

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Pavle P. Erić

**Adaptivni značaj unutarpopulacione
varijabilnosti mitohondrijskog genoma
Drosophila subobscura i *D. obscura***

- doktorska disertacija -

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Pavle P. Erić

**Adaptive significance of intrapopulation
mitochondrial DNA variation in
Drosophila subobscura and *D. obscura***

- Doctoral Dissertation -

Belgrade, 2024

MENTOR:

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

ČLANOVI KOMISIJE:

dr Marija Savić Veselinović, vanredni profesor
Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

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

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

datum odbrane:



Eksperimentalni deo doktorske disertacije ostvaren je u Odeljenju za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ Univerziteta u Beogradu. Istraživanja su realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja: „Dinamika genofonda, genetička i fenotipska varijabilnost populacija u promenljivim uslovima sredine“ (br. pr. 173012), kao i projektima Ministarstva pod evidencionim brojevima r 451-03-9/2021-14/200178 i 451-03-9/2021-14/200007.

Zahvalnica

Najveću zahvalnost dugujem svom mentoru prof. dr Mihailu Jeliću na izuzetnoj saradnji, beskrajnoj pomoći, izdvojenom vremenu, pažnji i strpljenju tokom čitavih doktorskih studija. Hvala na svim dobronamernim kritikama, savetima i sugestijama koje su neizmerno poboljšale ovu disertaciju. Hvala ti što si uvek bio primer kako da budem bolji i vredniji. Hvala ti Majki što si me naučio pravim akademskim vrednostima!

Veliku zahvalnost dugujem:

prof. dr Marini Stamenković-Radak što mi je pružila priliku da budem deo projekta, kroz koji sam ušao u svet populacione genetike i eksperimentalne evolucije. Hvala i na prenesenom znanju tokom godina i svim korisnim savetima, ne samo tokom pisanja ove teze, već i tokom čitavih doktorskih studija.

članovima komisije: prof. dr Mariji Savić Veselinović, dr Aleksandri Patenković i dr Ivani Budinski na posvećenosti, motivaciji i izdvojenom vremenu. Najviše vam hvala na svim korisnim idejama, savetima i sugestijama koje su značajno poboljšale ovu disertaciju.

dr Mariji Tanasković na svim dobronamernim kritikama, koje su doprinele kvalitetu ove disertacije. Takođe, hvala na razumevanju i podsticanju da uvek napredujem.

dr Milanu Dragičeviću na velikoj pomoći pri statističkoj i bioinformatičkoj obradi podataka, i na tome što me je uveo u svet bioinformatike.

dr Mariji Kankare (*Maarija Kankare*) sa Univerziteta u Juvaskuli (*University of Jyväskylä*) na obezbeđenim uzorcima *D. obscura* iz Finske.

dr Fabijanu Štaubahu (*Fabian Staubach*) sa Univerziteta u Frajburgu (*University of Freiburg*) na uzorcima *D. obscura* iz Nemačke.

prof. dr Darenu Obardu (*Daren Obbard*) i dr Megan Volas (*Megan Wallace*) sa Instituta za Evolucionu Biologiju, Univerziteta u Edinburgu (*University of Edinburgh*) na obezbeđenim uzorcima *D. obscura* iz Škotske.

dr Jeleni Savić sa odeljenja za fiziologiju biljaka, na ustupljenoj komori sa temperaturnom regulacijom, bez koje izvođenje eksperimenata ne bi bilo moguće.

dr Joranu Arnkvistu (*Göran Arnqvist*), dr Milomiru Stefanoviću i dr Ivani Budinski na korisnim savetima u vezi statističke obrade eksperimentalnih podataka.

akademiku Marku Anđelkoviću, dugogodišnjem rukovodiocu istraživanja na Odeljenju za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju, na prilici da čujem dosta zanimljivih iskustava, ideja i naučnih saznanja.

Mariji Savić Veselinović, Aleksandri Patenković, Mihailu Jeliću, Bojanu Kenigu, Marini Stamenković-Radak, Katarini Erić, Mini Rakić, Mirjani Beribaki, Slobodanu Davidoviću, Borisu Inđiću i Stefanu Stanovčiću na pomoći prilikom izvođenja eksperimenata komponenti životne istorije. Hvala vam svima na zajedničkom radu u laboratoriji, nezaboravnim terenima i druženju tokom godina. Hvala vam svima na podršci, motivaciji, savetima, kritikama i pomoći bez kojih ne bih uspeo da završim ovu tezu.

čika Bošku i Društvu istraživača „Vladimir Mandić Manda“ zbog kojih sam zavoleo prirodu i biologiju.

prijateljima i porodici što su uvek bili uz mene i pružali mi ljubav i podršku; posebno majci, ocu i sestri što su me trpeli, i Nataši koja me sad trpi. Hvala vam svima od srca!

Adaptivni značaj unutarpopulacione varijabilnosti mitohondrijskog genoma *Drosophila subobscura* i *D. obscura*

Rezime

Mitohondrijska DNK (mtDNK) kodira gene uključene u fundamentalne biološke procese ćelijske respiracije i proizvodnje energije. Mitohondrijski genom je haploidan, nasleđuje se uglavnom materinski, gotovo nikad se ne rekombinuje i odlikuje ga relativno mala efektivna veličina populacije. Zbog navedenih odlika mtDNK, uslovi koji predviđaju postojanje i održavanje adaptivne varijabilnosti mtDNK unutar populacija su restriktivni.

Analiziran je adaptivni značaj simpatričke mtDNK varijabilnosti, prisustvo mito-jedarnih interakcija, kao i selekcionni mehanizmi koji je održavaju: polno specifična selekcija, kao i selekcija u varijabilnim sredinskim uslovima. Korišćene su dve široko zastupljene palearktičke vrste roda *Drosophila* (iz *Obscura* grupe vrsta), *D. subobscura* i *D. obscura*. Prva vrsta je već ustaljeni model u ovom vidu evoluciono genetičkih istraživanja, i odlikuje se prisustvom dva učestala haplotipa u svim populacijama. Druga vrsta je kao model razvijena u ovoj disertaciji. Određena je njena genetička varijabilnost i izučena populaciona istorija kod nekoliko evropskih populacija. Izabrane su linije reprezentativnih haplotipova obe vrste i povratnim ukrštanjima su konstruisane eksperimentalne linije sa svim kombinacijama simpatričkih mtDNK haplotipova i jedarnih pozadina (nuDNK). Na dve eksperimentalne postavke koje su podrazumevale razlike u temperaturi i svetlosnom režimu analizirane su komponente životne istorije svih konstruisanih linija: otpornost na desikaciju, dužina razvića, preadultna vijabilnost, kao i procenat mužjaka (odnos polova).

Rezultati su pokazali postojanje značajne genetičke varijabilnosti kako unutar tako i između populacija *D. obscura*. Kod ove vrste je uočena geografska struktuiranost i smanjenje genetičkog diverziteta u pravcu od zapada ka istoku. Pokazan je adaptivni značaj simpatričke mtDNK varijabilnosti obe vrste. Kod *D. subobscura* je on bio prisutan na nivou dva glavna haplotipa jedino za vijabilitet, a kod ostalih komponenti na nivou pretpostavljenih dodatnih nukleotidnih razlika karakterističnih za pojedinačne linije. Pokazano je da su mito-jedarni genotipovi primarne jedinice na koje deluje prirodna selekcija, a efekat ovih interakcija na fitnes je bio izraženiji kod *D. obscura*. Pečat polno specifične selekcije nije zabeležen kod *D. subobscura*, dok je kod *D. obscura* efekat ovog vida balansne selekcije bio umeren. Naposljetku, eksperimenti su pokazali umeren efekat interakcija sredine i mito-jedarnog genotipa na fitnes kod *D. subobscura*, dok su kod *D. obscura* pokazali jači uticaj ovog vida balansne selekcije. Uz to kod *D. obscura* primećen je i efekat interakcija samog mitohondrijskog haplotipa i sredinskih faktora na fitnes jedinki. Posmatrajući obe vrste, analizirana sredinska varijabilnost se pokazala važnijom u održavanju mtDNK varijabilnosti u poređenju sa polno specifičnom selekcijom.

Upotreba dve vrste sa različitim obrascima mtDNK varijabilnosti omogućila je uvid u adaptivne razlike na barem dva različita stupnja funkcionalne povezanosti mitohondrijskog i jedarnog

genoma. Mali je broj eksperimentalnih radova koji ispituju mehanizme održavanja simpatričke varijabilnosti mtDNK, a rezultati ove studije umnogome doprinose njihovom boljem razumevanju.

Ključne reči: *Drosophila subobscura*, *Drosophila obscura*, mtDNK, mito-jedarne koadaptacije, održavanje genetičke varijabilnosti, komponente životne istorije

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Populaciona i evolucionarna genetika

UDK broj: [575.22+575.153]:575.827

Adaptive significance of intrapopulation variation in the mitochondrial genomes of *Drosophila subobscura* and *D. obscura*

Summary

Mitochondrial DNA (mtDNA) encodes genes involved in fundamental biological processes of cellular respiration and energy production. The mitochondrial genome is haploid, usually maternally inherited, rarely undergoes recombination, and is characterised by a relatively small effective population size. Due to these characteristics of mtDNA, conditions predicting the existence and maintenance of adaptive mtDNA variation within populations are restrictive.

The adaptive significance of sympatric mtDNA variability, the presence of mito-nuclear interactions, and selective mechanisms maintaining it were analysed, including sex-specific selection and selection in variable environmental conditions. Two widely distributed Palearctic species from the *Drosophila* genus (Obscura group species), *D. subobscura* and *D. obscura*, were used. The first species, a well-established model in evolutionary genetic research, features two common haplotypes in all populations. The second species was developed as a model in this dissertation. Genetic variability and population history of several European populations were determined as part of this thesis. Lines of representative haplotypes of both species were selected, and experimental lines with all combinations of sympatric mtDNA haplotypes and nuclear backgrounds (nuDNA) were constructed through backcrossing. All constructed lines of both species were subjected to life history experiments: desiccation resistance, developmental time, preadult viability, and sex ratio. Life history assays were conducted with two experimental setups involving differences in temperature and light regime.

The results showed significant genetic variability both within and between populations of *D. obscura*. In this species, geographic structuring and a reduction in genetic diversity from west to east was observed. The adaptive significance of sympatric mtDNA variation was demonstrated in both species. In *D. subobscura*, this significance was not present at the level of two main haplotypes except in viability experiment, and in other components it was assumed to involve additional, line specific nucleotide differences. Mito-nuclear genotypes were identified as primary units affected by natural selection, with a more pronounced effect of these interactions on fitness observed in *D. obscura*. Regarding sex-specific selection, its impact was not observed in *D. subobscura*, while in *D. obscura*, the effect of this type of balancing selection was moderate. Finally, experiments showed a moderate

effect of interactions between the environment and mito-nuclear genotype on fitness in *D. subobscura*, while in *D. obscura* showed a stronger influence of this type of balancing selection. Additionally, in *D. obscura*, an effect of interactions between the mitochondrial haplotype itself and environmental factors on the fitness of individuals was observed. Considering both species, environmental variability proved more important in maintaining mtDNA variation compared to sex-specific selection.

The use of two species with different patterns of mtDNA variability provided insight into adaptive differences at least two different levels of functional connectivity between the mitochondrial and nuclear genomes. Few experimental studies have examined the mechanisms sustaining sympatric mtDNA variability, and the results of this study significantly contribute to a better understanding of these mechanisms.

Key words: *Drosophila subobscura*, *Drosophila obscura*, mtDNA, mito-nuclear co-adaptations, maintenance of genetic variation, life history traits

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Population and Evolutionary Genetics

UDC number: [575.22+575.153]:575.827

Sadržaj

Lista skraćenica	xiii
1. UVOD.....	1
1.1. Mitohondrije	1
1.2. Odlike mtDNK.....	2
1.3. Promena paradigme neutralnosti mtDNK.....	3
1.4. Usklađenost mitohondrijskog i jedarnog genoma.....	4
1.4.1. Protein-protein interakcije	4
1.4.2. Regulatorne interakcije	5
1.4.2.1. Protein-DNK interakcije	5
1.4.2.2. Protein-RNK interakcije	6
1.4.3. Ekspresija jedarnih gena posredovana mitohondrijskim transkriptima	7
1.5. Varijabilnost mtDNK na različitim nivoima organizacije živih sistema.....	7
1.6. Održavanje mtDNK varijabilnosti	8
1.6.1. Mito-jedarne interakcije.....	8
1.6.2. Selekcija negativno zavisna od učestalosti	9
1.6.3. Polno specifična selekcija.....	10
1.6.4. Interakcije X vezanih lokusa i mtDNK.....	12
1.6.5. Interakcije mito-jedarnog genotipa i sredine.....	12
1.7. Model vrste	14
1.8. Komponente adaptivne vrednosti i njihova procena	16
1.9. Mikroorganizmi od značaja u analizi osobina životne istorije <i>Drosophila</i> i mtDNK varijabilnosti.....	19
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA	21
3. MATERIJAL I METODE	23
3.1. Uzorkovanje jedinki iz prirode	23
3.1.1. Uzorkovanje <i>Drosophila subobscura</i>	23
3.1.2. Uzorkovanje <i>Drosophila obscura</i>	23
3.2. Sakupljanje uzoraka i formiranje <i>iso-female</i> linija	25
3.3. Analiza <i>Cyt b</i> gena kod <i>D. obscura</i>	26
3.3.1. Izolacija mtDNK kod <i>D. obscura</i>	26
3.3.2. Određivanje koncentracije izolovane DNK	27
3.3.3. PCR umnožavanje <i>Cyt b</i> gena.....	27
3.3.4. Vizualizacija i prečišćavanje PCR produkata	28
3.3.5. Sekvenciranje <i>Cyt b</i> gena.....	28
3.3.6. Statistička obrada rezultata sekvenciranja	29
3.3.6.1. Obrada sekvenci <i>Cyt b</i> gena i definisanje haplotipova	29
3.3.6.2. Određivanje parametara molekularnog diverziteta <i>D. obscura</i>	29

3.3.6.3. Konstruisanje haplotipske mreže	29
3.3.6.4. Testovi neutralnosti.....	30
3.3.6.5. Ispitivanje izolacije distancom primenom Mantelovog testa	30
3.3.6.6. Bajesova analiza filogenetskih odnosa.....	30
3.4. Testiranje na mikroorganizme koji mogu uticati na obrasce varijabilnosti mtDNK i adaptivnu vrednost domaćina	31
3.4.1. Testiranje prisustva endosimbionata iz roda <i>Wolbachia</i>	31
3.4.2. Sekvenciranje mikrobioma kod <i>D. obscura</i>	33
3.4.3. Testiranje linija na prisustvo sigma virusa specifičnog za <i>D. obscura</i>	34
3.5. Odabir i formiranje eksperimentalnih linija	34
3.5.1. Odabir linija <i>D. subobscura</i> za analize osobina životne istorije	34
3.5.2. Odabir linija <i>D. obscura</i> za analize osobina životne istorije.....	35
3.5.3. Formiranje eksperimentalnih linija	36
3.6. Analize osobina životne istorije.....	38
3.6.1. Eksperiment otpornosti na desikaciju (isušivanje).....	39
3.6.1.1. Eksperiment otpornosti na desikaciju kod <i>D. subobscura</i>	41
3.6.1.2. Eksperiment otpornosti na desikaciju kod <i>D. obscura</i>	41
3.6.2. Dužina razvića od jajeta do adulta, preživljavanje i procenat mužjaka	41
3.6.2.1. Dužina razvića od jajeta do adulta, preživljavanje i procenat mužjaka kod <i>D. subobscura</i>	43
3.6.2.2. Dužina razvića od jajeta do adulta, preživljavanje i procenat mužjaka kod <i>D. obscura</i>	43
3.7. Statistička obrada eksperimentalnih podataka osobina životne istorije	43
3.7.1. Statistička obrada rezultata eksperimenta otpornosti na desikaciju	43
3.7.1.1. Statistička obrada rezultata eksperimenta otpornosti na desikaciju kod <i>D. subobscura</i>	44
3.7.1.2. Statistička obrada rezultata eksperimenta otpornosti na desikaciju kod <i>D. obscura</i>	45
3.7.2. Statistička obrada rezultata eksperimenta dužine razvića	45
3.7.3. Statistička obrada rezultata eksperimenta preživljavanja.....	45
3.7.4. Statistička obrada rezultata procenta mužjaka	46
3.7.5. Statistička obrada rezultata eksperimenata životne istorije u cilju analiziranja signala materinske kletve.....	46
4. REZULTATI	47
4.1. Varijabilnost prirodnih populacija <i>D. obscura</i>	47
4.1.1. Osnovni parametri genetičke varijabilnosti <i>D. obscura</i>	47
4.1.2. Prošireni Bajesovi grafici horizonta - EBSP	52
4.1.3. Analiza molekularne varijanse - AMOVA	55
4.1.4. Mantelov test izolacije distancom.....	55
4.1.5. Prisustvo mikroorganizama u uzorkovanim jedinkama	55
4.2. Rezultati eksperimenata komponenti životne istorije	57
4.2.1. Rezultati eksperimenata otpornosti na desikaciju	57
4.2.1.1. Otpornost na desikaciju kod <i>D. subobscura</i>	57
4.2.1.2. Otpornost na desikaciju kod <i>D. obscura</i>	61
4.2.2. Dužina razvića	66
4.2.2.1. Dužina razvića kod <i>D. subobscura</i>	66
4.2.2.2. Dužina razvića kod <i>D. obscura</i>	70
4.2.3. Preživljavanje	75
4.2.3.1. Preživljavanje od jajeta do adulta (EtA) kod <i>D. subobscura</i>	75

4.2.3.2. Preživljavanje od jajeta do adulta (EtA) kod <i>D. obscura</i>	78
4.2.4. Procenat mužjaka.....	82
4.2.4.1. Procenat mužjaka kod <i>D. subobscura</i>	82
4.2.4.2. Procenat mužjaka kod <i>D. obscura</i>	85
4.2.5. Rezultati testiranja hipoteze materinske kletve.....	89
4.2.6. Uticaj broja i tipa nukleotidnih promena između haplotipova na razlike u fitnessu kod <i>D. obscura</i>	90
5. DISKUSIJA.....	92
5.1. Varijabilnost mtDNK prirodnih populacija <i>D. obscura</i>	92
5.2. Eksperimenti životne istorije.....	95
5.2.1. Opšti pregled uticaja osnovnih faktora i sumiranje njihovih interakcija na osobine životne istorije kod obe model vrste.....	95
5.2.1.1. Uticaj analiziranih faktora na osobine životne istorije kod <i>D. subobscura</i>	97
5.2.1.2. Uticaj analiziranih faktora na osobine životne istorije kod <i>D. obscura</i>	98
5.2.2. Uticaj mtDNK varijabilnosti i mito-jedarnih interakcija na analizirane komponente životne istorije kod obe model vrste.....	99
5.2.3. Polno specifični efekat na mitohondrijsku i mito-jedarnu varijabilnost.....	102
5.2.4. Prisustvo pečata materinske kletve.....	104
5.2.5. Interakcija varijabilne sredine i genotipa na adaptivnu vrednost.....	106
6. ZAKLJUČAK.....	109
7. LITERATURA.....	111
8. PRILOZI.....	128

Lista skraćenica

ADP – Adenozin difosfat
AIC – Akaike informacijski kriterijum
AMOVA – Analiza molekularne varijanse
ANOVA – Analiza varijanse
ATP – Adenozin trifosfat
Chisq – Hi kvadratna vrednost
COI – Citohrom C oksidaza I
COII – Citohrom C oksidaza II
COX – Citohrom C oksidaza kompleks
Cyt b – Citohrom b
Cyt c – Citohrom c
ddf – Stepeni slobode imenioca (engl. *denominator degrees of freedom*)
df – Stepeni slobode (engl. *degrees of freedom*)
DObsSV – Sigma virus specifičan za *D. obscura*
DNK – Dezoksiribonukleinska kiselina
EB – Eksperimentalni blok
EBSP – Prošireni Bajesov grafik horizonta (engl. *Extended Bayesian Skyline Plot*)
EDTA – Etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina
EL – Eksperimentalna linija
ESS – Kriterijum Efektivne veličine uzorka (engl. *Effective Sampling Size criterion*)
EtA – Jaje do adulta (engl. *Egg to Adult*)
ETC – Elektron transportni lanac (engl. *Electron Transport Chain*)
EtP – Jaje do lutke (engl. *Egg to Pupa*)
FA – Finska (populacija)
G – Gabrovnica (populacija)
GF – Nemačka (populacija)
GLM – Generalizovani linearni model
IFL – Iso-female linija
LD – Neravnoteža vezanosti (engl. *Linkage Disequilibrium*)
Loglik – Logaritmovana verovatnoća
MCMC – Markovljev lanac Monte Karlo (engl. *Markov Chain Monte Carlo*)
MJ – Median-joining
MT – Mitohondrijski haplotip
mt-aaRSs – Mitohondrijska aminoacil-tRNK sintetaza
mtDNK – Mitohondrijska DNK
NCBI – Nacionalni centar za biotehnoške informacije SAD (engl. *National Centre for Biotechnological Information*)
ND3 – NADH dehidrogenaza 3
ND5 – NADH dehidrogenaza 5
NADH – Redukovani nikotinamid adenin dinukleotida
NFDS – Selekcija negativno zavisna od učestalosti (engl. *Negative Frequency-Dependant Selection*)

NU – Jedarna pozadina
nuDNK – Jedarna DNK
OXPHOS – Oksidativna fosforilacija
PCR – Lančana reakcija polimeraze (engl. *Polymerase Chain Reaction*)
POLRMT – Mitohondrijska RNK polimeraza
PP – Posteriorna verovatnoća (engl. *Posterior Probability*)
PtA – Lutka do adulta (engl. *Pupa to Adult*)
RFLP – Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism*)
ROS – Reaktivne vrste kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*)
RNK – Ribonukleinska kiselina
rRNK – Ribozomalna RNK
SC – Škotska (populacija)
SM – Maljen (populacija)
SDS – Natrijum-dodecil-sulfat
SG – Goč (populacija)
SK – Stara Kalna (populacija)
smithRNK – Mali mitohondrijski visoko transkribovani RNK (engl. *small mitochondrial highly-transcribed RNAs*)
SS – Stara planina (populacija)
SSD – Zbir kvadratnih odstupanja (engl. *Sum of Squared Deviations*)
SSq – Zbir kvadrata (engl. *Sum of Squares*)
ST – Tara (populacija)
T – Temperatura
TBE – Tris/borat/EDTA pufer
TE – Tris/EDTA pufer
TFAM – Mitohondrijski transkripcioni faktor A
TFBM – Mitohondrijski transkripcioni faktor B
Tris – 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol
tRNK – Transportna RNK

1. UVOD

1.1. Mitochondrije

Mitochondrije su ćelijske organele sa dve membrane koje poseduju sopstveni genom, mitohondrijsku DNK (mtDNK). Njihova glavna uloga jeste proizvodnja ćelijske energije u formi adenozin trifosfata (ATP), i one su najznačajnije organele kada je ćelijski metabolizam u pitanju. Regulacija procesa ćelijskog disanja odnosno serije bioloških procesa oksido-redukcije i regulacije proizvodnje i potrošnje ATP-a leži u osnovi čitavog procesa života i smrti kako u ćelijama tako i u organizmima.

Eukariotske ćelije sadrže veliki broj mitohondrija, od nekoliko stotina do čak par hiljada, i one mogu zauzimati čak četvrtinu zapremine citoplazme u ćeliji (Ballard 2004). U sastavu unutrašnje mitohondrijske membrane, nalazi se elektron-transportni lanac (engl. *Electron Transport Chain*, ETC), koji predstavlja niz proteinskih kompleksa koji oksido-redukcijom energiju sadržanu u hemijskim vezama molekula hrane koriste za proizvodnju adenozin trifosfata (ATP), u procesu koji nazivamo oksidativna fosforilacija (OXPHOS). U seriji oksido-redukcija elektroni se prenose ETC-om sve do kiseonika, stvarajući vodu kao nusprodukt reakcije. Energija koja se oslobađa prilikom prenosa elektrona, koristi se za upumpavanje protona u mitohondrijski matriks. Ovako dobijeni elektrohemijski gradijent dalje se koristi za pretvaranje adenozin difosfata (ADP) u ATP uz pomoć ATP sintaze (Wallace 2005). Mitochondrije su toliko specijalizovane za proizvodnju energije, da su popularno nazvane „elektranama ćelije“ (Siekevitz 1957). Energijom koja se oslobodi sagorevanjem jednog molekula glukoze u procesu oksidativne fosforilacije, mitochondrije proizvedu čak 30 molekula ATP-a, dok se u procesu glikolize, kojim posreduju isključivo jedarni produkti dobiju samo dva molekula ATP-a (Ballard 2004).

Pored produkcije ATP-a, ETC endotermnih životinja je zadužen i za stvaranje toplote. Van energetskog metabolizma najvažnija uloga mitohondrija jeste iniciranje procesa regulisane ćelijske smrti (Bossy-Wetzel i sar. 1998). Između ostalog, mitochondrije imaju značajnu ulogu u ćelijskoj signalizaciji zavisnoj od jona kalcijuma, pošto su važan depo ovih jona, produkciji reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *Reactive Oxygen Species*), kao i u procesima urođenog imuniteta i starenja (Rizzuto i sar. 2012; Hirst i sar. 2008; Wang i sar. 2017; Trifunović i sar. 2004).

Danas je poznato da mitochondrije vode poreklo od slobodnoživećih aerobnih alfa proteobakterija, srodnih rodu *Rickettsia* (Gray i sar. 1999). Smatra se da je pre oko dve milijarde godina, u uslovima kada je atmosfera počela da se puni kiseonikom, došlo do unosa bakterije sa efikasnim OXPHOS sistemom, od koje mitochondrije vode poreklo, u heterotrofnu eukariotsku ćeliju sa jedrom (Sagan 1967). Ovaj endosimbiotski događaj, okarakterisan je kao ključni u evoluciji kompleksnog života, i smatra se zaslužnim za nastanak ogromnog broja životnih formi među eukariotima (Wolff i sar. 2016a). Štaviše, nemoguće je definisati eukariote bez spominjanja ove endosimbioze i koevolucije genoma domaćina i endosimbionta tj, mitochondrije (Rand i sar. 2004). Nakon ovog endosimbiotskog događaja, i posledično nastanka višećelijskih organizama evolucija eukariota je išla u pravcu usloznavanja genetičke arhitekture razvića. Diferencijacijom velikog broja različitih tipova ćelija bilo je moguće osvojiti veći broj ekoloških niša, dok su se mitochondrije u

stabilnim uslovima unutar ćelije specijalizovale za sve efikasniju proizvodnju energije procesom oksidativne fosforilacije.

1.2. Odlike mtDNK

Mitohondrije, zajedno sa plastidima, jedine su citoplazmatske organele u eukariotskoj ćeliji koje nose genetičke informacije (Zeljić i sar. 2021). Tipični mitohondrijalni genom metazoa je mali kružni molekul koji se majčinski nasleđuje, prisutan u više kopija - od oko desetak kopija u humanim eritrocitima i spermatozoidima do 500.000 kopija u oocitima (Reynier i sar. 2001; Wai i sar. 2010).

Tokom evolucije eukariota, došlo je do redukcije broja mitohondrijskih gena koji postaju suvišni eukariotskoj ćeliji u novom simbiotskom načinu života. Uporedo sa tim veliki broj mitohondrijskih gena se prebacuje iz mitohondrija u jedro, čime ćelija preuzima kontrolu nad mitohondrijama. Takođe, veliki broj jedarnih gena stiče nove funkcije u procesu oksidativne fosforilacije u mitohondrijama (Clergeot i Olson 2021). Tako broj gena koji se danas nalaze u mtDNK različitih vrsta, varira od oko 100 kod nekih protozoa do samo tri strukturna gena (gena koja kodiraju proteine) kod *Plasmodium falciparum*, parazita koji izaziva malariju (Ballard i Rand 2005). Najveći broj životinja ipak ima relativno uniformnu veličinu mitohondrijskog genoma, oko 16kb, kao i uniforman broj gena. Tako mtDNK životinja najčešće sadrže 13 strukturnih gena, dva gena za mitohondrijske ribozomalne RNK (12S rRNK, 16S rRNK), 22 za transportne RNK (tRNK), kao i nekodirajući, AT bogat region, koji se još naziva kontrolni ili region D petlje. Sa druge strane, preko 500 jedarno kodiranih proteina se transportuje u mitohondrije gde ostvaruju funkciju (Gregersen i sar. 2012). Poređenja sekvenci između gena i odgovarajućih polipeptida pokazala su i zapanjujuću činjenicu da se genetički kod mtDNK neznatno, ali značajno razlikuje od genetičkog koda jedarne DNK (nuDNK). Tako je npr. kodon UGA u nukleusu „stop“ kodon, ali u mtDNK većine vrsta predstavlja kodon za triptofan, dok su AGA i AGG kodoni za arginin u nukleusu, a u mtDNK većine beskičmenjaka kodiraju serin dok u mtDNK kičmenjaka predstavlja „stop“ kodon (Ohira i sar. 2013).

Osnovne odlike mtDNK je jasno odvajaju od jedarne DNK, kako je mtDNK uglavnom cirkularna, haploidna, replikuje se kao jedna celina, i kod većine životinjskih vrsta gotovo da se nikada ne rekombinuje (Birky 2001). Takođe, budući da je mtDNK haploidna, ne postoje heterozigoti (osim ako se ne razmatra heteroplazmija) u kojima bi recesivni aleli bili zamaskirani dominantnim, što za posledicu ima da su svi aleli koji utiču na razlike u adaptivnoj vrednosti izloženi selekciji.

Dugo se smatralo da je varijabilnost prisutna u mtDNK sekvenci selektivno neutralna. Računajući da su mitohondrijski geni ključni za efikasno funkcionisanje ćelija, s obzirom na njihovu ulogu u metabolizmu eukariotskih ćelija, prvenstveno u produkciji ATP-a, zbog odsustva dominanse smatrano je da se sve adaptivne mutacije brzo šire kroz populaciju pozitivnom selekcijom, dok sa druge strane negativna selekcija efikasno odstranjuje sve štetne mutacije (Avisé i sar. 1987; Ballard i Kreitman 1995). Zbog odsustva rekombinacija i klonalne prirode, ceo mitohondrijski genom ima jedinstvenu genealošku istoriju (Galtier 2009). Svi evolucionarni pritisci koji deluju na jedan lokus, delovaće posredno i na sve ostale lokuse, pa se tako fiksacijom povoljnog alela, fiksiraju i svi ostali polimorfizmi procesom genetičkog prevoženja (engl. *genetic hitchhiking*), (Ballard i Kreitman 1995). Imajući u vidu gore pomenute odlike mtDNK, bilo je prihvaćeno opšte mišljenje da su adaptivne i štetne mutacije jako retke u populacijama, i da daleko najveći deo varijabilnosti predstavljaju selektivno neutralne i blago štetne mutacije, čiji efekat nije dovoljno štetan, da bi ih selekcija efikasno

prepoznala i uklonila iz populacije (Takahata 1984), u skladu sa neutralističkom teorijom molekularne evolucije (Kimura 1983).

Na pretpostavci selektivne neutralnosti, počiva i hipoteza molekularnog sata kojom se u evolucionoj biologiji određuje vreme razdvajanja vrsta i populacija (Dos Reis i sar. 2016). Uzimajući u obzir da je materinsko nasleđivanje mtDNK prisutno kod većine eukariota, mtDNK postaje moćan molekularni marker za izučavanje genetičke istorije populacija preko majčinske linije. Tome doprinosi i činjenica da je sadržaj i položaj gena u mtDNK evoluciono jako dobro očuvan, čak i između udaljenih taksona (Wolstenholme 1992). Pored toga, mitohondrijska DNK je prisutna u velikom broju kopija u svakoj ćeliji, što u mnogome olakšava njenu amplifikaciju za potrebe genetičkih istraživanja, čak i u slučaju degradiranih uzoraka. Posledica prokariotskog porekla mitohondrija jesu kratki intergenski regioni, odsustvo introna, kao i niska učestalost duplikacija (Gissi i sar. 2008). Hipervarijabilni regioni su okruženi evoluciono očuvanim (konzerviranim) regionima (npr. ribozomalna DNK) što omogućava dizajniranje univerzalnih prajmera (Galtier 2019). Sve ovo čini mtDNK veoma pogodnim i najčešće korišćenim molekularnim markerom u populacionim, evolucionim i filogenetskim studijama sve do današnjih dana. Ipak može se argumentovati da je zbog svih ovih tehničkih prednosti mtDNK kao molekularnog markera, naučna zajednica u želji za savršenim molekularnim alatom, previše olako prihvatila hipotezu o selektivnoj neutralnosti mtDNK.

1.3. Promena paradigme neutralnosti mtDNK

Dugo se smatralo da se neobično visok stepen varijabilnosti mtDNK eukariota može objasniti daleko višom stopom mutacija molekula mtDNK u odnosu na jedarnu DNK. Kasnije su ipak, teorijski modeli pokazali da je zapaženi nivo varijabilnosti mtDNK, dosta viši od očekivanog po modelu ravnoteže selekcije i mutacija (Charlesworth i Hughes 2000).

Jedan od prvih nagoveštaja da će se paradigma o neutralnosti mtDNK promeniti, bio je rad Whittam-a i saradnika (1986) koji su poredili genetičku varijabilnost, tj. broj haplotipova dobijenih restrikcijom 28 lokusa ljudske mtDNK sa vrednostima koje predviđa neutralistička teorija molekularne evolucije. Pokazali su da je u značajnom broju poređenja između populacija zabeleženo odstupanje od neutralnosti i to najviše u strukturnim genima, dok u nekodirajućoj D petlji nije zabeleženo odstupanje od neutralnosti. Veći broj radova je ubrzo osporio pretpostavku neutralnosti mtDNK kod sve većeg broja taksona, korišćenjem novorazvijenih testova koji se baziraju na različitim pretpostavkama neutralnosti, pa sve bolje diferenciraju efekte varijabilnosti koji rezultuju iz selekcionih pritisaka ili populacione istorije (Ramirez-Soriano i sar. 2008; Achaz 2009).

Među prvim radovima koji su osporavali pretpostavku neutralnosti mtDNK bio je rad (Ballard i Kreitman 1994) u kome je korišćen Mekdonald Krajtmanov test (McDonald i Kreitman 1991) na tri vrste roda *Drosophila*. Ovaj test se zasniva na poređenju odnosa sinonimnih i nesinonimnih zamena između vrsta sa odnosom sinonimnih i nesinonimnih zamena unutar tih istih vrsta. Analizom sekvenci *Cyt b* i *COI* (Citohrom oksidaza I) gena zabeležili su relativno veći broj nesinonimnih nukleotidnih promena unutar vrsta od očekivanog ili relativnu oskudnost nesinonimnih mutacija između vrsta u poređenju sa sinonimnim mutacijama. Nachman (1994) koristeći sekvence *ND3* (NADH dehidrogenaza 3) gena kod tri vrste miša, pokazuje odstupanje od neutralističkog modela, i dobija slične rezultate poredeći sekvence ovog gena između ljudi i šimpanza (1996). Rand i saradnici (1994), poređenjem varijabilnosti sekvence mtDNK kod *D. melanogaster* i *D. simulans* pronalaze pečat selekcije u *ND5* genu. Veliki broj radova u narednim godinama pronalazi tragove selekcionih procesa u mtDNK sekvencama sisara, prvenstveno kod čoveka i miša (Pesole i sar. 1999; Ruiz-Pesini 2004).

Meta-analiza (Bazin i sar. 2006), u kojoj je poređena varijabilnost mtDNK sekvence kod preko 1600 životinjskih vrsta, došla je do rezultata koji se ne poklapaju sa očekivanjima koja proizilaze iz teze selektivne neutralnosti mtDNK. Teorija neutralističke molekularne evolucije predviđa više vrednosti genetičkog diverziteta za vrste sa većom efektivnom veličinom populacije, zbog smanjenog uticaja genetičkog drifta (Kimura 1983). Generalno je pravilo da životinje manjih dimenzija imaju veće efektivne veličine populacija od životinja većih dimenzija, pa tako beskičmenjaci imaju veće populacije od kičmenjaka. Takođe, i morski taksoni se odlikuju većim efektivnim veličinama populacije od srodnih rečnih ili kopnenih taksona. Studija (Bazin i sar. 2006), nije pronašla razlike u mitohondrijskom diverzitetu između kičmenjaka i beskičmenjaka, morskih i rečnih životinja, kao ni između vrsta manjih i većih dimenzija. Rezultati su pokazali neverovatno slične nivoe intraspecijskog diverziteta mtDNK širom različitih kola (*filuma*). Sa druge strane u istoj studiji, poređenja varijabilnosti jedarne DNK bila su u skladu sa pretpostavkom odnosa veličine populacija i genetičkog diverziteta. Autori diskutuju da se nepostojanje veze između veličine populacije i genetičkog diverziteta kada je mtDNK u pitanju, može objasniti samo učestalim selektivnim otklonima (engl. *selective sweeps*), to jest efektom genetičkog prevoženja (Gillespie 2000). Zbog odsustva rekombinacija mtDNK je više podložna efektu genetičkog prevoženja, pa učestali selektivni otkloni u velikim populacijama dovode do čestog smanjenja genetičkog diverziteta celokupnog molekula mtDNK (Galtier i sar. 2009). Isto tako u velikim populacijama adaptivne mutacije se javljaju češće, pri čemu se onda fiksiranjem ovih alela, fiksiraju i sve ostale varijante prisutne na mtDNK molekulu i time se smanjuje genetička varijabilnost. Genetičko prevoženje koje se u određenom kontekstu može razmatrati kao stohastički proces, ostvaruje efekte istog smera kao genetički drift u velikim populacijama, kada je mtDNK u pitanju.

1.4. Usklađenost mitohondrijskog i jedarnog genoma

Kako bi ETC bio visoko efikasan, neophodna je funkcionalna i strukturna integrisanost oba genoma eukariotske ćelije, i ona se ostvaruje na dva osnovna nivoa. Prvi nivo podrazumeva interakcije proteinskih produkata dva genoma (protein-protein interakcije) pri sklapanju, formiranju i funkcionisanju ETC kompleksa. Drugi nivo su regulatorne interakcije dva genoma: s jedne strane protein-DNK interakcije pri transkripciji mtDNK gena (koji direktno ili indirektno utiču na OXPHOS) i replikaciji mtDNK (od kojeg zavisi ukupni broj mitohondrija u ćeliji, pa posledično i ukupni respiratorni kapacitet ćelije) (Hill 2019), i s druge strane protein-RNK interakcije, pri translaciji mtDNK kodiranih proteina. Smanjena kompatibilnost između komponenti kodiranih sa dva genoma, na bilo kojem od ovih nivoa može direktno ili indirektno uticati na efikasnost ETC-a i ugroziti normalno funkcionisanje ćelije. Zanimljivo je da je pored dva navedena osnovna nivoa interakcija, nedavno otkriven još jedan nivo specifičan za određene vrste klase Bivalvia, koji podrazumeva kontrolu ekspresije jedarnih gena regulatornim elementima iz mitohondrija.

1.4.1. Protein-protein interakcije

Oksidativna fosforilacija predstavlja jedan od najvažnijih bioloških mehanizama proizvodnje energije. Stoga je usklađenost dva genoma potpuno različitih genealogija ključna, kako bi se obezbedila energetska efikasnost koju iziskuje kompleksni način života eukariota. Proteinske subjedinice mitohondrijskog ETC-a, moraju biti visoko kompatibilne, analogno principu ključa i

brave, kako bi održali strukturnu i biohemijsku konfiguraciju, neophodnu za odvijanje enzimske funkcije (Wolff i sar. 2014). Ova usklađenost je pod selekcionim pritiskom kako bi se minimizovalo curenje elektrona (engl. *electron leakage*), i posleđično oksidativni stres. Promene u aminokiselinskoj sekvenci bilo mitohondrijski ili jedarno kodiranih proteina, mogu da naruše trodimenzionalnu strukturu subjedinica, ili dinamiku interakcija između subjedinica, što posleđično može narušiti protok elektrona ili transfer elektrona između kompleksa (Lane 2011, 2015).

Proteinski produkti 13 mtDNK gena deo su četiri od pet kompleksa ETC-a (I, III, IV, V), dok je u jedru kodirano preko 70 subjedinica ovih pet kompleksa. Uprkos činjenici da mtDNK sadrži mali broj kodirajućih sekvenci, njihovo delovanje u kooperaciji sa jedarno kodiranim genima koji se uvoze u mitohondrije, je neizmerno važno za održavanje visokih energetske potreba, i normalnog funkcionisanja eukariotskih ćelija. Pored direktnih interakcija u subjedinicama respiratornog lanca mitohondrija, još jedan nivo koadaptiranosti predstavljaju jedarno kodirani pomoćni proteini ETC-a. Postoji veliki broj različitih proteina, koji se uvozi u mitohondrije i ne učestvuje direktno u procesima OXPHOS-a, ali su neophodni za njegovo pravilno funkcionisanje. To su pre svega „montažni proteini“ šaperoni (engl. *Assembly proteins*), koji su zaduženi za sklapanje složenih konformacija ovih kompleksa. Svaka aminokiselinska promena u ovim proteinima, može dovesti do suboptimalnog interagovanja sa mtDNK kodiranim proteinima, što posleđično može narušiti funkcionalnost ETC kompleksa, čak ga i potpuno inhibirati. Pored sklapanja samih kompleksa, određeni jedarno kodirani šaperoni imaju ulogu u sastavljanju respiratornog superkompleksa (tzv. respirazoma), ogromne proteinske strukture koja povezuje komplekse I, III i IV u jednu složenu celinu koja olakšava rad ETC-a (Hill 2019).

1.4.2. Regulatorne interakcije

Pored funkcionalne usklađenosti produkata dva genoma u mitohondrijskom ETC, ćelije eukariota moraju koordinisati ekspresiju jedarno kodiranih gena (Burton i Barreto 2012a), koji su po pravilu prisutni u dve kopije po ćeliji, kao i ekspresiju mitohondrijski kodiranih gena koji su prisutni u nekoliko hiljada kopija u svakoj ćeliji. Prekomerna produkcija mtDNK kodiranih OXPHOS subjedinica, u odnosu na jedarne, predstavljala bi ogromno rasipanje ćelijskih resursa. Sa druge strane ako bi njihova produkcija bila niska, ćelije ne bi mogle odgovoriti energetskim zahtevima. Stoga je važno razmatrati koevoluciju dva genoma i u kontekstu regulatornih interakcija, koje se mogu ostvariti na dva nivoa, preko protein-DNK i protein-RNK interakcija.

1.4.2.1. Protein-DNK interakcije

Pored OXPHOS-a, koji predstavlja najproučavaniji i verovatno najilustrativniji nivo mitojedarnih interakcija, procesi replikacije i transkripcije mtDNK, takođe zavise od oba genoma, pa se koadaptacije između dva genoma mogu razmatrati i u okviru ovih procesa (Meiklejohn i sar. 2013). Replikacija i transkripcija mtDNK potpuno su regulisane jedrom, pošto su svi polipeptidi uključeni u ova dva procesa, jedarno kodirane sekvence. Njihova translacija se odigrava u citoplazmi odakle se uvoze u mitohondrije (Ellison i Burton 2010; Shadel i Clayton, 1997). Proces transkripcije mtDNK je kontrolisan sa dva transkripciona faktora (TFAM i TFBM) i mitohondrijskom RNK polimerazom

(POLRMT). Za razliku od jedarnih RNK polimeraza koje su sastavljene od velikog broja subjedinica, POLRMT je sastavljena od samo jedne subjedinice, pa je zadužena kako za jačinu tako i za specifičnost vezivanja promoterskih sekvenci (Gaspari i sar. 2004). Prema Ellison i Burton (2010), interakcija između POLRMT i kontrolnog regiona mtDNK predstavlja osnov transkripcionih mito-jedarnih interakcija. Ovaj jedarni protein mora biti strukturno komplementaran mitohondrijskom kontrolnom regionu, kako bi se održala optimalna regulacija mtDNK transkripcije. *In vitro* eksperimenti su pokazali da se kod hibridnih kombinacija (onih koje nisu bile prisutne zajedno u prirodnim populacijama) POLRMT i mitohondrijskih promoter sekvenci, smanjuje efikasnost transkripcije (Gaspari i sar. 2004; Ellison i Burton 2008; Chou i sar. 2010). Korišćenjem POLRMT-a poreklom iz drugih vrsta, pokazano je da što su taksoni evoluciono udaljeniji to je transkripcija nefunkcionalnija, ili čak potpuno odsustvuje (Gaspari i sar. 2004). Autori ovo objašnjavaju koevolucijom između vezujućih motiva na POLRMT i mesta prepoznavanja kontrolnog regiona mtDNK kod svake vrste.

POLRMT takođe učestvuje u replikaciji mtDNK. Ovaj enzim je zadužen za sintezu RNK prajmera, nakon čega kompleks mtDNK polimeraze (Pol γ) počinje proces replikacije. POLRMT je, stoga, neophodan za inicijaciju replikacije, pa smanjena specifičnost vezivanja između ovog jedarno kodiranog proteina i mtDNK promoterskih sekvenci ima dvostruki uticaj, kako na mtDNK transkripciju, tako i na replikaciju (Clayton 2000; Falkenberg i sar. 2007). Ova uloga POLRMT, kao i uloga drugih proteina uvezenih iz citoplazme u replikaciji mtDNK, postavlja osnovu još jednog vrlo važnog ćelijskog procesa, koji zavisi od mito-jedarnih interakcija. Ellison i Burton (2010) su eksperimentalno pokazali da kod međupopulacionih hibrida *Tigriopus californicus* dolazi do smanjenja adaptivne vrednosti, upravo zbog mito-jedarnog konflikta na nivou POLRMT i mtDNK promotera. Odsustvo koadaptiranosti između dva genoma usled porekla iz dve populacije, za posledicu ima smanjenu efikasnost transkripcije i replikacije.

1.4.2.2. Protein-RNK interakcije

Translacija mtDNK kodiranih proteina je još jedan od procesa, koji zavisi od bliske povezanosti dva genoma. Mitohondrijski ribozomi (mito-ribozomi) predstavljaju strukture koje sadrže veliki broj jedarno kodiranih proteina koji se funkcionalno uklapaju sa mtDNK kodiranim, 12S i 16S rRNK (Burton i Barreto 2012b). Zaduženi su za translaciju 13 mitohondrijski kodiranih OXPHOS proteina. Dakle, kada su mito-ribozomi u pitanju, mito-jedarne interakcije se dešavaju kako na nivou rRNK i jedarno kodiranih proteina sa kojima zajedno čine mito-ribozom, kao i tih istih proteina i mitohondrijskih iRNK, u čijoj translaciji ribozomi učestvuju. Translacija proteina u mitohondrijama zavisi i od visoko specifične kooperacije između tRNK, kodiranih od strane mtDNK, i mitohondrijskih aminoacil-tRNK sintetaza (mt-aaRSs) transportovanih iz citoplazme (Meiklejohn i sar. 2013). Složen proces translacije mtDNK, vođen je velikim brojem drugih jedarnih proteina kao što su faktori inicijacije i elongacije. Pored toga, efikasna translacija mtDNK proteina zavisi i od post-translacionih faktora modifikacije tRNK. Ovi proteini, uvezeni iz citoplazme, vrše modifikacije sirovih tRNK transkripta, koje omogućavaju sklapanje i zauzimanje pravilne konfiguracije tRNK, neophodne za njihovu funkciju (Lai i sar. 2010; Suzuki i Suzuki 2014).

1.4.3. Ekspresija jedarnih gena posredovana mitohondrijskim transkriptima

Pored prethodno navedenih nivoa interakcije dva genoma, nedavno je otkriven jedan specifičan oblik interakcije karakterističan za određene vrste klase Bivalvia. Ovde se radi o kontroli ekspresije jedarnih gena od strane mitohondrijskih transkripata, specifične grupe malih nekodirajućih mitohondrijskih RNK (engl. *small mitochondrial highly-transcribed RNAs*, smithRNK), koji se transportuju iz mitohondrija u jedro. Ove školjke nemaju polne hromozome, već u njihovim gonadama smithRNK mehanizmom RNK interferencije utiču na ekspresiju jedarnih gena, i time posledično utiču na razviće pola (Pozzi i sar. 2017; Passamonti i sar. 2020). Ovo je prvi slučaj zabeležene kontrole jedarnih lokusa, produktima mitohondrija, metodom RNK interferencije.

1.5. Varijabilnost mtDNK na različitim nivoima organizacije živih sistema

Genetička varijabilnost mtDNK se može razmatrati na nekoliko nivoa. Pre svega postoji unutarindividualni nivo mtDNK varijabilnosti koji predstavlja razlike u mtDNK sekvencama prisutnu unutar jedinke, a ova pojava se naziva heteroplazmija. Takođe, možemo govoriti o simpatričkoj mtDNK varijabilnosti koja predstavlja varijabilnost mtDNK sekvence između jedinki iste populacije. Sledeći nivo razmatranja predstavlja međupopulaciona mtDNK varijabilnost, koja obuhvata razlike mtDNK sekvence između različitih populacija određene vrste. Finalni nivo predstavlja mtDNK varijabilnost između različitih vrsta i viših taksonomskih kategorija. Teorijski postulati o mehanizmima koji mogu održavati stabilne funkcionalne polimorfizme mtDNK na različitim nivoima su doprineli promeni paradigme selektivne neutralnosti. Ipak ključno je bilo prikupljanje eksperimentalnih potvrda adaptivne mtDNK varijabilnosti. Za to su bili neophodni odgovarajući markeri kod različitih model sistema i izvođenje eksperimentalne evolucije.

Najlakše je bilo objasniti postojanje unutarindividualne adaptivno značajne varijabilnosti sekvence mtDNK, jer je odavno poznato da je njena stopa mutacija oko 10 puta veća od stope mutacija jedarne DNK (Brown i sar. 1979; Ballard i Whitlock 2004). Kako svaka ćelija sadrži veliki broj mitohondrija, uzimajući u obzir visoku mutacionu stopu, može se pretpostaviti da je heteroplazmija, u okviru jedne ćelije ili organizma, relativno česta pojava. Pojava ovakvih mutacija u gametima znači da će se one po principu slučajnosti preneti u većem ili manjem broju na potomstvo. Step en ispoljavanja fenotipa mutirane mtDNK, zavisi od tipa mutacije, tkiva, ali i udela mutiranih mitohondrija u potomstvu (Hartwell i sar. 2018). Stoga i štetne mutacije mogu opstajati u individuama ako se javljaju u malom broju, jer ne izazivaju značajne posledice po adaptivnu vrednost nosilaca.

Takođe, uočenu međupopulacionu adaptivnu varijabilnost nije bilo teško objasniti. Naime, do tada opšte prihvaćena neutralistička teorija evolucije mtDNK, nije isključivala prisustvo adaptivne varijabilnosti, samo je smatrala da je njen udeo jako mali. Različite populacije obično imaju specifične početne genofondove, koji su dalje oblikovani, kako adaptivnim tako i neutralnim procesima. Različiti selekcionarni pritisci u populacijama koje naseljavaju različita staništa mogu dovesti do favorizovanja ili fiksacije različitih mtDNK varijanti. Takođe, slučajni procesi mogu dovesti do divergencije populacija u mtDNK varijantama. Poznati su primeri gde različite populacije, koje se generalno značajno razlikuju u učestalostima različitih mtDNK haplogrupa, često imaju različite prevalencije prema određenim bolestima. Utvrđene su povezanosti između ljudskih mitohondrijskih haplogrupa sa predispozicijom na različite bolesti, kao što su određeni kanceri (Booker i sar. 2006), kardiovaskularne bolesti (Nishigaki i sar. 2007), dijabetes (Mohlke i sar. 2005), ali i sa dugovečnošću

(Ivanova i sar. 1998; Tanaka i sar. 2000) kao i atletskim performansama (Scott i sar. 2005; 2009). Upravo sa otkrićima medicinske genetike i povezivanja mtDNK varijanti sa patofiziološkim stanjima, sve veći broj autora se bavio povezanošću sredinskih faktora i distribucije mitohondrijskih haplotipova. Dokazi o klonalnim rasprostranjenostima mtDNK haplotipova menjali su opšte prihvaćeno mišljenje da je varijabilnost mtDNK oblikovana gotovo isključivo stohastičkim procesima, ističući daleko veću ulogu selekcije nego što se ranije smatralo (Ruiz-Pesini 2004; Mishmar i sar. 2003; Grant 2006).

Koristeći ovaj princip, razlike u varijabilnosti mtDNK između srodnih vrsta je još lakše objasniti. Kako su različite vrste međusobno udaljenije od različitih populacija određene vrste, reproduktivno su izolovane, zauzimaju različite ekološke niše, i podležu različitim selekcionim pritiscima i različitim stohastičkim procesima, prilično je jasno da će postojati stabilna mtDNK divergencija između ovih vrsta. Odsustvo protoka gena koji homogenizuje varijabilnost omogućava selekciji u različitim vrstama da oblikuje varijabilnost prema specifičnim selektivnim pritiscima (Wolff i sar. 2014).

U razmatranju održavanja adaptivne varijabilnosti posebnu pažnju treba obratiti na unutarpopulacionu (simpatričku) varijabilnost. Teorijske pretpostavke zasnovane na odlikama mtDNK i njenog nasleđivanja ukazuju da je održavanje ovog vida varijabilnosti teško i zahteva specifične uslove (Clark 1984; Gregorius i Ross 1984; Babcock i Asmussen 1996; 1998; Dowling i sar. 2007b.) Pored toga, razlike u mtDNK sekvencama dve jedinice iz iste populacije su daleko manje od razlika u sekvencama dve jedinice različitih vrsta. Manji stepen varijabilnosti znači da je daleko teže eksperimentalno dobiti statistički značajne rezultate koji potkrepljuju adaptivni značaj simpatričke mtDNK varijabilnosti.

1.6. Održavanje mtDNK varijabilnosti

Kako se tokom devedesetih godina prošlog veka pojavio veliki broj radova (Rand i sar. 1994; Ballard i Kreitman 1994; Nachman i sar. 1996; Templeton 1996; Rand i Kann 1998) koji je kod različitih taksona opisivao znatno veću varijabilnost mtDNK od očekivane u skladu sa neutralističkom teorijom evolucije mtDNK, sve veći broj autora je pokušavao da je teorijski objasni različitim mehanizmima. Kada govorimo o simpatričkoj mtDNK varijabilnosti, zbog haploidnosti, uniparentalnog nasleđivanja i drugih specifičnosti mtDNK, uslovi neophodni da bi se održao stabilan mtDNK polimorfizam su dosta strogi. Teorijska i eksperimentalna razmatranja podrazumevaju da održavanje mtDNK varijabilnosti podrazumeva nekoliko mehanizama koje se mogu dopunjavati i preplitati. To su pojava mito-jedarnih interakcija, selekcija negativno zavisna od učestalosti, polno specifična selekcija, X-vezane mito-jedarne interakcije, interakcije mito-jedarnog genotipa i sredine.

1.6.1. Mito-jedarne interakcije

Prve teorijske studije jedarno citoplazmatskih interakcija i njihovih posledica na fitness (Clark 1984; Gregorius i Ross 1984) postulirale su da je za održavanje citoplazmatskog polimorfizma neophodna veza sa jedarnim polimorfizmom. Autori obe studije su teorijski došli do zaključka da su

za održavanje stabilne interakcije između jedarnog lokusa i citoplazmatskog lokusa (lokusa na mtDNK ili hloroplastnoj DNK), potrebni dodatni uslovi kao što je delovanje selekcije negativno zavisne od učestalosti ili postojanje seksualne asimetrije, odnosno razlika u fitnessu između polova.

Eksperimentalne analize mito-jedarnih interakcija ipak nisu bile tako usaglašene. Naučnici dugo nisu bili u mogućnosti da potvrde njihovo održavanje unutar populacija. U početku su imali više uspeha u objašnjavanju održavanja međupopulacione varijabilnosti mehanizmom uzajamnog mito-jedarnog polimorfizma. Eksperimentalna studija zavisnosti fitnessa od mito-jedarnih interakcija kod *D. melanogaster* potvrdila je ovu teorijsku pretpostavku, koristeći linije poreklom iz šest različitih populacija (Clark 1985). Ipak eksperimenti u kojima je analizirano održavanje unutarpopulacione varijabilnosti nisu bili tako dosledni. Tako su Clark i Lyckegaard (1988) detektovali mito-jedarne interakcije samo u eksperimentima u kojima su ukrštali linije *D. melanogaster* iz udaljenih geografskih regija, dok ukrštanja linija iz iste populacije nisu pokazala znake postojanja mito-jedarnih interakcija.

Veliki broj radova na ovu temu je kao model organizam koristio kopepodu međuplimne zone *Tigriopus californicus*. Rawson i Burton (2002) su pokazali da međupopulacioni hibridi imaju značajno snižene efikasnosti funkcionisanja COX-a (Citohrom C oksidaza kompleks) iz jedne populacije, sa citohromom C (Cyt c) iz druge populacije. Autori objašnjavaju ovaj fenomen važnošću mito-jedarnih interakcija u funkcionisanju elektron-transportnog lanca. Kako je COX sastavljen iz velikog broja subjedinica, između ostalih mtDNK kodirane COI i COII kod kojih su zabeležili visok stepen varijabilnosti između ove dve populacije, dok je Cyt c jedarno kodiran, kod međupopulacionih hibrida dolazi do interakcije subjedinica dva genoma koje nisu koevoluirale zajedno pa je efikasnost elektron-transportnog lanca smanjena. Drugi rad na istoj model vrsti potvrdio je ove nalaze pronasavši i polno specifični efekat u nekoliko međupopulacionih poređenja (Willett i Burton 2001).

Do danas, eksperimentalni radovi, koji su se bavili održavanjem unutarpopulacione, odnosno simpatričke varijabilnosti mito-jedarnim interakcijama, davali su oprečne rezultate. Neki autori nisu nalazili dokaz održivosti unutarpopulacione mtDNK varijabilnosti posredstvom mito-jedarne epistaze (interakcije) (Kurbalija Novičić i sar. 2015), dok su drugi koristeći slične eksperimentalne postavke dokazivali upravo suprotno (Dowling i sar. 2008).

1.6.2. Selekcija negativno zavisna od učestalosti

Gregorious i Ross (1984) predlažu model selekcije negativno zavisne od učestalosti (engl. *Negative Frequency-Dependant Selection*, NFDS), koja održava varijabilnost u citoplazmatskim i jedarnim genima čiji su produkti funkcionalno povezani. Kod ovog tipa balansne selekcije, fitness određenog alela inverzno je proporcionalan učestalosti istog alela u populaciji. Ukratko, selekcija negativno zavisna od učestalosti (NFDS) favorizuje retke alele, dok se fitness nosilaca alela smanjuje kako mu se učestalost u populaciji povećava. Prema Lewontin-u (1974), kad god je određeni haplotip najgori neprijatelj samom sebi, njegov fitness će se smanjiti kako genotip postaje učestaliji. Najlakši način da se održe jedarni i mtDNK polimorfizam u populaciji jeste da jedarni aleli imaju suprotne efekte na fitness u svakoj citoplazmi. Po ovom modelu svaka od jedarnih varijanti bila bi fiksirana u populaciji da je prisutna samo jedna ili druga mtDNK varijanta.

MacRae i Anderson (1988) su sprovedli niz eksperimenata na *D. pseudobscura*, kojima su potvrdili održivost mtDNK polimorfizama u populaciji, i empirijski pokazali da je prirodna selekcija ta koja održava mtDNK varijabilnost. Iako su u ovim eksperimentima koristili mušice poreklom iz

dve različite populacije, ove linije su tokom velikog broja generacija, zajedno evoluirale u istim eksperimentalnim uslovima. Tokom generacija učestalosti haplotipova su fluktuirale, ali nijedan haplotip nije bio fiksiran ni u jednom od populacionih kaveza. Autori su pokazali da su i mitohondrijski i jedarni genom uključeni u promene učestalosti mtDNK haplotipa u ovom eksperimentu i kao najverovatniji mehanizam koji održava uzajamni mito-jedarni polimorfizam predložili selekciju negativno zavisnu od učestalosti. Važno je naglasiti da su autori ovaj eksperiment ponovili više puta, i da nisu u svakoj iteraciji dobili rezultate konzistentne sa NFDS.

Funkcija NFDS u održavanju isključivo jedarnih polimorfizama na primeru hromozomskih rearanžmana kod *Drosophila ananassae* je odavno poznata i dobro opisana (Kojima i Tobar 1969). Kada su biljke u pitanju, opisana je funkcija NFDS u održavanju jedarnih polimorfizama kod očuvanja auto-inkompatibilnosti (Charlesworth 2006). Uloga NFDS poznata je i u jedarnim genima uključenim u funkciju imunskog sistema kod kičmenjaka (Loisel i sar. 2006). Ipak kada su mito-jedarni polimorfizmi u pitanju, prošlo je puno vremena od postulacije ove teorije do prvih eksperimentalnih nagoveštaja (Arnqvist i sar. 2010). Pomenuti autori su merenjem metaboličke stope kod kombinacija mito-nukleusnih linija *Callosobruchus maculatus*, vrste žiška koji napada određene leguminoze, pokazali diferencijalni fitnes mtDNK haplotipova zavisan od jedarne pozadine, ali i sredinskih faktora. Tumačeći dobijene rezultate, autori diskutuju da je baš NFDS tip balansne selekcije koji održava unutarpopulacioni polimorfizam mtDNK kod ove vrste, kao i da varijabilni sredinski uslovi potpomažu postojanje ovog vida selekcije. U cilju eksperimentalnog potvrđivanja NFDS kao mehanizma odgovornog za održavanje mito-jedarnih koadaptacija u populaciji pomenute vrste, Kazancioglu i Arnqvist (2013) su postavili eksperiment prema teorijskim pretpostavkama koje je predložio Lewontin (1974). Prva pretpostavka jeste postojanje heterogenosti sredinskih uslova, što su oni obezbedili svojim eksperimentalnim populacijama kada su resursi i temperatura u pitanju. Druga pretpostavka jeste postojanje interakcije genotipa i sredinskih uslova što im je poznato iz prethodnih radova (Dowling i sar. 2007b; Arnqvist i sar. 2010; Dowling i sar. 2010). Treća pretpostavka jeste postojanje kompeticije za resursima, gde su njihove eksperimentalne populacije evoluirale u uslovima povećane juvenilne kompeticije. Mereći promene učestalosti dva haplotipa u populacionim kavezima dobili su rezultate koji se nedvosmisleno poklapaju sa teorijskim predviđanjima, postuliranim za ovaj mehanizam, čime su prvi put eksperimentalno potvrdili ulogu NFDS u održavanju mito-jedarnih koadaptacija u populaciji.

1.6.3. Polno specifična selekcija

Inspirisani teorijskim postulatima koji su proizašli iz radova objavljenih sredinom 80-tih godina prošlog veka (Clark 1985; Gregorious i Ross 1984), odnosno tezom da je za održavanje uzajamnog mito-jedarnog polimorfizma neophodno postojanje „seksualne asimetrije“, Babcock i Asmussen su deceniju kasnije razvili seriju modela koji testiraju uticaj polno specifične selekcije na održavanje simpatričke mtDNK varijabilnosti (Babcock i Asmussen 1996; 1998). Teorija predviđa da su određene mito-jedarne kombinacije boljeg fitnesa kod jedinki jednog pola dok su druge kombinacije favorizovane kod drugog pola. Autori su u pomenuta dva rada definisali uslove, i teorijskim razmatranjima i numeričkim simulacijama pokazali da razlike u fitnesu između polova, bilo u juvenilnom ili adultnom stadijumu mogu održavati stabilne mito-jedarne polimorfizme. Neophodno je da uticaj mito-jedarne interakcije nije multiplikativan na fitnes individue, odnosno fitnes mito-jedarne interakcije ne može biti jednak prostom proizvodu fitnesa jedarnog lokusa i mitohondrijskog.

Mužjaci i ženke imaju različite reproduktivne strategije, polno specifične životne istorije, kao i obrasce ponašanja, što za posledicu ima različite selektivne pritiske (Trivers 1972; Parker 1979). Kako se mitohondrije kod većine vrsta nasleđuju samo majčinskom linijom, selekcija deluje na njih samo kod ženki. Ako je mutacija štetna isključivo za mužjake, selekcija je „slepa“ za takvu mutaciju, i ona se genetičkim driftom može proširiti do značajne učestalosti u populaciji, drastično smanjujući fitnes mužjaka. Štaviše, određena mutacija koja je korisna kod ženki može imati štetan uticaj kod mužjaka, a selekcija će je favorizovati u celoj populaciji. Ovu hipotezu postulirali su Frank i Hurst (1996), a Gemmell i saradnici (2004) su je nazvali materinska kletva (engl. *mother's curse*). Materinska kletva je jedan od razloga za generalno duži životni vek ženki (Austad 2006; Camus i sar. 2012), takođe ona je razlog više stope bolesti izazvanih mitohondrijskim mutacijama u muškom delu populacije (Martikainen i sar. 2017). Eksperimentalni rezultati radova koji su ispitivali ovu hipotezu imali su oprečne rezultate. Potpora za ovu hipotezu dobijena je u studijama komponenti životne istorije (Rand i sar. 2006; Camus i sar. 2012; Yee i sar. 2013; Camus i sar. 2015; Đorđević i sar. 2015; 2017; Drummond i sar. 2019) ali i enzimske aktivnosti (Sackton i sar. 2003). Ipak značajan broj radova koji je analizirao osobine životne istorije dobio je rezultate koji nisu u skladu sa pretpostavkama ove hipoteze (Mossman i sar. 2016; Vaught i sar. 2019; Healy i sar. 2022; Watson i sar. 2022).

Pretpostavlja se da se mužjaci „odupiru“ povećanom genetičkom opterećenju, kompenzatornim mutacijama u mitohondrijskim proteinima kodiranim u jedru, koje su adaptivne samo za mužjake (Maklakov i Lummaa 2013). Analize ekspresije gena po tkivima, kod vrsta roda *Drosophila*, pokazale su da je ekspresija dupliranih OXPHOS gena u jedru značajno povećana u testisima (Tripoli i sar. 2005; Innocenti i sar. 2011). Autori objašnjavaju ovaj nalaz kao upravo jedan od mehanizama koji „oslobađa“ mužjake materinske kletve, gde se zbog nepostojanja selektivnog pritiska, koji deluje na originalni OXPHOS gen na novonastalom paralogu, selekciji daje prostor da nadoknadi smanjeni fitnes, kroz polno specifičnu ekspresiju ovih gena. Kompenzatornim mutacijama u novim dupliranim genima, mužjaci se prilagođavaju novom biohemijskom i strukturnom balansu mitohondrija, i tako održavaju metaboličku efikasnost (Connallon i sar. 2018). Pored toga ovim mehanizmom je ograničena divergencija mitohondrijski kodiranih proteina kako ne bi narušili ovaj kooperativni balans, ograničavajući adaptivnu vrednost novih mutacija mtDNK koje bi smanjile kompatibilnost mitohondrijskih proteina poreklom iz dva genoma. Eksperimentalna potvrda kompenzatornih mutacija dobijena je ukrštanjem interpopulacionih i interspecijskih hibrida *D. simulans* klade (Sackton i sar. 2003), gde su hibridni mužjaci sa stranim jedarnim pozadinama imali značajno smanjenu aktivnost COX-a, jer više nisu imali populaciono specifične jedarne kontra-adaptacije kojima bi vraćali izgubljeni fitnes.

Eksperimenti analize fitnesa na vrstama roda *Drosophila* pokazali su polno specifične efekte mito-jedarnih interakcija na određene osobine životne istorije. Dowling i saradnici (2007a), su analizirali linije poreklom iz jedne populacije *D. melanogaster*, i pronašli polno specifičan efekat kada je juvenilni vijabilitet u pitanju. Eksperimenti analize dužine života kod *D. melanogaster* (Drummond i sar. 2019; Vaught i sar. 2020) pokazali su da je i ova komponenta životne istorije pod uticajem epistatičkih interakcija dva genoma. Takođe, rezultati ovih studija, nedvosmisleno pokazuju polno specifični efekat mito-jedarnih interakcija na dužinu života. Kod *D. subobscura*, Jelić i saradnici (2015) su pronašli značajnu interakciju pola i mito-jedarnog genotipa za istu osobinu. Ovo pokazuje da se ishodi mito-jedarnih interakcija razlikuju između polova kod ove vrste. Indirektnu potvrdu ovog nalaza autori su dobili analizom još jedne fitnes komponente, naime analiza odnosa polova adultnih jedinki je pokazala razlike u preživljavanju od jajeta do adulta. Odnosno, u jednom od dva eksperimentalna modula, autori su zabeležili statistički značajan uticaj mito-jedarne interakcije. Slična serija analiza fitnes komponenti (Đorđević i sar. 2015, 2017) sprovedena je i na pasuljevom žišku (*Acanthoscelides obtectus*). Ispitujući preživljavanje i dužinu razvića od jajeta do adulta, autori su pronašli značajan uticaj mito-jedarnih interakcija na obe fitnes komponente. Kod dužine razvića postojala je i varijabla pola u modelu, koja je bila značajna sama po sebi, ali njena

interakcija sa kombinacijom genotipa nije bila značajna. Iste rezultate su dobili i kada su analizirali uticaj ovih faktora na telesnu težinu adulta (Đorđević i sar. 2015). Autori su pronašli polno specifične efekte mito-jedarnih adaptacija kada su analizirali dužinu života kod ove vrste, dok to nije bio slučaj kada je preživljavanje u pitanju, ali jeste interakcija mtDNK haplotipa i jedarnog genotipa. U ovom radu su analizirali i varijabilnost u aktivnosti mitohondrijskih ETC kompleksa I, II, III, IV. Očekivano, dobili su značajnu interakciju mitohondrijskog genotipa i jedarne pozadine kod svih ispitivanih ETC kompleksa sem ETC kompleksa II, koji se sastoji isključivo iz jedarno kodiranih subjednica. Zanimljivo, interakcija mtDNK:nuDNK:pol pokazala je statistički značajan uticaj na aktivnost ETC kompleksa I i II (Đorđević i sar. 2017), dok je osnovni efekat mtDNK bio statistički značajan jedino u ETC II. Navedena kolekcija radova eksperimentalno je naznačila ulogu polno specifične selekcije u promovisanju mito-nukleusnih interakcija koje posledično omogućavaju egzistiranje simpatričke mtDNK varijabilnosti.

1.6.4. Interakcije X vezanih lokusa i mtDNK

Rand i saradnici (2001) su razvili model mito-nukleusnih interakcija gde se jedarni lokusi nalaze na X hromozomu. Činjenica, da se dve trećine X hromozoma nalaze u ženama, odnosno da se dve trećine kopija X hromozoma segregiraju zajedno sa mitohondrijama, olakšava uslove neophodne za održavanje udruženog mito-jedarnog polimorfizma. Simulacijama su pokazali da su uslovi potrebni za održavanje intrapopulacionog polimorfizma na mtDNK lokusu koji interaguje sa haploidnim lokusom na X hromozomu, dosta manje restriktivni nego u slučaju autozoma. Takođe, poredeći dobijene rezultate sa rezultatima Clark i Lyckegaard (1988), pokazali su da se znatno veći udeo mito-jedarne varijabilnosti može održati unutar populacije, kada je reč o X vezanim jedarnim genima. Analizirane mito-jedarne koadaptacije bile su polno specifične, odnosno pokazalo se da selekcija ne favorizuje iste genotipove u oba pola. Rezultati dobijeni simulacijama su potvrđeni eksperimentalno, merenjem fitnesa linija *D. melanogaster* (Rand i sar. 2001).

1.6.5. Interakcije mito-jedarnog genotipa i sredine

Pored dva gore razmatrana mehanizma selekcije (selekcija negativno zavisna od učestalosti i polno specifična selekcija), koje mogu održavati mito-jedarnu varijabilnost unutar populacija, predložen je još jedan model balansne selekcije, koji podrazumeva interakcije mitohondrijskog i mito-jedarnog genotipa sa sredinskim faktorima (Dowling 2007b). Po ovom modelu jedinka određenog genotipa u populaciji koja se suočava sa varijabilnim uslovima sredine, imaće relativan fitnes u zavisnosti od sredinskih faktora. Ovi faktori mogu varirati prostorno ili vremenski gde će suprotne mito-jedarne kombinacije davati prednost u krajevima distribucije variranja sredinskih uslova. Dok je odavno teorijski postulirano da heterogenost sredine može biti zaslužna za održavanje jedarnih polimorfizama unutar populacija (Hedrick 1986), gotovo da nema teorijskih radova koji su se bavili uticajem variranja sredine na održavanje mitohondrijske varijabilnosti.

Sve veći broj eksperimentalnih radova pokazuje ulogu variranja sredinskih uslova u održavanju mito-jedarnih interakcija, ipak gotovo svi radovi analiziraju osobine životnih istorija u linijama poreklom iz različitih populacija, dok su radovi koji analiziraju linije poreklom iz iste populacije retki. Većina ovih radova koncentrisala se na ulogu temperature (Ballard i Whitlock 2004;

Somero 2002; Blier i Lemieux 2001; Rawson i Burton 2002; Doi i sar. 1999) zbog činjenice da su enzimski kompleksi, kao oni uključeni u elektron-transportni lanac u mitohondrijama, veoma osjetljivi na temperaturne promene. Radeći na interpopulacionim hibridima *Tigriopus californicus*, Willett i Burton (2003) su pokazali da je adaptivna vrednost mito-jedarnih kombinacija visoko korelisana sa temperaturom i svetlosnim režimom u eksperimentu analize fitnesa. Ovaj nalaz ukazuje da upravo variranja sredinskih faktora mogu biti zaslužna za odžavanje mito-jedarne varijabilnosti. Harrison i Burton (2006) su potvrdili ove nalaze izazivajući *de novo* mutacije u sekvenci *Cyt c* gena i testirajući efikasnost COX-a kod nekoliko populacija *Tigriopus californicus*. Ovaj eksperiment je pokazao da efikasnost ovog enzima zavisi od spoljašnje temperature, tj. pokazalo se da jedinke određene mito-jedarne kombinacije preferiraju nižu ili višu temperaturu na kojoj imaju veću efikasnost ETC-a. Autori diskutuju da su dva genoma koevoluirala da fizičke interakcije njihovih produkata budu najefikasnije u određenom temperaturnom spektru, i da je to razlog zašto su određene kombinacije bolje na određenim temperaturama (Willett i Burton 2003). Eksperiment na *C. maculatus* (Dowling i sar. 2007b) je takođe pokazao razlike u fitnesu između kombinacija mito-jedarnih genotipova u zavisnosti od sredinskih uslova, tačnije temperature. Eksperimentom u kom su pratili dužine razvića, autori su pokazali da određeni mito-jedarni genotipovi imaju brže relativno razviće na nižoj, a drugi na višoj temperaturi. Iako su autori koristili linije poreklom iz različitih populacija, ove linije su održavane u laboratorijskim uslovima preko pet godina. Naše razumevanje uticaja temperature na fitnes mito-jedarnih genotipova, prošireno je radovima na istoj model vrsti (Arnqvist i sar. 2010; Immonen 2020). Autori su pokazali da je epistaza između dva genoma zavisna od sredinskih faktora, kao i da je interakcija sredine sa mito-jedarnim genotipom najzaslužnija za održavanje mitohondrijskih polimorfizama u laboratorijskoj populaciji. Eksperiment na *D. melanogaster* (Camus i sar. 2020) je proučavao vezu između mtDNK i ishrane i fitnesa. Autori ovde nisu proučavali mito-jedarne interakcije, već su analizirali uticaj ishrane i mitohondrijskih haplotipova na istoj jedarnoj pozadini. Eksperiment je pokazao statistički značajnu interakciju mtDNK i sredinskih faktora, u ovom slučaju nutritivne vrednosti hrane, čime je pokazano da mtDNK haplotipovi moduliraju fitnes u zavisnosti od režima ishrane. Drummond i saradnici (2019) su pokazali statistički značajnu interakciju sredine (tip hrane) i kombinacije mtDNK:nuDNK genotipa na dugovečnost kod *D. melanogaster*.

Kada su intrapopulacioni eksperimenti u pitanju, grupa autora (Dowling 2007a) je poredeći fitnes mito-jedarnih genotipova kod *D. melanogaster*, pokazala da je relativni fitnes intergenomskih kombinacija genotipova zavisna od sredine u kojoj se ispoljava.

Poznata je i korelisanost ljudskih mtDNK haplotipova i geografske širine, odnosno klime. Funkcionalne mutacije mtDNK koje menjaju mitohondrijsku efikasnost vezivanja kiseonika u procesu proizvodnje ATP-a (engl. *mitochondrial coupling efficiency*) imale su veliki značaj za širenje i adaptaciju ljudskih populacija. Menjajući preraspodelu trošenja kalorija između stvaranja ATP za rad i stvaranja toplote, selekcija je favorizovala određene haplotipove u određenim regionima sveta, što je pomoglo našim precima da osvoje gotovo čitavu planetu (Wallace 2010, Mishmar i sar. 2003). Niz drugih studija je takođe pronašao povezanost učestalosti mtDNK haplotipova kod različitih vrsta i sredinskih faktora kao što su nadmorska visina (Fontanillas i sar. 2005), geografska širina (Camus i sar. 2017) i temperaturne kline (Quintela i sar. 2014). Prema hipotezi mitohondrijske klimatske adaptacije (Camus i sar. 2017), polimorfizmi koji se akumuliraju u mtDNK haplotipovima poreklom iz različitih krajeva su posledica selekcije na preovlađujuće klimatske uslove. Lajbner i saradnici (2018) su eksperimentalno potvrdili ovu hipotezu, termalnom selekcijom na dve populacije *D. melanogaster*, za koje je od ranije bilo poznato da su učestalosti njihovih mtDNK haplotipova klinealno raspoređene. Režimima termalne selekcije oni su zabeležili promene učestalosti dva haplotipa u eksperimentalnim populacijama koje odgovaraju očekivanim učestalostima prirodnih populacija iz odgovarajuće termalne klime.

