

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Marija N. Savić Veselinović

**UTICAJ INDUKOVANE MUTAGENEZE NA
REPRODUKTIVNO PONAŠANJE *Drosophila*
subobscura I ULOGA SEKSUALNE SELEKCIJE U
ODNOSU NA OBIM GENETIČKIH OPTEREĆENJA**

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Marija N. Savić Veselinović

**THE INFLUENCE OF INDUCED MUTAGENESIS ON
REPRODUCTIVE BEHAVIOR OF *Drosophila*
subobscura AND THE ROLE OF SEXUAL
SELECTION IN RELATION TO THE LEVEL OF
MUTATIONAL LOAD**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

MENTORI:

akademik Marko Anđelković,

redovni profesor Biološkog fakulteta

naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Univerzitet u Beogradu

dr Sofija Pavković-Lučić

docent Biološkog fakulteta

Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Marina Stamenković-Radak

vanredni profesor Biološkog fakulteta

naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Univerzitet u Beogradu

dr Zorana Kurbalija Novičić

naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Univerzitet u Beogradu

datum odbrane:

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je urađen u Odeljenju za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, u okviru projekata osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (143014, 173012).

Veliku zahvalnost dugujem svim članovima komisije:

akademiku Marku Anđelkoviću na ukazanom poverenju i prilici da učestvujem kako u nastavnom, tako i u naučnom delu njegovog tima. Hvala na idejama, prenetom znanju, strpljenju i izdvojenom vremenu da se ova disertacija realizuje.

doc dr. Sofiji Pavković-Lučić na sugestijama, podršci i podsticajima pomoći prilikom pisanja disertacije, na proširenju pogleda o seksualnoj selekciji.

prof. dr Marini Stamenković-Radak na poverenju da realizujem nastavne aktivnosti, na efikasnosti i korisnim sugestijama koje su doprinele kvalitetu ove disertacije.

Dr Zorani Kurbalija Novičić na velikoj podršci tokom izrade ove disertacije. Hvala za izdvojene vreme za svaku moju nedoumicu i problem, na nesebičnosti, na efikasnosti i verovanju u mene. Hvala na velikom prijateljstvu.

Zahvaljujem se kolegama iz Instituta za nuklearne nauke “Vinča” i Laboratoriji za zaštitu od zračenja i zaštitu životne sredine što su mi omogućili ozračivanje mušica.

Veliku zahvalnost dugujem dr Mihailu Jeliću na pomoći u realizaciji ove disertacije. Na zajedničkom radu u nastavi i naučnim istraživanjima, na pokazivanju sveta molekularne, na strpljenju i prijateljskim savetima.

Hvala Aleksandri Patenković za pozitivnu energiju, optimizam i podršku, Mariji Tanasković na podršci i pomoći pogotovo za rad vikendom, dr Bojanu Kenigu za pomoć kad god je zatrebalo. Dr Katarini Zeljić i Ljupki Filipović za podršku kad mi je trebalo. Tamari Karan za prijateljstvo i bodrenje. Ivani Bukvić na podršci i hiljadama skuvanih flakona i dr Tatjani Savić na obezbeđenim laboratorijskim uslovima. Hvala kolegama dr Vladimiru Jovanoviću i dr Tanji Adnađević što su uvek tu.

Zahvaljujem se svim prijateljima, kumovima i članovima porodice koji su tu za mene, i što su uvek imali razumevanje za svaku fazu mog rada.

Zahvaljujem se tati, mami, Radi i Slavku što su uvek bili tu za mene i što su uvek verovali u mene. Posebnu zahvalnost dugujem Nikoli i Bogdanu na strpljenju, razumevanju, motivaciji i ljubavi. Ova disertacija je za sve njih.

Uticaj indukovane mutageneze na reproduktivno ponašanje *Drosophila subobscura* i uloga seksualne selekcije u odnosu na obim genetičkih opterećenja

Rezime

Prema teorijskim očekivanjima seksualna selekcija može smanjivati mutaciona opterećenja u populacijama. Mužjaci koji su boljeg genetičkog kvaliteta bi trebalo da budu uspešniji u parenju u poređenju sa mužjacima lošijeg genetičkog kvaliteta. Na taj način ženke, prilikom izbora partnera za parenje, mogu da eliminišu one mužjake koji nose štetne alele, i da smanje mogućnost prenošenja štetnih alela u sledeću generaciju. Seksualna selekcija će redukovati mutaciona opterećenja i povećavati adaptivnu vrednost populacije, ako je većina mutacija štetna i za adaptivnu vrednost i za osobine koje utiču na uspešnost mužjaka u parenju.

Istraživanja poslednjih godina su dala rezultate koji idu u prilog ovoj teoriji, ali i oprečne rezultate. Ovakva kontradiktornost proizilazi iz kompleksnosti problematike usled različitih reproduktivnih strategija vrsta, kao i različitih reproduktivnih strategija mužjaka i ženki. Takođe, osobine koje utiču na komponente adaptivne vrednosti, kao i na uspešnost u parenju, su veoma složene, pod determinacijom velikog broja gena, i u čijoj osnovi leže kompleksne genske interakcije.

Iako se kao osobine koje su cilj seksualne selekcije najčešće analiziraju sekundarne polne karakteristike, i mnoge druge osobine određuju atraktivnost mužjaka. To su i morfološke, fiziološke, ponašajne i druge osobine koje utiču na uspešnost u parenju, a mogu se nazvati osobinama koje su zavisne od opšteg stanja mužjaka (eng. *condition-dependent traits*).

U cilju provere hipoteze, da seksualna selekcija utiče na smanjenje mutacionih opterećenja, u ovom radu na vrsti *Drosophila subobscura*, od istog genetičkog pula su formirane dve eksperimentalne grupe koje su se razlikovale u nivou mutacionih opterećenja. U jednoj grupi su mutacije indukovane gama jonizujućim zračenjem, dozom od 30Gy. Efekat seksualne selekcije na redukciju mutacionih opterećenja je praćen preko različitih komponenti reproduktivnog ponašanja mužjaka (odigravanje udvaranja, latentca udvaranja, intenzitet udvaranja, odigravanje kopulacije, latentca kopulacije i trajanje kopulacije), sa ciljem da se ispita da li su nosioci mutacija manje uspešni u parenju. Dobijeni rezultati ukazuju da seksualna selekcija *D. subobscura* može da utiče na smanjivanje mutacionih genetičkih opterećenja preko uspešnosti u parenju mužjaka. Heterozigotni nosioci indukovanih mutacija su pokazali manju uspešnost u parenju, i kasniji početak udvaranja. Kako je uspešnost u parenju složena komponenta adaptivne vrednosti, determinisana velikim brojem gena, ona reflektuje veliki broj osobina koje su važne za reproduktivni uspeh mužjaka.

Postavljena hipoteza je proverena i analizom dve komponente adaptivne vrednosti: fekunditeta i preživljavanja od stadijuma jaja do adulta, u zavisnosti od nivoa mutacionih opterećenja, kao i primenjenog sistema parenja (bez mogućnosti izbora partnera i sa višestrukom mogućnošću izbora). Dobijeni rezultati ne mogu da potvrde ulogu seksualne selekcije u eliminaciji mutacionih opterećenja za obe komponente adaptivne vrednosti kod *D. subobscura*. Pozitivna uloga seksualne selekcije u eliminaciji štetnih alela je potvrđena samo za fekunditet, ali samo kad su indukovana mutaciona opterećenja. S obzirom da je za većinu eksperimentalnih grupa utvrđeno postojanje seksualnog konflikta, odnosno manje vrednosti fekunditeta kad ženke nisu imale mogućnost izbora, dobijeni rezultati ukazuju da potencijalni negativni efekti seksualnog konflikta mogu biti prevaziđeni u uslovima povećanog broja mutacija. Genetička struktura populacija, koja podrazumeva i veličinu mutacionih opterećenja, može biti važan faktor od koga će i zavisiti delovanje seksualne selekcije na adaptivnu vrednost.

Ključne reči: *Drosophila subobscura*, seksualna selekcija, mutacije, reproduktivno ponašanje, adaptivna vrednost

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK broj: [575.224.4+575.827]:[595.77:634.1.076](043.3)

The influence of induced mutagenesis on reproductive behavior of *Drosophila subobscura* and the role of sexual selection in relation to the level of mutational load

Summary

According to theoretical predictions sexual selection can reduce mutational load in populations. Males of good genetic quality should be more successful in matings, compared to the males of low genetic quality. In this way females, through the choice of mating partners, can eliminate males carriers of deleterious alleles, and reduce transmission of deleterious alleles to the next generation. Sexual selection will purge mutational load and increase fitness if most mutations were deleterious to both nonsexual fitness and condition-dependent traits affecting mating success.

Studies in recent years have yielded results that support this theory, but opposite results are obtained, as well. This contradiction arises from different reproductive strategies of species, and different reproductive strategies of males and females. Traits that affect fitness components, as well as mating success, are under polygenic determination, with very complex gene interactions.

Although secondary sexual traits were usually analyzed as target of sexual selection, many other traits can determine male attractiveness. Traits such as morphological, physiological, behavior and other, affecting mating success, can be termed as condition-dependent traits.

In order to test this hypothesis, that sexual selection can reduce mutational load, two experimental groups were formed from the same population genetic pool of *Drosophila subobscura*, which differed in the level of mutational load. Mutations were induced in one group, using 30Gy ionizing radiation. The effect of sexual selection in

reduction of mutational load was measured through different components of male mating behavior (courtship occurrence, courtship latency, courtship intensity, mating occurrence, latency to mating and duration of mating). The aim was to evaluate if mutation carriers were less successful in matings. Obtained results indicate that sexual selection can reduce mutational load via male mating success. Potential carriers of mutations were less successful in matings and courted later. As mating success is the complex fitness component, determined by a large number of genes, it reflects a large number of traits important to male reproductive success.

A hypothesis was tested through analysis of two fitness components : fecundity and egg-to-adult viability, depending on the level of mutational load, as well as applied mating system (no choice and multiple choice). The obtained results can not confirm the role of sexual selection in reducing mutational load for both measured fitness components. The positive role of sexual selection in reducing mutational load was confirmed only for fecundity, and only when mutational load was induced. Considering that sexual conflict was confirmed for the most of the experimental groups, i.e. less fecundity values when females had no choice, the obtained results suggest that potential negative effects of sexual conflict could be overcome in conditions of increased number of mutation. Genetic structure of population, including the range of mutational load, could be important factor affecting the action of sexual selection and overall fitness.

Key words: *Drosophila subobscura*, sexual selection, mutations, mating behavior, fitness

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Genetics

UDC number: [575.224.4+575.827]:[595.77:634.1.076](043.3)

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Seksualna selekcija.....	2
1.2. Preferenca ženke.....	9
1.3. Mutacije i njihov efekat na adaptivnu vrednost.....	11
1.4. Genetička opterećenja.....	14
1.5. Jonizujuće zračenje kao mutageni faktor.....	19
1.6. Seksualna selekcija i genetička opterećenja.....	23
1.7. Reproduktivno ponašanje i seksualna selekcija kod <i>Drosophila subobscura</i>	27
2. CILJEVI	29
3. MATERIJAL I METODE	31
3.1. <i>Drosophila subobscura</i>	32
3.2. Formiranje linija.....	33
3.3. Tretman mužjaka.....	34
3.4. Reproduktivno ponašanje <i>Drosophila subobscura</i>	35
3.5. Statistička analiza reproduktivnog ponašanja.....	37
3.7. Komponente adaptivne vrednosti i odnos polova.....	38
3.8. Statistička analiza komponenti adaptivne vrednosti i odnosa polova.....	41
4. REZULTATI	42
4.1. Reproduktivno ponašanje <i>Drosophila subobscura</i>	43

4.2. Komponente adaptivne vrednosti.....	52
4.2.1. Fekunditet.....	52
4.2.2. Preživljavanje od stadijuma jaja do adulta.....	59
4.3. Odnos polova.....	64
5. DISKUSIJA.....	68
5.1. Reproduktivno ponašanje <i>Drosophila subobscura</i>	69
5.2. Komponente adaptivne vrednosti i odnos polova.....	75
6. ZAKLJUČCI.....	85
7. LITERATURA.....	88

1. UVOD

1.1. Seksualna selekcija

Seksualna selekcija je jedan od kontroverznijih koncepata u evolucionoj biologiji, koji je poslednjih tridesetak godina dopunjen novim pretpostavkama i dokazima koji nadograđuju temelje koje je postavio Čarls Darwin.

Seksualna selekcija se najčešće definiše kao prednost u reprodukciji koju imaju neke jedinke u odnosu na druge jedinke istog pola (Darwin 1871). Ističu se dva osnovna mehanizma seksualne selekcije, a u zavisnosti od polova jedinki: 1) Inter-seksualna selekcija se odnosi na *izbor* partnera za parenje koji vrše jedinke jednog pola, među jedinkama suprotnog pola; 2) Intra-seksualna selekcija se odnosi na *kompeticiju* koja postoji među jedinkama istog pola radi postizanja uspeha u parenju. Prvo ubedljivo objašnjenje zašto se kompeticija i izbirljivost razlikuju među polovima je dao Bateman (1948), ističući da se seksualna selekcija odigrava primarno na mužjacima. Njegov eksperiment je pokazao da se neki mužjaci pare češće od drugih, pa je i varijansa u reproduktivnom uspehu veća kod mužjaka u odnosu na ženke. Reproductivni uspeh mužjaka zavisi od broja parenja tokom života, dok reproduktivni uspeh ženki zavisi od broja potomaka tokom života, što je ograničeno produkcijom jajnih ćelija. Objašnjenje razlika u reproduktivnom ponašanju ženskog i muškog pola je dopunio Trivers (1972), čime je koncipiran princip roditeljskog ulaganja. On nije obuhvatao samo razlike u veličini gameta, već i postzigotske razlike u ulaganju roditelja (npr. hranjenje mladunaca, odbrana od predatora). Ženke ulažu mnogo više u potomstvo od mužjaka, pa je kod većine vrsta ženski pol ograničavajući i zbog koga su mužjaci u kompeticiji.

Uprkos veoma velikoj raznovrsnosti u reproduktivnoj biologiji koja postoji unutar živog sveta, najčešće ženke biraju partnere pa su i "odgovorne" za inter-seksualnu selekciju. Sa druge strane, najčešće je kompeticija među mužjacima sinonim za intra-seksualnu selekciju. Iako su ovi vidovi selekcije potkrepljeni veoma brojnim eksperimentima (Andersson 1994), danas se zna da kod nekih vrsta postoji reverzna uloga polova, bar što se tiče ova dva tipa selekcije (Gwyne 1991, Amundsen i Forsgren

2001, Amundsen 2000, Bonduriansky 2001). Primeri ovakvog „odstupanja“ su uočeni kod nekih vrsta insekata, rakova, riba, vodozemaca i ptica (Clutton-Brock 1991; Eens i Pinxten 2000).

Iako je reverzija polova samo jedno, takoreći odstupanje od Darwinove teorije o seksualnoj selekciji, mnoga druga odstupanja i proširenja ove teorije su veoma aktuelna poslednjih dvadesetak godina (Clutton-Brock 2007; 2009; Jones i Ratterman 2009). Podele na različite modele seksualne selekcije su ukazale na složenost svakog od njih, kao i preplitanje, što danas vodi njihovoj sintezi. U osnovi problema leži velika biološka raznovrsnost vrsta i njihovih strategija za parenje, postojanje različitih sistema i tipova parenja, kao i korišćenje različitih eksperimentalnih pristupa i njihova pogrešna tumačenja. Poslednjih godina je fokus istraživanja usmeren na preference ženki i evoluciju preference, razlike u intenzitetu seksualne selekcije između polova, promenljivost preferenci ženki u zavisnosti od uslova sredine, kao i na seksualni konflikt (Kokko i sar. 2003; Clutton-Brock 2007; Jennions i Petrie 1997; Cotton i sar. 2006; Tregenza i sar. 2006a).

Izbor partnera za parenje je osobina koja kao i svaka druga evoluira, a pravac evolucije zavisi od genetičke varijabilnosti, odnosno od učestalosti alela, i intenziteta delovanja seksualne selekcije na osobinu. Njena “evolutivna putanja” zavisi i od indirektno selekcije koja se zasniva na genetički korelisanim osobinama. Kokko i sar. (2003) su definisali četiri glavne teorije koje objašnjavaju evoluciju izbora partnera za parenje. To su teorije o direktnoj dobiti, indirektnoj dobiti, senzornom vođenju i antagonističkoj koevoluciji.

Teorija direktnih dobiti objašnjava izbor partnera za parenje isključivo preko direktne selekcije. To znači da jedinka ima direktnu dobit od partnera, što se ogleda u povećanju njene adaptivne vrednosti. Razlike među jedinkama koje se biraju su jasno uočljive. U datim uslovima sredine će neke jedinke biti u mogućnosti da pruže više jedinkama suprotnog pola od drugih, pa će zbog toga biti birane. Najčešće se ovaj vid selekcije ogleda kod vrsta kod kojih postoji briga o potomstvu, ili igra udvaranja u

kojoj se se jedinkama suprotnog pola nudi neki vid nutritivne dobiti (Trivers 1972; Kirckpatrick i Ryan 1991; Price i sar. 1993). Očekuje se da je ovaj tip seksualne selekcije važniji kada je heritabilnost seksualno selekcionisanih osobina niska, i kada je varijansa adaptivne vrednosti potomstva posredovana efektima muškog roditelja (Kokko 1998). Ovom teorijom se ne dovodi u pitanje heritabilnost osobina i efekat izbora na genetičku strukturu potomstva. U njenoj osnovi nije kvalitet potomstva .

Teorija indirektnih dobiti je teorija oko koje se i danas vode velike polemike (Hine i sar. 2002; Brooks 2000). Kroz istoriju se razvio veći broj hipoteza u čijoj osnovi je pretpostavka da se izbor partnera za parenje vrši na osnovu nekog kriterijuma, a parenje sa tako odabranim partnerom će se posledično odraziti na kvalitet potomstva. Prvu hipotezu je dao Fisher (1930.) i to je tzv. hipoteza “nezadržive, samoubrzavajuće” selekcije (eng. *runaway selection*). Po njoj, ženka bira mužjake na osnovu njihove atraktivnosti, a kriterijum za atraktivnost je neka sekundarna polna osobina mužjaka i njena veličina, oblik, boja, simetrija neke morfološke osobine, feromoni, aktivnost, pesma mužjaka.... Na ovaj način se na potomstvo prenose geni i za preferencu ženki ka određenim fenotipovima, kao i geni za osobinu koja određuje atraktivnost mužjaka. Rezultat toga je gametska neravnoteža vezanosti (eng. *gametic linkage disequilibrium*) gena za preferencu ženki i gena za atraktivnost, što vodi indirektnoj selekciji preference ženki. Selekcija za povećanje osobine kod mužjaka se može odvijati sve do momenta kad će mužjaci sa ekstremnom osobinom imati slabije preživljavanje usled delovanja prirodne selekcije, pa će se i “nezadrživa” selekcija zaustaviti. Lande (1981) je dao i matematičku potvrdu ovog modela.

Sledeća hipoteza koja pripada teoriji indirektno dobiti, je hipoteza “dobrih gena” (Zahavi 1975). Po njoj je kriterijum za atraktivnost mužjaka u stvari njegova adaptivna vrednost (vijabilitet). Mužjaci koji su boljeg genetičkog kvaliteta imaju i bolju adaptivnu vrednost, a samim tim i izraženije osobine na osnovu kojih ih ženke biraju. Dakle, razlika u odnosu na Fišerov model je ta, što je u ovom slučaju osobina,

na osnovu koje se bira, indikator o adaptivnoj vrednosti mužjaka. Na taj način se potomstvu obezbeđuje veća ukupna adaptivna vrednost kroz različite komponente adaptivne vrednosti. Ovu hipotezu bi trebalo da potvrdi pozitivna genetička korelacija između osobine na osnovu koje se bira i preživljavanja potomstva. Kokko (2001) ukazuje da negativna genetička korelacija između atraktivnosti mužjaka i preživljavanja potomstva ne mora da opovrgne teoriju dobrih gena, ako parenje sa visoko kvalitetnim mužjacima rezultuje, u proseku, superiornošću osobina potomstva (u koje je uključen i uspešnost muških potomaka u parenju). Dihotomija koja se opisuje kroz ova dva modela možda nije realna. Nameće se pitanje: kako ti “dobri” geni utiču i na reproduktivno ulaganje i na preživljavanje, na životnu istoriju između ovih negativno korelisanih komponenti adaptivne vrednosti, kod ćerki i kod sinova? Ova dva modela indirektno dobiti se danas označavaju kao “Fišer-Zahavi model” (Eshel i sar. 2000; Kokko i sar. 2003).

Hipoteza dobrih gena podrazumeva postojanje aditivne genetičke varijanse za adaptivnu vrednost, odnosno da jedinka koja bira partnera za parenje može i da proceni heritabilan genetički kvalitet potencijalnog partnera. Na taj način se biraju varijante gena koje će povećati adaptivnu vrednost potomstva, kroz neku od komponenti adaptivne vrednosti – preživljavanja i/ili reproduktivnog uspeha. U ovom slučaju su visoko kvalitetne one jedinke koje su “dobre” za bilo koju jedinku suprotnog pola.

Novija istraživanja ukazuju na postojanje ne-aditivne genetičke varijanse za adaptivnu vrednost, odnosno da se izborom partnera za parenje može povećati adaptivna vrednost potomstva, ali formiranjem povoljnih kombinacija gena (Trivers 1972; Yamazaki i sar. 1976; Zeh i Zeh 1996). To bi značilo da ženka mora biti sposobna da “proceni svoj genotip” i na osnovu toga da bira muški genotip koji je njoj adekvatan (Zeh i Zeh 1996; 1997; Tregenza i Wedell 2000). Ženka bira mužjake nosioce gena koji su kompatibilni isključivo njenim genima, odnosno, postoji preferenca ka genetičkoj kompatibilnosti (Mays i Hill 2004). Ovakav način

razmatranja genetičkog kvaliteta uzima u obzir i drugi aspekt, odnosno preferencu ženki ka određenim genotipovima radi izbegavanja inkompatibilnosti (Zeh i Zeh 1996). U slučaju da je ne-aditivna genetička varijansa važnija, ne postoji isti najbolji izbor partnera za sve jedinke suprotnog pola, već najbolji izbor zavisi od genotipa jedinke koja bira (Hettyey i sar. 2010).

Mays i Hill (2004) sugerišu da u različitim okolnostima, kako ekološke, tako i socijalne i genetičke prirode, kriterijumi koji leže u osnovi preference ženke mogu biti fenotipski plastični.

Teorija o senzornom vođenju (eng. *sensory drive*) se javila poslednjih decenija XX veka. Za razliku od prethodnih teorija, u njenoj osnovi ne leži selekcija za osobine na osnovu kojih se vrši izbor partnera za parenje. Evolucija osobina kod mužjaka i preferenci ženki je rezultat delovanja prirodne selekcije na senzorni sistem ženki, a koja nije povezana sa izborom u parenju. Atraktivnost mužjaka je slučajan proizvod delovanja selekcije koja je delovala na gene koji kontrolišu senzorne sisteme ženki.

Izbor partnera za parenje se može javiti u određenom stepenu kao eksaptacija, procesima kao što su senzorno vođenje, senzorna eksploatacija, već-postojećim sklonostima ili senzornim zamkama (Endler i Basolo 1998).

Senzorna pristrasnost (eng. *sensory bias*) je pojam koji se u evolucionoj biologiji koristi u različitim kontekstima, a jedan od aspekata je upravo objašnjenje evolucije preference ženke (West-Eberhard 1984; Basolo 1990; Ryan 1990; 1998; Kirkpatrick i Ryan 1991; Fuller i sar. 2005). Osnovna pretpostavka je da preferenca ženki evoluirala kao nus produkt delovanja prirodne selekcije na senzorni sistem, ali ne u kontekstu parenja i seksualne selekcije. Različite osobine ponašanja, ili neke druge osobine senzornog sistema, koje su pod delovanjem prirodne selekcije, korelišu sa evolucijom preference ženki. Dakle, za razliku od modela indirektno dobiti koji podrazumevaju korelaciju između preference i signala kao osobine mužjaka, ovaj

model podrazumeva korelaciju između preference i osobina koje su pod delovanjem prirodne selekcije. U osnovi modela indirektno dobiti bi bila gametska neravnoteža, a u osnovi senzorne pristrasnosti bi bila plejotropija gena (Fuller 2009). Senzorna pristrasnost je još jedan predloženi model za evoluciju preference ženki, i često se navodi i pod terminom senzorno vođenje, mada po nekim autorima (Fuller i sar. 2005) postoji jasna distinkcija između ovih termina. Senzorno vođenje podrazumeva promene u senzornom sistemu pod uticajem spoljašnje sredine, ali može biti kompatibilan sa svim modelima seksualne selekcije (Endler 1992; 1993; Endler i Basolo 1998).

Četvrta teorija koja objašnjava evoluciju preferenci ženke je **teorija seksualne antagonističke evolucije** (Rice 1992; 1996; Holland i Rice 1998). Seksualna antagonistička evolucija je osnova seksualnog konflikta. Javlja se kao posledica različitih evolutivnih interesa jedinki suprotnog pola (Parker 1979). Očekuje se da će ovaj tip evolucije postojati kod većine živih sistema koji se razmnožavaju seksualno, usled prisutnih razlika među polovima u njihovoj ulozi u reprodukciji (Clutton-Brock 1991; Andersson 1994). Postojanje seksualnog konflikta je neizbežno, jer se evolutivni interesi mužjaka i ženki, odnosno njihove optimalne strategije za postizanje maksimalne adaptivne vrednosti, skoro nikad ne poklapaju. U zavisnosti od toga na kom genetičkom nivou deluje seksualna antagonistička evolucija, seksualni konflikt može biti intralokusni i interlokusni. Ako su cilj selekcije aleli jednog lokusa koji se ekspimiraju kod oba pola, onda se radi o intralokusnom seksualnom konfliktu. Ovakav tip konflikta postoji kada pravac selekcije za isti alel zavisi od pola kod koga se alel nalazi (Arnquist i Rowe 2005). Na primer alel na lokusu koji utiče na veličinu neke karakteristike kod oba pola, može imati suprotan efekat na adaptivnu vrednost mužjaka i ženki. Kao posledica njegovog postojanja mogu se javiti adaptivna ograničenja za oba pola, pa bi rezultujući fenotip bio samo neka vrsta kompromisa zbog postojanja seksualno antagonističke evolucije. Veoma velike razlike među polovima, kao što je seksualni dimorfizam, mogu se objasniti ekspresijom gena

ograničenom polom (Rice 1984). Ona može biti favorizovana kao posledica intralokusnog seksualnog konflikta, ali je potrebno vreme da bi evoluirala. Poslednjih godina raste broj eksperimentalnih dokaza o intralokusnom seksualnom konfliktu, kako kod *Drosophila melanogaster* (Chippindale i sar. 2001; Gibson i sar. 2002), tako i kod drugih vrsta (Price i Burley 1994; Merilä i sar. 1997; Björklund i Senar 2001). Međutim, koliko je konflikt prisutan, i kakav je njegov krajnji efekat, još uvek nije potpuno jasno. Interlokusni seksualni konflikt se javlja kada su cilj selekcije aleli različitih interagujućih lokusa kod oba pola. Geni su na različitim lokusima, i mogu da evoluiraju nezavisno kod oba pola. Ovakav tip konflikta može da nastane usled interakcija između polova, kao što su odluke vezane za parenja, ili stepene roditeljskih ulaganja (Hosken i Stockley 2005). Ishodi seksualnog konflikta, teorijski, mogu biti različiti: preko pobede ženki, pobede mužjaka, postizanja kompromisa ili beskonačnih evolutivnih trka. Zbog poslednjeg mogućeg ishoda, Holland i Rice (1998) su ovaj model nazvali modelom proganjanja (eng. *chase-away sexual selection*). Po njemu, prihvatanje više parenja je maladaptivan odgovor na antagonističko zavođenje mužjaka. Očekuje se povećanje "otpornosti" ženki tokom evolucije, ali i koevolutivni odgovor mužjaka koji će voditi razvoju novih "zavodničkih" osobina. Odnosno, gledajući i druge osobine, ono što je adaptacija kod jednog pola vodiće "kontra-adaptaciji" kod drugog pola što može voditi "evolutivnim trkama" (eng. *sexual arms races*). To bi bio jedan kontinualni tok u kome bi učestvovali aleli različitih gena kod polova.

