0,115	0,022	0,029																				
14	0,072	0,148	0,074	0,126	0,033	0,180	0,059	0,069	0,044	0,132	0,031	0,025	0,049																			
15	0,028	0,134	0,039	0,114	0,206	0,185	0,201	0,162	0,100	0,137	0,212	0,100	0,152	0,196																		
16	0,000	0,059	-0,022	0,084	0,085	0,101	0,104	0,090	0,026	0,031	0,067	0,009	0,066	0,094	0,039																	
17	0,091	0,147	0,107	0,196	0,132	0,200	0,127	0,131	0,130	0,141	0,172	0,107	0,153	0,109	0,152	0,075																
18	0,314	0,283	0,332	0,408	0,213	0,336	0,195	0,279	0,276	0,362	0,295	0,253	0,334	0,248	0,399	0,276	0,262															
19	0,099	0,119	0,116	0,156	0,065	0,246	0,083	0,158	0,125	0,158	0,197	0,081	0,195	0,090	0,157	0,102	0,087	0,268														
20	0,144	0,156	0,157	0,224	0,181	0,231	0,202	0,235	0,192	0,255	0,286	0,190	0,300	0,230	0,198	0,129	0,172	0,397	0,124													
21	0,369	0,237	0,282	0,254	0,313	0,390	0,265	0,276	0,335	0,247	0,345	0,174	0,390	0,284	0,433	0,282	0,334	0,453	0,326	0,423												
22	0,103	0,143	0,123	0,180	0,198	0,200	0,137	0,142	0,166	0,083	0,205	0,097	0,165	0,167	0,152	0,137	0,134	0,363	0,172	0,306	0,353											
23	0,082	0,033	0,017	-0,031	0,075	0,139	0,087	0,134	0,028	0,126	0,150	0,020	0,134	0,105	0,091	0,037	0,169	0,367	0,123	0,154	0,306	0,203										
24	0,070	0,149	0,100	0,162	0,123	0,088	0,125	0,111	0,051	0,120	0,038	0,053	0,066	0,103	0,143	0,061	0,183	0,323	0,158	0,221	0,374	0,156	0,133									
25	0,036	0,136	0,034	0,111	0,079	0,206	0,099	0,033	0,002	0,115	0,018	0,024	0,024	0,018	0,128	0,035	0,123	0,341	0,129	0,239	0,347	0,165	0,105	0,081								
26	0,129	0,199	0,103	0,230	0,154	0,283	0,186	0,215	0,163	0,175	0,247	0,173	0,209	0,162	0,190	0,142	0,167	0,348	0,212	0,302	0,425	0,165	0,204	0,238	0,141							
27	0,134	0,057	0,055	0,072	0,048	0,215	0,055	0,102	0,051	0,122	0,114	0,028	0,160	0,099	0,179	0,093	0,170	0,329	0,132	0,209	0,279	0,211	0,074	0,165	0,106	0,212						
28	0,053	0,027	0,043	0,070	0,061	0,179	0,073	0,089	0,058	0,074	0,143	0,019	0,129	0,094	0,116	0,066	0,141	0,292	0,091	0,198	0,315	0,114	0,067	0,141	0,110	0,153	0,029					
28	0,036	0,049	0,055	0,089	0,136	0,154	0,120	0,134	0,091	0,092	0,213	0,083	0,147	0,128	0,111	0,070	0,146	0,297	0,137	0,209	0,354	0,182	0,049	0,169	0,149	0,202	0,122	0,054				
30	0,376	0,250	0,325	0,348	0,416	0,309	0,385	0,321	0,348	0,348	0,411	0,267	0,426	0,418	0,379	0,253	0,349	0,479	0,382	0,353	0,381	0,396	0,322	0,372	0,444	0,507	0,394	0,361	0,358			
31	-0,004	0,017	-0,021	0,024	0,050	0,094	0,051	0,022	-0,005	0,053	0,078	-0,027	0,027	0,037	0,033	-0,018	0,039	0,258	0,049	0,093	0,266	0,067	-0,003	0,071	0,032	0,127	0,062	0,007	0,033	0,256		
32	0,170	0,259	0,191	0,294	0,164	0,264	0,176	0,116	0,103	0,278	0,108	0,153	0,094	0,076	0,263	0,185	0,163	0,311	0,219	0,309	0,489	0,239	0,251	0,195	0,130	0,280	0,214	0,209	0,243	0,474	0,117	

BIOGRAFIJA AUTORA

Lea Vlajnić rođena je u Beogradu 21.8.1995. godine. Po završenoj osnovnoj školi upisuje Četvrtu gimnaziju u Beogradu, prirodno-matematički smer. Školske 2014/2015 upisuje osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Biologija, modul Molekularna biologija i fiziologija, koje završava 2018. godine sa prosekom 9,9. Nakon toga, školske 2018/2019 godine upisuje master akademske studije na studijskom programu Biologija, modul Primenjena genetika. Pod mentorstvom dr Mirka Đorđevića i prof. dr Biljane Stojković brani master rad pod nazivom „Uticaj mitohondrijskih haplotipova na reproduktivni potencijal ženki i mužjaka pasuljevog žiška *Acanthoscelides obtectus*“ i završava master studije sa prosečnom ocenom 9,83. Odmah nakon toga upisuje doktorske studije na istom fakultetu, studijski program Biologija, modul Evoluciona biologija, školske 2019/2020 godine.

10.5.2019. godine, odlukom donesenoj na VII redovnoj sednici Izbornog veća, Lea se zaposlila na Katedri za genetiku i evoluciju Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu kao saradnik u nastavi. Na IV redovnoj sednici Izbornog veća održanoj 24.1.2020. godine veća izabrana je u zvanje asistenta u koje je reizabrana na II redovnoj sednici Izbornog veća 16.11.2022.

Lea je učestvovala u realizaciji projekta „*Experimental evolution approach in developing insect pest control methods – ELEVATE*“ programa Ideje Fonda za nauku i projekta građanske nauke „Opasulji se“ finansiranog od strane Centra za promociju nauke.

Lea je rezultate svojih dosadašnjih istraživanja iz oblasti eksperimentalne evolucije i evolucije mito-jedarnih interakcija objavila u šest naučnih radova u časopisima od međunarodnog značaja, kao i u 12 saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja, štampanih u celini ili izvodu. Dodatno, Lea je autor i jednog autorskog kataloga za izložbu i udžbenika biologije za četvrti razred gimnazije prirodno-matematičkog smera.

Изјава о ауторству

Потписана Леа Влајнић
број индекса Б3001/2019

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Еволуција мито-једарних интеракција: „материнска клетва“ и „техника тројанских
женки“ у регулисању бројности популација пасуљевог жишка (*Acanthoscelides obtectus*,
Say)**

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Леа Влајнић

Број индекса: Б3001/2019

Студијски програм: Биологија

Наслов рада: Еволуција мито-једарних интеракција: „материнска клетва“ и „техника тројанских женки“ у регулисању бројности популација пасуљевог жишка (*Acanthoscelides obtectus*, Say)

Ментори: др Мирко Ђорђевић и проф. др Биљана Стојковић

Потписана: Леа Влајнић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Еволуција мито-једарних интеракција: „материнска клетва“ и „техника тројанских женки“ у регулисању бројности популација пасуљевог жишка (*Acanthoscelides obtectus*, Say)

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавање 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. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање 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. Дозвољавање 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.