1.7. Model vrste

Dva model organizma korišćena u ovoj disertaciji u ispitivanju adaptivnog značaja varijabilnosti mtDNK su *Drosophila subobscura* Collin (1936), i *D. obscura* Fallen (1823). Obe vrste pripadaju *Sophophora* podrodu, u okviru kog predstavljaju nominalne vrste svojih podgrupa. Simpatričke su vrste u najvećem delu svojih areala, sa originalno palearktičkim rasprostranjenjem. *D. subobscura* je preneti i u južnu Ameriku 70ih godina prošlog veka, odakle se za kratko vreme proširila južnoameričkim kontinentom, a odatle i severnoameričkim kontinentom (Ayala i sar. 1989; Pascual i sar. 2007). Iako su zajedno prisutne u kolekcijama *Drosophila* u većem delu Evrope, ipak postoje određene razlike u njihovom rasprostranjenju. Na osnovu pregleda literature može se zaključiti da je areal *D. obscura* pomeren severnije, odnosno *D. subobscura* južnije. Takođe, zbog opsežnih istraživanja koja su rađena na *D. subobscura* njen areal je znatno bolje opisan. *D. subobscura* se javlja od centralne Skandinavije do severnih delova Afrike. Na zapadu od Portugala pa sve do Bliskog istoka, pa čak i Irana (Lakovaara i Saura, 1971; Brehm i Krimbas, 1991). *D. subobscura* je zabeležena još istočnije u Kazahstanu i Uzbekistanu pa čak i severozapadnom delu Kine (Watabe i sar. 1993). *D. subobscura* se izvorno javlja i na atlanskim ostrvima, kao što su Kanarska, Azorska i Madeira. U najvećem delu areala, *D. subobscura* je brojnija vrsta, sem u Skandinaviji gde *D. obscura* preovladava. *D. obscura* je najučestalija vrsta roda *Drosophila* u južnoj Finskoj, a izolovane populacije ove vrste se mogu pronaći duž Norveške obale pa čak i u severnim delovima Laponije (Lakovaara i Saura 1971). U Velikoj Britaniji ove dve vrste predstavljaju dve najučestalije vrste roda *Drosophila* sa sličnim učestalostima, sa tim da je *D. subobscura* brojnija tokom većeg dela godine (Shorrocks 1975; Begon 1978). Na Balkanskom poluostrvu *D. subobscura* je dosta brojnija od srodne *D. obscura* (Stanić i sar. 2002; Pavković-Lučić i sar. 2012), sem na višim nadmorskim visinama, gde su im brojnosti slične (opservacija kolega sa Odeljenja za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju na osnovu dugogodišnjih terenskih istraživanja).

Kada su genetička istraživanja u pitanju, vrste roda *Drosophila* su među životinjama verovatno u samom vrhu najizučavanijih vrsta. Mali broj hromozoma koji su dobro opisani, kratko vreme generacija, veliki broj potomaka, mala veličina i jednostavnost održavanja samo su neke od prednosti, zbog kojih su se naučnici još pre više od 100 godina odabrali vinske mušice kao model organizme za genetička istraživanja. Otkriće velikih politenih hromozoma u pljuvačnim žlezdama larvi samo je doprinelo da se zacementira centralno mesto ovih životinja kao model organizama. Vrste roda *Drosophila* intenzivno se koriste i u fiziološkim, citogenetičkim, etološkim, biogeografskim, genotoksikološkim istraživanjima, pa sa pravom možemo reći da su jedan od najizučavanijih model sistema u biologiji. Iz *obscura* grupe populacionim genetičarima i evolucionim biologima iz Evrope omiljena je baš *D. subobscura*, dok je u Americi to *D. pseudoobscura*. *D. subobscura* je često korišćen model i u ekološkim istraživanjima, zbog njene široke rasprostranjenosti. Mogućnost ove vrste da osvaja nove predele, i da se prilagodi širokom spektru godišnjih klimatskih ciklusa, pokazala se jako interesantnom i ekolozima.

Od dve vrste korišćene u ovom radu, genetička varijabilnost prirodnih populacija *D. subobscura* je značajno više istražena. Prirodne populacije *D. subobscura* se jako dugo izučavaju pa je njihova genetička varijabilnost jako dobro opisana na nivou kako fenotipskih tako i hromozomskih ali i molekularnih markera (Krimbas 1993; Pascual i sar. 2001; Fragata i sar. 2010; Savić Veselinović i sar. 2019). U prvim populaciono genetičkim istraživanjima ove vrste, kao marker korišćeni su alozimi (Lakovaara i Saura 1971; Loukas i sar. 1979; Pinsker i Sperlich 1979). Zatim, istraživanja inverzionih polimorfizama, koja su dugi niz godina bila u fokusu populacionih genetičara, (Loukas i sar. 1979; 1980; Prevosti i sar. 1984; 1988), obzirom na brojnost i učestalost hromozomskih

rearanžmana, kao i pre svega klinalnu rasprostranjenost njihovih učestalosti. Nakon toga žiža interesovanja je prebačena na varijabilnost mtDNK kod *D. subobscura*. Prirodne populacije ove vrste odlikuju se opšte prisutnom homogenošću varijabilnosti mtDNK sekvence gotovo širom areala ove vrste. Naime, još odavno je poznato prisustvo dva gotovo podjednako učestala haplotipa nazvana I i II i većeg broja izvedenih haplotipova koji se javljaju sporadično (Afonso i sar. 1990; Castro i sar. 1999; Savić Veselinović i sar. 2019). U celom arealu vrste, sa izuzetkom Kanarskih ostrva, gde je jedan od endemičnih haplotipova (VIII) dominantan (Pinto i sar. 1997), ova dva haplotipa preovladavaju sa zajedničkom učestalošću od preko 90%. Haplotipovi su definisani analizom dužine restrikcioniha fragmenata (engl. *Restriction Fragment Length Polymorphism* RFLP). Ova metoda se sastoji od digestije celog molekula mtDNK sa serijom restriktivnih endonukleaza (Afonso i sar. 1990). Moya i saradnici (1993) su sekvencirali 2300 bp dug region mtDNK dva haplotipa i utvrdili da je restrikciono mesto enzima HaeIII koje razdvaja haplotipove I i II, sinonimna zamena u okviru ND5 gena. Nasuprot tome sekvenciranje citohroma b (Erić i sar. 2019), nije pokazalo konzistentne razlike između dva haplotipa. Uočen je jedan dominantan haplotip i veliki broj izvedenih, koji su zabeleženi samo jednom. Sekvenciranjem celokupne mtDNK kod većeg broja jedinki oba haplotipa (Kurbalija Novičić i sar. 2020), utvrđeno je postojanje još jedne obligatne nukleotidne razlike između dva najučestalija mtDNK haplotipa. U pitanju nije protein kodirajuća sekvenca, već gen za 12S rRNK, pa razlike u njegovoj sekvenci, utiču na sekundarnu strukturu rRNK. Budući da mitohondrijski kodirana rRNK strukturalno mora pristajati kompleksu jedarno kodiranih proteina, da bi ispunjavala svoju funkciju u sintezi proteina, razlike između dva haplotipa kod ove vrste predstavljaju više nego obećavajući model izučavanja mito-jedarnih koadaptacija. Mutacija u okviru 12S rRNK gena čini se primarnim mestom na koje deluje određeni vid balansne selekcije, stoga što ova sekvenca čini kompleks mitoribozoma, njena uloga u translaciji mtDNK proteina na kojima počivaju metabolički procesi mitohondrije, mora imati uticaja na fitnes jedinki. Sa druge strane, nije moguće isključiti ni uticaj mutacije u okviru ND5 gena, koja je doduše sinonimna, ali je poznato da je proteinski product ND5 gena važan učesnik mitohondrijskog ETC-a.

Dosadašnja istraživanja na ovoj vrsti, ukazuju pre svega na kompleksnost mehanizama koji održavaju unutarpopulacionu varijabilnost mtDNK kod *D. subobscura*, implicirajući uključenost kako adaptivno neutralnih procesa, tako i selekcije. Eksperimentalne analize koje su uključivale dva haplotipa pokazala su različite rezultate. Jedna studija (García-Martínez i sar. 1998) pokazala je da u laboratorijskim uslovima haplotip II postajao fiksiran u svim populacionim kavezima, nezavisno od početne učestalosti ova dva haplotipa. Sa druge strane, kada su mtDNK haplotipovi I i VIII na različitim jedarnim pozadinama stavljeni u kompeticiju u populacionim kavezima, uvek je preovladavao haplotip na sopstvenoj jedarnoj pozadini, implicirajući efekat mito-jedarnih interakcija (Fos i sar. 1990). Nekoliko radova je ispitivalo postojanje neravnoteže vezanosti (engl. *Linkage Disequilibrium*, LD) između jedarnih i mitohondrijskih lokusa. Castro i sar. (1999), pronašli su neravnotežu vezanosti između mtDNK i određenih alozima. Isto tako ispitivanjem neravnoteže vezanosti između mitohondrijskih haplotipova i hromozomskih aranžmana (Oliver i sar. 2002), su pronašli asocijaciju između haplotipa I i inverzije J_{st} kao i haplotipa II i inverzije J_1 . Drugi eksperiment ove grupe autora (Oliver i sar. 2005), nije pronašao asocijacije između mitohondrijskih haplotipova i hromozomskih aranžmana. U ovom radu autori su pokazali i da oba haplotipa opstaju u populacionim kavezima kada su uslovi nešto manje kompetitivni, suprotno studiji García-Martínez i sar. (1998). Povezanost mtDNK i hromozomske varijabilnosti pokazala je i studija (Savić Veselinović i sar. 2019) koja je ispitivala prisustvo LD kod osam populacija iz Srbije. Sa druge strane, pri analizi tri populacije poreklom iz različitih kanjona iz Srbije (Jelić i sar. 2012a, Jelić i sar. 2012b), nije utvrđena neravnoteža vezanosti između mtDNK i hromozomskih aranžmana.

Eksperimenti analize fitnes komponenti pokazali su dvosmislene rezultate, gde su određene fitnes komponente ukazivale na adaptivnu prednost haplotipa I u laboratorijskim uslovima (Castro i sar. 2003), dok su drugi eksperimenti indikovali adaptivnu prednost haplotipa II u laboratorijskoj sredini (Christie i sar. 2003). Ovi eksperimenti su ipak merili komponente adaptivne vrednosti dva

haplotipa na sopstvenim jedarnim pozadinama. Poređenje fitnesa nekoliko mtDNK haplotipova na uniformnoj jedarnoj pozadini (poreklom iz jednog retkog haplotipa), nije pokazalo razlike u komponentama adaptivne vrednosti između dva haplotipa (Christie i sar. 2011). Fitnes vrednosti haplotipova I i II nisu bili značajno različiti jedan od drugog, dok su se različiti retki haplotipovi pokazali kao značajno lošiji ili bolji u odnosu na dva glavna. Ovakvi rezultati sugerišu da je za održavanje simpatričke mtDNK varijabilnosti kod ove vrste najveći uticaj ima delovanje selekcije na mito-jedarne koadaptacije. Testovi neutralnosti kao i distribucije očekivanih i uočenih nukleotidnih razlika, ukazuju na stohastičke mehanizme, pre svega sezonska uska grla praćena naglim ekspanzijama populacije, ali i veliku ekspanziju populacija nakon poslednjeg ledenog doba, kao glavne uzroke za obrazac varijabilnosti mtDNK (Castro i sar. 2010; Christi i sar. 2010, Erić i sar. 2019). Sa druge strane Christie i saradnici (2010) ne isključuju ni uticaj selekcije, jer su pokazali da učestalosti dva haplotipa u prirodnim populacijama fluktuiraju tokom godine, gde je haplotip I učestaliji u proleće, dok je haplotip II brojniji tokom ostatka godine. Ovakve fluktuacije mogu biti povezane sa promenama u sredinskim uslovima tokom godine.

Gotovo jednake učestalosti dva glavna haplotipa skoro svuda u prirodi, ipak najviše upućuju na delovanje nekog oblika balansne selekcije. Kurbalija Novičić i saradnici (2015) predlažu NFDS kao mehanizam zaslužan za održavanje ravnoteže učestalosti dva haplotipa u prirodi. Prvo je teorijskim simulacijama pokazano da je zabeležena dinamika učestalosti haplotipova I i II u prirodi u skladu sa mehanizmom NFDS (Arnquist i sar. 2016), da bi ova hipoteza bila i eksperimentalno potvrđena, par godina kasnije (Kurbalija Novičić i sar. 2020). Dejstvo polno specifične selekcije je analizirano kod *D. subobscura* (Jelić i sar. 2015), ali je nije bilo moguće analizirati između haplotipova I i II zbog nepotpunosti modela. Prisustvo ovog tipa selekcije ispitivano je i potvrđeno isključivo u poređenju glavnih haplotipova sa retkim D haplotipom. Zbog prisustva dva podjednako učestala haplotipa u prirodi, *D. subobscura* je izvanredan model sistem za proučavanje mehanizama koji oblikuju i održavaju unutarpopulacionu mtDNK varijabilnost (Castro i sar. 2010; Kurbalija Novičić i sar. 2015; Jelić i sar. 2015; Savić Veselinović i sar. 2019; Kurbalija Novičić i sar. 2020).

Genetička varijabilnost *D. obscura* je značajno manje istražena. Lakovara i Saura (1971), prvi su istraživali varijabilnost kod Skandinavskih populacija na primeru 33 enzimska lokusa. Analiza hromozomskog inverzionog polimorfizma, na relativno malom uzorku, je pokazala sličan nivo varijabilnosti kao kod *D. subobscura* (Brehm i Krimbas 1991), ali naknadnih i dugoročnih istraživanja varijabilnosti hromozomskih rearanžmana nije bilo.

1.8. Komponente adaptivne vrednosti i njihova procena

Adaptivna vrednost, odnosno fitnes, određenog genotipa predstavlja ostvareni životni reproduktivni uspeh tog genotipa (Charlesworth 1994). Pošto je ovaj koncept neto adaptivne vrednosti, teško proceniti, kako je gotovo nemoguće imati informacije o fekunditetu i fertilitetu tokom čitavog života (Charlesworth i Hughes 2000), istraživanja se uglavnom svode na analiziranje komponenti životne istorije odnosno fenotipskih osobina koje utiču na preživljavanje i reprodukciju organizama. Stoga često govorimo o relativnom fitnesu nekog genotipa u okviru određene komponente ili osobine životne istorije. Osobina ili komponenta životne istorije može se definisati kao fenotipski karakter čije povećanje vrednosti uzrokuje povećanje ukupnog fitnesa, dok se sve druge osobine drže konstantnim (Charlesworth i Hughes, 2000). Komponente životne istorije poput veličine tela, fekunditeta i vijabiliteta u određenim životnim stadijumima, dužine života, procenta mužjaka, otpornosti na različite sredinske stresore kao što su uslovi suše, visoka i niska temperatutra

predstavljaju vrlo značajne fenotipske odrednice fitnesa. Genetičke i evolucione analize ovih fenotipskih komponenti su ključne za razumevanje adaptacija (Flatt 2020).

Fitnes bi očito bio maksimalan ukoliko bi preživljavanje i reprodukcija bili maksimalni tokom čitavog životnog ciklusa, ali ipak sve osobine životne istorije ne mogu biti maksimizovane procesom prirodne selekcije. Resursi u prirodi su limitirani, same osobine životne istorije se međusobno ograničavaju (engl. *trade-off*), a postoje i drugi sredinski ograničavajući faktori kao što su npr. predatori (Fabian i Flatt 2012). Ova evoluciona ograničenja su razlog zbog kojeg u prirodi ne postoje takozvani Darwinovi demoni (Law 1979), organizmi koji bi bili reproduktivno aktivni od rođenja, proizvodili beskonačan broj potomaka i bili besmrtni. Jedinke ulaganjem u jednu komponentu smanjuju resurse raspoložive za ulaganje u ostale osobine životne istorije (Roff, 2001; Partridge i sar. 2005). Ove preraspodele resursa takođe mogu biti i vremenske, recimo veće ulaganje u juvenilne osobine životne istorije tokom razvića ostavlja manje resursa za neke adultne osobine. Pa tako veća veličina tela pri izleganju rezultuje smanjenim kasnim fekunditetom (Stearns i sar. 2000). Međusobna ograničenja predstavljaju negativne fenotipske, fiziološke ili genetičke korelacije između komponenti životne istorije između jedinki u populaciji. Ako je osnova ovih ograničenja genetička, negativna korelacija između komponenti ograničava evoluciju osobina o kojima je reč. Jer iako povećanje fitnesa u određenoj komponenti generalno rezultuje povećanjem ukupnog fitnesa, ono ipak rezultuje smanjenjem fitnesa u drugoj komponenti i posledično ukupnog fitnesa. Studije eksperimentalne evolucije na *D. melanogaster* su pokazale da je cena veštačke selekcije za duži životni vek, smanjena reprodukcija u ranom adultnom stadijumu (Zwaan i sar. 1995a; b; Flatt 2011). Uzrok ovih negativnih korelacija može biti slučaj da jedan gen utiče na obe uključene osobine, gde govorimo o alelima sa antagonističkim plejotropnim dejstvom. Drugi slučaj je kada različiti, ali vezani lokusi utiču na uključene komponente životne istorije, i tada govorimo o neravnoteži vezanosti ovih lokusa. Pored negativnih korelacija postoje i pozitivne, gde povećanje vrednosti jedne komponente doprinosi povećanje i u drugoj komponenti. Jedan od primera jeste pozitivna korelacija između dužine razvića i veličine tela, ali isto tako ove dve osobine su negativno korelisane sa recimo kasnim fekunditetom (Fabian i Flatt 2012).

Zbog relativno jednostavnog i kratkog životnog ciklusa koji omogućava dugoročne eksperimente selekcije, kao i jednostavnog održavanja u laboratorijskim uslovima, globalnog rasprostranjenja, i dobro izučene genetike, sekvenciranih genoma (Kim i sar. 2021) vrste roda *Drosophila* zauzimaju centralno mesto u studijama evolucije životnih osobina (Prasad i sar. 2000). *Drosophila* predstavljaju holometabolne insekte kod kojih postoji vremenski aspekt podele života na različite stadijume (jaje, larva, lutka i adult). Zbog toga se i mnoge komponente životne istorije mogu podeliti po ovom kriterijumu, na preadultne i adultne. Najčešće ispitivane osobine životne istorije kod *Drosophila* su: dužina razvića, vijabilnost od jajeta do adulta, fekunditet, dužina razvića, dugovečnost, veličina krila i tela, otpornost na desikaciju i temperaturni stres (Dowling i sar. 2007a; Kurbalija Novičić i sar. 2012; Camus i sar. 2012; Savić Veselinović i sar. 2013; Patenković i sar. 2015; Tanasković i sar. 2015; Jelić i sar. 2015; Mossman i sar. 2016; Camus i Dowling 2018; Beribaka i sar. 2021; Erić i sar. 2022).

Prva ispitivana komponenta fitnesa jeste otpornost na desikaciju ili uslove suše, koja predstavlja jedan od najvećih sredinskih stresora sa kojim se vrste sreću u prirodnom staništu. Danas, kada je globalno zagrevanje u fokusu istraživanja više nego ikad, otpornost jedinki da se odupru ekstremno sušnim uslovima, predstavlja značajnu komponentu adaptivne vrednosti. Parametar koji se meri je vreme u satima koje su jedinke sposobne da prežive u sušnim uslovima bez hrane i vode. Iako se otpornost na desikaciju i druge stresove ne mogu smatrati kao osobine životne istorije u uskom smislu, one ipak značajno doprinose preživljavanju jedinki (Flatt 2020). Balans vode u organizmu je jako bitan za preživljavanje, ovipoziciju i stopu razvoja kod insekata (Clark i Doane 1983), pa je otpornost na desikaciju jedna od standardno ispitivanih komponenti životne istorije u studijama adaptacija kod *Drosophila*. Poznato je da kod *Drosophila* nivo otpornosti na desikacioni stres varira

između i unutar populacija (Hoffmann i sar. 2001), i da postoji genetička varijabilnost za toleranciju desikacionog stresa (Parsons 1970; 1980; Da Lage i sar. 1990; Gibbs i sar. 1997; Kang i sar. 2016). Ovo variranje je štaviše klinalno (Karan i sar. 1998). Ovi nalazi ukazuju da je ova komponenta životne istorije pod selekcionim pritiskom, što je čini idealnom za ispitivanje u okviru ove teze. Istraživanja su pokazala da je otpornost na desikaciju visoko korelisana sa dugovečnošću ali i drugim osobinama otpornosti na stres kao što je gladovanje ili visoka temperatura (Service i sar. 1985; Service 1987; Hoffmann i Parsons 1993; Rose i sar. 1992; Graves i sar. 1992; Hoffmann i Harshman 1999). Smatra se da je otpornost na desikaciju povezana sa sadržajem lipida i glikogena, čime je posledično povezana sa kompromisom između reprodukcije i preživljavanja (Prasad i Joshi 2003). Procenjuje se da je desikacija značajan uzrok smrtnosti u divljim populacijama *Drosophila*, pa je jedan od razloga analiziranja ove komponente životne istorije u mnogim radovima upravo želja da se razume uloga sredinskih stresora u ekološkoj adaptaciji (Gibbs i sar. 1997; Hoffmann i Harshman 1999; Hoffmann i sar. 2001). Jedan od razloga zašto je baš ova komponenta izabrana bio je i praktične prirode, pošto eksperiment otpornosti na desikaciju kraće traje od gladovanja i dugovečnosti, važnih komponenti životne istorije sa kojima je u korelaciji.

Sledeća odabrana komponenta životne istorije jeste dužina razvića i ona predstavlja broj dana potreban da se od polaganja jaja izlegne odrasla jedinka. Dužina razvića je posebno važna komponenta fitnesa kod vrsta sa preklapajućim generacijama (Mukai i Yamazaki 1971). Kod vrsta roda *Drosophila* smatra se da je brže razviće adaptivna prednost pošto u prirodi one polažu jaja u fermentisano voće, koje predstavlja efemerno stanište, ograničenog trajanja (Clarke i sar. 1961; Partridge i Fowler 1992). Pored toga što su voćke u kojima se razvijaju jedinke u procesu raspadanja, one mogu biti pojedene od strane herbivora, pa se smatra da su jedinke sa bržim razvićem u prednosti. Kako životni ciklus *Drosophila* u većem delu areala zavisi od sezone, brže razviće znači ranije razmnožavanje i time pruža prednost jedinkama na početku sezone u periodu ekspanzije populacije (Santos i sar. 1994; Cole 1954; Lewontin 1965). Ipak, sa druge strane rani fekunditet ženki je pozitivno korelisan sa veličinom tela, dok je veličina tela jako korelisana sa dužinom razvića (Alpatov 1929; Robertson 1960; Partridge i Fowler 1993). Veliki broj radova je pokazao da postoji velika fenotipska varijabilnost kada je dužina razvića i pitanju, i značajan udeo ove varijabilnosti je zasnovan na genetičkim razlikama (Flatt 2020).

Treća ispitivana komponenta je preživljavanje, odnosno vijabilitet, i ono predstavlja udeo jedinki koje prežive od jednog razvojnog stadijuma do drugog. Preadultni vijabilitet, odnosno stopa preživljavanja predstavlja još jednu široko korišćenu komponentu u eksperimentima životne istorije kod *Drosophila* i smatra se jednom od najznačajnijih fitnes komponenti (Mukai 1964). Genetička pozadina kao i značajan uticaj koji interakcije genotipa i sredine imaju na ovu komponentu životne istorije (Dobzansky i Spassky 1944) dobro su poznati već decenijama. Novija istraživanja su pokazala latitudinalnu i altitudinalnu klinalnu rasprostranjenost varijabilnosti za ovu osobinu (Folguera i sar, 2008). Različite studije korelacija između preadulnog vijabiliteta i drugih komponenti životne istorije pokazale su dosta različite rezultate. Neke studije su pokazale negativnu korelisanost između dužine razvića i vijabilnosti (Sang 1962; Mukai i Yamazaki 1971; Durmaz i sar. 2019), dok neke studije nisu pronašle povezanost između ove dve komponente (Chippindale i sar. 1994; Santos i sar. 1994; Zwaan i sar. 1995a; Buck i sar. 2000). Analiza fenotipskih efekata specifičnih mutacija pokazala je efekat ovih mutacija na nekoliko komponenti životne istorije između ostalih i veličinu tela i vijabilnost od jajeta do adulta (Durmaz i sar. 2019). U ovoj tezi je mereno preživljavanje od jajeta do lutke (*Egg to Pupa* EtP), kao i preživljavanje od lutke do adulta (*Pupa to Adult* PtA). Ipak, najvažnija stavka ovog eksperimenta jeste preživljavanje celokupnog razvića, odnosno od jajeta do adulta (*Egg to Adult* EtA).

Poslednja analizirana osobina jeste procenat mužjaka, među svim izleglim adultima. Zbog jednake verovatnoće kojom mužjaci prenose potomstvu X i Y hromozom, pretpostavlja se da je normalan odnos polova 1:1 i kod ove komponente se meri odstupanje od ovog odnosa. Ova

komponenta omogućava analiziranje polno specifičnog efekta vijabilnosti, odnosno juvenilnog fitnesa kod model vrsta. Kako jedinke istog genotipa mogu ostvariti različit fitnes u zavisnosti od pola, ova komponenta je jako bitna za ovu tezu u kontekstu interakcija između genotipa i pola u cilju ispitivanja uticaja polno specifične selekcije na održavanja mtDNK varijabilnosti. Odnos polova takođe predstavlja standardnu komponentu korišćenu u analizama životne istorije kod *Drosophila* (Santos i sar. 1994; van 't Land i sar. 1999; Flatt i Kawecki 2007; Bono i Markow 2009; Jelić i sar. 2015; Le Bourg 2021).

1.9. Mikroorganizmi od značaja u analizi osobina životne istorije *Drosophila* i mtDNK varijabilnosti

Kod mnogih vrsta artropoda karakteristične su infekcije unutarćelijskim mikroorganizmima. Priroda odnosa ovih mikroorganizama i arthropoda obuhvata širok spektar interakcija od parazitizma do mutualističke simbioze. Bakterije iz roda *Wolbachia*, *Spiroplasma Rickettsia*, gljive iz roda *Microsporidia*, i određeni virusi su od posebnog značaja za ovu tezu jer se karakterišu infektivnim nasleđivanjem i spektrom efekata na inficirane individue.

Svakako najznačajniji unutarćelijski simbionti kod *Drosophila* predstavljaju vrste roda *Wolbachia*. Ove intracelularne bakterije inficiraju prevashodno reproduktivna tkiva, uglavnom artropoda, uključujući čak do 70% svih vrsta insekata (Kozek i Rao 2007). Bakterije roda *Wolbachia* smatraju se najčešćim reproduktivnim endosimbiontom u biosferi, i pošto se prenose citoplazmom jajnih ćelija na potomstvo, razvile su mnogobrojne mehanizme manipulacije reprodukcije svojih domaćina (Werren 1997). *Wolbachia* sa domaćinom može imati širok spektar ekoloških odnosa, od mutualizma do parazitizma. Za ovaj rad najznačajniji je efekat *Wolbachia* na reproduktivnu biologiju, tačnije izazivanje citoplazmatske inkompatibilnosti (Breeuwer i sar. 1992; Hoffmann i Turelli 1995; Poinot i sar. 2003), koja predstavlja smanjeni vijabilitet jaja poreklom od nezaražene ženke, oplodjenih spermom zaraženog mužjaka, ili čak između jedinki zaraženih različitim sojevima ove bakterije. Izuzev direktnog efekta citoplazmatske inkompatibilnosti, za ovaj rad značajan je još jedan fenomen povezan sa infekcijom ovim endosimbiontom. Naime, kako se infekcija ovom bakterijom najčešće nasleđuje preko majke, kao i mitohondrije, očekuje se da se mtDNK varijante inficiranih ženki prošire kroz populaciju, procesom analognim genetičkom prevoženju, pošto je poznato da *Wolbachia* mehanizmom citoplazmatske inkompatibilnosti menja reprodukciju zaraženih jedinki kako bi maksimizovala svoju reprodukciju (Dean i sar. 2003). Pored toga bakterije roda *Wolbachia* se povezuju sa pojavom partenogeneze (Stouthamer i sar. 1993), feminizacijom mužjaka (Rousset i sar. 1992; Hiroki i sar. 2002) kao i smanjenim preživljavanjem mužjaka (Jiggins i sar. 2001). Poznati su mnogi efekti koje ove bakterije mogu imati na fitnes kod *Drosophila*, između ostalog, određeni sojevi *Wolbachia* skraćuju (Kyung-Tai i Seymour 1997) ili produžuju (Fry i Rand 2002) životni vek svojih domaćina, utiču na dužinu razvića (Bakula 1969), vraćaju fertilitet sterilnim ženkama supresijom *Sex-lethal* fenotipa (Starr i Cline 2002) ili smanjuju otpornost svojih domaćina na olovo (Wang i sar. 2012). Dokumentovana je i otpornost na različite RNK viruse izazvana prisustvom ovih endosimbionata kod *Drosophila* (Hedges i sar. 2008; Teixeira i sar. 2008).

Pored *Wolbachia* poznato je da se i bakterije iz roda *Spiroplasma* mogu naći kao endosimbionti kod *Drosophila*, gde je takođe ustanovljeno da mogu izazivati smrtnost mužjaka u toku embriogeneze (Montenegro i sar. 2005). Bakterije iz roda *Rickettsia*, inače jako srodne rodu *Wolbachia*, su povezane sa citoplazmatskom inkompatibilnošću kod različitih insekatskih vrsta (Yen i Barr 1971; Hsiao i Hsiao 1985). Slično, jednoćelijske gljive iz roda *Microsporidia* koje takođe

predstavljaju vertikalno prenosive endoparazite velikog broja zglavkara, mogu da izazovu smrtnost (Terry i sar. 2004) muških embriona domaćina kao i njihovu feminizaciju (Terry i sar. 1998). Endoparaziti iz roda *Microsporidia* mogu povećati smrtnost u pupalnom stadijumu *Drosophila*, za preko 70%, smanjiti fekunditet, ovipoziciju i dužinu života, kao i izazvati odstupanje od očekivanog odnosa polova u korist ženki, jednim od prethodno navedenih mehanizama (Futerman 2005, Biganski 2021).

Analiza statusa inficiranosti majčinski prenosivim endosimbiontima, značajna je za ovu tezu. Kako ovi mikroorganizmi, prvenstveno *Wolbachia*, imaju uniparentalno nasleđivanje, identično sa mitohondrijama, u inficiranim populacijama varijabilnost mtDNK je pod uticajem prirodne selekcije koja deluje na simbiote (Hurst i Jiggins 2005). Ovi mikroorganizmi mogu smanjiti diverzitet mtDNK i pomeriti distribuciju učestalosti alela u korist retkih varijanti (Maynard-Smith i Haigh 1974; Tajima 1989a), što se u potpunosti poklapa sa obrascima varijabilnosti uzrokovanih određenim demografskim procesima (uska grla praćena populacionim ekspanzijama). Pozitivna selekcija na simbionta imaće identičan pečat kao i pozitivna selekcija na same mtDNK varijante, pa je stoga jako bitno isključiti uticaj ovih mikroorganizama pre donošenja zaključaka o selektivnoj neutralnosti i demografskoj istoriji populacija.

Za neke vrste *Drosophila* je pored vertikalno prenosivih mikroorganizama, karakteristično postojanje vertikalno prenosivog virusa (Longdon i sar. 2012). Sigma virus specifičan za *D. obscura* (DObsSV), odavno je poznat nauci. Ova grupa rabdovirusa je česta kod određenih vrsta roda *Drosophila*. Karakteristično je da se vertikalno prenose preko oba roditelja, uz to da je stopa infekcije preko mužjaka znatno niža. Mužjak zaražen od strane oca, ne može preneti virus na svoje potomstvo (Brun i Plus 1980). Poznato je da izlaganje inficiranih jedinki CO₂ anesteziji izaziva paralizu ili smrt (Longdon 2011). Kada je reč o *D. subobscura*, sigma virus karakterističan za ovu vrstu nije poznat nauci. Kod ove vrste do sada nije zabeležen fenotip karakterističan za njegovo prisustvo.

Kako je eksperimentalni deo ove teze uključivao i seriju eksperimenata analize fitnesa, od velikog je značaja za ovaj eksperimentalni deo bilo isključiti sve moguće faktore koji bi na bilo koji način mogli da utiču na preživljavanje jedinki koje učestvuju u eksperimentima analize komponenti životne istorije, pa i infekciju ovim virusom. Takođe, kako se ispitala mtDNK varijabilnost *D. obscura* bitno je bilo isključiti efekat koji bi mikroorganizmi sa infektivnim nasleđivanjem mogli da imaju.

2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

U okviru ove doktorske disertacije ispituje se postojanje adaptivnih razlika između nosilaca simpatričkih mtDNK haplotipova. Pored toga ova teza nastoji da razgraniči uticaje selektivnih mehanizama koji održavaju unutarpopulacionu varijabilnost mtDNK. Model organizmi su dve vrste vinske mušice *Drosophila subobscura* i *D. obscura*. Određeni ciljevi su bili isti kod obe model vrste, dok su drugi bili specifični za datu model vrstu u zavisnosti od karakteristika kao i prethodne opisanosti mtDNK varijabilnosti.

Kod model vrste *D. subobscura* ciljevi su bili sledeći:

- utvrđivanje postojanja adaptivnih razlika između nosilaca dva najučestalija mtDNK haplotipa
- utvrđivanje adaptivnog značaja mtDNK variranja koje ne podrazumeva razlike između dva glavna haplotipa, već je specifično za svaku od jedanaest replikovanih eksperimentalnih grupa
- ispitivanje postojanja mito-jedarnih interakcija, odnosno diferencijalnog fitesa nosilaca različitih mtDNK haplotipa u zavisnosti od jedarne pozadine
- ispitivanje prisustva interakcija pola i genotipa, odnosno ispitivanje uticaja polno specifične selekcije na održavanje mtDNK varijabilnosti
- utvrđivanje signala karakterističnog za hipotezu materinske kletve
- ispitivanje prisustva interakcija sredinskih faktora (temperature i dužine dana) i genotipa, odnosno ispitivanje uticaja selekcije zavisne od sredinskih uslova na održavanje mtDNK varijabilnosti

Kod model vrste *D. obscura* ciljevi su bili sledeći:

- opisivanje genetičke varijabilnosti *Cyt b* gena i određivanje osnovnih parametara molekularnog diverziteta
- određivanje filogeografske strukture, demografske istorije i prostorne distribucije genetičke varijabilnosti vrste *D. obscura*
- utvrđivanje postojanja adaptivnih razlika između nosilaca odabranih mtDNK haplotipova u eksperimentalnim uslovima

- utvrđivanje da li genetička udaljenost (broj nukleotidnih razlika između nosilaca različitih haplotipova) kao i tip razlika (sinonimne i nesinonimne) utiče na razlike u ostvarenoj adaptivnoj vrednosti
- ispitivanje postojanja mito-jedarnih interakcija, odnosno diferencijalnog fitnesa nosilaca mtDNK haplotipa u zavisnosti od jedarne pozadine
- ispitivanje prisustva interakcija pola i genotipa odnosno ispitivanje uticaja polno specifične selekcije na održavanje mtDNK varijabilnosti
- utvrđivanje signala karakterističnog za hipotezu materinske kletve
- ispitivanje prisustva interakcija sredinskih faktora (temperature i dužine dana) i genotipa, odnosno ispitivanje uticaja selekcije zavisne od sredinskih uslova na održavanje mtDNK varijabilnosti

Eksperimenti analize životnih istorija kod dve model vrste kod kojih je analizirana simpatrička varijabilnost u različitim mtDNK genima, omogućavaju uvid u adaptivne razlike na dva različita stupnja funkcionalne povezanosti mitohondrijskog i jedarnog genoma. Kod *D. subobscura*, na nivou interakcije između rRNK i ribozomalnih proteina, a kod *D. obscura* na nivou elektron-transportnog kompleksa III, čiji je *Cyt b* deo. Haplotipovi su određeni analizama koje ne pokrivaju sekvencu mitohondrijskog genoma u potpunosti. U slučaju *D. subobscura*, to je RFLP mtDNK molekula i sekvenca *Cyt b* gena, a u slučaju *D. obscura* samo sekvenca *Cyt b* gena. Stoga potencijalni efekti koji se mogu uočiti, ne moraju biti ograničeni na funkcionalnu povezanost koja je ciljana. Takođe, zbog zabeleženih različitih obrazaca varijabilnosti kod dve model vrste kao i dostupnosti eksperimentalnih linija (EL), iako su ispitivane iste komponente životnih istorija, eksperimenti su postavljeni nešto drugačije. Kod *D. subobscura*, specifičnost je što su u okviru jedanaest kvarteta poređena dva najučestalija mtDNK haplotipa. Budući da su isti haplotipovi poreklom iz različitih *iso-female* linija (IFL), gotovo sigurno da neki od njih poseduju i dodatne razlike, kako u mtDNK sekvenci tako i u jedarnoj pozadini. Ovakve biološke replike ne samo da omogućavaju donošenje čvrstih zaključaka vezanih za ključne nukleotidne razlike dva glavna haplotipa, već dodatno ispituju i efekat neutvrđenih genetičkih razlika na adaptivnu vrednost. Sa druge strane, specifičnost eksperimentalne postavke kod *D. obscura* je to što je zbog veće mtDNK varijabilnosti koja je pokazana, moguće porediti više haplotipova različite udaljenosti i tipa nukleotidnih razlika u okviru različitih eksperimentalnih blokova. Svi eksperimenti su sprovedeni na dve eksperimentalne temperature, kako bi se ispitaio uticaj temperature na fitnes genotipa. Takođe, zbog činjenice da model vrste zauzimaju različite ekološke niše, i imaju donekle različito geografsko rasprostranjenje, u eksperimentima su korišćene različite temperature za dve model vrste.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Uzorkovanje jedinki iz prirode

3.1.1. Uzorkovanje *Drosophila subobscura*

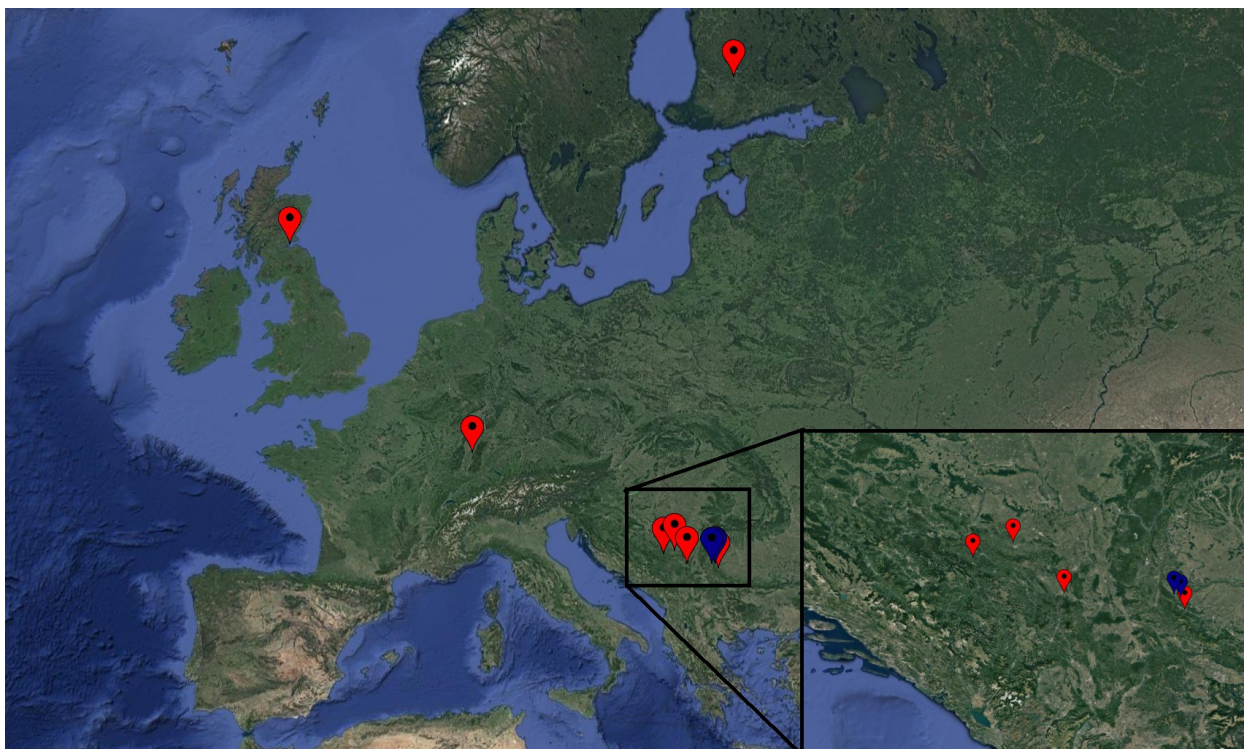
Jedinke *D. subobscura* su uzorkovane u junu 2015. godine u podnožju Stare Planine u istočnoj Srbiji. Jedinke su hvatane zamkama sa fermentisanim voćem, kvascem i pivom na dva lokaliteta udaljena oko 3 kilometra: Stara Kalna (SK) i Gabrovnica (G). Formirano je 30 IFL iz SK populacije i 49 IFL iz G populacije. Ove linije *D. subobscura* su ranije genotipizirane RFLP metodom celokupne mitohondrijske DNK, kojom se određuje mitohondrijski haplotip kod ove vrste. Tom prilikom je izabrano 41 linija (20 linija iz SK i 21 iz G populacije) kod kojih je pored RFLP metode sekvenciran i analiziran *Cyt b* gen, a rezultati su publikovani u Erić i saradnici (2019).

3.1.2. Uzorkovanje *Drosophila obscura*

Uzorci *D. obscura* korišćeni za genetičke analize i uspostavljanje IFL sakupljeni su u periodu od 2015. do 2019. godine. Uzorci iz Srbije su skupljeni na nekoliko planinskih lokaliteta između 2015. i 2017. godine. Četiri planine na kojima je uzorkovana *D. obscura* su: Goč (SG), Tara (ST), Stara Planina (SS), i Maljen (SM). Na svakoj planini postojala su dva lokaliteta na kojima su se postavljali trapovi, izuzev Maljena, koji je imao samo jedan lokalitet. Od uhvaćenih jedinki iz populacije sa Goča formirano je 24 IFL, sa Tare 34 IFL, sa Stare Planine 20 IFL dok su od jedinki sa Maljena formirane dve IFL *D. obscura*. F1 potomstvo ovih IFL je genotipizirano analizom sekvence *Cyt b* gena, kao što je prethodno urađeno za *D. subobscura*, i od njih su kasnije formirane eksperimentalne linije (EL). Pored uzoraka iz Srbije, u genotipizaciju *D. obscura* su uključeni i uzorci iz tri evropske populacije: Finska (FA), Nemačka (GF) i Škotska (SC), da bi se ispitala genetička varijabilnost jedinki većeg dela areala ove vrste. Pošto su jedinke ovih populacija čuvane u alkoholu, DNK je direktno ekstrahovana iz njih, i one nisu učestvovala u pravljenju eksperimentalnih linija. Podaci o broju uzoraka, lokacijama i vremenu uzorkovanja predstavljeni su u tabeli M1, dok je karta sa lokalitetima uzorkovanja predstavljena na slici M1.

Tabela M1. Detalji uzorkovanja prirodnih populacija obe vrste. Podaci za *D. obscura* su objavljeni u Erić 2022a, modifikovano, a podaci za *D. subobscura* u Erić i sar. 2019.

Vrsta	Država/ Populacija	Lokalitet	Oznaka	Koordinate lokaliteta	Godina uzorkovanja	Broj mužjaka/ženki
<i>D. subobscura</i>	Srbija	Stara Planina/ Gabrovnica	G	43°26'54,07"N 22°25'34,93"E	2015	49 ženki
<i>D. subobscura</i>	Srbija	Stara Planina/ Stara Kalna	SK	43°25'5,78"N 22°25'42,74"E	2015	30 ženki
<i>D. obscura</i>	Srbija	Goč	SG	43°33'29,10"N 20°45'17,40"E 43°32'54,00"N 20°47'11,30"E	2015	24 ženke
<i>D. obscura</i>	Srbija	Tara	ST	43°56'58,09"N 19°21'27,18"E 43°55'04,37"N 19°25'13,19"E	2016	34 ženke
<i>D. obscura</i>	Srbija	Stara Planina	SS	43°22'27,34"N 22°37'02,28"E 43°20'12,76"N 22°41'42,99"E	2016	20 ženke
<i>D. obscura</i>	Srbija	Maljen	MS	44°06'18,31"N 19°58'56,55"E	2017	2 ženke
<i>D. obscura</i>	Finska	Akaa	FA	61°08'58,69"N 23°31'26,33"E	2018	30 mužjaka/ 6 ženki
<i>D. obscura</i>	Nemačka	Fohrberg	GF	48°13'04,43"N 07°49'09,10"E	2015	17 mužjaka/4 ženke
<i>D. obscura</i>	Škotska, UK	Edinburg	SC	55°55'23,13"N 03°10'24,02"W	2017–2019	35 mužjaka/ 13 ženki



Slika M1. Karta sa lokalitetima na kojima su uzorkovane jedinice *D. subobscura* (plavo) i *D. obscura* (crveno) korišćene u izradi ove disertacije. U donjem desnom uglu je uveličana karta Srbije, pošto je više uzorkovanih lokacija prisutno u neposrednoj blizini. Preuzeto sa Google mapa 2021. [<https://www.google.com/maps/@51.0375553,24.7087047,4037510m/data=!3m1!1e3!5m1!1e4>], June 8. 2021. Objavljeno u (Erić i sar. 2022a), modifikovano.

3.2. Sakupljanje uzoraka i formiranje *iso-female* linija

Mušice su sakupljane u kasne popodnevne sate, korišćenjem zamki sa fermentisanim voćem, kvascem i pivom, upotrebom entomoloških mrežica. Gravidne ženke uhvaćene u prirodi izdvajene su u pojedinačne flakone sa standardnim kukuruznim supstratom da polažu jaja u cilju formiranja IFL.

Po formiranju, IFL su održavane na standardnom supstratu od kukuruznog griza tokom nekoliko generacija. Standardni supstrat se sastoji od 7,88% kukuruznog griza, 7,12% šećera, 0,76% kvasca, 0,52% agara sa dodatkom alkoholnog rastvora metil-4-hidroksibenzoata (Nipagin®), kao fungicidom. Flakoni sa formiranim IFL čuvani su u kontrolisanim, laboratorijskim uslovima optimalnim za vrste *D. subobscura* i *D. obscura*. Temperatura je podešena na $19^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, dok se relativna vlažnost vazduha kretala oko 60%. Intenzitet svetlosti u komori u kojoj su IFL održavane iznosio je 300 lux-a, a svetlosni režim je podešen na 12h svetlost/ 12h mrak.

3.3. Analiza *Cyt b* gena kod *D. obscura*

Pošto je prethodno već bila izvršena genotipizacija vrste *D. subobscura* (Erić i sar. 2019), u okviru ove doktorske teze izvršena je analiza *Cyt b* gena samo kod *D. obscura*. Takođe isti gen je sekvenciran i kod laboratorijske linije *D. ambigua* IFL R42, koja je uzorkovana na planini Rtanj 2014. godine. Ova vrsta predstavlja najrodniju vrstu *D. obscura*, te je pogodna kao *outgroup-a* analizi njene varijabilnosti.

3.3.1. Izolacija mtDNK kod *D. obscura*

Ekstrakcija DNK je rađena po protokolu koji su opisali Martinez i saradnici (1992). Ovim protokolom se dobija visoki udeo mitohondrijske DNK u rastvoru. Kako bismo dobili što veću količinu DNK, izolacija je vršena zbirno iz većeg broja jedinki iz iste IFL. Ovo je moguće jer je reč o mitohondrijskoj DNK koja se nasleđuje po majčinskoj liniji pa sve jedinke iz iste IFL dele istu mtDNK. Po 10 adulta iz svake IFL homogenizovano je na ledu sa 320 μ l Rastvora I (10mM Tris-HCl, 5% rastvor saharoze, 60mM NaCl i 10mM EDTA, pH 7,8). Potom se u mikrotube sa uzorcima doda 320 μ l Rastvora II (300mM TRIS-HCl, 1,25% SDS, 5% rastvor saharoze, 10mM EDTA, pH 9,0) uz lagano mešanje. Uzorci se onda ostave u vodenom kupatilu na 65°C da se 30 minuta inkubiraju. Natrijum dodecil sulfat (SDS) razgrađuje membrane i denaturiše proteine. Uz pomoć visoke temperature i jako bazne pH sredine, denaturišu se DNK molekuli raskidanjem vodoničnih veza između komplementarnih baza. Smeši se potom dodaje 120 μ l hladnog 3M kalijum acetata (pH 4,8). Sadržaj se promeša do nestanka dva sloja, nakon čega se uzorci hlade 15 minuta na -20°C. Naglo smanjenje pH vrednosti ali i temperature ispravno renaturiše DNK male veličine, ali ne i dugačke DNK molekule, odnosno jedarnu DNK koja se reasocira nepravilno na slučajan način. Uzorci se potom centrifugiraju na maksimalnom broju obrtaja u trajanju od 10 minuta, supernatant se prebacuje u nove tubice, dok se talog odbacuje. Ispravno renaturisani kratki DNK molekuli (mtDNK) se centrifugiranjem rastvaraju u vodenom rastvoru i ostaju u supernatantu, dok veliki DNK fragmenti, koji su se nepravilno povezali formirajući mrežu velike molekulske težine, nisu rastvorljivi pa padaju na dno tube i formiraju talog zajedno sa kompleksima SDS-proteina. Izdvojenom supernatantu se dodaje ista zapremina hladnog izopropanola, i posle inkubacije rastvora na sobnoj temperaturi u trajanju od 5 minuta, sledi 5 minuta centrifugiranja na maksimalnom broju obrtaja (14650), nakon čega se supernatant odstranjuje. Nukleinske kiseline su nerastvorljive u alkoholu pa prilikom centrifugiranja precipitiraju na dno tube. Talog se potom ispira sa 700 μ l 70% etanola i vorteksuje nakon čega se centrifugira 5 minuta. Nakon ponovnog odstranjivanja supernatanta, precipitat se suši, da bi se konačno resuspendovao u TE puferu (Tris-HCl 10mM, EDTA 10mM, pH 8,0). Nakon ovoga sledi drugi korak alkalne lize, u kojem se prvo uzorcima doda Alkalni rastvor (SDS 0,1%, 2N NaOH, pH 12,5), pa se uzorci posle mešanja inkubiraju 8 minuta na 65°C, u cilju ponovne denaturacije DNK molekula. Dodavanjem 225 μ l hladnog 3M natrijum acetata (pH 5,2) i inkubiranjem 15 minuta na -20°C, ponovo se pravilno renaturišu mali cirkularni molekuli mtDNK, dok se fragmenti jedarne DNK nasumično reasociraju i formiraju nerastvorni agregat. Uzorci se centrifugiraju 5 minuta, nakon čega se iz tuba sakupljenih na ledu prebacuje supernatant u nove tubice. Supernatantu se nakon toga dodaje ista zapremina hladnog izopropanola. Uzorci se nakon 5 minuta inkubacije na sobnoj temperaturi centrifugiraju 5 minuta, da bi im se onda odbacio supernatant. Talog se ponovo ispira sa 70% etanolom, pa se uzorci vorteksuju i ponovo centrifugiraju. Na kraju se odbacuje supernatant, dok se precipitat suši i konačno rastvara u TE puferu.

Kada je reč o jedinkama iz Srbije, za ekstrakciju DNK korišćena je F1 generacija ženki uhvaćenih u prirodi, uzimajući 10 jedinki po IFL, kako bi prinos po reakciji bio bolji. Kod jedinki *D. obscura*, koje nisu sa teritorije Srbije, izolacija DNK je vršena direktno iz jedinki koje su uhvaćene u prirodi. Pošto su se ovi uzorci sastojali od pojedinačnih jedinki, tokom ekstrakcije je preskočen drugi korak alkalne lize kako bi se skupila dovoljna količina DNK.

3.3.2. Određivanje koncentracije izolovane DNK

Koncentracija izolovane DNK određivana je korišćenjem NanoPhotometer (IMPLEN, Germany) spektrofotometra merenjem apsorbance rastvora izolovane DNK na 260nm talasne dužine. Kao negativna kontrola korišćen je samo TE pufer, u kojem je inače rastvorena izolovana DNK. Udeo proteina i drugih nečistoća računat je merenjem odnosa apsorbanci na 230 i 260nm kao i odnosa na 230 i 280nm. Korišćenjem ovih podataka pravljen su razblaženja finalne koncentracije od 50 oko ng/μl za svaki uzorak.

3.3.3. PCR umnožavanje *Cyt b* gena

Kod jedinki *D. obscura* je lančanom reakcijom polimeraze (PCR-om) umnožen 893 bp dugačak mitohondrijski Citohrom b gen (*Cyt b*). Za umnožavanje su korišćeni prajmeri korišćeni u Gao i saradnici (2007). Sekvence prajmera korišćenih za umnožavanje gena predstavljeni su u tabeli M2.

Tabela M2. Prajmeri korišćeni za umnožavanje *Cyt b* gena iz linija *D. obscura*

<i>Cyt b</i>	F	5'-TTATG GTTGA TTATT ACGAA-3'
<i>Cyt b</i>	R	5'- CAAAA CATAT GCTTA TTCAA-3'

PCR umnožavanje izvršeno je uz pomoć MiniAmp Plus Thermal Cycler (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Zapremine i sastojci PCR reakcije predstavljeni su u tabeli M3. dok su uslovi PCR protokola prikazani u tabeli M4.

Tabela M3. Sastojci i njihove zapremine kod PCR reakcije umnožavanja *Cyt b* gena kod *D. obscura*

H ₂ O (dejonizovana, bez nukleaza Qiagen)	13,04 μl
10xTaq Buffer +(NH ₄) ₂ SO ₂	2 μl
dNTP mix (10mM)	0,4 μl
MgCl ₂ (25mM)	1,6 μl
prajmer F (10μM)	1 μl
prajmer R (10μM)	1 μl
Taq DNK polimeraza (5U/μl)	0,16 μl
mtDNK	0,8 μl
Ukupno	20 μl

Tabela M4. Uslovi PCR reakcije umnožavanja *Cyt b* gena kod *D. obscura*

Korak	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94°C	180s	1
Denaturacija	94°C	50s	35
Veživanje prajmera	51,5°C	60s	
Sinteza DNK	72°C	60s	
Finalna elongacija	72°C	180s	1

3.3.4. Vizualizacija i prečišćavanje PCR produkata

Uspešnost umnožavanja *Cyt b* gena proveravana je elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu korišćenjem 1xTBE. Prilikom pravljenja gelova u smešu je dodavan i etidijum bromid u koncentraciji od 0,1µg/ml, radi vizualizacije DNK. Veličina dobijenih DNK produkata poređena je sa markerom za dužinu DNK fragmenata 100bp GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, EU). Gelovi su vizualizovani i slikani pod UV svetlom na Bio-Rad Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Amplifikati su prečišćeni korišćenjem QIAquick PCR kit-a za prečišćavanje DNK (QIAGEN, Hilden, Germany), i resuspendovani u 50µl TE pufera. Nakon toga koncentracija DNK je merena korišćenjem NanoPhotometer (IMPLEN, Germany) spektrofotometra merenjem apsorbance rastvora PCR produkta na 260nm talasne dužine. Kao negativna kontrola je korišćen TE pufer u kojem je resuspendovana prečišćena DNK. Udeo proteina i drugih nečistoća računat je merenjem odnosa apsorbanci na 230 i 260nm kao i odnosa na 230 i 280nm. Korišćenjem ovih podataka pravljen su razblaženja finalne koncentracije od oko 50 ng/µl za svaki uzorak.

3.3.5. Sekvenciranje *Cyt b* gena

Ovako razblaženi uzorci poslani su na sekvenciranje *Cyt b* gena (Macrogen inc. Amsterdam, The Netherlands) korišćenjem istih prajmera, koji su upotrebljeni i za PCR umnožavanje.

3.3.6. Statistička obrada rezultata sekvenciranja

3.3.6.1. Obrada sekvenci *Cyt b* gena i definisanje haplotipova

Provera kvaliteta dobijenih sekvenci *Cyt b* gena izvršena je pregledanjem hromatogramskih zapisa i svaka sekvenca kod koje nije bilo moguće nedvosmisleno određivanje svake nukleotidne pozicije u okviru 893 bp dugog gena, vraćana je na rekvenciranje. Inspekcija hromatogramskih zapisa, proverom vrednosti kvaliteta (quality scores), kao i ručno ispravljanje pogrešno dodeljenih baza vršeno je pomoću BioEdit softvera v.7.2.5 (Hall 2011). Nakon toga isti programski paket korišćen je za poravnavanje sekvenci, korišćenjem ClustalW algoritma sa standardnim parametrima (Thompson i sar. 1994). Korišćenjem DnaSP v6.0 programskog paketa (Librado i Rozas 2009) definisani su haplotipovi.

3.3.6.2. Određivanje parametara molekularnog diverziteta *D. obscura*

Parametri molekularnog diverziteta kao što su nukleotidni i haplotipski diverzitet, broj varijabilnih mesta i prosečan broj nukleotidnih razlika računati su korišćenjem DnaSP v.6.0 (Librado i Rozas 2009) i Arlequin (v.3.5.1.2) (Excoffier i Lischer 2010) programskih paketa. Analiza molekularne varijanse AMOVA je korišćena u cilju raščlanjivanja izvora genetičke varijabilnosti, kako između tako i unutar četiri geografska regiona (Srbija, Nemačka, Finska i Škotska). AMOVA je takođe urađena i samo na uzorcima iz Srbije, gde je poređena varijabilnost između i unutar tri populacije iz Srbije (Goč, Tara i Stara Planina, pošto populacija sa Maljena ima samo dve uzorkovane jedinice, te one nisu ušle u analizu kao zasebna populacija).

3.3.6.3. Konstruisanje haplotipske mreže

Median-joining (MJ) haplotipska mreža (Bandelt i sar. 1999) je izračunata i konstruisana u R v.4.1.0 (R Core Team 2021) programskoj platformi, korišćenjem *pegas* paketa (Paradis 2010). Vrednost epsilon parametra je nameštena na nula kako bi dobijena mreža imala minimalan broj pretpostavljenih medijarnih haplotipova. Za potrebe konstruisanja MJ mreže, kao autgrupa korišćena je *Cyt b* sekvenca *D. ambigua*. Finalna mreža je podešena tako da su na grafiku prikazane alternativne veze koje se sastoje samo od pojedinačnih mutacionih koraka.

3.3.6.4. Testovi neutralnosti

Testovi neutralnosti, implementirani u DnaSP programski paket, su rađeni u cilju ispitivanja selektivne neutralnosti distribucije *Cyt b* haplotipova. Korišćeno je više različitih testova kao što su Tajimov D test (Tajima 1989b), Fuov Fs test (Fu 1997), Fu i Lijev D-F (Fu i Li 1993), kao i Fej i Vuov H test (Fay i Wu 2000). Svi ovi testovi su korišćeni zbog njihove različite moći da razlikuju različite vidove selekcije od neutralnih procesa. Ovi testovi, iako su na prvi pogled jako slični, imaju različite statističke pristupe, i na različite načine poredi distribucije alela ili haplotipova, pa neki daju bolju sliku kod malih ili velikih populacija, kao i donekle jasnije razgraničavanje selekcionih od demografskih procesa u populacijama (Ramos-Onsins i Rozas 2002).

Direkciona selekcija, bilo ona pozitivna ili negativna, smanjuje heterozigotnost i dovodi do pojave veće učestalosti retkih varijanti od očekivane i negativnih vrednosti ovih testova, dok balansna selekcija povećava učestalosti najzastupljenijih alela u populaciji i daje pozitivne vrednosti ovih testova. Pozitivne ili negativne vrednosti testova neutralnosti ne moraju nužno biti posledica selekcionih pritisaka, već i različitih neutralnih procesa poput uskog grla ili populacione ekspanzije.

Za Fu i Lijev D-F i Fej i Vuov H test, kao autgrupa ponovo je korišćena *D. ambigua*. McDonald Krajtmanov test (McDonald i Kreitman 1991) je korišćen da uporedi broj sinonimnih i nesinonimnih mutacija unutar sekvenci *D. obscura*, kao i između *D. obscura* i *D. ambigua*.

Analiza grafika parova nukleotidnih razlika (engl. *pairwise mismatch distribution graphs*) poredi dobijene i pretpostavljene razlike između parova sekvenci sa ciljem utvrđivanja populacione istorije (Rogers i Harpending 1992). Ova analiza, kao i računanje parovnih F_{st} vrednosti između populacija, urađeni su u Arlequin programskom paketu (v.3.5.1.2) (Excoffier i Lischer 2010).

3.3.6.5. Ispitivanje izolacije distancom primenom Mantelovog testa

Mantelov test (Mantel 1967), implementiran u Arlequin programski paket, je korišćen u cilju otkrivanja izolacije distancom (engl. *isolation by distance*). Ovaj test poredi F_{st} vrednosti koje opisuju genetičku distancu sa prethodno logaritmovanim euklidskim prostornim distancama u kilometrima. Pored ovog standardnog tipa Mantelovog testa, urađen je i Mantelov test koji poredi F_{st} vrednosti sa matricom logaritmovanih koordinata geografske širine i dužine.

3.3.6.6. Bajesova analiza filogenetskih odnosa

Bajesovo filogenetsko stablo evolucionih odnosa između haplotipova *Cyt b* gena kod *D. obscura* je rađeno u okviru BEAST v2.6.2 paketa (Bouckaert i sar. 2019). Kao autgrupe korišćene su sekvence dve najsrodnije vrste *D. ambigua* i *D. tristis* (NCBI pristupni broj: EF216284.1).

Zbog nedostatka podataka o model vrsti, uzeta je stopa supstitucija kod više izučavane vrste *D. melanogaster* pronađena u literaturi (HaagLiautard i sar. 2008). Pod pretpostavkom da *D. obscura* ima četiri generacije godišnje u prirodi (Begon 1978), izračunata je stopa molekularnog časovnika od 0,248 mutacija po nukleotidnom mestu na milion godina. Dužina Markovljevihi lanaca je podešena na 10^9 u program BEAUty 2 u kojem se podešavaju parametri filogenetske analize za BEAST 2 softver.

Model nukleotidne supstitucije koji najbolje odgovara analiziranim podacima, je određen u jModelTest v.2 softveru (Darriba i sar. 2012) korišćenjem Akaike kriterijuma (AIC) (Akaike 1973). Model koji je najviše odgovarao sekvencama *D. obscura*, jeste Tamura-Nei model sa značajnim udelom nepromenljivih mesta (I) i gama distribucijom (G) stope supstitucija (TnR + I + G), i on je korišćen u Bajesovim analizama.

Markovljev lanac Monte Karlo (MCMC) pretraga je započeta od nasumičnog stabla, i puštena da radi 5×10^8 generacija, dok je stablo beleženo na svakih 1000 generacija. Ovim je dobijeno ukupno 5×10^5 stabala. Kada je 20% iteracija odstranjeno kao „Burn-in“, ostatak uzorka je sumiran sa pravilom većine od preko 50%, u konsenzusno stablo sa posteriornim verovatnoćama za svaku kladu, korišćenjem TreeAnnotator v.2.1.2 (BEAST paket). Stabla su vizualizovana i sređena u FigTree programu (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). Takozvano mešanje i konvergencija lanaca kao i stabilizacija verovatnoća i drugih parametarskih vrednosti su proveravani uz pomoć kriterijuma efektivne veličine uzorka (engl. *Effective Sampling Size criterion*, ESS) gde su vrednosti ESS >200 smatrane prihvatljivim. Ove provere su analizirane u Tracer v.1.7 (Rambaut i sar. 2018) programu iz BEAST paketa.

U cilju dodatne inferencije demografske istorije populacija, korišćen je prošireni Bajesov grafik horizonta (engl. *Extended Bayesian Skyline Plot*, EBSP) (Heled i Drummond 2008) takođe implementiran u BEAST 2 paketu. I za ovu metodu je korišćena stopa molekularnog časovnika od 0,248 mutacija po mestu na milion godina. Dužina Markovljevihi lanaca je nameštena na 10^9 , sa zapisivanjem parametara na svakih 3000 iteracija, u BEAUty 2 programu u kojem se podešavaju parametri za filogenetske analize u BEAST 2 softveru. „Burn-in“ je podešen da odbaci 25% uzoraka. Tracer softver je korišćen za proveravanje konvergencije lanaca.

3.4. Testiranje na mikroorganizme koji mogu uticati na obrasce varijabilnosti mtDNK i adaptivnu vrednost domaćina

3.4.1. Testiranje prisustva endosimbionata iz roda *Wolbachia*

Jedinke *D. subobscura* korišćene u eksperimentima analize komponenti životne istorije testirane su na prisustvo roda *Wolbachia* pre izrade ove teze (Erić i sar. 2019) i stoga je ovde bilo neophodno testirati isključivo linije *D. obscura*. Sve IFL *D. obscura* kao i jedinke čuvane u etanolu poreklom iz Nemačke, Finske i Škotske testirane su na prisustvo endosimbionata roda *Wolbachia*, kako bi isključili citoplazmatsku inkompatibilnost koju ove bakterije mogu da izazovu (Hoffmann i Turelli 1995).

Prisustvo ove proteobakterije je testirano PCR metodom korišćenjem 16S rDNK prajmera (O'Neill i sar. 1992) iz jedinki F1 generacije IFL, kao i iz izolovane DNK uzoraka od kojih nisu pravljenе IFL. Iz svih testiranih uzoraka je prethodno uspešno umnožen fragment *Cyt b* gena, što je

potvrda prisustva DNK odgovarajućeg kvaliteta za PCR reakciju, kako bi se odbacili lažno negativni rezultati. Za PCR je korišćeno 15µl genomske DNK, izdvojene za potrebe ove analize pre finalnog koraka u ekstrakciji mtDNK. Kao pozitivna kontrola statusa infekcije korišćena je IFL *D. tristis* sa Stare Planine, sa poznatim statusom infekcije.

Tabela M5. Sadržaj i zapremina PCR reakcije umnožavanja 16S rDNK roda *Wolbachia*

H ₂ O (dejonizovana, bez nukleaza Qiagen)	12,24µl
10xTaq Buffer +(NH ₄) ₂ SO ₂	2µl
dNTP mix (10mM)	0,4µl
MgCl ₂ (25mM)	2µl
prajmer F (10µM)	0,8µl
prajmer R (10µM)	0,8µl
Taq DNK polimeraza (5U/µl)	0,16µl
mtDNK	1,6µl
Ukupno	20µl

Sadržaj i zapremina PCR reakcije predstavljeni su u tabeli M5, a trajanje, temperatura kao i broj ciklusa svakog koraka PCR reakcije predstavljeni su u tabeli M6, dok su tip i sekvence prajmera korišćenih u PCR reakciji testiranja linija na prisustvo proteobakterija iz roda *Wolbachia* dati u tabeli M7. Finalno, uspešnost PCR reakcija, odnosno prisustvo umnoženog gena karakterističnog za rod *Wolbachia*, vizualizovano je elektroforezom na 1,5% agaroznom gelu.

Tabela M6. Uslovi PCR reakcije umnožavanja 16S rDNK roda *Wolbachia*

Korak	Temperatura	Trajanje	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	94°C	300s	1
Denaturacija	94°C	60s	30
Vezivanje prajmera	55°C	60s	
Sinteza DNK	72°C	120s	
Finalna elongacija	72°C	300s	1

Tabela M7. Prajmeri (O'Neill i sar. 1992) korišćeni za testiranje prisustva endosimbionata roda *Wolbachia* u linijama *D. obscura*

16S rDNK	F	5'-TTGTA GCCTG CTATG GTATA ACT-3'
16S rDNK	R	5'-GAATA GGTAT GATTT TCATG T-3'

3.4.2. Sekvenciranje mikrobioma kod *D. obscura*

U cilju isključivanja drugih mikroorganizama koji bi materinskim nasleđivanjem mogli da utiču kako na obrazac variranja mitohondrijskih haplotipova kod *D. obscura*, tako i na fitness vrednosti linija u eksperimentima životne istorije, sprovedeno je sekvenciranje mikrobioma odabranih linija iz Srbije među kojima su bile i linije koje su korišćene u ispitivanju osobina životne istorije. Dva uzorka od po deset združenih linija, od kojih svaki predstavlja po jednu od dve glavne haplogrupe (O1 i O2) poslata su na sekvenciranje u Fisabio (Valencia, Spain), korišćenjem MiSeq uređaja i MiSeq reagens kita (Illumina).

DNK je ekstrahovana prema protokolu koji prethodi mikrobiomnom sekvenciranju kod *Drosophila* (Kapun i sar. 2020), iz združenih uzoraka od po 10 odabranih linija iz grupe O1 i 10 iz grupe O2. Među izabranim linijama su bile sve linije korišćene u ispitivanju osobina životne istorije. Protokol je podrazumevao pripremu 16S V3-V4 amplikonskih biblioteka i *MiSeq* sekvenciranje uparenih krajeva dužine 300 bp. Na ovaj način dobijeno je oko 100 000 ridova (engl. *reads*) po uzorku. Analiza *MiSeq* rezultata urađena je u R-u v.4.1.0 (R Core Team 2021), koristeći *dada2* metodologiju (Callahan i sar. 2016). Uz pomoć *BBDuk* softvera (<https://jgi.doe.gov/data-and-tools/software-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/>) odstranjene su sekvence prajmera (F: CCTACGGGNGGCNGCAG, R: GACTACHVGGGTATCTAATCC) korišćenjem *k-mer*-a dužine 15 i dozvoljavajući dva nepodudaranja (engl. *mismatches*) (Klindworth i sar. 2013). Takođe, svi ridovi kod kojih nisu detektovani prajmeri su odstranjeni iz daljih analiza. Potom su *forward* ridovi skraćeni na 240 baza, dok su *reverse* skraćeni na 210 baza na osnovu FASTQ ocene kvaliteta. Kontrola kvaliteta sirovih sekvenci vršena je korišćenjem FASTQC alata (Andrews 2010). Svi ridovi koji su imali očekivanu grešku veću od 2 za *forward* i veću od 4 za *reverse* su odbačeni. Očekivana greška se računa po formuli ($\sum_i 10^{-Q_i}$), gde je Q ocena kvaliteta. Takođe, ridovi sa višesmislenim bazama (N), kao i svi ridovi kraći od 50 bp su odbačeni. Potom su parovi sekvenci spojeni korišćenjem minimalnog preklapanja od 20 baznih parova bez nepodudaranja. Sve sekvence kraće od 400 bp i duže od 428 bp su odbačene. Nakon što su himerne sekvence odstranjene, ostalo je oko 70% prvobitno sekvenciranih ridova.

Taksonomska identifikacija do nivoa roda je izvedena korišćenjem Silva v.132 baze (<https://www.arb-silva.de/documentation/release-132/>) sa RDP naivnim Bajesovim algoritmom za klasifikaciju (Wang i sar. 2007), uz metodu lažnog uzorkovanja sa vraćanjem (engl. *bootstrap*). Korišćena je *k-mer*-a dužina 8, i 100 *bootstrap* ponavljanja. Minimalni *bootstrap* interval poverenja za dodeljivanje taksonomskoj grupi je podešen na 50.

Kada je druga model vrsta, *D. subobscura* u pitanju, na linijama korišćenim u okviru ove teze nije sprovedeno sekvenciranje mikrobioma. Prethodni eksperimenti sekvenciranja jedinki ove vrste sakupljenih u prirodi sa istog lokaliteta, kao ni laboratorijske IFL poreklom sa istog (Kalna) ili drugih lokaliteta iz Srbije nisu pokazali prisustvo bakterijskih organizama koji bi materinskim nasleđivanjem mogli da utiču na obrazac variranja mitohondrijskih haplotipova (Beribaka i sar. 2020; Beribaka i sar. 2021a).

3.4.3. Testiranje linija na prisustvo sigma virusa specifičnog za *D. obscura*

Svi uzorci *D. obscura* poreklom iz Srbije su dodatno testirani na prisustvo sigma virusa specifičnog za *D. obscura* (DObsSV). Deset jedinki iz svake IFL izložene su CO₂ gasu na temperaturi od 12°C u trajanju od 15 minuta, da bi nakon 30 minuta iste jedinke bile pregledane, da li daju znake života ili paralize, po metodi korišćenoj u (Longdon i sar. 2010).

3.5. Odabir i formiranje eksperimentalnih linija

3.5.1. Odabir linija *D. subobscura* za analize osobina životne istorije

U skladu sa rezultatima prethodnog opisivanja mtDNK varijabilnosti linija *D. subobscura* (Erić i sar. 2019), plan je bio porediti adaptivne vrednosti isključivo dva najčešća haplotipa. Kako bi potvrdili prisustvo mito-jedarnih koadaptacija, dva haplotipa su poređena kako na svojoj tako i na jedarnoj pozadini suprotnog haplotipa. Pošto je fokus bio samo na razlikama između haplotipova I i II, koji se razlikuju jednom sinonimnom mutacijom u *ND5* genu, kao i mutacijom u okviru 12S rRNK, za eksperimente su odabrane linije koje pored posedovanja restriktionog obrasca jednog od dva najučestalija mtDNK haplotipa, takođe pripadaju najčešćem *Cyt b* haplotipu. Na ovaj način, uzimajući u obzir rezoluciju metoda delimično su isključene razlike koje se mogu javiti kod retkih, endemičnih haplotipova, i eksperimenti su usredsređeni na merenje fenotipskih razlika samo između mitohondrijskih haplotipova I i II. Izabrano je 11 linija haplotipa I i svakoj je nasumično dodeljena po jedna linija haplotipa II.

Povratnim ukrštanjima od svakog para IFL napravljeno je po četiri mito-jedarne linije sa svim kombinacijama jedarnih pozadina i mitohondrijskih haplotipova (kvartet). Na ovaj način dobijeno je ukupno 44 eksperimentalne linije (11 kvarteta) vrste *Drosophila subobscura*, čiji je fitnes poređen serijom eksperimenata. Nakon 14 generacija povratnih ukrštanja ove linije su ponovo testirane analizom dužine restriktionih fragmenata, kako bi se pre eksperimenata analize fitnes komponenti isključila mogućnost rada na linijama pogrešnog genotipa. Greške ovog tipa potencijalno mogu nastati usled greške u manipulaciji mušicama ili mutacija.

Radi preglednijeg prikaza, i smanjenja mogućnosti greške u povratnim ukrštanjima haplotipovi I i II su preimenovani malim slovima *a* i *c*, po nomenklaturi nazivanja restriktionih obrazaca koji se dobijaju korišćenjem HaeIII enzima. Jedarne pozadine obeležavane su velikim slovima *A* i *C* i pisane u eksponentu radi izbegavanja konfuzije. U okviru svakog od jedanaest poređenja postojale su četiri mito-jedarne kombinacije haplotipova: $a^A a^C c^A$ i c^C . Ovakvim dizajnom omogućava se poređenje fitnes komponenti kod dva najučestalija mtDNK haplotipa, kako na sopstvenoj, tako i na jedarnoj pozadini recipročnog haplotipa, i to u 11 nezavisnih grupa, ili kvarteta. Takođe, ovakav dizajn omogućava i utvrđivanje efekta svake varijable i njihovih interakcija na adaptivnu vrednost kako u okviru svakog od 11 kvarteta tako i sveobuhvatno u celom setu podataka.

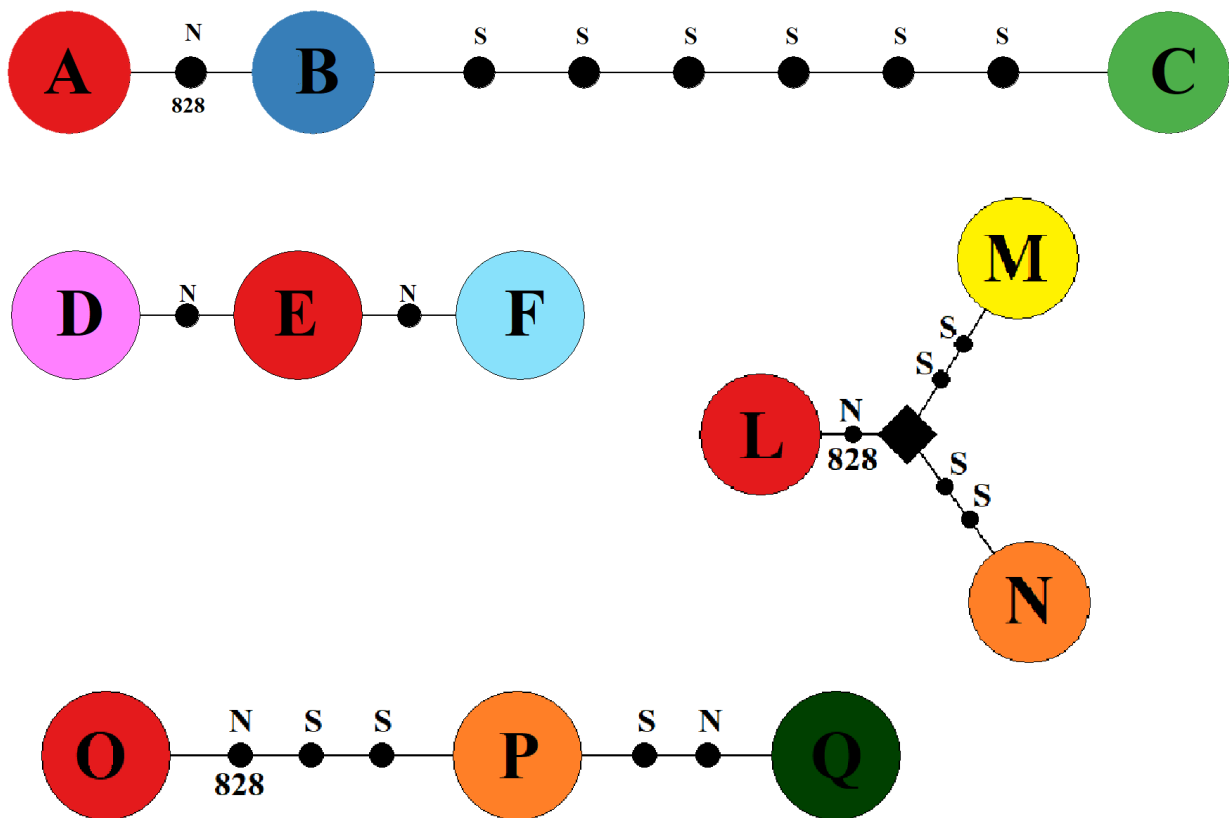
3.5.2. Odabir linija *D. obscura* za analize osobina životne istorije

Odabrana su četiri mesta uzorkovanja (dva sa Tare, po jedan sa Goča i Stare Planine) sa kojih su od skupljenih jedinki formirane IFL, a haplotipovi u okviru njih se mogu smatrati simpatričkim. Na osnovu specifičnih svojstava haplotipova, iz svakog od četiri mesta uzorkovanja izabrane su po tri specifične IFL. Svih dvanaest odabranih linija bile su deo dva združena uzorka kojima je sekvenciran mikrobiom. Tako su inicirana četiri eksperimentalna bloka (EB), gde su u svakom bloku haplotipovi simpatrički. Lista poređenih haplotipova u okviru svakog bloka data je u tabeli M8. U okviru svakog eksperimentalnog bloka, metodom povratnog ukrštanja od tri početne linije dobijeno je devet EL sa svim kombinacijama mitohondrijskih haplotipova i jedarnih pozadina početnih linija. Kod *D. obscura* je ukupno bilo 36 EL, četiri bloka sa po devet linija.