1.2. Preferenca ženke

Preferenca ženke je osobina koju definišu sva svojstva koja utiču na naklonost ženki da se pare sa određenim mužjacima. Preferenca ženke barem delimično određuje izbor partnera za parenje. Mogu se razlikovati dva svojstva preference parenja: 1) "funkcije preference" – redosled kojim individua rangira potencijalne partnere, i 2) "izbirljivost" – napor koji je individua spremna da uloži u proceni partnera (Jennions i Petrie 1997). Varijabilnost u izboru partnera za parenje može postojati usled varijabilnosti u funkcijama preference, ili stepena izbirljivosti, ili zbog i jednog i drugog. Ona može nastati usled genetičkih razlika, razvojnih putanja ili neposrednih sredinskih faktora (Jennions i Petrie 1997). Uprkos značaju preferenci ženki za seksualnu selekciju, malo je podataka o genetičkoj varijabilnosti preference (Moore 1989; Sharma i sar. 2010; Bakker i Pomiankowski 1995; Jennions i Petrie 1997; Mead i Arnold 2004), iako je ona preduslov za evoluciju preference.

Preferenca ženki opisuje povezanost fenotipa mužjaka i verovatnoće da bude prihvaćen za parenje. Pitanje koje se provlači, kroz veliki broj istraživanja na različitim vrstama, jeste pitanje broja osobina koje daju signale ženkama na osnovu kojih one procenjuju mužjake. Dakle, koje su to osobine na osnovu kojih ženka preferira određene mužjake? Da li je u pitanju samo jedna, ili su u pitanju više osobina? Da li su to morfološke, ili su to neke ponašajne ili druge osobine? Iako se u nekim radovima govori o pojedinačnim signalima (Pomiankowski i Iwasa 1993; Iwasa i Pomiankowski 1994), najverovatnije se koristi više signala (Jennions i Petrie 1997; Candolin 2003). Signali su osobine koje se procenjuju tokom izbora za parenje i utiču na odluku za parenje. Oni podrazumevaju i različite seksualne signale, rituale i predstavljanja (Candolin 2003; Chenoweth i Blows 2006; Heisler i sar. 1987; Kirkpatrick 1987; Jennions i Petrie 1997). Signali mogu biti fenotipske osobine (morfološke, vizuelne, akustične, olfaktorne, taktilne, ponašajne itd.) ili resursi koje suprotan pol stvara ili štiti (teritorija, gnezdo, nutritivne zalihe itd.). Oni najčešće imaju ulogu u komunikaciji, i mogu biti pod delovanjem prirodne selekcije pa u tom

slučaju formiraju poseban tip signala (Candolin 2003). Dakle, signali u zavisnosti od njihovog efekta na adaptivnu vrednost jedinke prilikom izbora partnera za parenje mogu da povećavaju adaptivnu vrednost, da je smanjuju ili da nemaju uticaja na nju. Signali mogu da se podele i na informativne i neinformativne u zavisnosti od toga da li pouzdano pružaju informaciju ženki o kvalitetu mužjaka (Candolin 2003). Poslednjih godina velika pažnja je posvećena interakcijama između osobina koje ženka preferira što dodatno usložnjava eksperimentalno detektovanje osobina koje su seksualno selekcionisane. Krajnji zaključak koji se može izvući iz dosadašnjih istraživanja se opet svodi na različite sisteme parenja i biologije vrsta i uslove spoljašnje sredine pod datim eksperimentalnim uslovima. Pretpostavlja se da se preferiranjem više signala povećava cena izbirljivosti, ali da se time smanjuju greške u izboru partnera za parenja. Kod monogamnih vrsta mužjaci verovatno pokazuju manje signala (Moller i Pomiankowski 1993). Opet, neki radovi ukazuju i na manju cenu izbirljivosti postojanjem više seksualno selekcionisanih osobina koja se može objasniti različitim mehanizmima (sekvencijalnim izborom – brza eliminacija na osnovu nekih signala, ili izbor na osnovu signala u kome se mužjaci najviše razlikuju, ili brža eliminacija na osnovu više signala koji se istovremeno procenjuju) (pregled u Candolin 2003).

Preference mogu da variraju u zavisnosti od kvaliteta ženki, zato što izbor ženke može da se razlikuje u odgovoru na unutrašnje ili spoljašnje uslove, a koji mogu da utiču na cenu i korist izbirljivosti (Willis i sar. 2011). Nekoliko studija ukazuje da preference ženki mogu biti zavisne od opšteg stanja (Hunt i sar. 2005; Cotton i sar. 2006; Burley i Foster 2006). To znači da i spoljašnji uslovi sredine mogu uticati na opšte stanje ženki, kao i na njene preference (Cotton i sar. 2006). U tom slučaju, očekuje se da ženke lošijeg kvaliteta budu manje izbirljive. Kao potencijalno adaptivna ponašanja, očekuje se da preference ženke variraju kao odgovor na mnoge faktore, uključujući i sposobnost ženki da diskriminišu na osnovu različitih signala (Jennions i Petrie 1997).

1.3. Mutacije i njihov efekat na adaptivnu vrednost

Mutacije se najčešće definišu kao nasledne promene u genetičkom materijalu. To je prilično opšta definicija mutacija koja obuhvata promene na genetičkom materijalu od nivoa nukleotida u molekulu DNK, pa do nivoa hromozoma i celih hromozomskih garnitura. Stopa spontanih mutacija je niska ako se uzmu u obzir tačkaste mutacije, ali može imati i drugačije vrednosti od ovih ako se posmatra veličina genoma koja je zahvaćena mutacijama (Kondrashov i Kondrashov 2010). Dosadašnja istraživanja su potvrdila da se različiti nivoi organizacije živih bića karakterišu i različitim stopama mutacija (Drake i sar. 1998; Drake 1999). Veličina genoma i stopa mutacije su obrnuto proporcionalni, odnosno niži organizmi, prokarioti, imaju nižu stopu mutacije, dok se viši organizmi odlikuju manjom tačnošću u procesima replikacije, transkripcije i translacije, pa samim tim i višom stopom mutacije (Lynch 2010). Različita struktura genetičkog materijala, odnosno tipovi sekvenci molekula DNK i njihova organizacija, takođe imaju različitu stopu mutacije. Do ovih podataka se danas može doći pouzdanije, napretkom tehnologija sekvenciranja. Iako se za mutacije kaže da su slučajni događaji, postoje mesta u genomu koja su zbog svoje prirode, odnosno tipa sekvence, podložnija greškama tokom replikacije, pa samim tim i mutacijama. Dakle, neke sekvence imaju višu stopu mutacije od drugih. Stopa spontanih mutacija može biti pod uticajem nekih faktora fiziološke prirode (starost, pol), kao i pod uticajem stresnih uslova sredine. Istraživanja ukazuju da sredinski stres može povećati stopu mutacija kako kod bakterija (Foster 1999) tako i kod eukariota (Steele i Jinks-Robertson 1992; Goho i Bell 2000; Sharp i Agrawal 2012; Matsuba i sar. 2012).

Mutacije se prema svom efektu na adaptivnu vrednost mogu podeliti na štetne, korisne i neutralne. Štetne mutacije smanjuju adaptivnu vrednost, obično smanjivanjem fekunditeta ili preživljavanja. Korisne mutacije imaju suprotan efekat na adaptivnu vrednost u odnosu na štetne, dok neutralne imaju veoma mali efekat ili najčešće ne utiču na adaptivnu vrednost. Iako su svi ovi efekti mogući, većina

mutacija je “umereno štetna” (Lynch i sar. 1999; Crow 2000; Baer i sar. 2007; Eyre-Walker i Keightley 2007).

Različiti tipovi mutacija imaju drugačiji efekat na adaptivnu vrednost. Na primer, sinonimne mutacije su neutralne ili su pod veoma slabim selekcionim pritiskom, za razliku od nesinonimnih, ili npr. mutacija promene okvira čitanja (eng. *frameshift mutation*) koje bi trebalo da su pod snažnijim selektivnim pritiskom.

Predviđanja kako će se pojava novih mutacija u genomima odraziti na populaciju tokom više generacija zavisi u velikoj meri i od kompleksnosti osobina u čijoj determinaciji učestvuju geni u kojima su se desile mutacije. Različiti geni mogu biti u epistatičkim interakcijama (Loewe i Hill 2010), a mogu i nezavisno da deluju a da se nalaze na istom hromozomu. Vezanost gena može imati različite posledice na adaptivnu vrednost, a u zavisnosti od stope rekombinacija, kao i od jačine selekcionog pritiska na neki od vezanih gena. Interakcija štetnih mutiranih alela različitih gena može biti sinergistička (dodavanje više štetnih alela smanjuje adaptivnu vrednost rastućom stopom). U tom slučaju može doći do povećanja prosečne adaptivne vrednosti populacije, jer jedinke koje nose štetne mutacije sa epistatičkim interakcijama, u slučaju nepreživljavanja zbog mutacije na jednom genu, ne prenose ni alele drugih gena sa kojima su epistatički vezani u narednu generaciju. Ovakav efekat smanjenja adaptivne vrednosti dodavanjem mutacija, ali povećanja prosečne adaptivne vrednosti populacije se pripisuje sinergističkoj epistazi štetnih alela. Tada je prosečna adaptivna vrednost populacije mnogo veća nego što bi bila u slučaju nezavisno delujućih mutacija (Kimura 1961; Kimura i Maruyama 1966; Kondrashov 1982; Rice 1998). Whithlock i Bourguet (2000) su za *D. melanogaster* potvrdili sinergističku epistazu nekih kombinacija vidljivih recesivnih mutacija, za osobinu produktivnost koja je analizirana kao komponenta adaptivne vrednosti.

Efekat novonastalih mutacija na populaciju zavisi i od genetičke strukture populacije, kao i od njene efektivne veličine. Efektivna veličina populacije je

parametar od kog zavisi efekat genetičkog drifta, pa samim tim i sudbina novih mutacija. U slučaju male efektivne veličine populacije, novonastale mutacije mogu opstajati i širiti se u populacijama, iako su štetne i smanjuju adaptivnu vrednost. Ovakvo održavanje štetnih alela u niskim učestalostima, iako deluje prirodna selekcija, može dovesti do smanjivanja prosečnih adaptivnih vrednosti populacija, koja mogu imati i za posledicu nestajanje malih populacija tokom vremena (Lande 1994; Lynch i sar. 1995a, b).

1.4. Genetička opterećenja

Temelje koncepta genetičkih opterećenja je postavio Haldane 1937. godine. Crow (1958) je definisao genetičko opterećenje kao proporcionalno smanjenje prosečne adaptivne vrednosti (ili druge merljive veličine) populacije relativno u odnosu na genotip koji poseduje maksimalnu ili optimalnu vrednost. Genetičko opterećenje se obeležava simbolom L i matematički se definicija može predstaviti kao

$$L = \frac{W_{\max} - \bar{W}}{W_{\max}}$$

odnosno, ako se „najboljem“ genotipu dodeli adaptivna vrednost jednaka 1, tada je $L = 1 - \bar{W}$.

Bez postojanja genetičke varijabilnosti ne bi bilo ni evolucije. Mutacije su evolutivni faktor koji generiše genetičku varijabilnost, i bez kojeg ne bi bilo opstanka u promenljivim uslovima spoljašnje sredine. Sa druge strane, i pored njihove važne uloge u evoluciji živih sistema, većina mutacija je štetna. Nove mutacije većinom smanjuju adaptivnu vrednost jedinki (Lynch i sar. 1999), pa prirodna selekcija deluje tako da im smanjuje učestalost u populacijama. Svi štetni aleli nastali mutacijama ne mogu biti odmah eliminisani, pa se zbog toga smanjuje prosečna adaptivna vrednost populacije. Ovakav efekat štetnih mutacija se naziva mutaciono genetičko opterećenje.

Haldane (1937) je izveo da je redukcija adaptivne vrednosti usled prisustva genetičkih opterećenja L proporcionalna udvostručenoj vrednosti stope mutacije $L = 2u$, ako se posmatra jedan lokus, sa nepotpunom dominansom, kod diploidnih organizama. On je takođe ukazao da mutaciona opterećenja mogu biti veoma velika, ako se uzmu u obzir mutacije celog genoma. Ako se stopa štetnih mutacija celog genoma označava kao U , onda je prosečna adaptivna vrednost populacije $\bar{W} = e^{-U}$, dok je genetičko opterećenje $L = 1 - \bar{W} = 1 - e^{-U}$. Po njegovim pretpostavkama, prosečna

jedinka pri mutaciono-selekcijom balansu (kada bi se u proseku desila jedna štetna mutacija po genomu po generaciji) ima za oko 60% nižu adaptivnu vrednost u odnosu na onu koja bi se očekivala pri uslovima bez mutacija. Ovaj zaključak je postao osnova za mnoge druge evolutivne fenomene, kao što su izumiranje populacija (Lande 1994), evolucija seksualne naspram aseksualne reprodukcije (Kondrashov 1982; 1988), inbriding depresija (Charlesworth i Charlesworth 1999), evolucija samooplodnje u odnosu na stranoplodnju (Lloyd 1979; Charlesworth 1980), evolucija veličine genoma i njegove kompleksnosti (Lynch i Conery 2003; Otto i Marks 1996).

Genetička opterećenja o kojima su pisali Haldane (1937), Crow (1948) i Muller (1950) se odnose na opterećenja izazvana mutacijama, pa se stoga nazivaju mutacionim genetičkim opterećenjima. Pored njih, u zavisnosti od uzroka smanjenja prosečne adaptivne vrednosti populacije, genetička opterećenja mogu biti segregaciona, inkompatibilna, drift, migraciona, substitucionna (Wallace 1991).

U kojoj meri će štetni aleli redukovati prosečnu adaptivnu vrednost populacije zavisi od toga na koje komponente adaptivne vrednosti utiču. Teško je predvideti veličinu promene u adaptivnim vrednostima, ako se izuzmu krajnje ekstremni mogući ishodi, tipa da su mutacije selektivno neutralne, ili da su letalne. Selekcioni pritisak može biti različite jačine, a krajnji efekat na prosečnu adaptivnu vrednost populacije zavisi od mnogo drugih faktora (Loewe and Hill 2010).

Na prosečnu adaptivnu vrednost populacije utiče i način njene procene. Kako je prosečna adaptivna vrednost određena primarno adaptivnom vrednošću ženki kod većine vrsta (Sharp and Agrawal 2008), svaki zaključak treba izvesti sa predostrožnošću. Poslednjih godina se vode polemike oko različitih stopa mutacija kod mužjaka i kod ženki i da li je selekcija protiv štetnih alela jača kod mužjaka nego kod ženki (Li i sar. 2002; Ellegren 2007; Hedrick 2007). Ove potencijalne razlike među polovima mogu, stoga, različito oblikovati prosečne adaptivne vrednosti populacije.

Posledica svake štetne mutacije, i kod muškog i kod ženskog pola, jeste smanjenje adaptivne vrednosti jedinke, jer negativan efekat na adaptivnu vrednost definiše mutaciju kao štetnu. Da li neka mutacija deluje na isti način, tj. da li ima isti efekat i na mužjaka i ženku je pitanje koje zahteva eksperimentalnu proceduru sa poznatim mutacijama radi upoređivanja. Međutim, i ovaj pristup nosi određena ograničenja, između ostalog zbog malog broja fenotipski vidljivih mutacija i poznatog efekta na adaptivnu vrednost (Sharp i Agrawal 2008; Hollis i sar. 2009). Drugi mogući pristup je merenje efekta štetnih mutacija kod visoko inbridingovanih linija, preko procena inbriding depresije (Mallet i Chippindale 2010). Razlika u hromozomskoj konstituciji između mužjaka i ženki, odnosno razlika u polnim hromozomima, je u ovom pristupu ograničenje, i činjenica za potencijalno loše procenjivanje s obzirom da bi se kod heterogametnog pola mutirani aleli ekspimirali u hemizigotnom stanju (Agrawal 2011). Dosadašnji rezultati svakako potvrđuju isti pravac delovanja štetnih mutacija kod oba pola, odnosno, smanjenje neke od komponenti adaptivne vrednosti. Oni takođe ukazuju na tendenciju da je selekcionni pritisak snažniji kod mužjaka, što bi bilo u skladu sa teorijom o ulozi seksualne selekcije u redukciji genetičkih opterećenja i uspešnošću u parenju mužjaka, kao bitnom komponentom njihove adaptivne vrednosti (Whitlock i Agrawal 2009).

Sve je više podataka koji ukazuju na veću stopu mutacija kod mužjaka, u poređenju sa ženkama (Hurst i Ellegren 1998; Li i sar. 2002). Odnos stope mutacija mužjaka i stope mutacija ženki u proseku iznosi oko 5 ($\alpha=5$). Ova procena se zasniva većinom na podacima dobijenim ispitivanjem kičmenjačkih vrsta. Raniji podaci na *Drosophila* nisu ukazivali na razlike u stopama mutacije među polovima (Bauer i Aquadro 1997), ali nove procene takođe potvrđuju višu stopu kod mužjaka, i to dva puta (Bachtrog 2008). Faktori koji leže u osnovi razlika između polova jesu češće deobe muških gameta, samim tim i veći broj replikacija, pa se povećava i verovatnoća nastanka mutacija.

Razlike među polovima po pitanju mutacione stope, a koje se sve češće spominju u novijoj literaturi, se čak odnose i na postojanje „mutator alela“ koji bi se favorizovali kod muškog pola. Naime, u osnovi ove ideje je pretpostavka da ženke preferiraju povećanje stope mutacije, i da bi se na ovaj način rešio problem tzv. „lek paradoksa“, odnosno održavanje genetičke varijabilnosti (Petrie i Roberts 2007). „Lek paradoksom“ se navodi problem održavanja genetičke varijabilnosti koji je neophodan za model indirektno koristi. Naime, stalan izbor ženki određenih karakteristika mužjaka bi vremenom doveo do smanjivanja aditivne genetičke varijanse (Kirkpatrick i Ryan 1991). Time bi se postepeno smanjivala i indirektna korist za ženke, odnosno genetička dobit za potomstvo. Varijabilnost bi se povećavala konstantnim ulaskom novih mutacija, većom brzinom nego što bi seksualna selekcija mogla da ih eliminiše. Seksualnom selekcijom bi se favorizovale korisne mutacije, sa njima i vezani „mutator geni“, dok bi štetne mutacije bile eliminisane, i to direktnom procenom mužjaka, odnosno njegovog opšteg stanja određenog kvantitetom korisnih i štetnih mutacija.

Pored razlika u veličini stope mutacija koje postoje između različitih vrsta, smatra se i da različiti genotipovi jedne vrste mogu imati različite stope mutacija (Haag-Liautard i sar. 2007). Jedinke se mogu razlikovati u genetičkom kvalitetu, pa su jedinke lošijeg genetičkog kvaliteta, usled posedovanja štetnih alela obično i lošijeg fenotipskog stanja (Rowe i Houle 1996). Štetne mutacije mogu imati efekat na ćelije i njihova stanja, metabolizam, što može voditi sukcesivnim koracima i do grešaka u samoj replikaciji i reparaciji, pa bi krajnji efekat bio i povećanje stope mutacija. Sharp i Agrawal (2012) su pokazali da genotipovi „lošijeg kvaliteta“ (genotipovi koji sadrže veći broj štetnih mutacija) kod *D. melanogaster* imaju povećanu stopu mutacije.

Veličina genetičkih opterećenja zavisi i od faktora spoljašnje sredine, naročito pri stresnim promenama sredine, u kojima bi bile izraženije razlike između jedinki populacije. Kad bi mutaciona stopa genoma bila konstantna, onda bi genetička opterećenja u ravnoteži bila ista kako u populaciji sa aseksualnim tako i sa

seksualnim tipom razmnožavanja. Ako bi mutaciona stopa zavisila od adaptivne vrednosti, onda bi se javile razlike. U aseksualnoj populaciji bi prosečna adaptivna vrednost odgovarala najbolje adaptiranom genotipu, dok bi u seksualnoj ona bila mnogo niža (Agrawal 2002).

1.5. Jonizujuće zračenje kao mutageni faktor

Jonizujuće zračenje pripada delu elektromagnetnog spektra visoke frekvence i niske talasne dužine. Posедуje veliku energiju po kvantu i ima sposobnost da jonizuje atome i molekule, tj. da svojom energijom oduzima ili dodaje elektron(e), stvarajući pozitivno ili negativno naelektrisane jone. Naime, tokom prolaska kroz materiju, jonizujuće zračenje predaje energiju atomima i molekulima od kojih je ona sačinjena. Njegova energija je dovoljna da izazove izbacivanje jednog ili više elektrona iz njihovih putanja oko atomskih jezgra. Izbacivanjem elektrona nastaju veoma reaktivni pozitivno naelektrisani joni, a izbačeni elektroni mogu dalje da vrši sekundarnu jonizaciju ukoliko poseduju dovoljno energije. Njihovim sjedinjavanjem sa atomima mogu nastati negativno naelektrisani joni. Ovoj vrsti zračenja pripadaju α , β , γ , rendgensko (X), protonsko, neutronska zračenje.

Zbog kompleksne prirode živih sistema, kao i tipa zračenja, dejstvo zračenja na žive sisteme se ogleda u veoma širokom spektru efekata. Kao glavni biološki efekat zračenja se podrazumevaju promene u genetičkom materijalu. Brojna istraživanja ukazuju na uticaj doze zračenja u genotoksičnim promenama (pregled u Zimonjic i sar. 1990). Pojam doze objašnjava jačinu izvora energije, tj. njegovu sposobnost jonizacije. Apsorbovana doza se izražava u jedinici grej (eng. *Gray* - Gy) i predstavlja deo energije zračenja koji apsorbuje jedinica mase ozračenog materijala. Jedan grej je apsorbovana doza u telu mase 1kg kome je jonizujućim zračenjem uneta energija od 1 džula (J), pa je $1\text{Gy}=1\text{J}/1\text{kg}$. Doza zračenja, u zavisnosti od trajanja izlaganja zračenju, može biti hronična i akutna. Svaki tip zračenja ima određene karakteristike, koje se mogu definisati pojmom linearnog transfera energije (LET). On opisuje gubitak energije po dužini puta jonizujuće čestice, odnosno potencijal zračenja da izaziva jonizujući efekat. Različite vrste jonizujućeg zračenja se odlikuju i različitim linearnim transferom energije, upravo zbog razlika u jonizujućim efektima duž njihovih putanja. Zračenja visokog LET-a imaju sposobnost veće jonizacije, za razliku od zračenja koja se odlikuju niskim LET-om, koje ima manju sposobnost jonizacije.

Postoje dve teorije o delovanju jonizujućeg zračenja na žive sisteme (Zimonjić i sar. 1990). Prva podrazumeva direktno dejstvo zračenja (tzv. teorija mete) koja podrazumeva da su živi organizmi izloženi delovanju seriji udara prilikom ozračivanja, i da od mesta udara zavisi i biološki efekat zračenja. Što je veći broj udara, veći je i procenat pogođenih meta, pa je samim tim veća i verovatnoća pogotka tzv. prave mete, odnosno molekula DNK. Svako zračenje ima potencijal da direktno interaguje sa ciljnim molekulom i izazove jonizaciju. Ovakav efekat, kao dominantni, proizvode zračenja koja se odlikuju velikim linearnim transferom energije, kao što su α ili neutronska zračenja. Ova teorija ne uzima u obzir broj pogodaka koji je dovoljan za pravu metu, kao i činjenicu da se svaka jonizacija ne dešava nezavisno jedna od druge. Druga teorija (tzv. teorija slobodnih radikala) podrazumeva indirektno dejstvo zračenja, tj. nastajanje slobodnih radikala, koji su u stanju da difunduju dovoljno daleko da interaguju direktno sa ciljnim molekulom, odnosno sa DNK ili proteinima. Reaktivni slobodni radikali nastaju najčešće jonizacijom vode, jer je ona glavna komponenta ćelija. Nastali slobodni vodonikovi atomi i hidroksilni radikali, su veoma reaktivni i reaguju sa organskim molekulima. Na taj način nastaju kratkoživeći organski radikali koji dalje generišu nove hemijske reakcije. Ove teorije ne isključuju jedna drugu, i zapravo objašnjavaju direktan i indirektan efekat jonizujućeg zračenja na žive organizme. Ipak, indirektan efekat je dominantan kad su u pitanju genetičke posledice.

Gama (γ) zračenje, pored rendgenskog zračenja, pripada grupi elektromagnetnog zračenja što znači da je kod njih nosilac energije foton, ili kvant svetlosti. Gama zračenje se emituje iz radioaktivnih izotopa, kao posledica ekscitiranosti jezgra atoma, koja emituju višak energije prilikom vraćanja u osnovno stanje. Pripada zračenju sa niskim linearnim transferom energije.

Biološki efekat zračenja se može sagledati na više nivoa, ali se kao jedan od glavnih podrazumevaju oštećenja na molekulima DNK. To mogu biti oštećenja baza, jednolančani prekidi DNK molekula (eng. *single strand breaks* - *SSB*) ili dvolančani

prekidi molekula DNK (eng. *double strand breaks* - DSB). Oštećenja baza mogu biti različite prirode, ali se smatra da imaju mali efekat u radijacionoj mutagenezi (Ward 1998). Jednolančani prekidi nastaju izbijanjem bilo kog vodonikovog atoma iz molekula dezoksiriboze. Formiranje reaktivnih grupa vodi destabilizaciji molekula i potencijalnih prekida na molekulu DNK. Ustanovljeno je da se većina jednolančanih prekida izazvanih jonizujućim zračenjem ispravlja DNK ligacijom (eng. *DNA ligation step*) (Von Sonntag 1987). Dvolančani prekidi se javljaju kad nastanu prekidi na oba lanca na istim mestima, ili se ta mesta razlikuju u malom broju baza (Han i Ngok Yu 2009). Upravo su ovi prekidi, koji se ne poprave ili se poprave sa greškom, odgovorni za hromozomske aberacije i genske mutacije (Goodhead 1994; Ward 1995). Bliska vezanost više oštećenja pod uticajem zračenja (baznih oštećenja, jednolančanih i dvolančanih prekida) može stvoriti tzv. grupisana (eng. *clustered*) oštećenja (Han i Ngok Yu 2009). Učestalost i kompleksnost oštećenja zavisi od tipa zračenja, odnosno od linearnog transfera energije. Neka istraživanja, koja uključuju i matematička modeliranja, pokazuju da je učestalost dvolančanih prekida 30% kod zračenja niskog LET-a, odnosno 70% kod zračenja visokog LET-a. Ako se računaju i bazna oštećenja, onda raste učestalost oštećenja i to na 60% i na 90% (za nizak odnosno visok LET) (Nikjoo i sar. 2000; 2001; 2002).

Jonizujuća zračenja mogu dovesti kako do genskih, tako i do hromozomskih mutacija. Ona najčešće indukuju hromozomske mutacije koje mogu biti strukturne ili numeričke. U osnovi strukturnih aberacija leže prekidi oba lanaca molekula DNK. U zavisnosti od toga u kojoj fazi ćelijskog ciklusa je ćelija ozračena, zavisice i da li će aberacije biti hromatidnog ili hromozomskog tipa. Ako su ćelije u G1 ili ranoj S fazi u trenutku ozračivanja, aberacije su hromozomske, a ako su u G2 fazi ili deobi (mitotičkoj ili mejotičkoj) aberacije su hromatidne. Jonizujuće zračenje može izazvati veliki broj različitih tipova mutacija, počevši od tačkastih u jednom genu, do delecija više gena (Thacker 1986). Niže doze zračenja uglavnom indukuju tačkaste mutacije, dok se sa povećanjem doza zračenja eksponencijalno povećava broj delecija (Schwartz i sar. 2000).

Indukovane mutacije mogu drastično smanjivati adaptivnu vrednost jedinki i čak uzrokovati letalnost (Blair 1958; Marinković i Anđelković 1969; Spalding i sar. 1969). Ovakvi efekti mogu biti posledica mutacija na pojedinačnim lokusima, ali su najčešće posledica mutacija u poligenim sistemima (Ayala 1968; Tracey i Ayala 1974). Istraživanja na *Drosophila* i glodarima su u većini slučajeva pokazala da se sa ozračivanjem roditelja smanjuje adaptivna vrednost potomaka, kao i da ekspresija indukovanih genetičkih efekata zavisi od linija životinja koje su se koristile (tj. njihove genetičke pozadine), prirode zračenja, i tipova mutacija koje su praćene (Vorobotsova 2000). Neki rezultati ukazuju i da su potomci ozračenih roditelja genetički nestabilniji, odnosno da su podložniji mutacijama prilikom izlaganja različitim mutagenima (Vorobotsova 2000).

Među različitim vrstama postoje razlike u vrednostima spontane stope mutacije, kao što postoje razlike između različitih genskih lokusa. Doza zračenja je direktno proporcionalna stopi mutacije. U zavisnosti od vrste organizama, kvaliteta zračenja i genskog lokusa zavisiće i funkcija pozitivne korelacije.

Kao što je već napomenuto, efekat jonizujućeg zračenja na DNK oštećenja u velikoj meri zavisi od faze ćelijskog ciklusa u kojoj je ćelija izložena zračenju. Efekti jonizujućeg zračenja na nivou molekula DNK su manji ako je do ozračivanja došlo u presintetskom (G1) nego u postsintetskom (G2) periodu interfaze. Osetljivost se povećava u S i G2 fazi ćelijskog ciklusa, što se proteže i na profazu mitoze. Ćelije u mejozi su osetljivije na jonizujuće zračenje nego ćelije u mitozu. Takođe je pokazano da se stadijumi gametogeneze razlikuju prema osetljivosti između mužjaka i ženki. Kod *Drosophila melanogaster* postoji hijerhijski odnos u osetljivosti različitih stadijuma spermatogeneze počevši od najviše osetljivih: rane spermatide, spermatocite II reda, spermatocite I reda, mladi spermatozoidi, zreli spermatozoidi i spermatogonije (Auerbach 1954; Khishin 1955; Bateman 1956; Alexanderi sar. 1959; Ives 1960; Fahmy i Fahmy 1964; Sobels 1965; Shiomi 1967).

1.6. Seksualna selekcija i genetička opterećenja

S obzirom na rastući trend eksperimentalnih dokaza da su stope spontanih mutacija visoke (Haag-Liautard i sar. 2007; Halligan i Keightley 2006), i postojeći model smanjenja adaptivne vrednosti (Haldane, 1937), populacije su potencijalno pod velikim genetičkim opterećenjima. U zavisnosti od genetičke strukture populacije, kao i drugih njenih karakteristika, kao što su brojnost, odnos polova, tipovi parenja, ali i spoljašnjih faktora, evolucija takve populacije može imati različite pravce. Krajnji efekti se mogu videti kroz lokalne adaptacije (Proulx 1999), ili nestajanja populacije (Lande 1994). Procesi koji bi mogli imati ulogu u smanjivanju genetičkih opterećenja su još uvek na nivou teorijskih razmatranja, sa nedovoljnim brojem eksperimentalnih podataka, kao i prilično kontradiktornim rezultatima. S obzirom na udeo adaptivne vrednosti ženki u prosečnoj adaptivnoj vrednosti populacije, jedan od načina kojim bi populacije mogle da „savladaju“ genetička opterećenja jeste putem seksualne selekcije.

U osnovi ove teorije je pretpostavka, da ženke prilikom izbora partnera za parenje, vrše odabir među mužjacima i na taj način eliminišu one koje nose štetne alele. U tom slučaju bi ženke imale veću adaptivnu vrednost od one koja bi se očekivala po Haldane-u (Whitlock 2000; Agrawal 2001; Siller 2001). Da bi ovaj način eliminacije bio moguć, geni koji determinišu različite komponente adaptivne vrednosti bi trebalo da determinišu i osobine mužjaka na osnovu kojih će oni imati reproduktivni uspeh. U osnovi ove pretpostavke bi bilo postojanje plejotropnog efekta gena koji su pod seksualnom selekcijom (Whitlock i Agrawal 2009). Iako se kao osobine koje su cilj seksualne selekcije najčešće analiziraju sekundarne polne karakteristike, i mnoge druge osobine mogu definisati atraktivnost mužjaka. To su morfološke, fiziološke, kao i ponašajne osobine koje se mogu nazvati osobinama koje zavise od opšteg stanja mužjaka (eng. *condition-dependent traits*). One bi trebalo da odražavaju zdravlje mužjaka, energiju sa kojom traga za ženkama i udvara im se,

snagu sa kojom bi mogao da se pokaže u kompeticiji i borbi sa drugim mužjacima (Andersson 1994).

Pretpostavlja se da veliki broj gena u genomu ima ulogu u određivanju stanja jedinke (Houle 1991; Rowe i Houle 1996), kao i da mnogi od njih imaju uticaja na različite komponente adaptivne vrednosti. Veliki broj lokusa su i potencijalna mesta mutacija, pa su time ti lokusi mogući nosioci genetičkih opterećenja. Izbor ženki na osnovu stanja mužjaka, bi bio korak kojim bi se omogućila eliminacija štetnih alela iz populacije putem seksualne selekcije.

Jedna od osnovnih pretpostavki Haldane-ovog modela genetičkih opterećenja jeste da su mužjaci i ženke pod istim selekcionim pritiskom. Iako selekcija za preživljavanje verovatno deluje na sličan način kod oba pola (Chippindale i sar. 2001), seksualna selekcija u većini sistema može biti veoma jak evolutivni mehanizam koji prvenstveno ima uticaja na muški pol. Međutim, rastući broj podataka ukazuje i na postojanje seksualnog konflikta, koji takođe može uticati na prosečnu adaptivnu vrednost populacije. Seksualni konflikt proizilazi iz seksualne selekcije i postoji ako se neki alel favorizuje kod jednog pola, a kod drugog ne. To bi značilo da mužjaci mogu imati veći reproduktivni uspeh usled posedovanja određene varijante gena, ali da će upravo ta varijanta gena biti štetna za ženku, odnosno za njenu adaptivnu vrednost. Ovakav tip seksualnog konflikta, kada je neki alel koristan za jedan pol, a za drugi štetan, naziva se intralokusni seksualni konflikt (Lande 1980; Arnqvist i Rowe 2005). U slučaju da se ženke sparuju sa mužjacima koji nose alele koji su štetni za ženke, onda je moguće da seksualna selekcija neće imati isti pravac delovanja kao prirodna selekcija, tj. neće se povećavati prosečna adaptivna vrednost populacije. Tada bi moglo doći i do smanjivanja prosečne adaptivne vrednosti populacije.

Ukoliko postoji seksualni konflikt, teško je odrediti efekat seksualne selekcije na prosečnu adaptivnu vrednost populacije i njenu ulogu u smanjivanju genetičkog opterećenja. Dosadašnji eksperimentalni podaci ne pružaju jasne dokaze koji idu u prilog ovoj teoriji, ali je takođe ni ne opovrgavaju. Do sada su istraživanja ovog tipa

sprovedena na vrsti *Drosophila melanogaster* za koju postoji veliki broj linija sa mutacijama sa vidljivim fenotipskim efektom, i za koje se uglavnom zna da li utiču na adaptivnu vrednosti nosilaca. Seksualna selekcija je neefikasna, čak može da inhibira "čišćenje" od štetnih alela (Arbuthnott i Rundle 2012), ali i da eliminiše štetne alele (Hollis i sar. 2009; Sharp i Agrawal 2008). Eksperimenti su urađeni i na drugim vrstama, na *Drosophila melanogaster* i na krpelju *Rhizoglyphus robini* bez korišćenja mutantnih linija sa tačno definisanim mutacijama, već sa linijama u kojima su akumulirane mutacije, tzv. mutaciono-akumulacionim linijama (MA linije) (Radwan i sar. 2004) ili indukovanjem mutogeneze hemijskim ili fizičkim putem (Hollis i Houle 2011; Radwan 2004). U tom slučaju se ne zna tačno koji geni nose mutacije, ali se podrazumeva da imaju efekta na više komponenti adaptivne vrednosti, uključujući i uspešnost u parenju. Radwan i saradnici (2004) nisu utvrdili da seksualna selekcija ima ulogu u povećanju fekunditeta u MA linijama krpelja *Rhizoglyphus robini*, dok su rezultati sa ozračenim populacijama (Radwan 2004) dali pozitivne rezultate za preživljavanje (sa seksualnom selekcijom se povećava preživljavanje jedinki). Seksualna selekcija nije pokazala efikasnost u smanjivanju genetičkih opterećenja koja su indukovana hemijskim mutagenom na *Drosophila melanogaster* (Hollis i Houle 2011).

1.7. Reproduktivno ponašanje i seksualna selekcija kod *Drosophila subobscura*

Rituali udvaranja i parenja vrste *Drosophila subobscura* su opisani još pedesetih godina XX veka (pregled u Krimbas-u 1993). Ova vrsta se opisuje kao monadrična (Maynard Smith 1956; Holman i sar. 2008), tj. ženke se pare samo jednom tokom života, dok se mužjaci pare više puta, iako je dokazano da je u manjem procentu moguća i poliandrija (Loukas i sar. 1981). Jedinke se ne pare u mraku, već samo u prisustvu svetlosti, i ova odlika je najverovatnije genetički determinisana manjim brojem gena (Anđelković i Marinković 1983). Nije utvrđeno da postoji udvaračka pesma mužjaka (Ewing i Bennet-Clark 1968) koja je inače karakteristična za *obscura* grupu kojoj ova vrsta pripada.

Udvaranje mužjaka *D. subobscura* se sastoji iz više koraka kojima se ženkama šalju različiti tipovi signala. Veoma su važni vizuelni signali, jer se parenje odigrava samo u prisustvu svetlosti. Mužjak započinje udvaranje otvaranjem i zatvaranjem krila (eng. *scissoring*). Nakon toga sledi prilazanje mužjaka ženki sa strane i dodirivanje ženke prednjim nogama. U ovom koraku se vrši prepoznavanje i komunikacija između jedinki za koje su najverovatnije odgovorni hemijski i taktilni signali. Nakon ovog koraka ženka obično miruje, dok se mužjak okreće svojim "licem" ka njenom, izbacuje proboscis i širi krila. U nekim slučajevima, ženka odmah prihvata udvaranje i pari se sa mužjakom, ali najčešće igra udvaranja traje. Ženka se udaljava i sklanja u stranu dok je mužjak i dalje prati da bi se opet postavio "licem" ispred nje. Ovakvi uzastopni koraci ženki prvo na jednu, pa na drugu stranu, izazivaju slične korake u stranu i kod mužjaka pa se jedinke stalno sučeljavaju i gledaju. Ovaj korak se naziva igra (eng. *dance*) i dokazano je da u njemu krila imaju važnu funkciju radi postizanja uspeha u parenju.

Iako je prisustvo krila neophodno za uspešnost u parenju (Grossfield 1968), za veličinu krila i njenu povezanost sa uspešnošću u parenju nisu dobijeni konzistentni rezultati za ovu vrstu (Monclus i Prevosti 1967; 1971; Steele 1986b; Steele i Partridge

1988). Takvi rezultati ukazuju da krila nisu seksualno selekcionisana osobina kao kod većine vrsta roda *Drosophila*. Naime, kod većine vrsta je utvrđena pozitivna korelacija veličine krila (ili tela) i uspešnosti u parenju: kod *D. ananassae* (Vishalashi i Singh 2008), *D. simulans* i *D. mojavensis* (Markow i Ricker 1992), *D. melanogaster* (Partridge i sar. 1987; Markow 1988), *D. pseudoobscura* (Markow i sar. 1996).

Za mužjake vrste roda *Drosophila* koje pripadaju podrodu Sophophora je karakteristično prisustvo polnih češljeva kao sekundarne polne karakteristike. Dosadašnja istraživanja ukazuju da je prisustvo polnih češljeva neophodno za uspešnost u parenju, jer imaju ulogu u hvatanju ženki za abdomen ili širenju njenih krila tokom parenja (Spieth 1952; Cook 1977; Ng i Kopp 2008). Broj zubaca polnih češljeva kod nekih vrsta ima uticaja na uspešnost u parenju. Pozitivna korelacija broja zubaca i uspešnosti u parenju je utvrđena za *Drosophila simulans* (Markow i sar. 1996), dok je negativna korelacija utvrđena za *Drosophila bipectinata* (Polak i sar. 2004). Broj zubaca polnih češljeva nema uticaja na uspešnost u parenju kod *Drosophila melanogaster* (Ahuja i Singh 2008; Pavkovic-Lucic i Kekic 2011), niti kod *D. pseudoobscura* (Markow i sar. 1996). Mužjaci *D. subobscura* imaju dva reda polnih češljeva. Povezanost ove sekundarne polne karakteristike kod mužjaka, merene preko broja zubaca i fluktuirajuće asimetrije polnih češljeva nije otkrivena u našoj ranijoj analizi (Savić i sar. 2007). Dosadašnji objavljeni eksperimentalni podaci nisu pokazali da je neka od navedenih morfoloških osobina (krila i polni češljevi) cilj seksualne selekcije kod ove vrste (Monclus i Prevosti 1967; 1971; Steele 1986b; Steele i Partridge 1988; Savić i sar. 2007).

Nutritivni darovi su karakteristika specifična za *D. subobscura*, a koja je u vezi sa udvaranjem mužjaka. Tokom faze označene kao "licem u lice" (eng. *face to face*) mužjaci mogu da daju ženkama hranljive kapljice što može doprineti uspehu u parenju (Steele 1986a; 1986b). Na taj način ženke mogu imati direktnu korist od mužjaka, ali da li će ta osobina darivanja imati uticaja na prihvatanje parenja zavisi

isključivo od opšteg stanja ženke, odnosno da li je gladna ili sita (Immonen i sar. 2009). Dobijeni rezultati ukazuju da variranje stanja, mužjaka i ženki, restrikcijama ishrane može imati uticaja na uspešnost u parenju. Siti mužjaci su bili uspešniji od "izgladnjivanih" mužjaka samo u slučaju kad su i ženke bile izložene slabijem režimu ishrane. Dakle, nutritivno darivanje je seksualno selekcionisana osobina, ali snaga seksualne selekcije zavisi od variranja uslova spoljašnje sredine, odnosno nutritivnih uslova u kojima se jedinka razvija. Veličina nutritivnih kapljica se nije razlikovala između korišćenih grupa mužjaka, što ukazuje na moguću značajnost sadržaja nutritivnih kapljica, a koji je još uvek nije analiziran.

Nakon udvaranja i davanja nutritivnih kapljica, ženka može pristati na parenje. Ona će tada prestati da se kreće, dozvoliće mužjaku da joj pride i kruži oko abdomena, da je "obgrli" i kopulira. Kopulacija u proseku traje 7-13 minuta (pregled u Krimbas-u 1993; Savic Veselinovic i sar. 2013).

Seksualna aktivnost jedinki u laboratorijskim uslovima zavisi od sezone i doba dana, ali se aktivnost linija povećava sa dužinom gajenja u laboratoriji (Pascual i sar. 1990). Aktivnost je veća kod jedinki koji potiču iz južnih populacija Evrope, u poređenju sa jedinkama iz severnih populacija. Po nekim podacima se mužjaci sa većim krilima brže pare (Monclus i Prevosti 1971), dok su s druge strane uspešniji u parenju sitniji mužjaci (Steele 1986a, 1986b). Kao što je već napomenuto, ne može se sa sigurnošću reći kad i u kojim uslovima spoljašnje sredine određeni fenotipovi mužjaka imaju reproduktivnu prednost u odnosu na druge.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja je provera hipoteze o ulozi seksualne selekcije u smanjivanju mutacionih genetičkih opterećenja na vrsti *Drosophila subobscura*.

Prema teorijskim očekivanjima, seksualna selekcija će smanjivati mutaciona opterećenja i povećavati adaptivnu vrednost, ako je većina mutacija štetna i za adaptivnu vrednost i za osobine zavisne od opšteg stanja mužjaka, a koje utiču na uspešnost u parenju.

Efekat seksualne selekcije na redukciju genetičkih opterećenja je praćen preko različitih komponenti reproduktivnog ponašanja mužjaka *D. subobscura* (odigravanje udvaranja, latentca udvaranja, intenzitet udvaranja, odigravanje kopulacije, latentca kopulacije i trajanje kopulacije) sa ciljem da se ispita da li su nosioci mutacija manje uspešni u parenju. Na ovaj način bi se dokazalo da ženke mogu izborom mužjaka za parenje da spreče prenošenje štetnih mutacija u narednu generaciju.

Takođe, da bi se proverila postavljena hipoteza analizirane su i promene dve komponente adaptivne vrednosti *D. subobscura*: fekunditeta i preživljavanja od stadijuma jaja do adulta, u zavisnosti od primenjenog sistema parenja (bez izbora i sa izborom), kao i nivoa mutacionih opterećenja. U slučaju da seksualna selekcija smanjuje mutaciona opterećenja, očekivali bismo veće vrednosti komponenti adaptivne vrednosti u grupama u kojima je postojao izbor za parenje.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. *Drosophila subobscura*

Model organizam korišćen u ovom istraživanju je vrsta *Drosophila subobscura* (Collin) koja pripada podrođu Sophophora, rodu *Drosophila*. Ova vrsta se odlikuje Palearktičkim rasprostranjenjem i može se naći u celoj Evropi (izuzev Centralne i severne Skandinavije), u Severozapadnoj Africi, Kanarskim ostrvima, Srednjem Istoku, a od sedamdesetih godina XX veka i u Severnoj i Južnoj Americi (Krimbas 1993).

U ovom radu su korišćene jedinke iz inbridingovanih linija, poreklom sa dva različita lokaliteta iz centralne i istočne Srbije. Jedan od lokaliteta je planina Goč u centralnoj Srbiji koja se nalazi između $43^{\circ} 33' - 43^{\circ} 35' N$ i $18^{\circ} 15' - 18^{\circ} 40' E$. Drugi lokalitet je planina Tara u zapadnoj Srbiji između $43^{\circ}56'58.10''N$ i $19^{\circ}21'27.21''E$.

Uzorkovanje mušica iz prirode je izvršeno pomoću trapova od fermentisanih jabuka postavljenih na površini od oko $400m^2$. Mušice su izlovljavane u intervalu od 17-20h, na svakih 20 minuta, pomoću entomoloških mrežica.

Održavanje linija i potrebna ukrštanja vršena su u laboratorijskim uslovima optimalnim za vrstu *Drosophila subobscura* na temperaturi od $19^{\circ}C$, relativnoj vlažnosti vazduha oko 60% i intenzitetu svetlosti oko 300 lux, pri svetlosnom režimu 12h svetlost/12h mrak.

3.2. Formiranje linija

U laboratorijskim uslovima nakon donošenja jedinki iz prirode formirane su linije od svake ženke (eng. isofemale - IF). Ženke su pojedinačno stavljane u flakone sa 15mL standardnog medijuma za gajenje *Drosophila*. Standardna hranljiva podloga se sastoji od kukuruznog griza (7.88%), šećera (7.12%) i agra (0.52%), obogaćena suvim kvascem (0.76%) i sa dodatkom fungicida (alkoholni rastvor metil-4-hidroksibenzoata-Nipagin®). Jedinke F1 generacije iz pojedinačnog flakona se mogu smatrati potomcima u punom srodstvu - braća i sestre (eng. *full-sibs*), jer je utvrđeno da je višestruka inseminacija ženki vrste *D. subobscura* u prirodnom staništu retka (Loukas i sar. 1981).

U eksperimentu su korišćene linije koje su dobijene ukrštanjem u potpunom srodstvu (eng. *full-sib breeding - FS*) tokom 15 generacija. Nakon uspostavljanja prirodnih IF linija i izleganja potomstva ženki, po principu slučajnosti su izabrani brat i sestra za roditelje naredne generacije. U svakoj narednoj generaciji je rađen isti tip ukrštanja, ali uvek uz dodatna 2-3 FS ukrštanja za svaku liniju. Na taj način se izbeglo gubljenje linija tokom više generacija ukrštanja u srodstvu. Iako se na ovaj način vrši selekcija između dodatnih ukrštanja, ovaj metod se koristi u istraživanjima inbridinga (Rumball i sar. 1994; Pegueroles i sar. 1996) da bi se smanjio veliki gubitak linija, kao i selekcija između linija (Rumball i sar. 1994). Posle 14 generacija inbridinga, po ovom načinu ukrštanja, teorijski se očekuje homozigotnost linija od 95,1% (Falconer 1989).

U eksperimentu je korišćeno ukupno 10 inbredovanih IF linija. Pred sam početak eksperimenta je napravljeno po 10 tehničkih replika za svaku liniju, prebacivanjem istih jedinki na nov supstrat na svakih 5 dana. Cilj umnožavanja linija je bio obezbeđivanje dovoljno jedinki iz svake linije za celu eksperimentalnu proceduru.

3.3. Tretman mužjaka

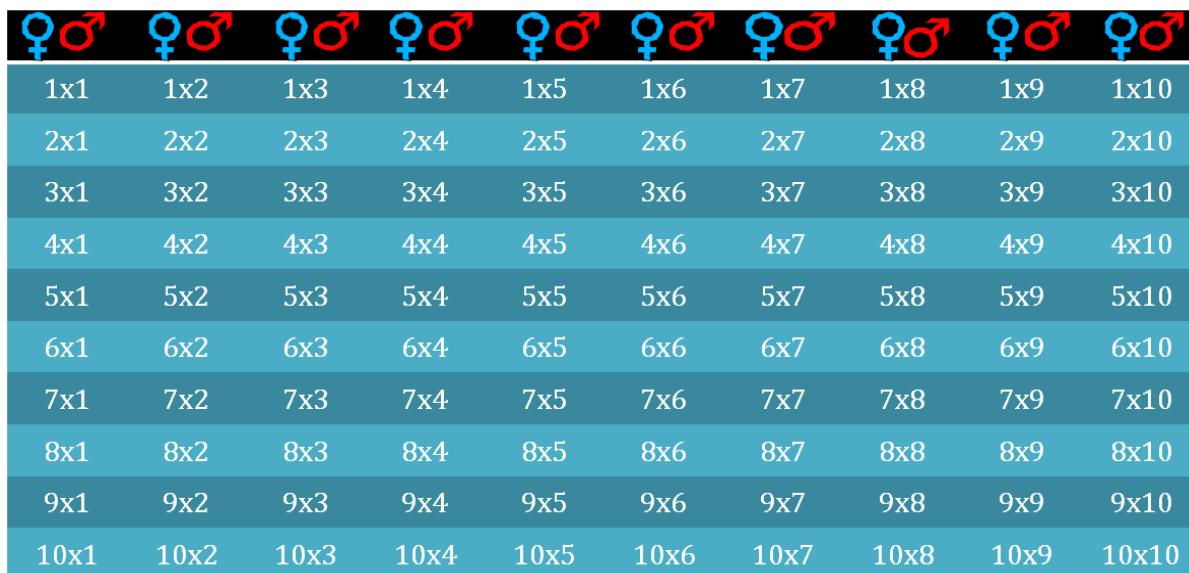
Da bi se dobila genetička varijabilnost u formiranim homozigotnim linijama, mužjaci iz linija su podvrgnuti jonizujućem zračenju kao mutagenu. Iz svake linije je zračeno po 50-60 mužjaka (2-4 dana starosti), po 15 mužjaka iz svake linije, na 5 dana. Mužjaci su stavljani u plastične epruvete u kontejner od pleksiglasa (tzv. „fantom“), dimenzija 15x15cm. Kao izvor jonizujućeg zračenja je korišćen ^{60}Co , na sobnoj temperaturi, na razdaljini od 100 cm od „fantoma“. Doza kojom su ozračene jedinice je iznosila 30 Gy, sa stopom od 18.12Gy/h. Svi tretmani su sprovedeni u istim i konstantnim laboratorijskim uslovima.

Dva dana nakon zračenja mužjaci su sparivani sa ženka iz sopstvenih linija. Paralelno su rađena i ukrštanja unutar linija između ženki i mužjaka koji nisu ozračeni. Na ovaj način su formirane dve grupe linija. Jedna grupa je sačinjena od “neozračenih” linija, a druga od tzv. “ozračenih” linija (jer su mužjaci podvrgnuti zračenju). Potomci uspostavljenih grupa linija su korišćeni u daljoj eksperimentalnoj proceduri.

3.4. Reproduktivno ponašanje *D. subobscura*

Izlegli mužjaci i ženke *D. subobscura* su izdvajani na svaka 24h. Ova vrsta se ne pari u mraku (Andjelkovic i Marinkovic 1983; Krimbas 1993), pa su flakoni iz kojih su izdvajane mušice čuvani sve vreme u mraku. Izdvajanje po polovima je rađeno bez eterizacije i bilo kog drugog tipa anestezije, da bi se izbegao njihov uticaj na ponašanje i parenje mušica (Barron 2000). Pojedinačni mužjaci su stavljeni u flakone zbog uticaja držanja u grupi na kasnije ponašanje (Ellis i Kessler 1975), dok su ženke stavljane u grupama od 15-20 jedinki. Nakon dostizanja starosti mušica od pet dana započeta su ukrštanja po shemi (Slika 1).

Ukrštanja su rađena po tzv. „no-choice“ dizajnu (bez izbora), stavljanjem po jednog mužjaka i jedne ženke u pojedinačne flakone. S obzirom na upotrebu 10 linija, bilo je moguće napraviti ukupno 100 kombinacija (Slika 1).



♀♂	♀♂	♀♂	♀♂	♀♂	♀♂	♀♂	♀♂	♀♂	♀♂
1x1	1x2	1x3	1x4	1x5	1x6	1x7	1x8	1x9	1x10
2x1	2x2	2x3	2x4	2x5	2x6	2x7	2x8	2x9	2x10
3x1	3x2	3x3	3x4	3x5	3x6	3x7	3x8	3x9	3x10
4x1	4x2	4x3	4x4	4x5	4x6	4x7	4x8	4x9	4x10
5x1	5x2	5x3	5x4	5x5	5x6	5x7	5x8	5x9	5x10
6x1	6x2	6x3	6x4	6x5	6x6	6x7	6x8	6x9	6x10
7x1	7x2	7x3	7x4	7x5	7x6	7x7	7x8	7x9	7x10
8x1	8x2	8x3	8x4	8x5	8x6	8x7	8x8	8x9	8x10
9x1	9x2	9x3	9x4	9x5	9x6	9x7	9x8	9x9	9x10
10x1	10x2	10x3	10x4	10x5	10x6	10x7	10x8	10x9	10x10

Slika 1. Šematski prikaz svih mogućih kombinacija ukrštanja deset visoko inbridingovanih linija korišćenih u eksperimentu

Svaka kombinacija linija koja je napravljena unutar „neozračene“ grupe je napravljena i unutar „ozračene“ grupe. Svaka kombinacija je ponovljena u proseku deset puta. Broj replika je varirao između kombinacija, zbog nedostatka odgovarajućeg broja izdvojenih mužjaka i ženki iz određenih linija, ali je opseg variranja broja replika iznosio između 7 i 11. Krajnji bilans za broj ukrštanja je iznosio 1003, kako za „neozračenu“, tako i za „ozračenu“ grupu, što je iznosilo ukupno 2006 ukrštanja. Svaka kombinacija ukrštanja između linija u „neozračenoj“ grupi je rađena simultano sa istom kombinacijom u „ozračenoj“ grupi.

Ukrštanja su sprovedena uvek u istom intervalu dana, u jutarnjim časovima od 7 do 11h i pod konstantnim laboratorijskim uslovima. *D. subobscura* ima dva pika dnevne aktivnosti u prirodi u letnjim mesecima (jutarnji i večernji) (Andjelkovic i sar. 1985; Kekic 2002). Prvo su u flakone stavljane ženke, pa potom i mužjaci. Svako parenje je posmatrano do završetka kopulacije ukoliko je do nje došlo, ili do isteka 2h od momenta stavljanja mužjaka i ženke u isti flakon.

Tokom posmatranja ponašanja *D. subobscura* je praćeno nekoliko faza kao karakteristika parenja mušica: odigravanje udvaranja, latenca udvaranja, intenzitet udvaranja, odigravanje kopulacije, latenca kopulacije i trajanje kopulacije.

Odigravanje udvaranja i odigravanje kopulacije (ili uspeh u parenju) su diskretne promenljive sa dva moguća ishoda: udvaranje se desilo ili nije, odnosno kopulacija se desila ili nije (0-1 sistem). Latenca udvaranja je merena kao vreme koje je proteklo od stavljanja mužjaka u flakon do početka njegovog udvaranja. Intenzitet udvaranja je zabeležen kao broj svakog kontakta mužjaka sa ženkom koji je opisan kao udvaranje mužjaka kod ove vrste. Radi dalje lakše analize intenzitet udvaranja je rangiran u 6 klasa u zavisnosti od broja udvaranja mužjaka (**0**: bez udvaranja; **1**: od 1-5; **2**: od 6-10; **3**: od 11-15; **4**: od 16-20; **5**: više od 20 pokušaja udvaranja). Latenca kopulacije je merena kao vreme koje je proteklo od trenutka stavljanja mušica u flakon do početka kopulacije. Trajanje kopulacije je mereno kao vreme od početka do kraja kopulacije, odnosno do razdvajanja mužjaka i ženke.