Tabela M8. *Cyt b* haplotipovi *D. obscura* korišćeni u eksperimentima analize komponenti životne istorije (levo) i njihova odgovarajuća IFL imena po eksperimentalnom bloku (desno). Objavljeno u Erić i sar. 2022b.

I EB Populacija ST (Tara) Lokalitet 1.		II EB Populacija ST (Tara) Lokalitet 2.		III EB Populacija SS (Stara Planina)		IV EB Populacija SG (Goč)	
O2	A	O9	D	O2	L	O2	O
O1	B	O2	E	O4	M	O3	P
O8	C	O10	F	O3	N	O18	Q

U okviru svakog bloka, polazni haplotipovi su birani tako da se obuhvati što širi dijapazon svojstava haplotipova koji bi bili poređeni. U nekim blokovima cilj je bio porediti najčešće haplotipove, u drugim one sa razlikama u broju mutacija, a negde različite sinonimne i nesinonimne promene. Najčešći haplotip O2 bio je prisutan u okviru svakog tripleta. U prvom EB su poređena dva globalno najčešća haplotipa O1 i O2 koje deli samo jedna nesinonimna nukleotidna razlika na 828. mestu, sa haplotipom O8 koji deli ovo mesto sa O1, ali ima još šest sinonimnih promena u odnosu na O1. Linije iz prvog EB potiču sa Tare sa lokaliteta broj 1. U okviru drugog eksperimentalnog bloka poređene su linije koje takođe potiču sa Tare, ali sa lokaliteta broj 2. Ovde su, pored u svim EB standardnog O2, izabrana dva haplotipa O9 i O10, koja su izvedena iz O2 i od njega se razlikuju za po jednu nesinonimnu mutaciju. U trećem EB, O2 je poređen sa dva haplotipa (O3 i O4) izvedena iz haplotipa O1, koji pored nesinonimne zamene na 828. poziciji (koja razdvaja dve grupe haplotipova O1 i O2), imaju po dve nezavisne tihe mutacije. Treći eksperimentalni blok nastao je od IFL sa Stare Planine. U četvrtom EB poredimo O2 sa O3 haplotipom kao i u prethodnom EB, i sa O18 koji je iz njega izveden, s tim da ove linije potiču sa Goča. Linije u okviru svakog eksperimentalnog bloka su preimenovane u odnosu na haplotipove koje poseduju, kako bi se izbegla zabuna, budući da se neki haplotipovi javljaju u više blokova. Nova imena eksperimentalnih linija, kao njihove međusobne razlike su prikazane na slici M2.



Slika M2. Haplotipovi A, B i C iz EB I; D, E i F iz EB II; L, M i N iz EB III; O, P i Q iz EB IV; Identični haplotipovi su obojeni istom bojom. S- sinonimna mutacija; N-nesinonimna mutacija; 828A>G – specifična nesinonimna zamena koja razdvaja dve grupe haplotipova. Objavljeno u Erić i sar. 2022b.

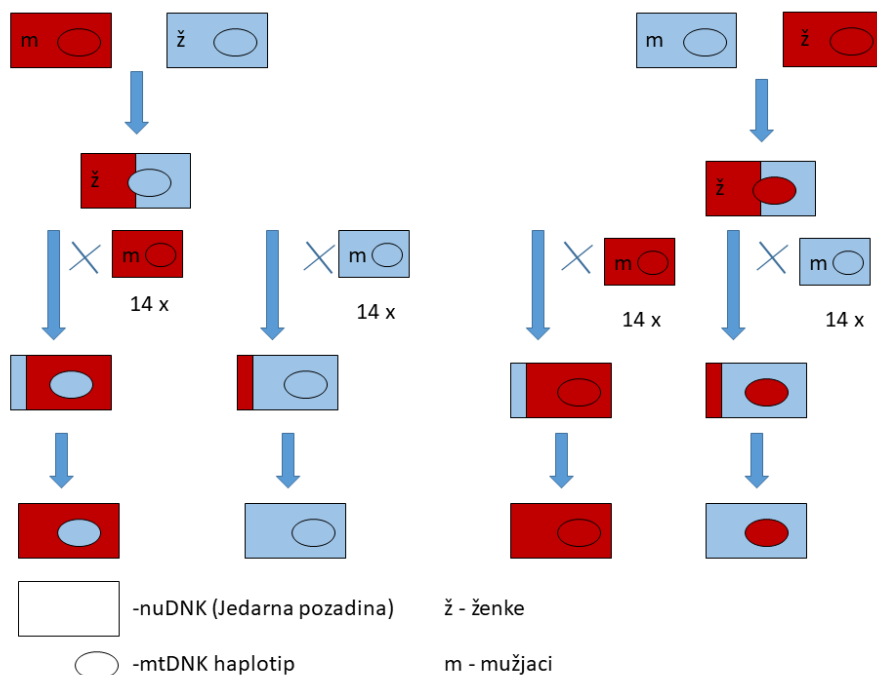
Eksperimentalne linije korišćene su za poređenja razlika u fitnessu između različitih kombinacija mitohondrijskih haplotipova i jedarnih pozadina, kod oba pola u dva velika eksperimenta, u kojima je obuhvaćen veći broj fitness komponenti. Svi eksperimenti sprovedeni su na dve eksperimentalne temperature, sa ciljem da se razgraniči efekat faktora i njihovih interakcija na fitness. U okviru svakog eksperimentalnog bloka postojala su tri parovna poređenja kombinacija haplotipova i jedarnih genoma (primer parovnog poređenja bi bio: AA, AB, BA i BB ili npr. AA, AC, CA, CC). Takođe su postojala poređenja celih eksperimentalnih blokova gde je svih 9 linija u okviru bloka poređeno zajedno (AA, AB, AC, BA, BB, BC, CA, CB, CC). Nakon 14 generacija eksperimentalne linije *D. obscura* su ponovo sekvencirane da bi se proverilo da svaka od 36 eksperimentalnih linija ima željeni *Cyt b* haplotip.

3.5.3. Formiranje eksperimentalnih linija

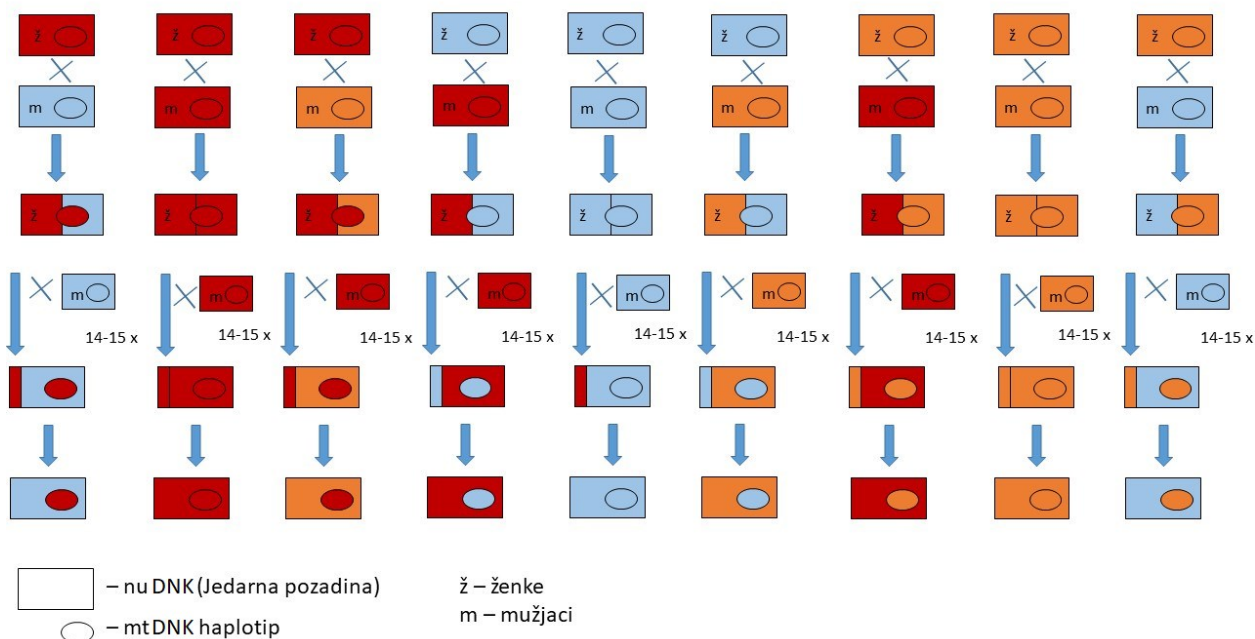
Kod *D. subobscura*, od ranije je poznato da se tek izležene jedinke neće pariti prva 24h po izleganju ako su u potpunom mraku (Anđelković i Marinković 1983; Krimbas 1993). Usled nedostataka radova na temu reproduktivne biologije *D. obscura*, koristeći se poznatim informacijama o vrsti *D. subobscura*, isprobana je metoda sakupljanja nevinih ženki, korišćena kod *D. subobscura*, i pratilo se da li će ostaviti potomstvo. U ovom pilot eksperimentu zaključeno je da se jedinke *D. obscura* kao i *D. subobscura* neće pariti tokom prva 24 časa po izleganju ako su u potpunom mraku.

Tokom pilot eksperimenta ni jedna ženka koja je bila u uslovima apsolutnog mraka tokom 24 sata od izleganja (i potencijalno u prisustvu jedinki suprotnog pola) nije nakon toga polagala oplođena jaja. Tako da je za obe model vrste, svakoj generaciji tokom serije povratnih ukrštanja, koja su prethodila eksperimentima komponenti životne istorije, flakoni sa jedinkama u stadijumu lutke držani su u mraku. Svakog jutra iz ovih eksperimentalnih linija eterizovanjem izležanih jedinki razdvajani su polovi. Za svaku generaciju povratnih ukrštanja sparivano je 10 ženki određenog mitohondrijskog haplotipa, sa 20 mužjaka specifične jedarne pozadine.

Kako se mitohondrije nasleđuju samo preko majke, a jedarni genom od oba roditelja, ženke specifičnog mitohondrijskog haplotipa sparivane su sa mužjacima željene jedarne pozadine. Ukrštajući ženke iz odabranih eksperimentalnih linija tokom minimuma od 14 uzastopnih generacija sa mužjacima jedne iste IFL, zadržan je mitohondrijski haplotip koji je imala ženka, dok je njena jedarna pozadina postepeno menjana pozadinom mužjaka tokom 14 generacija. Nakon takvog postupka bi udeo izvornog jedarnog genoma ženke bio oko 0,006%. Dizajn povratnih ukrštanja kojima su konstruisane eksperimentalne linije *D. subobscura* dat je na slici M3, dok je dizajn povratnih ukrštanja kod *D. obscura* prikazan na slici M4.



Slika M3. Šema povratnih ukrštanja kod *D. subobscura*.



Slika M4. Šema povratnih ukrštanja kod *D. obscura*. Objavljeno u Erić i sar. 2022b.

3.6. Analize osobina životne istorije

Eksperimentalne temperature su kod obe vrste birane tako da jedna bude optimalna temperatura za datu vrstu, dok bi druga bila van optimuma. Kako je već u uvodu navedeno, iako se areali vrsta preklapaju, *D. obscura* je prilagođenija nešto hladnijim uslovima, pa su za njene eksperimente birane nešto niže temperature u odnosu na *D. subobscura*. Svi eksperimenti analize komponenti životne istorije sprovedeni su na obe model vrste.

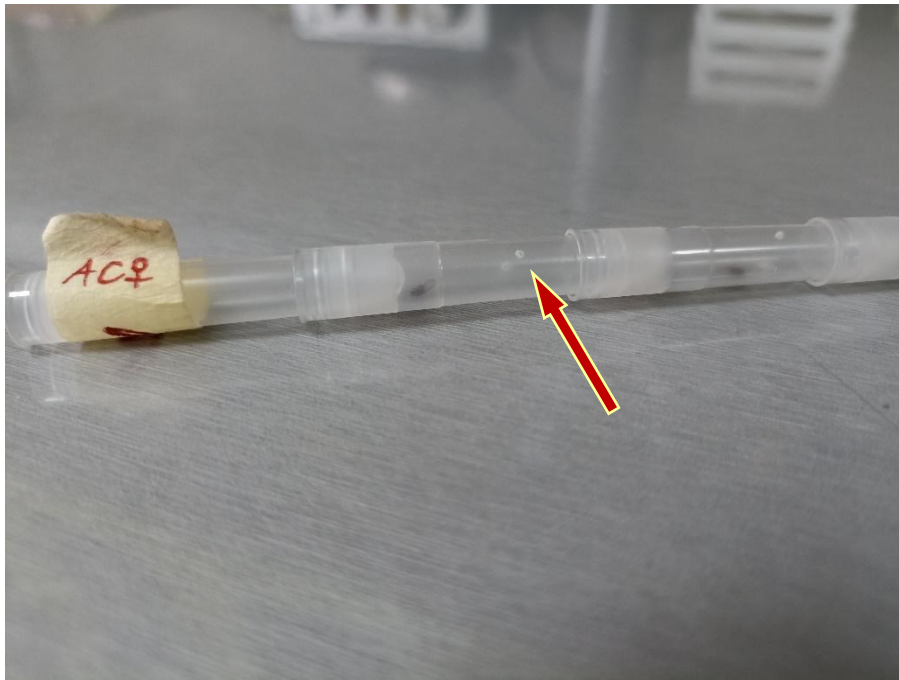
Broj replika po jedinstvenim linijama je bio veći u eksperimentima na *D. obscura* u odnosu na *D. subobscura*. Kod *D. subobscura* haplotipovi (I i II) bili su u startu replikovani 11 puta, čime je dobijeno 11 kvarteta u kojima poredimo iste mtDNK haplotipove. Kod *D. obscura*, sa izuzetkom pojedinih haplotipova koji se ponavljaju u više blokova, svaki od blokova je jedinstvena eksperimentalna jedinica u okviru koje su praćeni efekti specifičnih mito-jedarnih kombinacija na ostvareni fitnes. Iz tog razloga je kod vrste *D. obscura* analiziran generalno veći broj jedinki, kako bi uzorak u okviru svakog bloka bio dovoljno veliki za adekvatnu statističku analizu.

Prva ispitivana komponenta fitnesa jeste otpornost na desikaciju ili uslove suše, koja predstavlja jedan od najvećih sredinskih stresora sa kojim se vrste sreću u prirodnom staništu. Danas, kada je globalno zagrevanje u fokusu istraživanja više nego ikad, otpornost jedinki da se odupru ekstremno sušnim uslovima, predstavlja značajnu komponentu adaptivne vrednosti. Parametar koji se meri je vreme u satima koje su jedinke sposobne da prežive u sušnim uslovima bez hrane i vode. Sledeća odabrana komponenta životne istorije jeste dužina razvića i ona predstavlja broj dana potreban da se od polaganja jaja izlegne odrasla jedinka. Kod vrsta roda *Drosophila* smatra se da je brže razviće adaptivna prednost pošto u prirodi one polažu jaja u fermentisano voće, koje predstavlja

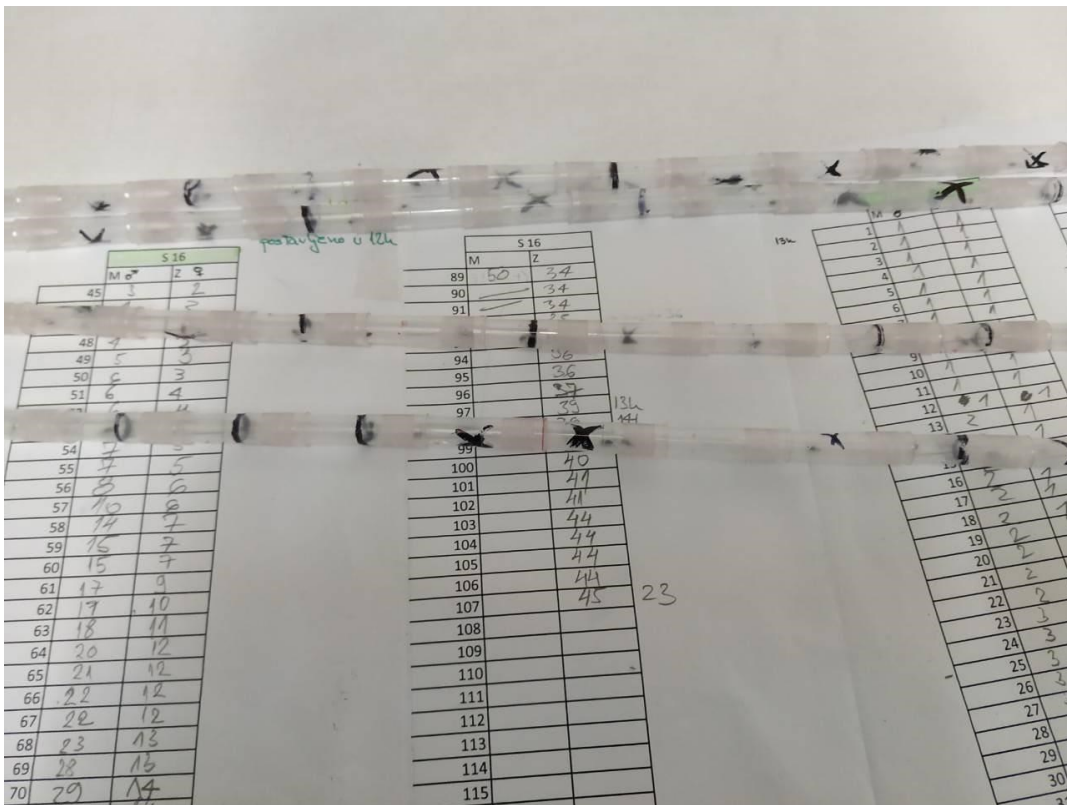
efemerno stanište, ograničenog trajanja. Pored toga što su voćke u kojima se razvijaju jedinke u procesu raspadanja, one mogu biti pojedene od strane herbivora, pa se smatra da su jedinke sa bržim razvićem u prednosti. Treća ispitivana komponenta je preživljavanje, odnosno vijabilitet, i ono predstavlja udeo jedinki koje prežive od jednog razvojnog stadijuma do drugog. U ovoj tezi je mereno preživljavanje od jajeta do lutke (engl. *Egg to Pupa* EtP), kao i preživljavanje od lutke do odrasle jedinke (engl. *Pupa to Adult PtA*). Ipak, najvažnija stavka ovog eksperimenta jeste preživljavanje celokupnog razvića, odnosno od jajeta do adulta (engl. *Egg to Adult* EtA). Poslednja odabrana komponenta životne istorije jeste procenat mužjaka, među svim izleglim adultima. Ova komponenta faktički analizira odnos polova i omogućava analiziranje polno specifičnog efekta vijabilnosti, odnosno juvenilnog fitnesa kod model vrsta.

3.6.1. Eksperiment otpornosti na desikaciju (isušivanje)

U ovom eksperimentu praćena je otpornost mito-jedarnih linija na uslove suše, tako što je mereno vreme koje su jedinke sposobne da prežive bez hrane i vode. Eksperiment otpornosti na desikaciju urađen je odmah posle 14. generacije povratnih ukrštanja eksperimentalnih linija. Eksperiment je rađen na dve eksperimentalne temperature, koje su se razlikovale kod dve model vrste, dok je vlažnost vazduha bila ograničena na 30% kod obe vrste. Mušice korišćene za eksperiment bile su nevine i stare između 5 i 7 dana, kako bi se isključio uticaj reprodukcije i starosti na varijabilnost njihovog preživljavanja u uslovima suše. Jedinke su aspiratorom ubacivane u male modularne plastične tubice, gde se svaka tubica zatvara sledećom. Na svakoj tubici su iglom napravljena dva otvora za vazduh promera 0,5mm (slika M5). Tubice su slagane u kolone od po 20 tubica sa mušicama, zarad lakšeg pregledanja (slika M6). Kolone sa tubicama su postavljene u dve različite prostorije, sa regulisanom temperaturom i vlažnošću vazduha. Jedinke koje su uginule u prva 2 sata nisu uključene u eksperiment, zbog pretpostavke da su uginule usled povreda koje mogu nastati pri izdvajanju i postavljanju u tubice, a ne zbog uslova suše. Po postavljanju eksperimenta, mušice su pregledane sve dok poslednja jedinka nije uginula. Mušica je smatrana mrtvom kada nije više bila u stanju da se zadrži ekstremitetima za zid tubice, niti da se uspravi nakon rotacije i blagog drmanja kolone tubica.



Slika M5. Izgled pojedinačne tubice sa naznačenim otvorom za vazduh.



Slika M6. Kolona tubica korišćenih za eksperiment otpornosti na desikaciju.

3.6.1.1. Eksperiment otpornosti na desikaciju kod *D. subobscura*

Eksperiment otpornosti na isušivanje kod *D. subobscura* je prvi u nizu eksperimenata analize komponenti životne istorije u okviru ove teze. Analizirane su dve eksperimentalne grupe: jedna na 19°C i jedna na 24°C, dok je vlažnost vazduha u obe grupe bila podešena na 30%. Ove dve temperature su izabrane, zbog činjenice da je haplotip I učestaliji tokom kasnog proleća, a haplotip II tokom jeseni, kao i pretpostavke da je razlog tome prilagođenost dva haplotipa na različite temperaturne optimume (Christie i sar. 2010). U toku postavke eksperimenta sakupljeno je po 20 nevinih mužjaka i ženki starosti od 5 do 7 dana, iz svake eksperimentalne linije, za svaku od eksperimentalnih temperatura. Zbog činjenice da neke jedinke nisu preživele proces prebacivanja u eksperimentalne tubice, u eksperimentu je praćeno u proseku 17,75 ženki i 16,88 mužjaka iz svake grupe po temperaturi. Sa ukupno 11 kvarteta ili grupa, svaki sa po 4 EL, na dve temperature, dva pola i oko 20 jedinki, eksperiment desikacije je urađen na preko 3000 jedinki *Drosophila subobscura*.

3.6.1.2. Eksperiment otpornosti na desikaciju kod *D. obscura*

Postavka eksperimenta je bila takva, da se za svaku eksperimentalnu liniju sakupi po 40 nevinih individua svakog pola starosti od 5 do 7 dana, po eksperimentalnoj temperaturi. U nekim linijama bilo je poteškoća sa sakupljanjem 40 mužjaka planirane starosti, dok su u drugim neke jedinke pobile, ili su povređene tokom postavljanja eksperimenta. Vlažnost vazduha je ograničena na 30%, dok su dve eksperimentalne temperature bile 16°C i 19°C, pri čemu je 19°C standardna temperatura na kojoj se mušice ove vrste održavaju u laboratorijskim uslovima, a 16°C je nešto niža temperatura od optimalne. U proseku, za eksperiment otpornosti za desikaciju kod *D. obscura* analizirano je 38,8 ženki i 37,6 mužjaka svake linije po eksperimentalnoj temperaturi. Sve ukupno, sa četiri eksperimentalna bloka od kojih je svaki sa po 9 EL, dva pola, na dve temperature i do 40 jedinki, eksperiment otpornosti na desikaciju kod *D. obscura* urađen je na oko 5500 jedinki.

3.6.2. Dužina razvića od jajeta do adulta, preživljavanje i procenat mužjaka

U ovom delu eksperimenta su poređene dužine razvića od stadijuma jajeta preko lutke do adulta, kod različitih eksperimentalnih linija (EL). Takođe, računato je i preživljavanje u svakom pojedinačnom flakonu, brojanjem jedinki koje su dostigle svaki razvojni stupanj. U ovom eksperimentu mereno je preživljavanje postavljenih jaja po flakonu, kako do stadijuma lutke tako i do adulta. Posmatran je i procenat mužjaka među jedinkama koje su dostigle stadijum adulta, radi analiziranja polno specifičnog preživljavanja juvenilnog stadijuma. Odstupanje od jednakog odnosa polova ukazuje na diferencijalno preživljavanje jedinki različitog pola.

Za svaku eksperimentalnu liniju, sakupljeno je po 40 nevinih ženki i 60 nevinih mužjaka starosti 5-7 dana. Flakoni iz kojih su se ove jedinke izlegale su držani u mraku kako bi se izbeglo parenje. Izdvojene mušice stavljene su u teglice zapremine 330ml sa standardnim medijumom od kukurznog griza da se pare 5 dana. Svaka linija je imala po jednu dodatnu teglicu sa mušicama u

rezervi ukoliko bi se jedinke ulepile, uginule, ili ukoliko nisu polagale dovoljan broj jaja za eksperiment. Nakon 5 dana mušice su prebačene u novu praznu teglicu koja je umesto čepa od vate imala petri šolju kao poklopac. U petri šolje je prethodno izliven standardni kukuruzni medijum koji je premazan rastvorom tečnog kvasca. Petri šolje su zatim, uz pomoć samolepljive trake prilepljene za grlić teglice kao čep. Nove teglice su okretane naopačke, da stoje na petri šoljama sa medijumom u koji bi mušice polagale jaja (slika M7). Svakog jutra prilikom postavke eksperimenta, stare petri šolje su skidane i zamenjene novim. Pošto su bile zatvorene lepljivom trakom, a ne pamučnom vatom, u teglicama se stvarala manja količina kondenza, pa su neke jedinke bile ulepljene u kapljicama vode na obodima teglica. Kod takvih tegli, kao i kod onih gde su jedinke polagale premali broj jaja, korišćene su i rezervne tegle, kako bi eksperiment bio postavljen u što kraćem roku, to jest da nijedna grupa ne zaostaje previše za drugima u pogledu postavljanja jaja, a sve u cilju što ujednačenijih eksperimentalnih uslova. Sa podloge iz petri šolja, koje su skidane svakog jutra, pod binokularom su skupljana položena jaja i prebacivana u eksperimentalne flakone sa kukuruznim medijumom i kvascem da se razvijaju. Dnevno je maksimalno postavljano do 15 flakona svake linije.



Slika M7. Tegle sa petri šoljama u kojima se nalazi supstrat u koji mušice polažu jaja.

Eksperimentalni flakoni sa postavljenim jajima su u okviru komora rotirani na svaka dva dana, kako bi se obezbedila što homogenija temperatura i što ujednačeniji uslovi za sve flakone tokom 36 dana trajanja eksperimenta. Za eksperiment praćenja dinamike razvića nasumično je odabrana trećina flakona od ukupno postavljenih u ovom eksperimentu. Ovi flakoni su svakoga dana tokom trajanja eksperimenta pregledani u klimatizovanim prostorijama podešenim na eksperimentalne temperature, kako razlika u temperaturi ne bi uticala na dužinu razvića. Sve izležene mušice su prebrojane uz eterizaciju i pod binokularom im je određen pol. Takođe, broj lutki je beležen u svakom flakonu na dnevnom nivou. Ostale dve trećine replika, koje nisu praćene u eksperimentu dinamike razvića, nakon 36 dana od postavljanja su pregledane, i u okviru svakog flakona prebrojan je broj lutki i adulta, i izračunat procenat mužjaka.

3.6.2.1. Dužina razvića od jajeta do adulta, preživljavanje i procenat mužjaka kod *D. subobscura*

Posle šesnaeste generacije povratnih ukrštanja kod *D. subobscura* je urađen i drugi veliki eksperiment analize fitnesa. Za potrebe merenja preživljavanja, za svaku od 44 eksperimentalnih linija (četiri kombinacije mito-jedarnih haplotipova u svakom od 11 kvarteta) napravljene su 24 replike sa po 24 jajeta za obe eksperimentalne temperature. Komore u kojima su držani flakoni sa eksperimentalnim jajima, bile su podešene na 19°C i 24°C. Svetlosni režimi koji su pratili ove dve eksperimentalne temperature su dizajnirani tako da simuliraju različita godišnja doba. Na 19°C bilo je 12h svetla i 12h mraka, dok je na 24°C bilo 16h svetla i 8h mraka. Za potrebe ovog eksperimenta konstruisane su 44 eksperimentalne linije, na dve eksperimentalne temperature, gde je za svaku postavljeno 24 flakona sa po 24 jajeta, što ukupno čini preko 50 000 postavljenih jaja. Iz svake grupe nasumično je izabrano 8 od 24 replika za merenje dužine razvića.

3.6.2.2. Dužina razvića od jajeta do adulta, preživljavanje i procenat mužjaka kod *D. obscura*

Drugi eksperiment na model vrsti *D. obscura*, sproveden je posle 15. generacije, kako bi se obezbedio dovoljan broj jedinki. Iz svake od 36 eksperimentalnih linija izdvajano je po 30 flakona sa po 20 jaja, za svaku od dve eksperimentalne temperature. Flakoni sa jajima su smešteni u dve različito temperaturno regulisane komore sa podešenim svetlosnim režimom. Polovina flakona bila je na 15°C sa 12h svetla i 12 sati mraka, dok je druga polovina bila smeštena na 20°C, 16h svetla i 8h mraka, kako bi se donekle simulirali efekti različitih godišnjih doba. Za ovaj deo eksperimenta, sa 36 eksperimentalnih linija (4 eksperimentalna bloka sa po 9 linija), dve temperature, 30 replika po temperaturi za svaku liniju, i po 20 jaja po flakonu, postavljeno je preko 43000 jaja. Iz svake grupe nasumično je izabrano 10 od 30 replika za merenje dužine razvića.

3.7. Statistička obrada eksperimentalnih podataka osobina životne istorije

Svi rezultati iz fitnes eksperimenata statistički su analizirani u R v.4.1.0 (R Core Team 2021).

3.7.1. Statistička obrada rezultata eksperimenta otpornosti na desikaciju

Podaci iz eksperimenata otpornosti na desikaciju kod obe model vrste analizirani su pomoću Koksovog modela proporcionalnih *hazard*-a (engl. *Cox proportional hazards model*), (Cox 1972), implementiranog u *survival* paket v.3.2-13 (Therneau i sar. 2020). Podaci nisu bili cenzurisani (engl. *censored*), što znači da je događaj koji pratimo zabeležen kod svake jedinke koja je učestvovala u eksperimentu, jer su eksperimenti trajali dok praktično poslednja jedinka nije uginula.

Kod obe vrste, postojala su četiri fiksna faktora u modelima: mitohondrijski haplotip (MT), jedarna pozadina (NU), pol i temperatura (T). Bitno je napomenuti da se pod faktorom temperatura (T), svuda u daljem tekstu pored same eksperimentalne temperature podrazumeva i svetlosni režim koji je išao uz nju. Kao najadekvatniji model u većini slučajeva kod obe vrste, pokazao se kompletni (engl. *full model*) koji pored ova četiri faktora sadrži i sve interakcije prvog, drugog i trećeg reda. Radi poredivosti podataka između različitih eksperimentalnih blokova i parovnih poređenja, svi podaci kod obe model vrste su modelovani sa svim interakcijama ova četiri faktora. Problem sa Cox modelima jeste da, ukoliko jedan od faktora nema takozvane *hazard-e*, proporcionalne ostalim faktorima, model se mora stratifikovati prema tom faktoru čime se gubi informacija o samom faktoru. U velikom broju modela kod obe model vrste bilo je poređenja u kojima pretpostavka o proporcionalnim *hazard*-ima nije bila ispunjena, pa je model stratifikovan po faktoru čija *hazard* funkcija nije bila proporcionalna ostalim faktorima. Ovo se po pravilu dešava kada jedan faktor ima daleko veći uticaj na nezavisnu promenljivu od ostalih faktora, čak toliko da ostali faktori mogu izgledati zanemarljivo pored nje. Ceo skup podataka se onda mora podeliti na onoliko modela koliko ta promenljiva ima nivoa. U slučaju ove d to je uvek dva, jer svi faktori imaju po dva nivoa. Ovom procedurom se dobijaju dva modela, po jedan za svaku vrednost promenljive po kojoj stratifikujemo model i onda na ta dva modela pravi prosek uticaja ostalih promenljivih na nezavisnu, dok se promenljiva po kojoj su podaci stratifikovani ne može meriti. Ovo se dešavalo u različitim modelima za različite faktore, pa u nekim slučajevima odsustvuje informacija o značajnosti ovih faktora, ili interakcije dva stratifikovana faktora. Pretpostavka proporcionalnosti *hazard*-a je proveravana uz pomoć *cox.zph* funkcije i oni faktori, čija *hazard* funkcija nije bila proporcionalna ostalim faktorima modela, su stratifikovani.

3.7.1.1. Statistička obrada rezultata eksperimenta otpornosti na desikaciju kod *D. subobscura*

Kod vrste *D. subobscura*, svaki kvartet je modelovan posebno, čime je dobijeno 11 replika poređenja istih mito-nukleusnih kombinacija tj. 11 modela. Temperatura, kao najznačajniji faktor kada je preživljavanje uslova suše u pitanju, u četiri modela nije imala proporcionalan *hazard* sa ostalim faktorima, pa je u ovim modelima stratifikovana. Kod ove model vrste postojao je i ukupni model gde su analizirani podaci iz svih 11 kvarteta zajedno. Ovaj model je pored četiri fiksna faktora imao i takozvani slučajni efekat - kvartet (engl. *random effect*). Kvartet, tj. pripadnost jednoj od 11 grupa poređenja haplotipova I i II, je u ovom ukupnom modelu bila takozvani *frailty*, jedan od načina definisanja nasumičnih efekata kod Cox modela. Na ovaj način se u statističkom modelovanju uzima u obzir heterogenost nemerljivih kovarijata. Kako Cox modeli pretpostavljaju homogenu eksperimentalnu populaciju, uvođenjem *frailty*-ja definiše se koji uzorci nisu međusobno nezavisni, i ovom varijablom ih na jedan način grupišemo zajedno. P vrednosti fiksiranih efekata za ukupni model kod *D. subobscura* dobijene su korišćenjem *joint tests* funkcionalnosti u okviru *emmeans* paketa v.1.7.2 zbog postojanja *frailty*-ja kao i stratifikovanih varijabli (Lenth i sar. 2022).

3.7.1.2. Statistička obrada rezultata eksperimenta otpornosti na desikaciju kod *D. obscura*

Kada je reč o *D. obscura*, podaci iz celih eksperimentalnih blokova su modelovani zajedno (svaki od 4 bloka posebno). Pored toga, u okviru svakog EB, postojala su po tri parovna poređenja koja su modelovana. Npr. OP, OQ i PQ u okviru četvrtog EB, gde su u OP paru poređene OO, OP, PO i PP kombinacije mito-nukleusnih genotipova. Tako postoje 4 ukupna modela koja predstavljaju 4 bloka, kao i po 3 parna poređenja u okviru svakog bloka (12 “parovnih” modela).

3.7.2. Statistička obrada rezultata eksperimenta dužine razvića

Dužina razvića je analizirana korišćenjem mešovitih linearnih modela, pozivanjem *lmer* funkcije implementirane u *lme4* paketu v.1.1-25 (Bates i sar. 2015) u okviru R okruženja. Kod ove komponente su takođe korišćeni kompletni modeli, koji uzimaju u obzir sve interakcije četiri fiksna faktora (mtDNK, nuDNK, pol i temperatura), ali i broj replike kao nasumični ili *random* efekat. Ovakav pristup je primenjen stoga što uticaj sredine svakog pojedinačnog flakona može uticati na dužinu razvića, te se može očekivati da jedinke koje se izlegu unutar jednog flakona budu međusobno sličnije u odnosu na jedinke izležene iz drugih flakona. Parametri modela korišćenih za ovu komponentu, podrazumevali su REML procenu (engl. *Reduced Estimated Maximum Likelihood*) kao i korišćenje tip III ANOVE (engl. *Type III sum of squares*) za poređenje grupa. p vrednosti ANOVA testova dobijene su korišćenjem *LmerTest* paketa (Kuznetsova i sar. 2017) u okviru R okruženja.

Kod model vrste *D. subobscura* postojalo je 11 klasičnih linearnih mešovitih modela za svaki od 11 kvarteta, kao i jedan zbirni model koji je obuhvatao sve podatke. U zbirnom modelu postojao je složen nasumični efekat, gde je broj replike bio „ugnježđen“ (engl. *nested*) u kvartet.

Kod *D. obscura*, modelovan je svaki od blokova zasebno, ali i u okviru svakog EB, postojala su po 3 para poređenja mito-nukleusnih haplotipova koji su modelovani za sebe.

3.7.3. Statistička obrada rezultata eksperimenta preživljavanja

Preživljavanje po flakonu je analizirano generalizovanim linearnim modelima (GLM) uz pomoć *glm* funkcije u R-u. U svakoj grupi beleženo je preživljavanje od jajeta do lutke (EtP), od lutke do adulta (PtA), kao i preživljavanje od jajeta do adulta (EtA). Tri osnovna faktora u ovim modelima su mitohondrijski haplotip (MT), jedarna pozadina (NU) i temperatura (T). Za sve tri komponente (EtP, EtA, PtA) korišćena je binomna raspodela greške, dok je broj jaja odnosno lutki u zavisnosti o kojoj se komponenti radi, korišćen kao imenilac.

Kao i u prethodnim komponentama kod vrste *D. subobscura*, postojalo je 11 modela u kojima su kvarteti analizirani pojedinačno, kao i jedan zbirni koji je obuhvatao svih 11 kvarteta zajedno. Zbirni model, koje je generalizovan linearni mešoviti model, napravljen uz pomoć *glmer* funkcije iz *lme4* paketa (Bates i sar. 2015). Pripadnost kvartetu je definisana kao nasumični efekat u ovom zbirnom modelu. Funkcija ANOVA nije kompatibilna sa *glmer* funkcijom, pa su p vrednosti dobijene

korišćenjem funkcije *joint_tests* iz *emmeans* paketa (Lenth i sar. 2022). U ovoj komponenti su kod vrste *D. obscura* modelovana poređenja parova kao i celih blokova.

3.7.4. Statistička obrada rezultata procenta mužjaka

Procentat mužjaka u ukupnom broju izleženih jedinki po flakonu je računat radi analiziranja odnosa polova. Ova komponenta je modelovana korišćenjem istih generalizovanih linearnih modela kao i preživljavanje, gde su svi parovi u okviru bloka modelovani posebno, kao i celi blokovi. Korišćena je ista distribucija greške i ukupni broj izleženih jedinki po flakonu kao imenilac pri računanju.

Kod *D. subobscura*, kao i kod preživljavanja, za ukupni model korišćena je *glmer* funkcija, gde je pripadnost kvartetu definisana kao nasumični efekat, p vrednosti su dobijene funkcijom *joint_tests* iz *emmeans* paketa (Lenth i sar. 2022).

3.7.5. Statistička obrada rezultata eksperimenata životne istorije u cilju analiziranja signala materinske kletve

Kada su komponente životne istorije kod kojih je u modelima dobijen značajan polno specifični efekat mtDNK haplotipa u pitanju (interakcija MT:Pol), u cilju utvrđivanja signala karakterističnog za hipotezu materinske kletve (Frank i Hurst 1996; Gemmel i sar. 2004) ove komponente su dodatno odvojeno modelovane po polovima, radi utvrđivanja relativne jačine efekta mtDNK haplotipova kod oba pola. Kod svake komponente, oba pola su modelovana identičnim modelom kao i celokupna komponenta sa izuzetkom faktora pola. Merenjem količine varijabilnosti koju faktor MT opisuje za svaku od komponenti (F vrednost) i njenu statističku značajnost (p vrednost) u okviru modela, utvrđuje se signal karakterističan za materinsku kletvu.

4. REZULTATI

4.1. Varijabilnost prirodnih populacija *D. obscura*

4.1.1. Osnovni parametri genetičke varijabilnosti *D. obscura*

Prilikom sekvenciranja citohrom b (*Cyt b*) gena kod 185 linija *D. obscura*, zabeležena su 72 različita haplotipa na osnovu 73 varijabilne pozicije (NCBI pristupni brojevi: MZ337620.1–MZ337804.1). Od evidentirana 73 polimorfna mesta u okviru ovog gena, na dva su zabeležene po tri nukleotidne varijante. Značajna većina uočenih supstitucija je sinonimna, njih čak 59, dok je 16 supstitucija uzrokuje nesinonimne aminokiselinske zamene. Kod više sekvenciranih linija zabeležene su 32 promene, dok su 43 mutacije uočene samo jednom u uzorku. Jedna promena (G u A na poziciji 828), koja izaziva promenu aminokiseline iz valina u izoleucin, posebno je zanimljiva iz razloga da je prisutna kod 73 jedinke iz uzorka. Varijanta sa G na poziciji 828 veoma je učestala u Srbiji (0,875), kao i Finskoj (0,75). U populaciji Nemačke je njena učestalost nešto niža (0,524), dok je u Škotskoj ova varijanta retka (0,083). Sekvence koje imaju A na poziciji 828, u najvećem broju slučajeva, imaju i veći broj drugih supstitucija u *Cyt b* genu.

Parametri nukleotidnog i haplotipskog diverziteta najniži su za populaciju iz Srbije ($\pi = 0,0146$; $hd = 0,546$), dok su najviši za Škotsku ($\pi = 0,0387$; $hd = 0,964$). Parametri diverziteta kao i rezultati testova neutralnosti (Tadžima D, Fuov Fs, Fu i Lijev D-F i Fej i Vuov H test) predstavljeni su u tabeli R1. Svi testovi su rezultirali negativnim vrednostima, za sve ispitivane populacije, a većina je bila statistički značajna. U svim testovima najmanje odstupanje od neutralnosti pokazala je populacija iz Nemačke.

Tabela R1. Parametri genetičkog diverziteta i rezultati testova koji mere odstupanje od ravnoteže pod pretpostavkom neutralnosti

Populacija	Diverzitet		Tadžima		Fu		Fu i Li				Fej i Vu	
	π	d	D	p	Fs	p	F	p	D	p	H	p
Srbija SR	0,00146	0,546	-2,451	**	-23,208	***	-3,846	*	-3,673	*	-13,839	**
Finska FA	0,00178	0,56	-2,110	*	-6,241	*	-2,670	*	-2,277	ns	-9,305	**
Nemačka GF	0,00279	0,816	-1,661	ns	-2,429	ns	-1,860	ns	-1,514	ns	-7,316	*
Škotska, UK SC	0,00387	0,964	-2,273	**	-42,140	***	-2,322	ns	-1,684	ns	-15,638	*

π – nukleotidni diverzitet; hd – haplotipski diverzitet; ns – nije značajno; * $p < 0,05$; ** $p < 0,02$; *** $p < 0,001$, pragovi p vrednosti su dati na osnovu DNASP softvera; statistički značajne vrednosti su podebljane. Objavljeno u (Erić i sar. 2022a).

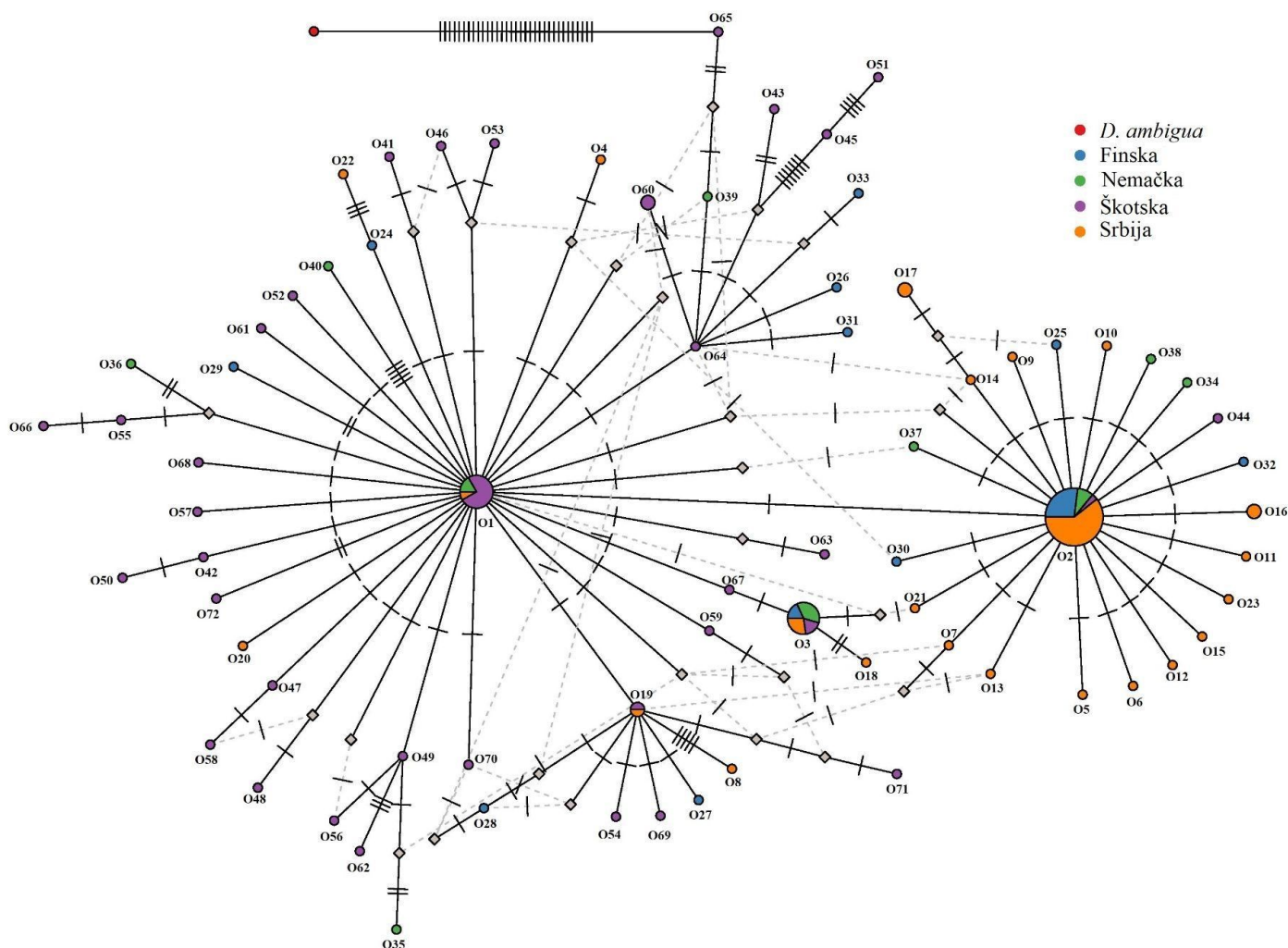
Mekdonald-Krajtmannov test je pokazao da je odnos nesinonimnih prema sinonimnim promenama veći unutar vrste nego između vrsta, dok je statistički značajno odstupanje od neutralnosti zabeleženo za populacije iz Srbije i Nemačke (tabela R2).

Tabela R2. Rezultati MekDonald Krajtmanovog testa za četiri evropske populacije *D. obscura*

Populacija		N	F. p	G	p	G(W)	p	G(Y)	p
Srbija	SR	8,826	ns	5,756	*	5,411	*	3,851	*
Finska	FA	1,824	ns	0,68	ns	0,133	ns	0,116	ns
Nemačka	GF	10,714	*	5,956	*	5,457	*	3,879	*
Škotska, UK	SC	4,55	ns	2,581	ns	2,412	ns	1,335	ns

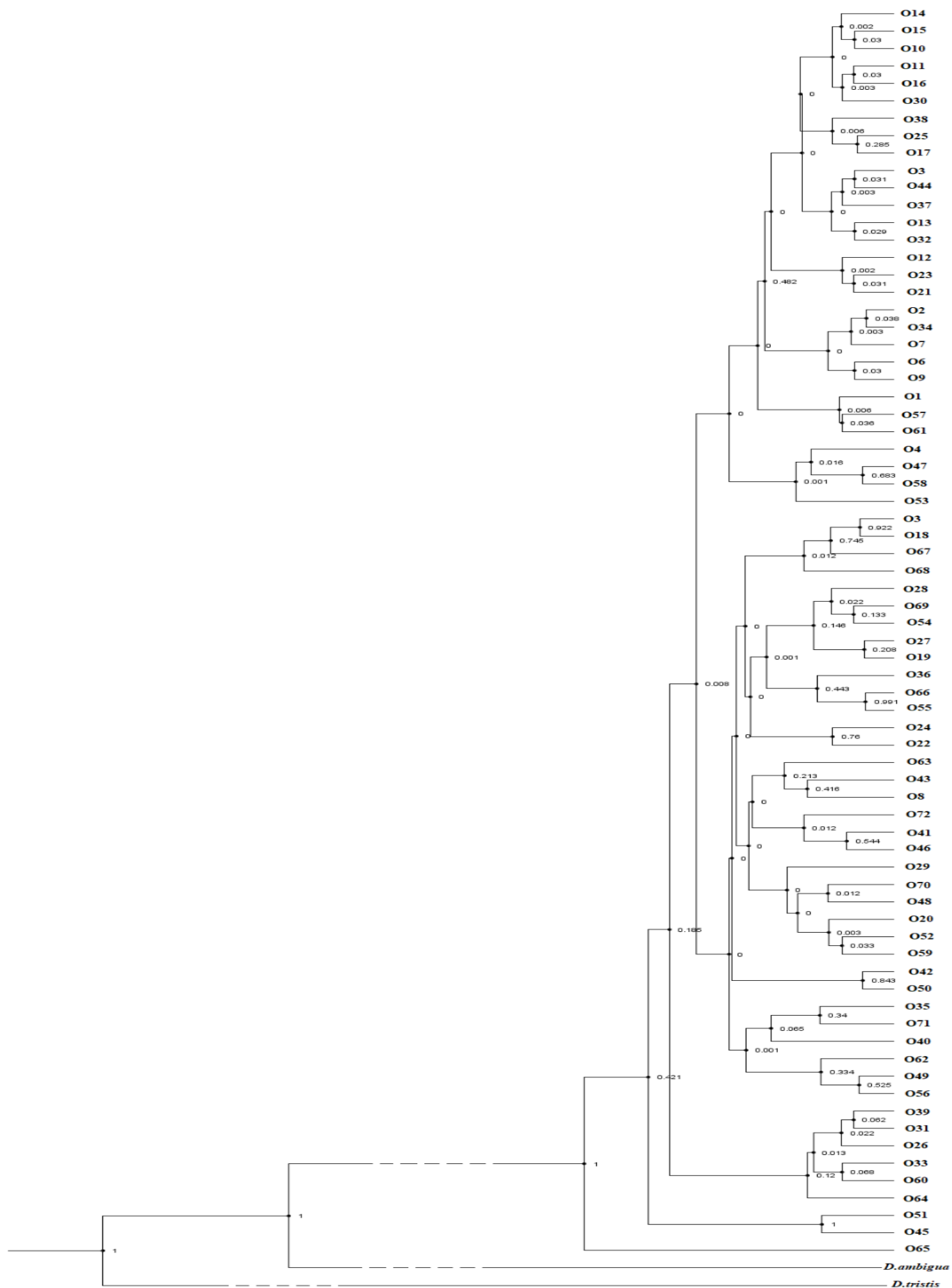
N – indeks neutralnosti; F.p – p-vrednost izračunata na osnovu Fišerovog testa; G – G test; G(W), G(Y) – G test sa Vilijamsovom i Jejtsovom korekcijom; ns – neznačajan; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, pragovi p vrednosti su dati na osnovu DNASP softvera; statistički značajne vrednosti su podebljane. Objavljeno u (Erić i sar. 2022a).

Median-joining mreža haplotipova predstavljena je na slici R1. O2 haplotip je najčešći u Srbiji, kao i u celom uzorku. Jedan od razloga za to je što je najveći broj uzoraka iz Srbije. Većina ostalih uzoraka iz Srbije deli varijantu haplotipa O2 na poziciji 828 i od njega se razlikuje uglavnom jednim mutacionim korakom. O1 haplotip, koji se od O2 razlikuje već pomenutom nesinonimnom mutacijom, najčešći je u Škotskoj zajedno sa većim brojem veoma raznovrsnih haplotipova, koji dele O1 varijantu na poziciji 828. O1 haplotip i haplotipovi izvedeni iz njega pokazali su se kao predački i bliži vrsti *D. ambigua* koja je korišćena kao autgrupa prilikom računanja *median-joining* mreže. Treći po učestalosti haplotip, O3 zabeležen je u sve četiri ispitivane populacije i na 828 nukleotidnom mestu deli varijantu sa O1 haplotipom.



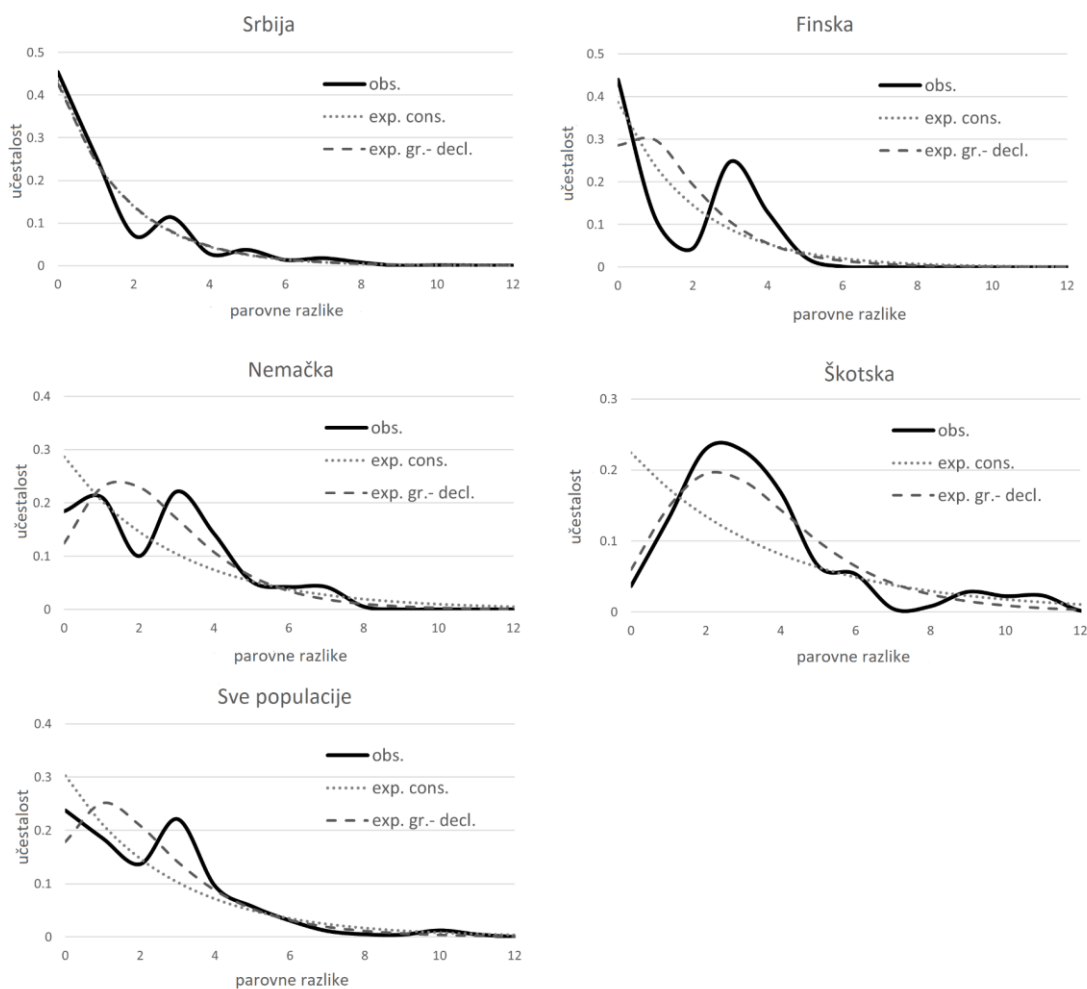
Slika R1. *Median-joining* mreža haplotipova. Veličina kruga proporcionalna je broju jedinki kod kojih je taj haplotip zabeležen. Crtnice na linijama predstavljaju broj nukleotidnih zamena, dok isprekidane linije predstavljaju alternativne retikulacije od po jednog mutacionog koraka. Različite populacije su predstavljene različitim bojama. Objavljeno u Erić i sar. 2022a, modifikovano.

Iako je *median-joining* mreža razdvojila uočene haplotipove u dve velike grupe izvedene iz O1 i O2, Bajesova filogenija nije mogla to da potvrdi sa sigurnošću. Bajesovo filogenetsko stablo prikazano na slici R2, koje je korišćeno da razjasni evolucione odnose kod ove vrste, nije sa sigurnošću moglo da razdvoji većinu grana. Osim što je sestrinske vrste *D. ambigua* i *D. tristis* razdvojio kao posebne klade, Bajesovo stablo razdvaja i haplotip O65 poreklom iz Škotske kao monofiletsku kladu (PP=1). Ostatak filogenetskih odnosa nije bilo moguće utvrditi sa dovoljnom posteriornom verovatnoćom (PP < 0,5), sem malog broja plitkih grananja sestrinskih haplotipova (PP > 0,7).



Slika R2. Bajesovo filogenetsko stablo sa posteriornim verovatnoćama datim za svako grananje. Isprekidanim linijama su predstavljene dugačke spoljne grane koje su skraćene radi preglednosti slike. Objavljeno u (Erić i sar. 2022a).

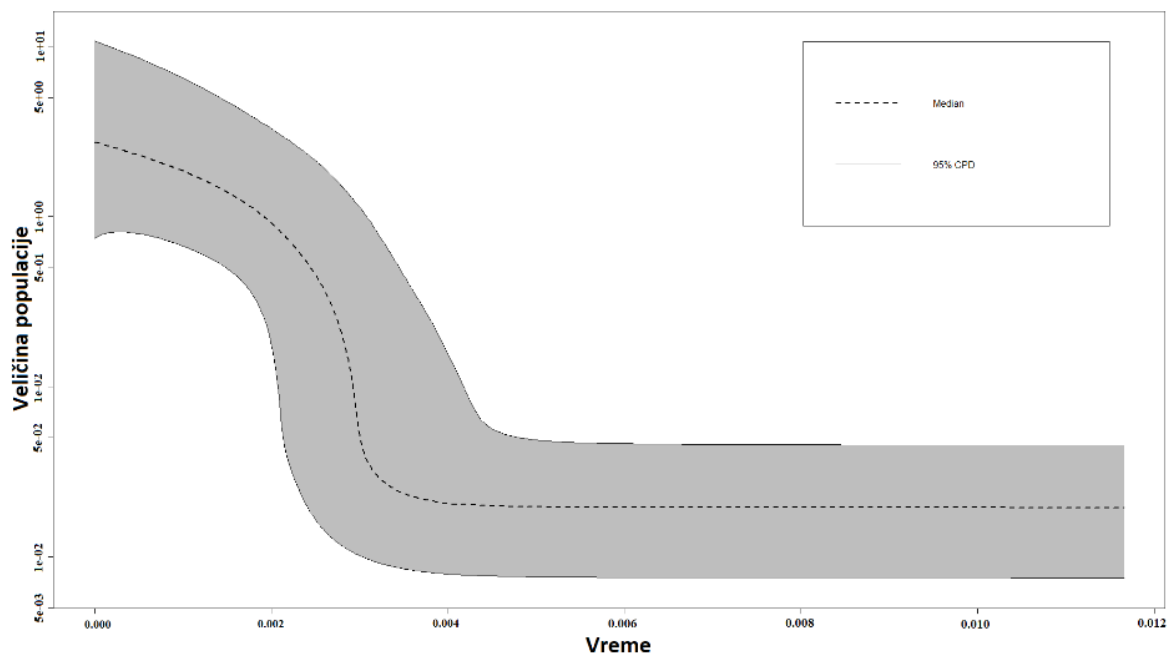
Grafici raspodele broja nukleotidnih razlika u parovnim poređenjima sekvenci (engl. *mismatch distribution graphs*) pokazuju određene razlike između ispitivanih populacija, kao što je prikazano na slici R3. Populacije poreklom iz Srbije i Škotske pokazale su gotovo unimodalne obrasce distribucije. Kod populacije iz Srbije, vrh distribucije (engl. *peak*) na grafiku je na vrednosti od 0 parovnih razlika, uz još jedno malo uzvišenje na 3 parovne razlike koje odgovara malom broju sekvenci iz O1 grupe u ovoj populaciji. Sa druge strane populacija poreklom iz Škotske se odlikuje dominantnim pikom između 2 i 3 parovne razlike, manjim pikom na 6 razlika, ali i još jednim malim uzvišenjem između 9 i 11 parovnih razlika. Bimodalna distribucija parova nukleotidnih razlika uočena je u populacijama iz Finske, Nemačke, kao i u celokupnom uzorku. Populacije iz Nemačke i Finske pokazale su bimodalne distribucije. Populacija poreklom iz Finske odlikuje se najvećim vrhom distribucije na 0 supstitucija, i drugim manjim na 3 parovne razlike. Grafik distribucije broja nukleotidnih razlika za populaciju iz Nemačke se odlikuje sa dva vrha iste veličine na jednoj i tri supstitucije.



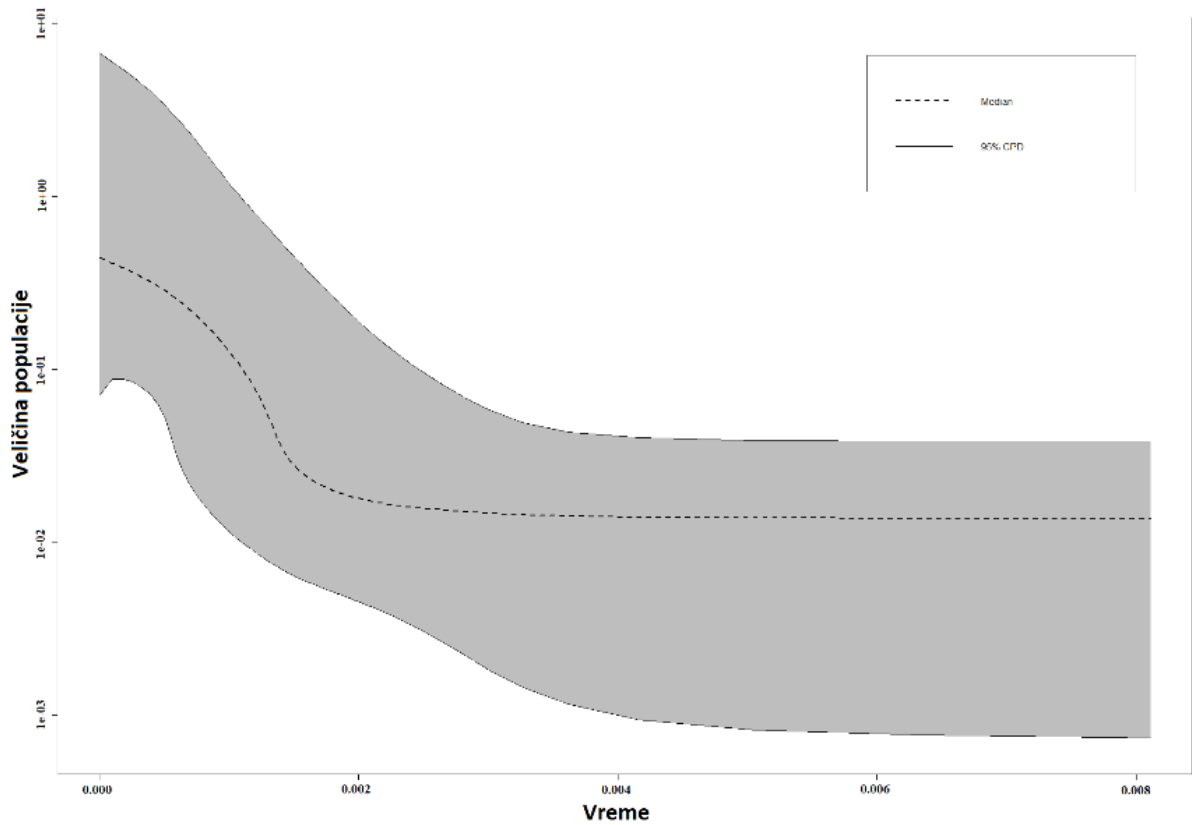
Slika R3. Grafici raspodele broja nukleotidnih razlika u parovnim poređenjima sekvenci citohrom b gena kod prirodnih populacija *D. obscura*. Puna linija predstavlja uočene parovne razlike, tačkasta linija predstavlja očekivanu distribuciju razlika pri konstantnoj veličini populacije, dok isprekidana linija predstavlja očekivane vrednosti pri modelu rasta i pada veličine populacije. Objavljeno u Erić i sar. 2022a, modifikovano.

4.1.2. Prošireni Bajesovi grafici horizonta - EBSP

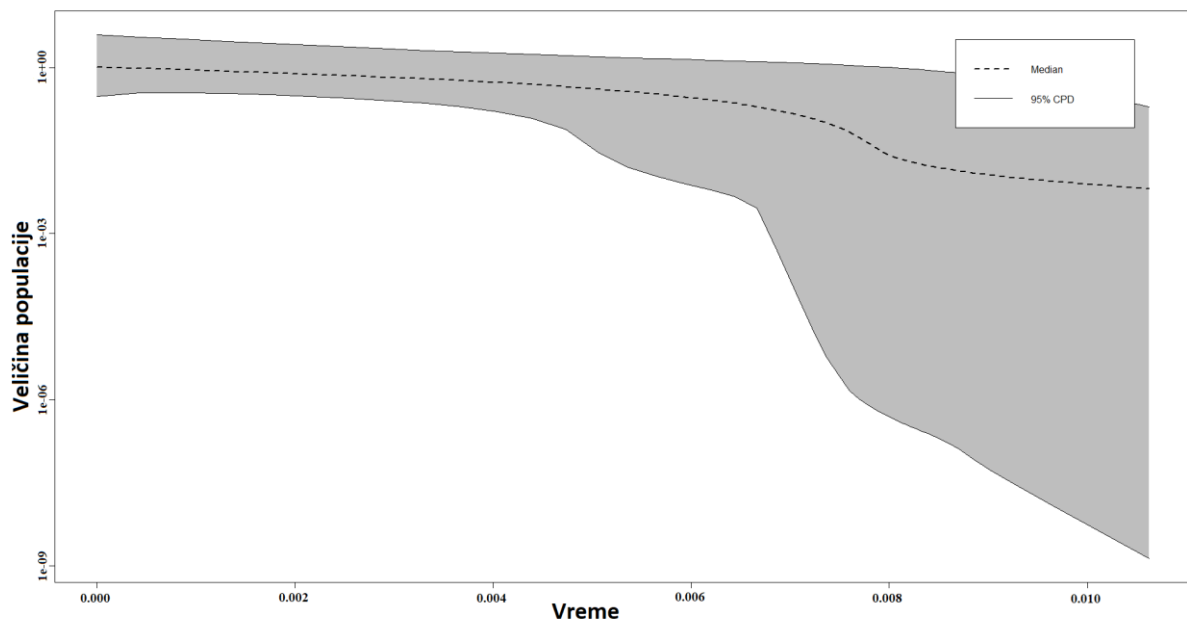
Prošireni Bajesovi grafici horizonta napravljeni na osnovu varijabilnosti sekvenci mitohondrijskog *Cyt b* gena, za celokupni uzorak, ali i po populacijama predstavljani su na slikama R4-R8. Kod celokupnog uzorka, grafik pokazuje početak populacione ekspanzije pre oko 3000 godina. Kada se analiziraju samo sekvence iz Srbije, grafik pokazuje znake skorašnje ekspanzije koja počinje pre oko 1200 godina, ali su intervali poverenja dosta široki i time nepouzdana. Kada je populacija iz Škotske u pitanju, grafik nam ukazuje da je ona tokom prethodnih 7000 godina bila u blagom porastu dok je ekspanziju doživela pre oko 8000 godina, s tim da se intervali poverenja intenzivno šire vraćanjem u prošlost. ESBP pokazuje da je populacija iz Finske doživela blagu ekspanziju između 3000 i 2000 godina u prošlosti, uz jako široke intervale poverenja. Što se populacije iz Nemačke tiče nije zabeležen obrazac populacione ekspanzije, kako Markovljevi lanci nisu uspeli da konvergiraju, čak i sa podešavanjem jako velikog broja iteracija, najverovatnije zbog malog broja uzoraka iz ove populacije.



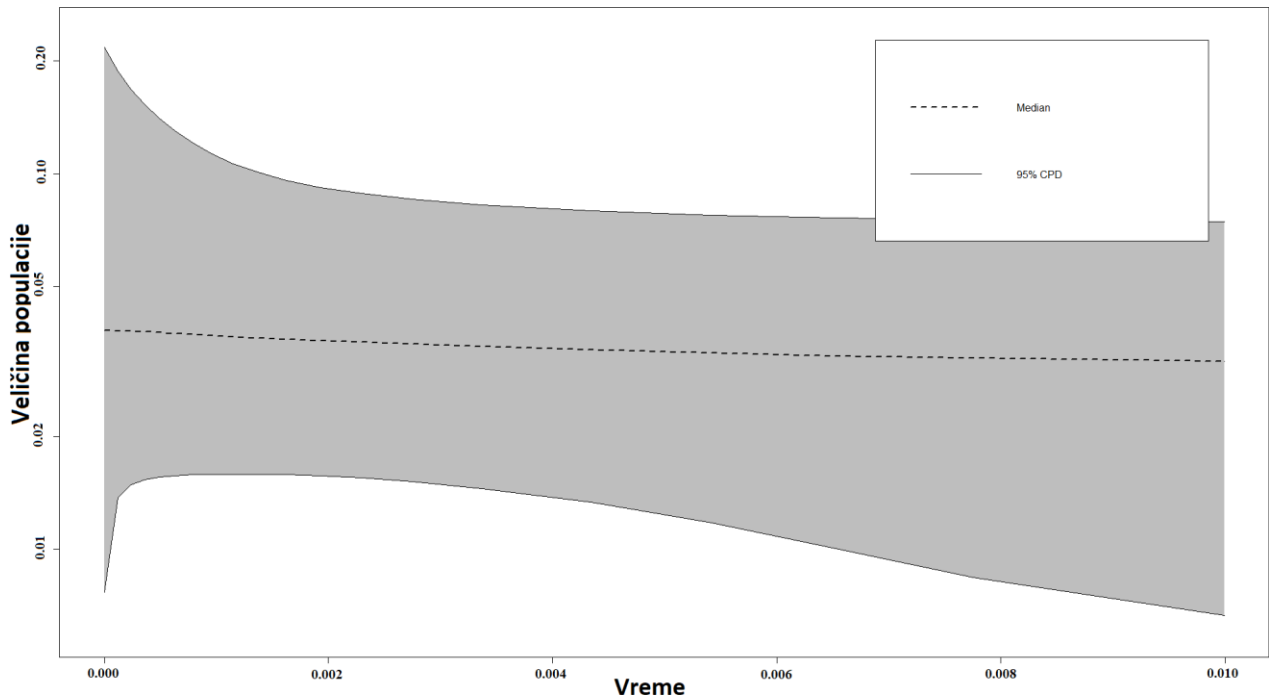
Slika R4. Procenjivanje demografske istorije populacija *D. obscura* za celokupni uzorak korišćenjem proširenog Bajesovog grafika horizonta (EBSP). Intervali poverenja su dati kao osenčani deo na grafiku. Vreme je iskazano u milionima godina. Objavljeno u Erić i sar. 2022a, modifikovano.



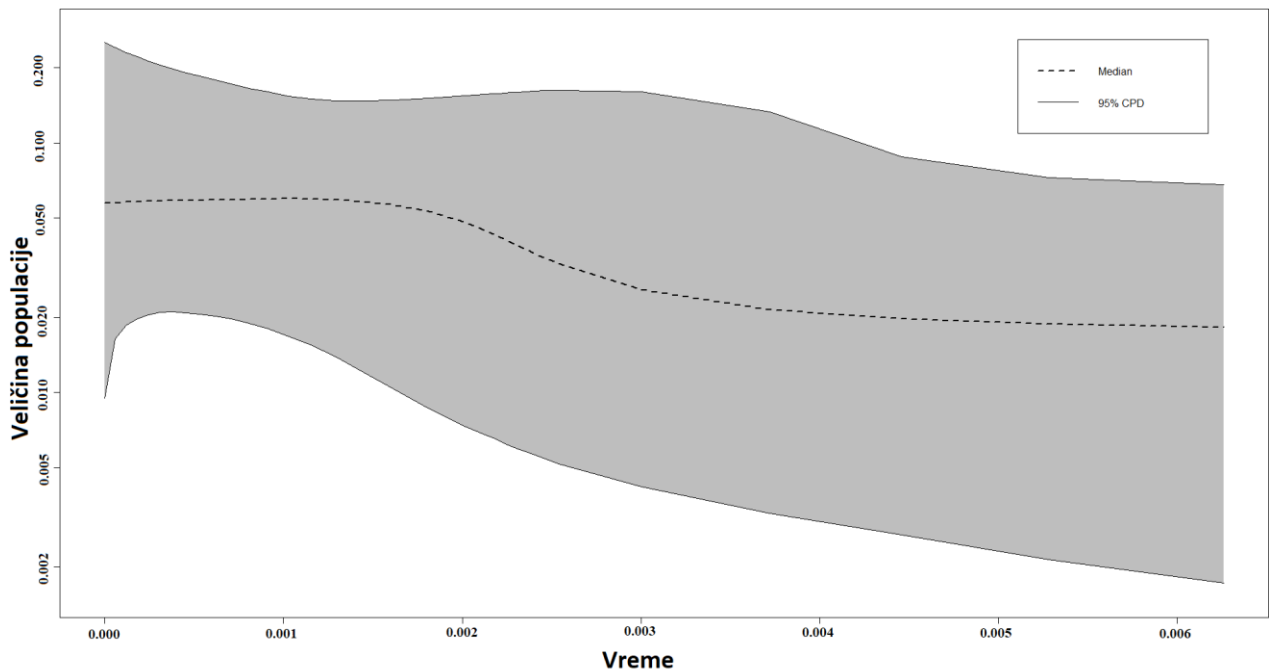
Slika R5. Procenjivanje demografske istorije populacije *D. obscura* iz Srbije korišćenjem proširenog Bajesovog grafika horizonta (EBSP). Intervali poverenja su dati kao osenčani deo na grafiku. Vreme je iskazano u milionima godina. Objavljeno u Erić i sar. 2022a, modifikovano.



Slika R6. Procenjivanje demografske istorije populacije *D. obscura* iz Škotske korišćenjem proširenog Bajesovog grafika horizonta (EBSP). Intervali poverenja su dati kao osenčani deo na grafiku. Vreme je iskazano u milionima godina. Objavljeno u Erić i sar. 2022a, modifikovano.



Slika R7. Procenjivanje demografske istorije populacije *D. obscura* iz Nemačke korišćenjem proširenog Bajesovog grafika horizonta (EBSP). Intervali poverenja su dati kao osenčani deo na grafiku. Vreme je iskazano u milionima godina. Objavljeno u Erić i sar. 2022a, modifikovano.



Slika R8. Procenjivanje demografske istorije populacije *D. obscura* iz Finske korišćenjem proširenog Bajesovog grafika horizonta (EBSP). Intervali poverenja su dati kao osenčani deo na grafiku. Vreme je iskazano u milionima godina. Objavljeno u Erić i sar. 2022a, modifikovano.

4.1.3. Analiza molekularne varijanse - AMOVA

Analizom molekularne varijanse pokazano je da postoje male razlike između populacija, samo 13,24% varijabilnosti posledica je razlika između populacija, a da je 86,76% razlika sadržano unutar populacija ($F_{st} = 0,1324$; $p < 0,001$). Parovne vrednosti F_{st} između populacija pokazuju da su genetički najudaljenije populacije iz Srbije i Škotske, dok je najmanji nivo genetičke diferencijacije zabeležen između populacija poreklom iz Srbije i Finske. Populacija iz Nemačke gotovo je podjednako diferencirana od svih ostalih populacija. F_{st} vrednosti između parova populacija i njihove značajnosti prikazane su u tabeli R3.

Tabela R3. Parovna diferencijacija populacija izračunata preko F_{st} vrednosti

	Srbija		Finska		Nemačka	
Finska	0,0017	ns				
Nemačka	0,0848	***	0,0294	*		
Škotska	0,2371	***	0,1412	***	0,0584	***

ns -nije značajno, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; Statistički značajne vrednosti su predstavljene boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022a)

Kada se analiziraju geografski lokaliteti na kojima su jedinke *D. obscura* uzorkovane u Srbiji, AMOVA pokazuje još manji stepen diferenciranosti ovih lokaliteta. Samo 2,27% uočene varijabilnosti se pripisuje varijabilnosti između lokaliteta ($F_{st} = 0,02269$; $p < 0,05$).