3.5. Statistička analiza reproduktivnog ponašanja

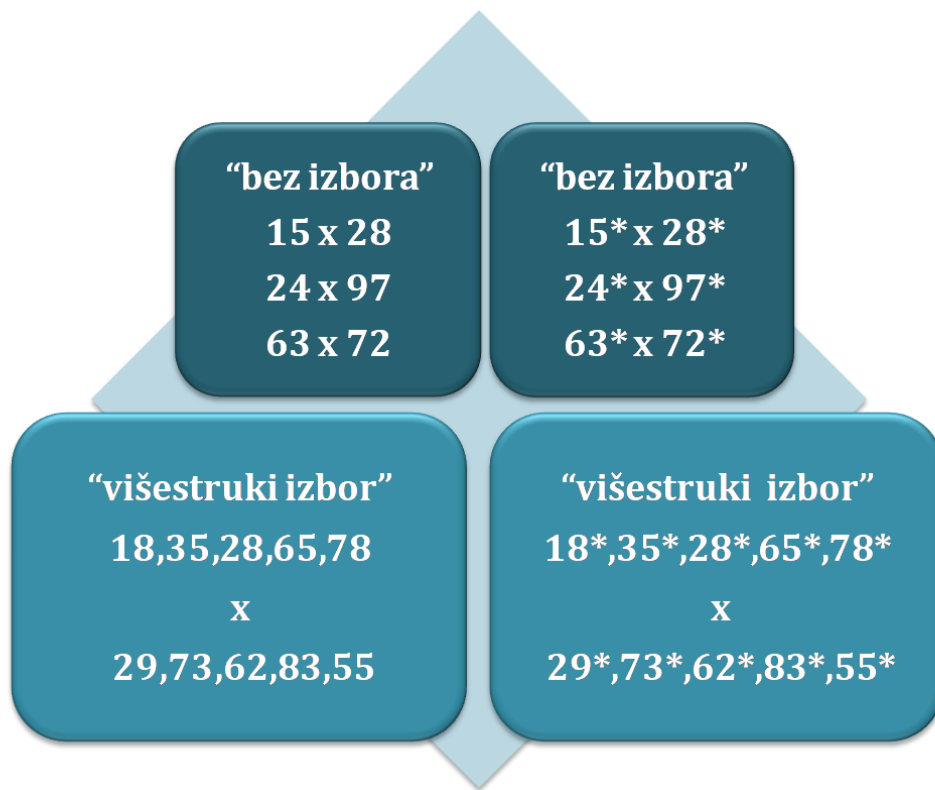
Primena odgovarajuće statističke analize je zavisila od tipa podataka. Diskretne promenljive (odigravanje udvaranja i uspeh u parenju) su analizirane binomnom logističkom regresijom u programu SPSS 12.0. Ostali podaci (za latencu udvaranja, intenzitet udvaranja, latencu kopulacije, trajanje kopulacije) nisu mogli bi ti normalizovani nijednom postojećom transformacijom koja se uobičajeno koristi za posmatrane osobine (log, ln, Box cox). Stoga su te ponašajne osobine analizirane neparametarskom statistikom. Za poređenje dve grupe podataka je korišćena Mann-Whitney neparametarska statistika, dok je za poređenje više grupa podataka korišćena Kruskal-Wallis neparametarska statistika. Korelacija između određenih osobina je urađena neparametarskom Spearman korelacijom. Sve analize su rađene u PAST (Hammer, 2001) ili SPSS 17.0 statističkom programu.

3.6. Komponente adaptivne vrednosti i odnos polova

U daljem eksperimentalnom radu upotrebljeno je potomstvo posmatranih ukrštanja tokom nekoliko generacija. Svako ukrštanje prethodnog eksperimentalnog dela je bilo obeleženo brojevima linija iz kojih potiču ženka i mužjak (Slika 1). Na primer kombinacija 25 je označavala da ženka vodi poreklo iz linije 2, a mužjak iz linije 5. Kombinacija 25* je označavala takođe poreklo ženke iz linije 2, ali mužjaka poreklom iz linije 5* (linije 5 čiji su očevi ozračeni).

U okviru svake od ove dve formirane "neozračene" i "ozračene" grupe su rađena dva tipa ukrštanja. Jedan tip ukrštanja je bio "bez izbora" u kome su stavljeni za ukrštanje po jedan mužjak i jedna ženka. Drugi tip je bio dizajn "višestrukog izbora", u kome su stavljeni za ukrštanje po 5 mužjaka i 5 ženki. Prvi tip ukrštanja je označen kao S-, a drugi kao S+. Na ovaj način su napravljene eksperimentalne grupe sa različitim nivoima seksualne selekcije, tj. u prvom tipu ukrštanja "bez seksualne selekcije", a u drugom tipu ukrštanja "sa delovanjem seksualne selekcije", jer su i ženke i mužjaci imali mogućnost biranja jedinki za parenja. Sve kombinacije, i za S- i za S+ ukrštanja, koja su napravljene u "neozračenoj" grupi su istovremeno napravljene, analogno po linijama, i u "ozračenoj" grupi. Primer ovakvih ukrštanja je dat na Slici 2.

Unutar svake eksperimentalne grupe, za svaki tip ukrštanja, i S- i S+, je urađeno po 100 ukrštanja. Za ovu eksperimentalnu generaciju je urađeno ukupno 400 ukrštanja, po 200 za svaku eksperimentalnu grupu. S obzirom da je u grupama sa višestrukim izborom bilo pet ženki po parenju, fekunditet je utvrđen za 500 ženki u "neozračenoj" i 500 u "ozračenoj" grupi.



Slika 2. Šematski prikaz parenja unutar svake eksperimentalne grupe, “neozračene” I “ozračene” (*), “bez izbora” (S-) i “sa višestrukim izborom “(S+).

Sva ukrštanja su rađena sa jedinkama iste starosti (5 dana), koje su izdvajane nakon izleganja po istom principu kao i u prvom eksperimentalnom delu. Četvrtog dana nakon ukrštanja (kad su jedinke bile stare 9 dana), ženke su stavljane na pojedinačne podloge da polažu jaja. Stavljana je pojedinačno svaka ženka iz S- i iz S+ ukrštanja. Podloga na kojoj su ženke polagale jaja je bio standardni medijum sa razmazanom kapi kvasca. Fekunditet ženki je praćen ukupno 3 dana (četvrtog, petog i šestog dana nakon ukrštanja), prebacivanjem svake ženke na svaka 24 sata na novu podlogu. Jaja su brojana pod binokularnom lupom. Za svaku ženku je izračunata ukupna vrednost fekunditeta na osnovu broja jaja položenih tokom ova tri dana. Za

ove podatke nije bila potrebna transformacija, pa su u analizi korišćene originalne vrednosti (broj jaja).

Nakon prebrojavanja jaja, flakoni su ostavljeni da bi se izlegle jedinke. Razviće kod vrste *D. subobscura* traje oko 20 dana u optimalnim uslovima. Izleganje jedinki je praćeno nakon petnaest dana od početka izleganja da bi se prebrojale i sve kasnije izležene jedinke. Na osnovu izleglih jedinki i prebrojanih jaja je izračunato preživljavanje potomstva za svaku ženku. Preživljavanje od jaja do adulta predstavlja procentualni odnos izleženih jedinki u odnosu na ukupan broj položenih jaja. Za svaku ženku je izračunato preživljavanje na osnovu tri dana polaganja jaja koja su praćena. Za ovu osobinu podaci nisu imali normalnu raspodelu, pa je izvršena njihova transformacija. Za procentualne podatke je korišćena *arcsin* transformacija ($p' = \arcsin \sqrt{p}$).

Prebrojavanjem izleženih jedinki je urađeno i odvajanje po polovima. Na taj način je dobijen i odnos polova izleženih mušica. Odnos polova (eng. *sex ratio*) se najčešće izražava kao procentualni udeo mužjaka u ukupnom potomstvu.

Paralelno sa ovim ukrštanjima je urađeno i po 100 parenja po sistemu „bez izbora“ unutar „ozračene“ i „neozračene“ grupe. Nakon toga su, po istom sistemu, urađena i parenja još dve generacije. Posle ukupno tri generacije ukrštanja „bez izbora“ ponovo su u okviru svake eksperimentalne grupe sparivane jedinke istim tipovima ukrštanja kao u prvoj generaciji: S- („bez izbora“) ili S+ („višestruki izbor“). Ponovo je praćen fekunditet ženki, preživljavanje jedinki, kao i određivanje odnosa polova. Broj ukrštanja za svaku eksperimentalnu grupu i tip ukrštanja je iznosio po 100, tako da je i u ovoj eksperimentalnoj generaciji urađeno ukupno 400 ukrštanja.

3.7. Statistička analiza komponenti adaptivne vrednosti i odnosa polova

Podaci za sve komponente adaptivne vrednosti su prvo testirane na normalnost neparametarskim Jarque-Berra testom.

Nakon što su svi podaci uspešno transformisani urađena je analiza varijanse (ANOVA) za svaku od komponenti adaptivne vrednosti. Ova analiza je bila moguća nakon izračunavanja prosečnih vrednosti za svaku komponentu pojedinačno, u svim S+ grupama. Na taj način je omogućeno dobijanje balansiranih nizova podataka s kojima je i ANOVA bila moguća.

S obzirom da je unutar S+ ukrštanja bilo slučajeva da se ženka ulepi za podlogu, ili da uginu tokom polaganja jaja, u analizama je korišćena prosečna vrednost za četiri ženke umesto za pet. Sva ukrštanja u kojima su podaci bili dostupni, zbog navedenih razloga, za manje od četiri ženke, nisu uključena u dalju analizu.

Za svaku komponentu adaptivne vrednosti je prvo urađena dvofaktorska analiza varijanse, da bi se video uticaj primenjenih sistema parenja i tretmana unutar svake eksperimentalne generacije. Da bi se utvrdile razlike između generacija, uveden je i faktor *generacija*.

Anova statistika je rađena u softverskom programu SPSS 17.0.

4. REZULTATI

4.1. Reproduktivno ponašanje *D. subobscura*

Eksperimentalni dizajn u kome je analizirano reproduktivno ponašanje *D. subobscura* je bio skoro u potpunosti balansiran, sa izuzetkom nekih od kombinacija ukrštanja IF linija. Neka ukrštanja nisu imala dovoljan broj replika, tj. broj replika je bio manji od 10 usled nedovoljnog broja mušica određenih linija, dok je za neke kombinacije bilo 11 replika. Broj replika ni za jednu kombinaciju nije bio manji od sedam. Ukupan broj posmatranih parenja je iznosio 2006 (po 1003 za svaku eksperimentalnu grupu, „neozračenu“ i „ozračenu“). Ali, i pored balansiranozi dizajna, ukupan broj uspešnih parenja je iznosio 804, ili izraženo procentualno 40,2%.

Od svih osobina reproduktivnog ponašanja analizirane su komponente udvaranja (u slučaju da se udvaranje odigralo), kao što su latenca udvaranja i intenzitet udvaranja, dok su u samo u 40% postavljenih parenja, u kojima se desila kopulacija, analizirani i latenca kopulacije i trajanje kopulacije.

Prvi deo prikaza rezultata se odnosi samo na razlike u tretmanu, tj. razlike koje proističu usled uvođenja mutacija putem jonizujućeg zračenja.

Deskriptivna statistika za promenljive diskretnog tipa, tj. za odigravanje udvaranja i uspešnost u parenju je prikazana u Tabeli 1. Među potomcima neozračenih mužjaka se 90,43% jedinki muškog pola udvaralo, dok je među potomcima ozračenih mužjaka taj procenat iznosio 88,2. Ako se analizira uspešnost u parenju, opet je učestalost bila veća među mužjacima čiji očevi nisu zračeni. Od “neozračenih” mužjaka 42,02% je bilo uspešno u parenju, naspram 38,22% “ozračenih” mužjaka. Dobijene razlike su značajne samo za uspešnost u parenju ($\chi^2=3,415$, $p<0,05$) (Tabela 6). Kod jednog broja jedinki je postojala uspešnost u parenju, iako je izostajao ritual udvaranja.

Tabela 1. Deskriptivna statistika za promenljive diskretnog tipa (odigravanje udvaranja i uspešnost u parenju)

Tip mužjaka	N	N ₁	N ₂	N ₃	N ₄	N ₅	N ₆
"neozračeni"	1003	907	90,43	421	42,02	366	40,35
"ozračeni"	1003	885	88,24	383	38,22	338	38,19

(Ukupan broj posmatranih parenja N; broj mužjaka (N₁) i procenat mužjaka (N₂) koji su se udvarali; broj mužjaka (N₃) i procenat mužjaka (N₄) koji su se parili; broj sparenih mužjaka (N₅) i procenat sparenih mužjaka (N₆) od ukupnog broja mužjaka koji su se udvarali)

Deskriptivna statistika za latencu udvaranja je prikazana u Tabeli 2. Mužjacima iz "neozračene" grupe je trebalo, u proseku, više vremena da započnu ritual udvaranja. Dobijene razlike između "neozračenih" i "ozračenih" mužjaka su značajne (Mann-Whitney, U=382600, p<0.05) (Tabela 6).

Tabela 2. Deskriptivna statistika za latencu udvaranja izražene u sekundama (s)

Tip mužjaka	N	$\bar{X} \pm S.E.$	V	SD	opseg variranja
"neozračeni"	906	704,98 ± 39,44	1409290	1187,14	0 - 6942
"ozračeni"	886	808,27 ± 42,44	1595950	1263,31	12 - 7184

N – ukupan broj; \bar{X} - srednja vrednost; S.E. - standardna greška; V – varijansa; SD standardna devijacija

Intenzitet udvaranja je ovoj studiji prikazan kao promenljiva ordinalnog tipa, pa je i prikaz rezultata dat u skladu sa tim. Deskriptivna statistika je data u Tabeli 3. Iste vrednosti medijane i opsega variranja su karakteristične za obe eksperimentalne grupe.

Tabela 3. Deskriptivna statistika za intenzitet udvaranja

Tip mužjaka	N	medijana	opseg variranja
"neozračeni"	1002	1	0-5
"ozračeni"	1002	1	0-5

N – ukupan broj

(0: bez udvaranja; 1: od 1- 5; 2: od 6-10; 3: od 11-15; 4: od 16-20; 5: više od 20 pokušaja udvaranja).

Podaci koji su dobijeni za latencu kopulacije i trajanje kopulacije ne pokazuju statistički značajne razlike između tretmana (Tabela 6). Na osnovu deskriptivne statistike se može uočiti trend da kopulacija počinje kasnije kod "neozračenih" mužjaka, kao i da kopulacija traje kraće, u poređenju sa "ozračenim" (Tabela 4 i Tabela 5).

Tabela 4. Deskriptivna statistika za latencu kopulacije izražene u sekundama (s)

Tip mužjaka	N	$\bar{X} \pm S.E.$	V	SD	opseg variranja
"neozračeni"	419	1917,51 ± 94,43	3736590	1933,03	28 - 8381
"ozračeni"	385	1891,62 ± 95,97	3546070	1883,1	35 - 7540

N – ukupan broj; \bar{X} - srednja vrednost; S.E. - standardna greška; V – varijansa; SD standardna devijacija

Tabela 5. Deskriptivna statistika za trajanje kopulacije izražene u sekundama (s)

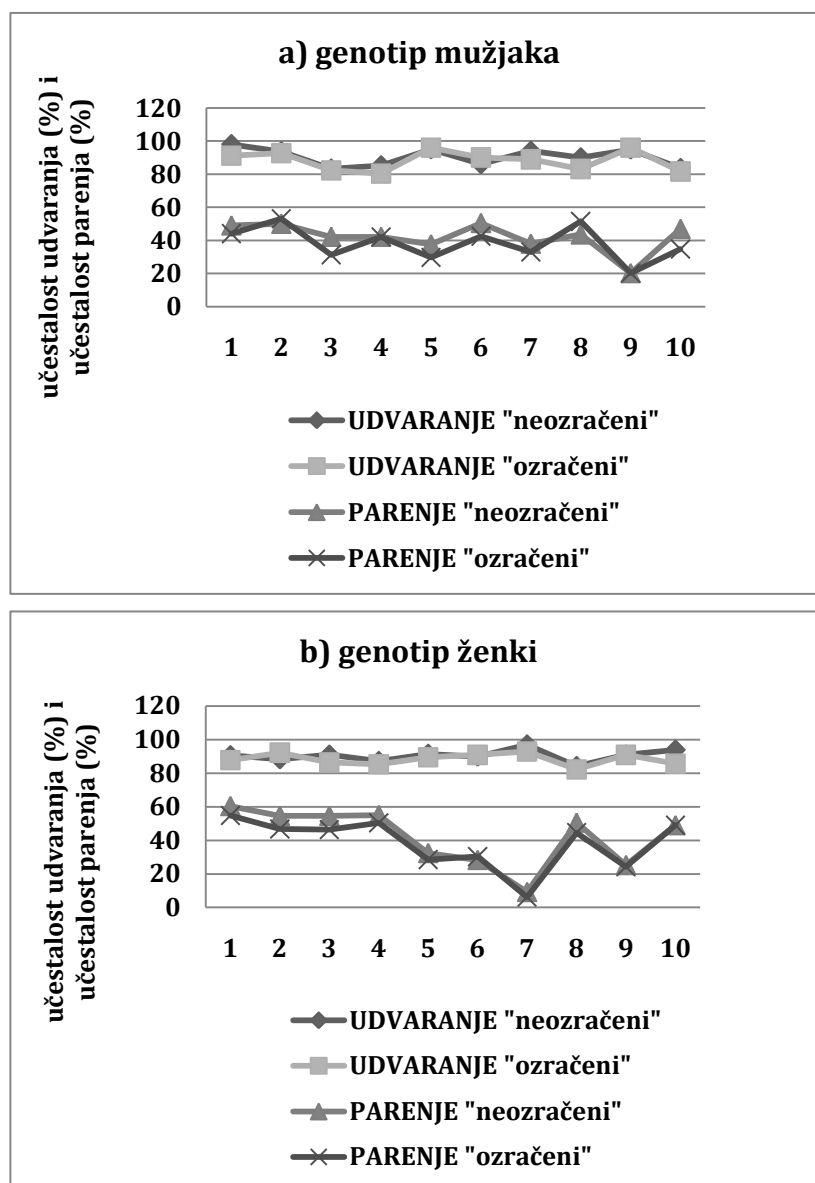
Tip mužjaka	N	$\bar{X} \pm S.E.$	V	SD	opseg variranja
"neozračeni"	419	712,866 \pm 18,91	149851	387,106	66-2584
"ozračeni"	385	718,075 \pm 19,20	141965	376,782	63 - 2413

Tabela 6. Efekti genotipa mužjaka, genotipa ženki i tretmana mužjaka na komponente reproduktivnog ponašanja. Odigravanje udvaranja i uspešnost u parenju su analizirani binomnom logističkom regresijom. Intenzitet udvaranja, latenca udvaranja, latenca kopulacije i trajanje kopulacije su analizirani neparametrijskom statistikom, Mann-Whitney testom za tretmane, i Kruskal-Wallis testom za genotipove

Izvor varijabilnosti	Udvaranje	Uspešnost u parenju	Intenzitet udvaranja	Latenca udvaranja	Latenca kopulacije	Trajanje kopulacije
Genotip ženke	0,058	42,756***	H=47,89***	H=47,72***	H=42,76***	H=10,46
Genotip mužjaka	1,374	11,955***	H=65***	H=219,1***	H=52,27***	H=266***
Tretman	$\chi^2= 1,893$	$\chi^2=3,415^*$	T=485500	T=382600*	T=79420	T=79210

p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***

Drugi deo prikaza rezultata se odnosi na razlike između deset inbridingovanih linija, mužjaka i ženki, za iste osobine reproduktivnog ponašanja.



Slika 3. Prikaz razlika među linijama u udvaranju i prihvatanju parenja mužjaka (a) i ženki (b)

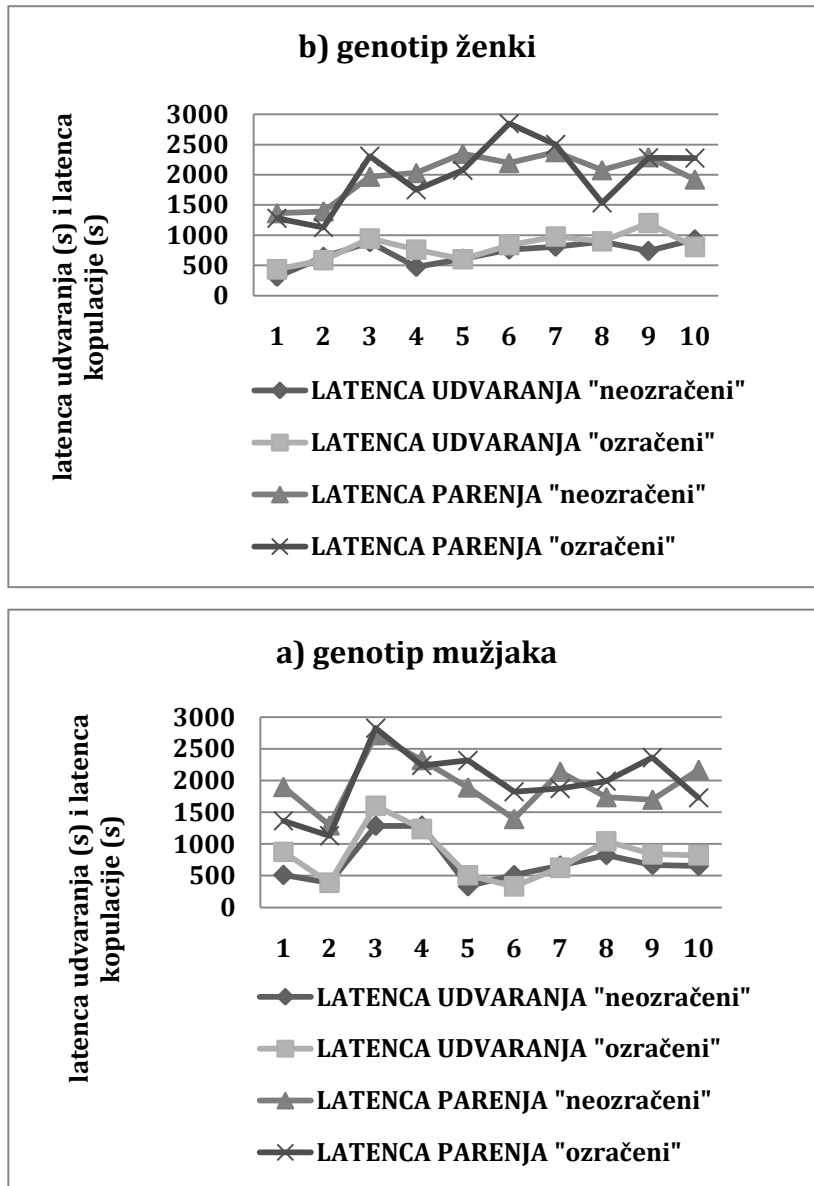
Udvaranje mužjaka je osobina koja se ne razlikuje među linijama, mužjaci svih linija se većinom udvaraju (Tabela 6; Slika 3). Njihovo udvaranje je bilo prisutno kod

svih linija ženki, pa ni među genotipovima ženki nije bilo razlika u tome da li je bilo ili nije udvaranja mužjaka (Tabela 6; Slika 3).

Iz analize druge diskretne promenljive, tj. uspešnosti u parenju, dobijeni su drugačiji rezultati. Postoji efekat genotipa i mužjaka i ženki na ovu osobinu ($\chi^2=11,955$, $p < 0,001$ za mužjake, i $\chi^2= 42,756$, $p < 0,001$ za ženke (Tabela 6)). Razlike među linijama mužjaka i ženki su takođe predstavljene na Slici 3. Na primer, mužjaci iz linija 2 i 6 su uspešniji u parenju od drugih, dok su mužjaci iz linije 9 najmanje uspešni od svih linija. Razlike su još izraženije između genotipova ženki, jer su se ženke iz linije 7 parile veoma retko, a ženke iz linija 5, 6 i 9 u manjem procentu u poređenju sa svim ostalim linijama.

Značajan efekat genotipa mužjaka i genotipa ženki je dobijen i za latencu udvaranja i latencu kopulacije (Tabela 6). Za latencu udvaranja je utvrđena značajnost uticaja genotipa ženki ($H=47,72$, $p < 0,001$) i genotipa mužjaka ($H=219,1$, $p < 0,001$). Za latencu kopulacije su dobijene takođe značajne razlike ($p < 0,001$) između genotipova mužjaka ($H=52,27$) i između genotipova ženki ($H=42,76$). Na Slici 4 su predstavljene razlike između linija ženki i mužjaka. Za ove dve osobine se može videti da su mužjaci nekih linija aktivniji, kao npr. mužjaci iz linija 2 i 6, kojima, u proseku, treba najmanje vremena da započnu udvaranje, kao i da se spare sa ženkama.

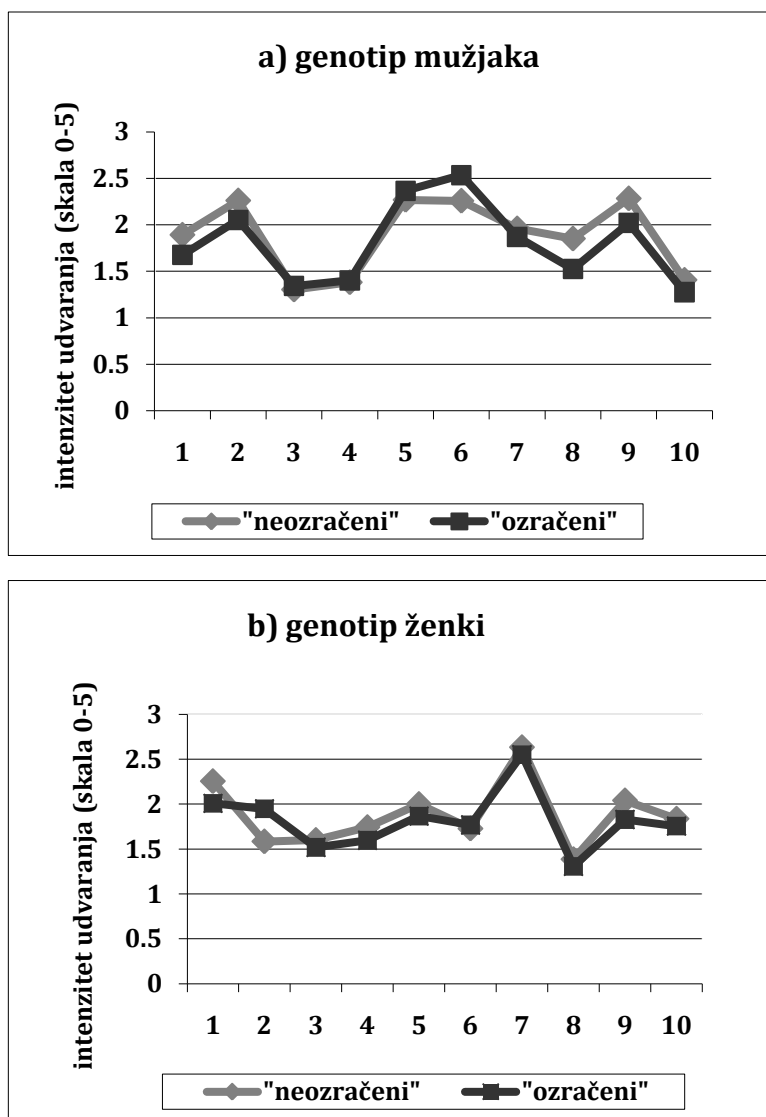
Utvrđena je pozitivna korelacija između latence udvaranja i latence kopulacije ($r = 0,41493$, $N= 702$, $p < 0,0001$), iako za latencu kopulacije nisu dobijene značajne razlike između tretmana (Tabela 6).



Slika 4. Prikaz razlika među linijama u latenci udvaranja i latenci kopulacije mužjaka (a) i ženki (b)

Za osobinu intenzitet udvaranja je takođe dobijen značajan efekat genotipa, i mužjaka i ženki (Tabela 6). Na Slici 5 se vide jasne razlike između genotipova. Među najaktivnijim su mužjaci iz linija 5 i 6, a među najmanje aktivnim su mužjaci iz linija 3 i 10. Na osnovu grafika se može zaključiti i da je najveća aktivnost mužjaka bila u

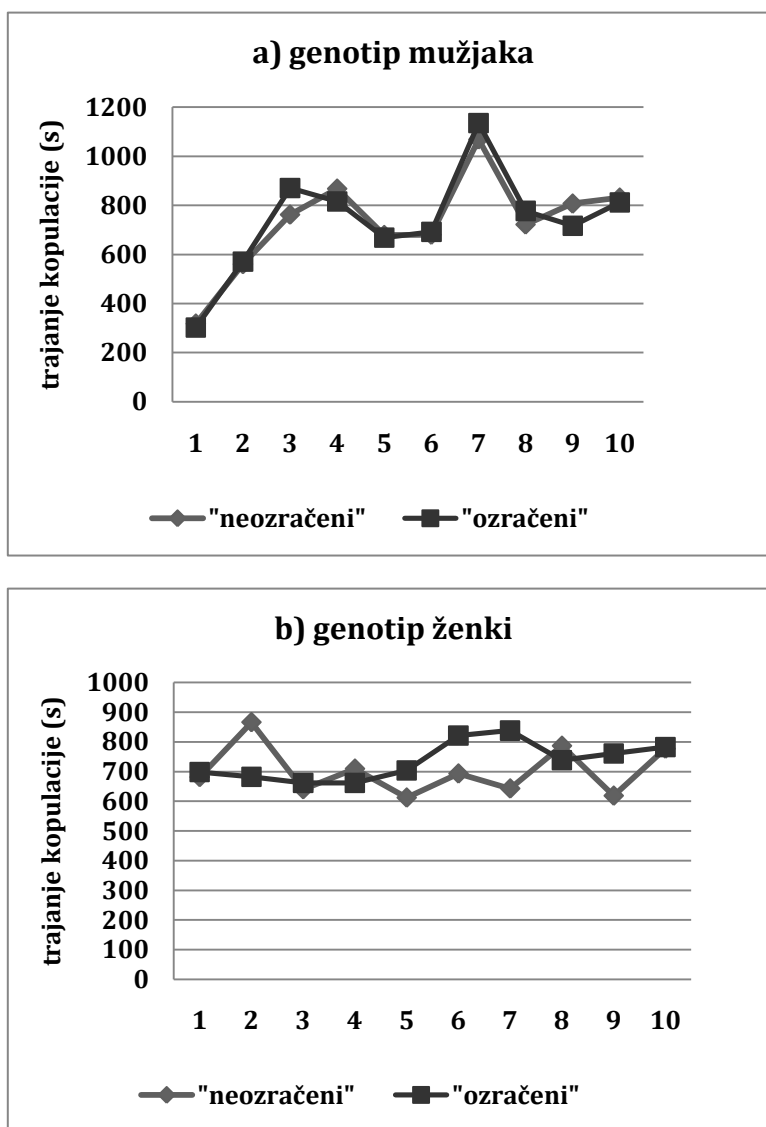
slučaju parenja sa ženka iz linije 7, koje su se retko sparivale (Slika 3b). Poređenjem Slike 3b i Slike 5b se može videti da su sparivanja ženki u obrnuto proporcionalnom odnosu sa intenzitetom udvaranja mužjaka, ako se posmatra po linijama ženki. Odnosno, udvaranje ženka poreklom iz linija koje su imale najmanju uspešnost u parenju je bilo najintenzivnije.



Slika 5. Razlike među linijama u intenzitetu udvaranja mužjaka (a) i ženki (b).

Skala za ukupan broj udvaranja mužjaka- 0: bez udvaranja; 1: 1-5; 2: 6-10; 3: 11-15; 4: 16-20; 5: >20

Za trajanje kopulacije je dobijen značajan efekat genotipova mužjaka ($H=266$, $p < 0.001$), dok efekat genotipova ženki nije uočen za trajanje kopulacije (Tabela 6; Slika 6b). Među mužjacima se vide jasne razlike u trajanju kopulacije, sa najdužim trajanjem za genotip 7, i najmanjim za genotip 1 (Grafik 4a).



Slika 6. Prikaz razlika među linijama za trajanje kopulacije mužjaka (a) i ženki (b).

4.2. Analiza komponenti adaptivne vrednosti

4.2.1. Fekunditet

Pregled deskriptivne statistike i variranja fekunditeta u prvoj eksperimentalnoj generaciji je dat u Tabeli 7.

Tabela 7. Deskriptivna statistika za osobinu fekunditet u prvoj eksperimentalnoj generaciji

Eksperimentalna grupa	min-max	$\bar{X} \pm S.E.$	SD	CV
S ⁻ neozračene	1-168	103,33 ± 5,14	37,10	35,906
S ⁻ ozračene	50-165	103,75 ± 4,02	29,01	27,962
S ⁺ neozračene	2-159	91,3 ± 2,13	33,03	36,183
S ⁺ ozračene	8-180	94,07 ± 2,25	35,39	37,618

S⁻ - bez izbora; S⁺ - višestruki izbor; \bar{X} – srednja vrednost; S.E. - standardna greška; SD – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije

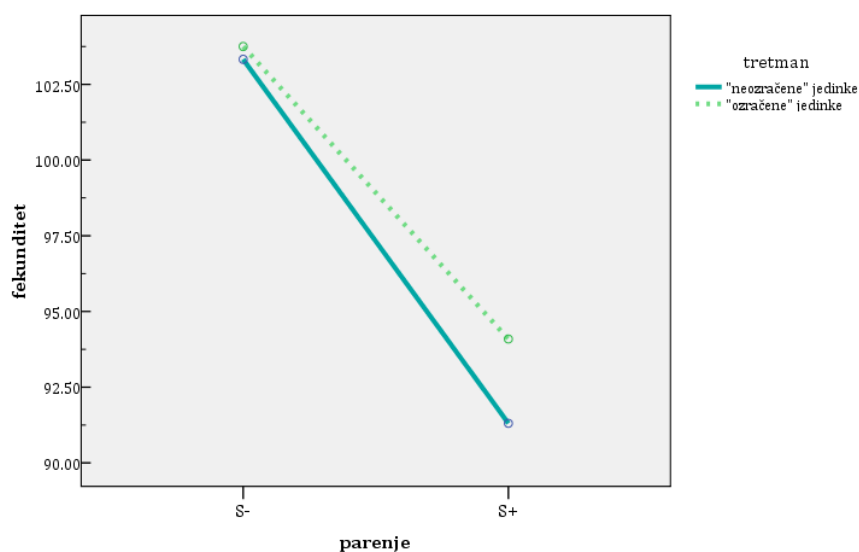
Za ispitivanje razlika u variranju ove osobine u zavisnosti od tipa parenja, kao i eksperimentalnih grupa posebno (zavisnost od tretmana), korišćena je dvofaktorska ANOVA. Rezultati analize su prikazani u Tabeli 8.

Tabela 8. Dvofaktorska ANOVA za osobinu fekunditet u prvoj eksperimentalnoj generaciji

Izvor varijabilnosti	df	MS	F	p
parenje	1	6050,892	7,804	0,006**
tretman	1	132,356	0,171	0,68
parenje x tretman	1	71,717	0,092	0,761

p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***

Dobijeni rezultati pokazuju značajan efekat parenja na vrednosti fekunditeta. Iako je Levenov test homogenosti varijanse pokazao značajno odstupanje ($F=18,7$, $p<0,001$), tzv. Welch analiza varijanse je pokazala isti nivo značajnosti efekta parenja na variranje fekunditeta kao i ANOVA ($p=0,005$). LSD Post hoc analiza je pokazala značajnu razliku između S- i S+ neozračenih grupa ($p=0,03$), kao i postojanje istog trenda između S- i S+ ozračenih grupa ($p=0,06$). Na Slici 7 su predstavljene vrednosti fekunditeta u eksperimentalnim grupama u prvoj generaciji. Ženke eksperimentalnih grupa u kojima nije postojao izbor partnera za parenje (tzv. S- grupe) imaju značajno veće vrednosti fekunditeta u odnosu na ženke kojima je bio dozvoljen izbor mušjaka.



Slika 7. Fekunditet za S- i S+ ukrštanja “neozračene” i “ozračene” grupe u prvoj eksperimentalnoj generaciji

Pregled deskriptivne statistike i variranja za istu osobinu, po istom sistemu parenja, ali nakon tri generacije ukrštanja bez seksualne selekcije, je prikazan u Tabeli 9.

Tabela 9. Deskriptivna statistika za osobinu fekunditet u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji

Eksperimentalna grupa	min-max	$\bar{X} \pm S.E.$	SD	CV
S ⁻ neozračene	8-131	83,902 ± 3,58	25,59	30,499
S ⁻ ozračene	4-119	70 ± 3,63	25,90	37,003
S ⁺ neozračene	1-154	81,89 ± 1,86	29,32	35,802
S ⁺ ozračene	6-145	80,08 ± 1,90	30,05	37,522

S⁻ - bez izbora; S⁺ - višestruki izbor; \bar{X} – srednja vrednost; S.E. - standardna greška; SD – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije

Rezultati dvofaktorske analize varijanse fekunditeta nakon tri generacije su prikazani u Tabeli 10.

Tabela 10. Dvofaktorska ANOVA za osobinu fekunditet u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji

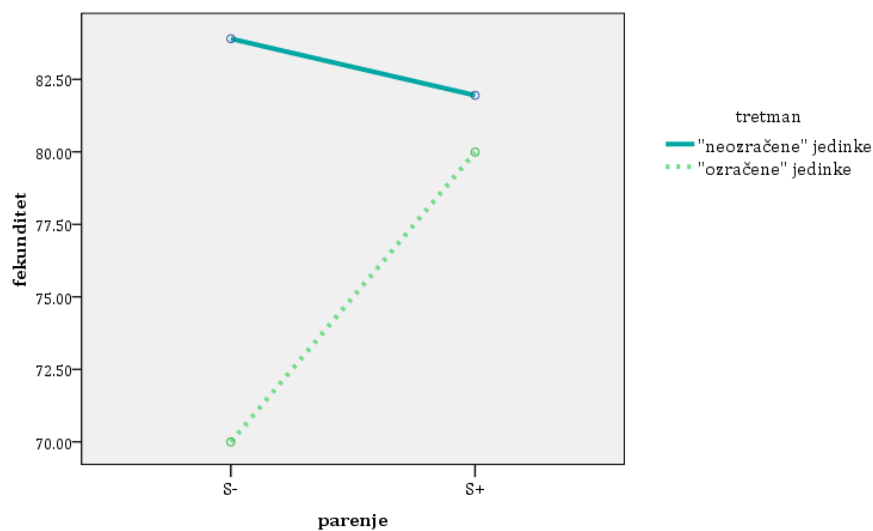
Izvor varijabilnosti	df	MS	F	p
parenje	1	824,02	1,697	0,194
tretman	1	3207,447	6,607	0,011**
parenje x tretman	1	1818,641	3,746	0,05*

p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***

U ovoj eksperimentalnoj generaciji se zapaža značajan uticaj tretmana, odnosno zračenja na fekunditet ženki, kao i interakcije tretmana i tipa parenja. Razlike u vrednostima fekunditeta između grupa sa različitim sistemom parenja se menjaju u

zavisnosti od tretmana. LSD Post hoc analiza varijanse pokazuje značajne razlike između grupe u kojoj ženke nisu imale izbor pri parenju (S-) i grupe u kojoj su imale izbor (S+), ali samo u okviru potomačke generacije tretiranih mužjaka ($p=0,023$).

Na Slici 8 su predstavljene srednje vrednosti fekunditeta korišćenih eksperimentalnih grupa. Na osnovu grafika se vidi jasan uticaj tipa parenja u „ozračenoj“ eksperimentalnoj grupi, odnosno kod potomaka ozračenih jedinki. Mogućnost izbora partnera za parenje kod ove grupe značajno povećava fekunditet ženki, odnosno, vidi se efekat seksualne selekcije na povećanje fekunditeta kao komponente adaptivne vrednosti.



Slika 8. Fekunditet za S- i S+ ukrštanja „neozračene“ i “ozračene“ grupe u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji.

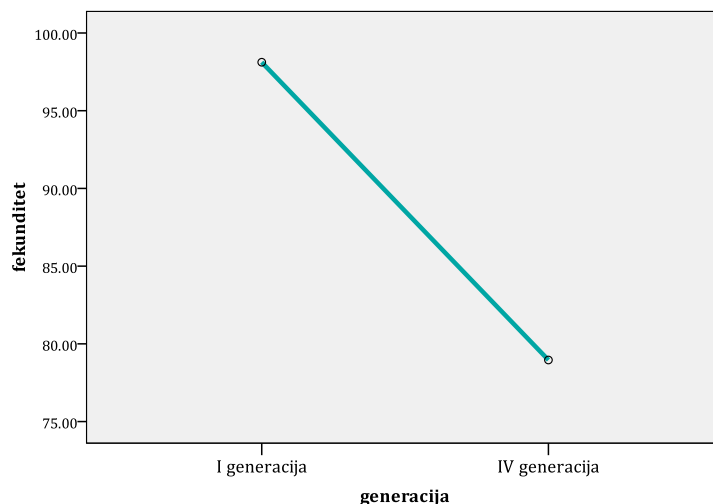
Rezultati analize varijanse fekunditeta, u koju je uključen i efekat generacije, su prikazani u Tabeli 11.

Tabela 11. Trofaktorska analiza varijanse za osobinu fekunditet

Izvor varijabilnosti	df	MS	F	p
generacija	1	37616,7	59,601	0***
parenje	1	1191,91	1,888	0,17
tretman	1	1025,78	1,625	0,203
generacija x parenje	1	5657,75	8,964	0,003**
generacija x tretman	1	2328,88	3,69	0,055*
parenje x tretman	1	1310,54	2,076	0,15
generacija x parenje x tretman	1	588,255	0,932	0,335

p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***

Rezultati pokazuju značajan efekat generacije, interakcije generacije i parenja, kao i interakcije generacije i tretmana na fekunditet ženki. Na Slici 9 se vidi da su vrednosti fekunditeta manje nakon tri generacije, u poređenju sa prvom eksperimentalnom generacijom.

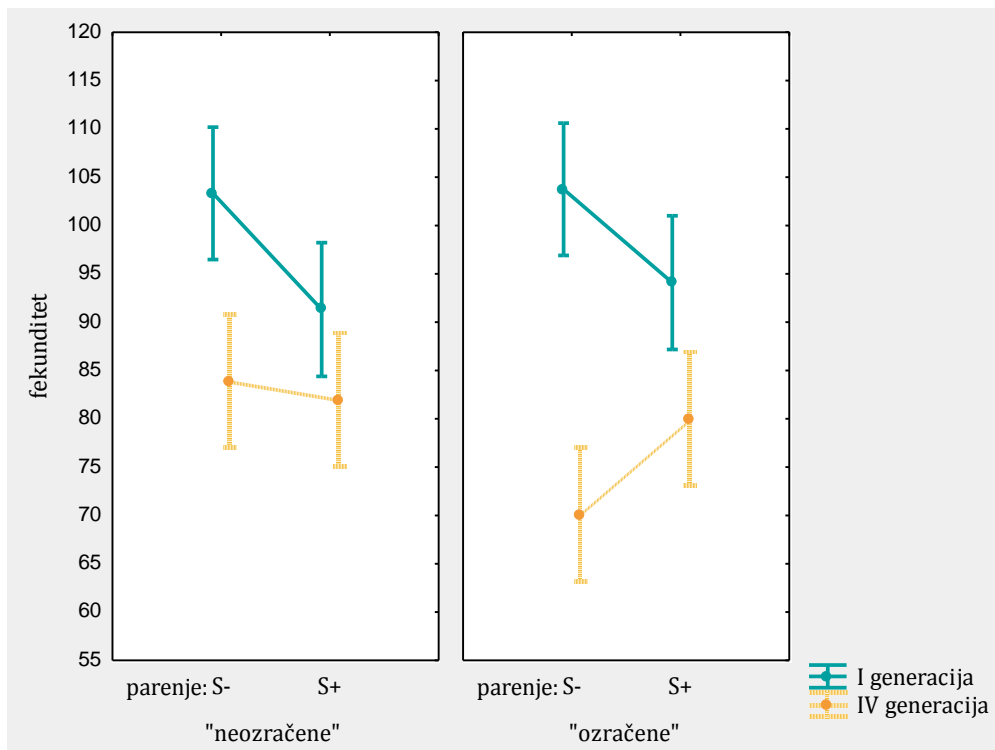


Slika 9. Fekunditet u obe eksperimentalne generacije.

Post hoc analiza varijanse interakcije generacije i parenja je pokazala značajne razlike između generacija i za svaki tip parenja, izuzev S- i S+ parenja u okviru četvrte eksperimentalne generacije. U prvoj generaciji je fekunditet ženki, koje su pripadale S-grupama, bio veći u poređenju sa ženkama S+ grupa ($p=0,002$). Vrednosti fekunditeta su bile značajno veće u prvoj eksperimentalnoj generaciji za svaki tip parenja ($p<0,001$).

Post hoc analiza varijanse interakcije generacije i tretmana pokazuje isti efekat u okviru kontrolnih grupa, kao i u okviru „ozračenih“ grupa, odnosno smanjenje fekunditeta u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji ($p<0,001$). Dobijena je i značajna razlika između neozračenih i ozračenih grupa u okviru četvrte generacije, sa većom prosečnom vrednošću fekunditeta u „neozračenim“ grupama ($p=0,02$).

Grafiki prikaz ove osobine, za sve eksperimentalne generacije, i svaki tip parenja i tretmana je predstavljen na Slici 10.



Slika 10. Variranje fekunditeta u svim eksperimentalnim grupama.

4.2.2. Preživljavanje od stadijuma jaja do adulta

U Tabeli 12 je prikazan pregled deskriptivne statistike i variranja za osobinu preživljavanje od jaja do adulta.

Tabela 12. Deskriptivna statistika za osobinu preživljavanje u prvoj eksperimentalnoj generaciji

Eksperimentalna grupa	min-max	$\bar{X} \pm S.E.$	SD	CV
S ⁻ neozračene	0,51-1	0,79 ± 0,01	0,1	12,939
S ⁻ ozracene	0,34-0,95	0,78 ± 0,02	0,13	16,187
S ⁺ neozračene	0,02-1	0,73 ± 0,01	0,17	23,026
S ⁺ ozračene	0,04-1	0,71 ± 0,01	0,17	23,86

S⁻ - bez izbora; S⁺ - višestruki izbor; \bar{X} – srednja vrednost; S.E. - standardna greška; SD – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije

Rezultati dvofaktorske analize varijanse za preživljavanje su prikazani u Tabeli 13.

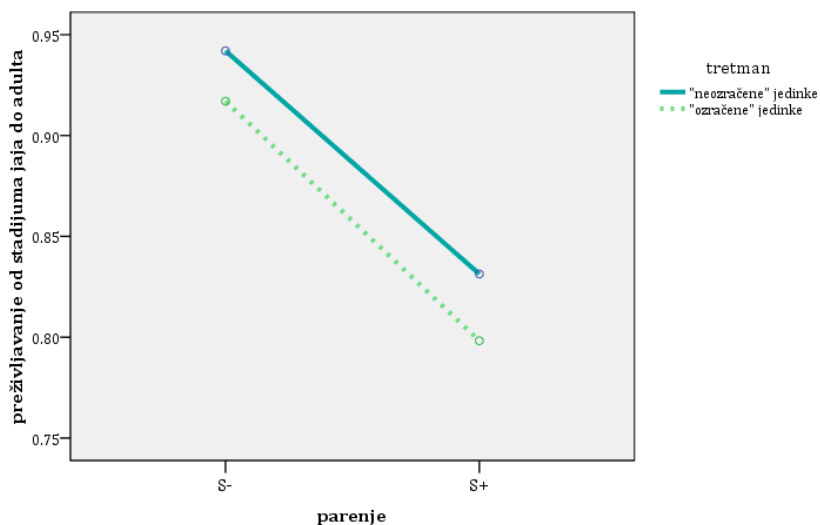
Tabela 13. Dvofaktorska ANOVA za osobinu preživljavanje u prvoj eksperimentalnoj generaciji

Izvor varijabilnosti	df	MS	F	p
parenje	1	0,664	27,423	0***
tretman	1	0,043	1,756	0,187
parenje x tretman	1	0,001	0,034	0,853

p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***

Kao i za fekunditet, u prvoj generaciji se uočava značajan efekat sistema parenja na vijabilitet jedinki. Fisher-ova LSD post hoc analiza pokazuje značajne razlike između jedinki „neozračenih“ S- i S+ grupa ($p=0,0004$), kao i između jedinki „ozračenih“ S- i S+ grupa ($p=0,0002$). U poređenju sa fekunditetom, preživljavanje pokazuje izraženije razlike između korišćenih sistema parenja.

Na Slici 11 je dat grafički prikaz srednjih vrednosti preživljavanja za eksperimentalne grupe. Vidljiv je isti obrazac kao i za prethodno analiziranu komponentu adaptivne vrednosti. Prosečno preživljavanje je veće kod eksperimentalnih grupa u kojima nije bilo mogućnosti izbora mužjaka za parenje.



Slika 11. Preživljavanje od stadijuma jaja do adulta za S- i S+ ukrštanja kontrolne i „ozračene“ grupe u prvoj eksperimentalnoj generaciji.

Pregled podataka koji su dobijeni za preživljavanje nakon tri generacije ukrštanja bez izbora partnera za parenje su prikazani u Tabeli 14.

Tabela 14. Deskriptivna statistika za osobinu preživljavanje u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji

Eksperimentalna grupa	min-max	$\bar{X} \pm S.E.$	SD	CV
S ⁻ neozračene	0,48-0,95	0,78 ± 0,02	0,11	14,213
S ⁻ ozračene	0,41-0,99	0,76 ± 0,02	0,15	19,607
S ⁺ neozračene	0,007-1	0,76 ± 0,01	0,17	21,952
S ⁺ ozračene	0,09-1	0,75 ± 0,01	0,16	20,543

S⁻ - bez izbora; S⁺ - višestruki izbor; \bar{X} – srednja vrednost; S.E. - standardna greška; SD – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije

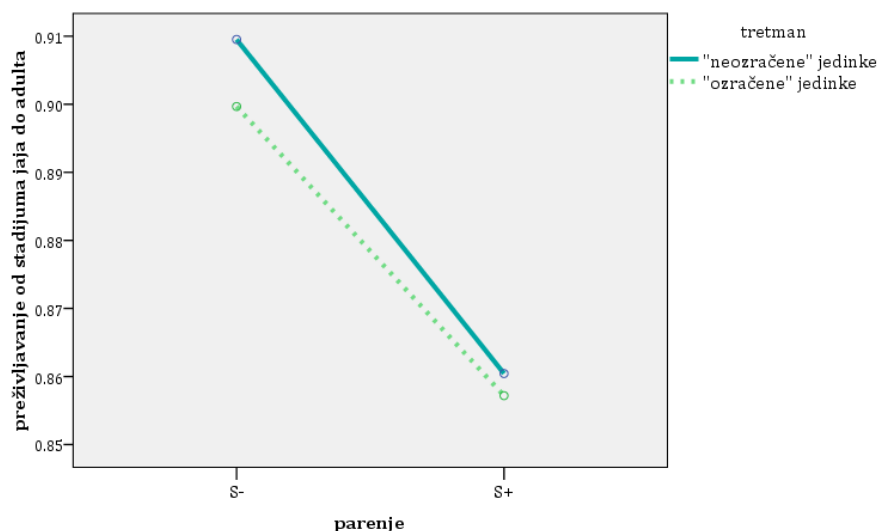
U Tabeli 15 su prikazani rezultati dvofaktorske analize varijanse za preživljavanje „neozračenih“ i „ozračenih“ eksperimentalnih grupa, sa istim sistemima parenja, nakon tri generacije ukrštanja jedinki bez mogućnosti izbora partnera za parenje.

Tabela 15. Dvofaktorska ANOVA za osobinu preživljavanje u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji

Izvor varijabilnosti	df	MS	F	p
parenje	1	0,105	3,437	0,065
tretman	1	0,002	0,07	0,791
parenje x tretman	1	0,001	0,018	0,894

p<0,05*; p<0,01**, p<0,001***

Rezultati ne pokazuju značajne efekte nijednog faktora korišćenog u eksperimentu. Jedino je uočen isti trend kao i u prethodnoj eksperimentalnoj generaciji, da je preživljavanje potomaka veće kod grupa u kojima jedinke nisu imale mogućnost izbora za parenje (odnosno kod S- grupa). Na Slici 12 je dat prikaz srednjih vrednosti preživljavanja na osnovu kojih se vidi navedeni trend.



Slika 12. Preživljavanje od stadijuma jaja do adulta za S- i S+ ukrštanja kontrolne i „ozračene“ grupe u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji.

Variranje preživljavanja između različitih generacija, sa istim sistemima parenja i tretmanima, analizirano je trofaktorskom analizom varijanse. Rezultati su prikazani u Tabeli 16. Oni pokazuju značajan efekat tipa parenja ($F=24,442$, $p<0,001^{***}$) na variranje vijabiliteta, kao i značajan efekat interakcije tipa parenja i generacije ($F=4,055$, $p=0,045^*$).

Tabela 16. Trofaktorska analiza varijanse za osobinu preživljavanje jaje-adult

Izvor varijabilnosti	df	MS	F	p-level
generacija	1	0,008	0,282	0,596
parenje	1	0,667	24,442	0***
tretman	1	0,041	1,485	0,224
generacija x parenje	1	0,111	4,055	0,045*
generacija x tretman	1	0,008	0,294	0,588
parenje x tretman	1	0,001	0,055	0,815
generacija x parenje x tretman	1	0,00006	0	0,99

p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***

Da bi se utvrdilo koje se eksperimentalne grupe značajno razlikuju uključivanjem u analizu i generacije kao izvora variranja preživljavanja, urađena je LSD post hoc analiza. Za interakciju generacije i parenja su dobijene značajne razlike između S- i S+ parenja u prvoj generaciji (p<0,001), i razlike sa manjim nivoom značajnosti u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji (p=0,04). Preživljavanje je veće kod S- grupa u obe generacije. Prosečna vrednost preživljavanja je veća kod S- grupa u prvoj generaciji u poređenju sa četvrtom generacijom, za razliku od S+ grupa čija je prosečna vrednost veća u četvrtoj generaciji.

4.2.3. Odnos polova

U Tabeli 17 je dat prikaz deskriptivne statistike i variranja procentualne zastupljenosti mužjaka u prvoj eksperimentalnoj generaciji.

Tabela 17. Deskriptivna statistika za odnos polova u prvoj eksperimentalnoj generaciji

Eksperimentalna grupa	min-max	$\bar{X} \pm S.E.$	SD	CV
S ⁻ neozračene	0,29-0,61	0,48 ± 0,01	0,06	13,085
S ⁻ ozračene	0,35-0,62	0,48 ± 0,01	0,06	12,602
S ⁺ neozračene	0,17-0,68	0,47 ± 0,005	0,08	16,375
S ⁺ ozračene	0,25-0,68	0,48 ± 0,005	0,07	15,682

S⁻ - bez izbora; S⁺ - višestruki izbor; \bar{X} – srednja vrednost; S.E. - standardna greška; SD – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije

Rezultati dvofaktorske analize varijanse uticaja tipa parenja i tretmana na variranje odnosa polova kod potomaka su predstavljeni u Tabeli 18.

Tabela 18. Dvofaktorska analiza varijanse za odnos polova u prvoj eksperimentalnoj generaciji

Izvor varijabilnosti	df	MS	F	p
parenje	1	0,001	0,377	0,54
tretman	1	0,00	0,003	0,956
parenje x tretman	1	0,001	0,48	0,489

p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***

Nijedan od faktora kontrolisanih u eksperimentu (ni sistem parenja, ni uvođenje mutacionih opterećenja) nema efekat na odnos polova. Nisu dobijene značajne razlike između eksperimentalnih grupa.

Deskriptivna statistika procentulne zastupljenosti mužjaka u potomstvu, sa parametrima kojima se opisuje i variranje iste osobine, za četvrtu eksperimentalnu generaciju je prikazana u Tabeli 19.

Tabela 19. Deskriptivna statistika za odnos polova u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji

Eksperimentalna grupa	min-max	$\bar{X} \pm S.E.$	SD	CV
S ⁻ neozračene	0,34-0,75	0,50 ± 0,01	0,07	15,01
S ⁻ ozračene	0,31-0,8	0,50 ± 0,01	0,09	18,451
S ⁺ neozračene	0,08-1	0,49 ± 0,006	0,09	18,764
S ⁺ ozračene	0,17-1	0,48 ± 0,005	0,08	17,23

S⁻ - bez izbora; S⁺ - višestruki izbor; \bar{X} – srednja vrednost; S.E. - standardna greška; SD – standardna devijacija; CV – koeficijent varijacije

Kao i za ostale analizirane osobine, i za odnos polova je urađena dvofaktorska analiza varijanse. Rezultati su predstavljeni u Tabeli 20.

Tabela 20. Dvofaktorska ANOVA za odnos polova u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji

Izvor varijabilnosti	df	MS	F	p
parenje	1	0,007	1,66	0,199
tretman	1	0,00	0,043	0,836
parenje x tretman	1	0,002	0,388	0,534

p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***

Značajne razlike između eksperimentalnih grupa nisu dobijene, kao i u prethodnoj eksperimentalnoj generaciji.