4.1.4. Mantelov test izolacije distancom

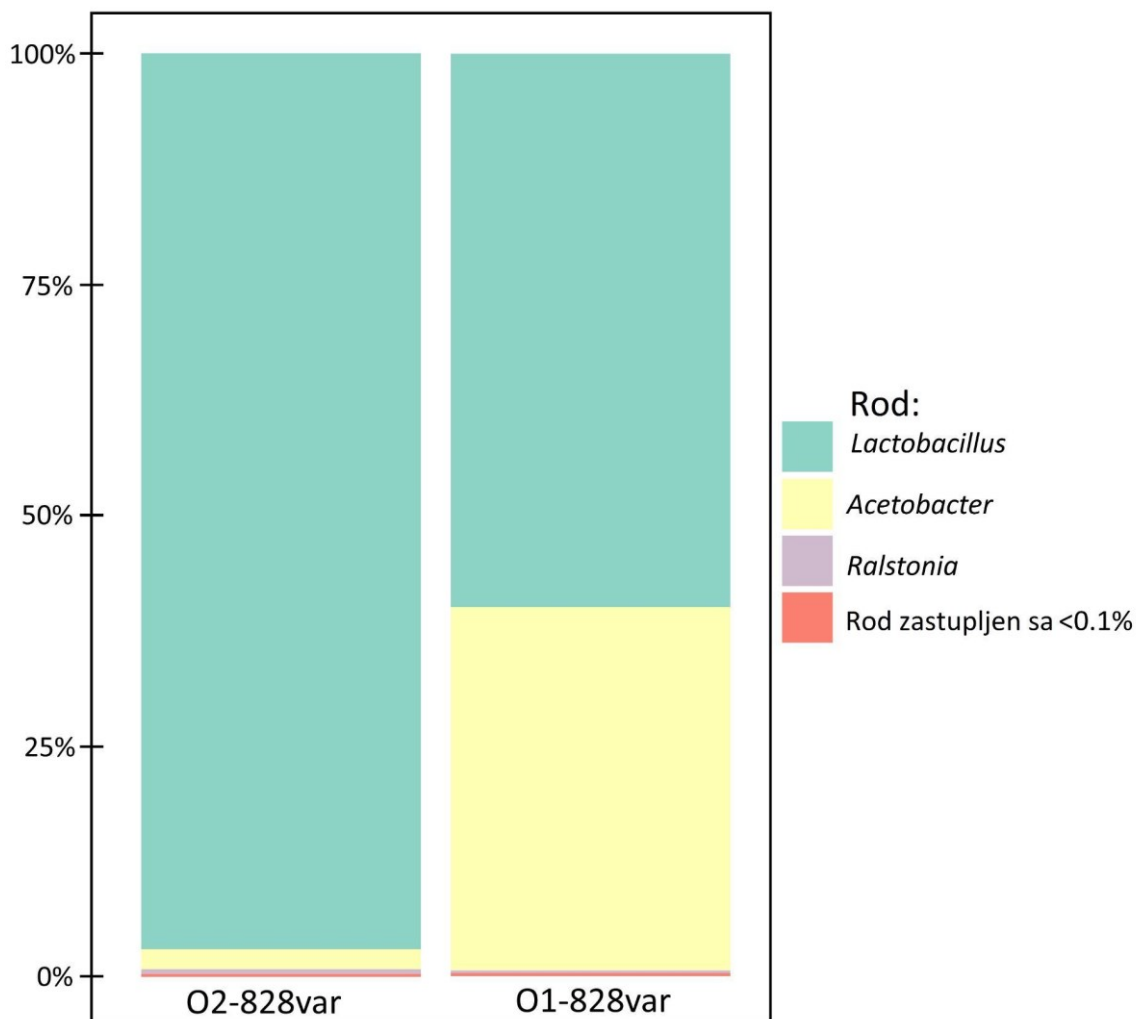
Mantelov test nije pokazao značajan efekat izolacije distancom. Korišćenjem geografskih distanci u Mantelovom testu, iako statistički neznačajna, dobijena je pozitivna korelacija ($r = 0,304757$; $p = 0,330740$). Korišćenjem geografske širine, dobija se negativna korelacija koja takođe nije značajna ($r = -0,234862$; $p = 0,6678$). Najveća korelacija, kao i p vrednost najbliža pragu statističke značajnosti, dobijena je korišćenjem geografske dužine ($r = 0,735025$; $p = 0,0828$). Ova vrednost bi mogla ukazivati na postojanje klinalnog rasprostranjenja mitohondrijskih haplotipova kod ove vrste u pravcu istok-zapad.

4.1.5. Prisustvo mikroorganizama u uzorkovanim jedinkama

Svih 185 uzoraka *D. obscura* bili su negativni na prisustvo endosimbionata iz roda *Wolbachia* korišćenjem PCR testa. Sekvenciranje mikrobioma kod dva združena uzorka (sastavljena od po 10 grupisanih linija iz Srbije koje dele istu varijantu na 828 nukleotidnoj poziciji) pokazalo je potpuno

odsustvo rodova *Wolbachia*, *Rickettsia* i *Spiroplasma*. Analizom mikrobiote je utvrđeno da u oba uzorka rodovi *Acetobacter* i *Lactobacillus* predstavljaju više od 99% mikrobiote, dok *Ralstonia* predstavlja 0,5%, a svi ostali rodovi manje od 0,1% mikrobiote. Na slici R9 su predstavljeni najzastupljeniji rodovi bakterija pronađeni sekvenciranjem mikrobiote.

Eksperimentalnom proverom statusa infekcije sigma virusom nije potvrđeno prisustvo ovog virusa, ni u jednoj liniji ove vrste poreklom iz Srbije, kako kod jedinki 80 testiranih linija nisu zapaženi efekti paralize ni smrti posle kratkotrajnog izlaganja CO₂ gasu.



Slika R9. Najzastupljeniji rodovi zabeleženi sekvenciranjem mikrobiote u dva združena uzorka *D. obscura*. Objavljeno u (Erić i sar. 2022a), modifikovano.

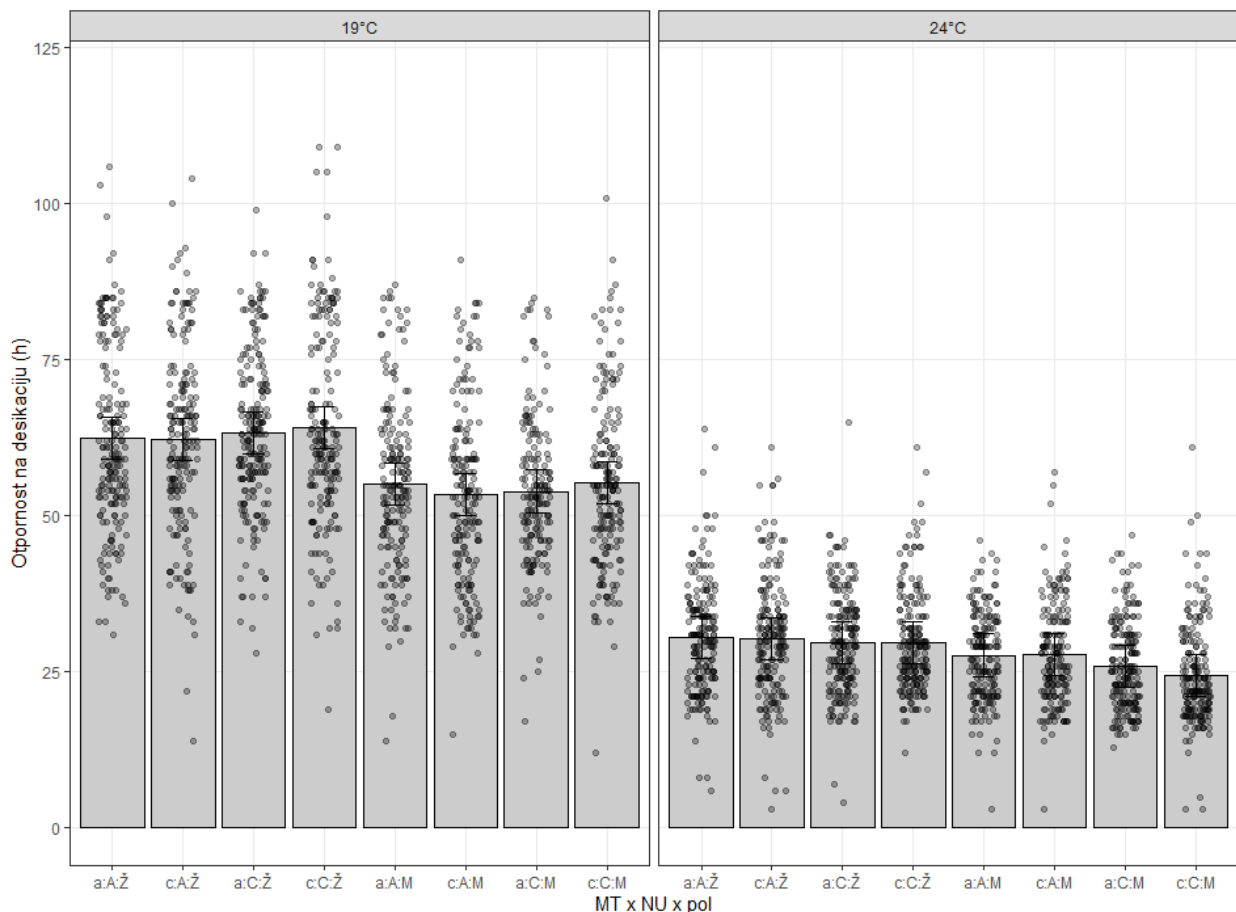
4.2. Rezultati eksperimenata komponenti životne istorije

4.2.1. Rezultati eksperimenata otpornosti na desikaciju

4.2.1.1. Otpornost na desikaciju kod *D. subobscura*

Kod *D. subobscura* u eksperimentima analize fitnes komponenti, postojalo je 11 replika poređenja mito-nukleusnih kombinacija genotipova I i II, iz čega je proisteklo 11 pojedinačnih modela kao i jedan ukupni gde je analiziran ceo skup podataka. Ukupni model je pored osnovnih faktora imao i dodatni takozvani nasumični (engl. *random*) efekat kvarteta po kom su merenja iz jednog kvarteta bila grupisana.

Srednje vrednosti vremena preživljavanja uslova desikacije jedinki vrste *D. subobscura* iz svih 11 eksperimentalnih kvarteta zajedno su predstavljene na slici R10, dok su srednje vrednosti pojedinačnih kvarteta predstavljene na slikama P1-11 u prilogu. Najuočljiviji podatak iz ovih grafika jeste razlika u preživljavanju između dve eksperimentalne temperature, gde se može uočiti da jedinke na nižoj temperaturi u proseku preživljavaju oko 70% duže nego jedinke na višoj eksperimentalnoj temperaturi.



Slika R10. Srednja vremena preživljavanja *D. subobscura* u satima za eksperiment desikacije za sve kombinacije genotipova i pola iz svih 11 kvarteta na dve eksperimentalne temperature. Malo slovo označava mtDNK haplotip (MT) gde je „a“ haplotip I, dok je „c“ haplotip II. Velika slova označavaju odgovarajuću jedarnu pozadinu (NU)), Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke predstavljaju vremena preživljavanja pojedinačnih jedinki. Predstavljani su intervali poverenja od 95%.

Takođe se može uočiti da su ženke preživljavale u proseku oko 6 sati (14%) duže ($p < 0,0001$). Gledajući ukupan skup podataka, može se uočiti blagi trend favorizovanja jedarne pozadine C na nižoj temperaturi i jedarne pozadine A na višoj temperaturi, što se može videti i u tabeli R5 gde je interakcija NU:T statistički značajna u ukupnom modelu. Kada je reč o mito-jedarnim kombinacijama ne mogu se uočiti značajne razlike, posmatrajući ceo skup podataka, dok su u različitim kvartetima favorizovane različite kombinacije genotipova. Eksperiment nije pokazao prednost određenog mitohondrijskog haplotipa u nekom od temperaturnih režima, što se vidi iz sličnih vremena preživljavanja haplotipova. Kada se posmatraju pojedinačni kvarteti, može se primetiti da se u nekim od njih kao bolje prilagođen na sušne uslove pokazao haplotip I (a) dok se u drugim kvartetima kao otporniji u ovim uslovima pokazao haplotip II (c). Ipak analiziranjem celog skupa podataka, ne može se izvesti validan zaključak, o tome koja haplogrupa ili genotip je bolje prilagođena na sušne uslove.

Rezultati ANOVA-e 11 kvartetnih modela za vremena preživljavanja desikacionog stresa kod *D. subobscura* predstavljeni su u tabeli R4.

Rezultati pokazuju da je temperatura najznačajniji faktor u određivanju dužine preživljavanja uslova suše. Četiri modela su morala biti stratifikovana po temperaturi zbog toga što njena *hazard* funkcija nije ispunjavala pretpostavku proporcionalnosti sa ostalim faktorima, dok se u ostalih 7 modela temperatura pokazala kao najuticajniji faktor, sa najvećom statističkom značajnošću. Pored temperature, pol se izdvojio kao drugi po uticajnosti faktor, pokazavši se statistički značajnim u 10 od 11 modela. Jedarna pozadina se pokazala kao statistički značajan prediktor preživljavanja uslova desikacije u 6 od 11 modela, dok je mitohondrijski haplotip bio značajan samo u 3.

Od interakcija prvog reda treba izdvojiti kombinaciju genotipa (MT:NU), koja je bila statistički značajna u 3 modela, dok se interakcija jedarne pozadine i pola (NU:pol) pokazala značajnom u 5 modela. Kombinacije temperature sa polom i jedarnom pozadinom (NU:T i pol:T) bile značajne u 2 modela. Ostale interakcije prvog reda bile su značajne samo u po jednom modelu (MT:pol i MT:T). Od interakcija drugog reda važno je napomenuti da su interakcije genotipa sa polom i temperaturom (MT:NU:T i MT:NU:pol) bile značajne u po tri kvartetna modela.

U ukupnom modelu u kome su analizirani svi kvarteti zajedno postojao je i random efekat pripadnosti kvartetu (engl. *frailty*). Ukupni model je morao biti stratifikovan po temperaturi, jer njena *hazard* funkcija nije bila proporcionalna ostalim. U odsustvu temperature najveći uticaj je imao pol, pa zatim interakcija NU:T i sama jedarna pozadina. U ukupnom modelu kao statistički značajne pokazale su se još i interakcije: NU:pol, pol:T i MT:NU:T. Rezultati ANOVA-e ukupnog modela vremena preživljavanja desikacionog stresa kod *D. subobscura* predstavljeni su u tabeli R5.

Tabela R4. Uticaj mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T), pola i njihovih interakcija na otpornost na desikaciju kod model vrste *D. subobscura*. Predstavljani su rezultati 11 kvartetnih modela (Q1-Q11). Loglik -Logaritmovana verovatnoća; Chisq – Hi kvadratna vrednost; df - stepeni slobode; strata – model je stratifikovan po toj promenljivoj; p vrednosti koje su značajne na $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

	Q1				Q2				Q3			
	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p
MT	-1148,19	4,8803	1	0,0272	-1159,8	0,5528	1	0,4572	-1189,46	0,0343	1	0,853
NU	-1143,51	9,3656	1	0,0022	-1149,2	21,3178	1	<0,0001	-1181,05	16,8154	1	<0,0001
pol	-1141,16	4,6976	1	0,0302	-1116,2	65,9859	1	<0,0001	-1178,67	4,7588	1	0,0291
T	-1012,25	257,8278	1	<0,0001	strata				-1015,66	326,0198	1	<0,0001
MT:NU	-1010,51	3,4829	1	0,062	-1114,3	3,7613	1	0,0524	-1004,6	22,1343	1	<0,0001
MT:pol	-1009,8	1,413	1	0,2346	-1113,7	1,1981	1	0,2737	-1003,45	2,2894	1	0,1303
NU:pol	-1008,93	1,7341	1	0,1879	-1104,1	19,1948	1	<0,0001	-1002,11	2,6767	1	0,1018
MT:T	-1003,17	11,5261	1	0,0007	-1103,5	1,2358	1	0,2663	-1001,5	1,2239	1	0,2686
NU:T	-1002,11	2,122	1	0,1452	-1102,1	2,8702	1	0,0902	-999,75	3,5015	1	0,0613
pol:T	-1000,6	3,0165	1	0,0824	-1101	2,1064	1	0,1467	-999,75	0,0082	1	0,9278
MT:NU:pol	-1000,58	0,0429	1	0,8358	-1098,4	5,2707	1	0,0217	-999,66	0,1791	1	0,6722
MT:NU:T	-998,17	4,8132	1	0,0282	-1098,4	0,0042	1	0,9483	-997,46	4,3989	1	0,036
MT:pol:T	-997,7	0,935	1	0,3336	-1098,3	0,1394	1	0,7088	-997,09	0,7316	1	0,3924
NU:pol:T	-997,69	0,0202	1	0,8869	-1098,1	0,3369	1	0,5616	-996,34	1,4953	1	0,2214
MT:NU:pol:T	-996,96	1,4783	1	0,224	-1095,4	5,4394	1	0,0197	-995,59	1,5061	1	0,2197
	Q4				Q5				Q6			
	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p
MT	-1313,2	10,3326	1	0,0013	-1250,9	0,0565	1	0,8121	-1138,19	2,7669	1	0,0962
NU	-1310,5	5,4985	1	0,019	-1250,1	1,5183	1	0,2179	-1137,86	0,656	1	0,418
pol	-1305,9	9,1364	1	0,0025	-1247,9	4,4387	1	0,0351	-1132,59	10,5357	1	0,0012
T	-1134,3	343,3287	1	<0,0001	-1088,5	318,7242	1	<0,0001	-998,94	267,3056	1	<0,0001
MT:NU	-1132,9	2,7134	1	0,0995	-1087,3	2,4265	1	0,1193	-996,17	5,5454	1	0,0185
MT:pol	-1132,3	1,2293	1	0,2675	-1084,1	6,3354	1	0,0118	-996,05	0,2371	1	0,6263
NU:pol	-1131,8	0,9489	1	0,33	-1073,2	21,8891	1	<0,0001	-995,81	0,4653	1	0,4951
MT:T	-1131,4	0,8734	1	0,35	-1071,9	2,5354	1	0,1113	-995,43	0,7653	1	0,3817
NU:T	-1131,2	0,3108	1	0,5772	-1070,2	3,5676	1	0,0589	-995,4	0,0663	1	0,7968
pol:T	-1131,1	0,1961	1	0,6579	-1067,7	4,9505	1	0,0261	-994,42	1,9549	1	0,1621
MT:NU:pol	-1131,1	0,0787	1	0,7791	-1065,6	4,169	1	0,0412	-994,13	0,5917	1	0,4418
MT:NU:T	-1130,7	0,7019	1	0,4022	-1064,4	2,4008	1	0,1213	-993,76	0,7364	1	0,3908
MT:pol:T	-1129,8	1,8217	1	0,1771	-1061,9	4,963	1	0,0259	-992,88	1,7559	1	0,1851
NU:pol:T	-1129,5	0,5949	1	0,4405	-1061	1,7083	1	0,1912	-991,8	2,1631	1	0,1414
MT:NU:pol:T	-1127,8	3,3377	1	0,0677	-1061	0,0487	1	0,8253	-991,41	0,7705	1	0,3801
	Q7				Q8				Q9			
	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p
MT	-1200	0,2367	1	0,6266	-1095,8	19,6151	1	<0,0001	-1329,5	0,309	1	0,5783
NU	-1199,7	0,5925	1	0,4414	-1095,8	0,0247	1	0,8752	-1329,4	0,3315	1	0,5648
pol	-1164,6	70,1205	1	<0,0001	-1086,6	18,4691	1	<0,0001	-1329,4	0,0216	1	0,883
T	strata				strata				-1170,9	316,9546	1	<0,0001
MT:NU	-1164,6	0,0743	1	0,7852	-1086,6	0,0022	1	0,9627	-1170,5	0,7292	1	0,3931
MT:pol	-1164,5	0,0846	1	0,7711	-1086,5	0,2363	1	0,6269	-1170,3	0,3765	1	0,5395
NU:pol	-1161,2	6,7146	1	0,0096	-1084,3	4,2372	1	0,0396	-1166,8	6,9931	1	0,0082
MT:T	-1161,2	0,0038	1	0,9509	-1083,4	1,9403	1	0,1636	-1166,8	0,017	1	0,8961
NU:T	-1160,3	1,6376	1	0,2007	-1083,4	0,011	1	0,9165	-1165,2	3,3354	1	0,0678
pol:T	-1160,1	0,4188	1	0,5175	-1082,2	2,3557	1	0,1248	-1162,3	5,7705	1	0,0163
MT:NU:pol	-1160,1	0,0349	1	0,8518	-1082,2	0,014	1	0,9059	-1159,5	5,6216	1	0,0177
MT:NU:T	-1155	10,3328	1	0,0013	-1081,8	0,6822	1	0,4088	-1158,9	1,0722	1	0,3004
MT:pol:T	-1154,9	0,0795	1	0,778	-1081,7	0,3684	1	0,5438	-1155,5	6,9442	1	0,0084
NU:pol:T	-1153,2	3,3669	1	0,0665	-1081,6	0,0517	1	0,8201	-1155,3	0,2481	1	0,6184
MT:NU:pol:T	-1152,5	1,451	1	0,2284	-1081,6	0,0104	1	0,9187	-1155,3	0,0087	1	0,9257

Tabela R4 nastavak.

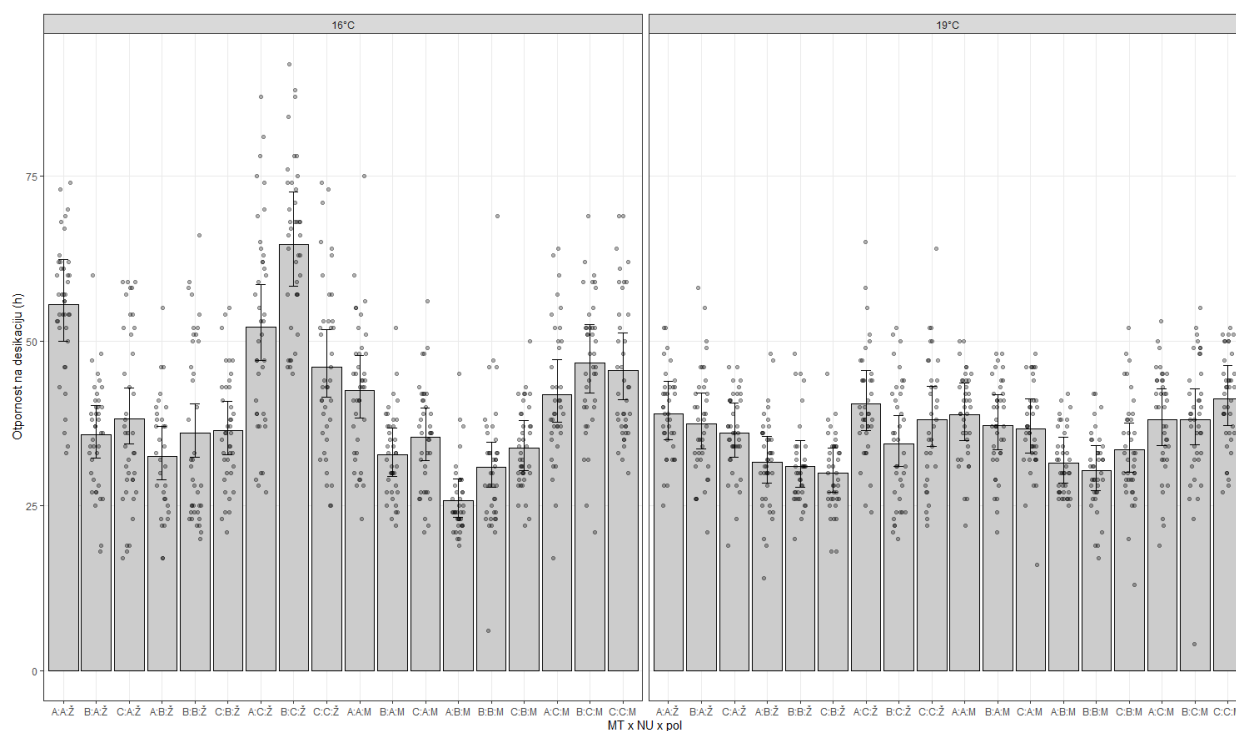
	Q10				Q11			
	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p
MT	-1284,4	0,2943	1	0,5875	-1209,8	0,7311	1	0,3925
NU	-1279,7	9,5585	1	0,002	-1200,5	18,5688	1	<0,0001
pol	-1263,2	32,9892	1	<0,0001	-1178,2	44,498	1	<0,0001
T	-1142,1	242,0688	1	<0,0001	strata			
MT:NU	-1134,8	14,6483	1	0,0001	-1177,2	2,0752	1	0,1497
MT:pol	-1134,7	0,1403	1	0,7079	-1177	0,3678	1	0,5442
NU:pol	-1134,3	0,9127	1	0,3394	-1176,6	0,8225	1	0,3644
MT:T	-1134	0,6498	1	0,4202	-1176,2	0,9272	1	0,3356
NU:T	-1128,9	10,1564	1	0,0014	-1163,4	25,5359	1	<0,0001
pol:T	-1127,2	3,355	1	0,067	-1162,5	1,7882	1	0,1811
MT:NU:pol	-1126,3	1,7725	1	0,1831	-1161,4	2,2491	1	0,1337
MT:NU:T	-1125,8	1,0604	1	0,3031	-1161,4	0,0024	1	0,9606
MT:pol:T	-1125,7	0,1736	1	0,6769	-1161,3	0,1994	1	0,6552
NU:pol:T	-1125,1	1,1011	1	0,294	-1158,9	4,6568	1	0,0309
MT:NU:pol:T	-1124,8	0,783	1	0,3762	-1158,6	0,6739	1	0,4117

Tabela R5. Uticaj mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na otpornost na desikaciju kod model vrste *D. subobscura*. Predstavljani su rezultati ukupnog modela koji je obuhvatao ceo skup podataka. df - stepeni slobode; F.ratio - F statistika; Chisq – Hi kvadratna vrednost; strata – model je stratifikovan po toj promenljivoj; p vrednosti koje su značajne na $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

	Ukupni model				
	df1	df2	F.ratio	Chisq	p
MT	1	Inf	0,123	0,123	0,7261
NU	1	Inf	15	15	0,0001
pol	1	Inf	228	228	<0,0001
T	strata				
MT:NU	1	Inf	0,011	0,011	0,9148
MT:pol	1	Inf	0,444	0,444	0,5051
MT:T	1	Inf	1	1	0,2261
NU:pol	1	Inf	5	5	0,0214
NU:T	1	Inf	18	18	<0,0001
pol:T	1	Inf	7	7	0,0086
MT:NU:pol	1	Inf	0,011	0,011	0,9149
MT:NU:T	1	Inf	7	7	0,0075
MT:pol:T	1	Inf	0,108	0,108	0,742
NU:pol:T	1	Inf	0,789	0,789	0,3744
MT:NU:pol:T	1	Inf	2	2	0,188

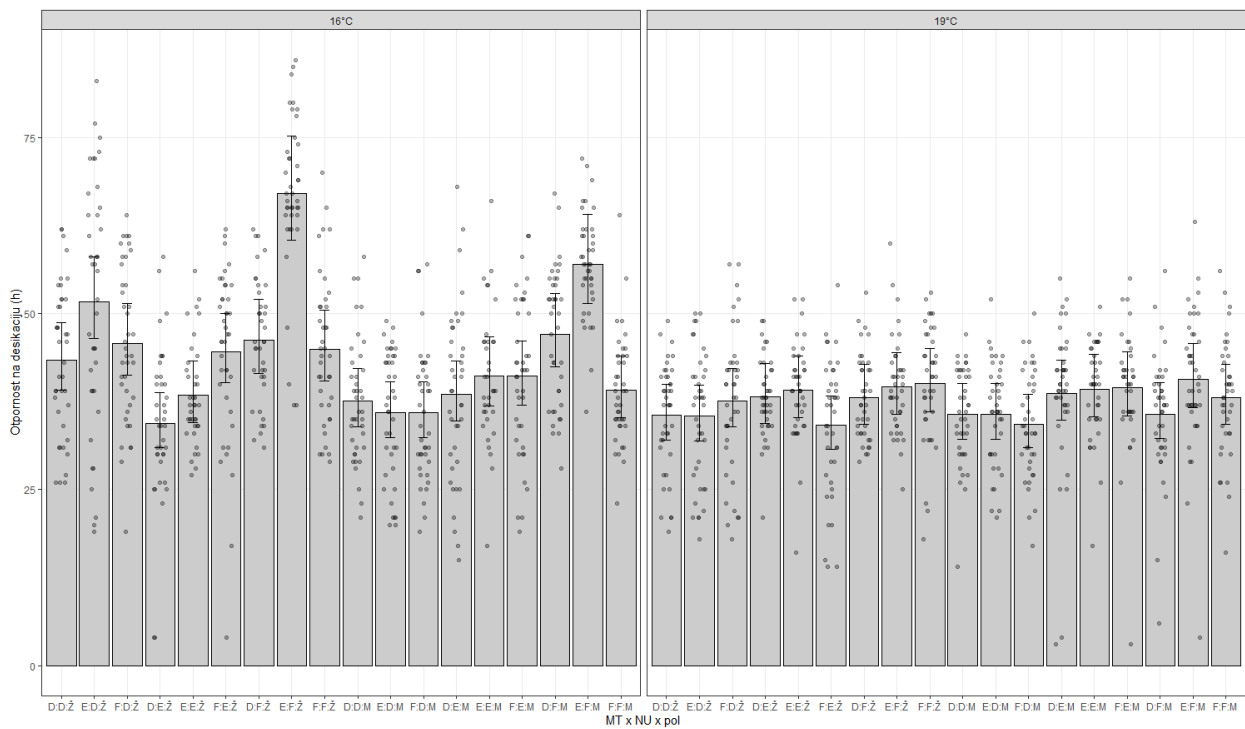
4.2.1.2. Otpornost na desikaciju kod *D. obscura*

Svaki od četiri eksperimentalna bloka, imao je tri poređenja kombinacija haplotipova (parovna poređenja), kao i po jedan ukupni model po bloku, koji je obuhvatao sva tri haplotipa. Srednja vremena (sa intervalima poverenja) preživljavanja uslova desikacije svih grupa iz četiri EB predstavljena su na slikama R11-R14. Rezultati ANOVA-e Cox modela za parovna i blokovska poređenja u četiri EB su dati u tabelama R6-R9.



Slika R11. Srednja vremena preživljavanja *D. obscura* u satima za eksperiment desikacije za sve kombinacije genotipova i pola iz EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake A, B i C označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke predstavljaju vremena preživljavanja pojedinačnih jednika. Predstavljene su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

U prvom bloku MT je značajno uticala na preživljavanje u uslovima desikacije u dva parovna poređenja, dok u trećem paru nije, kao i ukupnom modelu gde je p vrednost bila jako blizu granične 0,05 ($p=0,05684$). U drugom eksperimentalnom bloku MT bila je značajna u dva parovna poređenja kao i ukupnom modelu. U EB III samo kod jednog parovnog poređenja MT je bila značajna, dok je u ukupnom modelu ta vrednost bila blizu granice statističke značajnosti ($p=0,0609$). U četvrtom EB se MT pokazala kao značajna za dužinu preživljavanja u uslovima suše u jednom parovnom poređenju kao i ukupnom modelu koji je uključivao sva tri haplotipa iz četvrtog bloka. Zbirno gledano, MT je u parovnim poređenjima bila značajna u 6 od 12 modela, dok je u ukupnim modelima statistički značajno uticala na dužinu preživljavanja sušnih uslova u 2 od 4 modela.



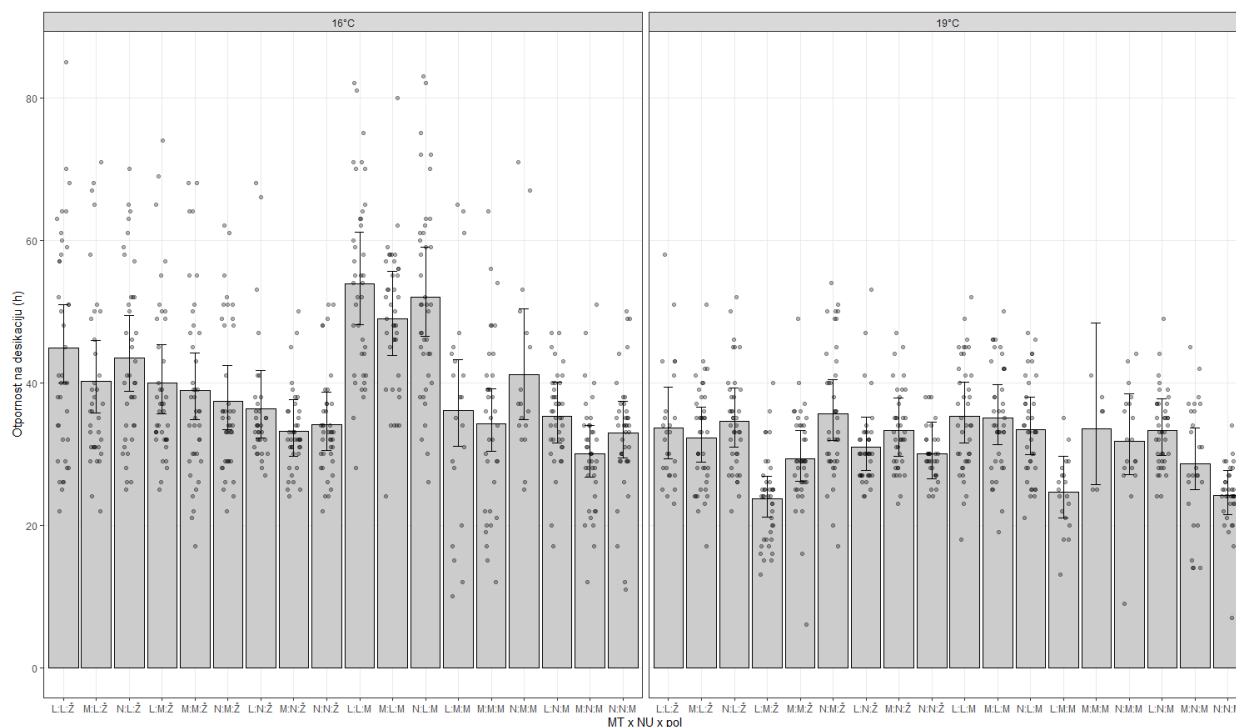
Slika R12. Srednja vremena preživljavanja *D. obscura* u satima za eksperiment desikacije za sve kombinacije genotipova i pola iz EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake D, E i F označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke predstavljaju vremena preživljavanja pojedinačnih jedinki. Predstavljani su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

U EB I dva od tri parovna modela morala su biti stratifikovana po NU, kao i u ukupnom modelu, dok je u trećem parovnom poređenju NU visoko značajna. U EB II NU je značajna u dva parovna poređenja i ukupnom modelu. U EB III u sva tri parovna poređenja jedarna DNK je visokoznačajna, dok je ukupni model morao biti stratifikovan prema ovoj promenljivoj. Svi modeli EB IV su morali biti stratifikovani po NU sem jednog parovnog poređenja, gde ova promenljiva nije bila značajna. Ukupno jedarna pozadina se pokazala kao značajna u 5 od 7 parovnih poređenja, dok je ostalih 5 modela moralo biti stratifikovano po ovom faktoru. Kada je reč o ukupnim modelima, u tri EB je model bio stratifikovan po NU, dok je u preostalom EB uticaj NU na preživljavanje u uslovima desikacije bio statistički značajan sa veoma niskom p vrednošću ($p < 0,0001$).

Pol se pokazao kao veoma značajan faktor za preživljavanje u uslovima suše u većini modela. U prvom EB pol je bio značajan u sva tri parovna poređenja. U ostala tri eksperimentalna bloka pol je bio značajan u po jednom od tri parovna poređenja i uz to je u EB IV u jednom parovnom poređenju model bio stratifikovan po polu. Kada je reč o ukupnim modelima, u EB II ne možemo govoriti o neospornom značaju pola na preživljavanje, pošto je model stratifikovan po polu, dok je u EB I, EB III i EB IV pol bio najznačajniji faktor u ukupnim modelima. Zbirno, pol se pokazao značajnim u 6 od 11 parovnih modela, dok je dvanaesti model stratifikovan prema polu.

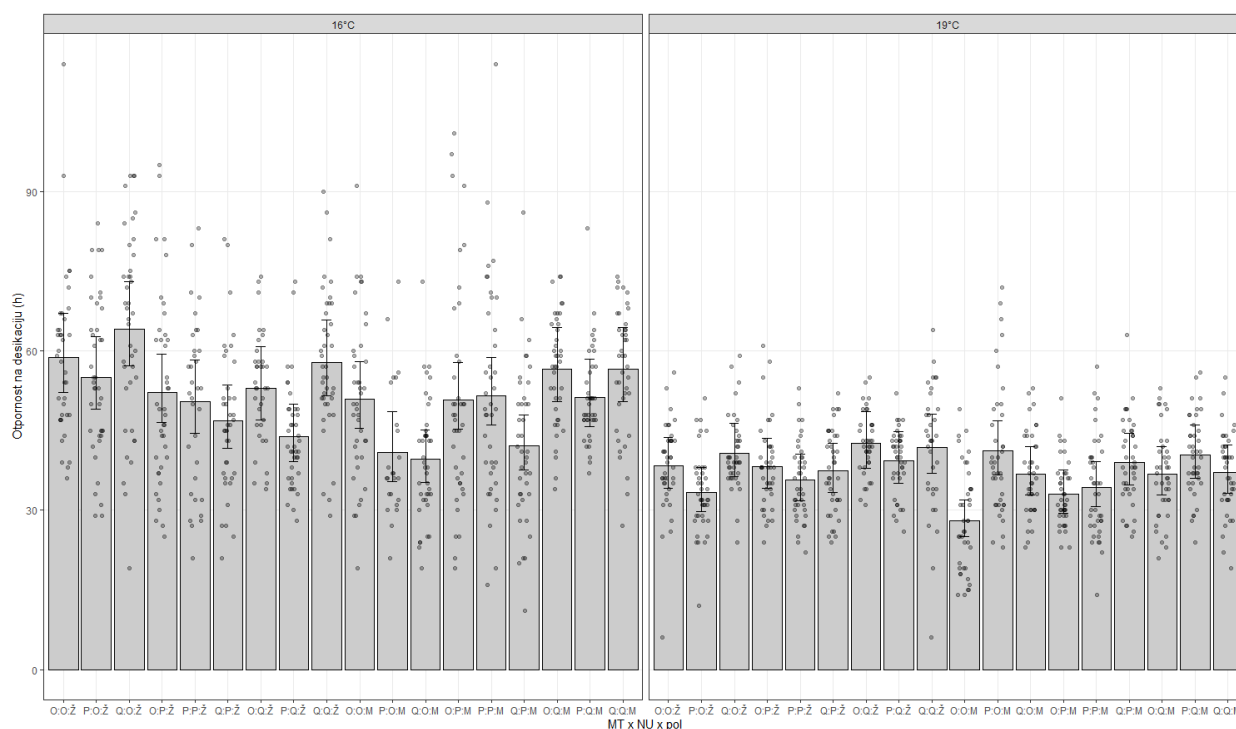
Temperatura je u ovom eksperimentu bila verovatno najznačajniji faktor u preživljavanju uslova suše u gotovo svim modelima širom svih eksperimentalnih blokova. Temperatura je bila značajna (7/7 parovnih modela), ili je model morao biti stratifikovan po njoj zbog prevelikog odskakanja njene *hazard* funkcije od ostalih promenljivih. Kada je reč o ukupnim modelima, samo ukupni model u EB III nije imao temperaturu kao statistički značajan faktor. U EB I i EB IV su modeli stratifikovani po temperaturi. Jedinke oba pola su značajno duže izdržavale desikacioni stres na nižoj

temperaturi (16°C) u svim eksperimentalnim blokovima. Takođe, uočeno je da su razlike između grupa veće na nižoj temperaturi.



Slika R13. Srednja vremena preživljavanja *D. obscura* u satima za eksperiment desikacije za sve kombinacije genotipova i pola iz EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake L, M i N označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke predstavljaju vremena preživljavanja pojedinačnih jedinki. Predstavljani su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

Kada su interakcije prvog reda u pitanju, kombinacije MT:NU i MT:T su se pokazale kao najuticajnije. Kombinacija jedarnog i mitohondrijskog haplotipa bila je značajna u 8 od 12 parovnih modela i sva četiri ukupna modela, dok je mitohondrijski haplotip u interakciji sa temperaturom statistički značajno uticao na dužinu preživljavanja u uslovima suše u 9 od 12 parovnih modela i tri ukupna modela. Kombinacija temperature i pola pokazala se statistički značajnom u 8 od 12 parovnih i 2 od 4 ukupna poređenja. Mitohondrijski haplotip u interakciji sa polom značajno je uticao na vreme preživljavanja uslova desikacije u 7 od 12 parovnih poređenja i 3 od 4 ukupna modela, dok je interakcija jedarnog haplotipa i pola bila značajna u polovini parovnih poređenja (6/12), kao i 2 od 3 ukupna poređenja u kojima model nije bio stratifikovan prema ova dva faktora. Kada govorimo o interakciji jedarnog genoma i temperature, dva parovna modela su morala biti stratifikovana po ova dva faktora, dok je u 5 od preostalih 10 ova interakcija bila značajna. U ukupnim modelima, takođe je jedan EB morao biti stratifikovan po ova dva faktora, dok je u 2 od preostala 3 ova interakcija bila značajna.



Slika R14. Srednja vremena preživljavanja *D. obscura* u satima za eksperiment desikacije za sve kombinacije genotipova i pola iz EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake O, P i Q označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke predstavljaju vremena preživljavanja pojedinačnih jedinki. Predstavljani su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

Interakcije drugog reda pokazale su manji procenat značajnosti u eksperimentalnim modelima. Najviše se izdvaja kombinacija MT:NU:T koja se pokazala značajnom u predviđanju dužine preživljavanja uslova suše u 8 od 12 parovnih modela i samo u 1 od 4 ukupna modela. Kombinacija genotipa i pola (MT:NU:pol) bila je značajna u samo 2 parovna poređenja, dok, zanimljivo, ukupni modeli u sva četiri EB pokazuju statistički značajan uticaj na preživljavanje suše. Interakcija MT:T:pol bila je značajna u 4 od 12 parovnih poređenja i 3 od 4 ukupna modela. Kombinacija NU:T:pol bila je značajna u 5 od 12 parovnih poređenja i 2 od 4 ukupna modela.

Interakcija trećeg stepena tj. kombinacija sva četiri faktora, značajno je uticala na dužinu preživljavanja uslova suše u 5 od 12 parovnih poređenja i tri od 4 ukupna modela.

Tabela R6. Efekat mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na otpornost na desikaciju EB I kod *D. obscura*. Loglik -Logaritmovana verovatnoća; Chisq – Hi kvadratna vrednost; df - stepeni slobode; Strata – model je stratifikovan po toj promenljivoj; Vrednosti koje su značajne na $p < 0,05$ date su podebljane. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

EB I	AB				AC				BC				ABC				
	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	P	loglik	Chisq	df	p	
MT	-2531,4	9,240	1	0,0024	-2966,2	13,56	1	0,0002	-2994,8	2,284	1	0,1307	-6307,2	5,74	2	0,0568	
NU					strata	-2955,7	21,16	1	<0,0001	strata			strata				
pol	-2521,6	19,570	1	<0,0001	-2949,9	11,54	1	0,0007	-2989,2	11,348	1	0,0008	-6294,2	26,03	1	<0,0001	
T					strata				-2952,2	73,989	1	<0,0001	strata				
MT:NU	-2506,3	30,534	1	<0,0001	-2941,9	16,07	1	<0,0001	-2949,7	4,846	1	0,0277	-6264,9	58,51	4	<0,0001	
MT:pol	-2503,6	1,352	1	0,245	-2936,6	10,55	1	0,0012	-2943,6	12,341	1	0,0004	-6264	1,79	2	0,4084	
NU:pol	-2503,5	0,104	1	0,7473	-2936,6	0,00	1	0,951	-2942,6	1,997	1	0,1577	strata				
MT:T	-2504,2	4,209	1	0,0402	-2934	5,24	1	0,0221	-2938,1	8,856	1	0,0029	-6255,5	17,14	2	0,0002	
NU:T					strata	-2934	0,01	1	0,9371	-2930,1	16,104	1	<0,0001	-6254,9	1,09	2	0,5789
T:pol	-2498,3	10,356	1	0,0013	-2927,2	13,43	1	0,0003	-2927,2	13,43	1	<0,0001	-6254,9	43,86	1	<0,0001	
MT:NU:pol	-2477,9	0,056	1	0,8122	-2926,4	1,61	1	0,2044	-2916,3	0,004	1	0,9498	-6202,2	61,54	4	<0,0001	
MT:NU:T	-2477,9	40,789	1	<0,0001	-2925,7	1,43	1	0,2311	-2913,7	5,255	1	0,0219	-6200,9	2,60	4	0,6269	
MT:T:pol	-2476,7	2,378	1	0,123	-2925,4	0,59	1	0,4414	-2912,2	3,115	1	0,0776	-6200,6	0,56	2	0,754	
NU:T:pol	-2476,6	0,151	1	0,6972	-2925,1	0,62	1	0,4307	-2911,7	0,856	1	0,3548	-6200,1	0,99	2	0,611	
MT:NU:T:pol	-2476,6	0,163	1	0,6866	-2925	0,16	1	0,6925	-2907,9	7,542	1	0,0060	-6194,1	12,01	4	0,0173	

Tabela R7. Efekat mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na otpornost na desikaciju EB II kod *D. obscura*. Loglik -Logaritmovana verovatnoća; Chisq – Hi kvadratna vrednost; df - stepeni slobode; strata – model je stratifikovan po toj promenljivoj; vrednosti koje su značajne na $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

EB II	DE				DF				EF				DEF			
	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	P	loglik	Chisq	df	p
MT	-2993,6	4,84	1	0,0278	-2601,3	0,61	1	0,4359	-2964,5	28,42	1	<0,0001	-7897,5	53,47	2	<0,0001
NU	-2993,6	0,00	1	0,9457	-3031,0	9,5888	1	0,002	-2945,6	37,76	1	<0,0001	-7869,6	55,87	2	<0,0001
pol	-2992	3,24	1	0,072	-2591,6	19,53	1	<0,0001	-2944,5	2,16	1	0,1415	strata			
T					strata								-7860,8	17,61	1	<0,0001
MT:NU	-2991,1	1,74	1	0,1873	-2591	1,27	1	0,2604	-2926,3	36,45	1	<0,0001	-7840,7	40,11	4	<0,0001
MT:pol	-2988,3	5,54	1	0,0186	-2587,5	7,00	1	0,0082	-2926,3	0,01	1	0,9047	-7832,5	16,34	2	0,0003
NU:pol	-2973,7	29,23	1	<0,0001	-2584,9	5,02	1	0,0251	-2919,9	12,83	1	0,0003	-7818,8	27,50	2	<0,0001
MT:T	-2973,4	0,61	1	0,4335	-2580,8	8,23	1	0,0041	-2916,2	7,44	1	0,0064	-7812,6	12,39	2	0,002
NU:T	-2963,6	19,60	1	<0,0001	-3009,0	0,2531	1	0,6149	-2910	12,40	1	0,0004	-7790	45,24	2	<0,0001
T:pol	-2961,2	4,74	1	0,0295	-2578,8	3,96	1	0,0467	-2904,3	11,41	1	0,0007	-7781,2	17,49	1	<0,0001
MT:NU:pol	-2961	0,45	1	0,5011	-2578,8	0,02	1	0,8776	-2904,3	0,01	1	0,92	-7762,1	38,16	4	<0,0001
MT:NU:T	-2961	0,06	1	0,8143	-2577,1	3,57	1	0,0587	-2882,4	43,78	1	<0,0001	-7760,9	2,44	4	0,6547
MT:T:pol	-2960,6	0,84	1	0,36	-2576,6	0,98	1	0,3218	-2882,1	0,53	1	0,4671	-7755,2	11,46	2	0,0032
NU:T:pol	-2954,1	12,92	1	0,0003	-2575,9	1,35	1	0,2456	-2878,8	6,58	1	0,0103	-7749,9	10,63	2	0,0049
MT:NU:T:pol	-2952,2	3,76	1	0,0525	-2574,6	2,65	1	0,1033	-2872,9	11,73	1	0,0006	-7738,2	23,39	4	0,0001

Tabela R8. Efekat mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na otpornost na desikaciju EB III kod *D. obscura*. Loglik -Logaritmovana verovatnoća; Chisq – Hi kvadratna vrednost; df - stepeni slobode; strata – model je stratifikovan po toj promenljivoj; vrednosti koje su značajne na $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

EB III	LM				LN				MN				LMN			
	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	P	loglik	Chisq	df	p
MT	-2873,1	2,08	1	0,1491	-3278,7	4,07	1	0,0436	-2798,6	0,09	1	0,7642	-6391,6	5,60	2	0,0609
NU	-2853,4	39,27	1	<0,0001	-3219	119,33	1	<0,0001	-2780,6	36,17	1	<0,0001	strata			
pol	-2851,2	4,48	1	0,0343	-3218,3	1,44	1	0,2304	-2779,1	2,94	1	0,0862	-6295,7	191,83	1	<0,0001
T	-2769	164,44	1	<0,0001	-3149,4	137,81	1	<0,0001	-2761,2	35,71	1	<0,0001	-6295,6	0,15	1	0,7021
MT:NU	-2764,4	9,08	1	0,0026	-3144,6	9,59	1	0,0019	-2756,8	8,74	1	0,0031	-6271,9	47,28	4	<0,0001
MT:pol	-2764,4	0,03	1	0,8693	-3142,3	4,55	1	0,0329	-2756,8	0,06	1	0,8043	-6263,5	16,84	2	0,0002
NU:pol	-2761,3	6,26	1	0,0124	-3137,7	9,26	1	0,0023	-2755	3,65	1	0,0562	-6246,6	33,81	2	<0,0001
MT:T	-2754,5	13,65	1	0,0002	-3134,7	6,01	1	0,0142	-2752	5,98	1	0,0145	-6245,2	2,87	2	0,2381
NU:T	-2752,1	4,69	1	0,0303	-3131,8	5,67	1	0,0172	-2751,9	0,23	1	0,6314	-6237,3	15,86	2	0,0004
T:pol	-2752,1	0,03	1	0,8599	-3129,3	5,11	1	0,0238	-2750,3	3,26	1	0,0711	-6235,9	2,68	1	0,1015
MT:NU:pol	-2751,9	0,45	1	0,5046	-3127,3	3,92	1	0,0478	-2750,1	0,42	1	0,5156	-6209,7	52,40	4	<0,0001
MT:NU:T	-2749,1	5,48	1	0,0192	-3123,6	7,48	1	0,0063	-2737,8	24,51	1	<0,0001	-6205,7	7,96	4	0,0931
MT:T:pol	-2748,8	0,69	1	0,4065	-3117	13,18	1	0,0003	-2731,5	12,62	1	0,0004	-6196,4	18,62	2	<0,0001
NU:T:pol	-2747,1	3,43	1	0,064	-3116,9	0,17	1	0,679	-2730,3	2,45	1	0,1179	-6195,3	2,18	2	0,3361
MT:NU:T:pol	-2746,7	0,72	1	0,3955	-3114,6	4,54	1	0,0332	-2729,8	0,98	1	0,3216	-6192,6	5,49	4	0,2406

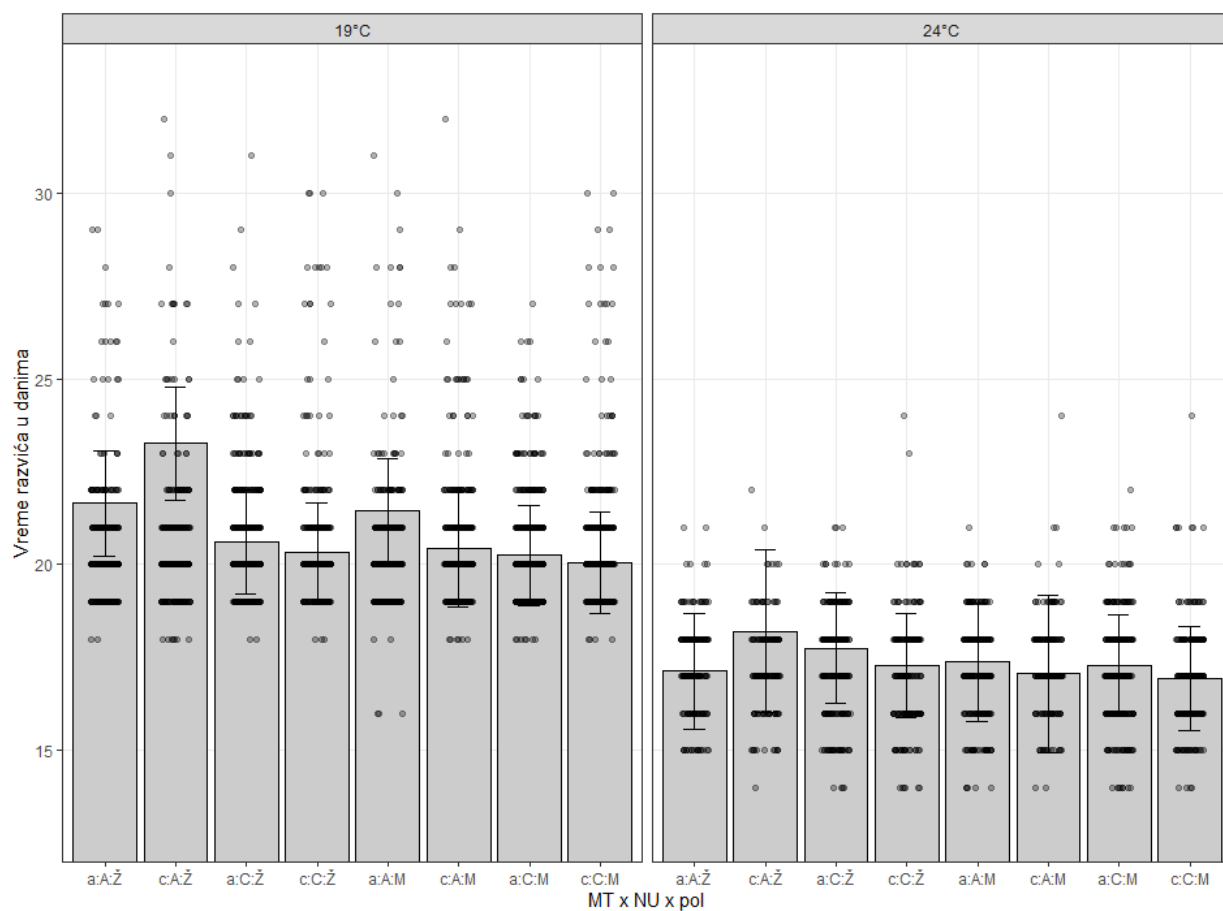
Tabela R9. Efekat mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na otpornost na desikaciju EB IV kod *D. obscura*. Loglik -Logaritmovana verovatnoća; Chisq – Hi kvadratna vrednost; df - stepeni slobode; strata – model je stratifikovan po toj promenljivoj; vrednosti koje su značajne na $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

EB IV	OP				OQ				PQ				OPQ			
	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p	loglik	Chisq	df	p
MT	-2915,2	0,86	1	0,3542	-2983,5	2,02	1	0,1554	-2976,2	5,10	1	0,024	-6261,5	10,45	2	0,0054
NU				0,8863				strata								
pol				strata				< 0,0001				0,7931				< 0,0001
T	-2810,4	209,51	1	< 0,0001	-2824,3	296,56	1	< 0,0001	-2888,9	174,40	1	< 0,0001				strata
MT:NU	-2809,9	0,99	1	0,3208	-2824,3	0,00	1	0,9692	-2882,8	12,31	1	0,0004	-6042,6	16,07	4	0,0029
MT:pol	-2801,8	16,30	1	< 0,0001	-2822,7	3,21	1	0,0731	-2879,1	7,36	1	0,0067	-6034,5	16,05	2	0,0003
NU:pol	-2801,8	0,01	1	0,9366	-2818,3	8,78	1	0,003	-2879,1	0,07	1	0,798	-6032,6	3,96	2	0,1383
MT:T	-2800,4	2,72	1	0,0994	-2816,2	4,26	1	0,039	-2879	0,06	1	0,8001	-6017,3	30,56	2	< 0,0001
NU:T	-2800,4	0,01	1	0,9103	-2815	2,31	1	0,1289	-2878,2	1,75	1	0,186				strata
T:pol	-2797,4	5,96	1	0,0146	-2814,6	0,80	1	0,3698	-2878	0,35	1	0,5549	-6015,4	3,78	1	0,0519
MT:NU:pol	-2796,4	2,03	1	0,154	-2814,6	0,07	1	0,7929	-2874,8	6,38	1	0,0115	-6005,6	19,63	4	0,0006
MT:NU:T	-2795,5	1,87	1	0,1716	-2810,6	8,00	1	0,0047	-2864,6	20,40	1	< 0,0001	-5998,3	14,43	4	0,006
MT:T:pol	-2788,6	13,76	1	0,0002	-2805,3	10,55	1	0,0012	-2864,6	0,06	1	0,8116	-5990,1	16,49	2	0,0003
NU:T:pol	-2785,2	6,81	1	0,0091	-2798,7	13,27	1	0,0003	-2862,5	4,16	1	0,0413	-5969,5	41,23	2	< 0,0001
MT:NU:T:pol	-2781,5	7,34	1	0,0067	-2794,8	7,64	1	0,0057	-2861,4	2,21	1	0,1367	-5962,8	13,45	4	0,0093

4.2.2. Dužina razvića

4.2.2.1. Dužina razvića kod *D. subobscura*

Kada je dužina razvića kod model vrste *D. subobscura* u pitanju, jedan od kvarteta je bio nepotpun. U 7. kvartetu, genotip c^A , koji je inače imao najniži vijabilitet, a pogotovo na 24°C, u 8 replika izgledao se samo 1 mužjak, dok ženki nije bilo. Ovo je zadalo probleme u modelovanju ovog kvarteta, kako model nije imao nijedan podatak za dužinu razvića ženki c^A genotipa na 24°C. Zbog toga za ovu komponentu postoji samo 10 modela. Iako je 7. kvartet bio nepotpun, u ukupnom modelu su uključeni podaci iz svih 11 kvarteta pošto su u celokupnom setu podataka nijedna grupa nije bila bez unosa. Srednje vrednosti dužine razvića kombinacija genotipova na dve eksperimentalne temperature, za ukupni model, predstavljene su na slici R15, dok su srednje vrednosti dužine razvića pojedinačnih kvarteta predstavljene na slikama p12-22 u prilogu.



Slika R15. Srednja vremena dužine razvića *D. subobscura* u danima za sve kombinacije genotipova i pola kod svih 11 kvarteta zajedno na dve eksperimentalne temperature. Malo slovo označava mtDNK haplotip (MT) gde je „a“ haplotip I, dok je „c“ haplotip II. Velika slova označavaju odgovarajuću jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke predstavljaju vremena razvića pojedinačnih jedinki. Predstavljani su intervali poverenja od 95%.

Mušjaci i ženke model vrste *D. subobscura* su u ovom eksperimentu imali slične dužine razvića u svim kvartetima na obe temperature. Jedinke sa različitim kombinacijama mito-jedarnih haplotipova takođe imaju slične dužine razvića kada gledamo svih 11 kvarteta. Ne uočavaju se prednosti određenih kombinacija kod jednog ili drugog pola, kao ni na jednoj od eksperimentalnih temperatura. Najuočljivije razlike su između dve eksperimentalne temperature, gde se jasno uočava da se eksperimentalna grupa na 24°C razvijala u proseku 18% brže od one na 19°C. Rezultati ANOVA-e GLM modela za dužinu razvića za 10 eksperimentalnih kvarteta dati su u tabeli R10, dok su rezultati ANOVA-e za ukupni model prikazani u tabeli R11.

Tabela R10. Uticaj mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na dužinu razvića od jajeta do adulta kod model vrste *D. subobscura*. Predstavljene su rezultati deset Kvartetnih modela (Q1-Q6, Q8-Q11), pošto je sedmi kvartet bio nepotpun da bi se odradile statističke analize. SSq – Zbir kvadrata; F- F statistika; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

	Q1			Q2			Q3		
	SSq	F	p	SSq	F	p	SSq	F	p
MT	1,235	1,1037	0,2979	6,622	2,9884	0,0924	0,028	0,0241	0,8772
NU	9,265	8,2821	0,0056	0,005	0,0024	0,961	17,663	15,0661	0,0003
pol	0,043	0,038	0,8455	1,752	0,7906	0,3747	2,966	2,5301	0,1125
T	208,098	186,0237	<0,0001	310,692	140,2148	<0,0001	213,226	181,879	<0,0001
MT:NU	12,813	11,4539	0,0013	17,389	7,8477	0,0081	0,711	0,6069	0,4396
MT:pol	1,944	1,7376	0,1883	7,598	3,4291	0,0651	1,714	1,4623	0,2273
NU:pol	1,042	0,931	0,3352	0,103	0,0465	0,8294	2,684	2,2897	0,131
MT:T	0,172	0,1541	0,6961	1,897	0,8563	0,3609	0,011	0,0096	0,9224
NU:T	1,231	1,1005	0,2986	5,381	2,4282	0,1279	0,273	0,2329	0,6314
pol:T	3,621	3,2373	0,0728	4,372	1,9733	0,1612	0,053	0,0456	0,831
MT:NU:pol	1,613	1,4418	0,2306	2,026	0,9145	0,3397	0,588	0,5015	0,4792
MT:NU:T	0,895	0,8005	0,3747	0,168	0,076	0,7844	0,089	0,076	0,784
MT:pol:T	2,523	2,255	0,1341	8,309	3,7499	0,0538	2,084	1,7774	0,1832
NU:pol:T	0	0,0002	0,9884	0,016	0,0071	0,9327	0,954	0,8134	0,3676
MT:NU:pol:T	0	0,0002	0,9892	0,008	0,0034	0,9534	0,039	0,0329	0,8561
	Q4			Q5			Q6		
	SSq	F	p	SSq	F	p	SSq	F	p
MT	0,11	0,0477	0,828	0,867	0,6604	0,4199	3,14	2,8573	0,096
NU	3,38	1,4831	0,2293	1,696	1,2913	0,2606	6,681	6,079	0,0165
pol	0,13	0,0559	0,8132	1,494	1,1376	0,2866	7,915	7,2024	0,0077
T	527,24	231,0767	<0,0001	156,829	119,4216	<0,0001	277,359	252,3781	<0,0001
MT:NU	2,75	1,2037	0,2781	0	0,0002	0,989	4,848	4,4112	0,0398
MT:pol	1,69	0,7391	0,3904	0,053	0,0403	0,841	0,051	0,0466	0,8293
NU:pol	0,08	0,0341	0,8536	0	0,0002	0,9894	3,393	3,087	0,0799
MT:T	1	0,4367	0,5119	0,311	0,2368	0,6284	2,033	1,8499	0,1788
NU:T	0,21	0,0906	0,7648	1,212	0,9229	0,3409	0,871	0,7924	0,3769
pol:T	0,03	0,0119	0,913	3,512	2,674	0,1026	2,689	2,4472	0,1187
MT:NU:pol	2,15	0,9408	0,3326	0,551	0,4196	0,5174	0,006	0,0057	0,94
MT:NU:T	0,44	0,1941	0,6615	0,016	0,0125	0,9112	1,287	1,1707	0,2835
MT:pol:T	0,21	0,0924	0,7613	1,136	0,8652	0,3527	0,053	0,0484	0,826
NU:pol:T	0,56	0,2437	0,6218	0,099	0,0752	0,784	2,01	1,8285	0,1773
MT:NU:pol:T	5,17	2,2652	0,133	1,102	0,8394	0,36	0	0,0004	0,9842
	Q8			Q9			Q10		
	SSq	F	p	SSq	F	p	SSq	F	p
MT	3,95	2,2987	0,1349	0,071	0,0477	0,8278	0,62	0,3205	0,5739
NU	0,17	0,0967	0,757	2,923	1,9643	0,1654	18,57	9,55	0,0033
pol	3,07	1,7864	0,1819	5,157	3,466	0,0642	0,55	0,2841	0,5943
T	569,86	331,2609	<0,0001	195,683	131,5183	<0,0001	336,33	172,9925	<0,0001
MT:NU	1,99	1,1572	0,2865	0,004	0,0025	0,9606	1,48	0,7621	0,387
MT:pol	0,82	0,4778	0,4897	0,141	0,0951	0,7582	4,39	2,2576	0,1335
NU:pol	0,3	0,1746	0,6762	0,857	0,5759	0,4489	6,49	3,3361	0,0683
MT:T	0,03	0,0189	0,8912	0,958	0,6439	0,425	1,44	0,7383	0,3945
NU:T	1,67	0,9693	0,3289	6,017	4,0438	0,0481	0,64	0,3267	0,5703
pol:T	0	0	0,9975	0,051	0,0345	0,8529	0,02	0,01	0,9206
MT:NU:pol	1,28	0,7443	0,3887	0,199	0,1339	0,7148	3,44	1,7709	0,1838
MT:NU:T	1,16	0,6739	0,415	0,726	0,4882	0,487	1,04	0,5342	0,4684
MT:pol:T	0,41	0,2412	0,6235	0,044	0,0293	0,8642	0,09	0,0441	0,8337
NU:pol:T	2	1,1599	0,282	0,505	0,3396	0,5607	10,43	5,3643	0,0209
MT:NU:pol:T	0,59	0,3402	0,5599	0,089	0,0598	0,807	0	0	0,9969

Tabela R10 nastavak.

	Q11		
	SSq	F	p
MT	0,006	0,0036	0,9524
NU	7,098	4,1628	0,0472
pol	7,042	4,1302	0,0429
T	180,339	105,7654	<0,0001
MT:NU	0,007	0,0043	0,9482
MT:pol	3,223	1,8901	0,1701
NU:pol	5,99	3,5128	0,0393
MT:T	0,006	0,0033	0,9542
NU:T	5,367	3,1477	0,0826
pol:T	3,746	2,1972	0,1391
MT:NU:pol	3,06	1,7947	0,1812
MT:NU:T	0,051	0,0298	0,8636
MT:pol:T	1,68	0,9852	0,3216
NU:pol:T	5,397	3,1654	0,0761
MT:NU:pol:T	1,439	0,8439	0,3589

Tabela R11. Uticaj mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T), pola i njihovih interakcija na dužinu razvića od jajeta do adulta kod model vrste *D. subobscura*. Predstavljene su rezultati ukupnog modela koji je obuhvatao ceo skup podataka. SSq – Zbir kvadrata; F- F statistika; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

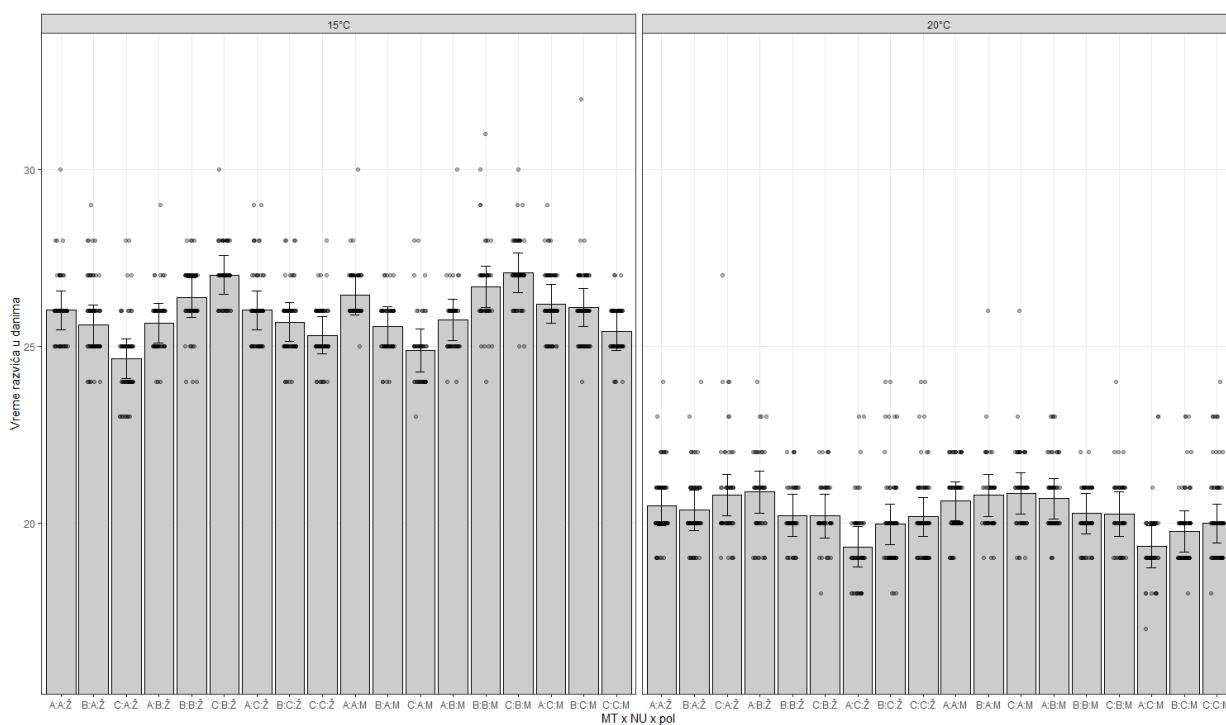
Ukupni model			
	SSq	F	p
MT	3,32	1,8655	0,1725
NU	1,63	0,9146	0,3393
pol	24,91	13,9832	0,0002
T	2945,97	1653,667	<0,0001
MT:NU	0,49	0,2726	0,6017
MT:pol	0,01	0,006	0,938
NU:pol	0	0,001	0,9745
MT:T	0,34	0,1897	0,6633
NU:T	0,32	0,1812	0,6705
pol:T	1,43	0,8015	0,3707
MT:NU:pol	2,06	1,1538	0,2828
MT:NU:T	0,3	0,1702	0,6801
MT:pol:T	0,33	0,1875	0,6651
NU:pol:T	0,03	0,0191	0,8901
MT:NU:pol:T	1,83	1,0245	0,3115

Rezultati pokazuju mali broj značajnosti širom analiziranih 10 kvarteta, pogotovo kada su interakcije u pitanju. Očekivano, temperatura se ispostavila kao najbitniji faktor u ovom eksperimentu, pošto se u svih 10 kvartetnih modela, kao i ukupnom pokazalo da temperatura statistički značajno utiče na dužinu razvića. Jedarna pozadina je drugi najuticajniji faktor u kvartetnim modelima, pokazavši se statistički značajnom u 5 od 10 modela. U ukupnom modelu jedini faktor koji je bio značajan pored temperature jeste pol. Ovo je pomalo iznenađujuć rezultat pošto je ovaj

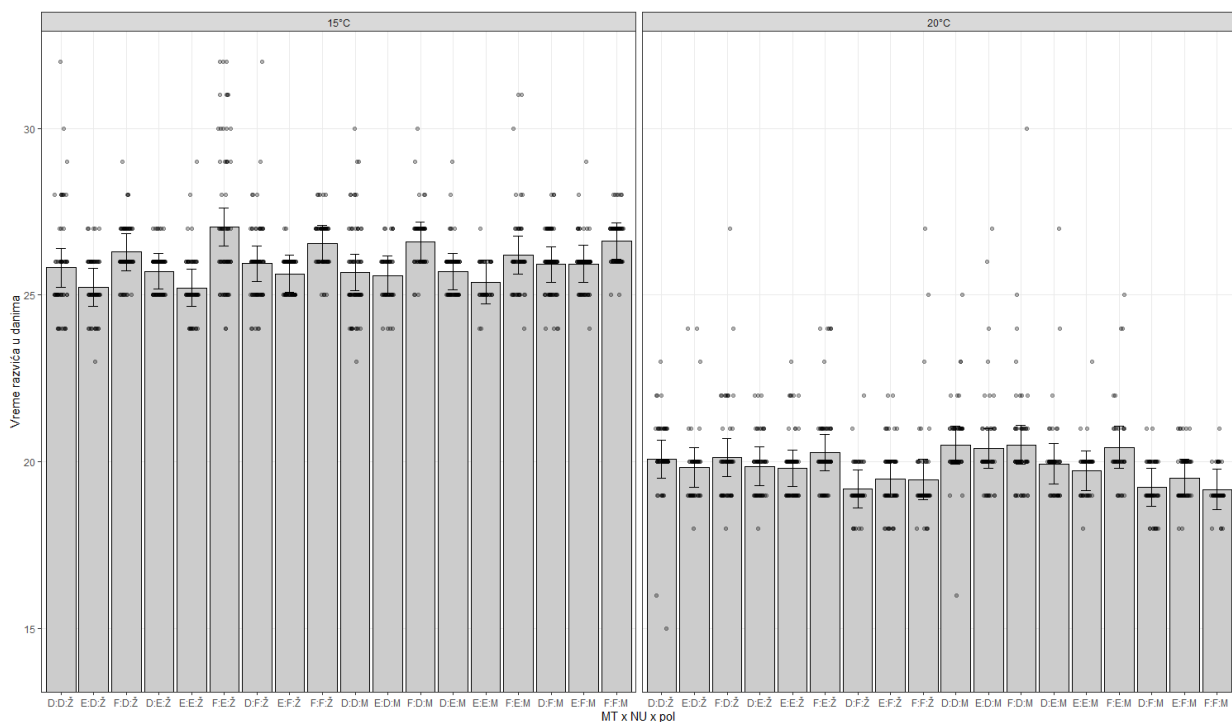
faktor bio statistički značajan u samo dva od deset kvartetnih modela. Mitohondrijski haplotip nije bio značajan ni u jednom modelu. Od interakcija vredno je spomenuti da se kombinacija genotipa (MT:NU) pokazala kao dobar prediktor dužine razvića u 3 modela u kojima je bila statistički značajna. Ženke su imale brže razviće kod nekih kombinacija mito-jedarnih genotipova, dok je kod drugih kombinacija, razviće mužjaka bilo brže. Ipak ovaj efekat je bio zavisian od kvarteta tako da u ukupnom modelu interakcija MT:NU:pol nije značajna. Od ostalih interakcija prvog reda samo su NU:T i NU:pol zabeležili po jednu statistički značajnu p vrednost u modelima. Od viših interakcija jednu značajnu p vrednost imala je NU:pol:T interakcija.

4.6.2.2. Dužina razvića kod *D. obscura*

Srednje vrednosti dužine razvića za četiri eksperimentalna bloka kod model vrste *D. obscura* prikazana su na slikama R16-R19. Očekivano, temperatura je imala najveći uticaj na dužinu razvića u svim grupama, gde su se sve grupe razvijale znatno brže na višoj temperaturi. Uopšteno govoreći, mužjaci i ženke su imali približne dužine razvića u svim EB. Određene kombinacije genotipova favorizovale su ženke, dok je kod drugih kombinacija genotipova, razviće mužjaka bilo brže.



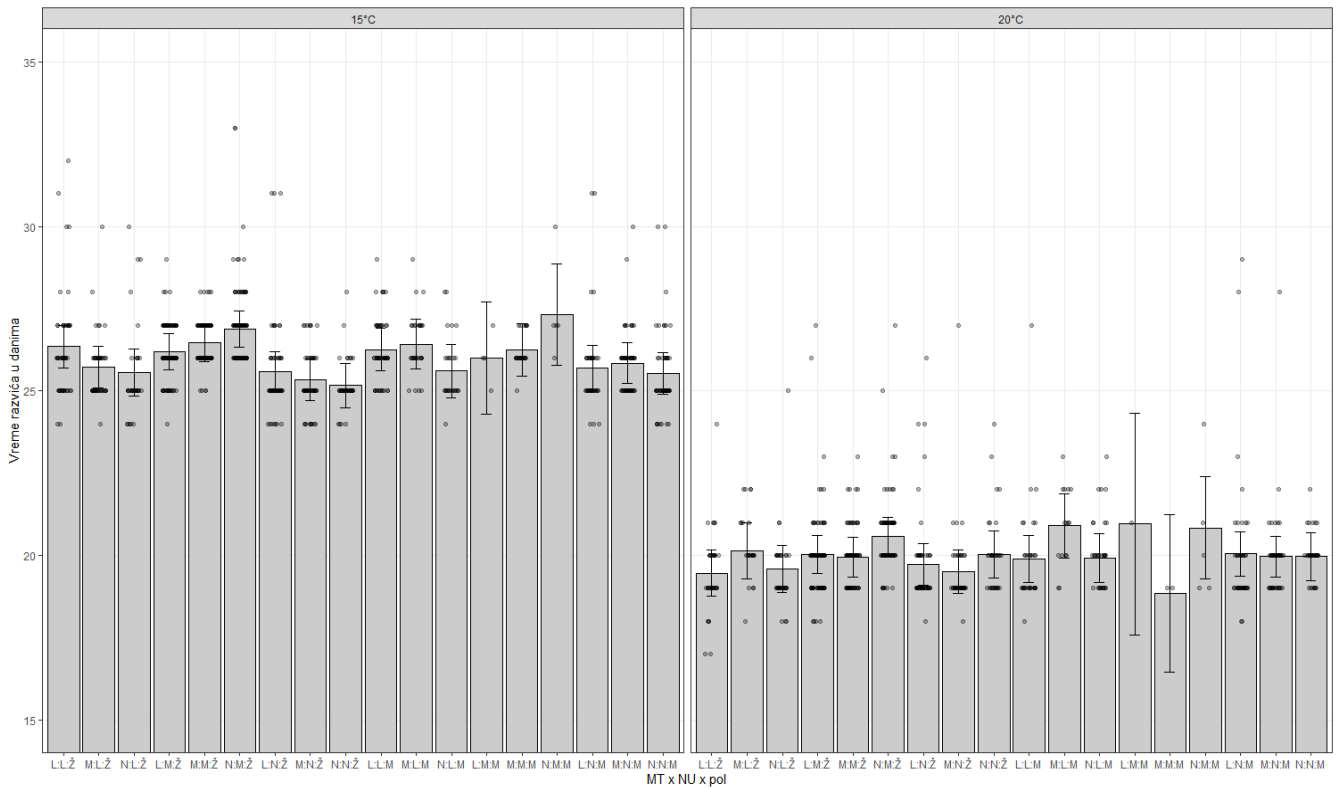
Slika R16. Srednja vremena dužine razvića *D. obscura* u danima za sve kombinacije genotipova i pola iz EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake A, B i C označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke odgovaraju dužinama razvića pojedinačnih jedinki. Predstavljene su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.