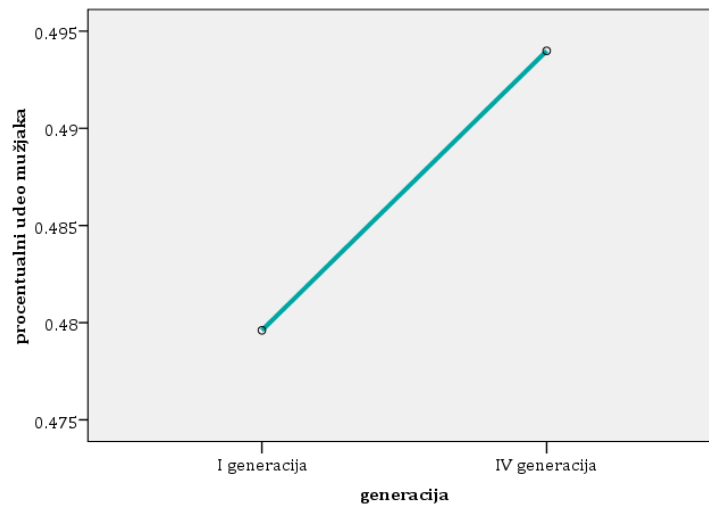
Uvođenjem i generacije kao faktora u variranju analizirane osobine urađena je trofaktorska analiza varijanse. Rezultati su prikazani u Tabeli 21.

Tabela 21. Trofaktorska analiza varijanse za odnos polova

Izvor varijabilnosti	df	MS	F	p-level
generacija	1	0,021	6,44	0,012*
parenje	1	0,006	1,932	0,165
tretman	1	0,00005306	0,016	0,898
generacija x parenje	1	0,001	0,399	0,528
generacija x tretman	1	0	0,039	0,844
parenje x tretman	1	0,00001175	0,004	0,952
generacija x parenje x tretman	1	0,003	0,84	0,36

p<0,05*; p<0,01**; p<0,001***

Analiza varijanse pokazuje značajne razlike između analiziranih eksperimentalnih generacija (Tabela 21). Na Slici 13 se vidi da je odnos polova približniji odnosu 1:1 u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji, odnosno da se u kasnijoj eksperimentalnoj generaciji procentualni udeo mužjaka povećao u odnosu na prethodnu eksperimentalnu generaciju.



Slika 13. Procentualni udeo mužjaka u eksperimentalnim generacijama.

5. DISKUSIJA

5.1. Reproduktivno ponašanje *D. subobscura*

Rezultati prvog eksperimentalnog dela ukazuju da potencijalno nasleđene heterozigotne mutacije kod mužjaka *D. subobscura* imaju relativno mali efekat na opšte stanje individua koje je mereno različitim komponentama ponašanja mužjaka tokom parenja. Iako je u eksperimentalnom dizajnu korišćeno 10 visoko inbridingovanih linija, sa 10 replika po svakoj kombinaciji linija, nisu detektovane značajne razlike između “neozračenih” i “ozračenih” linija za svaku kombinaciju ukrštanja. Ipak, detektovane su male razlike između ove dve eksperimentalne grupe, u koje su uključena sva ukrštanja svih mogućih kombinacija. Ovakav rezultat ukazuje na kompleksnost osobine koju nazivamo “stanje” (eng. *condition*) mužjaka. Ova osobina je najverovatnije determinisana velikim brojem gena (Rowe i Houle 1996), ali je činjenica i da indukovane mutacije u heterozigotnom stanju nemaju samo efekat na parenje i ponašanje tokom parenja. Većina mutacija je štetna u odnosu na opšte zdravlje/stanje i sve glavne komponente adaptivne vrednosti zavise, bar delimično, od opšteg stanja individue (Rowe i Houle 1996). Većina štetnih mutacija je recesivna i može biti maskirana u heterozigotnom stanju. Efekat mutacija zavisi od tipa mutacija, i njihovih različitih epistatičkih interakcija sa drugim genima, kao i plejotropnih efekata, koji se ne mogu predvideti (Pepin i sar. 2006). Uprkos svemu ovome, detektovana je slabija uspešnost u parenju “ozračenih” mužjaka u poređenju sa “neozračenim” mužjacima, što sugeriše da genetički kvalitet, koji je manipulisan indukovanjem mutacija, ima određeni efekat na uspešnost u parenju. Ovi rezultati ukazuju da opšte stanje mužjaka može da bude indikator genetičkog kvaliteta.

Analizirane osobine u eksperimentu su u različitoj meri zavisne od opšteg stanja, i predstavljaju važan aspekt reproduktivnog ponašanja, značajan za uspešnost u parenju. Veoma aktivni ritual udvaranja mužjaka, specifičan za ovu vrstu, je energetski zahtevan. U našoj studiji mutacije nisu pokazale efekat na odigravanje udvaranja, intenzitet udvaranja, latencu parenja i trajanje parenja. Ipak, “ozračeni”

mužjaci pokazuju dužu latencu udvaranja u poređenju sa “neozračenim” mužjacima što ukazuje na ulogu aktivnosti mužjaka u seksualnoj selekciji za genetički kvalitet kod *D. subobscura*.

Primenjenim eksperimentalnim dizajnom je bilo moguće meriti samo nekoliko osobina koji određuju atraktivnost mužjaka. Ipak, treba uzeti u obzir da je i atraktivnost veoma kompleksna osobina, koja predstavlja skup svih fizičkih, morfoloških i hemijskih signala koje mužjak nudi. Iako najverovatnije nijedna od osobina nije presudna za uspešnost u parenju, ne može se isključiti seksualna selekcija za genetički kvalitet preko aktivnosti mužjaka. Početak udvaranja je sigurno veoma važan korak u prirodnim uslovima, gde se mužjaci nalaze u kompeticiji sa drugim mužjacima.

D. subobscura je monandrična vrsta, ali po nekim podacima (Loukas i sar. 1981) mali procenat ženki se ponovo pari. Zbog monandrije, latenca parenja može biti od posebnog značaja kod mužjaka i njihovog uspeha u parenju (Monclus i Prevosti 1971). Iako rezultati u ovom eksperimentu ne pružaju direktan dokaz da mužjaci, potencijalni nosioci heterozigotnih mutacija, imaju dužu latencu parenja, u našim rezultatima je detektovana pozitivna korelacija između latence udvaranja i latence parenja kod “ozračenih” mužjaka. Duža latenca parenja verovatno smanjuje ukupnu uspešnost u parenju mužjaka, jer može redukovati broj parenja koje mužjak realizuje tokom svog celog života (Shackleton i sar. 2005; McGhee i sar. 2007). Kod monogamnih vrsta seksualna selekcija može postojati usled variranja u genetičkom kvalitetu, kompeticije mužjaka ili asortativnim parenjima (Parker 1983; Johnstone i sar. 1996). Seksualna selekcija takođe može biti jaka kod monogamnih vrsta (Andersson 1994). O seksualnoj selekciji kod *D. subobscura* nema puno literaturnih podataka. Nisu dobijeni konzistentni rezultati za morfološke osobine, kao npr. za veličinu krila ili veličinu tela, kao signala na osnovu koga ženka bira (Monclus i Prevosti 1971; Steele 1986; Steele i Partridge 1988). Za ovu vrstu je karakteristično specifično ponašanje mužjaka koji daruje tečne kapljice ženki tokom udvaranja (Steele

1986; Immonen i sar. 2009). Ženke sigurno biraju mužjake na osnovu nekoliko vrednosnih kriterijuma, jer se uglavnom pare samo jednom tokom celog života. Preference parenja koje su merene u ovom eksperimentu reflektuju izbirljivost ženki na osnovu atraktivnosti mužjaka, kojoj doprinose više osobina, između ostalog i merena aktivnost mužjaka prilikom udvaranja. Merenje preferenci ženki parenjima bez mogućnosti izbora mužjaka predstavlja standardni način merenja (Narraway i sar. 2010). Na taj način se eliminiše potencijalni uticaj kompeticije na uspešnost u parenju (Gowaty i sar. 2002; Shackleton i sar. 2005; Tregenza i sar. 2006b). Dobijeni rezultati našeg eksperimenta ukazuju da ženke imaju slabije preference prema mužjacima lošijeg genetičkog kvaliteta, što se vidi kroz značajno manju uspešnost u parenju "ozračenih" mužjaka. Takođe, mužjaci lošijeg genetičkog kvaliteta se udvaraju kasnije, što ukazuje da početak udvaranja kao mera aktivnosti, odnosno atraktivnosti, može da utiče na preference ženki.

Odsustva razlika između "neozračenih" i "ozračenih" mužjaka u intenzitetu udvaranja može biti objašnjeno činjenicom da je možda, kod vrsta kod kojih osobine ženki utiču na intenzitet udvaranja mužjaka, samo udvaranje manje informativno kao atribut mužjaka, koji reflektuje stanje organizma ili genetički kvalitet (Lehtonen i sar. 2011). Takođe, odnos između preference ženke i aktivnosti mužjaka tokom udvaranja, nije uvek jasan. Naime, ženke koriste višestruke signale prilikom odabira mužjaka (Petrie i Jennions 1997). One mogu biti "nedosledne" u svom izboru potencijalnih partnera za parenje, a u zavisnosti od mnogih sredinskih uslova, koja određuju njihovo opšte stanje. Iako rezultati ovog eksperimenta pokazuju da se linije ženki razlikuju u njihovim preferencama, možda intenzitet udvaranja nije važan signal za ženke, bar u navedenim eksperimentalnim uslovima. MacLellan i saradnici (2009) su u svom eksperimentu utvrdili da je seksualna selekcija protiv mužjaka sa mutacijama bila intenzivnija kad je u eksperiment uključena i potraga za ženkama radi parenja. Menjanjem uslova u kojima se parenja odigravaju se može uticati na nivoe napora koji mužjaci ulažu u potrazi za ženkama i njihovom pronalaženju. Sve je veći broj

istraživanja koji ukazuju na plastičnost izbora ženki kod velikog broja vrsta (Jennions i Petrie 1997; Cotton i sar. 2006; Hosken i House 2011; Ingleby i sar. 2013). Ženke neće imati iste preference u različitim uslovima sredine, a genetička osnova plastičnosti preference je potvrđena za neke vrste preko genotipsko sredinskih interakcija (Greenfield i Rodruguez 2004, Narraway i sar. 2010; Ingleby i sar.2013)

Intenzitet udvaranja i napor koji se ulaže u potrazi za ženkom najverovatnije zavise od stanja mužjaka. Stanje mužjaka se najčešće definiše i kao zdravlje i kao vigor mužjaka, i ne postoji njegova jasna mera (Whitlock i Agrawal 2009). Osim udvaranja i različitih mera intenziteta udvaranja, i neke druge osobine, kao što su kompeticija mužjaka, ili veličina tela, mogu biti pokazatelji stanja mužjaka (Andersson 1994; Whitlock i Agrawal 2009). S obzirom na kompleksnost ove osobine, koja ne uključuje samo genetičku pozadinu jedinki, nego i spoljašnje uslove, ne samo biotičke, već i uslove fizičke prirode, veoma je teško uspostaviti eksperimentalne uslove kojima bi se predvidela ispoljavanja mogućih razlika određenih osobina. S obzirom na vrlo intenzivnu igru udvaranja koja postoji kod ove vrste može se smatrati da merene osobine reproduktivnog ponašanja, u korišćenim uslovima, mogu, bar delimično, da impliciraju ulogu mutacija u ispoljavanju stanja i zdravlja mužjaka.

Naši rezultati ukazuju na značajan efekat genotipova i mužjaka i ženki na latencu udvaranja, intenzitet udvaranja (tj. aktivnost), latencu parenja i uspešnost u parenju. Odigravanje udvaranja nije pokazalo značajne razlike kako između genotipova mužjaka, tako ni između genotipova ženki, što ukazuje na nepostojanje varijabilnosti za ovu osobinu. Jedino je za trajanje kopulacije dobijen uticaj muškog genotipa kao jedini izvor varijabilnosti za ovu osobinu, s obzirom da nije ustanovljen efekat genotipa ženki. Ovi rezultati ukazuju da je trajanje kopulacije osobina koju kontrolišu jedino mužjaci. Trajanje kopulacije je uglavnom pod kontrolom mužjaka kod velikog broja vrsta roda *Drosophila*, što je potvrđeno kod *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. mojavensis* and *D. athabasca* (Mac Bean i sar. 1967; Parsons i sar. 1966;

Krebs 1991; Patty 1975). Literaturni podaci ukazuju da trajanje kopulacije može biti karakteristika oba pola. Ženke mogu da kontrolišu dužinu kopulaciju i da imaju korist od dužih kopulacija (Arnqvist 1989; Schneider i sar. 2006), kao što i duže kopulacije mogu biti "skupe" za ženke u određenim uslovima, kao što je npr. rizik od predatora (Barbosa 2011). Moguće su i različite optimalne vrednosti dužine kopulacija za mužjake i ženke zbog kojih može da proistekne seksualni konflikt (Arnqvist i Rowe 2005).

Izbor mužjaka, od strane ženki koje su u visokom stepenu inbridingovane, je retko analizirano. Individualna heterozigotnost ili inbriding mogu imati znatan uticaj na reproduktivni uspeh i izbirljivost jedinki (Kempnaers 2007). Nizak procenat kopulacija koji je dobijen u ovom eksperimentu može biti uzrokovan upravo korišćenjem visoko inbridingovanih linija. I rezultati Maynarda Smitha (1956) potvrđuju da se ženke češće pare sa outbridingovanim mužjacima, nego sa inbridingovanim. Verovatno kod *D. subobscura* inbriding ima veliki uticaj na učestalost kopulacija, bar u ograničenim vremenskim periodima (dva sata po stavljanju za parenje). Ograničavanje vremena za parenje je neophodno za određivanje preference ženki, a upotreba ovakvih linija je česta u merenju preferenci ženki, u dizajnu "bez izbora" (Narraway i sar. 2010). Inbridingovane ženke mogu biti izbirljivije, i više diskriminirajuće tokom odabiranja mužjaka za parenje, nego outbredovane (Mazzi 2004; Ilmonen i sar. 2009). Inbridingovane jedinke su generalno lošeg stanja, i kao takve mogu imati snažnije preference, iako je to suprotno nekim očekivanjima (Cotton i sar. 2006). To može biti od velikog značaja za detektovanje veoma malih razlika između „neozračenih“ i „ozračenih“ mužjaka.

Ako se uzme u obzir veliki broj replika, u isto vreme za obe eksperimentalne grupe i za svaku kombinaciju linija, svaka razlika između "neozračene" i "ozračene" grupe jedinki može biti pripisana mutacijama. U istraživanju Pekkala i saradnika (2009) se diskutuje da su možda dobijeni rezultati artefakt eksperimentalnog dizajna

jer su ženke prihvatale parenja sa bilo kojim mužjacima u odsustvu drugih, pa nisu mogle da izaberu boljeg. U pomenutom radu su merene osobine reproduktivnog ponašanja, u uslovima bez izbora i sa izborom. Efekat mutacija je dobijen jedino u uslovima bez izbora. Kako se kod *D. subobscura* ženke pare uglavnom samo jednom u životu, izbirljivost ženki je sigurno evoluirala u ovakvom sistemu. Naši rezultati za uspešnost u parenju pokazuju preferencu ženki prema određenom genotipu mužjaka, i ako bi pretpostavka o artefaktu dizajna "bez izbora" bila tačna, ne bi bilo razlika u preferenci ženki među linijama, kao ni u atraktivnosti mužjaka.

Ako ženke biraju da se pare sa mužjacima dobrog stanja, onda se može zaključiti da seksualna selekcija može da doprinese adaptivnim evolutivnim promenama. Jedan od modela seksualne selekcije, tzv. teorija "dobrih gena" i veliki broj sličnih istraživanja ističu ulogu ženki u izboru mužjaka dobrog kvaliteta sa kojim se pare (Zahavi 1975; 1977; Pomiankowski 1988; Maynard Smith 1991; Andersson 1994; Kokko i sar. 2003). Neka teorijska istraživanja su pokazala da seksualna selekcija može ubrzati širenje korisnih mutacija (Proulx 1999; Whitlock 2000) i da doprinese smanjenju genetičkih opterećenja .

Dobijeni rezultati pružaju određeni dokaz da seksualna selekcija za genetički kvalitet može da deluje putem uspešnosti u parenju i aktivnosti mužjaka tokom udvaranja i parenja.

5.2. Komponente adaptivne vrednosti i odnos polova

Drugi deo ove doktorske disertacije se odnosi na ispitivanje uloge seksualne selekcije u smanjivanju genetičkih opterećenja, ali preko analize fekunditeta i preživljavanja kao komponenti adaptivne vrednosti. Simultana ukrštanja “neozračenih” i “ozračenih” grupa, formiranih od istog genetičkog pula u eksperimentu, daju precizniju informaciju o efektima indukovanih naslednih mutacija na celokupnu adaptivnu vrednost, u zavisnosti od mogućnosti izbora partnera za parenje. Dobijeni rezultati ne mogu da potvrde ulogu seksualne selekcije u eliminaciji genetičkih opterećenja za obe komponente adaptivne vrednosti. Složena genetička osnova adaptivne vrednosti, postojanje različitih odnosa među komponentama, kao i kompleksnost delovanja seksualne selekcije, su samo neki od faktora koji ne mogu da daju jasnu sliku o celokupnom efektu (“net efektu”) na ukupnu adaptivnu vrednost populacija, prirodne selekcije s jedne, i seksualne selekcije sa druge strane. Kod većine vrsta sa polnim razmnožavanjem tok i pravac evolucije zavisi i od prisustva seksualnog konflikta. Ponekad njegovo postojanje može da prikrije ulogu seksualne selekcije u eliminaciji štetnih alela. Seksualni konflikt i njegov efekat se može opisati činjenicom da neke mutacije mogu imati isti smer delovanja na adaptivnu vrednost kod mužjaka i ženki, ali za neke važne lokuse mogu imati i suprotan (Arnqvist i Rowe 2005). Potencijalnog povećanja adaptivne vrednosti usled seksualne selekcije, u tom slučaju ne bi bilo, ili bi se adaptivna vrednost smanjila. Odnosno dobit seksualne selekcije, bi u tom slučaju, mogla biti “nadvladana” suprotnim efektima seksualnog konflikta. Treba uzeti u obzir i različito delovanje mutacija na adaptivne vrednosti mužjaka i ženki, ali i sa aspekta njihovog merenja. Razlog tome jeste činjenica da se smatra da je, na populacionom nivou, adaptivna vrednost određena primarno adaptivnom vrednošću ženki kod većine vrsta (Sharp i Agrawal 2008).

Naši rezultati pokazuju različiti efekat sistema parenja korišćenih u eksperimentu (bez izbora i sa višestrukim izborom), kao i različit efekat tretmana (bez i sa indukcijom mutacionih opterećenja) na merene komponente adaptivne

vrednosti. Jedino je za fekunditet, ali tek nakon pet generacija nakon uvođenja mutacionih opterećenja i održavanja bez izbora, jasno vidljiv efekat indukovanih mutacija. Tretman je pokazao značajne razlike u fekunditetu, i to značajno smanjene vrednosti kod "ozračenih" grupa u poređenju sa "neozračenim". Interakcija tretmana i parenja za datu osobinu, samo u okviru "ozračenih" grupa, predstavlja direktan pokazatelj da seksualna selekcija može da ima ulogu u eliminaciji štetnih mutacija. U prisustvu seksualne selekcije je fekunditet jedinki bio značajno veći u poređenju sa fekunditetom jedinki koje nisu imale izbor mužjaka za parenje.

Ako se fekunditet kao komponenta adaptivne vrednosti posmatra u okviru svake eksperimentalne generacije posebno, uočavaju se razlike u efektima primenjenih faktora na variranje ove osobine. U prvoj generaciji postoji efekat sistema parenja, dok u četvrtoj eksperimentalnoj generaciji nema tog efekta, već postoji efekat tretmana i njegova interakcija sa sistemom parenja. U poslednjoj generaciji nema posebnog efekta parenja jer se on „izgubio“ usled drastičnog sniženja prosečnog fekunditeta u tretiranoj grupi, kod parenja bez izbora.

Dalje se kao pitanje nameće zašto efekat tretmana nije bio vidljiv u prvoj eksperimentalnoj generaciji. Eksperiment je započet korišćenjem visoko inbridingovanih linija, homozigotnih za veći deo genskih lokusa ($F=0,96$). Nove mutacije, indukovane jonizujućim zračenjem, su bile jedini izvor genetičkih razlika između tretiranih i netretiranih grupa. Tokom mutageneze može da se poveća neravnoteža vezanosti, jer će svaka nova mutacija u populaciji biti u asocijaciji sa susednim alelima hromozoma na kom je i nastala. Do smanjenja neravnoteže vezanosti može doći usled rekombinacija. Iako je generalno uticaj mutacija na ukupnu neravnotežu vezanosti umeren ako se uzme u obzir niska stopa spontanih mutacija, u ovom slučaju, sa indukovanjem mutacija, ne treba zanemariti povećanje stope mutacija i posledice toga. Nakon tri generacije tzv. "relaksirajuće" selekcije (bez izbora, ukrštanjem po jedne ženke i jednog mužjaka) eksperimentalna postavka je ponovljena. Na taj način je eliminisana moguća, slučajno uspostavljena pozitivna

gametska neravnoteža između lokusa koji imaju samo uticaj na seksualnu selekciju, i lokusa koji utiču na druge komponente adaptivne vrednosti (Whitlock i Agrawal 2009).

Ponovljeno merenje fekunditeta i preživljavanja nakon nekoliko generacija u ovom eksperimentu eliminiše i potencijalne uticaje početnih ukrštanja. Naime, ukrštanjem visoko inbridingovanih linija se očekuje potomstvo sa visokim nivoom heterozigotnosti, a poznato je da se može dobiti hibridni vigor (heterozis) za različite komponente adaptivne vrednosti (Falconer 1981; Charlesworth i Charlesworth 1987; 1999).

U prvoj generaciji merenja komponenti adaptivne vrednosti ukrštene su heterozigotne jedinke. Iako je postojala i kontrolna grupa, efekat tretmana možda nije bio vidljiv usled postojanja heterotičnog efekta. U prilog ovoj pretpostavci ide i dobijena značajnost faktora generacija u analizi varijanse fekunditeta. Naime, uključivanjem obe generacije u zajedničku analizu uočava se efekat generacije na varijansu analizirane osobine. U prvoj eksperimentalnoj generaciji je prosečna vrednost fekunditeta bila veća u odnosu na četvrtu eksperimentalnu generaciju. Fekunditet je bio značajno veći u prvoj generaciji poređenjem bilo kojih eksperimentalnih grupa između generacija. Heterotični efekat za ovu osobinu je dobijen i kod *Drosophila melanogaster* ukrštanjem heterozigotnih linija dobijenih od visoko inbridingovanih linija, kao i analognim ukrštanjem linija u kojima su akumulirane mutacije tokom više generacija (Fry i saradnici 1998).

Dobijene razlike za interakciju generacije i parenja su dobijene usled razlike između generacija u primenjenim sistemima parenja. Naime, obrazac da je fekunditet manji kod grupa sa mogućnošću izbora u prvoj generaciji, nije isti kao u četvrtoj, gde nisu ni utvrđene razlike među parenjima. Dobijene razlike za interakciju generacije i tretmana su dobijene usled generacijskih razlika u tretmanima između “neozračenih” i “ozračenih” grupa. U prvoj generaciji nisu utvrđene razlike među njima, dok je u četvrtoj dobijena značajna razlika, fekunditet je bio veći kod neozračenih grupa. Svi

ovi rezultati trofaktorske analize varijanse odražavaju u stvari efekat tretmana u interakciji sa sistemom parenja koji je dobijen u trećoj generaciji, kao i međugeneracijske razlike.

Rezultati ovog eksperimenta, kao i drugih eksperimenata, ukazuju na uticaj velikog broja faktora u ispoljavanju fekunditeta kao osobine. Sličan način uvođenja mutacionih opterećenja u populacije, tj. indukovanje mutageneze pokazuje da zračenje smanjuje fekunditet (Radwan 2004), ali i da primena hemijskih mutagena nema takav efekat (Hollis i Houle 2011). Seksualna selekcija može smanjivati fekunditet, ali samo u slučaju održavanja populacija pod pritiskom seksualne selekcije (Hollis i Houle 2011).

Veće vrednosti fekunditeta kod grupa bez mogućnosti izbora, u "neozračenoj", kao i u "ozračenoj" grupi u prvoj generaciji, i sa istim trendom u "neozračenoj" grupi četvrte eksperimentalne generacije sugerišu na postojanje seksualnog konflikta kod *D. subobscura*. Naime, ako seksualna selekcija generalno deluje protiv štetnih mutacija, očekuje se da će u prisustvu seksualne selekcije mutaciona opterećenja biti niža (odnosno biće veća adaptivna vrednost), kao što će bez seksualne selekcije mutaciona opterećenja biti viša, a adaptivna vrednost manja. Postojanje seksualne selekcije utiče i na mogućnost postojanja seksualnog konflikta, koji takođe može imati uticaj na prosečnu adaptivnu vrednost (Chapman i sar. 1995; Pitnick i Garcia-Gonzalez 2002; Prasad i sar. 2007). U zavisnosti od komponenti adaptivne vrednosti koje se prate, seksualni konflikt može imati različite efekte, pa i negativni uticaj na adaptivnu vrednost. Naši rezultati ukazuju na mogućnost postojanja seksualnog konflikta i njegovog negativnog efekta. Adaptivne vrednosti ženki kod kojih je onemogućen izbor mužjaka reflektuju isključivo slučajnost u odnosu na sparivanje mužjaka i ženki. Ženke kojima je omogućena mogućnost izbora imaju manje vrednosti fekunditeta, i reflektuju izbor ženke. S obzirom da je seksualna selekcija omogućena postavljanjem pet ženki i pet mužjaka, može se razmatrati i uticaj kompeticije među mužjacima na

uspešnost u parenju, pored izbora ženki. Ako se uzme u obzir i biologija ove vrste, bar što se tiče parenja, dobijene rezultate treba sagledati i u tom kontekstu.

Kao što je već napomenuto, kod ove vrste je najčešće zastupljena monandrija, odnosno parenje ženki samo jednom tokom životnog ciklusa, dok je poliandrija registrovana u nekim populacijama (Loukas i saradnici 1981; Markow i O'Grady 2005). Monandrija u nekim populacijama drugih vrsta može biti zastupljena usled određenih nepovoljnih abiotičkih faktora (Valimaki i sar. 2006), čak i sa primerima klinalne varijabilnosti (Gaston 2000; Corley i Fjerdingsstad 2011). U prirodi je za druge vrste monandrija veoma retko zastupljena, iako se zna da postoji za određene vrste insekata (Arnqvist i Nilsson 2000; Hosken i sar. 2009). Kod *Drosophila* je poliandrija česta (Singh i sar. 2002). Monandrija može postojati usled koristi koju ona donosi ženkama (što bi predstavljalo veoma retku pojavu) ili verovatno kao posledica supresije mužjaka na ponovna parenja ženki (pregled u publikaciji Hoskena i sar. 2009). U slučaju da je monandrija nametnuta od strane muškog pola postojao bi i seksualni konflikt usled različitih strategija mužjaka i ženki koji se odnose na tipove parenja. Jedini sigurni način kojim bi mogla da se proveriti ova hipoteza jeste poređenje adaptivnih vrednosti ženki koje su se parile samo jednom i ženki koje su se parile više puta. Dosadašnji literaturni podaci ukazuju na nemogućnost višestrukog parenja ženki *Drosophila subobscura* u laboratorijskim uslovima (Holman i sar. 2008; Lize i sar. 2011), pa je i ovu hipotezu, teško proveriti. Dobijeni rezultati za druge vrste ukazuju na postojanje seksualnog konflikta usled poliandrije za neke komponente adaptivne vrednosti (pregled u Gowaty i sar. 2010).

Dosadašnja istraživanja sugerišu da je kod *D. subobscura* monandrija pre rezultat supresije mužjaka na ponovno parenje ženki, nego rezultat koristi koje ona daje ženkama. S obzirom da ženke mogu da uzimaju nutritivne darove i bez parenja, najverovatnije seminalni proteini suprimiraju ponovno parenje kod ove vrste (Immonen i sar. 2009). Ženke bi trebalo da su izbirljive s obzirom da se pare samo jednom, ali postoje i podaci koji ukazuju i na značajnost kompeticije mužjaka u

parenju. Naime, pokazano je da kopulacije kod ove vrste traju duže, kao i da je latenca kopulacije duža, ukoliko je mužjak pre parenja bio u kontaktu sa drugim mužjakom (Lize i sar. 2011). S obzirom da su naši podaci rezultat isključivo ukrštanja u kojima ženka nije imala izbor, i da je mužjak pre toga čuvan u izolaciji pojedinačno, dobijene razlike su isključivo zbog izbora ženke, a ne efekta kompeticije. Mužjaci ne bi trebalo da su uopšte izbirljivi, zbog malog broja receptivnih ženki usled monandrije, ali zbog čega su sigurno kompetitivniji.

Smanjen fekunditet ženki koje su imale mogućnost izbora mužjaka je rezultat istovremenog delovanja seksualne selekcije (izbora ženki i kompeticije mužjaka), i seksualnog konflikta. Međutim, kod ove vrste se uočeni seksualni konflikt ne može pripisati višestrukom parenju ženki kao kod drugih vrsta, korišćenih u svrhu provere hipoteze o ulozi seksualne selekcije u smanjivanju opterećenja (Hollis i sar. 2009; Hollis i Houle 2011).

U ovom slučaju je konflikt proistekao iz različitih strategija u parenju mužjaka i ženki. Naime, u grupi bez mogućnosti izbora se većina parenja odigrala, pa nametanje mužjaka za parenja nije uticalo na odluku o prihvatanju parenja. U grupi sa mogućnošću izbora je jedan isti mužjak mogao da oplodi više od jedne ženke, kako se mužjaci ove vrste pare više puta. Na taj način ženkama s kojim bi se pario kasnije ne bi obezbedio dovoljno sperme za oplodjenje jaja. Poznato je da se kod mnogih vrsta količina ejakulata smanjuje sa brojem kopulacija, što ukazuje na ograničenost broja spermatozoida i njihove zamene (Elzinga i sar. 2011). Time mužjaci i dalje imaju koristi da se pare više puta, i sa različitim ženkama, jer na taj način povećavaju broj svojih potomaka. Nasuprot tome, za ženke, parenje sa već sparenim mužjakom može biti štetno iz više razloga: manje sperme, produženo trajanje kopulacije, povećan rizik od neuspešnih fertilizacija, ili kraći životni vek (Kaitala i Wiklund 1995; Watanabe i sar. 1998; Hughes i sar. 2000; Jones i sar. 2006; Lauwers i Van Dyck 2006).

Dobijeni rezultati ukazuju da seksualna selekcija uspeva da "nadvlada" seksualni konflikt, odnosno cenu seksualne selekcije koja se ogleda u smanjenju adaptivne vrednosti, i to samo u slučaju povećanih mutacionih opterećenja. Postojanje kontrolnih, odnosno "neozračenih" grupa, i ukrštanja u okviru njih, dokazuju navedenu tvrdnju. Potpuno različit trend za vrednosti fekunditeta u okviru „neozračenih“ i „ozračenih“ grupa, za parenja bez i sa izborom, ukazuje na razlike koje zavise isključivo od veličine genetičkih opterećenja po kojima se ove dve eksperimentalne grupe i razlikuju. Ako je fekunditet smanjen u prisustvu seksualne selekcije zbog uspešnosti u parenju samo nekih mužjaka, suprotni rezultati kod „ozračenih“ grupa mogu jedino biti objašnjeni smanjenjem adaptivne vrednosti mužjaka u S- grupi, koje je veće u odnosu na smanjenje adaptivne vrednosti uzrokovano potencijalnim sukcesivnim parenjima mužjaka u S+ grupi.

Iako bi dobijeni efekat korišćenih sistema parenja mogao biti izbegnut upotrebom različitih operativnih odnosa polova, čak bi i veći broj mužjaka u odnosu na broj ženki podrazumevao povećanu kompeticiju mužjaka, koja dalje može voditi do konflikta. Pokazano je da se reproduktivna komponenta adaptivne vrednosti smanjuje sa povećanjem aktivnosti udvaranja u slučaju pojačane kompeticije mužjaka kod *Drosophila melanogaster* (Holland i Rice 1999; Friberg i Arnqvist 2003). Izgleda da je seksualni konflikt neminovan u slučaju delovanja seksualne selekcije.

Iako je već diskutovano o razlikama koje su dobijene između generacija, kao i različitim efektima u okviru njih, rezultati se mogu tumačiti i poređenjem sa drugim eksperimentima i njihovim dizajnima. Hollis i saradnici (2009) su na *D. melanogaster* merili adaptivne vrednosti tokom nekoliko generacija kontinualno, i ističu značajnost toga u poređenju sa samo jednim merenjem posle nekoliko generacija, ili sa naizmeničnim merenjima (merenjima sa pauzama od nekoliko generacija). Seksualna selekcija, sa potencijalnom ulogom u adaptaciji populacija, najverovatnije donosi korist populacijama već u prvim generacijama u novoj sredini, pre postizanja ravnoteže (Lorch i sar. 2003; Fricke i Arnqvist 2007). Ukoliko se populacije analiziraju

nakon velikog broja generacija rizikuje se uočavanje prvih promena, iako je, i merenjima koja uključuju i prve i kasnije generacije, moguće ispratiti dinamiku evolucionih procesa. U našem eksperimentu su iste komponente adaptivne vrednosti merene u razmaku od samo tri generacije, i može se reći da su sigurno sa njima detektovane neke od prvih promena. Održavanjem linija ukrštanjem slučajno odabranih po jedne ženke i jednog mužjaka pre svakog merenja komponenti adaptivne vrednosti, eliminiše se uticaj seksualne selekcije, a samim tim i seksualnog konflikta, koji bi eventualno mogao da smanji vrednosti fekunditeta posle nekoliko generacija.

Pored prilično velike raznolikosti u radovima koji se odnose na kratkoročne ili dugoročne eksperimente, uočavaju se i razlike u merenju uticaja seksualne selekcije u eliminaciji mutacionih opterećenja. Kod *D. melanogaster* su češće praćene promene učestalosti određenih mutiranih alela kroz generacije (Hollis i sar. 2009; Arbuthnott i Rundle 2012), dok su kod pomenute vrste, ali i drugih model organizama, uglavnom praćene promene određenih komponenti adaptivne vrednosti (McGuigan i sar. 2011; Radwan 2004; Radwan i sar. 2004; Hollis i Houle 2011). Iako bi bilo idealno meriti ukupnu adaptivnu vrednost tokom celog životnog veka organizama, najčešće preko adultnog životnog reproduktivnog uspeha (eng. *adult lifetime reproductive success - adult LRS*), eksperimentalna ograničenost uslovljava merenje fekunditeta i preživljavanja kao komponenti adaptivne vrednosti tokom jednog perioda životnog veka jedinki. Neka istraživanja ukazuju na mogućnost nereprezentativnosti kratkotrajnog merenja komponenti adaptivne vrednosti, a u zavisnosti od samog trajanja merenja, kao i od dužine života (Pekkala i sar. 2011). Sigurno je da od same vrste i njene biologije zavisi reprezentativnost merenja komponenti adaptivne vrednosti jedinki u različitom delu životnog ciklusa, ali u većini pomenutih eksperimenata je raspon merenja bio uglavnom kratak, od dva dana do dve nedelje, čime se naša merenja uklapaju u dati opseg. Stoga, dobijeni rezultati ne bi trebalo da budu posledica nereprezentativnosti primenjenih merenja komponenti adaptivne vrednosti.

Za razliku od fekunditeta, indukovana mutaciona opterećenja nisu imala efekat na preživljavanje od stadijuma jaja do adulta. Razlike u preživljavanju su uočljive za primenjene sistema parenja, kako u „neozračenju“, tako i u „ozračenju“ grupi. Trend smanjenja adaptivne vrednosti u grupi sa mogućnošću izbora je karakterističan i za ovu komponentu adaptivne vrednosti, što takođe ukazuje na mogućnost seksualnog konflikta, kao i za fekunditet. Naši rezultati nisu pokazali da seksualna selekcija povećava preživljavanje jedinki u slučaju povećanih mutacionih opterećenja usled jonizujućeg zračenja, za razliku od rezultata Radwana (2004). U tom radu preživljavanje je mereno na vrsti *Rhizoglyphus robini*, ali u prvoj generaciji nakon uvođenja mutacija. Moguće je da su u našem eksperimentu mutacije, koje su imale efekat na preživljavanje, uklonjene u prethodnoj generaciji, kao u pomenutom eksperimentu. Takva mogućnost postoji usled širokog spektra mutacija koje jonizujuće zračenje može da izazove, od tačkastih mutacija do hromozomskih aberacija (Evans i DeMarini 1999). Neke od mutacija mogu biti veoma štetne i shodno tome brzo elimisane iz populacije. Druge mutacije mogu ostajati u populaciji, ali ako one ne utiču i na uspešnost u parenju i na tzv. neseksualnu adaptivnu vrednost, uticaj seksualne selekcije na smanjenje mutacionih opterećenja ne može biti detektovan.

Mutacije mogu biti štetne u različitom stepenu u odnosu na različite komponente adaptivne vrednosti. Kakav će biti efekat veoma štetnih mutacija na populaciju u velikoj meri zavisi i od veličine populacije. Veoma štetne mutacije se „čiste“ kroz mali broj generacija čak i u malim populacijama, pa se može reći da nemaju efekat ako se posmatra dugoročno preživljavanje populacije (Wang i sar. 1999; Theodorou i Couvet 2006). Za njih je karakteristično smanjenje adaptivne vrednosti u prvim generacijama, posle čega populacije mogu brzo da se vrate u ravnotežu. Mnogo veći efekat na male populacije imaju srednje štetne mutacije, jer one uglavnom opstaju u populacijama, i dovode do konstantnog smanjivanja adaptivne vrednosti, što predstavlja veliki rizik za preživljavanje malih populacija (Lande 1994).

Mutacije koje utiču na različite komponente adaptivne vrednosti mogu da se razlikuju u stepenu dominantnosti u svom ispoljavanju. Ako su veoma štetne mutacije eliminisane pre naših analiza, sigurno je i da su takve mutacije ispoljavale dominantnost. Indukovane mutacije koje su opstale u "ozračenoj" populaciji su verovatno ostale skrivene, u heterozigotnom stanju, i mali broj generacija možda nije dozvolio ispoljavanje recesivnosti. To može biti razlog zašto nije uočen efekat tretmana za ovu osobinu.

Za preživljavanje nisu dobijene razlike među generacijama. U eksperimentu nije uočen heterotični efekat za ovu osobinu, što se delimično uklapa u rezultate Fry-a i saradnika (1998). Genofond populacije u ovom eksperimentu čini deset inbridingovanih linija, pa je moguće da se one nisu ni razlikovale u lokusima koji determinišu ovu komponentu adaptivne vrednosti. U tom slučaju ne bi bilo moguće dobiti efekat heterozisa.

Obrazac smanjenog preživljavanja u svim eksperimentalnim grupama sa mogućnošću izbora, u odnosu na grupe bez mogućnosti izbora, može biti posledica primenjenih sistema parenja, i korišćenog genofonda populacije. U grupi sa mogućnošću izbora je bilo moguće dobiti efekat inbridinga za neke lokuse, jer je i bila veća mogućnost sparivanja jedinki u nekom stepenu srodstva usled postavljanja pet ženki i pet mužjaka koji su poreklom od početnih deset linija.

Iako je pretpostavljen uticaj tretmana na odnos polova bio u pravcu smanjenog broja mužjaka u potomstvu, dobijeni rezultati za odnos polova su u skladu sa rezultatima efekta tretmana na preživljavanje. Kako preživljavanje nije smanjeno, dobijen je približno jednak broj mužjaka i ženki, kako u kontrolnoj tako i u eksperimentalnoj grupi.

6. ZAKLJUČCI

1. Seksualna selekcija može imati ulogu u smanjivanju mutacionih opterećenja populacija. Efekat seksualne selekcije zavisi od obima mutacionih genetičkih opterećenja, kao i od toga na koju komponentu adaptivne vrednosti utiče.

2. Potencijalno nasleđene heterozigotne mutacije kod mužjaka *D. subobscura* imaju relativno mali efekat na opšte stanje individua koje je mereno različitim komponentama ponašanja mužjaka tokom parenja. Ovakav rezultat ukazuje na kompleksnost osobine koju nazivamo stanje mužjaka.

3. Seksualna selekcija može da utiče na smanjivanje mutacionih genetičkih opterećenja preko uspešnosti u parenju mužjaka i aktivnosti mužjaka. Heterozigotni nosioci indukovanih mutacija su pokazali manju uspešnost u parenju, i kasniji početak udvaranja. Kako je uspešnost u parenju složena komponenta adaptivne vrednosti, determinisana velikim brojem gena, ona reflektuje veliki broj osobina koje su važne za reproduktivni uspeh mužjaka.

4. Dobijeni rezultati ne mogu da potvrde ulogu seksualne selekcije u eliminaciji mutacionih opterećenja za obe komponente adaptivne vrednosti. Složena genetička osnova adaptivne vrednosti, postojanje različitih odnosa među komponentama, kao i kompleksnost delovanja seksualne selekcije, samo su neki od faktora koji ne mogu da daju jasnu sliku o celokupnom efektu na ukupnu adaptivnu vrednost populacija, prirodne selekcije s jedne strane, i seksualne selekcije sa druge strane.

5. Indukovane mutacije imaju različit efekat na komponente adaptivne vrednosti. Efekat mutacija na adaptivnu vrednost je detektovan za njegovu komponentu fekunditet, što se ispoljilo smanjenim fekunditetom ženki. Efekat indukovanih mutacija nije detektovan za preživljavanje od stadijuma jaja do adulta. Kako preživljavanje nije smanjeno u uslovima povećanih mutacionih opterećenja, isti odnos polova u potomstvu u obe eksperimentalne grupe je očekivan.

6. Naši rezultati pokazuju različiti efekat sistema parenja korišćenih u eksperimentu (bez izbora i sa izborom), kao i različit efekat tretmana (bez i sa indukcijom mutacionih opterećenja) na analizirane komponente adaptivne vrednosti. Pozitivna uloga seksualne selekcije u eliminaciji štetnih alela je potvrđena za fekunditet, ali samo u uslovima povećanih mutacionih opterećenja. Sa seksualnom selekcijom potencijalni negativni efekti seksualnog konflikta mogu biti prevaziđeni, u slučaju smanjenog fekunditeta usled povećanog broja mutacija.

7. Dobijene veće vrednosti fekunditeta i preživljavanja u grupama bez mogućnosti izbora, u poređenju sa mogućnošću izbora, u većini eksperimentalnih grupa, ukazuju na postojanje seksualnog konflikta. Adaptivna vrednost grupa sa mogućnošću izbora predstavlja rezultat istovremenog postojanja seksualne selekcije i seksualnog konflikta, odnosno rezultat njihovih korisnih i štetnih efekata.

8. Uticaj seksualne selekcije na adaptivnu vrednost može varirati u zavisnosti od veličine opterećenja što se ogleda u tipovima i broju mutacija, načina održavanja eksperimentalnih grupa, i broja generacija u kojima se promene prate. Seksualna selekcija može ispoljavati različite efekte na adaptivnu vrednost, a pravac delovanja zavisi od velikog broja faktora koji definišu populaciju i koji tek treba da se ispituju.

7. LITERATURA

Agrawal, A.F. (2001) Sexual selection and maintenance of sexual reproduction. *Nature*, 411: 692-695.

Agrawal, A.F. (2002) Genetic loads under fitness-dependent mutation rates. *Journal of Evolutionary Biology*, 15: 1004-1010.

Agrawal, A.F. (2011) Are males the more “sensitive” sex? *Heredity*, 107(1): 20-21.

Ahuja, A. and Singh, R.S. (2008) Variation and evolution of male sex combs in *Drosophila* : nature of selection response and theories of genetic variation for sexual traits. *Genetics*, 179: 503–509.

Alexander, M.L., Bergendahl, J. and Brittain, M. (1959) Biological damage in mature and immature germ cells of *Drosophila virilis* with ionizing radiations. *Genetics*, 44: 979-999.

Amundsen, T. (2000) Why are females birds ornamented? *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 149-155.

Amundsen, T. and Forsgren, E. (2001) Male mate choice selects for female coloration in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 98: 13155-13160.

Andersson, M. B. (1994) *Sexual selection*. Princeton University Press.

Andjelkovic, M. and Marinkovic, D. (1983) Selection for copulation ability of *Drosophila subobscura* in the absence of light. *Behavior Genetics*, 13: 411-419.

Andjelkovic, M., Stamenkovic-Radak, M. and Sekulic, M. (1985) The daily activity rhythm of *D. subobscura* at Ravniste (Jastrebac) locality, Yugoslavia. *Acta Entomologica Yugoslavica*, 21(1-2): 109-118.

Arbuthnott, D. and Rundle, H.D. (2012) Sexual selection is ineffectual or inhibits the purging of deleterious mutations in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 66(7): 2127-2137.

Arnqvist, G. (1989) Multiple mating in a water strider: mutual benefits or intersexual conflict? *Animal Behaviour*, 38(5):749–756.

Arnqvist, G., and Nilsson, T. (2000) The evolution of polyandry: multiple mating and female fitness in insects. *Animal Behaviour*, 60:145–164.

Arnquist, G., and Rowe, L. (2005) *Sexual conflict*. Princeton University press.

Auerbach, C. (1954) Sensitivity of the *Drosophila* testis to the mutagenic action of x-rays. *Zeitschrift fur induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 86: 113-125.

Ayala, F.J. (1968) Genotype, environment and population number. *Science*, 162: 1453-1459.

Bachtrog, D. (2008) Evidence for Male-Driven Evolution in *Drosophila*. *Molecular Biology and Evolution*, 25(4):617–619.

Baer, C.F., Miyamoto, M.M. and Denver, D.R. (2007) Mutation rate variation in multicellular eukaryotes: causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*, 8: 619–631.

Bakker, T.C.M, Pomiankowski, A. (1995) The genetic basis of female mate preferences. *Journal of Evolutionary Biology*, 8: 129–171.

Barbosa, F. (2011) Copulation duration in the soldier fly: the roles of cryptic male choice and sperm competition risk. *Behavioral Ecology*, 22:1332–1336.

Barron, A.B. (2000) Anaesthetising *Drosophila* for behavior studies. *Journal of Insect Physiology*, 46: 439–442.

Basolo, A. L. (1990) Female preference predates the evolution of the sword in swordtail fish. *Science*, 250: 808–810.

Bateman, A. J. (1948) Intrasexual selection in *Drosophila*. *Heredity*, 2: 349–368.

Bateman, A.J. (1956) Mutagenic sensitivity of maturing *Drosophila* sperm. I. Dominant lethal. *Journal of Genetics*, 54: 400-410.

Bauer, V. L. and Aquadro C. F. (1997) Rates of DNA sequence evolution are not sex-biased in *Drosophila melanogaster* and *D.simulans*. *Molecular Biology and Evolution*, 14: 1252–1257.

Bjorklund, M., and Senar, J. C. (2001) Sex differences in survival selection in the serin, *Serinus serinus*. *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 841–849.

Blair, W.F. (1958) Effects of x-irradiation on a natural population of the deer mouse. *Ecology*, 39: 113-118.

Bonduriansky, R. (2001) The evolution of male mate choice in insects: a synthesis of ideas and evidence. *Biological Reviews*, 76: 305-339.

Brooks, R. (2000) Negative genetic correlation between male sexual attractiveness and survival. *Nature*, 406: 67-70.

Burley, N.T. and Foster, V.S. (2006) Variation in female choice of mates: condition influences selectivity. *Animal Behaviour*, 72: 713-719.

Candolin, U. (2003) The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews*, 78: 575-595.

Chapman, T., Liddle, L. F., Kalb, J. M., Wolfner, M. F. and Partridge, L. (1995) Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature*, 373: 241-244.

Charlesworth, B. (1980) The cost of sex in relation to mating system. *Journal of Theoretical Biology*, 84: 655-671.

Charlesworth, D. and Charlesworth, B. (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 18: 237-268.

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

Chenoweth, S. F. and Blows, M. W. (2006) Dissecting the complex genetic basis of mate choice. *Nature Reviews Genetics*, 7: 681-692.

Chippindale, A.K., Gibson J.R., and Rice, W.R. (2001) Negative genetic correlation for adult fitness between sexes reveals ontogenic conflict in *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 98: 1671-1675.

Clutton-Brock, T.H. (1991) *The Evolution of Parental Care*. Princeton University Press.

Clutton-Brock, T. (2007) Sexual selection in males and females. *Science*, 318: 1882-1885.

Clutton-Brock, T. (2009) Sexual selection in females. *Animal Behaviour*, 77: 3-11.

Cook, R.M. (1977) Behavioral role of the sex combs in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila simulans*. *Behavior Genetics*, 7: 349-357.

Corley, M., and Fjerdingstad, E. J. (2011) Mating strategies of queens in *Lasius niger* ants—is environment type important? *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 65: 889–897.

Cotton, S., Small J., and Pomiankowski, A. (2006) Sexual selection and condition-dependent mate preferences. *Current Biology*, 16: R755–R765.

Crow, J.F. (1948) Alternate hypotheses of hybrid vigor. *Genetics*, 33: 477–487.

Crow, J.F. (1958) Some possibilities for measuring selection intensities in man. *Human Biology*, 30: 1–13.

Crow, J.F. (2000) The origins, patterns and implications of human spontaneous mutation. *Nature Reviews Genetics*, 1: 40–47.

Darwin, C. (1871) *The descent of man, and selection in relation to sex*. London: John Murray.

Drake, J.W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J.F. (1998) Rates of Spontaneous Mutation. *Genetics*, 148: 1667–1686.

Drake, J. W. (1999) The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 870: 100–107.

Eens, M. and Pinxten, R. (2000) Sex-role reversal in Vertebrates behavioral and endocrinological accounts. *Behavioural Processes*, 51: 135–147.

Ellegren, H. (2007) Characteristics, causes and evolutionary consequences of male-biased mutation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 274: 1–10.

Ellis, L.B., and Kessler, S. (1975) Differential posteclosion housing experiences and reproduction in *Drosophila*. *Animal Behaviour*, 23: 949-952.

Elzinga, J.A., Chevasaco, V., Grapputo, A., and Mappes, J. (2011) Influence of male mating history on female reproductive success among monandrous Naryciinae (Lepidoptera: Psychidae). *Ecological Entomology*, 36: 170-180.

Endler, J. A. (1992) Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *American Naturalist*, 139(suppl.): S125-S153.

Endler, J. A. (1993) Some general comments on the evolution and design of animal communication systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, 340: 215-225.

Endler, J. A. and Basolo, A. (1998) Sensory ecology, receiver biases and sexual selection. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 415-420.

Eshel, I., Volovik, I., and Sansone, E. (2000) On Fisher-Zahavi's handicapped sexy son. *Evolutionary Ecology Research*, 2: 509-523.

Evans, H.H., and DeMarini, D.M. (1999) Ionizing radiation-induced mutagenesis: Radiation studies in *Neurospora* predictive for results in mammalian cells. *Mutation Research*, 437: 135-150.

Ewing, A. W., and Bennet-Clark, H. C. (1968) The courtship songs of *Drosophila*. *Behaviour*, 31: 288-301.

Eyre-Walker, A., and Keightley, P. D. (2007) The distribution of fitness effects of new mutations. *Nature Reviews Genetics*, 8: 610-618.

Fahmy, O.C. and Fahmy, M.J. (1964) Radiosensitivity of the stages of spermatogenesis to different mutations in *Drosophila melanogaster*. *Mutation Research*, 1: 247-267.

Falconer, D. S. (1989) *Introduction to Quantitative Genetics*. Longman, Essex, UK.

Fisher, R. A. (1930) *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Clarendon Press.

Foster, P.L. (1999) Mechanisms of stationary phase mutation: a decade of adaptive mutation. *Annual Review of Genetics*, 33: 57–88.

Friberg, U. and Arnqvist, G. (2003) Fitness effects of female mate choice: preferred males are detrimental for *Drosophila melanogaster* females. *Journal of Evolutionary Biology*, 16: 797–811.

Fricke, C. and Arnqvist, G. (2007) Rapid adaptation to a novel host in a seed beetle (*Callosobruchus maculatus*): the role of sexual selection. *Evolution*, 61: 440–454.

Fry, J.D., Heinsohn, S.L. and Mackay, T.F.C. (1998) Heterosis for viability, fecundity, and male fertility in *Drosophila melanogaster*: Comparison of mutational and standing variation. *Genetics*, 148: 1171–1188.

Fuller, R.C., Houle, D. and Travis, J. (2005) Synthesis: Sensory bias as an explanation for the evolution of mate preferences. *The American Naturalist*, 166 (4): 437-446.

Fuller C. R. (2009) A Test of the critical assumption of the sensory bias model for the evolution of female mating preference using neural networks. *Evolution*, 63(7): 1697–1711.

Gaston, K. J. (2000) Global patterns in biodiversity. *Nature*, 405: 20–227.

Gibson, J. R., Chippindale, A. K. and Rice, W. R. (2002) The X chromosome is a hot spot for sexually antagonistic fitness variation. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 269 (1490): 499-505.

Goho, S. and Bell, G. (2000) Mild environmental stress elicits mutations affecting fitness in *Chlamydomonas*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 267: 123–129.

Goodhead, D.T. (1994) Initial events in the cellular effects of ionising radiations: clustered damage in DNA. *International Journal of Radiation Biology*, 65: 7-17.

Gowaty, P.A., Steinichen, R. and Andersson, W.W. (2002) Mutual interest between the sexes and reproductive success in *Drosophila pseudoobscura*. *Evolution*, 56: 2537–2540.

Gowaty, P.A., Kim, Y.K., Rawlings, J., and Anderson, W. W. (2010) Polyandry increases offspring viability and mother productivity but does not decrease mother survival in *Drosophila pseudoobscura*. *PLOS*, 107(31): 13771-13776.

Greenfield, M.D. and Rodriguez, R.L. (2004) Genotype-environment interaction and the reliability of mating signals. *Animal Behavior* 68: 1461–1468.

Grossfield, J. (1968) The relative importance of wing utilisation in light dependent courtship in *Drosophila*. *Stud Genet Univ Tex Publ*, 6818: 147-156.

Gwyne, D. T. (1991) Sexual competition among females – what causes courtship-reversal. *Trends in Ecology and Evolution*, 6: 118-121.

Haag-Liautard, C., Dorris, M., Maside, X., Macaskill, S., Halligan, D.L., Charlesworth, B. and Keightley, P.D. (2007) Direct estimation of per nucleotide and genomic deleterious mutation rates in *Drosophila*. *Nature*, 445: 82-85.

Haldane, J. B. S. (1937) The effect of variation on fitness. *American Naturalist*, 71:337-349.

Halligan, D.L., and Keightley, P.D. (2006) Ubiquitous selective constraints in the *Drosophila* genome revealed by a genome-wide interspecies comparison. *Genome Research*, 16: 875-884.

Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P.D. (2001): PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol Electron* 4: 9.

Han, W. and Ngok Yu, K. (2009) Response of Cells to Ionizing Radiation. *Advances in Biomedical Sciences and Engineering*, 204-262.

Hedrick, P. W. (2007) Sex: differences in mutation, recombination, selection, gene flow, and genetic drift. *Evolution*, 61: 2750–2771.

Heisler, I., Andersson, M., Arnold, S., Boake, C., Borgia, G., Hausfater, G., Kirkpatrick, M., Lande, R., Maynard Smith, J. and O'Donald P. (1987) The evolution of mating preferences and sexually selected traits: group report. In: *Sexual selection: testing the alternatives*. Bradbury, J.W, and Andersson, M. (eds.), p. 97-218. John Wiley and Sons, Berlin, Germany.

Hettyey, A., Hegyi, G., Puurtinen, M., Hoi, H., Török, J. and Penn D.J. (2010) Mate choice for genetic benefits: Time to put the pieces together. *Ethology*, 116: 1-9.

Hine, E., Lachish, S., Higgin, M. and Blows, M.W. (2002) Positive genetic correlation between female preference and offspring fitness. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 269: 2215-2219.

Holland, B. and Rice, W.R. (1998) Chase-away sexual selection: antagonistic seduction versus resistance. *Evolution*, 52: 1-7.

Holland, B. and Rice, W.R. (1999) Experimental removal of sexual selection reverses intersexual antagonistic coevolution and removes a reproductive load. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 96:5083–5088.

Hollis, B., Fierst, J.L. and Houle, D. (2009) Sexual selection accelerates the elimination of a deleterious mutant in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 62(3): 324-333.

Hollis, B. and Houle, D. (2011) Populations with elevated mutation load do not benefit from the operation of sexual selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 24: 1918-1926.

Holman, L., Freckleton, R.P., and Snook, R.R. (2008). What use is an infertile sperm? A comparative study of sperm-heteromorphic *Drosophila*. *Evolution*, 62: 374-385.

Hosken, D.J. and Stockley, P. (2005) Sexual conflict. *Current Biology*, 15(14): R535-536.

Hosken, D. J., Stockley, P., Tregenza, T. and Wedell, N. (2009) Monogamy and the battle of the sexes. *Annual Review of Entomology*, 54:361–378.

Hosken, D.J. and House, C.M. (2011) Sexual selection. *Current Biology* 21: R62–R65.

Houle, D. (1991) Genetic covariance of fitness correlates: what genetic correlations are made of and why it matters. *Evolution*, 45:630–648.