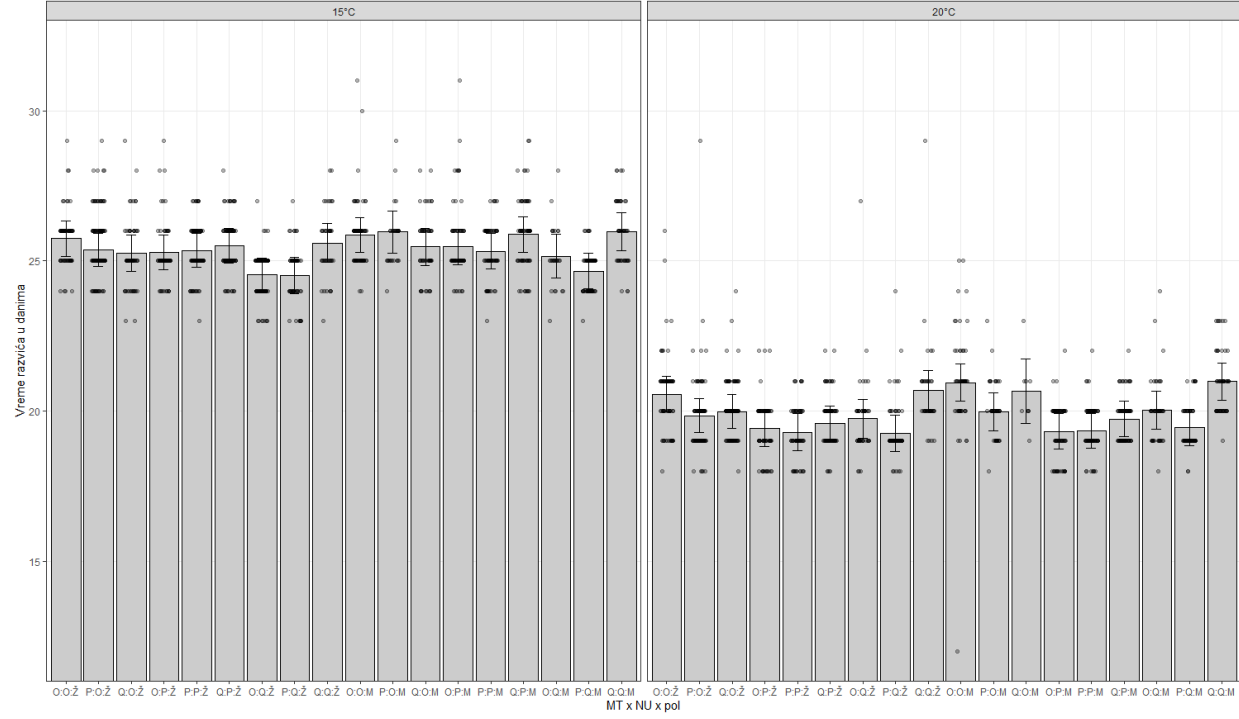
Slika R17. Srednja vremena dužine razvića *D. obscura* u danima za sve kombinacije genotipova i pola iz EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake D, E i F označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke odgovaraju dužinama razvića pojedinačnih jedinki. Predstavljene su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

ANOVA GLM modela za dužinu razvića za četiri eksperimentalna bloka je data u tabelama R12-R15. U tabelama su predstavljena kako parovna poređenja, tako i ukupni modeli koji obuhvataju sva tri mitohondrijska haplotipa i njihove kombinacije sa ostalim faktorima.

Temperatura je u svim modelima, kako parovnim tako i ukupnim širom svih EB, daleko najuticajniji faktor na dužinu razvića, sa statistički najznačajnijim vrednostima u svim modelima. Ostali faktori su imali dosta varijabilne rezultate u zavisnosti od EB, pa se dešavalo da isti faktor utiče na dužinu razvića sa visokom značajnošću u sva tri poređenja u jednom bloku, dok u drugom ni u jednom poređenju taj faktor ne utiče na dužinu razvića.



Slika R18. Srednja vremena dužine razvića *D. obscura* u danima za sve kombinacije genotipova i pola iz EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake L, M i N označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke odgovaraju dužinama razvića pojedinačnih jedinki. Predstavljene su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.



Slika R19. Srednja vremena dužine razvića *D. obscura* u danima za sve kombinacije genotipova i pola iz EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake O, P i Q označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke odgovaraju dužinama razvića pojedinačnih jedinki. Predstavljene su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

Mitohondrijski haplotip je statistički značajno uticao na dužinu razvića u 7 od 12 parovnih poređenja i 2 od 4 ukupna modela. Jedarna pozadina bila je značajna takođe u 7 od 12 parovnih modela, ali i u ukupnim modelima za sva četiri EB. Uticaj pola je bio dosta varijabilan između različitih EB. Generalno, pol se pokazao značajnim prediktorom dužine razvića u 6 od 12 parovnih modela i 3 ukupna modela. Od interakcija prvog reda, najbitnijim su se pokazale kombinacija genotipa MT:NU (6/12 parovnih modela i 3/4 ukupna) i NU:T (8/12 i 3/4). Sa druge strane, kombinacija mitohondrijskog haplotipa i temperature bila je značajna samo u 3 od 12 parovnih i 2 od 4 ukupna modela. Interakcije genotipa sa polom nisu se pokazale krucijalnim za ovu fitness komponentu. Interakcija MT:pol bila je značajna samo u 2 parovna poređenja i nijednom ukupnom modelu dok je NU:pol bila značajna samo u 1 od 12 parovnih i dva od 4 ukupna modela. Kombinacija temperature i pola pokazala se kao značajan prediktor dužine razvića samo u prvom EB gde je bila značajna u 2 od 3 parovna poređenja kao i ukupnom modelu koji poredi sva tri haplotipa zajedno, dok u ostalim EB nijedan model nije pokazao značajnost ove interakcije. Interakcije drugog reda takođe se nisu pokazale naročito značajnim za ovu fitness komponentu, budući da nijedna od njih nije bila značajna u više od tri parovna poređenja i jednom ukupnom modelu. Uglavnom bi neka od njih bila značajna samo u jednom EB u par poređenja. Interakcija sva četiri faktora se takođe nije pokazala kao dobar prediktor dužine razvića, obzirom da je bila statistički značajna u 2 od 12 parovnih modela i 2 od 4 ukupna poređenja.

Tabela R12. Efekat mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na dužinu razvića za tri parovna poređenja i ukupni model u okviru eksperimentalnog bloka (EB) I kod *D. obscura*. SSq – Zbir kvadrata; ddf - stepeni slobode imenioca; F- F statistika; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

EB I	AB				AC				BC				ABC			
	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P
MT	0,450	70,0	0,62	0,4320	5,2	72,3	6,46	0,0132	0,1	69,6	0,10	0,7585	0,5	158,7	0,31	0,7374
NU	0,350	70,0	0,49	0,4870	7,8	72,3	9,61	0,0028	18,3	69,6	27,55	<0,0001	33,6	158,6	21,55	<0,0001
pol	5,400	931,4	7,43	0,0065	3,8	1042,2	4,67	0,0309	1,4	1028,8	2,18	0,1405	6,3	2214,3	8,12	0,0044
T	1726	70,0	2374	<0,0001	1675	72,3	2073	<0,0001	1353	69,6	2041	<0,0001	3835	158,7	4913	<0,0001
MT:NU	3,120	70,0	4,30	0,0419	5,3	72,3	6,50	0,0129	1,5	69,6	2,20	0,1428	14,4	158,5	4,63	0,0015
MT:pol	0,210	931,4	0,29	0,5928	1,3	1042,2	1,56	0,2123	1,1	1028,8	1,73	0,1892	1	2214,2	0,65	0,5217
NU:pol	1,670	931,4	2,30	0,1298	2,1	1042,2	2,56	0,1100	0,5	1028,8	0,68	0,4113	2,5	2213,9	1,60	0,2019
MT:T	1,740	70,0	2,39	0,1263	37,4	72,3	46,29	<0,0001	0,1	69,6	0,13	0,7176	5,1	158,7	3,25	0,0416
NU:T	0,950	70,0	1,31	0,2571	21,0	72,3	26,04	<0,0001	7,4	69,6	11,12	0,0014	34,9	158,6	22,35	<0,0001
T:pol	0,490	931,4	0,67	0,4131	3,7	1042,2	4,53	0,0336	5,6	1028,8	8,42	0,0038	4,6	2214,3	5,95	0,0148
MT:NU:pol	1,550	931,4	2,14	0,1441	0,0	1042,2	0,01	0,9115	0,0	1028,8	0,01	0,9201	1,9	2213,6	0,60	0,6591
MT:NU:T	14,96	70,0	20,58	<0,0001	0,2	72,3	0,24	0,6277	3,9	69,6	5,84	0,0183	55,4	158,5	17,75	<0,0001
MT:T:pol	2,310	931,4	3,18	0,0749	0,0	1042,2	0,00	0,9446	1,2	1028,8	1,75	0,1857	0,3	2214,2	0,20	0,8185
NU:T:pol	1,810	931,4	2,49	0,1146	0,0	1042,2	0,01	0,9263	1,9	1028,8	2,91	0,0885	3	2213,9	1,93	0,1452
MT:NU:T:pol	1,990	931,4	2,74	0,0984	0,2	1042,2	0,25	0,6154	0,0	1028,8	0,05	0,8181	7,6	2213,6	2,44	0,0446

Tabela R13. Efekat mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na dužinu razvića za tri parovna poređenja i ukupni model u okviru eksperimentalnog bloka (EB) II kod *D. obscura*. SSq – Zbir kvadrata; ddf - stepeni slobode imenioca; F- F statistika; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su podebljano. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

EB II	DE				DF				EF				DEF			
	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P
MT	5,54	70,66	5,63	0,020	9,28	70,7	8,72	0,0043	32,1	71,14	33,26	<0,0001	45,3	160,0	22,66	<0,0001
NU	3,93	70,66	4,00	0,049	20,78	70,7	19,52	<0,0001	3,9	71,14	4,07	0,0474	12,7	160,0	6,33	0,0023
pol	6,36	954,08	6,46	0,011	0,25	996,9	0,24	0,6271	0,9	996	0,91	0,3396	3,7	2233,5	3,72	0,0538
T	2474	70,66	2514	<0,0001	3028	72,0	2845	<0,0001	3265	71,14	3378	<0,0001	6008	160,1	6008	<0,0001
MT:NU	0	70,66	0,00	0,982	0,08	70,7	0,08	0,7843	8,3	71,14	8,64	0,0044	8,2	160,0	2,06	0,0889
MT:pol	1,72	954,08	1,75	0,186	3,69	996,9	3,46	0,0631	6,5	996	6,71	0,0097	5,8	2233,1	2,90	0,0554
NU:pol	3,57	954,08	3,63	0,057	2,36	996,9	2,21	0,1371	1,6	996	1,67	0,1960	14,6	2233,0	7,28	0,0007
MT:T	0,96	70,66	0,98	0,326	6,81	72,0	6,40	0,0136	14,6	71,14	15,15	0,0002	19,6	160,0	9,81	<0,0001
NU:T	1,77	70,66	1,80	0,184	26,3	72,0	24,71	<0,0001	15,4	71,14	15,95	0,0002	38,4	160,0	19,20	<0,0001
T:pol	1,6	954,08	1,63	0,202	0,51	999,3	0,48	0,4875	0	996	0,02	0,8837	2,2	2233,5	2,20	0,1382
MT:NU:pol	1,38	954,08	1,41	0,236	0,05	996,9	0,04	0,8339	0,2	996	0,21	0,6484	5,2	2231,9	1,31	0,2643
MT:NU:T	0,05	70,66	0,05	0,826	0,09	72,0	0,08	0,7771	0,3	71,14	0,32	0,5719	0,5	160,0	0,14	0,9685
MT:T:pol	1,52	954,08	1,54	0,215	3,48	999,3	3,27	0,0710	4,9	996	5,03	0,0251	3,4	2233,1	1,69	0,1850
NU:T:pol	3,33	954,08	3,38	0,066	3,42	999,3	3,21	0,0735	7,4	996	7,66	0,0057	7,2	2233,0	3,62	0,0269
MT:NU:T:pol	0,01	954,08	0,01	0,943	0	999,3	0,00	0,9865	6,5	996	6,77	0,0094	12,2	2231,9	3,05	0,0162

Tabela R14. Efekat mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na dužinu razvića za tri parovna poređenja i ukupni model u okviru eksperimentalnog bloka (EB) III kod *D. obscura*. SSq – Zbir kvadrata; ddf - stepeni slobode imenioca; F- F statistika; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

EB III	LM				LN				MN				LMN			
	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P
MT	0,08	352,01	0,08	0,774	2,56	79,85	1,64	0,2040	10,17	263,43	10,84	0,0011	1,13	508,12	0,48	0,6201
NU	0,08	352,01	0,08	0,772	0,77	79,85	0,50	0,4832	19,82	263,43	21,13	<0,0001	20,16	350,54	8,55	0,0002
pol	0,68	684,68	0,75	0,388	4,85	623,7	3,11	0,0783	0,35	782,68	0,37	0,5435	5,25	1563,83	4,45	0,0350
T	840	352,01	917	<0,0001	2147	79,85	1376	<0,0001	1447	263,43	1543	<0,0001	2672	550,98	2267	<0,0001
MT:NU	2,89	352,01	3,15	0,077	0,84	79,85	0,54	0,4657	9,71	263,43	10,35	0,0015	23,37	334,23	4,96	0,0007
MT:pol	0,41	684,68	0,44	0,506	0,03	623,7	0,02	0,8810	1,43	782,68	1,52	0,2174	0,09	1566,61	0,04	0,9619
NU:pol	2,61	684,68	2,84	0,092	0	623,7	0,00	0,9913	2,93	782,68	3,12	0,0776	1,56	1582,77	0,66	0,5158
MT:T	0,11	352,01	0,12	0,731	5,7	79,85	3,65	0,0595	2,61	263,43	2,78	0,0968	1,05	508,12	0,45	0,6408
NU:T	0,19	352,01	0,20	0,653	6,99	79,85	4,48	0,0375	11,09	263,43	11,82	0,0007	5,67	350,54	2,41	0,0917
T:pol	0,31	684,68	0,34	0,558	0,77	623,7	0,49	0,4830	2,09	782,68	2,23	0,1356	0,14	1563,83	0,11	0,7348
MT:NU:pol	4,55	684,68	4,97	0,026	0,06	623,7	0,04	0,8425	5,77	782,68	6,15	0,0134	8,51	1580,6	1,81	0,1252
MT:NU:T	8,14	352,01	8,89	0,003	0,6	79,85	0,39	0,5365	0	263,43	0,00	0,9458	10,77	334,23	2,29	0,0600
MT:T:pol	2,8	684,68	3,06	0,081	1,96	623,7	1,26	0,2626	0,07	782,68	0,07	0,7913	3,37	1566,61	1,43	0,2395
NU:T:pol	0,08	684,68	0,09	0,770	2,56	623,7	1,64	0,2009	0,31	782,68	0,33	0,5684	1,94	1582,77	0,82	0,4396
MT:NU:T:pol	1,14	684,68	1,25	0,265	0,39	623,7	0,25	0,6165	0,96	782,68	1,02	0,3117	2,41	1580,6	0,51	0,7280

Tabela R15. Efekat mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), pola, temperature (T) i njihovih interakcija na dužinu razvića za tri parovna poređenja i ukupni model u okviru eksperimentalnog bloka (EB) IV kod *D. obscura*. SSq – Zbir kvadrata; ddf - imenilac stepeni slobode; F- F statistika; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

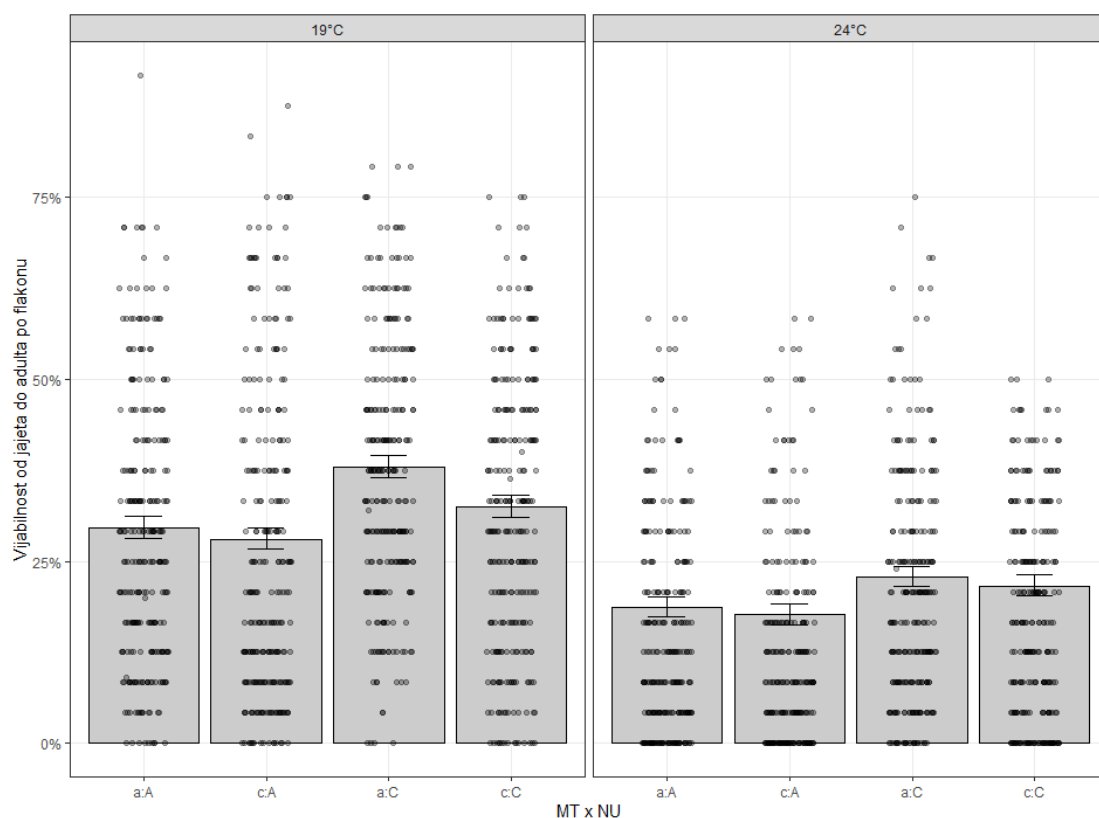
EB IV	OP				OQ				PQ				OPQ			
	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P	SSq	ddf	F	P
MT	4,32	74,1	5,23	0,0251	3,07	82,0	2,99	0,0877	28,92	66,4	45,15	<0,0001	22,88	172,1	14,38	<0,0001
NU	25,84	74,1	31,28	<0,0001	2,46	82,0	2,39	0,1263	0,73	66,4	1,15	0,2881	19,83	171,9	12,47	<0,0001
pol	9,05	1146	10,95	0,001	20,83	884,2	20,23	<0,0001	9,46	1014	14,76	0,0001	29,81	2318	37,47	<0,0001
T	1690	74,1	2045	<0,0001	1235	82,0	1199	<0,0001	1251	66,4	1953	<0,0001	3075	172,6	3865	<0,0001
MT:NU	3,18	74,1	3,85	0,0536	23,28	82,0	22,61	<0,0001	9,90	66,4	15,46	0,0002	28,23	171,0	8,87	<0,0001
MT:pol	0,01	1146	0,01	0,9175	0,08	884,2	0,07	0,787	2,70	1014	4,21	0,0404	2,04	2315	1,28	0,2779
NU:pol	6,47	1146	7,82	0,0052	0,10	884,2	0,10	0,7572	0,89	1014	1,39	0,2392	6,15	2314	3,87	0,0211
MT:T	2,19	74,1	2,64	0,1081	0,00	82,0	0,00	0,9813	0,17	66,4	0,27	0,6049	2,55	172,1	1,60	0,2045
NU:T	5,55	74,1	6,72	0,0115	0,08	82,0	0,08	0,7833	8,87	66,4	13,84	0,0004	18,35	171,9	11,53	<0,0001
T:pol	0,15	1146	0,18	0,6684	0,20	884,2	0,20	0,6581	0,12	1014	0,18	0,6711	0,38	2318	0,48	0,4905
MT:NU:pol	0,03	1146	0,04	0,8371	0,85	884,2	0,82	0,3643	0,10	1014	0,16	0,6907	2,65	2311	0,83	0,5049
MT:NU:T	2,1	74,1	2,55	0,1148	0,00	82,0	0,00	0,9927	0,23	66,4	0,36	0,55	2,12	171,0	0,67	0,6167
MT:T:pol	1,21	1146	1,47	0,2259	0,41	884,2	0,40	0,5279	0,71	1014	1,11	0,2914	0,52	2315	0,33	0,7202
NU:T:pol	0,15	1146	0,18	0,668	2,99	884,2	2,90	0,0888	0,03	1014	0,05	0,8156	1,03	2314	0,65	0,523
MT:NU:T:pol	6,44	1146	7,79	0,0053	0,02	884,2	0,02	0,8987	0,11	1014	0,18	0,674	7,18	2311	2,26	0,0607

4.2.3. Preživljavanje

U okviru eksperimenta vijabiliteta, merene su vrednosti preživljavanja od jajeta do lutke (EtP), lutke do adulta (PtA), kao i celokupno razviće od jajeta do adulta (EtA). Kako je većina jedinki koja je preživela do stadijuma lutke uspešla da završi svoje razviće do adulta, tako su rezultati EtP preživljavanja jako slični vrednostima EtA preživljavanja, dok su PtA vrednosti slabo informativne uzimajući u obzir da je oko 95% jedinki koje su se ulutkale došle i do stadijuma adulta. Iz tog razloga je preživljavanje od jajeta do adulta, pored toga što je obuhvatalo celokupno razviće mušica, najinformativnija komponenta, pa će samo modeli koji su analizirali ovu komponentu biti predstavljeni, dok druge dve neće biti detaljnije diskutovane. Rezultati ANOVA-e modela za preživljavanje od jajeta do lutke (EtP) i lutke do adulta (PtA) kod model vrsta *D. subobscura* i *D. obscura* predstavljeni su u dodatnim tabelama P1-6 u prilogu.

4.2.3.1. Preživljavanje od jajeta do adulta (EtA) kod *D. subobscura*

Srednje vrednosti vijabiliteta od jajeta do adulta (EtA) celog skupa podataka kod vrste *D. subobscura*, predstavljene su na slici R20 dok su srednje vrednosti preživljavanja od jajeta do adulta pojedinačnih kvarteta predstavljene na slikama P23-33 u prilogu. Na grafiku preživljavanja od jajeta do adulta se najpre može uočiti da su jedinke iz eksperimentalne grupe na 19°C imale prosečno 14,5% veće preživljavanje od eksperimentalne grupe na 24°C.



Slika R20. Prosečne vrednosti preživljavanja od jajeta do adulta jedinki *D. subobscura* po flakonu, za sve kombinacije genotipova celog skupa podataka na dve eksperimentalne temperature. Malo slovo označava mtDNK haplotip (MT) gde je „a“ haplotip I, dok je „c“ haplotip II. Velika slova označavaju odgovarajuću jedarnu pozadinu (NU). Tačke označavaju vijabilite pojedinačnih flakona. Predstavljani su intervali poverenja od 95%.

Generalno gledano, jedarna pozadina C imala je za 5,9% bolje preživljavanje od jedarne pozadine A. Na 24°C ova razlika je 5,26% u korist C jedarne pozadine, dok je na 19°C pozadina C za 6,53% bolje preživljavala od A. Zanimljivo je istaći, da kada se porede mitohondrijski haplotipovi, haplotip I predstavljen slovom a je bio za 4,5% vijabilniji na 19°C i za 3% vijabilniji na 24°C. Dakle, mito-jedarna kombinacija a^C bila je najuspešnija u ovom eksperimentu pa zatim c^C, praćena sa a^A, dok se kombinacija c^A pokazala najmanje vijabilnom, na obe temperature. Rezultati ANOVA-e GLM modela EtA preživljavanja kod *D. subobscura* za svih 11 modelovanih kvarteta predstavljeni su u tabeli R16, dok su rezultati ANOVA-e ukupnog modela dati u tabeli R17.

Tabela R16. Uticaj mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na preživljavanje od jajeta do adulta kod model vrste *D. subobscura*. Predstavljani su rezultati jedanaest kvartetnih modela. df – Stepni slobode; Dev. – Devijacija; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

	Q1			Q2			Q3		
	df	Dev.	p	df	Dev.	p	df	Dev.	p
MT	1	0,202	0,6529	1	4,519	0,0335	1	3,16	0,0755
NU	1	13,86	0,0002	1	3,851	0,0497	1	3,888	0,0486
T	1	63,455	<0,0001	1	37,18	<0,0001	1	154,174	<0,0001
MT:NU	1	15,154	<0,0001	1	0,106	0,7445	1	51,49	<0,0001
MT:T	1	0,227	0,6338	1	2,602	0,1067	1	0	0,993
NU:T	1	0,084	0,7716	1	1,093	0,2959	1	1,139	0,2859
MT:NU:T	1	13,939	0,0002	1	4,117	0,0425	1	1,813	0,1782
	Q4			Q5			Q6		
	df	Dev.	p	df	Dev.	p	df	Dev.	p
MT	1	1,588	0,2076	1	1,789	0,1811	1	10,067	0,0015
NU	1	0,009	0,9263	1	9,761	0,0018	1	259,242	<0,0001
T	1	128,388	<0,0001	1	150,216	<0,0001	1	27,126	<0,0001
MT:NU	1	2,286	0,1306	1	163,519	<0,0001	1	2,821	0,093
MT:T	1	0,021	0,8843	1	0,164	0,6859	1	1,531	0,216
NU:T	1	2,249	0,1337	1	0,296	0,5866	1	0,968	0,3251
MT:NU:T	1	0,158	0,6907	1	18,042	<0,0001	1	0,001	0,971
	Q7			Q8			Q9		
	df	Dev.	p	df	Dev.	p	df	Dev.	p
MT	1	26,745	<0,0001	1	2,047	0,1525	1	5,3278	0,021
NU	1	100,46	<0,0001	1	212,116	<0,0001	1	0,4925	0,4828
T	1	201,487	<0,0001	1	191,14	<0,0001	1	20,0071	<0,0001
MT:NU	1	29,364	<0,0001	1	10,208	0,0014	1	24,2489	<0,0001
MT:T	1	1,684	0,1944	1	9,599	0,0019	1	2,0824	0,149
NU:T	1	0,049	0,8254	1	11,639	0,0006	1	11,3598	0,0008
MT:NU:T	1	0,232	0,6301	1	0,474	0,4912	1	2,1439	0,1431
	Q10			Q11					
	df	Dev.	p	df	Dev.	p			
MT	1	56,06	<0,0001	1	1,59	0,2073			
NU	1	349,21	<0,0001	1	112,038	<0,0001			
T	1	80,64	<0,0001	1	57,671	<0,0001			
MT:NU	1	1,53	0,2155	1	9,782	0,0018			
MT:T	1	1,18	0,2783	1	4,777	0,0288			
NU:T	1	11,17	0,0008	1	1,742	0,1868			
MT:NU:T	1	0,68	0,4083	1	0,61	0,4348			

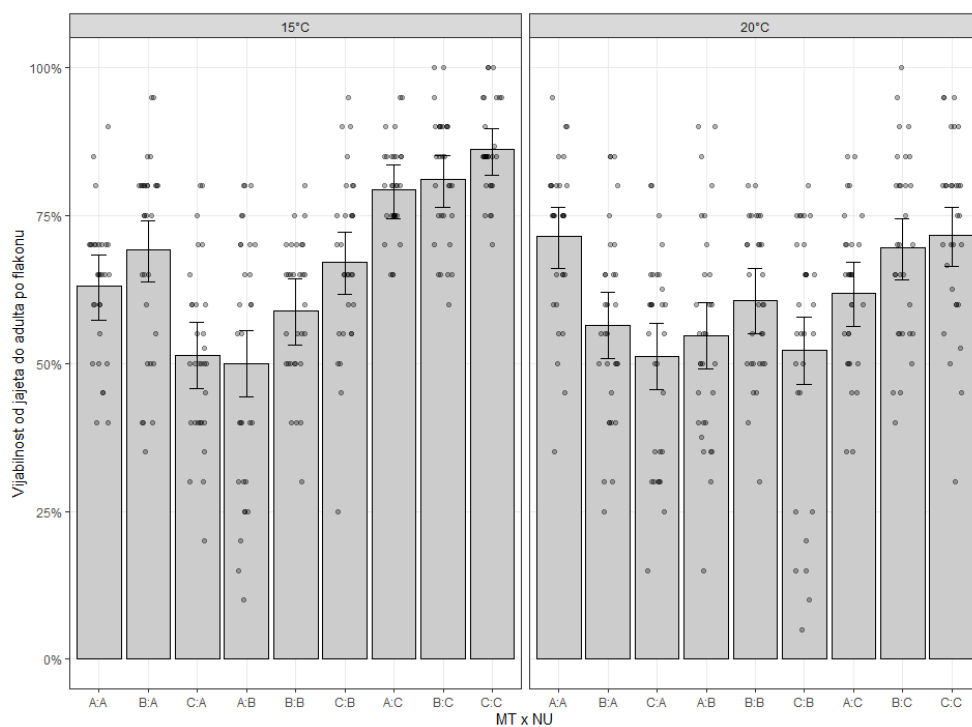
Tabela R17. Uticaj mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na preživljavanje od jajeta do adulta kod model vrste *D. subobscura*. Predstavljene su rezultati ukupnog modela koji je obuhvatao ceo skup podataka. df - stepeni slobode; F.ratio - F statistika; Chisq – Hi kvadratna vrednost; p vrednosti koje su značajne na $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

Ukupni model					
	df1	df2	F.ratio	Chisq	p
MT	1	Inf	31,78	31,78	<0,0001
NU	1	Inf	135,947	135,947	<0,0001
T	1	Inf	846,195	846,195	<0,0001
MT:NU	1	Inf	8,754	8,754	0,0031
MT:T	1	Inf	3,439	3,439	0,0637
NU:T	1	Inf	0,927	0,927	0,3355
MT:NU:T	1	Inf	2,515	2,515	0,1128

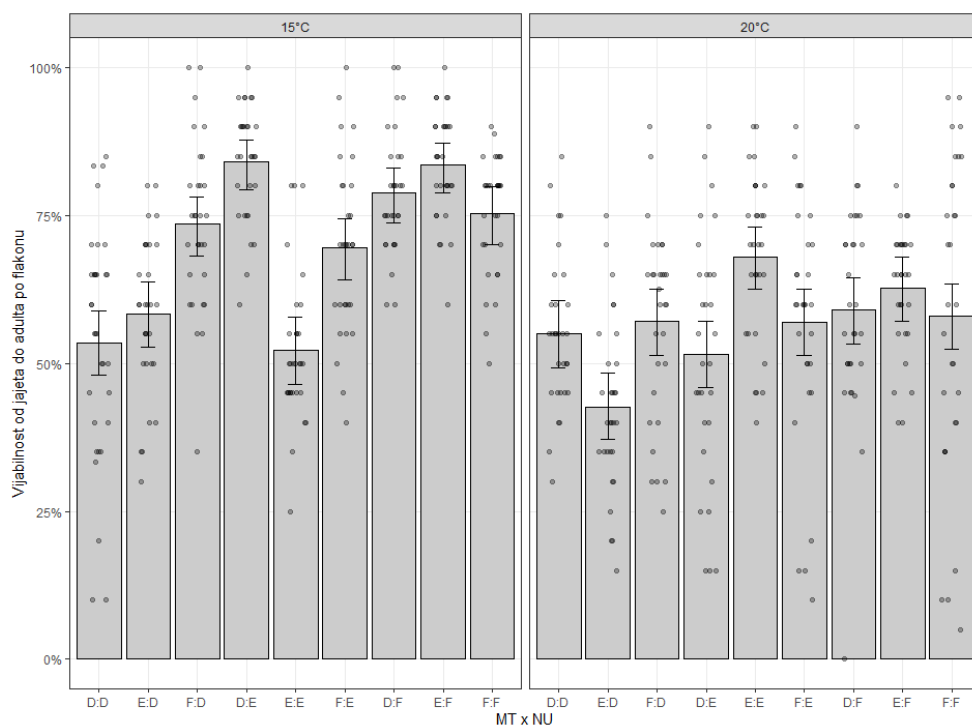
Temperatura je bila značajan faktor u svih 11 kvartetnih modela kao i u ukupnom modelu. Jedarna pozadina je bila statistički značajna u 9 od 11 kvarteta kao i u ukupnom modelu. Zanimljivo je da je NU u čak 5 od tih 9 kvarteta najuticajniji faktor za preživljavanje. Mitohondrijski haplotip statistički značajno je uticao na vijabilitet u 5 od 11 kvartetnih modela, a bio je značajan i u ukupnom modelu. Od interakcija prvog reda, najznačajnijom se pokazala kombinacija jedarnog i mitohondrijskog haplotipa, koja je bila značajna u 7 kvartetnih modela, kao i u ukupnom modelu. Kombinacija mitohondrijskog haplotipa i temperature bila je značajna u 2 kvarteta, dok je kombinacija jedarne pozadine i temperature statistički značajno uticala na preživljavanje u 3 od 11 modela, dok nijedna od ovih interakcija nije bila značajna u ukupnom modelu. Interakcija sva tri faktora (MT:NU:T) bila je statistički značajna u 3 kvarteta, ali ne i u ukupnom modelu.

4.2.3.2. Preživljavanje od jajeta do adulta (EtA) kod *D. obscura*

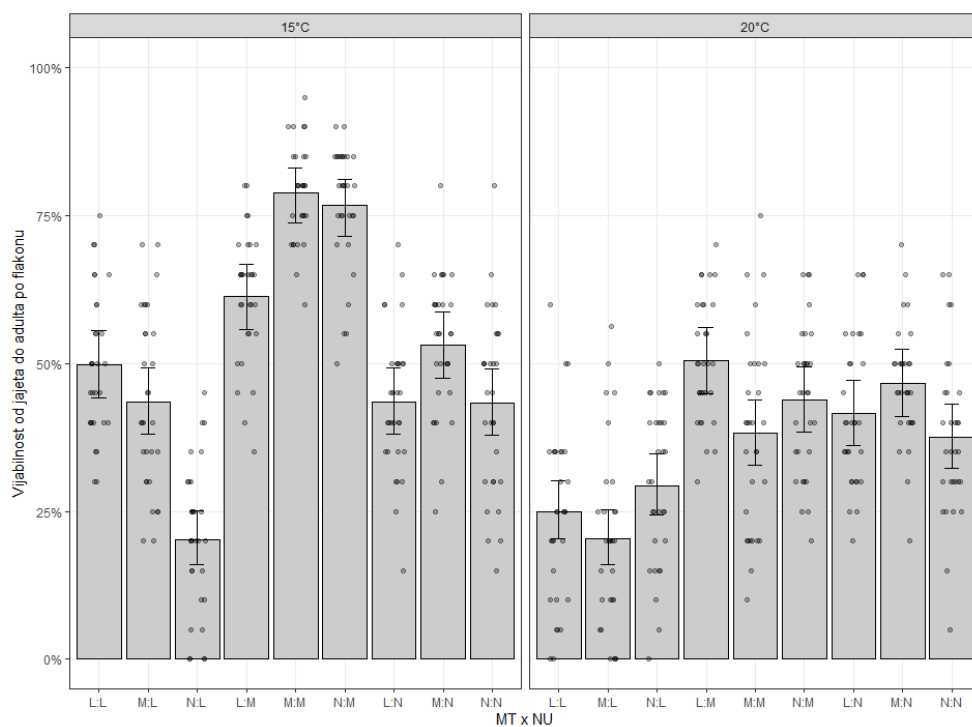
Srednje vrednosti preživljavanja od jajeta do adulta (EtA) kod *D. obscura* predstavljena su na slikama R21-R24. Zanimljivo je da je u ovom eksperimentu mitohondrijski haplotip generalno pokazivao najniži vijabilitet na svojoj sopstvenoj jedarnoj pozadini (npr. FF, NN, QQ), sem u EB I gde su ove kombinacije uglavnom bile najvijabilnije. Rezultati ANOVA-e eksperimenta EtA preživljavanja za sva četiri eksperimentalna bloka predstavljene su u tabeli R18. Svi faktori i njihove interakcije pokazali su se kao jako dobri i statistički značajni prediktori EtA vijabiliteta u svim eksperimentalnim blokovima.



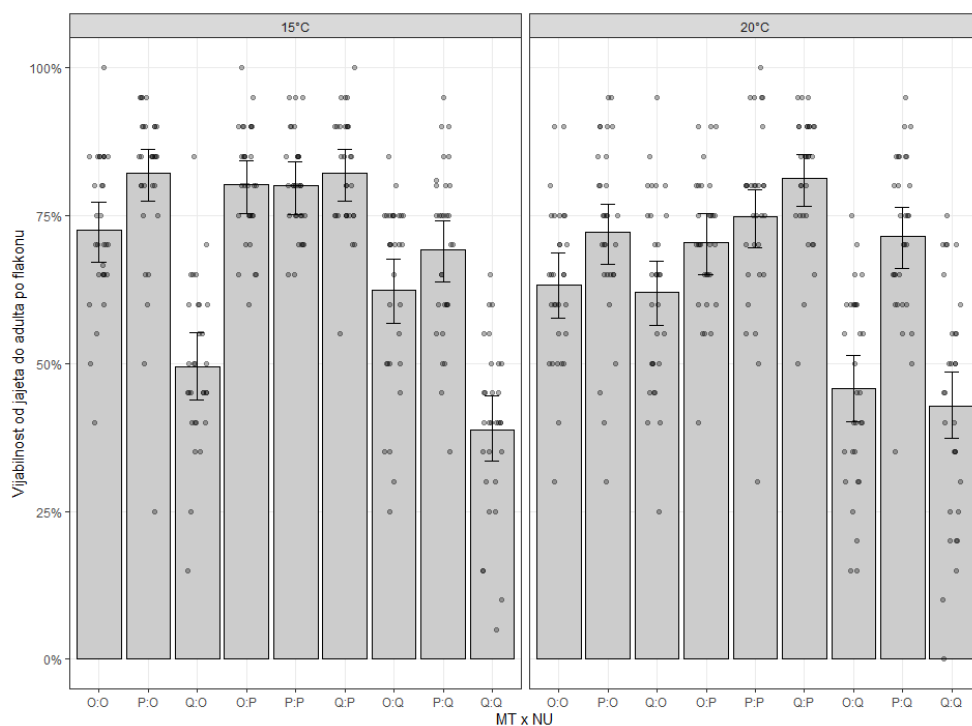
Slika R21. Prosečne vrednosti preživljavanja *D. obscura* od jajeta do adulta po flakonu, za sve kombinacije genotipova EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake A, B i C označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)). Tačke predstavljaju vijabilite pojedinačnih flakona. Predstavljani su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.



Slika R22. Prosečne vrednosti preživljavanja *D. obscura* od jajeta do adulta po flakonu, za sve kombinacije genotipova EB II na dve eksperimentalne temperature. Oznake D, E i F označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)). Tačke predstavljaju vijabilite pojedinačnih flakona. Predstavljani su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.



Slika R23. Prosečne vrednosti preživljavanja *D. obscura* od jajeta do adulta po flakonu, za sve kombinacije genotipova EB III na dve eksperimentalne temperature (15 i 20°C). Oznake L, M i N označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)). Tačke predstavljaju vijabilite pojedinačnih flakona. Predstavljani su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.



Slika R24. Prosečne vrednosti preživljavanja *D. obscura* od jajeta do adulta po flakonu, za sve kombinacije genotipova EB IV na dve eksperimentalne temperature (15°C i 20°C). Oznake O, P i Q označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)). Tačke predstavljaju vijabilite pojedinačnih flakona. Predstavljani su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

Jedarna pozadina se pokazala kao najuticajniji faktor u predviđanju EtA preživljavanja u ovom eksperimentu, budući da je bila statistički značajna u svim parovnim i ukupnim modelima u svim EB. Potom sledi temperatura, koja je bila statistički značajna u 9 od 12 parovnih poređenja i sva 4 ukupna modela. Sličnu ulogu imao je i MT haplotip, koji je bio značajan u 8 od 12 parovnih poređenja i takođe u sva 4 ukupna modela. Kombinacija mitohondrijskog i jedarnog genotipa statistički je značajno uticala na vijabilitet u 9 od 12 parovnih modela i sva četiri modela koji obuhvataju cele EB, dok je MT:T interakcija bila nešto manje učestala samo u parovnim modelima (8/12 i 4/4). Kombinacija NU:T pokazala se kao dobar prediktor preživljavanja u 7 parovnih i tri ukupna modela. To je jedini faktor koji nije bio statistički značajan u sva 4 ukupna modela. Konačno, interakcija sva tri faktora bila je značajna u najmanjem broju parovnih poređenja, 6 od 12 i u sva 4 ukupna modela.

Tabela R18. Uticaj mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na preživljavanje od jajeta do adulta kod *D. obscura*. Kod svakog od četiri eksperimentalna bloka (EB), predstavljena su tri parovna poređenja i eksperimentalni blok analiziran kao celina. df – Stepeni slobode; Dev – Devijacija; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

EB I	AB			AC			BC			ABC		
	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p
MT	1	1,11	0,2932	1	7,24	0,0071	1	1,874	0,1711	2	7,041	0,0296
NU	1	40,66	<0,0001	1	132,6	<0,0001	1	171,0	<0,0001	2	288,7	<0,0001
T	1	0,18	0,6732	1	20,15	<0,0001	1	57,03	<0,0001	1	48,41	<0,0001
MT:NU	1	17,38	<0,0001	1	78,50	<0,0001	1	2,71	0,0997	4	101,2	<0,0001
MT:T	1	18,39	<0,0001	1	1,45	0,2285	1	15,77	<0,0001	2	16,51	<0,0001
NU:T	1	3,23	0,0723	1	70,44	<0,0001	1	15,24	<0,0001	2	62,91	<0,0001
MT:NU:T	1	11,82	0,0006	1	1,839	0,1751	1	2,761	0,0966	4	40,30	<0,0001
EB II	DE			DF			EF			DEF		
	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p
MT	1	15,51	<0,0001	1	10,55	0,0012	1	1,458	0,2273	2	11,51	0,0032
NU	1	66,97	<0,0001	1	34,21	<0,0001	1	35,74	<0,0001	2	130,5	<0,0001
T	1	29,32	<0,0001	1	87,20	<0,0001	1	40,59	<0,0001	1	200,5	<0,0001
MT:NU	1	2,596	0,1071	1	23,32	<0,0001	1	13,11	0,0003	4	76,41	<0,0001
MT:T	1	31,34	<0,0001	1	9,333	0,0023	1	19,69	<0,0001	2	23,56	<0,0001
NU:T	1	0,811	0,3678	1	19,71	<0,0001	1	62,83	<0,0001	2	31,95	<0,0001
MT:NU:T	1	149,9	<0,0001	1	15,07	0,0001	1	36,52	<0,0001	4	173,4	<0,0001
EB III	LM			LN			MN			LMN		
	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p
MT	1	1,085	0,2976	1	28,27	<0,0001	1	6,41	0,0114	2	18,83	<0,0001
NU	1	238,3	<0,0001	1	56,36	<0,0001	1	94,99	<0,0001	2	522,3	<0,0001
T	1	313,8	<0,0001	1	18,26	<0,0001	1	225,9	<0,0001	1	266,4	<0,0001
MT:NU	1	8,779	0,0030	1	17,70	<0,0001	1	16,53	<0,0001	4	55,97	<0,0001
MT:T	1	32,16	<0,0001	1	27,78	<0,0001	1	1,581	0,2087	2	37,28	8,0E-09
NU:T	1	0,115	0,7341	1	2,159	0,1418	1	125,2	<0,0001	2	106,3	<0,0001
MT:NU:T	1	28,06	<0,0001	1	50,24	<0,0001	1	1,9	0,1681	4	126,0	<0,0001

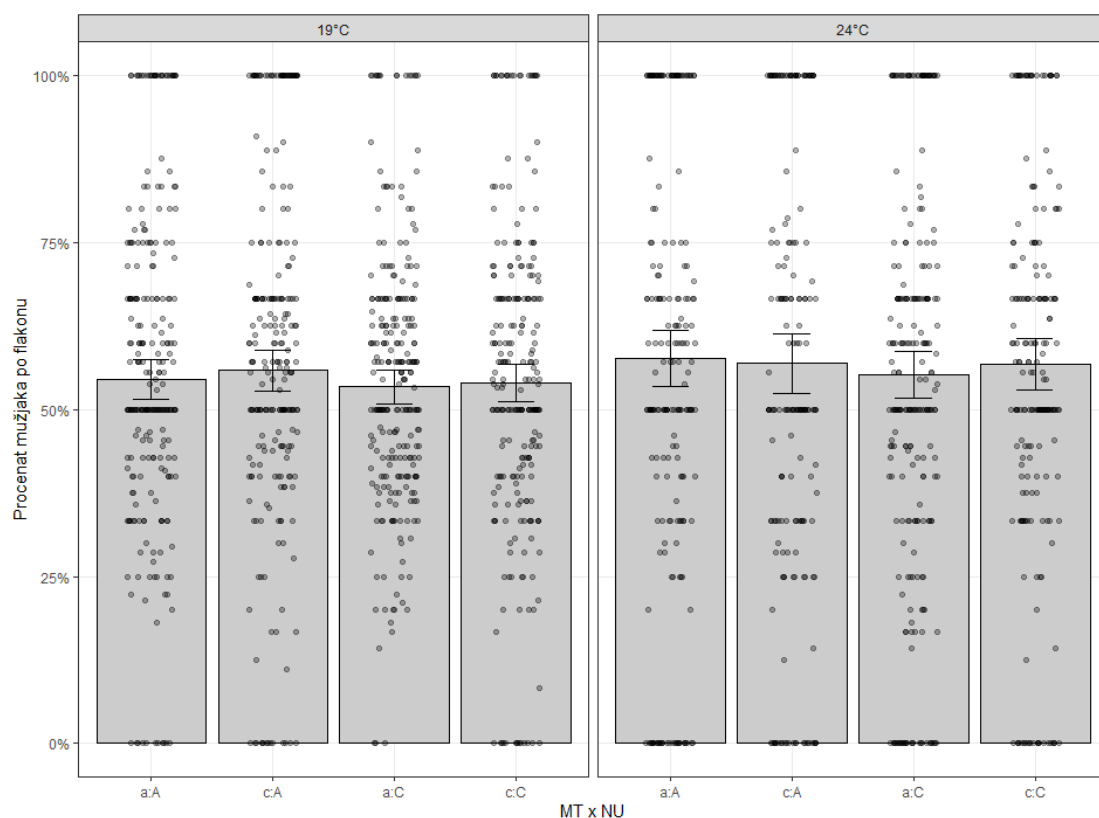
Tabela R18 nastavak.

EB IV	OP			OQ			PQ			OPQ		
	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p
MT	1	20,38	<0,0001	1	78,53	<0,0001	1	87,32	<0,0001	2	200,8	<0,0001
NU	1	9,33	0,0023	1	103,0	<0,0001	1	327,1	<0,0001	2	447,3	<0,0001
T	1	45,95	<0,0001	1	2,752	0,0971	1	0	0,9581	1	17,14	<0,0001
MT:NU	1	7,112	0,0077	1	0,01	0,9197	1	128,7	<0,0001	4	148,3	<0,0001
MT:T	1	0,061	0,8051	1	57,04	<0,0001	1	1,42	0,2339	2	61,24	<0,0001
NU:T	1	0,299	0,5844	1	6,415	0,0113	1	5,57	0,0183	2	2,32	0,3130
MT:NU:T	1	2,017	0,1555	1	0,134	0,7144	1	0,48	0,4900	4	23,16	0,0001

4.2.4. Procenat mužjaka

4.2.4.1. Procenat mužjaka kod *D. subobscura*

Srednje vrednosti prosečnog procenta mužjaka po flakonu među izleženim jedinkama *D. subobscura* u eksperimentima, za ceo skup podataka date su na slici R25, dok su srednje vrednosti pojedinačnih kvarteta predstavljene na slikama P34-44 u prilogu. Sve mito-jedarne kombinacije su imale nešto viši procenat mužjaka od očekivanih 50%. Kada posmatramo ceo skup podataka, prosečni procenat mužjaka po flakonu je bio 55,3% i statistički značajno je odstupao od očekivanih 50% ($p < 0,001$). Nešto veći procenat mužjaka zabeležen na jedarnoj pozadini A, u odnosu na jedarnu pozadinu C, oko 2,6% više mužjaka u proseku po flakonu.



Slika R25. Prosečni procenat mužjaka po flakonu *D. subobscura* za sve kombinacije genotipova iz celog skupa podataka, na dve eksperimentalne temperature. Malo slovo označava mtDNK haplotip (MT) gde je „a“ haplotip I, dok je „c“ haplotip II. Velika slova označavaju odgovarajuću jedarnu pozadinu (NU). Tačke predstavljaju procenat mužjaka u pojedinačnim flakonima. Predstavljeni su intervali poverenja od 95%.

Jedarna pozadina je najjači faktor koji utiče na odnos polova, sa statističkom značajnošću u pet kvarteta, dok je mitohondrijski haplotip značajno uticao na odnos polova u samo 2 modela. Temperatura nije bila značajan faktor ni u jednom kvartetu. Od kombinacija faktora, samo je interakcija MT:NU bila značajna u jednom kvartetu. U ukupnom modelu samo je temperatura bila značajna. Rezultati ANOVA-e za fitness komponentu procenat mužjaka za jedanaest kvarteta su dati u tabeli R19, dok su rezultati ANOVA-e ukupnog modela predstavljeni u tabeli R20. Kako odstupanja od očekivanih 50% mužjaka nisu bila velika, kod ove komponente nemamo veliki broj statistički značajnih faktora i njihovih interakcija.

Tabela R19. Uticaj mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na procenat mužjaka kod model vrste *D. subobscura*. Predstavljani su rezultati jedanaest Kvartetnih modela. df – Stepeni slobode; Dev. – Devijacija; Resid. df – preostali stepeni slobode; Resid.Dev –preostala devijacija; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

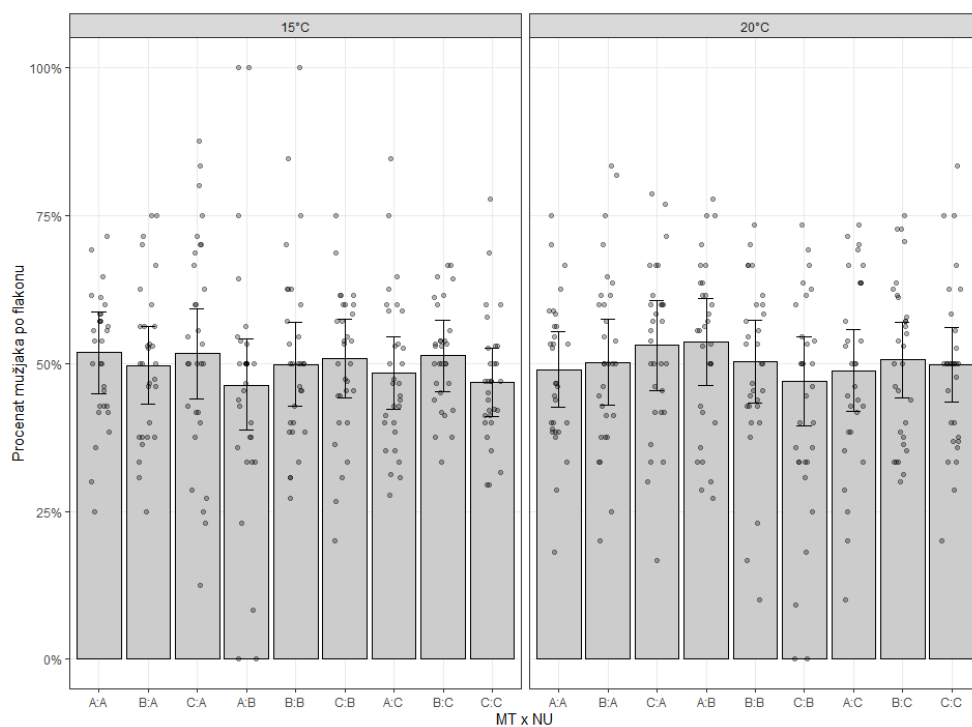
	Q1			Q2			Q3		
	df	Dev.	p	df	Dev.	p	df	Dev.	p
MT	1	3,9363	0,0473	1	4,2303	0,0397	1	0,0273	0,8687
NU	1	11,5675	0,0007	1	0,0542	0,8159	1	3,3019	0,0692
T	1	1,8604	0,1726	1	3,3982	0,0653	1	0,7101	0,3994
MT:NU	1	0,5187	0,4714	1	0,5907	0,4422	1	4,8891	0,027
MT:T	1	0,175	0,6757	1	1,3956	0,2375	1	0,1929	0,6605
NU:T	1	0,0508	0,8217	1	0,4416	0,5063	1	0,1309	0,7175
MT:NU:T	1	0,0045	0,9466	1	0,8013	0,3707	1	3,7121	0,054
	Q4			Q5			Q6		
	df	Dev.	p	df	Dev.	p	df	Dev.	p
MT	1	0,05857	0,8088	1	0,8918	0,345	1	0,342	0,5587
NU	1	0,36087	0,548	1	0,4435	0,5054	1	4,266	0,0389
T	1	0,11362	0,7361	1	0,5795	0,4465	1	0,1025	0,7489
MT:NU	1	0,2693	0,6038	1	0,9334	0,334	1	1,6035	0,2054
MT:T	1	0,22644	0,6342	1	3,5922	0,058	1	0,5781	0,4471
NU:T	1	0,95637	0,3281	1	0,3468	0,5559	1	1,1977	0,2738
MT:NU:T	1	0,12659	0,722	1	0,0168	0,8968	1	0,0237	0,8778
	Q7			Q8			Q9		
	df	Dev.	p	df	Dev.	p	df	Dev.	p
MT	1	3,7449	0,053	1	0,4742	0,4911	1	0,10195	0,7495
NU	1	8,4893	0,0036	1	8,9406	0,0028	1	0,01079	0,9173
T	1	1,817	0,1777	1	3,5683	0,0589	1	0,0054	0,9414
MT:NU	1	1,8395	0,175	1	1,051	0,3053	1	2,13222	0,1442
MT:T	1	0,2512	0,6162	1	0,3211	0,571	1	0,00283	0,9576
NU:T	1	0,2616	0,609	1	0,0426	0,8365	1	0,75705	0,3843
MT:NU:T	1	0,3482	0,5552	1	3,287	0,0698	1	1,03348	0,3093
	Q10			Q11					
	df	Dev.	p	df	Dev.	p			
MT	1	0,27254	0,6016	1	0,8806	0,348			
NU	1	0,27058	0,6029	1	5,1091	0,0238			
T	1	1,45227	0,2282	1	0,0172	0,8957			
MT:NU	1	1,01817	0,313	1	0,4506	0,5021			
MT:T	1	1,70655	0,1914	1	0,0369	0,8476			
NU:T	1	0,04034	0,8408	1	0,7592	0,3836			
MT:NU:T	1	2,63237	0,1047	1	0,3498	0,5542			

Tabela R20. Uticaj mitohondrijskog haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na procenat mužjaka kod model vrste *D. subobscura*. Predstavljani su rezultati ukupnog modela koji je obuhvatao ceo skup podataka. df - stepeni slobode; F.ratio - F statistika; Chisq – Hi kvadratna vrednost; p vrednosti koje su značajne na p <0,05 predstavljene su boldom.

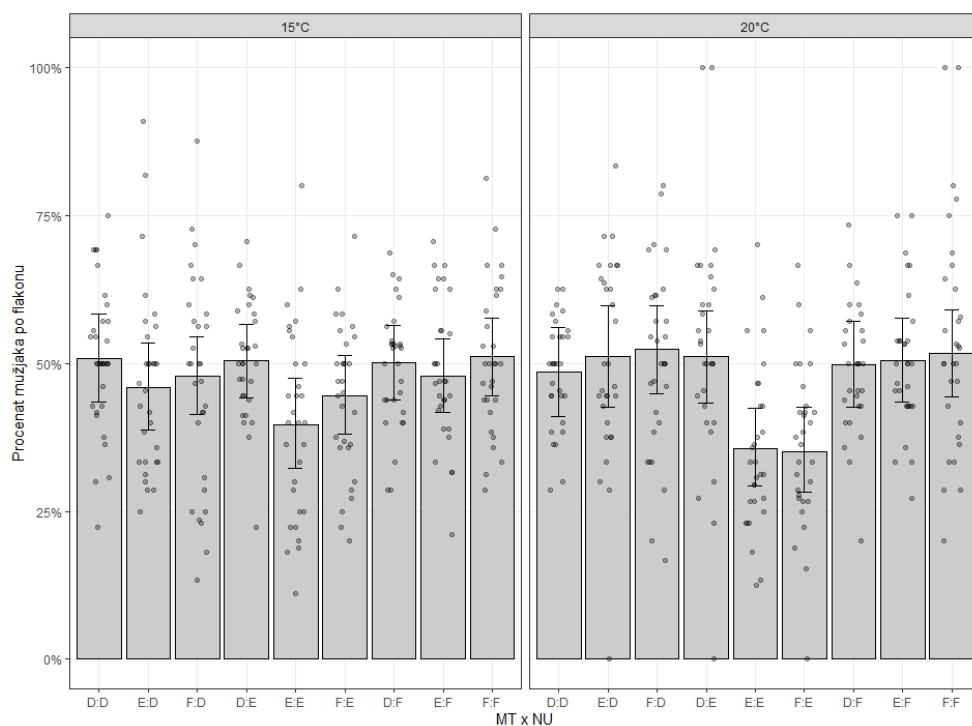
Ukupni model					
	df1	df2	F.ratio	Chisq	p
MT	1	Inf	0,447	0,447	0,5039
NU	1	Inf	1,956	1,956	0,162
T	1	Inf	5,124	5,124	0,0236
MT:NU	1	Inf	0,161	0,161	0,6879
MT:T	1	Inf	0,062	0,062	0,8034
NU:T	1	Inf	0,009	0,009	0,9261
MT:NU:T	1	Inf	0,601	0,601	0,4383

4.2.4.2. Procenat mužjaka kod *D. obscura*

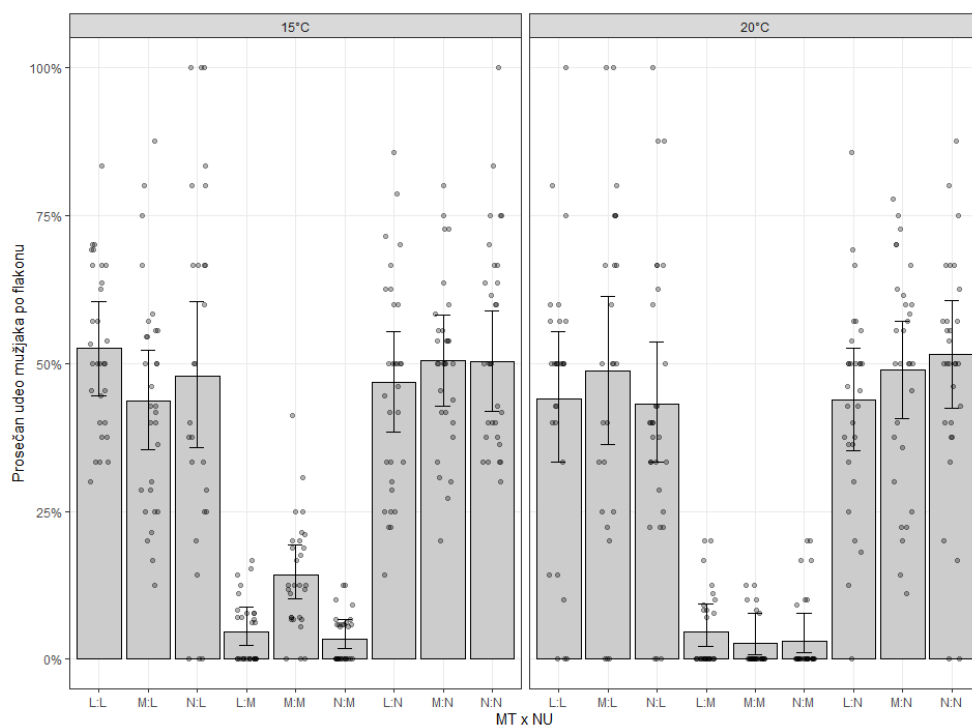
U ovom eksperimentu smanjen procenat mužjaka primećen je u nekoliko eksperimentalnih linija. Ovaj efekat bio je najdrastičniji u linijama sa M jedarnom pozadinom (EB III) gde su gotovo sve mito-jedarne linije imale samo oko 5% mužjaka među izleženim jedinkama. Izuzetak je linija MM na temperaturi 15°C gde ih je bilo oko 15% što je i dalje veliko odstupanje od očekivane proporcije. Odstupanje od očekivanog odnosa polova u korist ženki takođe je zabeležen u IV EB. Iako ovaj efekat nije bio toliko drastičan kao u EB III, zabeležena su statistički značajna odstupanja od normalnog odnosa polova. Efekat je bio prisutan u linijama sa O jedarnom pozadinom, kao i kod linije koja poseduje O mitohondrijski haplotip na Q jedarnoj pozadini. Najniži procenat mužjaka u EB IV imala je linija QO na 20°C. U EB II zabeleženo je malo odstupanje procenta mužjaka u mito-jedarnim kombinacijama EE i FE na obe eksperimentalne temperature, s tim da je ovaj efekat nešto izraženiji na 20°C gde obe linije imaju oko 35% mužjaka. Prosečni procenat mužjaka po flakonu za svaki od četiri eksperimentalna bloka kod *D. obscura* predstavljani su na slikama R26-R29.



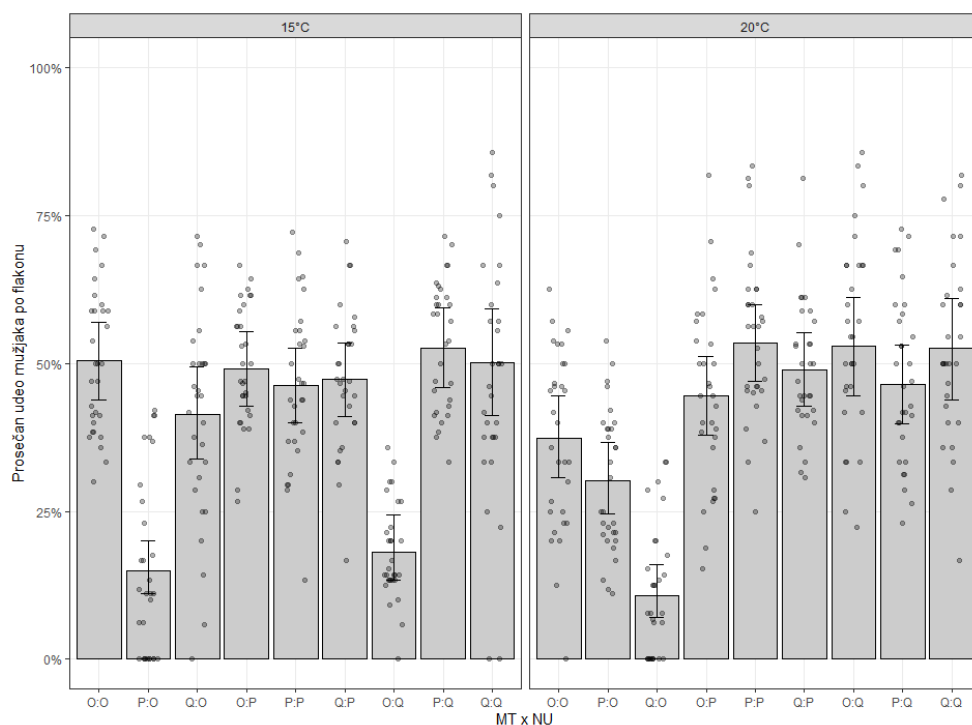
Slika R26. Prosečni procenat mužjaka po flakonu *D. obscura* za sve kombinacije genotipova iz EB I na dve eksperimentalne temperature. Oznake A, B i C označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)). Tačke predstavljaju procenat mužjaka u pojedinačnim flakonima. Predstavljani su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.



Slika R27. Prosečni procenat mužjaka po flakonu *D. obscura* za sve kombinacije genotipova iz EB II na dve eksperimentalne temperature. Oznake D, E i F označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)). Tačke predstavljaju procenat mužjaka u pojedinačnim flakonima. Predstavljani su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.



Slika R28. Prosečni procenat mužjaka po flakonu *D. obscura* za sve kombinacije genotipova iz EB III na dve eksperimentalne temperature. Oznake L, M i N označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)). Tačke predstavljaju procenat mužjaka u pojedinačnim flakonima. Predstavljeni su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.



Slika R29. Prosečni procenat mužjaka po flakonu *D. obscura* za sve kombinacije genotipova iz EB IV na dve eksperimentalne temperature. Oznake O, P i Q označavaju EL (prvo slovo označava mtDNK haplotip (MT), drugo slovo označava jedarnu pozadinu (NU)). Tačke predstavljaju procenat mužjaka u pojedinačnim flakonima. Predstavljeni su intervali poverenja od 95%. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b), modifikovano.

Rezultati ANOVA-e za procenat mužjaka za četiri eksperimentalna bloka dati su u tabeli R21. U prvom EB nisu zabeležena statistički značajna odstupanja od očekivanog odnosa polova, pa nijedan faktor nije bio značajan ni u jednom poređenju. Generalno, najznačajniji faktor je bila jedarna pozadina koja je bila značajna u 5 od 12 parovnih poređenja. NU je bila značajna i u tri od četiri ukupna modela. Temperatura se pokazala značajnom u 3 od 12 parovnih poređenja, dok je od ukupnim modelima bila značajna samo u EB III gde su i primećena najveća odstupanja odnosa polova. Efekat mito-jedarne kombinacije bio je značajan u 4 od 12 parovnih poređenja i u dva ukupna modela, dok je kombinacija MT:T bila značajna samo u 2 od 12 parovnih poređenja i jednom ukupnom modelu. Kombinacija jedarne pozadine i temperature (NU:T) bila je nešto značajnija u određivanju odnosa polova sa 6 od 12 parovnih modela i 2 od 4 ukupna poređenja. Kombinacija sva tri faktora bila je značajna u tri parovna i dva ukupna modela.

Tabela R21. Uticaj mtDNK haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na procenat mužjaka kod model vrste *D. obscura*. Za svaki eksperimentalni blok (EB) predstavljeni su rezultati ANOVA-e modela tri parovna poređenja i model koji analizira ceo EB. df – Stepeni slobode; Dev – Devijacija; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b).

EB I	AB			AC			BC			ABC		
	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p
MT	1	0,02	0,8808	1	0,04739	0,8277	1	1,33724	0,2475	2	0,36	0,834
NU	1	0,00	0,9872	1	2,74073	0,0978	1	0,00149	0,9692	2	1,12	0,571
T	1	0,30	0,5828	1	0,09581	0,7569	1	0,00376	0,9511	1	0,24	0,626
MT:NU	1	0,01	0,9396	1	0,48097	0,4880	1	0,30348	0,5817	4	2,47	0,651
MT:T	1	0,09	0,7636	1	1,0408	0,3076	1	0,0083	0,9274	2	0,16	0,922
NU:T	1	1,78	0,1825	1	0,48283	0,4871	1	0,67503	0,4113	2	0,35	0,841
MT:NU:T	1	1,92	0,1659	1	0,06717	0,7955	1	1,32005	0,2506	4	5,53	0,237
EB II	DE			DF			EF			DEF		
	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p
MT	1	6,0323	0,014046	1	0,16616	0,6836	1	1,605	0,20518	2	12,25	0,002
NU	1	0,3274	0,567219	1	0,27904	0,5973	1	41,353	<0,0001	2	28,76	<0,0001
T	1	9,7708	0,001773	1	0,15959	0,6895	1	1,791	0,18086	1	0,31	0,578
MT:NU	1	0,0497	0,823663	1	0,11465	0,7349	1	0,021	0,88541	4	19,09	0,001
MT:T	1	0,5159	0,472606	1	1,07144	0,3006	1	1,22	0,26934	2	0,74	0,691
NU:T	1	6,0323	0,014046	1	0,06932	0,7923	1	5,761	0,01639	2	5,59	0,061
MT:NU:T	1	0,3274	0,567219	1	0,68873	0,4066	1	0,242	0,62276	4	6,17	0,187
EB III	LM			LN			MN			LMN		
	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p
MT	1	0,00	0,97074	1	0,3288	0,56638	1	12,92	0,00032	2	11,7	0,003
NU	1	472,89	<0,0001	1	0,0007	0,97957	1	633,78	<0,0001	2	1125,3	<0,0001
T	1	8,40	0,00375	1	2,7945	0,09459	1	4,59	0,03210	1	5,5	0,019
MT:NU	1	15,68	<0,0001	1	3,479	0,06215	1	23,35	<0,0001	4	33,1	<0,0001
MT:T	1	0,35	0,55523	1	0,8008	0,37085	1	3,57	0,05889	2	1,0	0,610
NU:T	1	8,54	0,00348	1	1,3167	0,25119	1	13,88	0,00019	2	9,3	0,010
MT:NU:T	1	14,50	0,00014	1	0,0018	0,96654	1	5,64	0,01751	4	16,9	0,002

Tabela R21 nastavak.

EB IV	OP			OQ			PQ			OPQ		
	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p	df	Dev	p
MT	1	35,30	<0,0001	1	3,409	0,06486	1	0,0482	0,82617	2	2,20	0,334
NU	1	90,58	<0,0001	1	7,96	0,00478	1	0,4858	0,48582	2	188,33	<0,0001
T	1	1,13	0,28824	1	2,405	0,12093	1	0,5486	0,45890	1	0,68	0,409
MT:NU	1	66,80	<0,0001	1	102,83	<0,0001	1	0,9611	0,32692	4	168,34	<0,0001
MT:T	1	39,46	<0,0001	1	44,23	<0,0001	1	0,1021	0,74928	2	27,32	<0,0001
NU:T	1	0,48	0,49005	1	140,156	<0,0001	1	4,3152	0,03777	2	31,88	<0,0001
MT:NU:T	1	11,23	0,00081	1	0,674	0,41178	1	3,7143	0,05395	4	169,68	<0,0001

4.2.5. Rezultati testiranja hipoteze materinske kletve

Rezultati pokazuju da u svim ukupnim, kao i gotovo svim parovnim ili kvartetnim modelima, gde postoje razlike između polova, mtDNK haplotip više utiče na fitnes ženki nego mužjaka. Jedini modeli koji odstupaju od ovog pravila jesu Q5 model otpornosti na desikaciju kod *D. subobscura*, PQ parovni model u slučaju dužine razvića i LN parovni model u slučaju otpornosti na desikaciju kod *D. obscura*. Sa druge strane, uočava se trend kod modela koji pokazuju statistički značajne razlike između polova, po kojem je jedarna pozadina znatno više uticala na fitnes mužjaka. Jedini model koji je imao NU kao statistički značajan faktor, a da je pokazao veći efekat jedarne pozadine kod ženki nego mužjaka jeste EF parovni model dužine razvića kod *D. obscura*. F vrednosti i njihove značajnosti (p vrednosti) efekata mitohondrijskog haplotipa i jedarne pozadine za oba pola kod svih modela koji su imali interakciju MT:pol statistički značajnu su date u tabeli R22.

Tabela R22. Komparacija uticaja mtDNK haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU) između polova u cilju ispitivanja efekata materinske kletve kod obe model vrste. p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

Fitnes komponenta i Model	pol	MT		NU	
		F	p	F	p
Desikacija <i>D. subobscura</i> Q5 model	ženke	1,819	0,1774	0,686	0,4075
	Mužjaci	5,391	0,0202	29,449	<,0001
Desikacija <i>D. obscura</i> D blok	ženke	23,143	<,0001	23,143	<,0001
	Mužjaci	6,213	0,002	33,417	<,0001
Desikacija <i>D. obscura</i> L blok	ženke	0,912	0,4019	0,425	0,6537
	Mužjaci	1,059	0,3467	4,286	0,0138
Desikacija <i>D. obscura</i> O blok	ženke	19,367	<,0001	0,725	0,4843
	Mužjaci	0,876	0,4166	1,574	0,2073
Desikacija <i>D. obscura</i> AC model	ženke	23,982	<,0001	10,993	0,0009
	Mužjaci	0,81	0,3682	14,514	0,0001
Desikacija <i>D. obscura</i> BC model	ženke	5,818	0,0159	strata	
	Mužjaci	4,169	0,0412	strata	
Desikacija <i>D. obscura</i> DE model	ženke	11,519	0,0007	14,353	0,0002
	Mužjaci	0,071	0,7897	16,747	<,0001
Desikacija <i>D. obscura</i> DF model	ženke	6,351	0,0117	0,913	0,3392
	Mužjaci	2,39	0,1221	13,6	0,0002
Desikacija <i>D. obscura</i> LN model	ženke	1,911	0,1668	34,073	<,0001
	Mužjaci	26,87	<,0001	131,506	<,0001
Desikacija <i>D. obscura</i> OP model	ženke	6,982	0,0082	0,179	0,672
	Mužjaci	3,415	0,0646	1,244	0,2647
Desikacija <i>D. obscura</i> PQ model	ženke	13,107	0,0003	strata	
	Mužjaci	0,028	0,8667	strata	
Dužina razvića <i>D. obscura</i> EF model	ženke	34,146	<,0001	5,117	0,027
	Mužjaci	16,421	<,0001	1,476	0,2286
Dužina razvića <i>D. obscura</i> PQ model	ženke	17,924	0,0001	0,655	0,4209
	Mužjaci	58,558	<,0001	1,909	0,1714

4.2.6. Uticaj broja i tipa nukleotidnih promena između haplotipova na razlike u fitnessu kod *D. obscura*

Kako je na analiziranom uzorku *D. obscura* zabeležena dosta veća varijabilnost mtDNK, kao i prilično drugačija struktura haplotipske mreže u odnosu na *D. subobscura*, bilo je pogodno da se poredi veći broj što različitijih haplotipova *Cyt b*, sa varijabilnim tipom i brojem nukleotidnih supstitucija između njih. Tako je u četiri eksperimentalna bloka postojalo po tri linije poreklom iz iste populacije, koje su poređene kako parovno tako i ukupno u okviru svakog bloka.

Budući da je polimorfizam na poziciji 828 najučestaliji u uzorku i pošto haplotipovi koji se razlikuju na ovoj nukleotidnoj poziciji poseduju specifičan obrazac zastupljenosti u istočnom i zapadnom delu areala vrste, posebna pažnja je posvećena analizi adaptivnih razlika između njih. Stoga je ova nukleotidna supstitucija bila fokus fitnes poređenja kod vrste *D. obscura*. Haplotip O2

koji je najučestaliji u populaciji iz Srbije je bio prisutan u sva četiri eksperimentalna bloka, dok je tipični O1 bio prisutan u okviru samo jednog bloka, jer je zabeležen samo u populaciji sa Tare. Ipak u tri od četiri bloka poređeni su haplotipovi sa različitim varijantama na nukleotidnoj poziciji 828 *Cyt b* gena, gde je uz to ispitivan i uticaj većeg ili manjeg broja kako sinonimnih, tako i nesinonimnih promena. Samo su u EB II analizirane fitnes kombinacije nosilaca tri mtDNK haplotipa, gde su sva tri iz „O2“ grupe, tačnije haplotip O2 i još dva haplotipa koja se od njega razlikuju sa po jednom nesinonimnom zamenom.

Sa izuzetkom fitnes komponente procenta mužjaka, kod koje nijedan faktor nije bio statistički značajan u okviru prvog bloka, rezultati poređenja u okviru ovog bloka nedvosmisleno pokazuju da su ukrštanja inkompatibilnija što su linije udaljenije, pa je posledično fitnes nosioca ovih kombinacija niži. Tako su, kada je AC par u pitanju, mtDNK haplotip, kao i interakcija mitohondrijskog haplotipa i jedarne pozadine (MT:NU), bili značajni u svim ostalim fitnes komponentama (otpornost na desikaciju, dužina razvića i preživljavanje). Kod AB poređenja, MT:NU interakcija bila je statistički značajna u iste tri fitnes komponente, dok je uticaj mtDNK haplotipa na fitnes bio značajan u jednoj od tri fitnes komponente (otpornost na desikaciju). Linije A i B predstavljaju haplotipove O2 i O1, dok je linija C haplotip koji pored O1 varijante na poziciji 828 poseduje još šest sinonimnih mutacija u odnosu na O1 haplotip. Pored toga, kada je BC par u pitanju, MT:NU interakcija bila je značajna u eksperimentu desikacije, dok mtDNK haplotip nije bio značajan ni kod jedne fitnes komponente.

U ostalim eksperimentalnim blokovima, rezultati nisu bili tako nedvosmisleni, pa jasni trendovi nisu uočeni. U slučaju nekih fitnes komponenti u određenim parovnim poređenjima uočena je pozitivna veza između broja razlika između haplotipova i razlike u fitnesu njihovih nosilaca, dok je u nekim slučajevima ova veza bila suprotnog smera. Kod određenih komponenti modeli pokazuju veće razlike između, uslovno rečeno sličnijih haplotipova, gde sinonimna razlika ima veće posledice po fitnes od nesinonimne, ili gde manji broj nukleotidnih zamena ima veći uticaj na fitnes od većeg broja nukleotidnih razlika.

Tako je model za otpornost na desikaciju u okviru IV EB pokazao da mitohondrijski haplotip kao i MT:NU interakcija statistički značajno utiču na fitnes nosioca samo kod poređenja dva sličnija haplotipa (PQ), koji imaju manji broj mutacionih koraka između sebe, a takođe i dele istu 828 varijantu. Sličan slučaj zabeležen je i u rezultatima modelovanja dužine razvića kod III EB, gde se ispostavilo da mitohondrijski haplotip, kao i MT:NU interakcija, statistički značajno utiču na fitnes samo kod MN parovnog poređenja. Ovde se porede dve haplogrupe M i N koje poseduju O1 varijantu na 828. nukleotidu, a međusobno se razlikuju sa 4 sinonimne zamene, dok se od linije L (O2) razlikuju za po jednu nesinonimnu (828) i dve sinonimne zamene. Parovna poređenja LN iz EB III i OP iz EB IV predstavljaju poređenja dva ista haplotipa, a dobijeni rezultati gotovo da se ne poklapaju ni za jednu ispitivanu komponentu životne istorije.

5. DISKUSIJA

5.1. Varijabilnost mtDNK prirodnih populacija *D. obscura*

U cilju testiranja adaptivnog značaja varijabilnosti mtDNK kod *D. obscura*, najpre je bilo potrebno opisati varijabilnost njenih prirodnih populacija. Nukleotidni diverzitet *Cyt b* gena model vrste *D. obscura* izračunat u okviru ove disertacije je imao širok opseg i kretao se od 0,00146 za populaciju iz Srbije, do 0,00387 za populaciju iz Škotske. Nukleotidni diverzitet *Cyt b* gena populacije *D. subobscura*, od koje su formirane linije korišćene u ovoj disertaciji, i koje su takođe uzorkovane u Srbiji (Erić i sar. 2019) iznosi 0,00087 što predstavlja vrednost sličnu za ovaj gen kod *D. obscura*, posebno kada je reč o populaciji iz Srbije. Ovakav rezultat je u skladu i sa drugim vrstama ovog roda: *D. melanogaster* - 0,0009, *D. simulans* - 0,0003, *D. yakuba* - 0,0014 (Ballard i Kreitman 1994), dok su (Castro i sar. 2010) zabeležili slične vrednosti nukleotidnog diverziteta (od 0,00092 do 0,00266), analizirajući *ND5* gen.

Za razliku od *D. subobscura*, gde su dva najučestalija mtDNK haplotipa ravnomerno zastupljena širom areala ove vrste (Afonso i sar. 1990; Castro i sar. 1999), kod *D. obscura* se učestalosti dve glavne haplogrupe (koje se razlikuju na 828. mestu), drastično razlikuju na istoku i zapadu Evrope. O2 varijanta je visoko učestala u istočnom delu areala, tj. Srbiji (0,875) i Finskoj (0,750), dok se ova varijanta u Škotskoj javlja samo sporadično (0,083). Populacija iz Nemačke imala je slične učestalosti O1 i O2 varijanti, što ukazuje da je distribucija haplotipova u centralnoj Evropi između istočno evropskih i zapadno evropskih populacija. Obzirom da je broj analiziranih jedinki iz Nemačke populacije relativno mali u poređenju sa ostalim analiziranim populacijama, ostaje doza rezerve da li uzorak adekvatno opisuje varijabilnost u toj populaciji.

Varijabilnost je značajno niža u istočnom delu areala, što je posledica toga da se svi haplotipovi koji dele O2 varijantu na poziciji 828, od izvornog O2 razlikuju za po jednu nukleotidnu supstituciju, sem jednog haplotipa kojeg od O2 dele dva mutaciona događaja. Sa druge strane, haplotipovi unutar O1 grupe, u većini slučajeva imaju više od jedne nukleotidne promene u odnosu na česti O1 haplotip. U haplotipskoj mreži dominiraju dve zvezdaste formacije haplotipova formirane oko dva najučestalija haplotipa O1 i O2, sa još nekoliko manjih zvezdastih oblika formiranih od ređih haplotipova.

Iako mreža haplotipova pokazuje dve haplogrupe bazirane oko haplogrupa O1 i O2, Bajesova filogenija nije jasno razgraničila filogeniju na ove dve grupe. Pošto su sekvence *Cyt b* gena izrazito evoluciono očuvane, broj razlika između haplotipova je mali. Stoga ova metoda nije mogla da razreši čvorove filogenetskog stabla sa sigurnošću, već su posteriorne verovatnoće bile niske ($PP < 0,5$). Bajesova filogenija je pokazala da su haplotipovi koji poseduju „O1“ varijantu na 828. nukleotidnoj poziciji predački odnosno, bliži sekvencama *Cyt b* gena srodne vrste *D. ambigua*, koja je korišćena kao *out* grupa prilikom analize. Ova metoda je grupisala sekvence koje dele „O2“ varijantu zajedno, ali su verovatnoće ovih grana nedovoljno visoke da bi se izveo verodostojan zaključak.

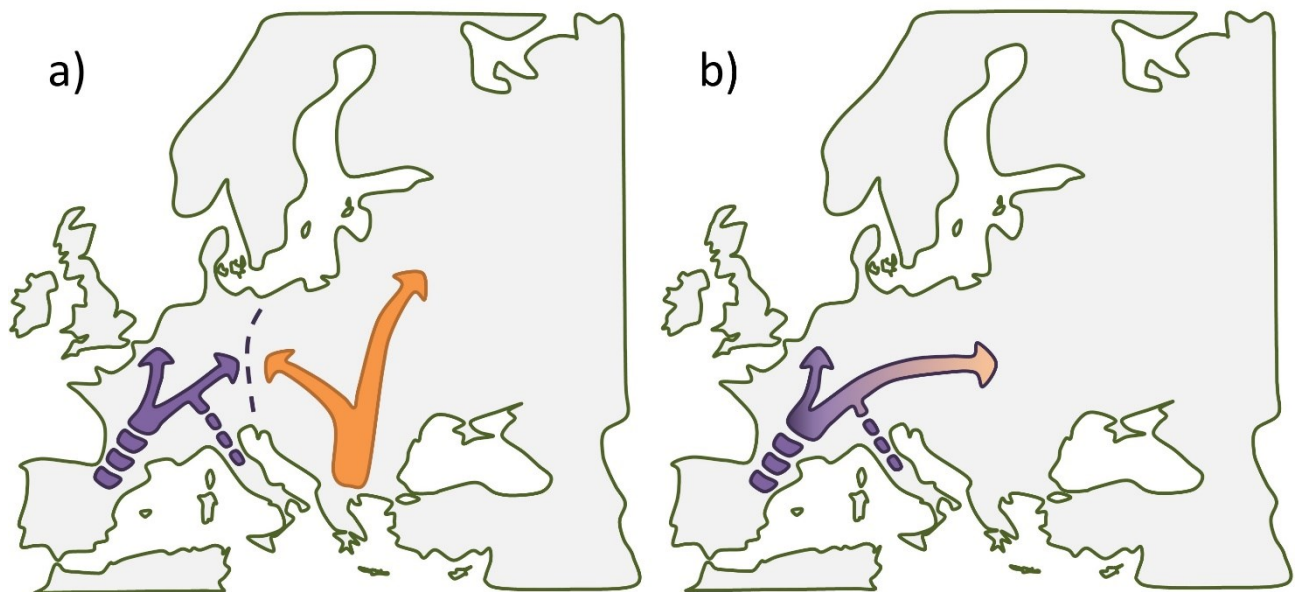
Analiza grafika parova nukleotidnih razlika pokazala je dve različite distribucije karakteristične za istočni i zapadni areal ove vrste. Škotsku populaciju odlikuje najveći stepen genetičkog diverziteta pa je grafik pokazao najveći pik između 2 i 3 nukleotidne razlike i još 2 manja

na većem broju razlika. Ovakva distribucija najbliže odgovara predviđanjima karakterističnim za model fluktuiranja veličine populacije (engl. *growth – decline model*). Kako je varijabilnost dosta niža u populaciji iz Srbije, pik na grafiku je na vrednosti od 0 parovnih razlika, uz još jedno malo uzvišenje na 3 parovne razlike koje odgovara malom broju sekvenci iz O1 grupe u ovoj populaciji. Ovakva distribucija donekle odgovara očekivanim vrednostima scenarija konstantne veličine populacije, ali i modela fluktuiranja veličine populacije, premda se očekivana linija oba scenarija poklapa kod populacije iz Srbije. Populacije iz Finske i Nemačke odlikuju se bimodalnim distribucijama koje se nalaze između distribucija karakterističnih sa populacije Srbije i Škotske, gde njihove distribucije ne odgovaraju nijednom od dva populaciona scenarija. Populacija poreklom iz Finske ipak je dosta sličnija populaciji iz Srbije, gde se i dalje najveći vrh distribucije nalazi na 0 supstitucija, dok se drugi vrh nalazi na 3 parovne razlike, gde i populacija iz Srbije ima malo uzvišenje. Populacija iz Nemačke pokazala je jasniju bimodalnu distribuciju sa dva pika podjednake visine, što je posledica njene centralno Evropske pozicije, i posedovanja obrazaca varijabilnosti i istočnih i zapadnih populacija *D. obscura*.

Uočeni višak retkih mutacija, kao i veći broj segregacionih mesta u sekvencama *Cyt b* gena od očekivanog, je zaslužan za negativne vrednosti parametara testova koji mere odstupanje distribucije haplotipova od neutralnosti. Indeksi svih testova (Tadžima, Fu, Fu i Li, Fej i Vu) koji mere odstupanje od neutralnosti (engl. *mutational-drift equilibrium*) bili su negativni kao posledica uočenog viška *singltona* (različitih varijanti koje su retke). Iako nisu svi parametri kod svih populacija bili statistički značajni, negativan trend ukazuje na rast populacije ili delovanje pročišćujuće selekcije. Kada je reč o MekDonald Krajtmanovom testu, zabeležene pozitivne vrednosti u svim populacijama, posledica su manje učestalosti nesinonimnih zamena unutar vrste u odnosu na njihov broj između vrsta. Ovakav rezultat je karakterističan pečat delovanja pozitivne selekcije i u skladu je sa istim analizama mtDNK kod drugih vrsta roda *Drosophila* (Kaneko i sar. 1993; Rand i sar. 1994), pogotovo kada je *Cyt b* gen u pitanju (Ballard i Kreitman 1994; Erić i sar. 2019). Slični rezultati dobijeni su analizom mitohondrijskih gena kod različitih vrsta miševa (Nachman i sar. 1994) kao i primata (Nachman i sar. 1996; Templeton 1996). Odstupanje zabeleženo u ovom istraživanju se može tumačiti u svetlu skoro neutralističkog modela (engl. *nearly neutral model*) (Ohta 1973; 1992a; 1992b). Ova modifikacija neutralističkog modela, predviđa da mutacije uočene u populaciji imaju normalnu raspodelu oko selektivne neutralnosti, što većinu ovih varijanti čini blago štetnim, ili blago korisnim. Njihov fenotipski efekat nije dovoljno veliki da bi ih selekcija efikasno fiksirala ili odstranila iz populacije, pa se zadržavaju neko vreme u populacijama i predstavljaju najveći deo detektovanih polimorfizama, ali ne doprinose divergenciji (Nachman 1998; Weinreich i Rand, 2000; Meiklejohn i sar. 2007). Selekcija sprečava starije blago štetne polimorfizme da budu rodonačelnici novih linija (Grant 2015). Ovo tumačenje može biti relevantno za haplotipski diverzitet populacije iz Škotske. Sa druge strane nedavna povećanja efektivne veličine populacije mogu ostaviti prividan signal pozitivne selekcije, ukoliko su mutacije u pitanju blago štetne i ukoliko nema selekcije za sinonimne kodone (Eyre-Walker, 2002). Ovaj scenario može biti važan za istočno evropske populacije, i haplotip O2 čija bi mreža haplotipova bila posledica skorašnjeg povećanja veličine populacije.

Različite učestalosti mtDNK haplotipova u istočnom i zapadnom delu areala mogu ukazivati na post-glacijalnu kolonizaciju iz dva različita refugijuma. Centralno evropska populacija iz Nemačke, koja predstavlja mešavinu istočne i zapadne populacije, u potpunosti odgovara ovom scenariju. Balkansko poluostrvo, poznato kao post-glacijalni refugijum mnogih vrsta, predstavljalo bi hipotetički izvor haplotipa O2, dok bi O1 poticao sa Pirinejskog ili Apeninskog poluostrva. Grafici parovnih promena nedvosmisleno pokazuju dva vrha karakteristična za dve različite linije porekla. Ovakav scenario post-glacijalne kolonizacije odgovara onom koji je karaktersističan, na primer, za evropskog ježa (Hewitt 2004).

EBSP analiza pokazala je različita vremena ekspanzije populacija za populacije iz Srbije i Škotske. Iako su intervali poverenja jako široki, na graficima se može uočiti da je populacija iz Srbije doživela ekspanziju pre oko 1200 godina, dok je u Škotskoj ta ekspanzija počela pre oko 8000 godina. Iz ovoga proističe pitanje, kako je moguće da dva refugijuma imaju toliko različita vremena ekspanzija populacija posle poslednjeg glacijalnog maksimuma? Pored toga, različiti nivoi varijabilnosti u istočnom i zapadnom arealu mogu biti indikator drugog post-glacijalnog scenarija. U ovom drugom scenariju, koji se poklapa sa hipotetičkim scenarijom karakterističnim za mrkog medveda (Hewitt 2004), Jugozapadna Evropa predstavljala bi jedini refugijum za vrstu *D. obscura*. Prema ovom scenariju vrsta se postepeno širila ka istoku, prema takozvanom *stepping stone* modelu. Ovakav model savršeno odgovara različitim vremenima ekspanzije populacija, gde zapadna ekspanzija, zaista predstavlja povećanje veličine populacije posle poslednjeg glacijalnog maksimuma, dok je na istoku to bila neka skorija ekspanzija po osvajanju Balkanskog poluostrva. Dva scenarija populacione ekspanzije posle ledenih doba prikazana su na slici D1. Visoka učestalost O2 u istočnom delu areala mogla bi se pripisati efektu uskog grla, što bi posle proizvelo zvezdastu formaciju mladih haplotipova koji potiču iz O2. *Drosophila obscura* je na Balkanskom poluostrvu učestalija na višim nadmorskim visinama, dok je na severu raširena svuda. Iz tog razloga su populacije u južnim delovima više izolovane, pa je protok gena manji, a uticaj genetičkog drifta veći. Ovo može biti razlog zbog kojeg je haplotip O2 dostigao ovako visoku učestalost na Balkanu. Postoje dve mogućnosti, da se sa Balkana potom raširio na severoistok Evrope, ili da je istovremeno povećavao svoju učestalost, kako na jugoistoku, tako i na severoistoku Evrope.



Slika D1. Dva Scenarija post-glacijalne ekspanzije za vrstu *D. obscura*. a) kolonizacija iz dva refugijuma; b) kolonizacija isključivo iz zapadnog refugijuma. Objavljeno u Erić i sar. 2022a.

Važno je naglasiti, da su vremena ekspanzija dobijena u ovom radu, gruba procena dobijena korišćenjem stope mutacija izmerene za srodnu vrstu *D. melanogaster* (Haag-Liautard i sar. 2008), kao i konstantnog broja generacija tokom godina (Begon 1978). Činjenica je da godišnji broj generacija jako varira između različitih populacija i različitih klimatsko-geografskih uslova, a nema sumnje da su klimatsko-geografski uslovi značajno varirali od poslednjeg glacijalnog maksimuma do danas (Shakun i Carlson 2010).

Takođe, od velike je važnosti napomenuti da *D. obscura*, kao i njoj srodna *D. subobscura* (Castro i sar. 2010; Christie i sar. 2010; Erić i sar. 2019), u većoj ili manjoj meri prolazi kroz godišnje kontrakcije i ekspanzije populacija tokom leta ili zime u zavisnosti od klimatskih uslova. Ovakve godišnje populacione fluktuacije mogu maskirati pečat drevne post-glacijalne ekspanzije i biti razlog beleženja relativno skore ekspanzije populacije iz Srbije.

Bolje rasvetljavanje demografske istorije ove vrste zahtevalo bi, pre svega, uzorkovanje jedinki iz dva potencijalna refugijuma, Pirinejskog i Apeninskog poluostrva, kao i korišćenje većeg broja genetičkih markera (Rosenberg 2002).

Pored toga što je sekvenciranje mikrobioma isključilo mogućnost infekcije bakterijskim mikroorganizmima koji mogu kompromitovati pravilno izvođenje zaključaka o faktorima koji oblikuju mtDNK varijabilnost, ova analiza je po prvi put dala informacije o mikrobioti koja se javlja kod vrste *D. obscura*. Sekvenciranje mikrobioma je pokazalo da u uzorcima *D. obscura* preovladavaju rodovi *Lactobacillus* i *Acetobacter*, koji predstavljaju česte rodove u laboratorijskim uzorcima *D. subobscura* i *D. melanogaster* (Beribaka i sar. 2020; 2021), ali za razliku od ove dve vrste, *D. obscura* je pokazala značajno niži diverzitet bakterijskih rodova.

5.2. Eksperimenti životne istorije

5.2.1. Opšti pregled uticaja osnovnih faktora i sumiranje njihovih interakcija na osobine životne istorije kod obe model vrste

Temperatura (sa svetlosnim režimom) se pokazala kao daleko najuticajni faktor u eksperimentima otpornosti na desikaciju, dužinu razvića, kao i preživljavanje. Ovakva uloga temperature za fitnes komponentu otpornost na desikaciju je bila očekivana, pošto je poznato da je metabolizam brži na višoj temperaturi i da sva živa bića brže gube vodu sa porastom temperature (Schulte 2015). Insekti, kao poikilotermne životinje, zavise od spoljašnje temperature koja pokreće enzime koji učestvuju u hemijskim reakcijama neophodnim za njihovo složeno razviće (Taylor 1981), pa stoga činjenica da je temperatura krucijalni faktor kod dužine razvića ne treba da iznenađuje. Pored toga, poznato je i da insekti ne mogu završiti svoje razviće ispod ili iznad nekog temperaturnog praga, pa se tako definišu gornji i donji prag, kao i optimalna temperatura za razvoj i preživljavanje insekatskih vrsta (Infante 2000). Stoga je jasna uloga i značajnost temperature u eksperimentima preživljavanja jedinki od jajeta do stadijuma adulta.

Pol se kod obe model vrste takođe pokazao kao važan faktor koji utiče na preživljavanje uslova desikacije u velikom broju modela. Ženke su generalno duže preživljavale sušne uslove u svim modelima, što takođe ne iznenađuje, budući da je davno utvrđeno da je ova osobina polno dimorfna i da su ženke te koje imaju prednost u preživljavanju desikacionog stresa, prvenstveno zbog morfoloških karakteristika, poput većeg tela (Kalmus 1941; Eckstrand i Richardson 1980; Da Lage i sar. 1989; Matzkin i sar. 2007; Ferveur i sar. 2018). Veće telo podrazumeva manji odnos površine i zapremine. Zbog toga što su ženke *Drosophila* krupnije od mužjaka, mužjaci imaju veći odnos površine tela u odnosu na zapreminu (Testa i sar. 2013), pa su samim tim više izloženi sredinskim uslovima i teže im je da zadrže vodu u uslovima desikacije (Ferveur i sar. 2018). Sa druge strane, u eksperimentu dužine razvića, pol jeste bio značajan ali ne u tolikoj meri kao u eksperimentu

desikacije. Literaturni podaci navode da je i dužina razvića polno dimorfna osobina kod roda *Drosophila*, i da ženke imaju 2-4% brže razviće (Powsner 1935; Bainbridge i Bownes 1981; Anderson 1966; Mossman i sar. 2016). Kod *D. subobscura* ženke su se razvijale oko 1% brže na obe eksperimentalne temperature ($p=0,0037$), što je uporedivo sa rezultatima dobijenim na srodnim vrstama u prethodno navedenoj literaturi. Suprotno tome, kod *D. obscura* uočeno je da su mužjaci imali 0,12% brže razviće ali ova razlika nije bio statistički značajan ($p=0,6787$). Iako ova osobina nije ranije ispitivana kod *D. obscura*, ovaj nalaz nije u skladu sa literaturnim podacima dobijenim za druge vrste roda *Drosophila*. Razlog za odsustvo polnog dimorfizma za dužinu razvića kod *D. obscura* može biti posledica same biologije ove vrste, koja nije dovoljno istražena. U svim eksperimentima zabeležen je veći uticaj jedarne pozadine u odnosu na mitohondrijski haplotip, što je i očekivano zbog nesagledivo veće složenosti i količine DNK informacije koju jedarni genom sadrži u odnosu na mitohondrijski. Broj modela u kojima su faktori i njihove interakcije bile značajne za komponente otpornost na desikaciju i dužina razvića kod obe vrste sumirani su u tabeli D1 radi preglednijeg sagledavanja diskusije, dok su za komponente preživljavanje od jajeta do adulta i procenat mužjaka predstavljeni u tabeli D2.

Tabela D1. Broj modela u kojima su pojedinačni faktori i njihove interakcije značajne naspram ukupnog broja modela kod dve model vrste za komponente otpornosti na desikaciju i dužina razvića. Faktori i interakcije čije tumačenje je važno za ispunjavanje ciljeva teze i koji su posebno diskutovani su dati boldom.

Eksperiment	Desikacija				Dužina razvića			
	<i>D. subobscura</i>		<i>D. obscura</i>		<i>D. subobscura</i>		<i>D. obscura</i>	
Model vrsta								
Tip modela	Kvartetni	Ukupni	Parovni	Ukupni	Kvartetni	Ukupni	Parovni	Ukupni
MT	3 11	0 1	6 12	2 4	0 10	0 1	7 12	2 4
NU	6 11	1 1	5 7	1 1	5 10	0 1	7 12	4 4
pol	10 11	1 1	6 11	3 4	2 10	1 1	6 12	3 4
T	7 7	0 0	7 7	1 2	10 10	1 1	12 12	4 4
MT:NU	3 11	0 1	8 12	4 4	3 10	0 1	6 12	3 4
MT:pol	1 11	0 1	7 12	3 4	0 10	0 1	2 12	0 4
NU:pol	5 11	1 1	6 12	2 3	1 10	0 1	1 12	2 4
MT:T	1 11	0 1	9 12	3 4	0 10	0 1	3 12	2 4
NU:T	2 11	1 1	5 10	2 3	1 10	0 1	8 12	3 4
pol:T	2 11	1 1	8 12	2 4	0 10	0 1	2 12	1 4
MT:NU:pol	3 11	0 1	2 12	4 4	0 10	0 1	2 12	0 4
MT:NU:T	3 11	1 1	8 12	1 4	0 10	0 1	3 12	1 4
MT:pol:T	2 11	0 1	4 12	3 4	0 10	0 1	1 12	0 4
NU:pol:T	1 11	0 1	5 12	2 4	1 10	0 1	1 12	1 4
MT:NU:pol:T	1 11	0 1	5 12	3 4	0 10	0 1	2 12	2 4

Tabela D2. Broj modela u kojima su pojedinačni faktori i njihove interakcije značajne naspram ukupnog broja modela kod dve model vrste za komponente preživljavanje od jajeta do adulta i procenta mužjaka. Faktori i interakcije čije tumačenje je važno za ispunjavanje ciljeva teze i koji su posebno diskutovani su dati boldom.

Eksperiment	Preživljavanje od jajeta do adulta				Procentat mužjaka			
	<i>D. subobscura</i>		<i>D. obscura</i>		<i>D. subobscura</i>		<i>D. obscura</i>	
Model vrsta								
Tip modela	Kvartetni	Ukupni	Parovni	Ukupni	Kvartetni	Ukupni	Parovni	Ukupni
MT	5 11	1 1	8 12	4 4	2 11	0 1	3 12	2 4
NU	9 11	1 1	12 12	4 4	5 11	0 1	5 12	3 4
T	11 11	1 1	9 12	4 4	0 11	1 1	3 12	1 4
MT:NU	7 11	1 1	9 12	4 4	1 11	0 1	4 12	3 4
MT:T	2 11	0 1	8 12	4 4	0 11	0 1	2 12	1 4
NU:T	3 11	0 1	7 12	3 4	0 11	0 1	6 12	2 4
MT:NU:T	3 11	0 1	6 12	4 4	0 11	0 1	3 12	2 4

5.2.1.1. Uticaj analiziranih faktora na osobine životne istorije kod *D. subobscura*

Kada su rezultati eksperimenata komponenti životne istorije u pitanju, kod vrste *D. subobscura*, dobijen je manji broj jasnih trendova nego kod druge model vrste. Teorijska pretpostavka iz rada (Christie i sar. 2010), da je razlog godišnjih fluktuacija učestalosti dva najčešća haplotipa njihova prilagođenost na različite temperature, nije potvrđena u eksperimentima sprovedenim u okviru ove disertacije. Kada se posmatra ceo skup podataka, dva haplotipa, kao i njihove specifične mito-jedarne kombinacije, nisu se pokazali kao prilagođeniji određenoj temperaturi, već se situacija menjala od kvarteta do kvarteta. U nekim kvartetima je jedan haplotip pokazao više fitnes vrednosti od drugog na višoj temperaturi, dok bi u drugim kvartetima situacija bila obrnuta, pa se nisu mogli izvesti opšti zaključci.

U literaturi se mogu pronaći radovi koji su pronašli značajne razlike u adaptivnoj prednosti jednog od dva haplotipa, u kontekstu određene analizirane komponente životne istorije. Tako je (Castro i sar. 2003) pokazao veći fertilitet jedinki haplotipa I. Suprotno ovome (Christie i sar. 2003) su koristeći iste eksperimentalne linije pak pokazali superiornost haplotipa II u otpornosti na desikaciju, preživljavanju od larve do adulta kao i dužini razvića. Važno je napomenuti da u ovim eksperimentima nisu testirane mito-jedarne kombinacije, već isključivo mtDNK haplotipovi, na svojim izvornim jedarnim pozadinama. Ipak, ista grupa autora nije mogla da potvrdi rezultate dobijene u ove dve studije, kako na uniformnoj jedarnoj pozadini nisu zabeležili adaptivne prednosti haplotipova I i II, u različitim komponentama životne istorije (Christie i sar. 2011).

Jedina analizirana komponenta u kojoj je jedan od haplotipova pokazao statistički značajnu prednost u ovoj disertaciji kod *D. subobscura*, jeste upravo preživljavanje od jajeta do adulta gde su jedinke haplotipa I (a) pokazale nešto višu stopu preživljavanja. Ono što je zanimljivo kod ove komponente jeste da se na obe eksperimentalne temperature najvrijabilnijom pokazala mito-jedarna kombinacija aC. Kod preživljavanja jedinke sa jedarnom pozadinom C bila su daleko uspešnije od jedinki sa jedarnom pozadinom A. Isto tako su jedinke sa mitohondrijskim haplotipom a bile uspešnije od jedinki sa mtDNK haplotipom c, što je doprinelo da aC bude najvrijabilnija genotipska kombinacija.

5.2.1.2. Uticaj analiziranih faktora na osobine životne istorije kod *D. obscura*

U okviru prvog bloka je potvrđena hipoteza da poređenje najrazličitijih haplotipova (A i C) pokazuje najveće razlike između fitnesa nosilaca različitih kombinacija ovih haplotipova. Pokazalo se da je uticaj mtDNK haplotipa na fitnes dosta veći nego kada je u pitanju poređenje dva srodnija haplotipa (B i C), koji dele istu varijantu na 828. nukleotidnoj poziciji. Kada su ostala tri eksperimentalna bloka u pitanju, neki modeli su pokazali pozitivnu korelaciju između broja nukleotidnih supstitucija koje razdvajaju dva haplotipa i razlike u adaptivnoj vrednosti između njih, dok kod drugih to nije bio slučaj. Generalno govoreći, za očekivati je da veći broj nukleotidnih razlika za posledicu ima veće fenotipske razlike, iako to ne mora uvek da bude slučaj. Takođe, bitno je istaći, da je u okviru ove teze za *D. obscura* sekvenciran isključivo *Cyt b* gen, pa su sve ostale nukleotidne razlike u mtDNK sekvencama analiziranih haplotipova ostale nepoznate. Stoga kada se poziva isključivo na sekvencu *Cyt b* gena i kaže da su dva haplotipa sličnija, to ne mora nužno važiti za celokupnu mtDNK sekvencu. U okviru ova tri EB, modeli određenih komponenti pokazuju veće fitnes razlike između, haplotipova koji se razlikuju sinonimnom supstitucijom, u odnosu na haplotipove koji se razlikuju nesinonimnom. Iako se dugo verovalo da tihe mutacije ne mogu imati uticaja na fitnes, danas se zna da one mogu imati efekat na fenotip, koji ponekad čak može biti veći nego kod zamenskih mutacija (Bailey i sar. 2021). Sinonimne mutacije ne izazivaju aminokiselinske zamene ali mogu uticati na stabilnost iRNK, brzinu translacije kao i na sklapanje u odgovarajuću konformaciju i post translacione modifikacije proteina (Hurst 2011; Jiang i sar. 2022). U okviru III i IV EB postojalo je isto poređenje dva haplotipa, međutim dobijeni rezultati se ne poklapaju u gotovo nijednoj ispitivanoj osobini životne istorije. Ipak, važno je diskutovati ove nalaze u svetlu porekla populacija. Linije su poreklom iz potpuno različitih populacija, te iako imaju identične *Cyt b* haplotipove za očekivati je da imaju niz drugih razlika u mtDNK sekvencama van ovog jednog analiziranog gena. Osim toga, kako potiču iz različitih populacija, verovatno poseduju potpuno drugačije jedarne pozadine, što se može uočiti i iz velikog broja modela u kojima je jedarna pozadina značajna, pa ove razlike u rezultatima nisu toliko iznenađujuće.

Još pre sprovođenja eksperimenata analize fitnes komponenti, tokom niza povratnih ukrštanja, uočen je neočekivano veliki udeo ženki u linijama M i O. Ova neuravnoteženost je bila posebno izražena u liniji M gde su mužjaci predstavljali samo oko 5% odraslih jedinki, pa nije bilo moguće skupiti dovoljan broj mužjaka za ukrštanja, ali i za same eksperimente analize fitnesa. Ovaj efekat je očigledno povezan sa jedarnom pozadinom, jer se javljao kod gotovo svih linija koje dele određenu jedarnu pozadinu. U trećem eksperimentalnom bloku neuravnoteženost polova zabeležena je samo u eksperimentalnim linijama sa jedarnom pozadinom M (LM, MM, NM). Neuravnotežen odnos polova zabeležen je i u EB IV ali dosta manjeg obima, ali i pravilnosti, kako je ovaj efekat zabeležen na linijama sa O jedarnom pozadinom ali i u OQ liniji koja ima O mtDNK i Q jedarnu pozadinu. Takođe zabeležene su značajne razlike u odnosu polova ovih eksperimentalnih linija između dve eksperimentalne temperature. Samo u jednom slučaju je procenat mužjaka bio niži od 12% u QO liniji na 20°C, dok je ista linija na nižoj temperaturi imala oko 40% mužjaka.

Materinski nasleđeni mikroorganizmi mogu uticati na odnos polova (Rousset i sar. 1992; Stouthamer i sar. 1993; Jiggins i sar. 2001; Hiroki i sar. 2002), a pošto imaju isti način nasleđivanja kao mitohondrije, disbalans polova bi u tom slučaju bio povezan sa mtDNK haplotipom, što nije bio slučaj u ovoj disertaciji. Dodatno, molekularno genetičkim metodama isključena je mogućnost prisustva ovih mikroorganizama u eksperimentalnim linijama. Zanimljivo je da eksperiment preživljavanja nije pokazao da linije sa jedarnom pozadinom M imaju niže preživljavanje od jajeta do adulta od ostalih linija iz trećeg EB. Naprotiv, na nižoj eksperimentalnoj temperaturi, linije sa M

jedarnom pozadinom su imale najvišu stopu EtA preživljavanja u ovom eksperimentalnom bloku. Iz ovoga se može zaključiti da je već po polaganju jaja odnos polova bio pomećen u korist ženki.

Kada je u pitanju nejednak odnos polova povezan sa jedarnom pozadinom, kao u konkretnom slučaju linije M, najverovatniji uzrok je mehanizam mejotičkog vođenja. Zanimljivo je napomenuti da je ovaj tip intragenomskog konflikta prvi put zabeležen upravo na vrsti *D. obscura* (Gershenson 1928). Gershenson je eksperimentima utvrdio da kod linija kod kojih je zabeležio odstupanje od ravnomerne zastupljenosti polova, gen lociran na X hromozomu, sprečava razvoj vijabilnih spermatozoida sa Y hromozomom. Ovi geni nazvani drajveri (engl. *driver genes*) manipulacijom mejoze povećavaju svoju učestalost u sledećoj generaciji, bez obzira na fenotipsku ekspresiju i adaptivni značaj. Mejotičko vođenje, kao i sebični genetički elementi koji ga izazivaju, zabeleženi su i opisani kod velikog broja vrsta. Istraživanja na vrstama roda *Drosophila*, utvrdila su postojanje nekoliko molekularnih mehanizama pomoću kojih mejotičko vođenje može izazivati disbalans odnosa polova (McKee i sar. 1998; Cazemajor i sar. 2000). Trenutna teorijska saznanja (Hiraizumi 1993; Tao i sar. 2007) opisuju da je stepen disbalansa odnosa polova zavisao od temperature, gde pri višim temperaturama, sebični genetički element ili tzv. *drajver* u većem procentu deaktivira spermatozoide sa Y hromozomom. Rezultati ovog istraživanja idu u prilog ovoj teoriji, jer je prosečno zabeležen veći procenat mužjaka na nižoj temperaturi, što je posebno uočljivo u liniji MM (15°C), gde je flakon imao u proseku 12% mužjaka. Sa druge strane, flakoni linije MM na višoj temperaturi imali su u proseku samo oko 2% mužjaka.

Iako je odnos polova u startu bio značajno pomećen u nekim eksperimentalnim linijama, verovatno usled efekta mejotičkog vođenja, dizajn ovog eksperimenta je omogućio da se zabeleže i izmere efekti koje mitohondrijski haplotip, jedarna pozadina, kao i njihova interakcija imaju na preživljavanje izleženih jedinki oba pola, čak i u linijama u kojima je očekivani odnos polova bio narušen.

5.2.2. Uticaj mtDNK varijabilnosti i mito-jedarnih interakcija na analizirane komponente životne istorije kod obe model vrste

Eksperimenti na model vrsti *D. subobscura* generalno nisu pokazali kauzalnu vezu između mtDNK haplotipa ili mito-jedarnih kombinacija i fitnesa jedinki, osim za komponentu preživljavanja od jajeta do adulta, tj. vijabiliteta. Eksperiment vijabiliteta kod *D. subobscura* jedini je imao ova dva faktora značajna u ukupnom modelu, kao i u približno polovini kvartetnih modela (5/11 i 7/11). U ostalim komponentama MT i MT:NU bila su značajna u po par pojedinačnih kvarteta. Iako kod *D. subobscura* nije uočen mitohondrijski i mito-jedarni efekat na fitnes u ukupnim modelima kod većine komponenti, statistička značajnost ovih efekata u nekoliko pojedinačnih kvarteta ide u prilog adaptivnom značaju mtDNK varijabilnosti. Iako ova varijabilnost verovatno ne podrazumeva osnovne razlike između dva glavna haplotipa, već razlike specifične za kombinacije haplotipova u okviru posebnih kvarteta, odnosno varijabilnost celokupne mtDNK.

Sa druge strane, kada su eksperimenti na *D. obscura* u pitanju, dobijen je veći broj značajnosti za oba diskutovana faktora u svim analiziranim komponentama. Po pravilu u svim eksperimentima, osim procenta mužjaka gde su svi faktori polno specifični (pa će biti diskutovani u sledećem poglavlju), većina parovnih i blokovskih modela je imala i MT i MT:NU kao statistički značajne faktore.

Rezultati ove disertacije slažu se sa sve većim brojem radova (Ballard i Kreitman 1994; Nachman i sar. 1996; Ballard i Whitlock 2004; Wolff i sar. 2016a; Pichaud i sar. 2012; Ballard i Pichaud 2014; Dowling 2014; Kern i Hahn 2018) koji opovrgavaju teoriju striktnosti neutralnosti mtDNK. Podaci dobijeni iz eksperimenata na obe model vrste, pogotovo kod *D. obscura*, i pojedinačnim kvartetima *D. subobscura* govore u prilog adaptivnom značaju unutarpopulacione varijabilnosti mtDNK sekvence. Takođe kod obe vrste, rezultati su pokazali da su mito-jedarne interakcije važnije kao jedinice delovanja selekcije od samih mtDNK haplotipova, što je u skladu sa prethodno objavljenim radovima (Dowling i sar. 2007a; b; Mossman i sar. 2016). Kada gledamo uopšteno kod obe model vrste, u gotovo svim analiziranim komponentama životnih istorija, MT:NU interakcija je značajna u većem broju modela u odnosu na mtDNK kao faktor. Budući da su kod model vrste *D. obscura* analizirani haplotipovi *Cyt b* gena čiji produkt je deo kompleksa III respiratornog lanca, koji se sastoji od subjedinica koje su kodirane lokusima oba genoma dobijeni rezultati nisu iznenađujući. Sa druge strane kod *D. subobscura*, dva ispitivana mtDNK haplotipa razlikuju se jednom supstitucijom u okviru *ND5* gena, ali i jednom mutacijom u genu koji kodira malu subjedinicu mitohondrijske ribozomalne RNK (12S) (Kurbalija Novičić i sar. 2020). Ovaj RNK molekul zajedno sa 16S RNK i velikim brojem jedarno kodiranih proteina, čini mito-ribozome. Ove riboproteinske strukture zadužene su za translaciju mitohondrijski kodiranih gena. Kako i ovaj za ćeliju krucijalni proces zavisi od bliske uvezanosti dva genoma (Hill 2019), ne treba da čudi što su i kod *D. subobscura* MT:NU interakcije osnovni nivo delovanja selekcije. Mutacije u ribozomalnoj DNK mogu značajnije kompromitovati fitness ukoliko njihov RNK produkt nije kompatibilan sa jedarnim proteinima, pa bi selekcija efikasno delovala protiv njih. Svako postojanje polimorfizama u ovim genima, implicira postojanje odgovarajuće jedarne varijante kompatibilne sa mtDNK polimorfizmima, što ukazuje na postojanje mito-jedarnih koadaptacija održavanih selekcionim mehanizmima.

Između pojedinačnih linija kod obe vrste verovatno postoje i dodatne razlike u sekvencama, u delovima genoma koji nisu genotipizirani, pa i drugi nivoi interakcija mogu biti značajni. Značajnosti interakcije MT:NU u okviru pojedinačnih kvartetnih i parovnih modela ukazuju na prisustvo mito-jedarnih interakcija na ovim specifičnim mestima.

Iako veliki broj eksperimentalnih studija potvrđuje značajan efekat koji mito-jedarne interakcije imaju na fitnes jedinki (Willett i Burton 2003; James i Ballard 2003; Harrison i Burton 2006; Dowling 2007a; b; Arnqvist i sar. 2010; Immonen 2016a; b; Wolf i sar. 2016b; Rand i sar. 2018; Immonen i sar. 2020), u većini je analizirana međupopulacijska varijabilnost (Willett i Burton 2001; James i Ballard 2003; Ellison i Burton 2006; Dowling i sar. 2007b; Camus i Dowling 2018). Neki su čak ispitivali trans-specijske mito-jedarne hibride (Hutter i Rand 1995; Montooth i sar. 2010; Meiklejohn i sar. 2013; Zhu i sar. 2014; Mossman i sar. 2016) kako bi uz pomoć veće divergentnosti između linija bolje mogli da uoče mito-jedarne efekte. Mali je broj studija koji je izučavao efekte mitohondrijske varijabilnosti unutar populacija (Maklakov i sar. 2006; Dowling i sar. 2007a; Jelić i sar. 2015; Kurbalija Novičić i sar. 2015), a njihovi rezultati nisu bili konzistentni kroz eksperimentalne blokove.

Prve studije koje su se bavile efektom mito-jedarne epistaze na fitnes (Clark 1985; Clark i Lyckegaard 1988), analizirale su fekunditet i segregaciju hromozoma, nisu pronašle značajnost ovog efekta unutar populacije, pored uočenih međupopulacionih razlika kod *D. melanogaster*. Koristeći iste eksperimente, Rand i saradnici (2001), su prvi potvrdila mito-jedarne efekte unutar populacija koristeći istu model vrstu. Ipak u ovoj studiji autori su zabeležili veće efekte između populacija nego unutar njih. Ograničenje ovih studija jeste da nisu testirali eksperimentalne linije na prisustvo endosimbionata roda *Wolbachia*, niti ih tretirali tetraciklinom, kako bi uklonili ovog endosimbionta pre eksperimentalne postavke. Zbog toga nisu mogli razdvojiti mtDNK efekte od efekta materinski naslednih endosimbionata u okviru „cito-jedarnih“ efekata kako su ih nazivali.

Generalno i kasnije studije na vrstama roda *Drosophila* koje su poredile linije poreklom iz različitih populacija (James i Ballard 2003; Wolff i sar. 2016b; Camus i Dowling 2018; Rand i sar. 2018), ili čak interspecijske mito-jedarne hibride (Montooth i sar. 2010; Mossman i saradnici 2016) imale su dosta više uspeha u pronalaženju značajnih efekata mitohondrijskih i mito-jedarnih genotipova u eksperimentima osobina životne istorije u odnosu na unutarpopulacione studije. U studiji Camus i Dowling (2018) se kod pet od šest ispitivanih komponenti mtDNK haplotip pokazao kao statistički značajan faktor. Jedna od ovih pet komponenti jeste i preživljavanje od jajeta do adulta, koja je imala ovaj faktor kao statistički značajan kod obe vrste u okviru ove teze. Mossman i saradnici (2016) su pronašli visoko značajan efekat kako mtDNK tako i mito-jedarnih interakcija na dužinu razvića, vijabilnost od jajeta do adulta. Kod komponente odnosa polova nisu našli značajnosti. Ovi efekti su daleko veće magnitude nego efekti dobijeni u okviru ove disertacije posebno kada je reč o model vrsti *D. subobscura*. Ove studije su ipak poredile dosta divergentnije mtDNK haplotipove pa je očekivano efekat mtDNK varijacije neuporedivo veći, nasuprot mtDNK haplotipovima analiziranim u okviru ove teze koji potiču iz iste populacije, i posledično bi trebalo da budu bitno dosta sličniji (Rand i sar. 2001).

Rad Maklakova i sar. (2006) predstavlja jedan od retkih radova u kojima je ispitivan uticaj simpatričke varijabilnosti mtDNK na dužinu života kod ženki *D. melanogaster*, ali u okviru ove studije nisu ispitivali uticaj jedarne pozadine, pa samim tim ni mito-jedarni efekat. Bitno je naglasiti da su u pronašli značajno veći efekat mtDNK na fitness u odnosu na rezultate ove teze. Poznato je da su mitohondrije značajan izvor ROS-a koji oštećuje DNK, ali i druge molekule u ćeliji. Mitohondrijska DNK je sklonija oštećenjima od jedarne DNK, a pored toga oštećenja na mtDNK kao i ROS-om indukovane mutacije mogu izazvati dodatno curenje elektrona i posledično dodatnu proizvodnju ROS-a, što finalno može rezultirati ćelijskom smrću (Mandavilli i sar. 2002). Iz ovog razloga je poznata uloga mitohondrija u procesu starenja (Ballard i Whitlock 2004; Trifunovic i sar. 2004), pa se može diskutovati da je značajniji efekat mtDNK na starenje nego na komponente životne istorije analizirane u okviru ove teze očekivan. Tako je i komponenta koja je u okviru ove disertacije pokazala najveći broj značajnosti mtDNK haplotipa bila otpornost na desikaciju, upravo komponenta koja je od svih analiziranih najviše korelisana sa dugovečnošću (Service i sar. 1985).

Kada je reč o eksperimentima koji su poredili simpatričke mtDNK haplotipove, bitno je spomenuti i rad (Dowling i sar. 2007a) u kome je kod *D. melanogaster* pokazan statistički značajan uticaj mito-jedarnih interakcija na fekunditet ženki. Interakcija dva genoma pokazala se značajnom u sva tri analizirana eksperimentalna bloka, dok se mtDNK haplotip nije pokazao značajnim ni u jednom. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatom ove disertacije gde se generalno kod obe vrste MT:NU interakcija pokazala značajnijom od samog mtDNK haplotipa.

Jelić i sar. (2015) su analizirali komponente životne istorije kod *D. subobscura*, takođe poredeći simpatričke haplotipove. Analizirajući sve četiri komponente koje su analizirane u okviru ove disertacije (otpornost na desikaciju, dužina razvića, vijabilnost od jajeta do adulta i udeo mužjaka) kao i dugovečnost, autori nisu pronašli značajan efekat mtDNK ni mito-jedarnih interakcija ni kod jedne analizirane komponente, sem u okviru jednog eksperimentalnog modula za udeo mužjaka. U ovoj tezi su dobijeni donekle slični rezultati na istoj model vrsti (*D. subobscura*) za sve komponente osim za vijabilitet. Ipak, važno je napomenuti razliku u eksperimentalnom dizajnu između ova dva rada. Jelić i saradnici (2015) nisu imali potpuni dizajn poređenja, već su u okviru prvog bloka poredili haplotip I sa retkim haplotipom D, u okviru drugog bloka haplotip II sa retkim haplotipom D, dok su u okviru trećeg bloka poredili haplotip I i II isključivo na jedarnoj pozadini D. Prva dva bloka imala su potpuni dizajn odnosno sve četiri kombinacije haplotipova (npr. I^I, I^D, D^I i D^D u okviru prvog bloka), dok je treći blok bio nepotpun poredeći isključivo D^I i D^{II}, zbog čega je ovaj blok imao isključivo efekat mtDNK haplotipa, a ne i MT:NU interakciju. Koristeći iste linije Kurbalija Novičić

i sar. (2015) su u dva eksperimentalna bloka pronašli značajan uticaj mtDNK haplotipa na stopu metabolizma, ali ne i mito-jedarnih interakcija. Oba diskutovana rada pronašla su slab efekat mtDNK i mitojedarne varijabilnosti na fitness, koji nije bio baziran na razikama između dva glavna haplotipa nego između glavnih i jednog retkog. Ovakav nalaz u potpunosti odgovara rezultatima na istoj vrsti iz ove teze u svim komponentama osim kod vijabilnosti. Efekti mtDNK i MT:NU su kod ostalih komponenti zabeleženi isključivo na nivou kvarteta ali ne i u ukupnim modelima, ne ukazujući na adaptivni značaj razlika koje razdvajaju haplotipe I i II već varijabilnosti specifične za linije unutar tih kvarteta.

Generalno gledano kod svih analiziranih komponenti životne istorije u okviru ove teze, mito-jedarni hibridi nisu pokazali niži fitness u odnosu na mtDNK haplotipove na sopstvenoj pozadini, kao što bi bilo očekivano i u skladu sa velikim brojem literaturnih podataka (Edmands i Burton 1999; Rawson i Burton 2002; Sackton i sar. 2003; Ellison i Burton 2006; Immonen i sar. 2016b). Mogući razlog za ovo jeste što su u većini navedenih radova mito-jedarne linije formirane ukrštanjem linija iz jako udaljenih populacija, za razliku od ove disertacije gde su sve ukrštane linije poreklom iz iste populacije. U određenim parovnim i kvartetnim poređenjima za određenu komponentu životne istorije mito-jedarni hibridi su zaista imali najniži zabeležen fitness, dok su pak u drugim kvartetima najniži fitness imali mtDNK haplotipovi na sopstvenim jedarnim pozadinama, pa se u ukupnim i blokovskim modelima generalno nije mogao uočiti neki trend. Slično rezultatima ove teze Kilpatrick i Rand (1995), nisu pronašli prednost mtDNK haplotipa na sopstvenoj jedarnoj pozadini, koristeći dve udaljene populacije *D. melanogaster*. Hutter i Rand (1995), takođe nisu pronašli značajne razlike u fitnessu trans-specijskih mito-jedarnih hibrida. Ukrštajući dve srodne vrste (*Drosophila pseudoobscura* i *D. persimilis*), nisu uočili značajne razlike u fitnessu kod jedinki jedne vrste sa mitohondrijama druge i jedinki čistih vrsta. Rezultat koji je takođe u suprotnosti sa većinom objavljenih radova jeste i Dowling i sar. (2007b), koji su koristeći *Callosobruchus maculatus* kao model organizam, u četiri od pet poređenja dobili da su kombinacije različitog mtDNK haplotipa i jedarne pozadine imale značajno kraće vreme razvića u odnosu na podudarajuće kombinacije mtDNK haplotipa i jedarne pozadine. Linije na kojima su oni pokazali više vrednosti fitnessa mito-jedarnih hibrida poreklom su iz različitih populacija, ali kasnije se ispostavilo da korišćeni haplotipovi prirodno segregiraju u istoj populaciji (Kebe i sar. 2016).

Mitohondrije proizvode oko 90% ukupne metaboličke energije kod eukariota, a mito-jedarne interakcije predstavljaju ključ funkcionisanja mitohondrijskog ETC-a koji je osnova energetskog metabolizma (Ballard i Rand 2005). Pored toga mito-jedarne interakcije utiču i indirektno na efikasnost ETC-a kroz regulatorne interakcije. Metabolizam je u srži evolucije komponenti životne istorije, jer na bazičnom nivou fitness predstavlja konverziju resursa iz sredine u potomstvo (Arnqvist i sar. 2010). Zbog toga ne treba da čudi da različite mito-jedarne kombinacije mogu rezultirati potpuno različitim adaptivnim vrednostima. Kada se sve ovo uzme u obzir, jasan je potencijal koji prirodna selekcija ima da moduliše ove intergenomske epistatičke interakcije, i da kroz različite vidove delovanja balansne selekcije održava pozamašan nivo polimorfizama u molekulu mtDNK.

5.2.3. Polno specifični efekat na mitohondrijsku i mito-jedarnu varijabilnost

Pored ispitivanja adaptivnog značaja unutarpopulacione varijabilnosti mtDNK, kao i sagledavanja uticaja mito-jedarnih interakcija na fitness, cilj ove disertacije bilo je i utvrđivanje uloge dva vida balansne selekcije u održavanju mtDNK varijabilnosti. Uticaj polno specifične selekcije sagledavan kroz interakciju pola i mtDNK haplotipa (MT:pol), ali i pola i mito-jedarnih kombinacija (MT:NU:pol) kod otpornosti na desikaciju i dužinu razvića. Sa druge strane, kod fitness komponente

procenat mužjaka, razlike u fitnessu između polova su merene indirektno, gde su efekti mtDNK haplotipa, kao i mito-jedarne kombinacije, svakako bili polno specifični budući da se meri udeo jednog pola, pod pretpostavkom da je normalan udeo polovina.

Kada je polno specifična selekcija u pitanju, kod model vrste *D. subobscura* nije zabeležen pečat ovog tipa balansne selekcije kako interakcije MT:pol i MT:NU:pol nisu bile značajne ni u jednom ukupnom modelu za komponente otpornost na desikaciju i dužinu razvića. Isto tako kod komponente procenat mužjaka, kod koje je ovaj vid selekcije meren indirektno, MT i interakcija MT:NU nisu bile značajne u ukupnom modelu. Pečat polno specifične selekcije pokazalo je tek nekoliko kvarteta, što verovatno ukazuje da ovaj tip balansne selekcije ne održava visoke učestalosti dva glavna haplotipa, već verovatno deluje na mestima specifičnim za svaki od kvarteta.

Ovakav rezultat je u skladu prethodno objavljenim radovima koji su analizirali ove efekte koristeći simpatričke haplotipove *D. subobscura* (Kurbalija Novičić i sar. 2015; Jelić i sar. 2015). Analizirajući stopu metabolizma, Kurbalija Novičić i saradnici (2015) su od polno specifičnih efekata zabeležili značajan efekat isključivo interakcije mtDNK i pola samo u jednom od tri eksperimentalna bloka. Polno specifični efekat mito-jedarnih interakcija nije zabeležen u ovoj studiji. Koristeći iste linije *D. subobscura* kao i prethodna studija, Jelić i saradnici (2015) su ispitivali delovanje polno specifične selekcije koristeći nekoliko komponenti životne istorije. U eksperimentu udela mužjaka pronašli su značajan polno specifični efekat mito-nukleusnih interakcija u jednom od dva eksperimentalna bloka, dok su polno specifični efekat mtDNK haplotipa zabeležili u jednom od tri eksperimentalna bloka. Slično, okviru ove teze u istom eksperimentu polno specifični efekat mito-nukleusnih interakcija zabeležen je samo u jednom kvartetu, dok je polno specifični efekat mtDNK haplotipa zabeležen u dva kvarteta. Sa druge strane u eksperimentu dugovečnosti postojala je statistički značajna interakcija MT:NU:pol u oba eksperimentalna bloka. Kada je reč o eksperimentu desikacije nijedna od prethodno navedenih interakcija koja ukazuje na delovanje polno specifične selekcije nije zabeležena ni u jednom bloku, dok su u ovoj disertaciji ove interakcije bile značajne u jednom odnosno tri od ukupno jedanaest kvartetnih modela. Bitno je napomenuti da su autori analizirali mito-jedarne kombinacije haplotipa I i retkog haplotipa D, odnosno haplotipa II i retkog haplotipa D, pa se većina ovih efekata podrazumevala poređenja haplotipa D. Kao i u slučaju retkog haplotipa D (Kurbalija Novičić i sar. 2015; Jelić i sar. 2015), i u ovoj disertaciji polno specifična selekcija zabeležena je na nivou retkih varijanti specifičnih za pojedinačne kvartete.

Dobijeni rezultat je u skladu i sa prethodnim empirijskim rezultatima na drugim model vrstama, kao što su *D. melanogaster* i *Acanthoscelides obtectus*, gde eksperimenti starenja i dugovečnosti pokazuju najveće razlike između polova (Camus i sar. 2012; Đorđević i sar. 2015). Studije korelacija osobina životnih istorija pokazuju visoku korelisanost između otpornosti na različite stresore i dugovečnosti (Hoffmann i Parsons 1993; Graves i sar. 1992; Hoffmann i Harshman 1999), pa ne treba da čudi da je kod *D. subobscura* u okviru ove teze najveći broj polno specifičnih mito-jedarnih efekata u kvartetnim modelima zabeležen upravo u komponenti otpornosti na desikaciju. Slab signal polno specifične selekcije kod *D. subobscura* ukazuje na selekciju negativno zavisnu od učestalosti (NFDS) kao jedini ili dominantni vid balansne selekcije koji je zaslužan za održavanje učestalosti dva dominantna mtDNK haplotipa (Kurbalija Novičić i sar. 2020).

Sa druge strane kod model vrste *D. obscura*, zabeležen je nešto jači signal ovog tipa selekcije. Naime u eksperimentima desikacije veliki broj modela je pokazao statističke značajnosti dve interakcije (MT:pol i MT:NU:pol) kojima se meri dejstvo polno specifične selekcije. Nešto slabiji signal ovog vida selekcije pokazale su komponente procenat mužjaka, i dužina razvića.

Efekat polno specifične selekcije na mtDNK varijabilnost zabeležen kod *D. obscura* uporediv je sa studijom Camus i sar. (2012). Autori su koristeći dugovečnost i stopu biološkog starenja pokazali značajne razlike u ove dve komponente životne istorije između mužjaka i ženki *D. melanogaster*

nosilaca različitih mtDNK haplotipova. Efekti slične magnitude zabeleženi su i drugim eksperimentima u kojima su korišćene ove linije (Wolf i sar. 2016c; Camus i sar. 2015). U ovim studijama su korišćeni mtDNK haplotipovi poreklom iz velikog broja populacija širom sveta, poredeći ih sve na izogenoj jedarnoj pozadini, pa nije ispitivan efekat mito-jedarnih interakcija, te u tom smislu nije moguće napraviti paralelu sa ovom disertacijom.

Kada su pitanju radovi koji su analizirali unutarpopulacionu mtDNK varijabilnost, Dowling i sar. (2007a), su u eksperimentu udela mužjaka, koristeći *D. melanogaster* u jednom od dva eksperimentalna bloka pronašli polno specifični efekat mito-jedarnih interakcija (MT:NU:pol) dok su u jednom od tri eksperimentalna bloka uočili značajnu MT:pol interakciju. Ipak ove interakcije nisu bile značajne u ukupnom modelu. Ovaj obim značajnosti interakcija u skladu je sa rezultatima komponente procenta mužjaka u ovoj tezi na vrsti *D. obscura* gde je u sličnoj meri potvrđen polno specifični efekat mtDNK varijabilnosti i mito-nukleusnih interakcija.

5.2.4. Prisustvo pečata materinske kletve

Diferencijalno modelovanje po polovima fitnes komponenti, koje su imale MT:pol značajnu interakciju, nije pokazalo veći efekat mtDNK varijabilnosti na fitnes mužjaka u odnosu na ženke. Naprotiv, većina modela pokazala je veći efekat mtDNK varijabilnosti na fitnes ženki. Ovakav nalaz je u potpunoj suprotnosti sa predviđanjima teorije koju su postulirali Frank i Hurst (1996), a koja je kasnije dobila naziv hipoteza materinske kletve (Gemmell i sar. 2004), i velikim brojem prethodno objavljenih empirijskih radova koji pružaju potporu ovoj hipotezi.

Dok određeni broj novijih studija nije zabeležio veći efekat mtDNK varijabilnosti na mužjake (Vaught i sar. 2020; Healy i sar. 2022; Watson i sar. 2022), većina radova je koristeći različite model vrste kao i različite eksperimentalne postavke, u većoj ili manjoj meri dobila rezultate koji se poklapaju sa hipotezom materinske kletve (Rand i sar. 2006; Innocenti i sar. 2011; Camus i sar. 2012; Yee i sar. 2013; Camus i sar. 2015; Đorđević i sar. 2015; Wolf i sar. 2016c; Aw i sar. 2017; Đorđević i sar. 2017; Drummond i sar. 2019). Jedan od retkih radova koji je zabeležio slične rezultate kao ova disertacija jeste studija Mossman-a i saradnika (2016a). Oni su analizirajući seriju komponenti životne istorije kod inter- i intraspecijskih mito-jedarnih hibrida *Drosophila*, takođe zabeležili veći uticaj mtDNK varijabilnosti na ženke. U drugom radu (Mossman i sar. 2016b) su poredili ekspresiju velikog broja gena kod ovih mito-jedarnih linija između polova i takođe zaključili da mtDNK varijabilnost više utiče na ekspresione profile kod ženki nego kod mužjaka, još jednom dobijajući rezultate koji nisu u skladu sa predikcijama hipoteze materinske kletve.

Sa druge strane polno specifični modeli analiziranih komponenti životne istorije u okviru ove teze gotovo su pokazali pravilnost po kojoj je jedarna pozadina znatno više uticala na fitnes mužjaka u odnosu na ženke. Generalno gledano, uticaj jedarne pozadine znatno je viši od uticaja mtDNK na fitnes kod oba pola, usled veće kompleksnosti i daleko većeg broja lokusa koji utiču na sve osobine životne istorije. Teorijske pretpostavke (Maklakov i Lummaa 2013) kažu da bi mužjaci trebalo da vrate najveći deo izgubljenog fitnesa, povratnim kompatibilnim mutacijama u jedarnom genomu gde selekcija prepoznaje njihov fitnes i može povećavati učestalost mutacija koje se pokažu kao povoljne na fitnes mužjaka. Možda upravo tu leži razlog iz kog jedarna pozadina ima više uticaja na fitnes mužjaka.

Analizom radova koji su proučavali efekat materinske kletve može se uočiti da su ograničenja u eksperimentalnim postavkama umnogome uticala na zaključke o postojanju efekta materinske

kletve (Dowling i Adrian 2019). Na to je uticalo nekoliko faktora: Da li korišćena jedarna pozadina kosegregira sa analiziranim mt haplotipovima, zatim kakva je varijabilnost haplotipova, da li su korišćene varijabilne jedarne pozadine, ili izogena za sve. Najveći broj studija koje su ispitivale, i potvrdile efekat materinske kletve kod *Drosophila*, analizirale su mtDNK haplotipove *D. melanogaster* na jednoj izogenoj jedarnoj pozadini (W^{1118}), koja u prirodi ne segregira zajedno sa ispitivanim mtDNK haplotipovima (Innocenti i sar. 2011; Camus i sar. 2012; Yee i sar. 2013; Camus i sar. 2015; Wolf i sar. 2016c; Aw i sar. 2017). Dodatno ova jedarna pozadina je manipulirana da bude što homozigotnija. Svi ovi radovi su analizirajući različite komponente životne istorije, ili aktivnosti OXPHOS enzima utvrdili veći uticaj mtDNK haplotipova na fitnes mužjaka u odnosu na ženke. Ipak dodatni eksperimenti (Aw i sar. 2017; Patel i sar. 2016), su pokazali da ukrštanjem eksperimentalnih linija sa jedinkama iz različitih prirodnih populacija, štetni efekti mtDNK po mužjake nestaju, ukazujući da sve prirodne populacije sadrže jedarne polimorfizme koji vraćaju izgubljeni fitnes mužjacima.

Smatra se da je značajno teže uhvatiti efekte materinske kletve ukrštanjem linija poreklom iz iste populacije (Dowling i Adrian 2019) kao što je rađeno u okviru ove disertacije. Kada se mtDNK haplotipovi porede na izogenoj jedarnoj pozadini (Camus i sar. 2012; Camus i sar. 2015; Wolf i sar. 2016c), koja nije koevoluirala ni sa jednim od korišćenih mtDNK haplotipova, mužjaci nemaju kako da povrate izgubljeni fitnes, pa su štetni efekti fiksiranih mtDNK mutacija očigledni. Dodatno, korišćena izogena jedarna pozadina ima sve lokuse u homozigotnom stanju, dok korišćenjem neke prirodno segregirajuće jedarne pozadine, koja je heterozigotna na velikom broju lokusa, postoji veći potencijal da određena varijanta bude korisna za fitnes mužjaka. Suprotno, ženke ne zavise od jedarne pozadine da povrate fitnes. Sa druge strane kada se porede mtDNK haplotipovi na više različitih jedarnih pozadina, koje prirodno potiču iz populacija iz kojih dolaze i mtDNK haplotipovi, situacija postaje obrnuta. Fitnes mužjaka sada više zavisi od jedarne pozadine jer, je ona ta koja im potencijalno vraća fitnes, opet u zavisnosti od mtDNK haplotipa. Fitnes ženki i u ovom slučaju ne zavisi specifično od jedarnih varijanti jer im one ne vraćaju fitnes, već isključivo od mutacija u mtDNK. Dakle, u slučaju izogene, a strane jedarne pozadine, veći je negativni uticaj variranja mtDNK na mužjake nego što ono može imati pozitivan uticaj na ženke. Suprotno kada se mtDNK haplotipovi porede na jedarnim pozadinama sa kojima prirodno segregiraju u populacijama, kao što je bio slučaj u ovoj disertaciji, te jedarne pozadine su koevoluirale da kompenzuju izgubljeni fitnes kod mužjaka, pa je veći pozitivan uticaj variranja mtDNK na fitnes ženki u odnosu na štetni efekat kod mužjaka. Odsustvo efekta materinske kletve zabeleženo u okviru ove teze, posledica je korišćenja simpatričkih haplotipova kao i mtDNK i jedarne pozadine koje zajedno segregiraju, i posledično su koadaptirane.

Connallon i sar. (2018) diskutuju kako se određene populacije mogu odupirati efektima materinske kletve različitim stepenima inbridinga, asortativnog parenja, kao i do neke mere prenošenjem mitohondrija po očevoj liniji, fenomenu koji je zabeležen kod određenih životinjskih vrsta, ali se nedovoljno zna o sveprisutnosti ovog fenomena kao i njegove učestalosti kod različitih taksona.

Iz svega prethodno navedenog, jasna je potreba za sprovođenjem eksperimenata različitih eksperimentalnih postavki, na različitim model vrstama, i različitim komponentama životne istorije, kako bi se jasnije i bolje razumeli prisustvo i efekti materinske kletve (Dowling i Adrian 2019). Samo sveobuhvatnim pristupom biće moguće ekstrapolirati podatke iz laboratorijskih na prirodne populacije, i utvrditi prisustvo i magnitudu ove pojave kod različitih vrsta, prirodnih populacija, kao i potencijal jedarne varijabilnosti u ublažavanju njenih efekata.

5.2.5. Interakcija varijabilne sredine i genotipa na adaptivnu vrednost

Pored polno specifične selekcije, u okviru ove disertacije, određivana je adaptivna vrednost različitih genotipova u različitim sredinskim uslovima. Sa ciljem razlučivanja uloge selekcije zavisne od sredinskih uslova na održavanje unutarpopulacione varijabilnosti mtDNK, pri modelovanju svih fitnes komponenti analizirane su interakcije MT:T i MT:NU:T, gde su različiti temperaturni eksperimentalni režimi podrazumevali i različite dužine perioda svetlosti i mraka.

Kada je model vrsta *D. subobscura* u pitanju, diferencijalni fitnes nosilaca mtDNK haplotipova u zavisnosti od eksperimentalne temperature (MT:T) bio je značajan samo u nekoliko kvartetnih modela. Temperaturno specifični efekat mito-jedarnih interakcija zabeležen je samo u eksperimentu desikacije, gde je ukupni model imao MT:NU:T interakciju značajnom kao nekoliko kvartetnih modela u eksperimentima otpornosti na desikaciju i preživljavanja. Rezultati na ovoj model vrsti ukazuju na umeren značaj selekcije zavisne od sredinskih uslova na održavanje učestalosti dva glavna haplotipa. Ovi rezultati zajedno sa odsustvom polno specifične selekcije targetiraju selekciju negativno zavisnu od učestalosti kao najznačajniji selekcionni mehanizam koji održava učestalosti dva glavna haplotipa (Kurbalija Novičić i sar. 2020).

Sa druge strane kod model vrste *D. obscura*, je zabeležen dosta jači signal ovog tipa balansne selekcije. Posebno veliki broj statističkih značajnosti ove dve interakcije (MT:T i MT:NU:T) zabeležen je u modelima otpornosti na desikaciju i preživljavanja od jajeta do adulta, gde je većina modela kako parovnih tako i ukupnih, imala statistički značajne ove interakcije.

Kada se govori o interakciji sredinskih faktora sa mitohondrijskim genotipovima, na različitim model sistemima ispitivan je uticaj temperature na mtDNK varijabilnost, pošto je temperatura najuticajniji spoljni faktor koji utiče na rad enzima (Somero 2002; Blier i Guderley 1993). U literaturi se mogu pronaći radovi koji su proučavali korelisanost određenih mtDNK varijanti sa klimatskim regionima (Mishmar i sar. 2003; Ruiz-Pesini i sar. 2004). Takođe, značajan broj radova je opisao klinalnu distribuciju mtDNK haplotipova po geografskoj širini (Consuegra i sar. 2015; Camus i sar. 2017; Silva i sar. 2014) i nadmorskoj visini (Cheviron i sar. 2009; Fontanillas i sar. 2005), koji predstavljaju svojevrsne temperaturne gradijente.

Kada su eksperimentalni radovi u pitanju, interakcije temperature i mito-nukleusnog genotipa izučavane su kod širokog spektra organizama, ipak većina radova je proučavala mito-jedarne linije koje potiču iz različitih populacija. Grupa naučnika predvođena Buronom (Willett i Burton 2003; Harrison i Burton 2006) je koristeći interpopulacione hibride *Tigriopus californicus* kao model organizam pokazala uticaj sredinskih faktora na adaptivne vrednosti mito-jedarnih kombinacija. Oni su potvrdili da variranje sredinskih faktora, odnosno temperature i svetlosti može biti zaslužno za održavanje mito-jedarne varijabilnosti, slično rezultatu dobijenom u okviru ove teze. Studija (Dowling 2007b), bavila se interakcijom dva genoma na različitim temperaturama, konkretno dužinom razvika od jajeta do adulta kod *Callosobruchus maculatus*. Oni su pokazali da adaptivna vrednost određenog mtDNK haplotipa ili mito-jedarnog genotipa, često zavisi od temperaturnih uslova. Koristeći iste linije, dve studije (Arnqvist i sar. 2010; Immonen i sar. 2020) su različitim eksperimentima komponenti životne istorije i kompeticije takođe potvrdili temperaturnu specifičnost mito-jedarnih interakcija. Ove tri studije (Dowling 2007b; Arnqvist i sar. 2010; Immonen i sar. 2020) kao i većina drugih iz ove oblasti, vršila je eksperimente na linijama poreklom iz različitih populacija. Ipak utvrđeno je da iako su konkretne linije poreklom iz pet različitih populacija, svi mtDNK haplotipovi korišćeni u studijama, se prirodno simpatrički javljaju u zapadno Afričkim populacijama

ove vrste (Kebe i sar. 2016). Stoga, iako su koristili potpuno različit model system u odnosu na ovu disertaciju, obim značajnosti efekata u ovim radovima je jako sličan sa ovom disertacijom, pogotovo u svetlu prirodne segregacije ovih haplotipova ka oi sličnosti eksperimentalnih postavki i analiziranih komponenti.

Pored temperature kao najznačajnijeg spoljašnjeg faktora, studije na vrstama roda *Drosophila* koristile su i različite eksperimentalne postavke sa varijabilnošću u ishrani i nivoom kiseonika (Rand i sar. 2018; Camus i sar. 2020), i pokazale značajan efekat ovih sredinskih faktora na mito-jedarnu varijabilnost. U svetlu ovih rezultata bilo bi zanimljivo analizirati uticaj interakcije genotipa i ovih i sličnih sredinskih faktora na fitnes linija kod obe model vrste korišćene u ovoj tezi.

Uopšteno gledano, većina radova koja je kod različitih model sistema potvrdila značajnu ulogu mito-nukleusnih interakcija na određenu komponentu životne istorije kod različitih vrsta zglavkara, a da je imala i neki spoljašnji faktor kao jednu od kovarijabli, pokazala je da je koncept mito-jedarnih interakcija saglediv isključivo u kontekstu spoljašnjih faktora, bilo da je reč o pravim spoljašnjim faktorima kao što su različita sredinska variranja, ili recimo pol koji se takođe može gledati u ovom svetlu. Radovi koji su analizirali diferencijalne adaptivne vrednosti mito-jedarnih interakcija u zavisnosti od sredinskih faktora (Willett i Burton 2003; Harrison i Burton 2006; Dowling 2007b; Arnqvist i sar. 2010; Immonen i sar. 2020; Rand i sar. 2018; Camus i sar. 2020; Aw i sar. 2018; Towarnicki i Ballard 2017; Drummond i sar. 2019) imali su više uspeha u potvrđivanju ovog efekta nego kada je reč o polno specifičnim MT:NU interakcijama (Camus i sar. 2012; Wolff i sar. 2016; Camus 2015; Đorđević i sar. 2015; Dowling i sar. 2007a; Jelić i sar. 2015; Kurbalija Novičić i sar. 2015; Immonen 2016b). Generalno, eksperimenti sprovedeni na dve model vrste u okviru ove teze pokazuju kompleksnost održavanja unutarpopulacione mtDNK varijabilnosti. Rezultati ukazuju na veći značaj selekcije zavisne od sredinskih faktora u odnosu na polno specifičnu selekciju, na održavanje unutarpopulacione mitohondrijske varijabilnosti kod ove dva specifična modela, što je u skladu sa gore pomenutim literaturnim podacima. Ipak jasno je da na određenom nivou, i u određenoj meri oba ova vida balansne selekcije pa i sigurno neki drugi selekcionni mehanizmi, poput NFDS (Arnqvist i sar. 2016; Kurbalija Novičić i sar. 2020) utiču na održavanje mito i mito-jedarnih polimorfizama. U prilog ovome govori i činjenica da su kod *D. obscura* tri od četiri blokovska modela za otpornost na desikaciju imala značajne interakcije temperature pola i genotipa (MT:T:pol i MT:NU:pol:T). Slično je u studiji Immonen i sar. (2020) većina komponenti pokazala temperaturnu specifičnost mito-jedarnih interakcija, dok je određeni broj komponenti pokazao i polnu specifičnost, a određeni broj modela je imao i interakciju sva četiri faktora statistički značajnu.

Prema dostupnim radovima koji su analizirali sredinske faktore i njihovu interakciju sa mtDNK haplotipovima kod različitih vrsta *Drosophila*, u nijednom se nisu analizirali simpatrički haplotipovi ili analizirani haplotipovi nisu jasno naznačeni kao simpatrički. Ova teza po prvi put pruža direktnu potvrdu da temperaturna variranja kao jedan od vidova sredinskog variranja preko mito-jedarnih interakcija mogu održavati simpatričku mtDNK varijabilnost.

Eksperimenti iz ove teze su za svaku od model vrsta sprovedeni na dve arbitrarno izabrane temperature, nasuprot, nepredvidivom kontinuumu varijacije temperature, pa i svih ostalih sredinskih uslova u prirodi. Da je biranje drugačijih eksperimentalnih temperatura, moglo je imati za posledicu potpuno drugačije rezultate, potvrđuju brojni radovi (Towarnicki i Ballard 2017; Hoekstra i sar. 2013; Aw i sar. 2018). Towarnicki i Ballard (2017), su pokazali prednosti jednog odnosno drugog mtDNK haplotipa kod *D. melanogaster* na 23°C odnosno 27°C u dužini razvića, dok su ove razlike potpuno nestale na 19°C. Ispitujući inkompatibilnosti između mitohondrijske tRNK i jedarno kodirane tirozil-tRNK sintetaze, poreklom iz *D. simulans* i *D. melanogaster*, (Hoekstra i sar. 2013), pokazano je da ova inkompatibilnost u velikom zavisi od temperature. Oni su dobili da kada larve hibridne linije sa određenim mtDNK haplotipom *D. simulans* i specifičnom *D. melanogaster* jedarnom pozadinom, rastu na višim temperaturama imaju znatno manje efikasan metabolizam i generalno niži fitnes u

odnosu na larve kompatibilnih genotipova, dok kada rastu na nižim temperaturama, ova mito-jedarna inkompatibilnost nestaje. U sličnom eksperimentu (Aw i sar. 2018) su pokazali prednosti određenih mtDNK haplotipova na podlogama sa određenim koncentracijama nutritijenata, dok na nekim drugim koncentracijama razlike nije bilo. Ovakvi rezultati ukazuju da ne postoji prosta veza između fitnesa, genotipa i diskretnih vrednosti sredinskih varijabli, čak ni kada se posmatra samo jedna ovakva varijabla u eksperimentalnim uslovima, a kamoli kada se kao cilj postavi ekstrapoliranje tih zapažanja na prirodna staništa, gde bezbroj sredinskih varijabli interaguje i beskonačno mnogo usložnjava ceo sistem. Rezultati ove teze, kao i sve većeg broja radova na istu temu ukazuju da je za rasvetljavanje mehanizama uključenih u održavanje stabilnih mtDNK kao mito-jedarnih polimorfizama, pored uključivanja većeg broja varijabli u eksperimentalnu postavku, neophodno koristiti i širi spektar vrednosti ovih varijabli.

Vrednost fitnesa nekog genotipa ili kombinacije mito-jedarnog genotipa je zavisna od uslova u kojima se ispoljava, što i rezultati ove teze nedvosmisleno pokazuju. Ništa u prirodi nije apsolutno, pa tako prednost određenog genotipa u određenoj komponenti životne istorije može značiti manu u drugoj. Na primer brži metabolizam može da podrži veći fekunditet u optimalnim uslovima, ali u stresnim uslovima kakvi su npr. sušni, ovaj ubrzani metabolizam postaje mana. Duže vreme razvića može biti loše u efemernim staništima, ili u eksperimentalnim uslovima gde se recimo generacijskim prebacivanjem mušica posle određenog vremena, veštački selektuje protiv dužeg razvića. Sa druge strane duže razviće uglavnom znači veće jedinke sa većim zalihama energije, koje recimo bolje podnose uslove suše ili gladi. Takođe, sve ovo se dodatno komplikuje u svetlu spoljašnjih faktora, gde fitnes zavisi od velikog broja sredinskih varijabli sa malim uticajem koji tek zajedničkim delovanjem i interakcijama daju kompletnu sliku.

6. ZAKLJUČAK

- Kod model vrste *Drosophila subobscura* nisu utvrđene statistički značajne adaptivne razlike između dva najčešća haplotipa, ni u jednoj analiziranoj komponenti životne istorije, osim u vijabilnosti od jajeta do adulta, gde se haplotip I pokazao superiornijim. Prirodna selekcija ne deluje na razlike između dva glavna haplotipa sama po sebi.
- Neopisana genetička varijabilnost mtDNK genoma kod eksperimentalnih jedinki *D. subobscura* određenih kvarteta pruža adaptivne prednosti svojim nosiocima.
- Mito-jedarne interakcije uočene su kod vrste *D. subobscura* u gotovo svim ispitivanim fitness komponentama makar u određenom broju kvartetnih modela, dok je eksperiment vijabilnosti pokazao značajan mito-jedarni efekat i u ukupnom modelu. Pošto su mito-jedarne interakcije bile značajne u većem broju modela od same mtDNK, može se zaključiti da su mito-jedarni genotipovi primarne jedinice delovanja selekcije.
- Polno specifični efekat mtDNK i mito-jedarne varijabilnosti nije zabeležen kod *D. subobscura* ni u jednoj ispitivanoj komponenti životne istorije u ukupnom modelu, dok je mali broj kvartetnih modela imao interakcije koje ukazuju na ovaj vid selekcije značajne.
- Varijabilnost u mtDNK sekvenci nije imala veći efekat na adaptivnu vrednost kod mužjaka u odnosu na ženke pa efekat materinske kletve nije prisutan kod *D. subobscura*.
- Sredinski specifični efekat mito-jedarnih interakcija kod *D. subobscura* zabeležen je pri analiziranju otpornosti na desikaciju i u nešto manjoj meri kod preživljavanja od jajeta do adulta. Temperaturno moduliranje efekata mtDNK haplotipa nije zabeleženo ni kod jedne ispitivane fitness komponente. Selekcija zavisne od sredinskih uslova je u određenom stepenu značajna za održavanje učestalosti dva glavna haplotipa, ali takođe deluje i na nivou razlika specifičnih za određene linije.
- Analize parametara genetičkog diverziteta prirodnih populacija *Drosophila obscura* pokazale su visok stepen nukleotidnog diverziteta mtDNK *Cyt b* gena kako unutar tako i između populacija. Za razliku od *D. subobscura* prisutna je geografska struktuiranost genetičkog diverziteta mtDNK, sa različitim učestalostima haplotipova prvenstveno između zapadnog i istočnog areala ove vrste.
- Dobijeni rezultati najviše ukazuju na dva moguća demografska scenarija postglacijalne kolonizacije Evrope *D. obscura*. Prvi scenario predviđa da su zapadni i istočni areal kolonizovani iz dva različita refugijuma (Pirinejsko ili Apeninsko Poluostrvo za zapad i Balkansko Poluostrvo za istok). Drugi scenario predviđa da je cela Evropa postepeno kolonizovana iz zapadnog refugijuma (Pirinejsko ili Apeninsko Poluostrvo) prema istoku, gde se razlike između istoka i zapada objašnjavaju genetičkim driftom.
- Svi eksperimenti analize komponenti životne istorije pokazali su adaptivni značaj mtDNK varijabilnosti kod vrste *D. obscura*, ukazujući da mtDNK sama po sebi jeste u određenom stepenu jedinica delovanja selekcije.