Hughes, L., Siew-Woon Chang, B., Wagner, D. and Pierce, N.E. (2000) Effects of mating history on ejaculate size, fecundity, longevity, and copulation duration in the ant-tended lycaenid butterfly, *Jalmenus evagoras*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 47: 119–128.

Hunt, J., Brooks, R. and Jennions, M. D. (2005) Female mate choice as a condition dependent life-history trait. *American Naturalist*, 166: 79–92.

Hurst, L. D., and Ellegren H. (1998) Sex biases in the mutation rate. *Trends in Genetics*, 14: 446-452.

Ilmonen, P., Stundner, G., Thoß, M., and Penn, D.J. (2009) Females prefer the scent of outbred males: good-genes-as-heterozygosity? *BMC Evolutionary Biology*, 9: 104-113.

Immonen, E., Hoikkala, A., Kazem, A.J.N., Ritchie, M.G. (2009) When are vomiting males attractive? Sexual selection on condition-dependent nuptial feeding in *Drosophila subobscura*. *Behavioral Ecology*, 20: 289-295.

Ingleby, F. C., Hunt, J., Hosken, D. J. (2013) Genotype-by-environment interactions for female mate choice of male cuticular hydrocarbons in *Drosophila simulans*. *PLoS ONE* 8 (6): e67623.

Ives, P.T. (1960) The effects of γ -rays on fecundity and mutagenesis in Oregon-R males of *Drosophila*. *International Journal of Radiation Biology*, 2: 54-67.

Iwasa, Y. and Pomiankowski, A. (1994) The evolution of mate preferences for multiple sexual ornaments. *Evolution*, 48: 853-867.

Jennions, M. and Petrie, M. (1997) Variation in mate choice and mating preferences: a review of causes and consequences. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 72: 283–327.

Johnstone, R. A., Reynolds, J. D. and Deutsch, J. C. (1996) Mutual mate choice and sex differences in choosiness. *Evolution*, 50: 1382–1391.

Jones, T.M., McNamara, K.B., Colvin, P.G.R., Featherston, R. and Elgar, M.A. (2006) Mating frequency, fecundity and fertilization success in the hide beetle, *Dermestes maculatus*. *Journal of Insect Behavior*, 19: 357–371.

Jones, A.G. and Ratterman, N.L. (2009) Mate choice and sexual selection: What have we learned since Darwin? *PNAS*, 106 (1): 10001-10008.

Kaitala, A. and Wiklund, C. (1995) Female mate choice and mating costs in the polyandrous butterfly *Pieris napi* (Lepidoptera: Pieridae). *Journal of Insect Behavior*, 8: 355–363.

Kekic, V. (2002) The Drosophilae (Drosophilidae, Diptera) of Yugoslavia. In: Curcic B.P.M and Andjelkovic M. (eds.). *Genetics, Ecology, Evolution. Monographs*, , Institute of Zoology, Faculty of biology, University of Belgrade, Vol. VI: 109 -120.

Kempnaers, B. (2007) Mate Choice and Genetic Quality: A Review of the Heterozygosity Theory. *Advances in the study of behavior*, 37: 189-278.

Khishin, A.F.E. (1955) The response of the immature testis of *Drosophila* to the mutagenic action of X-rays. *Zeitschrift fur induktive Abstammungs- und Vererbungslehre*, 87: 97-112.

Kimura, M. (1961) Some calculations on the mutational load. *Japanese Journal of Human Genetics*, 36: 179-190.

Kimura, M. and Maruyama, T. (1966) The mutational load with epistatic gene interactions in fitness. *Genetics* 54: 137-1351.

Kirkpatrick, M. (1987) Sexual selection by female choice in polygynous animals. *Annu Rev Ecol Syst* 18:43-70.

Kirkpatrick, M. and Ryan, M.J. (1991) The evolution of mating preference and the paradox of the lek. *Nature*, 350: 33-38.

Kokko, H. (1998) Should advertising parental care be honest? *Proceedings of the Royal Society B*, 265: 1871-1878.

Kokko, H. (2001) Fisherian and "good genes" benefits of mate choice: how (not) to distinguish between them. *Ecology Letters*, 4: 322-326.

Kokko, H., Brooks, R., Jennions, M.D., and Morley, J. (2003) The evolution of mate choice and mating biases. *Proceedings of the Royal Society B*, 270: 653-664.

Kondrashov, A.S. (1982) Selection against harmful mutations in large sexual and asexual populations. *Genetical Research*, 40: 325-332.

Kondrashov, A.S. (1988) Deleterious mutations and the evolution of sexual reproduction. *Nature*, 336: 435-440.

Kondrashov, F.A. and Kondrashov, A.S. (2010) Measurements of spontaneous rates of mutations in the recent past and the near future. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B*, 365: 1169-1176.

Krebs, R.A. (1991) Function and genetics of long versus short copulations in the cactophilic fruit fly, *Drosophila mojavensis* (Diptera, Drosophilidae). *Journal of Insect Behavior*, 4: 221-233.

Krimbas, C.B. (1993). *Drosophila subobscura: Biology, Genetics, and Inversion Polymorphism*. Verlag Dr. Kovac, Hamburg.

Lande, R. (1980) Sexual dimorphism, sexual selection, and adaptation in polygenic characters. *Evolution*, 34:292-305.

Lande, R. (1981) Models of speciation by sexual selection on polygenic traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 78: 3721-3725.

Lande, R. (1994) Risk of population extinction from fixation of new deleterious mutations. *Evolution*, 48: 1460-1469.

Lauwers, K. and Van Dyck, H. (2006) The cost of mating with a non-virgin male in a monandrous butterfly: experimental evidence from the speckled wood, *Pararge aegeria*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60: 69–76.

Lehtonen, T.K., Svensson P.A., and Wong B.M. (2011). Both male and female identity influence variation in male signaling effort. *BMC Evolutionary Biology*, 11: 233.

Li, W. H., Yi, S. J. and Makova K. (2002) Male-driven evolution. *Current Opinion in Genetics and Development*, 12: 650-656.

Lize, A., Doff, R.J., Smaller, E.A., Lewis, Z., and Hurst, G.D.D. (2011) Perception of male-male competition influences *Drosophila* copulation behavior even in species where females rarely remate. *Biology Letters*, 8: 35-38

Lloyd, D.G. (1979) Some reproductive factors affecting the selection of self-fertilization in plants. *American Naturalist*, 113: 67-79.

Loewe, L. and Hill, W.G. (2010) The population genetics and mutations: good, bad and indifferent. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, 365: 1153-1167.

Lorch, P.D., Proulx, S., Rowe, L., Day, T. (2003) Condition-dependent sexual selection can accelerate adaptation. *Evolutionary Ecology Research*, 5: 867–881.

Loukas, M., Vergini, Y., and Krimbas, C. B. (1981) The genetics of *Drosophila subobscura* populations. XVIII. Multiple insemination and sperm displacement in *Drosophila subobscura*. *Genetica*, 57: 29–37.

- Lynch, M., Conery, J. and Bürger, R. (1995a) Mutation accumulation and the extinction of small populations. *American Naturalist*, 146: 489-518.
- Lynch, M., Conery, J. and Bürger, R. (1995b) Mutational meltdowns in sexual populations. *Evolution*, 49: 1067-1080.
- Lynch, M., Blanchard, E., Houle, D., Kibota, T., Schultz, S., Vassilieva, L., and Willis, J. (1999) Perspective: spontaneous deleterious mutation. *Evolution*, 53(3): 645-663.
- Lynch, M. and Conery, J.S. (2003) The origins of genome complexity. *Science*, 302: 1401-1404.
- Lynch, M. (2010) Evolution of the mutation rate. *Trends in Genetics*, 26: 345-352.
- MacBean, I.T. and Parsons, P.A. (1967) Directional selection for duration of copulation in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 56: 233-239.
- MacLellan, K., Whitlock, M. C., Rundle, H. D. (2009) Sexual selection against deleterious mutations via variable male search success. *Biology Letters*, 5: 795-797.
- Mallet, M.A. and Chippindale, A.K. (2010) Inbreeding reveals stronger net selection on *Drosophila melanogaster* males: implications for mutation load and the fitness of sexual females. *Heredity*, 106(6): 994-1002.
- Markow, T. A. (1988) Reproductive behavior of *Drosophila* in the laboratory and in the field. *Journal of Comparative Physiology*, 102: 169-173.
- Markow, T. A. and Ricker, J. P. (1992) Male size, developmental stability, and mating success in natural populations of three *Drosophila* species. *Heredity*, 69: 122-127.
- Markow, T. A., Bustoz, D. and Pitnick, S. (1996) Sexual selection and a secondary sexual character in two *Drosophila* species. *Animal Behaviour*, 52: 759-766.
- Markow, T.A. and O'Grady, P. (2005) *Drosophila*: a guide to species identification and use. London, UK: Academic.

Marinković, D. i Anđelković, M. (1969) Dejstvo jonizujućeg zračenja na izazivanje genetičkih opterećenja koji smanjuju vijabilitet, seksualnu aktivnost i fertilitet kod *Drosophila melanogaster*. Genetika, 1: 139-145.

Matsuba, C., Ostrow, D.G., Salomon, M.P., Tolani, A., and Baer, C.F. (2012) Temperature, stress and spontaneous mutation in *Caenorhabditis briggsae* and *Caenorhabditis elegans*. Biology letters, doi: 10.1098/rsbl.2012.0334.

Maynard Smith, J. (1956). Fertility, mating behavior and sexual selection in *Drosophila subobscura*. Journal of Genetics, 54: 261-279.

Maynard Smith, J. (1991). Theories of sexual selection. Trends in Ecology and Evolution, 6: 146–151.

Mays, H.L. and Hill, G.E. (2004) Does compatibility matter? Trends in Ecology and Evolution, 19(10): 554-559.

Mays, Jr. H.L. and Hill, G.E. (2004) Choosing mates: good genes versus genes that are a good fit. Trends in Ecology and Evolution, 19(10): 554-559.

Mazzi, D., Kunzler, R., Largiader, C.R., and Bakker, T.C.M. (2004) Inbreeding affects female preference for symmetry in computer-animated sticklebacks. Behavior Genetics, 34: 417-424.

McGhee, K.E., Fuller, R.C., and Travis, J. (2007) Male competition and female choice interact to determine mating success in the bluefin killifish. Behavioral Ecology, 18: 822-830.

McGuigan, K., Petfield, D., and Blows, M.W. (2011) Reducing mutational load through sexual selection on males. Evolution, 65: 2816-2829.

Mead, L.S. and Arnold, S.J. (2004) Quantitative models of sexual selection. Trends in Ecology and Evolution, 19: 264–271.

Merila, J., Sheldon, B. C. and Ellegren, H. (1997) Antagonistic natural selection revealed by molecular sex identification of nestling collared flycatchers. *Molecular Ecology*, 6: 1167–1175.

Møller, A. P. and Pomiankowski, A. (1993) Why have birds got multiple sexual ornaments? *Behavioural Ecology and Sociobiology*, 32: 167-176.

Monclus, M. and Prevosti, A. (1967) Velocidad de apareamiento y tamaño en *Drosophila subobscura*. *Portugaliae Acta Biologica*, 10: 195-200.

Monclus, M. and Prevosti, A., (1971). The relationship between mating speed and wing length in *Drosophila subobscura*. *Evolution*, 25: 214-217.

Moore, A.J. (1989) Sexual selection in *Nauphoeta cineria*: inherited mating preference. *Behavior Genetics*, 19: 717–724.

Muller, H.J. (1950) Our load of mutations. *American Journal of Human Genetics*, 2: 111-176.

Narraway, C., Hunt, J., Wedell, N. and Hosken, D.J. (2010) Genotype-by-environment interactions for female preference. *Journal of Evolutionary Biology*, 23: 2550–2557.

Ng, C.S. and Kopp, A. (2008) Sex combs are important for male mating success in *Drosophila melanogaster*. *Behavior Genetics*, 38: 195–201.

Nikjoo, H., Munson, R.J., Bridges, B.A. (2000) RBE-LET relationships in mutagenesis by ionizing radiation. *Journal of Radiation Research*, 40 (Supplement): 85-105.

Nikjoo, H., O'Neill, P., Wilson, W.E., Goodhead, D.T. (2001) Computational approach for determining the spectrum of DNA damage by ionising radiation. *Radiation Research*, 156: 577-583.

Nikjoo, H., Bolton, C.E., Watanabe, R., Terrissol, M., O'Neill, P., Goodhead, D.T. (2002) Modelling of DNA damage induced by energetic electrons (100eV to 100keV). *Radiation Protection Dosimetry*, 99: 77-80.

Otto, S.P. and Marks J.C. (1996) Mating systems and the evolutionary transition between haploidy and diploidy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 57: 197-218.

Pascual, M., Constanti, M., Ribo, G. and Prevosti, A. (1990) Genetic changes in mating activity in laboratory strains of *Drosophila subobscura*. *Genetica*, 80(1): 39-43.

Parker, G.A. (1979) Sexual selection and sexual conflict. In *Sexual Selection and Reproductive Competition in Insects*. (M.S. Blum and N.A. Blum, eds.) New York: Academic Press. pp 123-166.

Parker, G.A. (1983) Mate quality and mating decisions. In *Mate choice* (ed. P. Bateson), Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 141-166.

Parsons, P.A. and Kaul, D. (1966) Mating speed and duration of copulation in *Drosophila pseudoobscura*. *Heredity*, 21: 219-225.

Partridge, L., Hoffman, A. and Jones, S. (1987) Male size and mating success in *Drosophila melanogaster* and *Drosophila pseudoobscura* under field conditions. *Animal Behaviour*, 35: 468-476.

Pavkovic-Lucic, S. and Kekic, V. (2011) Are larger and/or more symmetrical *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) males more successful in matings in nature? *Revista Brasileira de Entomologia*, 55(4): 583-588.

Patty, R.A. (1975) Investigation of genetic factors influencing duration of copulation in 'eastern' and 'western' *Drosophila athabasca*. *Animal Behaviour*, 23: 344-348.

Pegueroles, G. (1996). Analysis of inbreeding in a colonizing population of *Drosophila subobscura*. *Genetica*, 98: 289-296.

Pekkala, N., Puurtinen, M. and Kotiaho J.S. (2009) Sexual selection for genetic quality: disentangling the roles of male and female behavior. *Animal Behaviour*, 78: 1357-1363.

Pekkala, N., Kotiaho, J.S. and Puurtinen, M. (2011) Reproductive success and fitness surrogates in a *Drosophila littoralis* population. *PLoS ONE*, 6(9): e24560.

Pepin, K. M., Samuel, M.A. and Wichman, H. A. (2006) Variable pleiotropic effects from mutations at the same locus hamper prediction of fitness from a fitness component. *Genetics*, 172: 2047–2056.

Petrie, M. and Roberts, G. (2007) Sexual selection and the evolution of evolvability. *Heredity*, 98: 198-205.

Pitnick S. and Garcia-Gonzalez F. (2002) Harm to females increases with male body size in *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 269: 1821–1828.

Polak, M., Starmer, W. T. and Wolf, L. L. (2004) Sexual selection for size and symmetry in a diversifying secondary sexual character in *Drosophila bipectinata*. *Evolution*, 58(3): 597–607.

Pomiankowski, A. (1988) The evolution of female mating preferences for male genetic quality. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 5: 136–184.

Pomiankowski, A. and Iwasa, Y. (1993) Evolution of multiple sexual preferences by Fisher runaway process of sexual selection. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B*, 253: 173–181.

Prasad, N. G., Bedhomme, S., Day, T. and Chippindale, A. K. (2007) An evolutionary cost of separate genders revealed by male-limited evolution. *American Naturalist*, 169: 29–37.

Price, T., Schluter, D., and Heckman, N.E. (1993) Sexual selection when the female directly benefits. *Biological Journal of the Linnean Society*, 48: 187–211.

Price, D. K. and Burley, N. T. (1994) Constraints on the evolution of attractive traits: selection in male and female zebra finches. *American Naturalist*, 144: 908–934.

Proulx, S.R. (1999) Mating systems and the evolution of niche breadth. *American Naturalist*, 154: 89-98.

Radwan, J. (2004) Effectiveness of sexual selection in removing mutations induced with ionizing radiation. *Ecology Letters*, 7: 1149-1154.

Radwan, J., Unrug, J., Snigorska, K., and Gawronska, K. (2004) Effectiveness of sexual selection in preventing fitness deterioration in bulb mite populations under relaxed natural selection. *Journal of Evolutionary Biology*, 17: 94-99.

Rice, W.R. (1984) Sex chromosomes and the evolution of sexual dimorphism. *Evolution*, 38: 735–742.

Rice, W.R. (1992) Sexually antagonistic genes: Experimental evidence. *Science*, 256: 1436-1439.

Rice, W.R. (1996) Sexually antagonistic male adaptation triggered by experimental arrest of female evolution. *Nature*, 381: 232-234.

Rice, W.R. (1998) Requisite mutational load, pathway epistasis, and deterministic mutational accumulation in sexual versus asexual populations. *Genetica*, 102/103: 71-81.

Rowe, L., and Houle, D. (1996) The lek paradox and the capture of genetic variance by condition dependent trait. *Proceedings of the Royal Society B*, 263: 1415-1421.

Rumball, W. (1994) Decline in heterozygosity under full-sib and double first-cousin inbreeding in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 136: 1039-1049.

Ryan, M.J. (1990) Sexual selection, sensory systems and sensory exploitation. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*, 7: 157-195.

Ryan, M.J. (1998) Sexual selection, receiver biases, and the evolution of sex differences. *Science*, 281: 1999-2003.

Savic, M., Savic, T., Pavkovic – Lucic, S., Stamenkovic – Radak, M. and Andjelkovic, M. (2007) Mating success and developmental stability of two male sexual traits in *Drosophila subobscura*. 11th European Congress for Evolutionary Biology, Uppsala, Sweden, 20-25. 08. 2007. 24-57P, p. 470.

Savic Veselinovic, M., Kurbalija Novicic, Z., Jelic, M., Tanaskovic, M., and Andjelkovic, M. (2013) Can mutational load be reduced through selection on males? 14th Congress of the European Society for Evolutionary Biology, Lisbon, Portugal, 19-24. 08. 2013. D21SY25PS1033, p. 974.

Schwartz, J.L., Jordan, R., Sun, J., Ma, H., and Hsieh, A.W. (2000) Dose-dependent changes in the spectrum of mutations induced by ionizing radiation. *Radiation Research*, 153(3): 312-7.

Shackleton, M.A., Jennions, M.D. and Hunt, J. (2005) Fighting success and attractiveness as predictors of male mating success in the black field cricket, *Teleogryllus commodus*: the effectiveness of no-choice tests. Behavioral Ecology and Sociobiology, 58: 1–8.

Sharma, M.D., Tregenza, T. and Hosken, D.J. (2010) Female mate preferences in *Drosophila simulans*: evolution and costs. Journal of Evolutionary Biology, 23: 1672–1679.

Schneider, J.M., Gilberg, S., Fromhage, L., Uhl, G. (2006) Sexual conflict over copulation duration in a cannibalistic spider. Animal Behaviour, 71(4):781–788.

Sharp, N.P. and Agrawal, A.F. (2008) Mating density and the strength of sexual selection against deleterious alleles in *Drosophila melanogaster*. Evolution, 62(4): 857–867.

Sharp, N. and Agrawal, A. (2012) Evidence for elevated mutation rates in low-quality genotypes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 109: 6142–6146.

Shiomi T. (1967) Sensitivity differences in successive stages of spermatogenesis in *Drosophila* after irradiation in nitrogen or air. Mutation Research, 4: 323-332.

Siller, S. (2001) Sexual selection and maintenance of sex. Nature, 411: 689-692.

Singh, S.R., Singh, B.N., Hoenigsberg, H.F. (2002) Female remating, sperm competition and sexual selection in *Drosophila*. Genetics and Molecular Research, 1(3): 178-215.

Sobels, F.H. (1965) Radiosensitivity and repair in different germ cell stages of *Drosophila*. "Genetics today" Vol 2., Proc. XI Inter. Congr. Genet. , the Hague, 1963 (ed. S.J. Geerts). Pergamon Press, Oxford, 235-254.

Spalding, J.F., Brooks, M.R., Tietjen, G.L. (1969) Lifetime, body weights and mortality distribution of mice with 10 to 50 generations of ancestral x-ray exposure. *Genetics*, 63: 897-906.

Spieth, H.T. (1952) Mating behavior within the genus *Drosophila* (Diptera). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 99: 395-474.

Steele, R.H. (1986a) Courtship feeding in *Drosophila subobscura*. 1. The nutritional significance of courtship feeding. *Animal Behaviour*, 34: 1087-1098.

Steele, R.H. (1986b) Courtship feeding in *Drosophila subobscura*. 2. Courtship feeding by males influences female mate choice. *Animal Behaviour*, 34: 1099-1108.

Steele, R.H. and Partridge, L. (1988) A courtship advantage for small males in *Drosophila subobscura*. *Animal Behaviour* 36: 1190-1197.

Steele, D.F. and Jinks-Robertson, S. (1992) An examination of adaptive reversion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 132: 9-21.

Thacker, J. (1986) The nature of mutants induced by ionising radiation in cultured hamster cells. *Mutation Research*, 160: 267-75.

Theodorou, K. and Couvet, D. (2006) On the expected relationship between inbreeding, fitness, and extinction. *Genetics, Selection, Evolution*, 38:371-387.

Tracey, M.L. and Ayala, F.J. (1974) Genetic loads in natural populations: It is compatible with the hypothesis that many polymorphisms are maintained by natural selection? *Genetics*, 77: 569-589.

Tregenza, T. and Wedell, N. (2000) Genetic compatibility, mate choice and patterns of parentage. *Molecular Ecology*, 9: 1013-1027.

Tregenza, T., Wedell, N. and Chapman, T. (2006a) Introduction. Sexual conflict: a new paradigm? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B*, 361: 229-234.

Tregenza, T., Simmons, L.W., Wedell, N. and Zuk, M. (2006b) Female preference for male courtship song and its role as a signal of immune function and condition. *Animal Behaviour*, 72: 809-818.

Trivers, R. (1972) Parental investment and sexual selection. In B. Campbell (Ed.). *Sexual selection and the descent of man: 1871-1971* (pp. 136-179). Chicago: Aldine.

Välimäki, P., Kaitala, A. and Kokko H. (2006) Temporal patterns in reproduction may explain variation in mating frequencies in the green-veined white butterfly *Pieris napi*. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 61:99-107.

Vishalashi, C. and Singh, B.N. (2008) Mating success is not correlated with fluctuating asymmetry in *Drosophila ananassae*. *Current Science*, 94: 375-381.

Von Sonntag, C. (1987) *The Chemical Basis of Radiation Biology*. Taylor and Francis, London.

Vorobotsova, I.E. (2000) Irradiation of male rats increases the chromosomal sensitivity of progeny to genotoxic agents. *Mutagenesis*, 15(1): 33-38.

Wallace, B. (1991) *Fifty years of genetic load*. Cornell University Press.

Wang, J.L., Hill, W.G., Charlesworth, D., Charlesworth, B. (1999) Dynamics of inbreeding depression due to deleterious mutations in small populations: mutation parameters and inbreeding rate. *Genetical Research*, 74: 165–178.

Ward, J.F. (1995) Radiation mutagenesis: the initial DNA lesion responsible. *Radiation Research*, 142: 362-8.

Ward, J.E. (1998) Nature of lesions formed by ionizing radiation. In *DNA damage and Repair*. Human Press, Totowa NJ, Volume 2, 1998.

Watanabe, M., Wiklund, C. and Bon'no, M. (1998) The effect of repeated matings on sperm numbers in successive ejaculates of the cabbage white butterfly *Pieris rapae* (Lepidoptera: Pieridae). *Journal of Insect Behavior*, 11: 559–570.

West-Eberhard, M.J. (1984) Sexual selection, competitive communication and species-specific signals in insects. In: Lewis T, editor. *Insect communication*. London: Academic Press; p. 283-324.

Whitlock, M.C. (2000) Fixation of new alleles and the extinction of small populations: drift load, beneficial alleles, and sexual selection. *Evolution*, 54: 1855-1861.

Whitlock, M.C. and Bourguet, D. (2000) Factors affecting the genetic load in *Drosophila*: synergistic epistasis and correlations among fitness components. *Evolution*, 54(5): 1654-1660.

Whitlock, M.C. and Agrawal, A.F. (2009) Purging the genome with sexual selection: Reducing mutation load through selection on males. *Evolution*, 63: 569-582.

Willis, P.M., Ryan, M.J. and Rosenthal, G.G. (2011) Encounter rates with conspecific males influence female mate choice in a naturally hybridizing fish. *Behavioral Ecology*, 22: 1234-1240.

Zahavi, A. (1975) Mate selection: a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology*, 53: 205-214.

Zahavi, A. (1977) Cost of honesty (further remarks on handicap principle). *Journal of Theoretical Biology*, 67: 603-605.

Zeh, J.A. and Zeh, D.W. (1996) The evolution of polyandry I: intragenomic conflict and genetic compatibility. *Proceedings of the Royal Society B*, 263: 1711-1717.

Zeh, J.A. and Zeh, D.W. (1997) The evolution of polyandry II: postcopulatory defences against genetic incompatibility. *Proceedings of the Royal Society B*, 264: 69-75.

Zimonjić, D.B, Savković, N., Anđelković, M. (1990) Genotoksični agensi: Efekti, principi I metodologija detekcije. Naučna knjiga. Beograd.

Yamazaki, K., Boyse, E.A., Mike, V., Thaler, H.T., Mathieson, B.J., Abbott, J., Boyse, J., Zayas, Z.A., Thomas, L. (1976) Control of mating preferences in mice by genes in the major histocompatibility complex. *Journal of Experimental Medicine*, 144: 1324-1335.

Biografija autora

Marija Savić Veselinović je rođena 13. avgusta 1976. godine u Beogradu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 1995/1996. godine na studijskoj grupi Biologija. Diplomirala je 2004. godine sa prosečnom ocenom 9,18. Iste godine je upisala Poslediplomske studije na smeru Genetika na Biološkom fakultetu. Doktorske studije na istom fakultetu, na smeru Genetika, modulu Genetika populacija i zaštita sredine upisuje 2006. godine.

Od decembra 2005. godine je zaposlena kao asistent pripravnik na Katedri za genetiku i evoluciju, 2008. godine je izabrana u zvanje asistenta na istoj katedri za užu naučnu oblast Genetika i evolucija. Marija Savić Veselinović je tokom istraživačkog rada učestvovala u realizaciji dva nacionalna projekta Ministarstva za nauku tehnološki razvoj (143014) i Ministarstva prosvete i nauke (173012).

Od 2006. godine je angažovana kao saradnik Istraživačke stanice Petnica. 2008. godine je angažovana u popularizaciji nauke u okviru Festivala nauke.

Marija Savić Veselinović je član Društva genetičara Srbije, Srpskog biološkog društva i European Society for Evolutionary Biology. 2012. godine je bila član sekretarijata simpozijuma "II Symposium of population and Evolutionary Genetics, 9-12 May 2012, Belgrade".

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а _____ Марија Савић Веселиновић _____

број индекса _____ ГЦ 060093 _____

Изјављујем

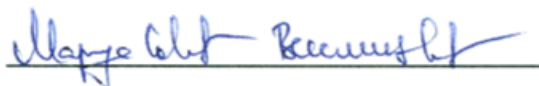
да је докторска дисертација под насловом

Утицај индуковане мутагенезе на репродуктивно понашање *Drosophila subobscura* и
улога сексуалне селекције у односу на обим генетичких оптерећења

- 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, _____ 12. 08. 2013. _____

 _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Марија Савић Веселиновић _____

Број индекса _____ ГЦ 060093 _____

Студијски програм _____ Генетика популација и заштита средине _____

Наслов рада

Утицај индуковане мутагенезе на репродуктивно понашање *Drosophila subobscura* и
улога сексуалне селекције у односу на обим генетичких оптерећења

Ментор _____ академик Марко Анђелковић, доц. др Софија Павковић-Лучић _____

Потписани/а _____ Марија Савић Веселиновић _____

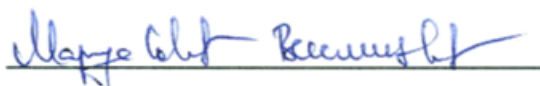
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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, _____ 12.08.2013. _____



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај индуковане мутагенезе на репродуктивно понашање *Drosophila subobscura* и улога сексуалне селекције у односу на обим генетичких оптерећења

која је моје ауторско дело.

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

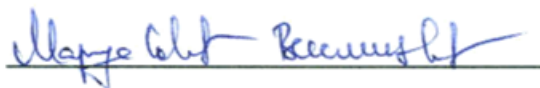
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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, 12.08.2013.



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.