- Generalno, nesinonimne mutacije su većinom imale veći uticaj na fitness od sinonimnih, ipak u nekim poređenjima nesinonimne razlike nisu imale statistički značajan uticaj na fitness, dok su se u nekim sinonimne pokazale značajnim. Generalni trend da su najudaljeniji haplotipovi pokazali najveće razlike u fitnessu nije bio uvek prisutan. Ovaj nalaz ukazuje na potrebu analiziranja celokupnog mtDNK genoma u ovakvim studijama.
- Kada je reč o mito-jedarnim interakcijama velika većina modela je pokazala diferencijalni fitness mtDNK haplotipova u zavisnosti od jedarne pozadine na kojoj se ispoljavaju, ukazujući da mito-jedarni genotipovi predstavljaju primarne jedinice na koje deluje prirodna selekcija kod *D. obscura*.
- Eksperimenti životne istorije kod *D. obscura* pokazali su umeren pečat polno specifične selekcije, ukazujući da ovaj vid balansne selekcije učestvuje, ali nije ključni proces u održavanju unutarpopulacione mtDNK varijabilnosti kod ove model vrste.
- Varijabilnost u mtDNK sekvenci nije imala veći efekat na adaptivnu vrednost kod mužjaka u odnosu na ženke pa efekat materinske kletve nije prisutan kod *D. obscura*.
- Kada je reč o interakciji sredinskih faktora i genotipa, eksperimenti na *D. obscura* pokazuju jači signal u odnosu na interakciju pola i genotipa, implicirajući da selekcija zavisna od sredinskih uslova ima veći uticaj na održavanje simpatričke mtDNK varijabilnosti kod ove vrste.

Činjenica je da je evolucioni mehanizam prirodne selekcije kao i sam život na zemlji mnogo puta kompleksniji nego što naše trenutne aproksimacije različitim simulacijama i eksperimentima mogu da dosegnu. Mi stremimo da pronađemo idealan model sistem koji će predstavljati školski primer određenog selekcionog mehanizma. Istina je da u prirodi deluje neverovatan splet evolucionih mehanizama koji deluju sinergijski i međusobno konfrontiraju u određenom smislu. Kako su svi živi sistemi izloženi konstantnoj promeni u sredini, tako se i same interakcije između različitih evolucionih mehanizama menjaju kako prostorno tako i vremenski. Teško je pronaći i kvalitativno utvrditi sve mehanizme koji oblikuju varijabilnost određene prirodne populacije, a još veći kvantitativno odrediti odnose između svih uključenih činilaca. Stoga je na nama kao naučnicima koji smo odabrali ovu oblast veliki zadatak da u narednim godinama iskoristimo dosadašnja znanja kako bi dizajnirali sve bolje modele i metode kojima ćemo korak po korak sve bolje razmršavati beskrajno kompleksnu mrežu evolucionih mehanizama koja prožima ceo živi svet, u nadi da bolje shvatimo prirodne fenomene koji nas okružuju i čiji smo deo.

7. LITERATURA

- Achaz, G. (2009). Frequency spectrum neutrality tests: one for all and all for one. *Genetics*, 183(1), 249-258.
- Afonso, J., Volz, A., Hernandez, M., Ruttkay, H., Gonzalez, M., Larruga, J., Cabrera, V. i Sperlich, D. (1990). Mitochondrial DNA variation and genetic structure in Old-World populations of *Drosophila subobscura*. *Molecular biology and evolution*, 7(2), 123-142.
- Akaike, H. (1973). Maximum likelihood identification of Gaussian autoregressive moving average models. *Biometrika*, 60(2), 255-265.
- Alpatov, W. (1929). Growth and variation of the larvae of *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Zoology*, 52(3), 407-437.
- Anderson, W. W. (1966). Genetic divergence in M. Vetukhiv's experimental populations of *Drosophila pseudoobscura* 3. Divergence in body size. *Genetics Research*, 7(2), 255-266.
- Andjelković, M., i Marinković, D. (1983). Selection for copulation ability of *Drosophila subobscura* in the absence of light. *Behavior genetics*, 13, 411-419.
- Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data: Babraham Bioinformatics, Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom.
- Arnqvist, G., Dowling, D. K., Eady, P., Gay, L., Tregenza, T., Tuda, M., i Hosken, D. J. (2010). Genetic architecture of metabolic rate: environment specific epistasis between mitochondrial and nuclear genes in an insect. *Evolution*, 64(12), 3354-3363.
- Arnqvist, G., Novičić, Z. K., Castro, J. A., i Sayadi, A. (2016). Negative frequency dependent selection on sympatric mtDNA haplotypes in *Drosophila subobscura*. *Hereditas*, 153(1), 1-6.
- Austad, S. N. (2006). Why women live longer than men: sex differences in longevity. *Gender medicine*, 3(2), 79-92.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C.A. i Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 489-522.
- Aw, W. C., Garvin, M. R., Melvin, R. G., i Ballard, J. W. O. (2017). Sex-specific influences of mtDNA mitotype and diet on mitochondrial functions and physiological traits in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, 12(11), e0187554.
- Aw, W. C., Towarnicki, S. G., Melvin, R. G., Youngson, N. A., Garvin, M. R., Hu, Y., Nielsen, S., Thomas, T., Pickford, R., Bustamante, S. i Vila-Sanjurjo, A. (2018). Genotype to phenotype: diet-by-mitochondrial DNA haplotype interactions drive metabolic flexibility and organismal fitness. *PLoS genetics*, 14(11), e1007735.
- Ayala, F. J., Serra, L., i Prevosti, A. (1989). A grand experiment in evolution: the *Drosophila subobscura* colonization of the Americas. *Genome*, 31(1), 246-255.
- Babcock, C. S., i Asmussen, M. A. (1996). Effects of differential selection in the sexes on cytonuclear polymorphism and disequilibria. *Genetics*, 144(2), 839-853.
- Babcock, C. S., i Asmussen, M. A. (1998). Effects of differential selection in the sexes on cytonuclear dynamics: life stages with sex differences. *Genetics*, 149(4), 2063-2077.
- Bailey, S. F., Alonso Morales, L. A., i Kassen, R. (2021). Effects of synonymous mutations beyond codon bias: the evidence for adaptive synonymous substitutions from microbial evolution experiments. *Genome biology and evolution*, 13(9), evab141.
- Bainbridge, S. P., i Bownes, M. (1981). Staging the metamorphosis of *Drosophila melanogaster*. *Development*, 66(1), 57-80.
- Bakula, M. (1969). The persistence of a microbial flora during postembryogenesis of *Drosophila melanogaster*. *Journal of invertebrate pathology*, 14(3), 365-374.
- Ballard, J. W., i Kreitman, M. (1994). Unraveling selection in the mitochondrial genome of

- Drosophila. Genetics*, 138(3), 757-772.
- Ballard, J. W. O., i Kreitman, M. (1995). Is mitochondrial DNA a strictly neutral marker? *Trends in ecology i evolution*, 10(12), 485-488.
- Ballard, J. W. O., i Rand, D. M. (2005). The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.*, 36, 621-642.
- Ballard, J. W. O., i Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4), 729-744.
- Bandelt, H.-J., Forster, P., i Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Barreto, F. S., i Burton, R. S. (2012). Evidence for compensatory evolution of ribosomal proteins in response to rapid divergence of mitochondrial rRNA. *Molecular biology and evolution*, 30(2), 310-314.
- Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., Walker, S., Christensen, R. H. B., Singmann, H., Dai, B., Scheipl, F., Grothendieck, G. i Green, P. (2009). Package 'lme4'. URL <http://lme4.r-forge.r-project.org>.
- Bazin, E., Glémin, S., i Galtier, N. (2006). Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science*, 312(5773), 570-572.
- Begon, M. (1978). Population densities in *Drosophila obscura* Fallen and *D. subobscura* Collin. *Ecological Entomology*, 3(1), 1-12.
- Beribaka, M., Jelić, M., Tanasković, M., Lazić, C., i Stamenković-Radak, M. (2021). Life history traits in two *Drosophila* species differently affected by microbiota diversity under lead exposure. *Insects*, 12(12), 1122.
- Beribaka, M. B., Dimkić, I. Z., Jelić, M. Đ., Stanković, S. M., Pržulj, N. M., Anđelković, M. L., i Stamenković-Radak, M. M. (2021). Altered diversity of bacterial communities in two *Drosophila* species under laboratory conditions and lead exposure. *Archives of Biological Sciences*, 73(1), 17-29.
- Biganski, S., Fückel, S., Jehle, J. A., i Kleespies, R. G. (2021). Infection effects of the new microsporidian species *Tubulinosema suzukii* on its host *Drosophila suzukii*. *Scientific Reports*, 11(1), 10151.
- Birky Jr, C. W. (2001). The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annual review of genetics*, 35(1), 125-148.
- Blier, P. U., i Guderley, H. E. (1993). Mitochondrial activity in rainbow trout red muscle: the effect of temperature on the ADP-dependence of ATP synthesis. *Journal of Experimental Biology*, 176(1), 145-158.
- Blier, P. U., i Lemieux, H. (2001). The impact of the thermal sensitivity of cytochrome c oxidase on the respiration rate of Arctic charr red muscle mitochondria. *Journal of Comparative Physiology B*, 171, 247-253.
- Bono, J. M., i Markow, T. (2009). Post-zygotic isolation in cactophilic *Drosophila*: larval viability and adult life-history traits of *D. mojavensis*/*D. arizonae* hybrids. *Journal of evolutionary biology*, 22(7), 1387-1395.
- Booker, L. M., Habermacher, G. M., Jessie, B. C., Sun, Q. C., Baumann, A. K., Amin, M., Lim, S.D., Fernandez-Golarz, C., Lyles, R.H., Brown, M.D. i Marshall, F.F. (2006). North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer. *The Journal of urology*, 175(2), 468-473.
- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D., i Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *The EMBO journal*, 17(1), 37-49.
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., Heled, J., Jones, G., Kühnert, D., De Maio, N. i Matschiner, M. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 15(4), e1006650.
- Breeuwer, J., Stouthamer, R., Barns, S., Pelletier, D., Weisburg, W., i Werren, J. (1992). Phylogeny

- of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus *Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Molecular Biology*, 1(1), 25-36.
- Brehm, A., i Krimbas, C. (1991). Inversion polymorphism in *Drosophila obscura*. *Journal of Heredity*, 82(2), 110-117.
- Brown, W. M., George Jr, M., i Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1967-1971.
- Brun, G., i Plus, N. (1980) The viruses of *Drosophila*, pp. 625–702 in *The Genetics and Biology of Drosophila*, edited by Ashburner M. i T. R. F. Wright. Academic Press, New York.
- Buck, S., Vettraino, J., Force, A. G., i Arking, R. (2000). Extended longevity in *Drosophila* is consistently associated with a decrease in developmental viability. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 55(6), B292-B301.
- Burton, R. S., i Barreto, F. S. (2012). A disproportionate role for mt DNA in D obzhansky–M uller incompatibilities? *Molecular ecology*, 21(20), 4942-4957.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., i Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581-583.
- Camus, M., Moore, J., i Reuter, M. (2020). Nutritional geometry of mitochondrial genetic effects on male fertility. *Biology Letters*, 16(2), 20190891.
- Camus, M. F., Clancy, D. J., i Dowling, D. K. (2012). Mitochondria, maternal inheritance, and male aging. *Current Biology*, 22(18), 1717-1721.
- Camus, M. F., i Dowling, D. K. (2018). Mitochondrial genetic effects on reproductive success: signatures of positive intrasexual, but negative intersexual pleiotropy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1879), 20180187.
- Camus, M. F., Wolff, J. B., Morrow, E. H., i Dowling, D. K. (2015). Single nucleotides in the mtDNA sequence modify mitochondrial molecular function and are associated with sex-specific effects on fertility and aging. *Current Biology*, 25(20), 2717-2722.
- Camus, M. F., Wolff, J. N., Sgrò, C. M., i Dowling, D. K. (2017). Experimental support that natural selection has shaped the latitudinal distribution of mitochondrial haplotypes in Australian *Drosophila melanogaster*. *Molecular biology and evolution*, 34(10), 2600-2612.
- Castro, J. A., Barrio, E., González, A., Picornell, A., Ramon, M. M., i Moya, A. (2010). Nucleotide diversity of a ND5 fragment confirms that population expansion is the most suitable explanation for the mtDNA haplotype polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetica*, 138, 819-829.
- Castro, J. A., Oliver, P., Christie, J. S., Picornell, A., Ramon, M., i Moya, A. (2003). Assortative mating and fertility in two *Drosophila subobscura* strains with different mitochondrial DNA haplotypes. *Genetica*, 119, 295-301.
- Castro, J. A., Ramon, M., Picornell, A., i Moya, A. (1999). The genetic structure of *Drosophila subobscura* populations from the islands of Majorca and Minorca (Balearic Islands, Spain) based on allozymes and mitochondrial DNA. *Heredity*, 83(3), 271-279.
- Cazemajor, M., Joly, D., i Montchamp-Moreau, C. (2000). Sex-ratio meiotic drive in *Drosophila simulans* is related to equational nondisjunction of the Y chromosome. *Genetics*, 154(1), 229-236.
- Charlesworth, B. (1994). *Evolution in Age-Structured Populations*. Cambridge: Cambridge University Press
- Charlesworth, B. i Hughes, K.A. (2000). The maintenance of genetic variation in lifehistory traits. In: *Evolutionary Genetics: from Molecules to Morphology*, eds. Singh, R.S. i Krimbas, C.B., Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 369-392
- Charlesworth, D. (2006). Balancing selection and its effects on sequences in nearby genome regions. *PLoS genetics*, 2(4), e64.
- Cheviron, Z. A., i Brumfield, R. T. (2009). Migration-selection balance and local adaptation of mitochondrial haplotypes in rufous-collared sparrows (*Zonotrichia capensis*) along an

- elevational gradient. *Evolution*, 63(6), 1593-1605.
- Chippindale, A. K., Hoang, D. T., Service, P. M., i Rose, M. R. (1994). The evolution of development in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Evolution*, 48(6), 1880-1899.
- Chou, J.-Y., Hung, Y.-S., Lin, K.-H., Lee, H.-Y., i Leu, J.-Y. (2010). Multiple molecular mechanisms cause reproductive isolation between three yeast species. *PLoS biology*, 8(7), e1000432.
- Christie, J. S., Castro, J. A., Oliver, P., Picornell, A., Ramon, M. M., i Moya, A. (2004). Fitness and life-history traits of the two major mitochondrial DNA haplotypes of *Drosophila subobscura*. *Heredity*, 93(4), 371-378.
- Christie, J. S., Picornell, A., Moya, A., Ramon, M. M., i Castro, J. A. (2010). Dynamics of the mtDNA haplotype variability in a *Drosophila subobscura* population over a two-year period. *The Open Evolution Journal*, 4(1).
- Christie, J., Picornell, A., Moya, A., Ramon, M., i Castro, J. (2011). Mitochondrial DNA effects on fitness in *Drosophila subobscura*. *Heredity*, 107(3), 239-245.
- Clark, A. G. (1984). Natural selection with nuclear and cytoplasmic transmission. I. A deterministic model. *Genetics*, 107(4), 679-701.
- Clark, A. G. (1985). Natural selection with nuclear and cytoplasmic transmission. II. Tests with *Drosophila* from diverse populations. *Genetics*, 111(1), 97-112.
- Clark, A. G., i Doane, W. W. (1983). Desiccation tolerance of the adipose60 mutant of *Drosophila melanogaster*. *Hereditas*, 99(2), 165-175.
- Clark, A. G., i Lyckegaard, E. (1988). Natural selection with nuclear and cytoplasmic transmission. III. Joint analysis of segregation and mtDNA in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 118(3), 471-481.
- Clarke, J. M., Smith, J. M., i Sondhi, K. (1961). Asymmetrical response to selection for rate of development in *Drosophila subobscura*. *Genetics Research*, 2(1), 70-81.
- Clayton, D. A. (2000). Transcription and replication of mitochondrial DNA. *Human reproduction*, 15(suppl_2), 11-17.
- Clergeot, P.-H., i Olson, Å. (2021). Mitonuclear genetic interactions in the basidiomycete *Heterobasidion parviporum* involve a non-conserved mitochondrial open reading frame. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 779337.
- Collin, J. E., 1936. *Drosophila subobscura* n. sp. *J. Genet.* 39, 60.
- Connallon, T., Camus, M. F., Morrow, E. H., i Dowling, D. K. (2018). Coadaptation of mitochondrial and nuclear genes, and the cost of mother's curse. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1871), 20172257.
- Consuegra, S., John, E., Verspoor, E., i de Leaniz, C. G. (2015). Patterns of natural selection acting on the mitochondrial genome of a locally adapted fish species. *Genetics Selection Evolution*, 47(1), 1-10.
- Cox, D. R. (1972). Regression models and life-tables. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 34(2), 187-202.
- Da Lage, J., Capy, P., i David, J. (1989). Starvation and desiccation tolerance in *Drosophila melanogaster* adults: effects of environmental temperature. *Journal of Insect Physiology*, 35(6), 453-457.
- Da Lage, J., Capy, P., i David, J. (1990). Starvation and desiccation tolerance in *Drosophila melanogaster*: differences between European, North African and Afrotropical populations. *Genetics Selection Evolution*, 22(4), 381-391.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., i Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and high-performance computing. *Nature methods*, 9(8), 772.
- Dean, M. D., Ballard, K. J., Glass, A., William, J., i Ballard, O. (2003). Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*. *Genetics*, 165(4), 1959-1969.
- Dobzhansky, T., i Spassky, B. (1944). Genetics of natural populations. XI. Manifestation of genetic

- variants in *Drosophila pseudoobscura* in different environments. *Genetics*, 29(3), 270.
- Doi A., Suzuki, H., i Matsuura, E. T. (1999). Genetic analysis of temperature-dependent transmission of mitochondrial DNA in *Drosophila*. *Heredity*, 82(5), 555-560.
- Dorđević, M., Savković, U., Lazarević, J., Tucić, N., i Stojković, B. (2015). Intergenomic interactions in hybrids between short-lived and long-lived lines of a seed beetle: Analyses of life history traits. *Evolutionary Biology*, 42, 461-472.
- Dorđević, M., Stojković, B., Savković, U., Immonen, E., Tucić, N., Lazarević, J., i Arnqvist, G. (2017). Sex-specific mitonuclear epistasis and the evolution of mitochondrial bioenergetics, ageing, and life history in seed beetles. *Evolution*, 71(2), 274-288.
- Dos Reis, M., Donoghue, P. C., i Yang, Z. (2016). Bayesian molecular clock dating of species divergences in the genomics era. *Nature Reviews Genetics*, 17(2), 71-80.
- Dowling, D. K. (2014). Evolutionary perspectives on the links between mitochondrial genotype and disease phenotype. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1840(4), 1393-1403.
- Dowling, D. K., Friberg, U., Hailer, F., i Arnqvist, G. r. (2007a). Intergenomic epistasis for fitness: within-population interactions between cytoplasmic and nuclear genes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 175(1), 235-244.
- Dowling, D. K., Abiega, K. C., i Arnqvist, G. (2007b). Temperature-specific outcomes of cytoplasmic-nuclear interactions on egg-to-adult development time in seed beetles. *Evolution*, 61(1), 194-201.
- Dowling, D. K., i Adrian, R. E. (2019). Challenges and prospects for testing the mother's curse hypothesis. *Integrative and comparative biology*, 59(4), 875-889.
- Dowling, D. K., Friberg, U., i Lindell, J. (2008). Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends in ecology i evolution*, 23(10), 546-554.
- Dowling, D. K., Meerupati, T., i Arnqvist, G. (2010). Cytonuclear interactions and the economics of mating in seed beetles. *The American Naturalist*, 176(2), 131-140.
- Drummond, E., Short, E., i Clancy, D. (2019). Mitonuclear gene X environment effects on lifespan and health: how common, how big? *Mitochondrion*, 49, 12-18.
- Durmaz, E., Rajpurohit, S., Betancourt, N., Fabian, D. K., Kapun, M., Schmidt, P., i Flatt, T. (2019). A clinal polymorphism in the insulin signaling transcription factor foxo contributes to life-history adaptation in *Drosophila*. *Evolution*, 73(9), 1774-1792.
- Eckstrand, I., i Richardson, R. (1980). Comparison of some water balance characteristics in several *Drosophila* species which differ in habitat. *Environmental Entomology*, 9(5), 716-720.
- Edmands, S., i Burton, R. S. (1999). Cytochrome c oxidase activity in interpopulation hybrids of a marine copepod: a test for nuclear-nuclear or nuclear-cytoplasmic coadaptation. *Evolution*, 53(6), 1972-1978.
- Ellison, C. K., i Burton, R. S. (2006). Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*. *Evolution*, 60(7), 1382-1391.
- Ellison, C. K., i Burton, R. S. (2008). Genotype-dependent variation of mitochondrial transcriptional profiles in interpopulation hybrids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(41), 15831-15836.
- Ellison, C., i Burton, R. S. (2010). Cytonuclear conflict in interpopulation hybrids: the role of RNA polymerase in mtDNA transcription and replication. *Journal of evolutionary biology*, 23(3), 528-538.
- Erić, P., Jelić, M., Savić-Veselinović, M., Kenig, B., Anđelković, M., i Stamenković-Radak, M. (2019). Nucleotide diversity of Cyt b gene in *Drosophila subobscura* Collin. *Genetika*, 51(1), 213-226.
- Erić, P., Patenković, A., Erić, K., Tanasković, M., Davidović, S., Rakić, M., Savić Veselinović, M., Stamenković-Radak, M. i Jelić, M. (2022). Temperature-specific and sex-specific fitness effects of sympatric mitochondrial and mito-nuclear variation in *Drosophila obscura*. *Insects*, 13(2), 139.
- Erić, P., Stamenković-Radak, M., Dragičević, M., Kankare, M., Wallace, M. A., Savić Veselinović,

- M., i Jelić, M. (2022). Mitochondrial DNA variation of *Drosophila obscura* (Diptera: Drosophilidae) across Europe. *European Journal of Entomology*, 119, 99-110.
- Excoffier, L., i Lischer, H. E. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3), 564-567.
- Eyre-Walker, A., Keightley, P. D., Smith, N. G., i Gaffney, D. (2002). Quantifying the slightly deleterious mutation model of molecular evolution. *Molecular biology and evolution*, 19(12), 2142-2149.
- Fabian, D., i Flatt, T. (2012). Life history evolution. *Nature Education Knowledge*, 3(10).
- Fallén, C.F. (1823) Dipterasveciae Geomyzides 8pp Berlin.
- Falkenberg, M., Larsson, N.-G., i Gustafsson, C. M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 76, 679-699.
- Fay, J. C., i Wu, C.-I. (2000). Hitchhiking under positive Darwinian selection. *Genetics*, 155(3), 1405-1413.
- Ferveur, J.-F., Cortot, J., Rihani, K., Cobb, M., i Everaerts, C. (2018). Desiccation resistance: effect of cuticular hydrocarbons and water content in *Drosophila melanogaster* adults. *PeerJ*, 6, e4318.
- Flatt, T. (2011). Survival costs of reproduction in *Drosophila*. *Experimental Gerontology*, 46(5), 369-375.
- Flatt, T. (2020). Life-history evolution and the genetics of fitness components in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 214(1), 3-48.
- Flatt, T., i Kawecki, T. J. (2007). Juvenile hormone as a regulator of the trade-off between reproduction and life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 61(8), 1980-1991.
- Folguera, G., Ceballos, S., Spezzi, L., Fanara, J. J., i Hasson, E. (2008). Clinal variation in developmental time and viability, and the response to thermal treatments in two species of *Drosophila*. *Biological Journal of the Linnean Society*, 95(2), 233-245.
- Fontanillas, P., Depraz, A., Giorgi, M. S., i Perrin, N. (2005). Nonshivering thermogenesis capacity associated to mitochondrial DNA haplotypes and gender in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Molecular ecology*, 14(2), 661-670.
- Fos, M., Domínguez, M. A., Latorre, A., i Moya, A. (1990). Mitochondrial DNA evolution in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(11), 4198-4201.
- Fragata, I., Balanya, J., Rego, C., Matos, M., Rezende, E. L., i Santos, M. (2010). Contrasting patterns of phenotypic variation linked to chromosomal inversions in native and colonizing populations of *Drosophila subobscura*. *Journal of evolutionary biology*, 23(1), 112-123.
- Frank, S., i Hurst, L. (1996). Mitochondria and male disease. *Nature*, 383(6597), 224-224.
- Fry, A. J., i Rand, D. M. (2002). *Wolbachia* interactions that determine *Drosophila melanogaster* survival. *Evolution*, 56(10), 1976-1981.
- Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- Fu, Y.-X., i Li, W.-H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3), 693-709.
- Futerman, P., Layen, S., Kotzen, M., Franzen, C., Kraaijeveld, A., i Godfray, H. (2006). Fitness effects and transmission routes of a microsporidian parasite infecting *Drosophila* and its parasitoids. *Parasitology*, 132(4), 479-492.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., i Hurst, G. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22), 4541-4550.
- Gao, J.-j., Watabe, H.-a., Aotsuka, T., Pang, J.-f., i Zhang, Y.-p. (2007). Molecular phylogeny of the *Drosophila obscura* species group, with emphasis on the Old World species. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 1-12.
- García-Martínez, J., Castro, J. A., Ramón, M., Latorre, A., i Moya, A. (1998). Mitochondrial DNA haplotype frequencies in natural and experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics*, 149(3), 1377-1382.

- Gaspari, M., Falkenberg, M., Larsson, N. G., i Gustafsson, C. M. (2004). The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *The EMBO journal*, 23(23), 4606-4614.
- Gemmell, N. J., Metcalf, V. J., i Allendorf, F. W. (2004). Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends in ecology i evolution*, 19(5), 238-244.
- Gershenson, S. (1928). A new sex-ratio abnormality in *Drosophila obscura*. *Genetics*, 13(6), 488.
- Gibbs, A. G., Chippindale, A. K., i Rose, M. R. (1997). Physiological mechanisms of evolved desiccation resistance in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 200(12), 1821-1832.
- Gillespie, J. H. (2000). Genetic drift in an infinite population: the pseudohitchhiking model. *Genetics*, 155(2), 909-919.
- Gissi, C., Iannelli, F., i Pesole, G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101(4), 301-320.
- Grant, W. S. (2015). Problems and cautions with sequence mismatch analysis and Bayesian skyline plots to infer historical demography. *Journal of Heredity*, 106(4), 333-346.
- Grant, W. S., Spies, I. B., i Canino, M. F. (2006). Biogeographic evidence for selection on mitochondrial DNA in North Pacific walleye pollock *Theragra chalcogramma*. *Journal of Heredity*, 97(6), 571-580.
- Graves, J., Toolson, E., Jeong, C., Vu, L., i Rose, M. (1992). Desiccation, flight, glycogen, and postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Physiological Zoology*, 65(2), 268-286.
- Gray, M. W., Burger, G., i Lang, B. F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science*, 283(5407), 1476-1481.
- Gregersen, N., Hansen, J., i Palmfeldt, J. (2012). Mitochondrial proteomics—a tool for the study of metabolic disorders. *Journal of inherited metabolic disease*, 35, 715-726.
- Gregorius, H., i Ross, M. (1984). Selection with gene-cytoplasm interactions. I. Maintenance of cytoplasm polymorphisms. *Genetics*, 107(1), 165-178.
- Haag-Liautard, C., Coffey, N., Houle, D., Lynch, M., Charlesworth, B., i Keightley, P. D. (2008). Direct estimation of the mitochondrial DNA mutation rate in *Drosophila melanogaster*. *PLoS biology*, 6(8), e204.
- Hall, T. A. (1999). *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT*. Paper presented at the Nucleic acids symposium series.
- Harrison, J. S., i Burton, R. S. (2006). Tracing hybrid incompatibilities to single amino acid substitutions. *Molecular biology and evolution*, 23(3), 559-564.
- Hartwell L.H., Goldberg M.L., Fisher J.A. i Hood L. *Genetics from genes to Genomes*, 6th edition. McGraw-Hill Education, New York, USA, 2018.
- Healy, T. M., Hargadon, A. C., i Burton, R. S. (2023). Developmental rate displays effects of inheritance but not of sex in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*.
- Hedges, L. M., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L., i Johnson, K. N. (2008). *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science*, 322(5902), 702-702.
- Hedrick, P. W. (1986). Genetic polymorphism in heterogeneous environments: a decade later. *Annual review of ecology and systematics*, 17(1), 535-566.
- Heled, J., i Drummond, A. J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 1-15.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1442), 183-195.
- Hill, G. E. (2019). *Mitochondrial ecology*: Oxford University Press.
- Hiraizumi, Y. (1993). Temperature sensitivity of negative segregation distortion in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 135(3), 831-841.
- Hiroki, M., Kato, Y., Kamito, T., i Miura, K. (2002). Feminization of genetic males by a symbiotic bacterium in a butterfly, *Eurema hecabe* (Lepidoptera: Pieridae). *Naturwissenschaften*, 89,

167-170.

- Hirst, J., King, M. S., i Pryde, K. R. (2008). The production of reactive oxygen species by complex I: Portland Press Ltd.
- Hoekstra, L. A., Siddiq, M. A., i Montooth, K. L. (2013). Pleiotropic effects of a mitochondrial–nuclear incompatibility depend upon the accelerating effect of temperature in *Drosophila*. *Genetics*, 195(3), 1129-1139.
- Hoffmann, A. A., Hallas, R., Sinclair, C., i Mitrovski, P. (2001). Levels of variation in stress resistance in *Drosophila* among strains, local populations, and geographic regions: patterns for desiccation, starvation, cold resistance, and associated traits. *Evolution*, 55(8), 1621-1630.
- Hoffmann, A. A., i Harshman, L. G. (1999). Desiccation and starvation resistance in *Drosophila*: patterns of variation at the species, population and intrapopulation levels. *Heredity*, 83(6), 637-643.
- Hoffmann, A. A., i Parsons, P. (1993). Direct and correlated responses to selection for desiccation resistance: a comparison of *Drosophila melanogaster* and *D. simulans*. *Journal of evolutionary biology*, 6(5), 643-657.
- Hsiao, C., i Hsiao, T. (1985). Rickettsia as the cause of cytoplasmic incompatibility in the alfalfa weevil, *Hypera postica*. *Journal of invertebrate pathology*, 45(2), 244-246.
- Hurst, G. D., i Jiggins, F. M. (2005). Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(1572), 1525-1534.
- Hurst, L. D. (2011). The sound of silence. *Nature*, 471(7340), 582-583.
- Hutter, C. M., i Rand, D. M. (1995). Competition between mitochondrial haplotypes in distinct nuclear genetic environments: *Drosophila pseudoobscura* vs. *D. persimilis*. *Genetics*, 140(2), 537-548.
- Immonen, E., Berger, D., Sayadi, A., Liljestrand-Rönn, J., i Arnqvist, G. (2020). An experimental test of temperature-dependent selection on mitochondrial haplotypes in *Callosobruchus maculatus* seed beetles. *Ecology and Evolution*, 10(20), 11387-11398.
- Immonen, E., Collet, M., Goenaga, J., i Arnqvist, G. (2016a). Direct and indirect genetic effects of sex-specific mitonuclear epistasis on reproductive ageing. *Heredity*, 116(3), 338-339.
- Immonen, E., Rönn, J., Watson, C., Berger, D., i Arnqvist, G. (2016b). Complex mitonuclear interactions and metabolic costs of mating in male seed beetles. *Journal of evolutionary biology*, 29(2), 360-370.
- Infante, F. (2000). Development and population growth rates of *Prorops nasuta* (Hym., Bethyridae) at constant temperatures. *Journal of applied entomology*, 124(9/10), 343-348.
- Innocenti, P., Morrow, E. H., i Dowling, D. K. (2011). Experimental evidence supports a sex-specific selective sieve in mitochondrial genome evolution. *Science*, 332(6031), 845-848.
- Ivanova, R., Lepage, V., Charron, D., i Schachter, F. (1998). Mitochondrial genotype associated with French Caucasian centenarians. *Gerontology*, 44(6), 349.
- James, A. C., i Ballard, J. W. O. (2003). Mitochondrial genotype affects fitness in *Drosophila simulans*. *Genetics*, 164(1), 187-194.
- Jelić, M., Arnqvist, G., Kurbalija Novičić, Z., Kenig, B., Tanasković, M., Anđelković, M., i Stamenković-Radak, M. (2015). Sex-specific effects of sympatric mitonuclear variation on fitness in *Drosophila subobscura*. *BMC Evolutionary Biology*, 15, 1-9.
- Jelić, M., Castro, J. A., Kurbalija Novičić, Z., Kenig, B., Dimitrijević, D., Savić Veselinović, M., Jovanović, M., Milovanović, D., Stamenković-Radak, M. i Andjelković, M. (2012a). Absence of linkage disequilibria between chromosomal arrangements and mtDNA haplotypes in natural populations of *Drosophila subobscura* from the Balkan Peninsula. *Genome*, 55(3), 214-221.
- Jelić, M., Kenig, B., Tanasković, M., Stamenković-Radak, M., i Anđelković, M. (2012b). Relationship between chromosomal and mitochondrial DNA variability of *Drosophila subobscura* population from the Lazar's River Canyon. *Genetika*, 44(2), 409-417.

- Jiang, Y., Neti, S. S., Sitarik, I., Pradhan, P., To, P., Xia, Y., Fried, S.D., Booker, S.J. i O'Brien, E. P. (2023). How synonymous mutations alter enzyme structure and function over long timescales. *Nature Chemistry*, 15(3), 308-318.
- Jiggins, F. M., Schulenburg, J. H. G. v. d., Hurst, G. D., i Majerus, M. E. (2001). Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 268(1474), 1423-1427.
- Kalmus, H. (1941). The resistance to desiccation of *Drosophila* mutants affecting body colour. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences*, 130(859), 185-201.
- Kaneko, M., Satta, Y., Matsuura, E. T., i Chigusa, S. I. (1993). Evolution of the mitochondrial ATPase 6 gene in *Drosophila*: unusually high level of polymorphism in *D. melanogaster*. *Genetics Research*, 61(3), 195-204.
- Kang, L., Aggarwal, D. D., Rashkovetsky, E., Korol, A. B., i Michalak, P. (2016). Rapid genomic changes in *Drosophila melanogaster* adapting to desiccation stress in an experimental evolution system. *BMC genomics*, 17, 1-11.
- Karan, D., Dahiya, N., Munjal, A. K., Gibert, P., Moreteau, B., Parkash, R., i David, J. R. (1998). Desiccation and starvation tolerance of adult *Drosophila*: opposite latitudinal clines in natural populations of three different species. *Evolution*, 52(3), 825-831.
- Kazancıoğlu, E., i Arnqvist, G. (2014). The maintenance of mitochondrial genetic variation by negative frequency-dependent selection. *Ecology letters*, 17(1), 22-27.
- Kébé, K., Alvarez, N., Espíndola, A., Justy, F., Olivieri, I., i Sembène, M. (2016). Insights into the genetic structure of the cowpea pest *Callosobruchus maculatus* in Africa. *Journal of pest science*, 89, 449-458.
- Kern, A. D., i Hahn, M. W. (2018). The neutral theory in light of natural selection. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1366-1371.
- Kilpatrick, S. T., i Rand, D. M. (1995). Conditional hitchhiking of mitochondrial DNA: frequency shifts of *Drosophila melanogaster* mtDNA variants depend on nuclear genetic background. *Genetics*, 141(3), 1113-1124.
- Kim, B. Y., Wang, J. R., Miller, D. E., Barmina, O., Delaney, E., Thompson, A., Comeault, A. A., Peede, D., D'Agostino, E. R. R., Pelaez, J., Aguilar, J. M., Haji, D., Matsunaga, T., Armstrong, E. E., Zych, M., Ogawa, Y., Stamenkovic-Radak, M., Jelic, M., Savic Veselinovic, M., Tanaskovic, M., Eric, P., Gao, J.-J., Katoh, T. K., Toda, M. J., Watabe, H., Watada, M., Davis, J. S., Moyle, L. C., Manoli, G., Bertolini, E., Kos't a l, V., Hawley, R. S., Takahashi, A., Jones, C. D., Price, D. K., Whiteman, N., Kopp, A., Matute, D. R., & Petrov, D. A. (2021). Highly contiguous assemblies of 101 drosophilid genomes. *Elife*, 10, e66405.
- Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*: Cambridge University Press.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., i Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic acids research*, 41(1), e1-e1.
- Kojima, K.-I., i Tobari, Y. N. (1969). Selective modes associated with karyotypes in *Drosophila ananassae*. II. Heterosis and frequency-dependent selection. *Genetics*, 63(3), 639.
- Kozek, W. J., i Rao, R. U. (2007). The discovery of *Wolbachia* in arthropods and nematodes—A historical perspective *Wolbachia: a bug's life in another bug* (Vol. 5, pp. 1-14): Karger Publishers.
- Krimbas C.B. (1993) *Drosophila subobscura*: biology, genetics, and inversion polymorphism. Verlag Dr. Kovac, Hamburg
- Kurbalija Novičić, Z., Immonen, E., Jelić, M., Anđelković, M., Stamenković-Radak, M., i Arnqvist, G. (2015). Within-population genetic effects of mt DNA on metabolic rate in *Drosophila subobscura*. *Journal of evolutionary biology*, 28(2), 338-346.
- Kurbalija Novičić, Z., Sayadi, A., Jelić, M., i Arnqvist, G. (2020). Negative frequency dependent selection contributes to the maintenance of a global polymorphism in mitochondrial DNA.

- BMC Evolutionary Biology*, 20, 1-9.
- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., i Christensen, R. H. (2017). lmerTest package: tests in linear mixed effects models. *Journal of statistical software*, 82, 1-26.
- Lai, L. B., Vioque, A., Kirsebom, L. A., i Gopalan, V. (2010). Unexpected diversity of RNase P, an ancient tRNA processing enzyme: challenges and prospects. *FEBS letters*, 584(2), 287-296.
- Lajbner, Z., Pnini, R., Camus, M. F., Miller, J., i Dowling, D. K. (2018). Experimental evidence that thermal selection shapes mitochondrial genome evolution. *Scientific Reports*, 8(1), 9500.
- Lakovaara, S., i Saura, A. (1971). Genetic variation in natural populations of *Drosophila obscura*. *Genetics*, 69(3), 377.
- Land, J. V. t., Putten, P. V., Zwaan, Kamping, i Delden, W. V. (1999). Latitudinal variation in wild populations of *Drosophila melanogaster*: heritabilities and reaction norms. *Journal of evolutionary biology*, 12(2), 222-232.
- Lane, N. (2011). Mitonuclear match: optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations. *Bioessays*, 33(11), 860-869.
- Lane, N. (2015). *Vital Question: Energy, Evolution, and the Origins of Complex Life*: WW Norton i Company.
- Law, R. (1979). Optimal life histories under age-specific predation. *The American Naturalist*, 114(3), 399-417.
- Le Bourg, E. (2021). Is lifespan linked with developmental viability in *Drosophila melanogaster*? *Experimental Gerontology*, 156, 111583.
- Lenth, R., Buerkner, P., Herve, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H., i Singmann, H. (2022). Emmeans: Estimated marginal means, aka least-squares means. r package version 1.7. 2 (2022).
- Lewontin, R. C. (1974). *The genetic basis of evolutionary change* (Vol. 560): Columbia University Press New York.
- Librado, P., i Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.
- Loisel, D. A., Rockman, M. V., Wray, G. A., Altmann, J., i Alberts, S. C. (2006). Ancient polymorphism and functional variation in the primate MHC-DQA1 5' cis-regulatory region. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(44), 16331-16336.
- Longdon, B., Obbard, D. J., i Jiggins, F. M. (2010). Sigma viruses from three species of *Drosophila* form a major new clade in the rhabdovirus phylogeny. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1678), 35-44.
- Longdon, B., Wilfert, L., i Jiggins, F. M. (2012). The sigma viruses of *Drosophila*. *Rhabdoviruses: Molecular Taxonomy, Evolution, Genomics, Ecology, Cytopathology and Control*, 117-132.
- Longdon, B. J. (2011). Evolution and ecology of *Drosophila* sigma viruses.
- Loukas, M., Krimbas, C., i Vergini, Y. (1979). The genetics of *Drosophila subobscura* populations. IX. Studies on linkage disequilibrium in four natural populations. *Genetics*, 93(2), 497-523.
- Loukas, M., Krimbas, C., i Morgan K. (1980). The Genetics of *Drosophila subobscura* Populations Xiv. Further Data on Linkage Disequilibria. *Genetics*, 95(3):757-68
- MacRae, A. F., i Anderson, W. W. (1988). Evidence for non-neutrality of mitochondrial DNA haplotypes in *Drosophila pseudoobscura*. *Genetics*, 120(2), 485-494.
- Maklakov, A. A., Friberg, U., Dowling, D. K., i Arnqvist, G. (2006). Within-population variation in cytoplasmic genes affects female life span and aging in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 60(10), 2081-2086.
- Maklakov, A. A., i Lummaa, V. (2013). Evolution of sex differences in lifespan and aging: causes and constraints. *Bioessays*, 35(8), 717-724.
- Mandavilli, B. S., Santos, J. H., i Van Houten, B. (2002). Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 509(1-2), 127-151.
- Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach.

- Cancer research*, 27(2_Part_1), 209-220.
- Martikainen, M. H., Grady, J. P., Ng, Y. S., Alston, C. L., Gorman, G. S., Taylor, R. W., McFarland, R. i Turnbull, D. M. (2017). Decreased male reproductive success in association with mitochondrial dysfunction. *European Journal of Human Genetics*, 25(10), 1162-1164.
- Martinez, D., Moya, A., Latorre, A., i Fereres, A. (1992). Mitochondrial DNA variation in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) populations from four Spanish localities. *Annals of the Entomological Society of America*, 85(2), 241-246.
- Matzkin, L., Watts, T. D., i Markow, T. A. (2007). Desiccation resistance in four *Drosophila* species: sex and population effects. *Fly*, 1(5), 268-273.
- McDonald, J. H., i Kreitman, M. (1991). Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature*, 351(6328), 652-654.
- McKee, B. D., Wilhelm, K., Merrill, C., i Ren, X.-j. (1998). Male sterility and meiotic drive associated with sex chromosome rearrangements in *Drosophila*: role of XY pairing. *Genetics*, 149(1), 143-155.
- Meiklejohn, C., Holmbeck, M., Siddiq, M., Abt, D., i Rand, D. (2013). An Incompatibility between a Mitochondrial tRNA and Its Nuclear-Encoded tRNA synthetase compromises development and fitness in *Drosophila*. *PLoS genetics*, 9(1), e1003238.
- Meiklejohn, C. D., Montooth, K. L., i Rand, D. M. (2007). Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends in genetics*, 23(6), 259-263.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A. G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D. i Sukernik, R.I. (2003). Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(1), 171-176.
- Mohlke, K. L., Jackson, A. U., Scott, L. J., Peck, E. C., Suh, Y. D., Chines, P. S., Watanabe, R.M., Buchanan, T.A., Conneely, K.N., Erdos, M.R. and Narisu, N., Enloe S., Valle T.T., Tuomilehto J., Bergman R.N., Boehnke M., Collins F.S. (2005). Mitochondrial polymorphisms and susceptibility to type 2 diabetes-related traits in Finns. *Human genetics*, 118, 245-254.
- Montenegro, H., Solferini, V., Klaczko, L., i Hurst, G. (2005). Male-killing Spiroplasma naturally infecting *Drosophila melanogaster*. *Insect Molecular Biology*, 14(3), 281-287.
- Montooth, K. L., Meiklejohn, C. D., Abt, D. N., i Rand, D. M. (2010). Mitochondrial–nuclear epistasis affects fitness within species but does not contribute to fixed incompatibilities between species of *Drosophila*. *Evolution*, 64(12), 3364-3379.
- Mossman, J. A., Biancani, L. M., Zhu, C.-T., i Rand, D. M. (2016a). Mitonuclear epistasis for development time and its modification by diet in *Drosophila*. *Genetics*, 203(1), 463-484.
- Mossman, J. A., Tross, J. G., Li, N., Wu, Z., i Rand, D. M. (2016b). Mitochondrial-nuclear interactions mediate sex-specific transcriptional profiles in *Drosophila*. *Genetics*, 204(2), 613-630.
- Moya, A., Barrio, E., Martínez, D., Latorre, A., González-Candelas, F., Ramón, M., i Castro, J. A. (1993). Molecular characterization and cytonuclear disequilibria of two *Drosophila subobscura* mitochondrial haplotypes. *Genome*, 36(5), 890-898.
- Mukai, T. (1964). The genetic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. I. Spontaneous mutation rate of polygenes controlling viability. *Genetics*, 50(1), 1.
- Mukai, T., i Yamazaki, T. (1971). The genetic structure of natural populations of *Drosophila melanogaster*. X. Developmental time and viability. *Genetics*, 69(3), 385.
- Nachman, M. W. (1998). Deleterious mutations in animal mitochondrial DNA. *Mutation and evolution*, 61-69.
- Nachman, M. W., Boyer, S. N., i Aquadro, C. F. (1994). Nonneutral evolution at the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 3 gene in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(14), 6364-6368.
- Nachman, M. W., Brown, W. M., Stoneking, M., i Aquadro, C. F. (1996). Nonneutral mitochondrial DNA variation in humans and chimpanzees. *Genetics*, 142(3), 953-963.

- Nishigaki, Y., Yamada, Y., Fuku, N., Matsuo, H., Segawa, T., Watanabe, S., Kato, K., Yokoi, K., Yamaguchi, S., Nozawa, Y. i Tanaka, M. (2007). Mitochondrial haplogroup N9b is protective against myocardial infarction in Japanese males. *Human genetics*, 120, 827-836.
- Ohira, T., Suzuki, T., Miyauchi, K., Suzuki, T., Yokobori, S.-i., Yamagishi, A., i Watanabe, K. (2013). Decoding mechanism of non-universal genetic codes in *Loligo bleekeri* mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 288(11), 7645-7652.
- Ohta, T. (1973). Slightly deleterious mutant substitutions in evolution. *Nature*, 246(5428), 96-98.
- Ohta, T. (1992a). The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annual review of ecology and systematics*, 23(1), 263-286.
- Ohta, T. (1992b). Theoretical study of near neutrality. II. Effect of subdivided population structure with local extinction and recolonization. *Genetics*, 130(4), 917-923.
- Oliver, P., Balanyà, J., Ramon, M. M., Picornell, A., Serra, L., Moya, A., i Castro, J. A. (2005). Population dynamics of the 2 major mitochondrial DNA haplotypes in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genome*, 48(6), 1010-1018.
- Oliver, P., Castro, J.A., Picornell, A., Ramon, M.M., Solé, E., Balanyà, J., Serra, L., Latorre, A. i Moya, A. (2002). Linkage disequilibria between mtDNA haplotypes and chromosomal arrangements in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Heredity*, 89(2), 133-138.
- O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A., Karr, T. L., i Robertson, H. M. (1992). 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(7), 2699-2702.
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419-420.
- Parker, G. A. (1979). Sexual selection and sexual conflict. *Sexual selection and reproductive competition in insects*, 123, 166.
- Parsons, P. (1970). Genetic heterogeneity in natural populations of *Drosophila melanogaster* for ability to withstand desiccation. *Theoretical and Applied Genetics*, 40(6), 261-266.
- Parsons, P. (1980). Parallel climatic races for tolerances to high temperature-desiccation stress in two *Drosophila* species. *Journal of Biogeography*, 97-101.
- Partridge, L., i Fowler, K. (1992). Direct and correlated responses to selection on age at reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 46(1), 76-91.
- Partridge, L., i Fowler, K. (1993). Responses and correlated responses to artificial selection on thorax length in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 47(1), 213-226.
- Partridge, L., Gems, D., i Withers, D. J. (2005). Sex and death: what is the connection? *Cell*, 120(4), 461-472.
- Pascual, M., Aquadro, C. F., Soto, V., i Serra, L. (2001). Microsatellite variation in colonizing and palearctic populations of *Drosophila subobscura*. *Molecular biology and evolution*, 18(5), 731-740.
- Pascual, M., Chapuis, M. P., Mestres, F., Balanya, J., Huey, R., Gilchrist, G., G.W., Serra, L. i Estoup, A. (2007). Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Molecular ecology*, 16(15), 3069-3083.
- Passamonti, M., Calderone, M., Delpero, M., i Plazzi, F. (2020). Clues of in vivo nuclear gene regulation by mitochondrial short non-coding RNAs. *Scientific Reports*, 10(1), 8219.
- Patel, M. R., Miriyala, G. K., Littleton, A. J., Yang, H., Trinh, K., Young, J. M., Kennedy, S.R., Yamashita, Y.M., Pallanck, L.J. i Malik, H. S. (2016). A mitochondrial DNA hypomorph of cytochrome oxidase specifically impairs male fertility in *Drosophila melanogaster*. *Elife*, 5, e16923.
- Pavković-Lučić, S., Savić, T., Jelić, M., Kenig, B., Tanasković, M., Stamenković-Radak, M., i Anđelković, M. (2012). Note on the fauna of *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae) and the first record of *Opomyza florum* (Diptera: Opomyzidae) from Mt. Goč, Serbia. *Acta Entomologica Serbica*, 17(1/2), 45-51.
- Pesole, G., Gissi, C., De Chirico, A., i Saccone, C. (1999). Nucleotide substitution rate of

- mammalian mitochondrial genomes. *Journal of molecular evolution*, 48, 427-434.
- Pichaud, N., Ballard, J. W. O., Tanguay, R. M., i Blier, P. U. (2012). Naturally occurring mitochondrial DNA haplotypes exhibit metabolic differences: insight into functional properties of mitochondria. *Evolution*, 66(10), 3189-3197.
- Pinsker, W., i Sperlich, D. (1979). Allozyme variation in natural populations of *Drosophila subobscura* along a North-South gradient. *Genetica*, 50(3), 207-219.
doi:10.1007/BF00122046
- Pinto, F., Brehm, A., Hernandez, M., Larruga, J., González, A., i Cabrera, V. (1997). Population genetic structure and colonization sequence of *Drosophila subobscura* in the Canaries and Madeira Atlantic islands as inferred by autosomal, sex-linked and mtDNA traits. *Journal of Heredity*, 88(2), 108-114.
- Poinsot, D., Charlat, S., i Mercot, H. (2003). On the mechanism of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility: Confronting the models with the facts. *Bioessays*, 25(3), 259-265.
- Powsner, L. (1935). The effects of temperature on the durations of the developmental stages of *Drosophila melanogaster*. *Physiological Zoology*, 8(4), 474-520.
- Pozzi, A., Plazzi, F., Milani, L., Ghiselli, F., i Passamonti, M. (2017). SmithRNAs: could mitochondria “bend” nuclear regulation? *Molecular biology and evolution*, 34(8), 1960-1973.
- Prasad, N. G., Shakarad, M., Gohil, V. M., Sheeba, V., Rajamani, M., i Joshi, A. (2000). Evolution of reduced pre-adult viability and larval growth rate in laboratory populations of *Drosophila melanogaster* selected for shorter development time. *Genetics Research*, 76(3), 249-259.
- Prasad, N., i Joshi, A. (2003). What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? *Journal of genetics*, 82, 45-76.
- Prevosti, A., de Frutos, R., Alonso, G., Latorre, A., Monclus, M., i Martinez, M.-J. (1984). Genetic differentiation between natural populations of *Drosophila subobscura* in the Western Mediterranean Area with respect to chromosomal variation. *Génétique sélection évolution*, 16(2), 143-156.
- Quintela, M., Johansson, M. P., Kristjansson, B. K., Barreiro, R., i Laurila, A. (2014). AFLPs and mitochondrial haplotypes reveal local adaptation to extreme thermal environments in a freshwater gastropod. *PLoS One*, 9(7), e101821.
- R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., i Suchard, M. A. (2018). Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901-904.
- Ramírez-Soriano, A., Ramos-Onsins, S. E., Rozas, J., Calafell, F., i Navarro, A. (2008). Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, 179(1), 555-567.
- Ramos-Onsins, S. E., i Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, 19(12), 2092-2100.
- Rand, D. M., Clark, A. G., i Kann, L. M. (2001). Sexually antagonistic cytonuclear fitness interactions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 159(1), 173-187.
- Rand, D. M., Dorfsman, M., i Kann, L. M. (1994). Neutral and non-neutral evolution of *Drosophila* mitochondrial DNA. *Genetics*, 138(3), 741-756.
- Rand, D. M., Fry, A., i Sheldahl, L. (2006). Nuclear–mitochondrial epistasis and *Drosophila* aging: Introgression of *Drosophila simulans* mtDNA modifies longevity in *D. melanogaster* nuclear backgrounds. *Genetics*, 172(1), 329-341.
- Rand, D. M., Haney, R. A., i Fry, A. J. (2004). Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends in ecology i evolution*, 19(12), 645-653.
- Rand, D. M., Mossman, J. A., Zhu, L., Biancani, L. M., i Ge, J. Y. (2018). Mitonuclear epistasis, genotype-by-environment interactions, and personalized genomics of complex traits in *Drosophila*. *Iubmb Life*, 70(12), 1275-1288.

- Rawson, P. D., i Burton, R. S. (2002). Functional coadaptation between cytochrome c and cytochrome c oxidase within allopatric populations of a marine copepod. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12955-12958.
- Reynier, P., May-Panloup, P., Chretien, M., Morgan, C., Jean, M., Savagner, F., Barriere, P. i Malthiery, Y. (2001). Mitochondrial DNA content affects the fertilizability of human oocytes. *Molecular human reproduction*, 7(5), 425-429.
- Rizzuto, R., De Stefani, D., Raffaello, A., i Mammucari, C. (2012). Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*, 13(9), 566-578.
- Robertson, F. W. (1960). The ecological genetics of growth in *Drosophila* 1. Body size and developmental time on different diets 1. Body size and developmental time on different diets. *Genetics Research*, 1(2), 288-304.
- Roff, D. (2001). Life history, evolution of. *Encyclopedia of biodiversity*, 631-641.
- Rogers, A. R., i Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, 9(3), 552-569.
- Rose, M. R., Vu, L. N., Park, S. U., i Graves Jr, J. L. (1992). Selection on stress resistance increases longevity in *Drosophila melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 27(2), 241-250.
- Rosenberg, N. A. (2002). The probability of topological concordance of gene trees and species trees. *Theoretical population biology*, 61(2), 225-247.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P., i Solignac, M. (1992). *Wolbachia* endosymbionts responsible for various alterations of sexuality in arthropods. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 250(1328), 91-98.
- Ruiz-Pesini, E., Mishmar, D., Brandon, M., Procaccio, V., i Wallace, D. C. (2004). Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science*, 303(5655), 223-226.
- Sackton, T. B., Haney, R. A., i Rand, D. M. (2003). Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: disruption of cytochrome c oxidase activity in backcross genotypes. *Evolution*, 57(10), 2315-2325.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology*, 14(3), 225-IN226.
- Sang, J. H. (1962). Selection for rate of larval development using *Drosophila melanogaster* cultured axenically on deficient diets. *Genetics Research*, 3(1), 90-109.
- Santos, M., Fowler, K., i Partridge, L. (1994). Gene–environment interaction for body size and larval density in *Drosophila melanogaster*: an investigation of effects on development time, thorax length and adult sex ratio. *Heredity*, 72(5), 515-521.
- Savić-Veselinović, M., Pavković-Lučić, S., Kurbalija-Novičić, Z., Jelić, M., i Anđelković, M. (2013). Sexual selection can reduce mutational load in *Drosophila subobscura*. *Genetika*, 45(2), 537-552.
- Schulte, P. M. (2015). The effects of temperature on aerobic metabolism: towards a mechanistic understanding of the responses of ectotherms to a changing environment. *The Journal of experimental biology*, 218(12), 1856-1866.
- Scott, R. A., Fuku, N., Onywera, V. O., Boit, M., Wilson, R. H., Tanaka, M., Goodwin, W.H i Pitsiladis, Y. P. (2009). Mitochondrial haplogroups associated with elite Kenyan athlete status. *Medicine i Science in Sports i Exercise*, 41(1), 123-128.
- Scott, R. A., Wilson, R. H., Goodwin, W. H., Moran, C. N., Georgiades, E., Wolde, B., i Pitsiladis, Y. P. (2005). Mitochondrial DNA lineages of elite Ethiopian athletes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140(3), 497-503.
- Service, P., Hutchinson, E., MacKinley, M., i Rose, M. (1985). Resistance to environmental stress in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiological Zoology*, 58(4), 380-389.
- Service, P. M. (1987). Physiological mechanisms of increased stress resistance in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Physiological Zoology*, 60(3), 321-326.
- Shadel, G. S., i Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annual*

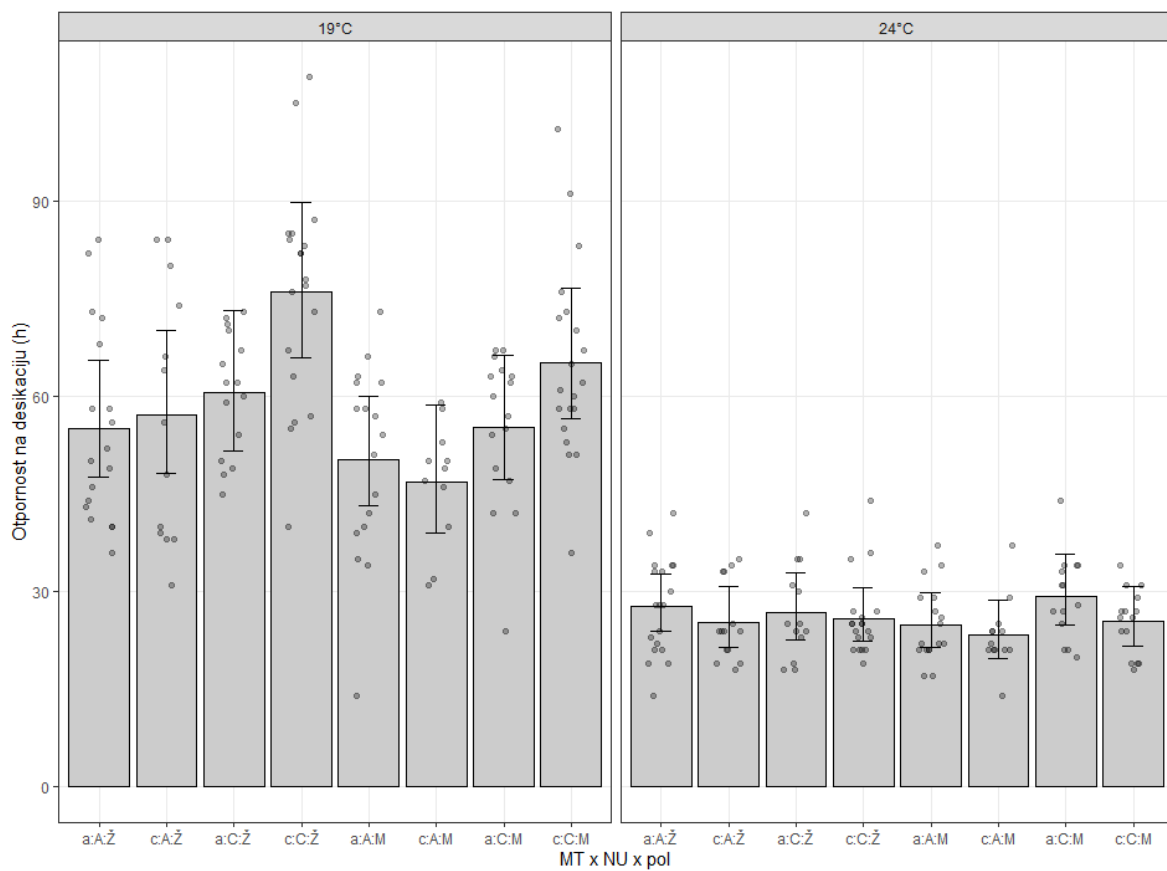
- review of biochemistry*, 66(1), 409-435.
- Shakun, J. D., i Carlson, A. E. (2010). A global perspective on Last Glacial Maximum to Holocene climate change. *Quaternary Science Reviews*, 29(15-16), 1801-1816.
- Shen, Y.-Y., Liang, L., Zhu, Z.-H., Zhou, W.-P., Irwin, D. M., i Zhang, Y.-P. (2010). Adaptive evolution of energy metabolism genes and the origin of flight in bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8666-8671.
- Shorrocks, B. (1975). The distribution and abundance of woodland species of British *Drosophila* (Diptera: Drosophilidae). *The Journal of Animal Ecology*, 851-864.
- Siekevitz, P. (1957). Powerhouse of the cell. *Scientific American*, 197(1), 131-144.
- Silva, G., Lima, F. P., Martel, P., i Castilho, R. (2014). Thermal adaptation and clinal mitochondrial DNA variation of European anchovy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1792), 20141093.
- Smith, J. M., i Haigh, J. (1974). The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetics Research*, 23(1), 23-35.
- Somero, G. N. (2002). Thermal physiology and vertical zonation of intertidal animals: optima, limits, and costs of living. *Integrative and comparative biology*, 42(4), 780-789.
- Stanić, S., Kekić, V., i Pavković-Lučić, S. (2002). A contribution to knowledge of Drosophilidae (Diptera) fauna in Kragujevac basin. *Acta Entomologica Serbica*, 7(1/2), 151-154.
- Starr, D. J., i Cline, T. W. (2002). A host-parasite interaction rescues *Drosophila* oogenesis defects. *Nature*, 418(6893), 76-79.
- Stearns, S. C., Ackermann, M., Doebeli, M., i Kaiser, M. (2000). Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(7), 3309-3313.
- Stouthamer, R., Breeuwer, J., Luck, R., i Werren, J. (1993). Molecular identification of microorganisms associated with parthenogenesis. *Nature*, 361(6407), 66-68.
- Suzuki, T., i Suzuki, T. (2014). A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic acids research*, 42(11), 7346-7357.
- Tajima, F. (1989a). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 597-601.
- Tajima, F. (1989b). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- Takahata, N. (1984). A model of extranuclear genomes and the substitution rate under within-generation selection. *Genetics Research*, 44(1), 109-115.
- Takahata, N. (1993). Relaxed natural selection in human populations during the Pleistocene. *The Japanese Journal of Genetics*, 68(6), 539-547.
- Tanaka, M., Gong, J.-S., Zhang, J., Yamada, Y., Borgeld, H.-J., i Yagi, K. (2000). Mitochondrial genotype associated with longevity and its inhibitory effect on mutagenesis. *Mechanisms of ageing and development*, 116(2-3), 65-76.
- Tao, Y., Masly, J. P., Araripe, L., Ke, Y., i Hartl, D. L. (2007). A sex-ratio meiotic drive system in *Drosophila simulans*. I: an autosomal suppressor. *PLoS biology*, 5(11), e292.
- Taylor, F. (1981). Ecology and evolution of physiological time in insects. *The American Naturalist*, 117(1), 1-23.
- Teixeira, L., Ferreira, Á., i Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS biology*, 6(12), e1000002.
- Templeton, A. R. (1996). Contingency tests of neutrality using intra/interspecific gene trees: the rejection of neutrality for the evolution of the mitochondrial cytochrome oxidase II gene in the hominoid primates. *Genetics*, 144(3), 1263-1270.
- Terry, R. S., Smith, J. E., i Dunn, A. M. (1998). Impact of a novel, feminising microsporidium on its crustacean host. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 45(5), 497-501.
- Terry, R. S., Smith, J. E., Sharpe, R. G., Rigaud, T., Littlewood, D. T. J., Ironside, J. E Rollinson, D., Bouchon, D., MacNeil, C., Dick, J.T. i Dunn, A.M. (2004). Widespread vertical

- transmission and associated host sex-ratio distortion within the eukaryotic phylum *Microspora*. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1550), 1783-1789.
- Testa, N. D., Ghosh, S. M., i Shingleton, A. W. (2013). Sex-specific weight loss mediates sexual size dimorphism in *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*, 8(3), e58936.
- Therneau, T., Crowson, C., i Atkinson, E. (2020). Multi-state models and competing risks. *CRAN-R* (<https://cran.r-project.org/web/packages/survival/vignettes/compete.pdf>).
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., i Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Towarnicki, S. G., i Ballard, J. W. O. (2017). *Drosophila* mitotypes determine developmental time in a diet and temperature dependent manner. *Journal of Insect Physiology*, 100, 133-139.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R. i Törnell, J. (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, 429(6990), 417-423.
- Tripoli, G., D'Elia, D., Barsanti, P., i Caggese, C. (2005). Comparison of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) nuclear genes in the genomes of *Drosophila melanogaster*, *Drosophila pseudoobscura* and *Anopheles gambiae*. *Genome biology*, 6(2), 1-17.
- Trivers, R. L., i Campbell, B. (1972). Sexual selection and the descent of man: Aldine, Chicago.
- Vaught, R. C., Voigt, S., Dobler, R., Clancy, D. J., Reinhardt, K., i Dowling, D. K. (2020). Interactions between cytoplasmic and nuclear genomes confer sex-specific effects on lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Journal of evolutionary biology*, 33(5), 694-713.
- Savić-Veselinović, M., Novicic, Z. K., Kenig, B., Jelic, M., Patenković, A., Tanasković, M., Pertoldi, C., Stamenkovic-Radak, M. i Andjelkovic, M. (2019). Local adaptation at fine spatial scale through chromosomal inversions and mito-nuclear epistasis: Findings in *Drosophila subobscura* (Diptera: Drosophilidae). *European Journal of Entomology*, 116, 492-503.
- Wai, T., Ao, A., Zhang, X., Cyr, D., Dufort, D., i Shoubridge, E. A. (2010). The role of mitochondrial DNA copy number in mammalian fertility. *Biology of reproduction*, 83(1), 52-62.
- Wallace, D. C. (2005). The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene*, 354, 169-180.
- Wallace, D. C. (2010). Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environmental and molecular mutagenesis*, 51(5), 440-450.
- Wang, L., Zhou, C., He, Z., Wang, Z.-G., Wang, J.-L., i Wang, Y.-F. (2012). *Wolbachia* infection decreased the resistance of *Drosophila* to lead. *PLoS One*, 7(3), e32643.
- Wang, M., Huang, Y.-P., Wu, H., Song, K., Wan, C., Chi, A.-N., Xiao, Y.M. i Zhao, X.-Y. (2017). Mitochondrial complex I deficiency leads to the retardation of early embryonic development in *Ndufs4* knockout mice. *PeerJ*, 5, e3339.
- Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., i Cole, J. R. (2007). Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and environmental microbiology*, 73(16), 5261-5267.
- Watabe, H., Toda, M. J., Li, G. C., Duan, C. L., Imitty, R., Entomack, B., i Muhtar, A. (1993). *Drosophilid* fauna (Diptera, Drosophilidae) of Chinese Central Asia. *Jpn J Ent*, 61, 525-545.
- Watson, E. T., Flanagan, B. A., Pascari, J. A., i Edmands, S. (2022). Mitochondrial effects on fertility and longevity in *Tigriopus californicus* contradict predictions of the mother's curse hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B*, 289(1987), 20221211.
- Weinreich, D. M., i Rand, D. M. (2000). Contrasting patterns of nonneutral evolution in proteins encoded in nuclear and mitochondrial genomes. *Genetics*, 156(1), 385-399.
- Werren, J. H. (1997). Biology of *wolbachia*. *Annual review of entomology*, 42(1), 587-609.
- Whittam, T. S., Clark, A. G., Stoneking, M., Cann, R. L., i Wilson, A. C. (1986). Allelic variation in human mitochondrial genes based on patterns of restriction site polymorphism.

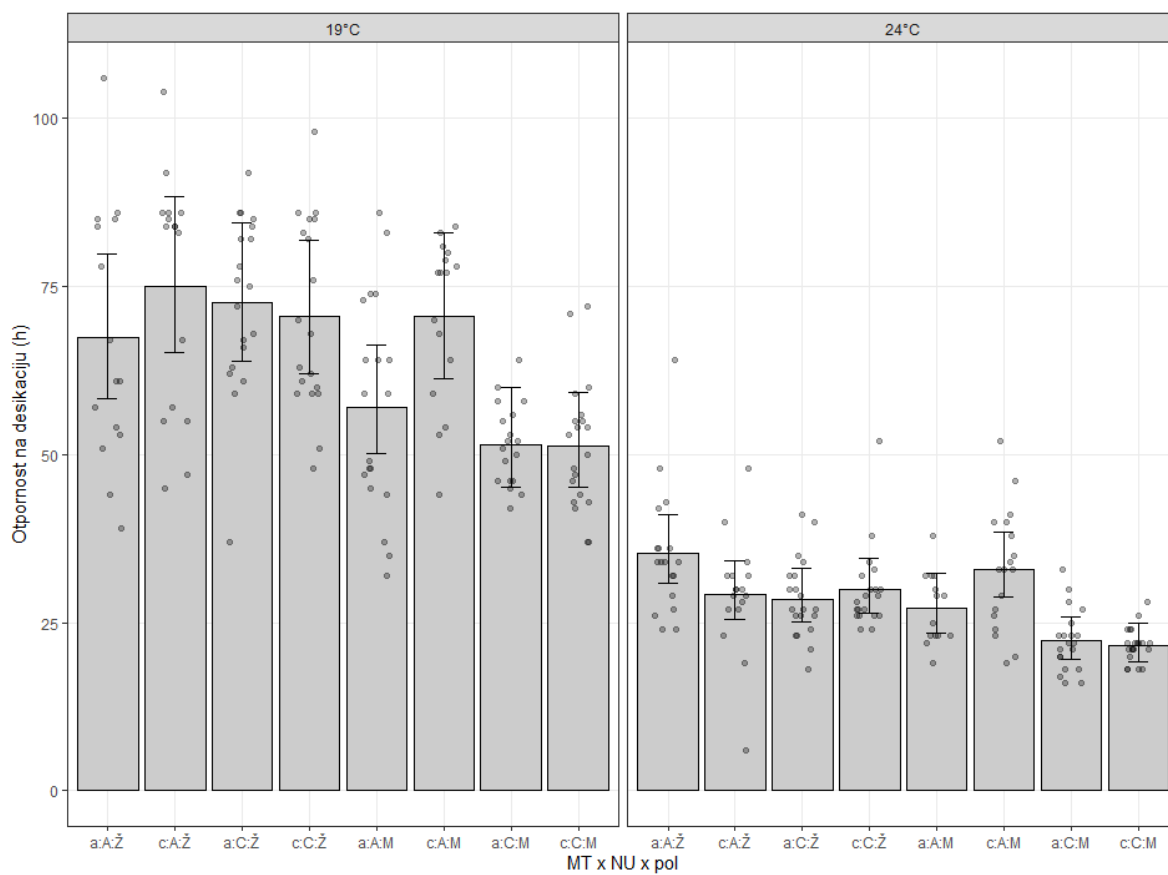
- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(24), 9611-9615.
- Willett, C. S., i Burton, R. S. (2001). Viability of cytochrome c genotypes depends on cytoplasmic backgrounds in *Tigriopus californicus*. *Evolution*, 55(8), 1592-1599.
- Willett, C. S., i Burton, R. S. (2003). Environmental influences on epistatic interactions: viabilities of cytochrome c genotypes in interpopulation crosses. *Evolution*, 57(10), 2286-2292.
- Wolff, J., Pichaud, N., Camus, M., Côté, G., Blier, P., i Dowling, D. (2016a). Evolutionary implications of mitochondrial genetic variation: mitochondrial genetic effects on OXPHOS respiration and mitochondrial quantity change with age and sex in fruit flies. *Journal of evolutionary biology*, 29(4), 736-747.
- Wolff, J. N., Camus, M. F., Clancy, D. J., i Dowling, D. K. (2016b). Complete mitochondrial genome sequences of thirteen globally sourced strains of fruit fly (*Drosophila melanogaster*) form a powerful model for mitochondrial research. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(6), 4672-4674.
- Wolff, J. N., Ladoukakis, E. D., Enríquez, J. A., i Dowling, D. K. (2014). Mitonuclear interactions: evolutionary consequences over multiple biological scales. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 369(1646), 20130443.
- Wolff, J. N., Tompkins, D. M., Gemmell, N. J., i Dowling, D. K. (2016c). Mitonuclear interactions, mtDNA-mediated thermal plasticity and implications for the Trojan Female Technique for pest control. *Scientific Reports*, 6(1), 30016.
- Wolstenholme, D. R. (1992). Animal mitochondrial DNA: structure and evolution. *International review of cytology*, 141, 173-216.
- Yee, W. K., Sutton, K. L., i Dowling, D. K. (2013). In vivo male fertility is affected by naturally occurring mitochondrial haplotypes. *Current Biology*, 23(2), R55-R56.
- Yen, J. H., i Barr, A. R. (1971). New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*, 232(5313), 657-658.
- Zeljić, K., Savić-Veselinović, M. i Jelić M. (2021) Genetika, Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet
- Zhu, C., Ingelmo, P., i Rand, D. (2014). G× G× E for Lifespan in *Drosophila*: Mitochondrial, Nuclear, and dietary interactions that modify longevity. *PLoS genetics*, 10(5), e1004354.
- Zwaan, B., Bijlsma, R., i Hoekstra, R. (1995a). Artificial selection for developmental time in *Drosophila melanogaster* in relation to the evolution of aging: direct and correlated responses. *Evolution*, 49(4), 635-648.
- Zwaan, B., Bijlsma, R., i Hoekstra, R. (1995b). Direct selection on life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 49(4), 649-659.

8. PRILOZI

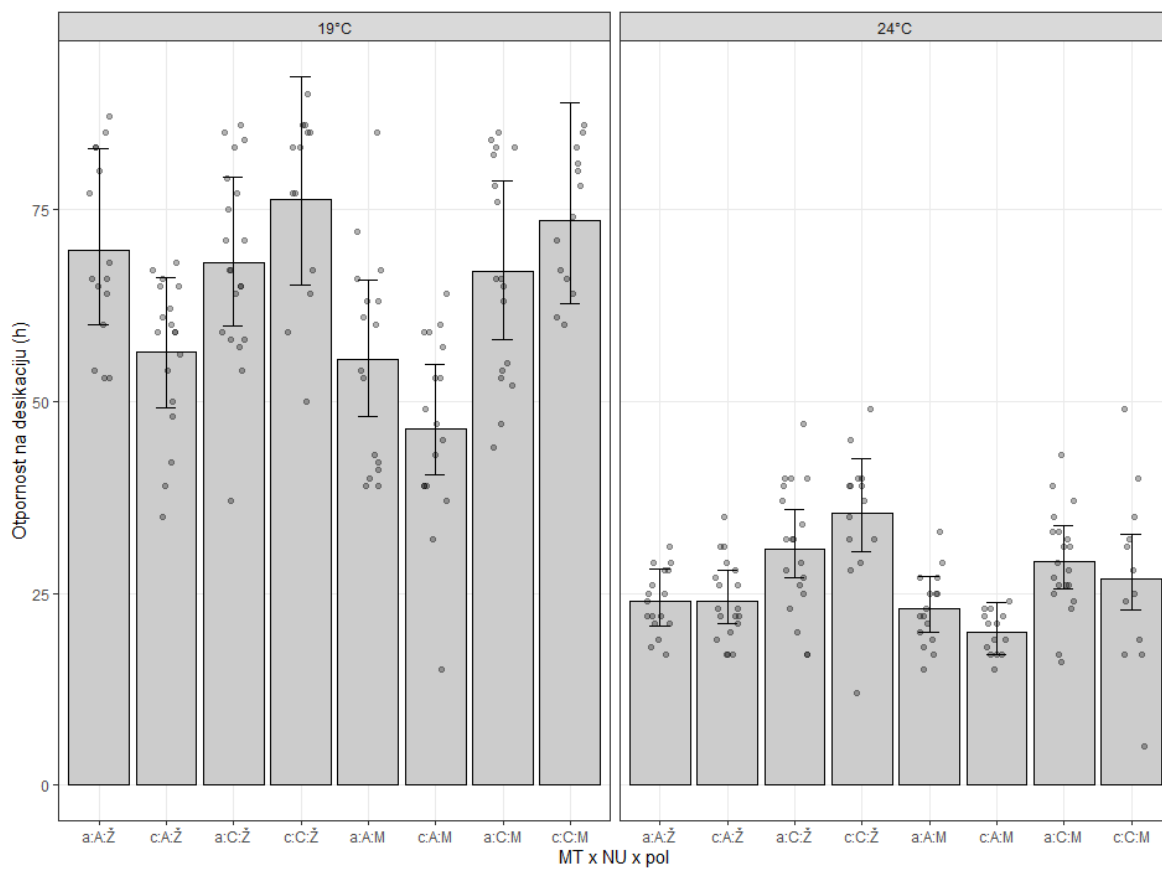
Slike P1- P11 prikazuju srednja vremena preživljavanja eksperimenta desikacije *D. subobscura* za sve kombinacije genotipova i pola na dve eksperimentalne temperature, kod svakog od jedanaest kvarteta. Malo slovo označava mtDNK haplotip (MT) gde je „a“ haplotip I, dok je „c“ haplotip II. Velika slova označavaju odgovarajuću jedarnu pozadinu (NU)), Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke predstavljaju vremena preživljavanja pojedinačnih jedinki. Predstavljeni su intervali poverenja od 95%.



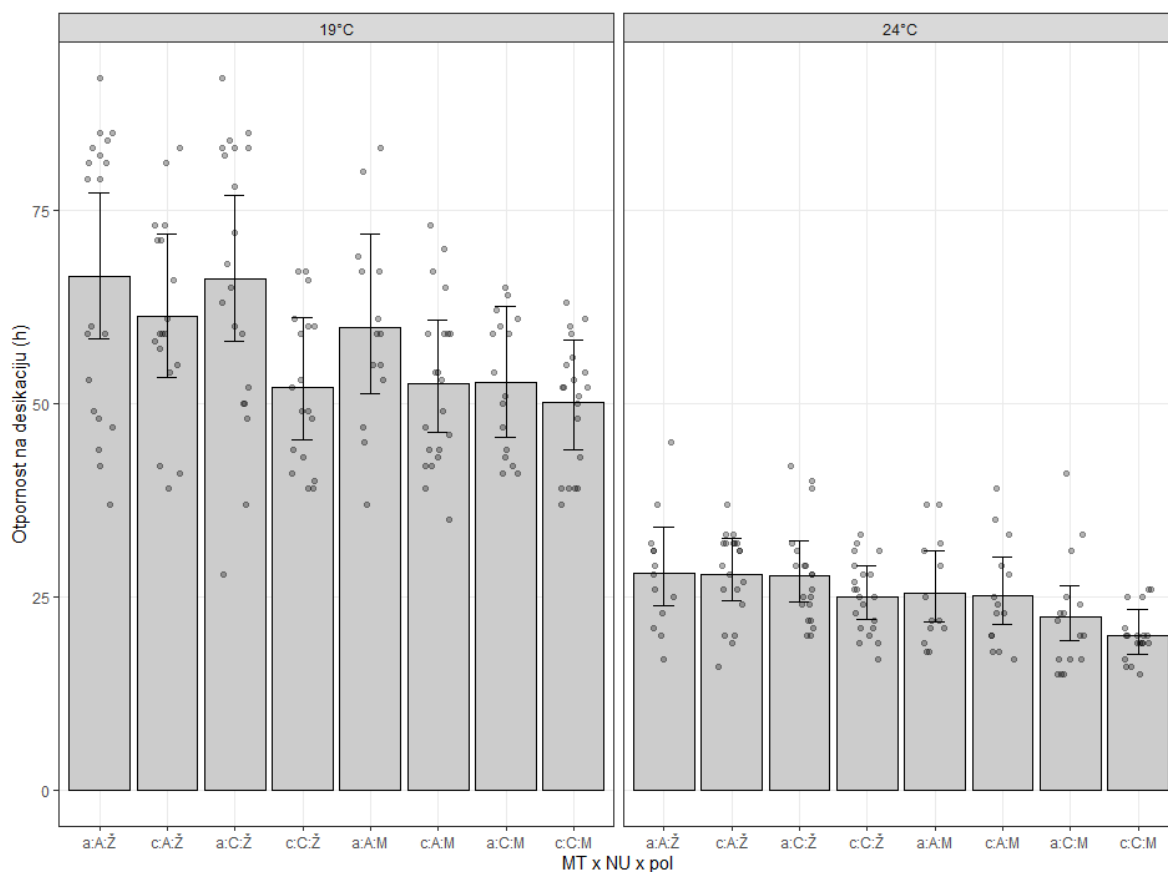
Slika P1. Prvi kvartet



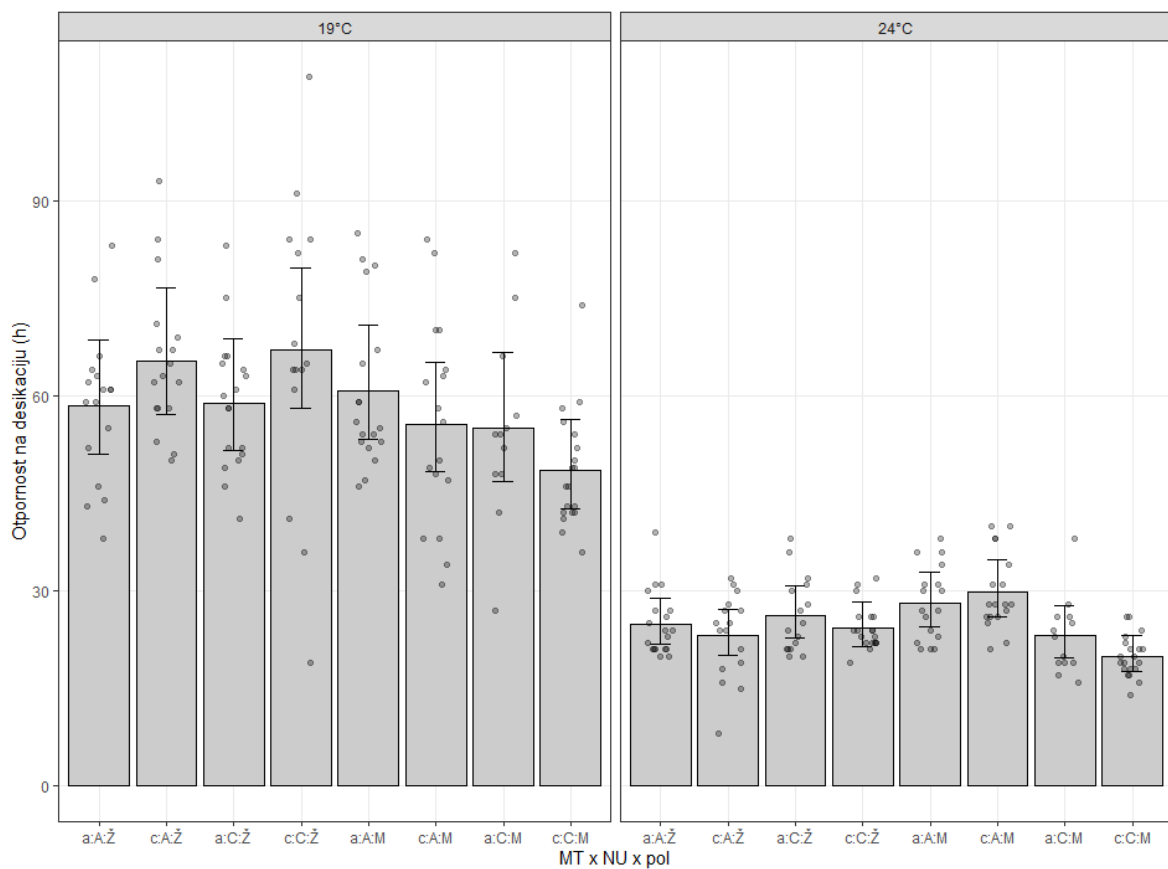
Slika P2. Drugi kvartet



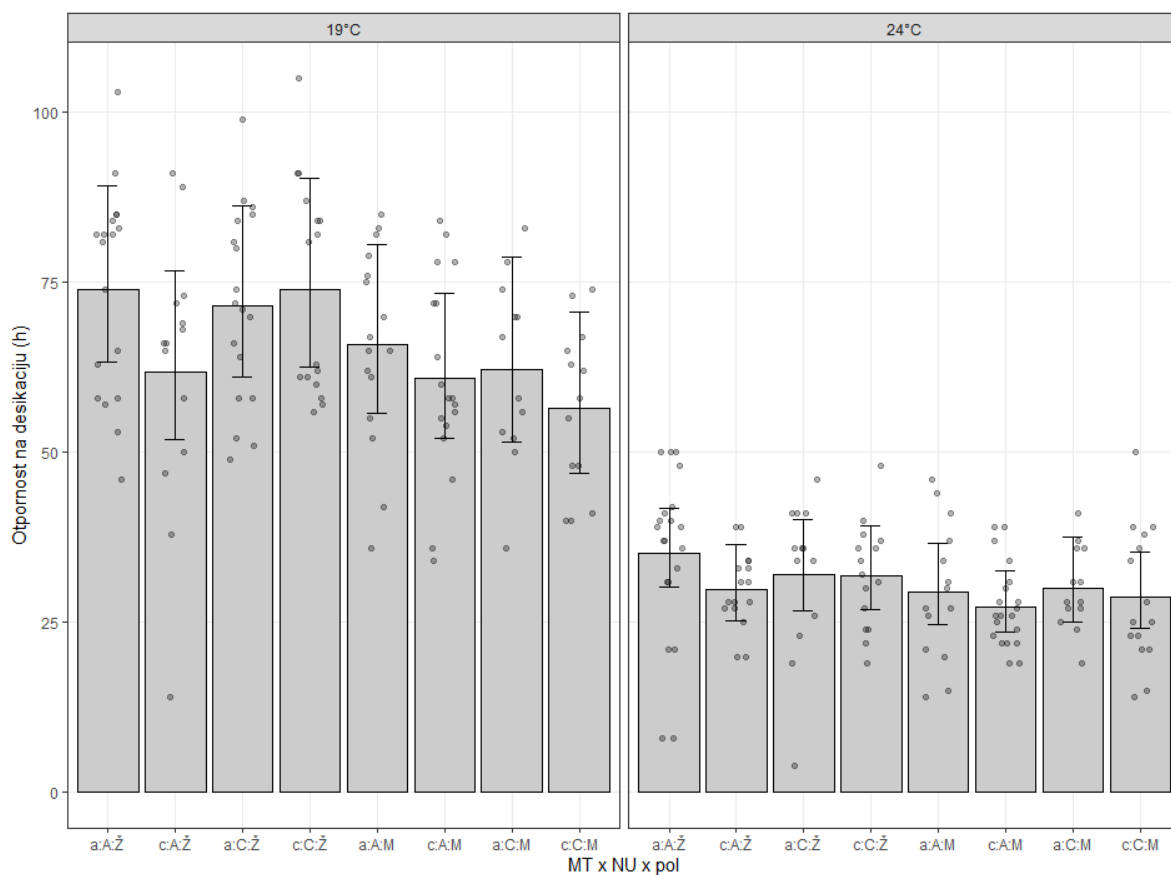
Slika P3. Treći kvartet



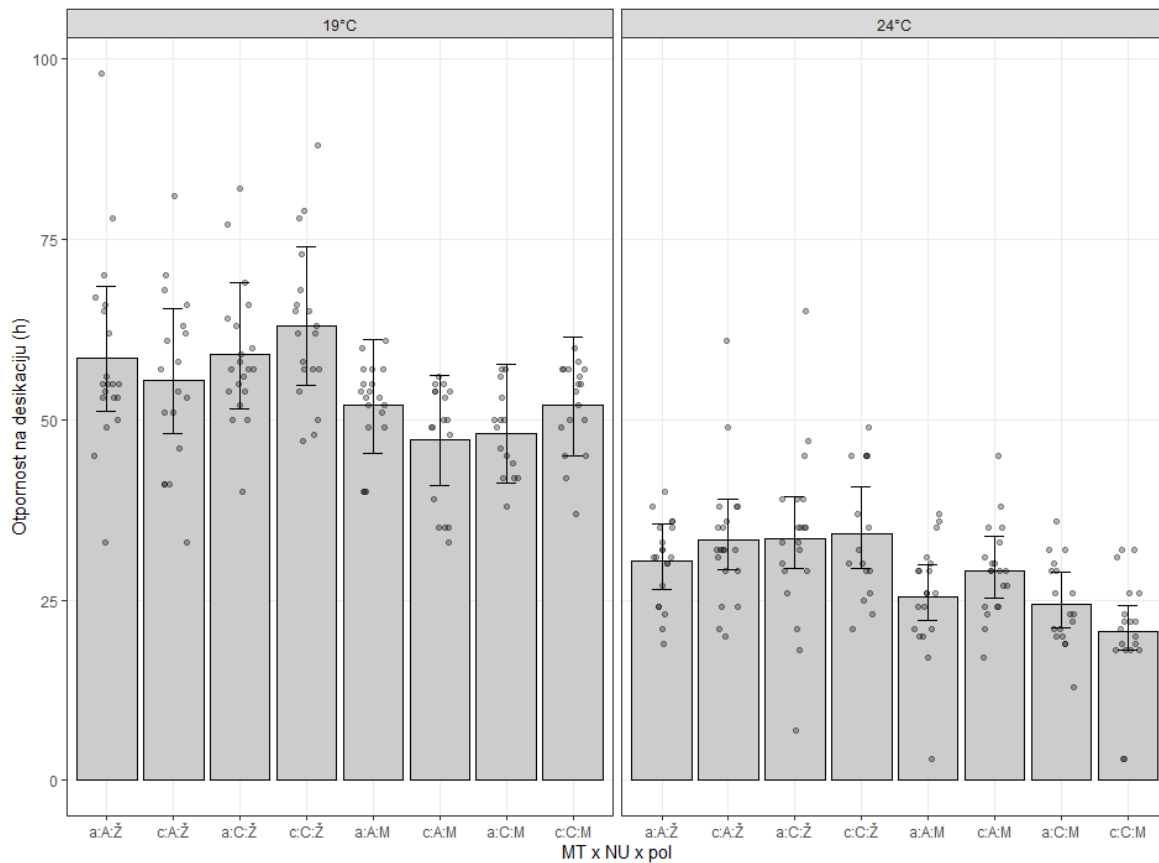
Slika P4. Četvrti kvartet



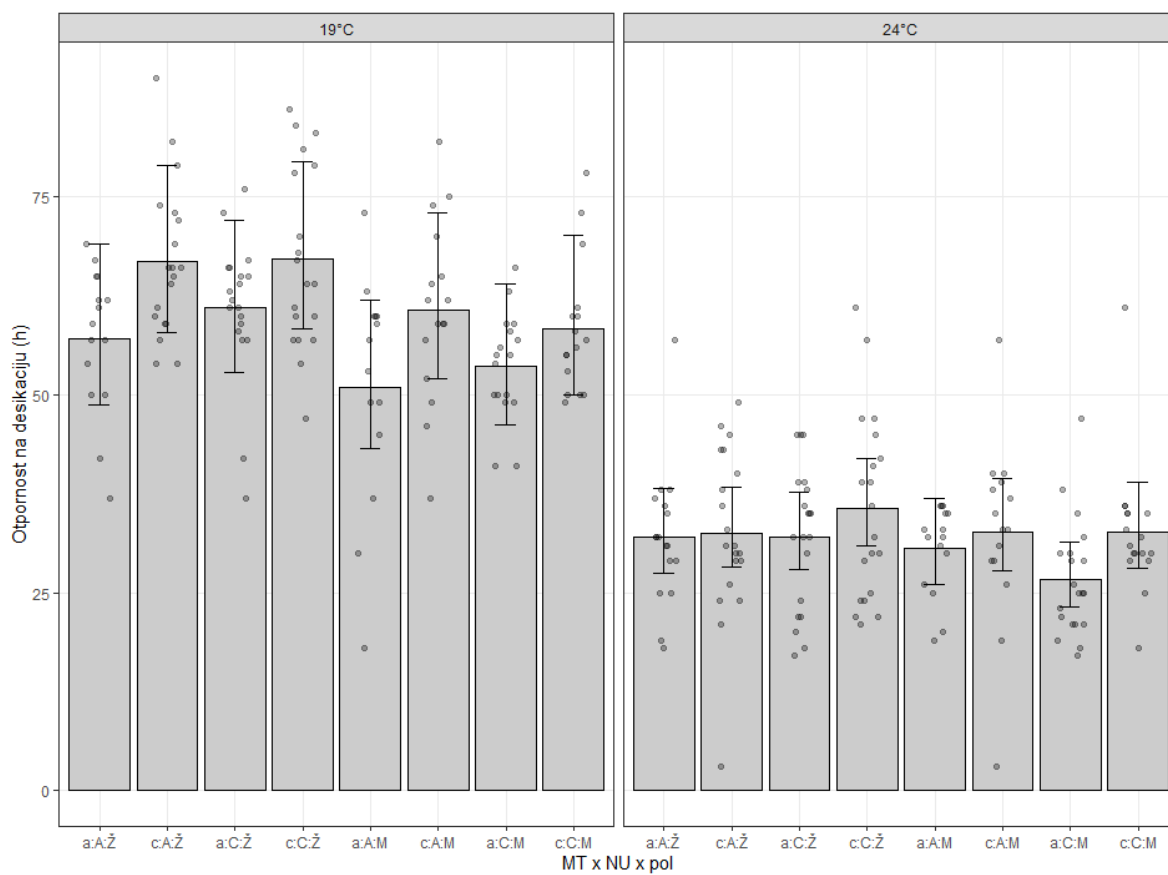
Slika P5. Peti kvartet



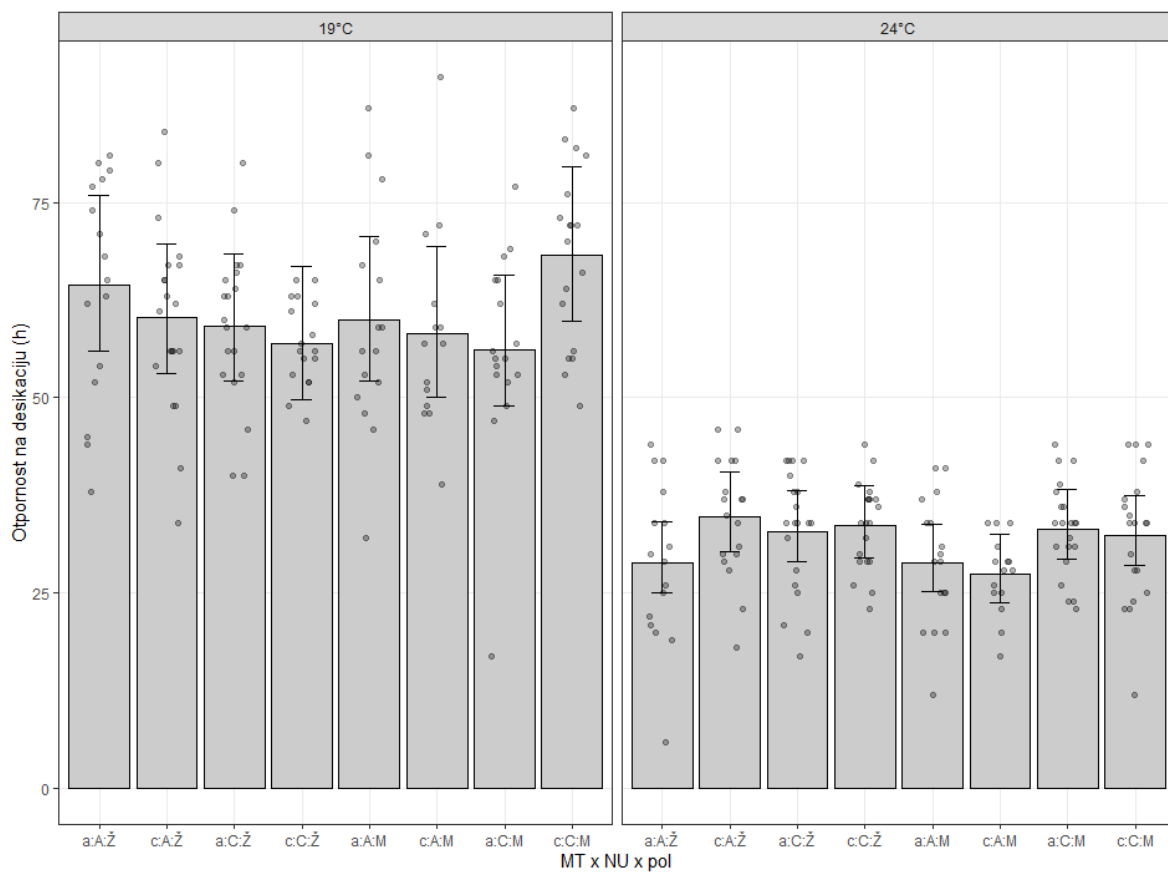
Slika P6. Šesti kvartet



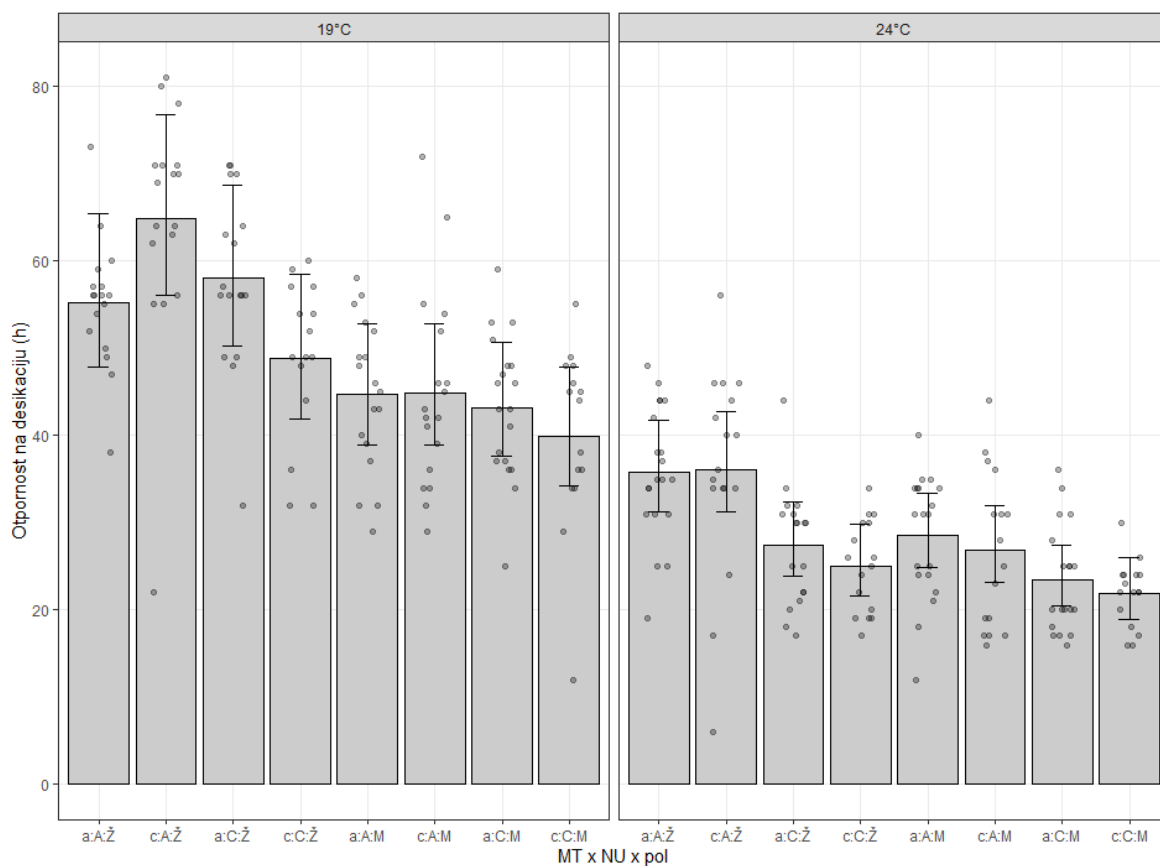
Slika P7. Sedmi kvartet



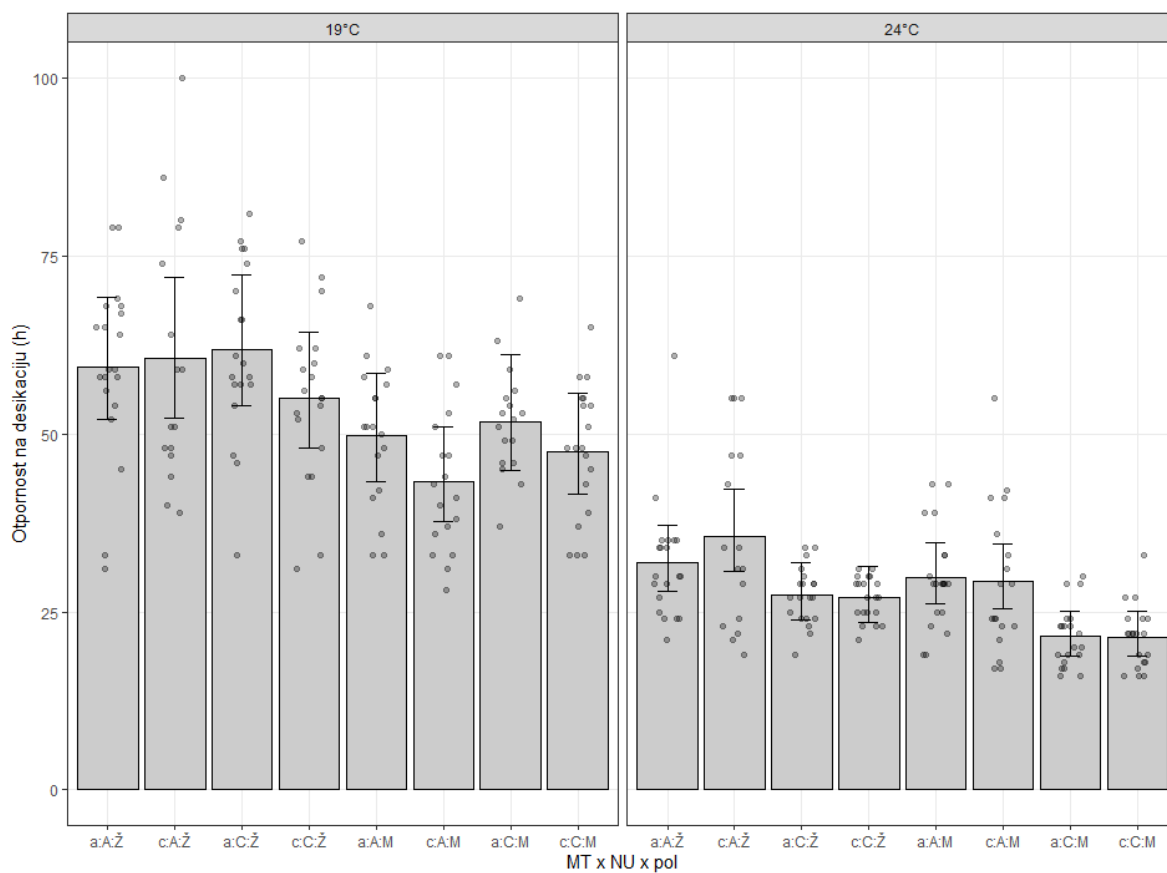
Slika P8. Osmi kvartet



Slika P9. Deveti kvartet

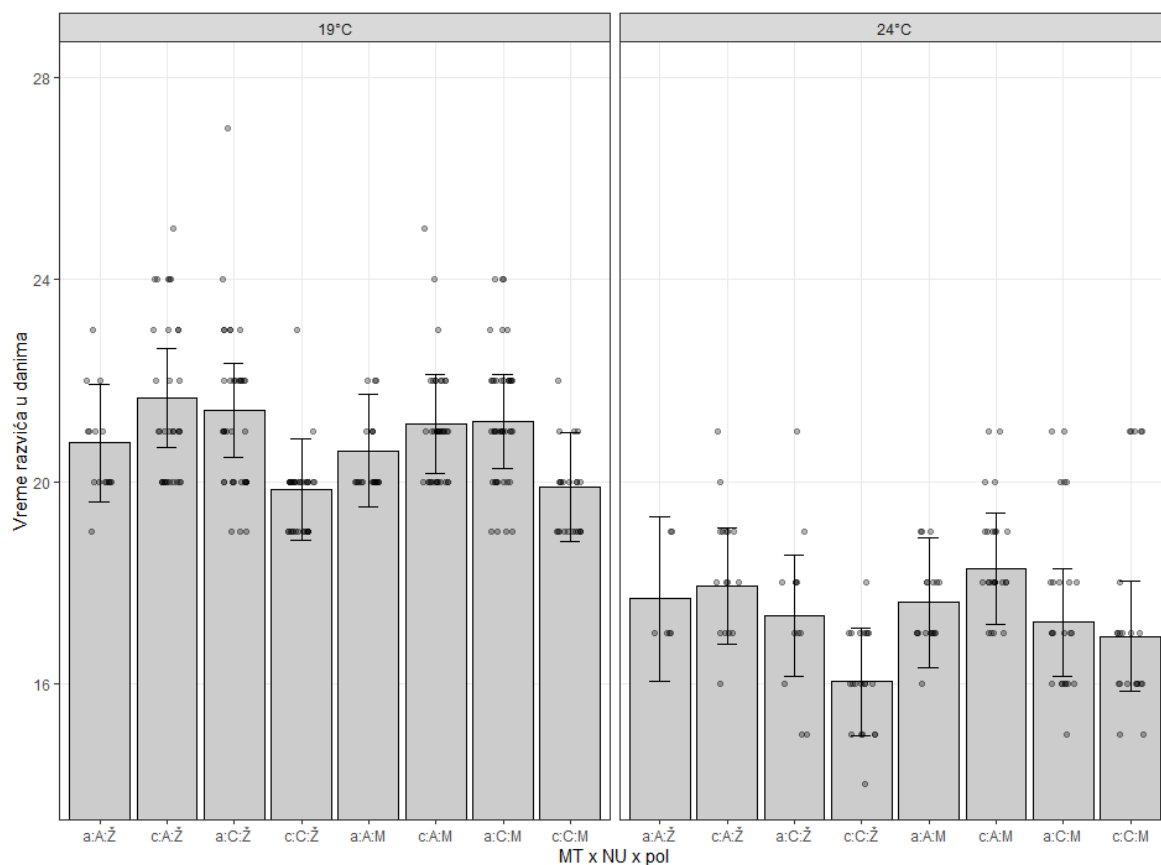


Slika P10. Deseti kvartet

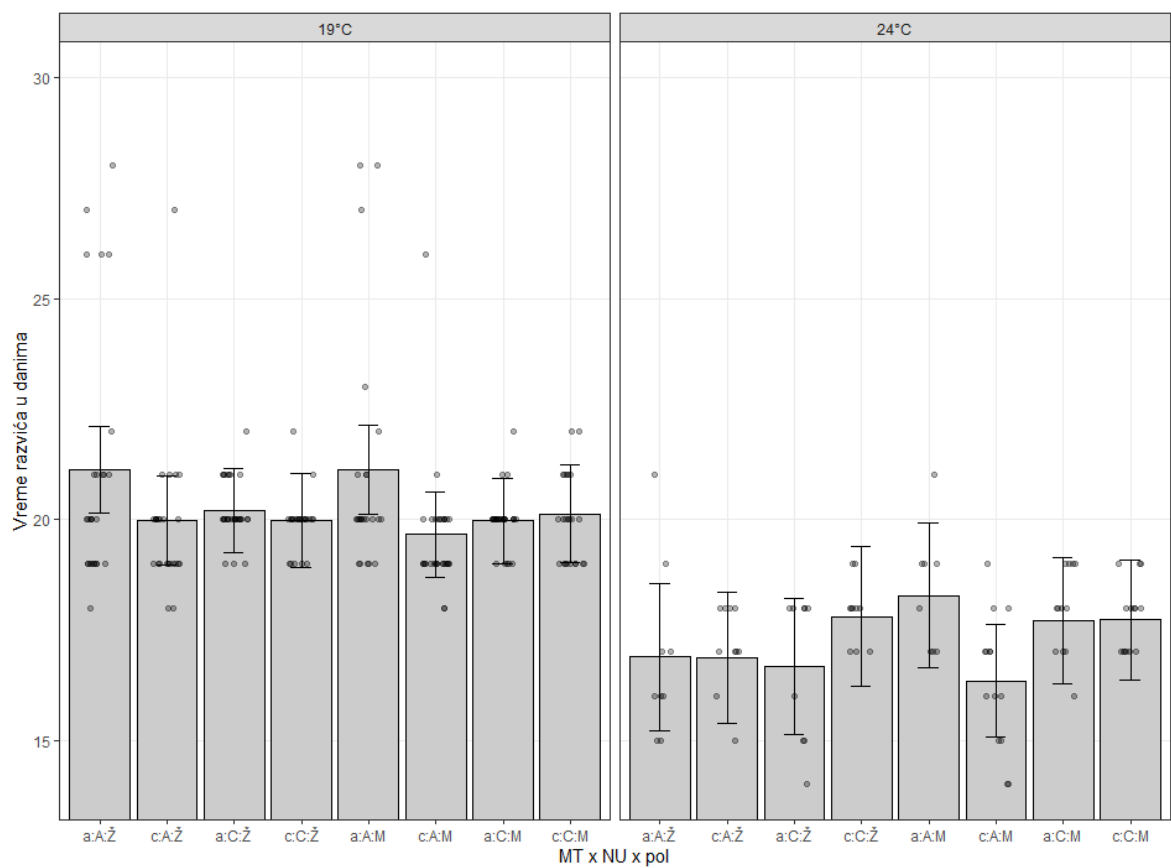


Slika P11. Jedanaesti kvartet

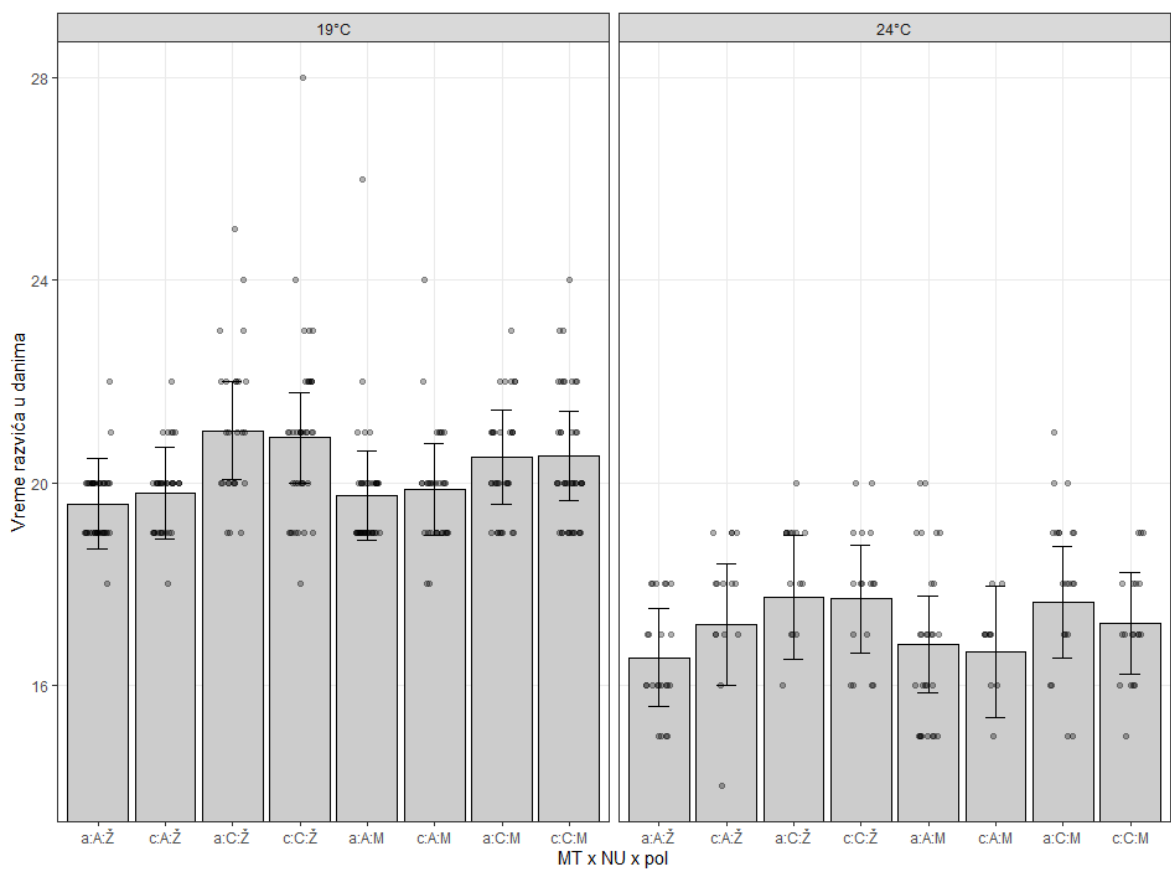
Slike P12- P22. Srednja vremena dužine razvića *D. subobscura* u danima za sve kombinacije genotipova i pola na dve eksperimentalne temperature, kod svakog od jedanaest kvarteta. Malo slovo označava mtDNK haplotip (MT) gde je „a“ haplotip I, dok je „c“ haplotip II. Velika slova označavaju odgovarajuću jedarnu pozadinu (NU)), dok Ž i M označavaju ženke odnosno mužjake (pol). Tačke predstavljaju vremena razvića pojedinačnih jedinki. Predstavljani su intervali poverenja od 95%.



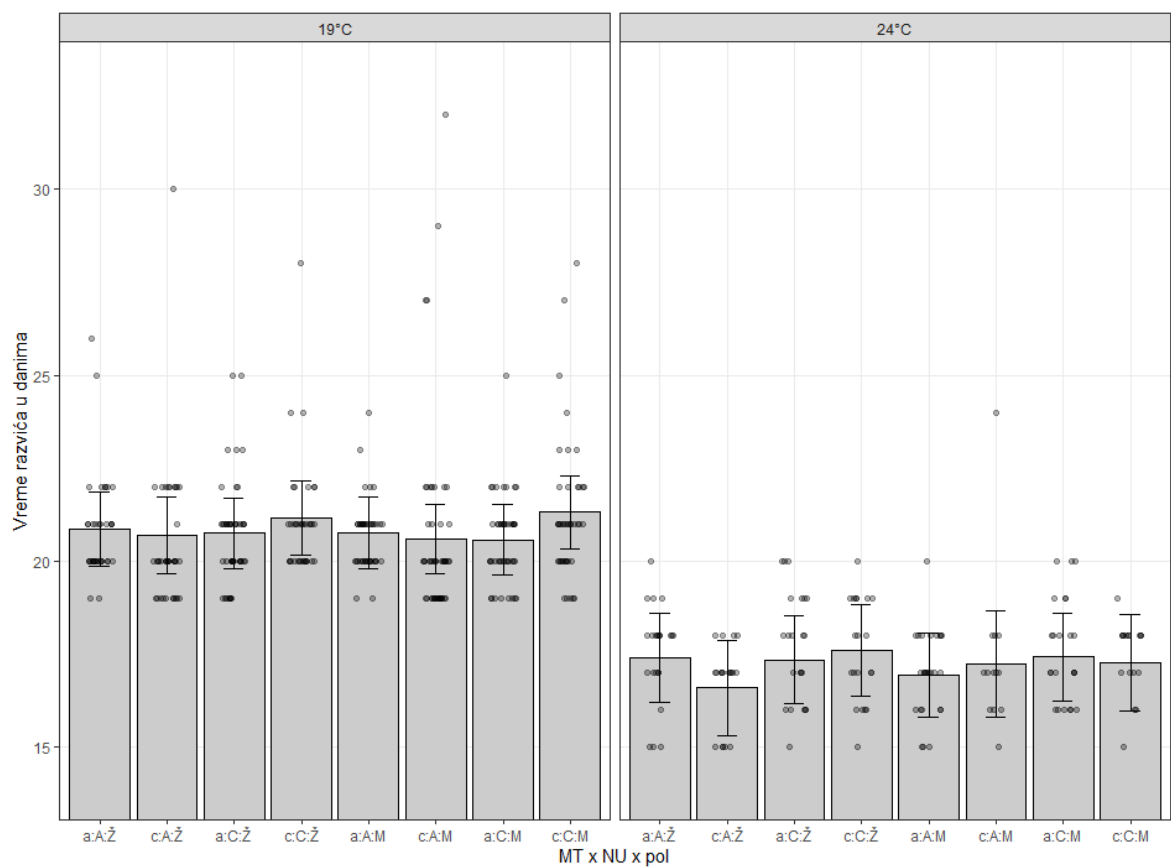
Slika P12. Prvi kvartet



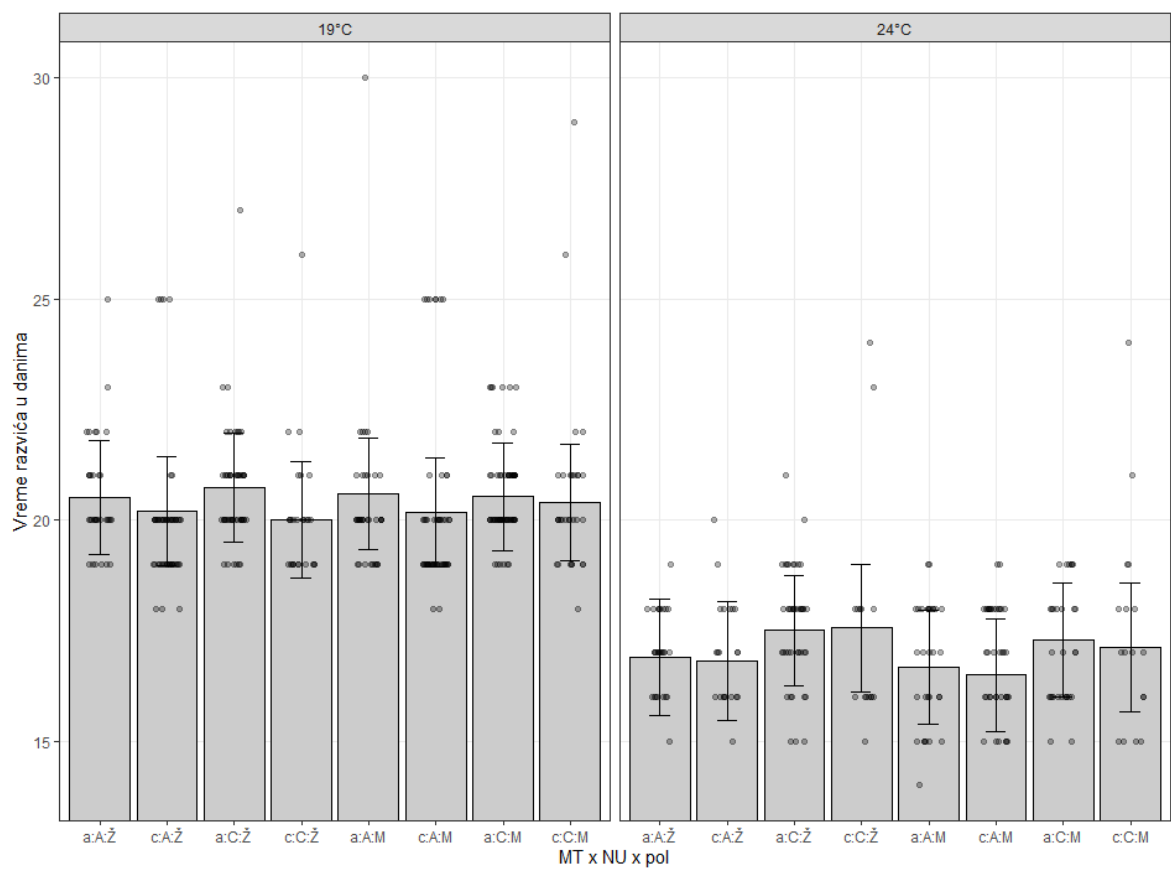
Slika P13. Drugi kvartet



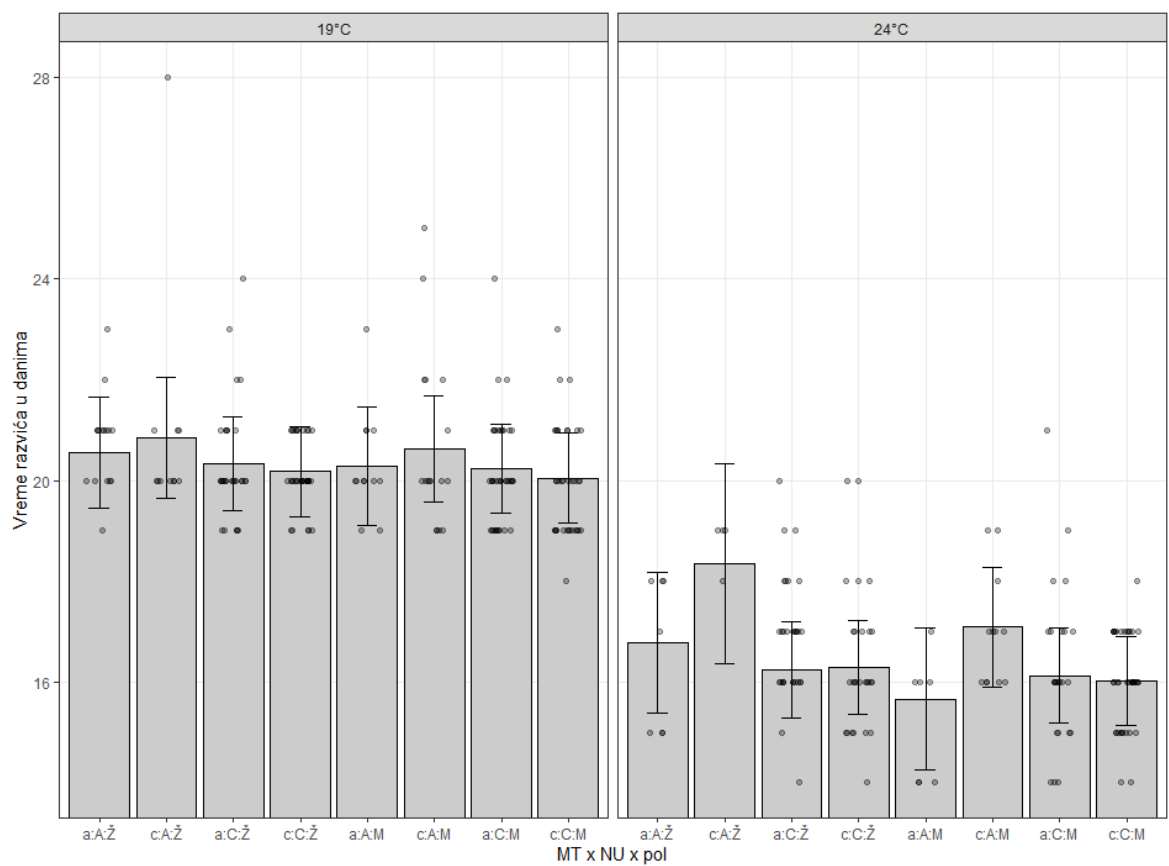
Slika P14. Treći kvartet



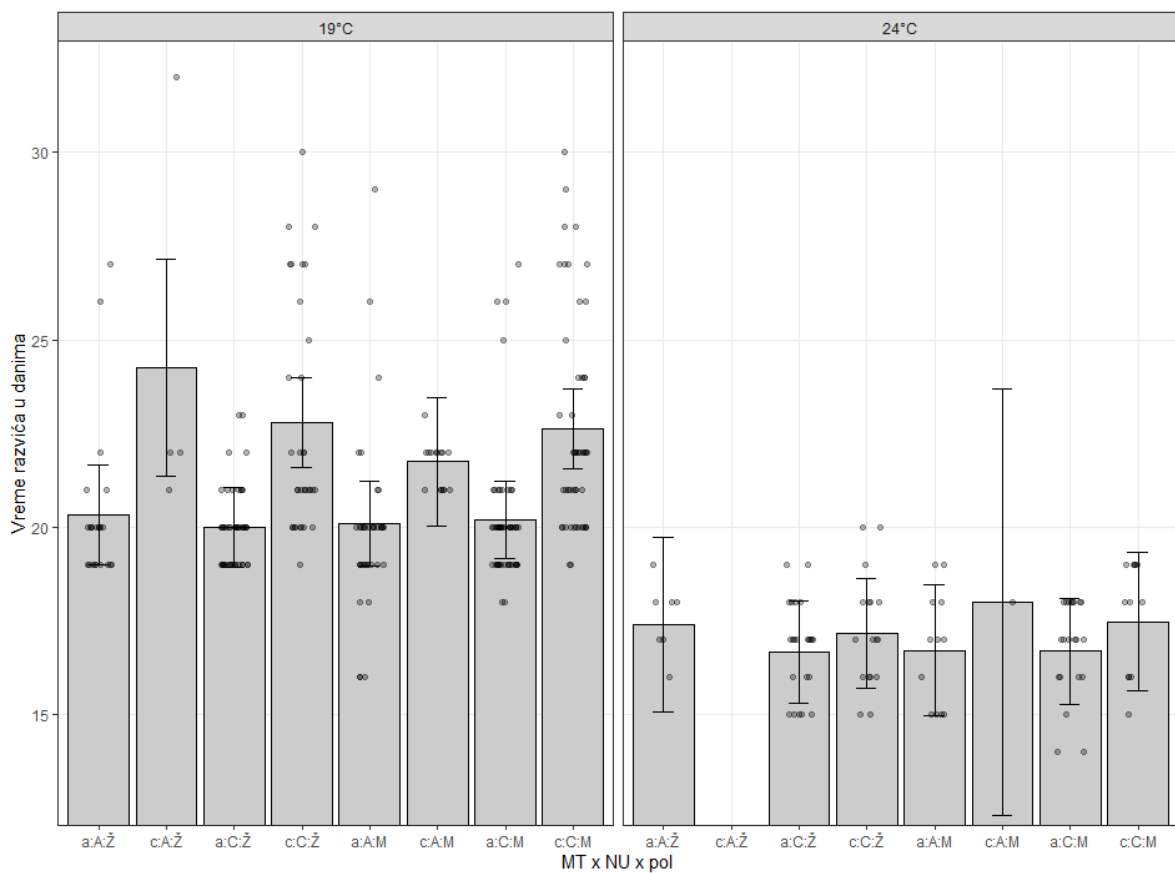
Slika P15. Četvrti kvartet



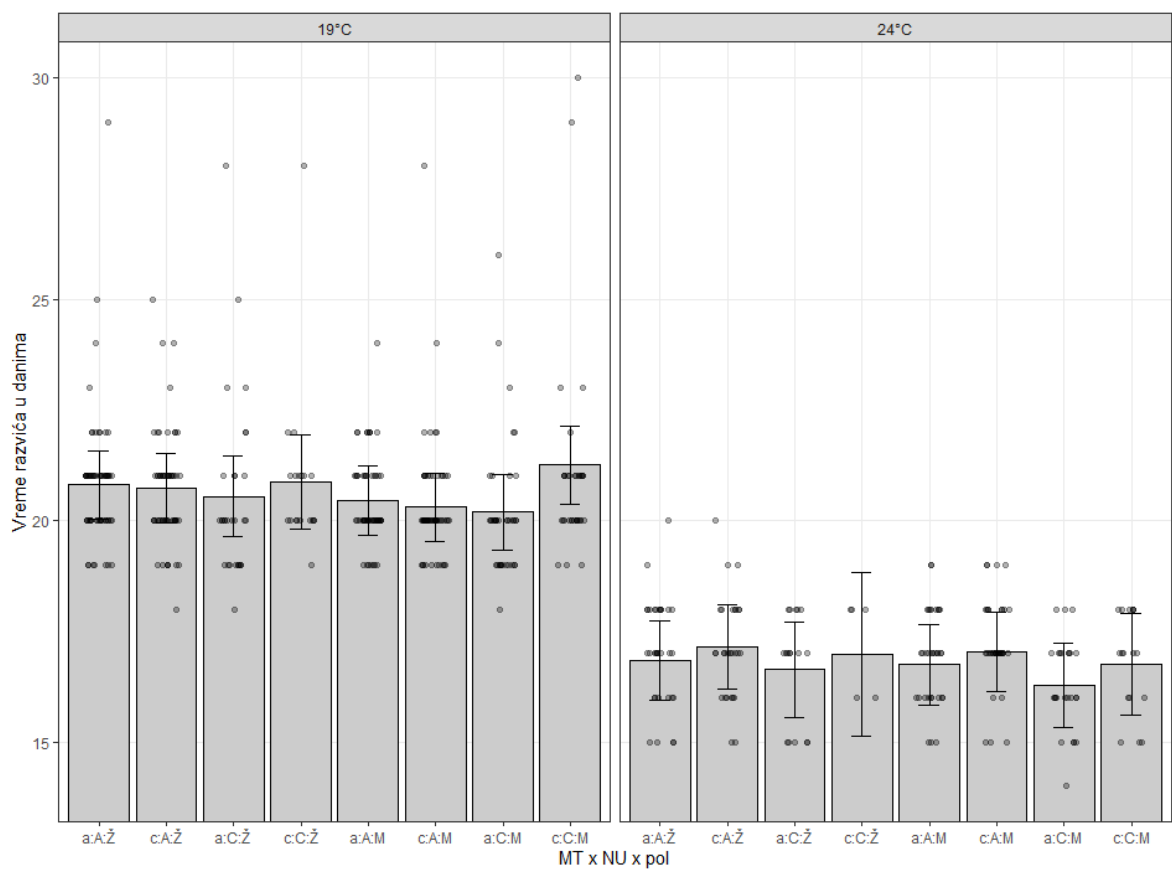
Slika P16. Peti kvartet



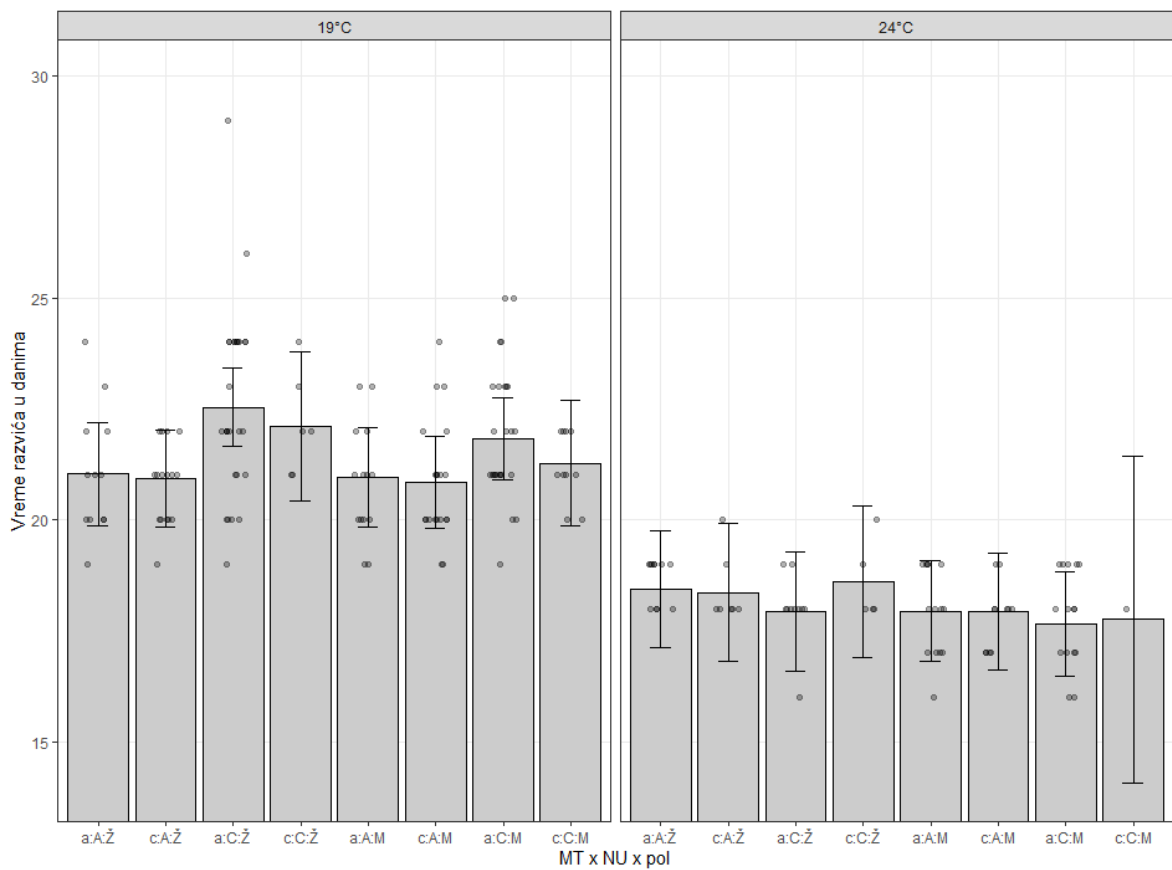
Slika P17. Šesti kvartet



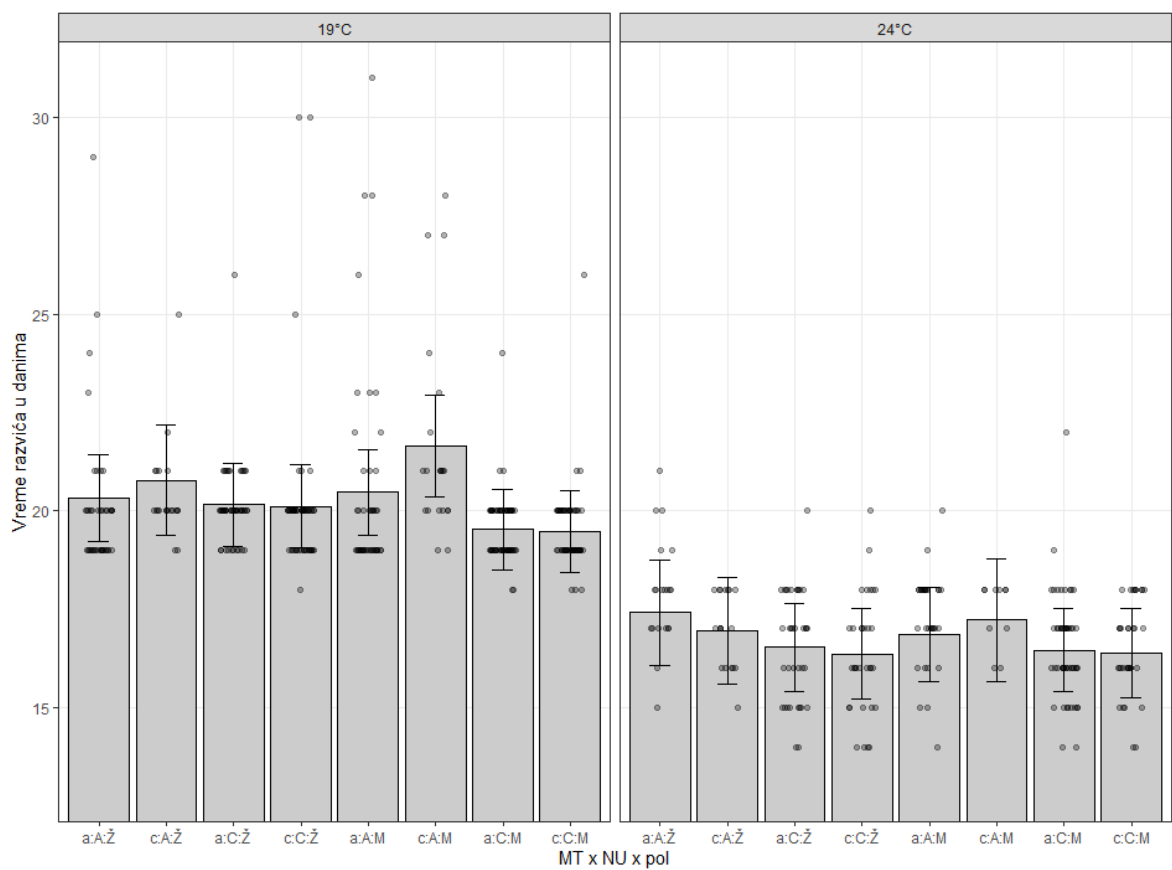
Slika P18. Sedmi kvartet



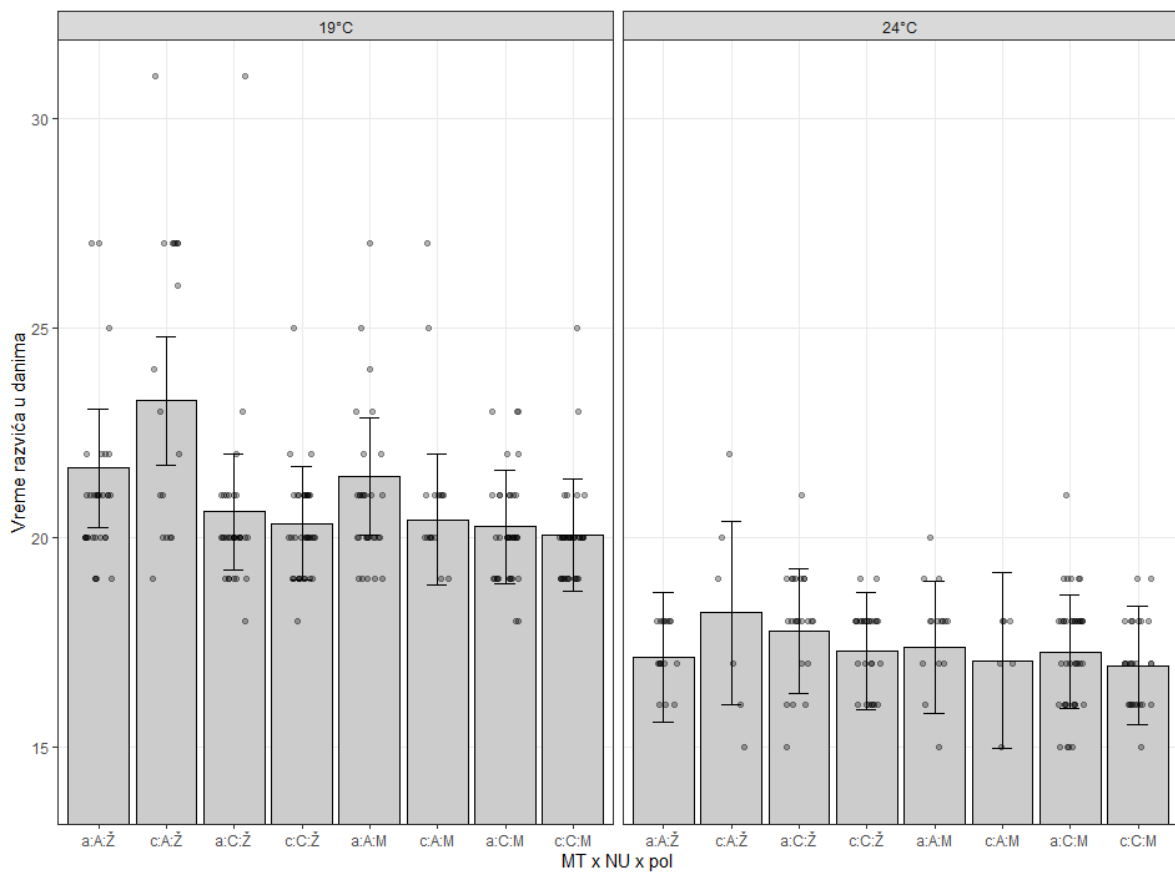
Slika P19. Osmi kvartet



Slika P20. Deveti kvartet

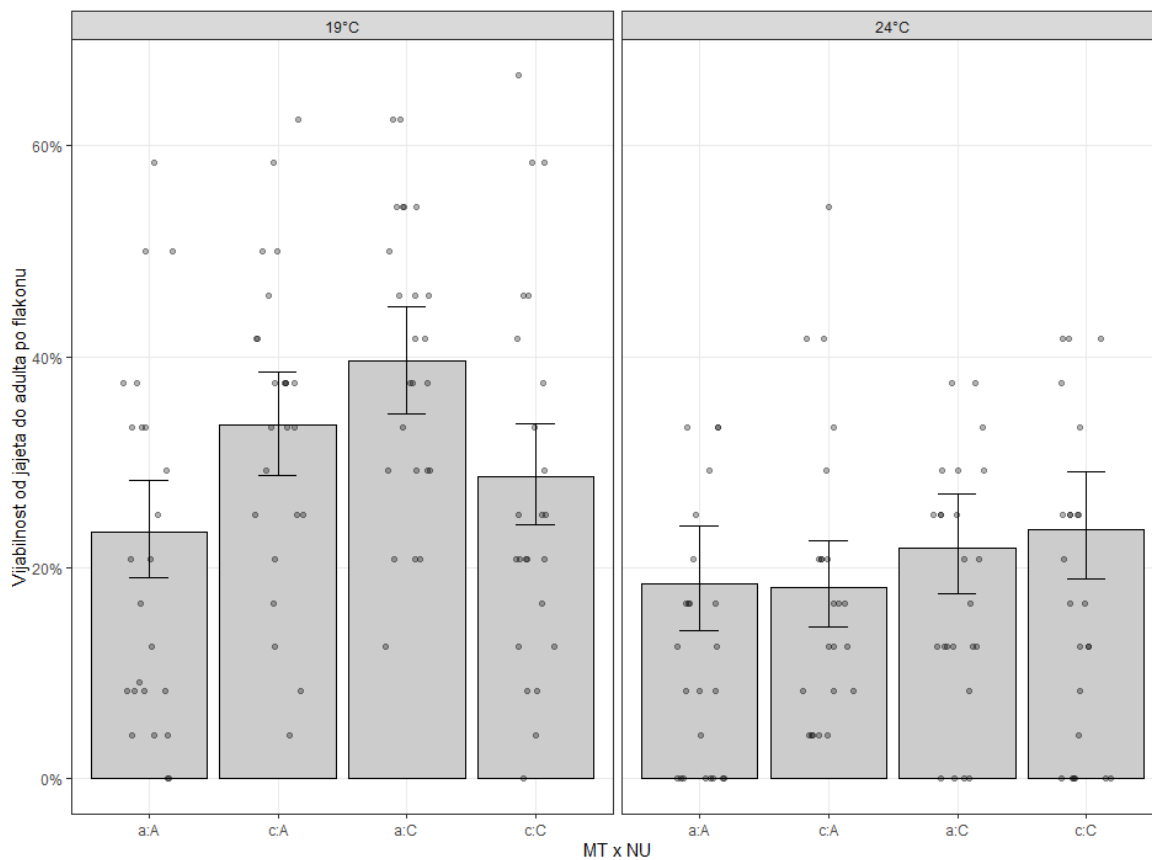


Slika P21. Deseti kvartet

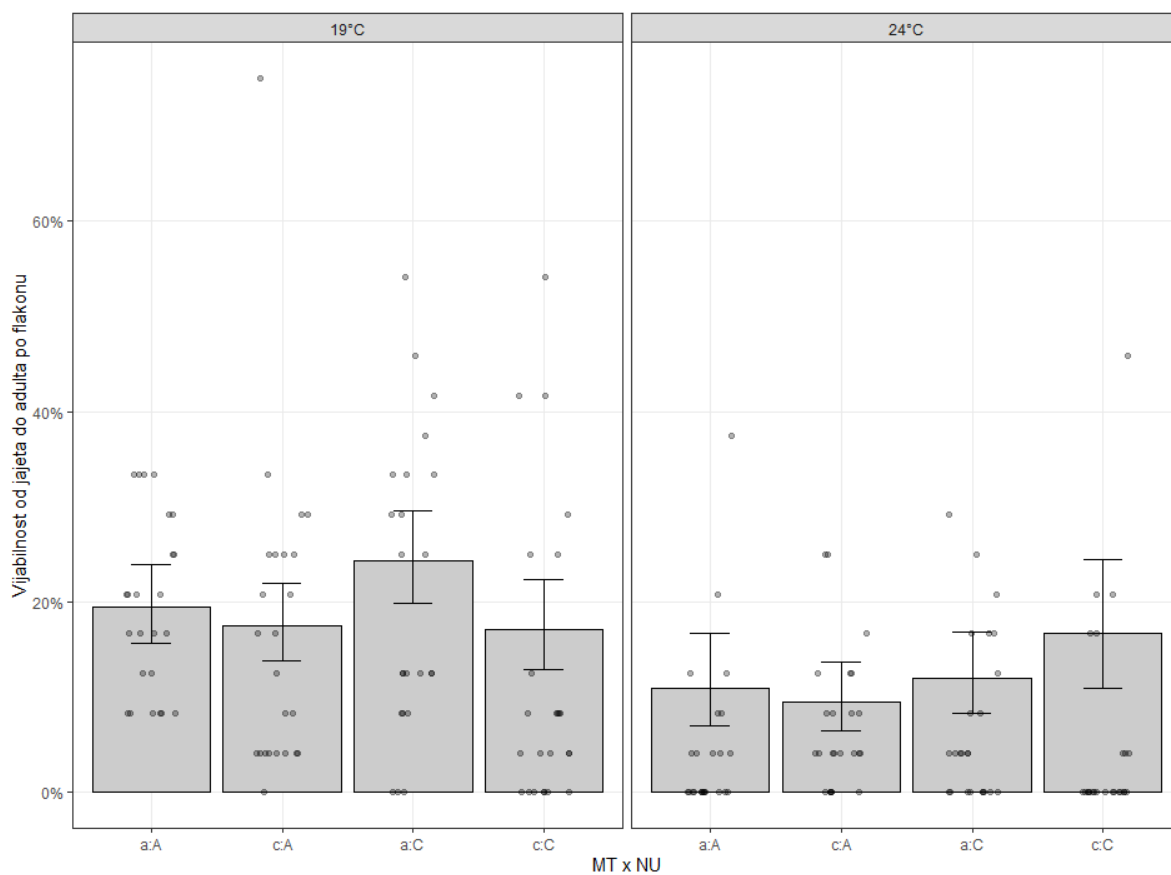


Slika P22. Jedanaesti kvartet

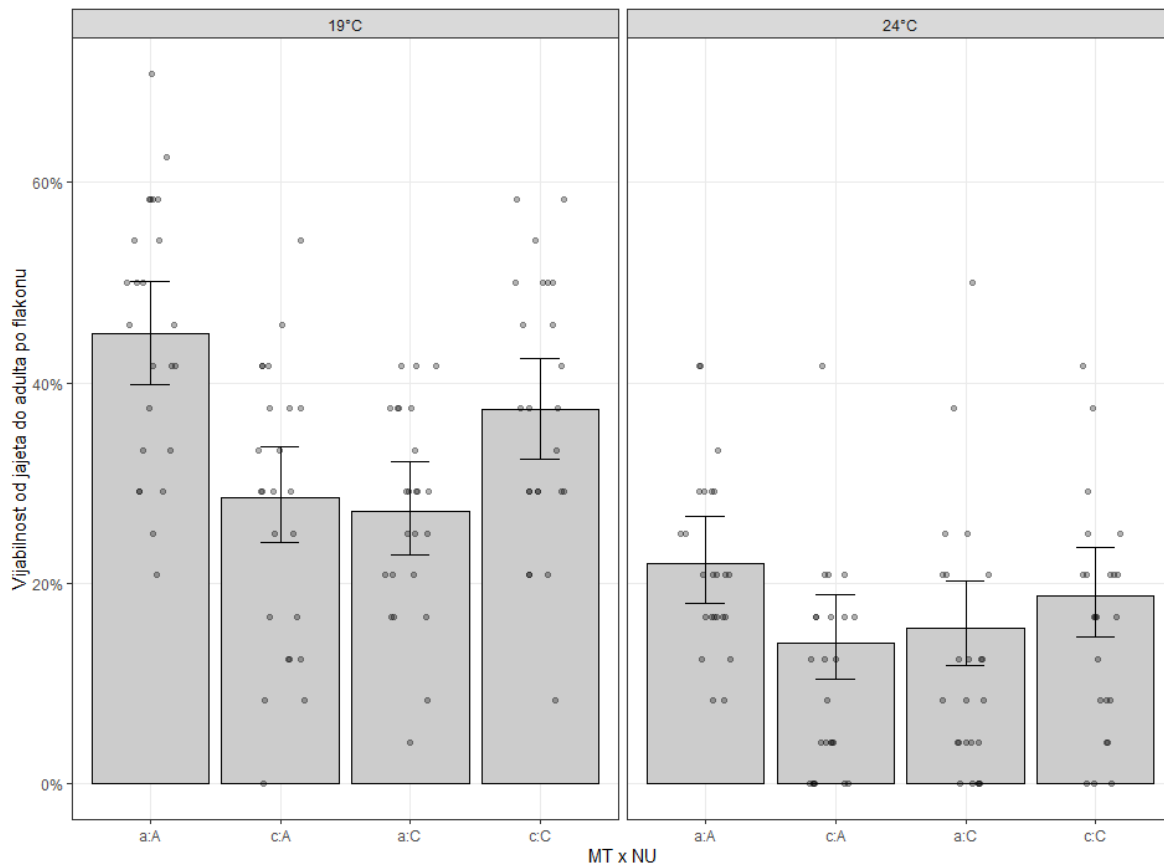
Slika P23-P33. Prosečne vrednosti preživljavanja od jajeta do adulta jedinki *D. subobscura* po flakonu, za sve kombinacije genotipova na dve eksperimentalne temperature kod svakog od jedanaest kvarteta. Malo slovo označava mtDNK haplotip (MT) gde je „a“ haplotip I, dok je „c“ haplotip II. Velika slova označavaju odgovarajuću jedarnu pozadinu (NU). Tačke označavaju vijabilitete pojedinačnih flakona. Predstavljani su intervali poverenja od 95%.



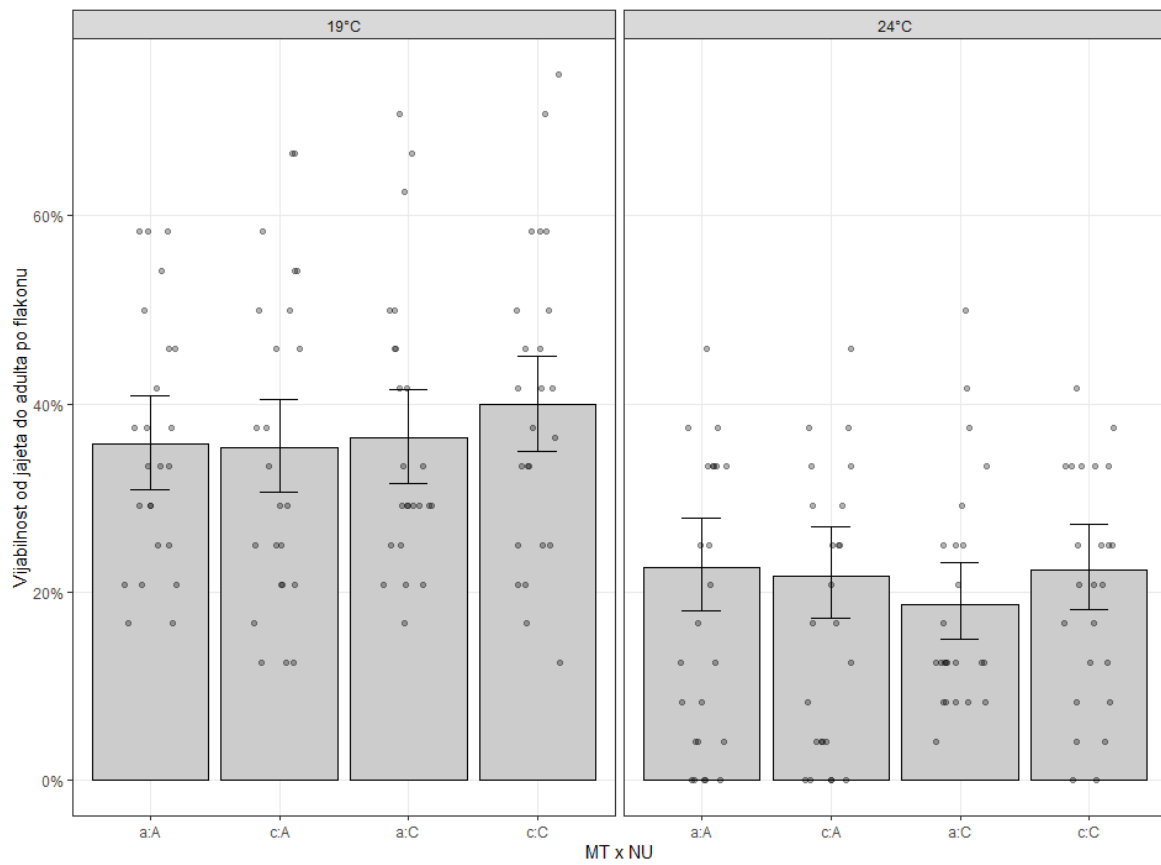
Slika P23. Prvi kvartet



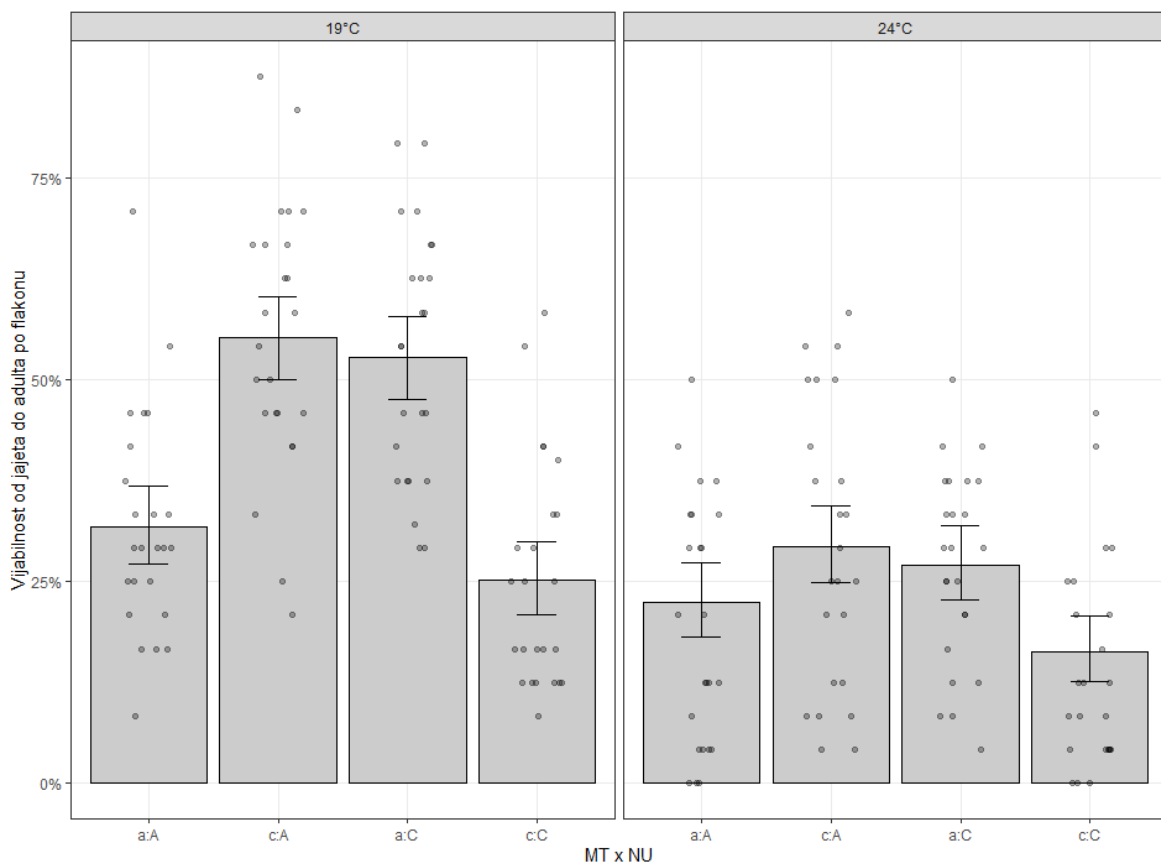
Slika P24. Drugi kvartet



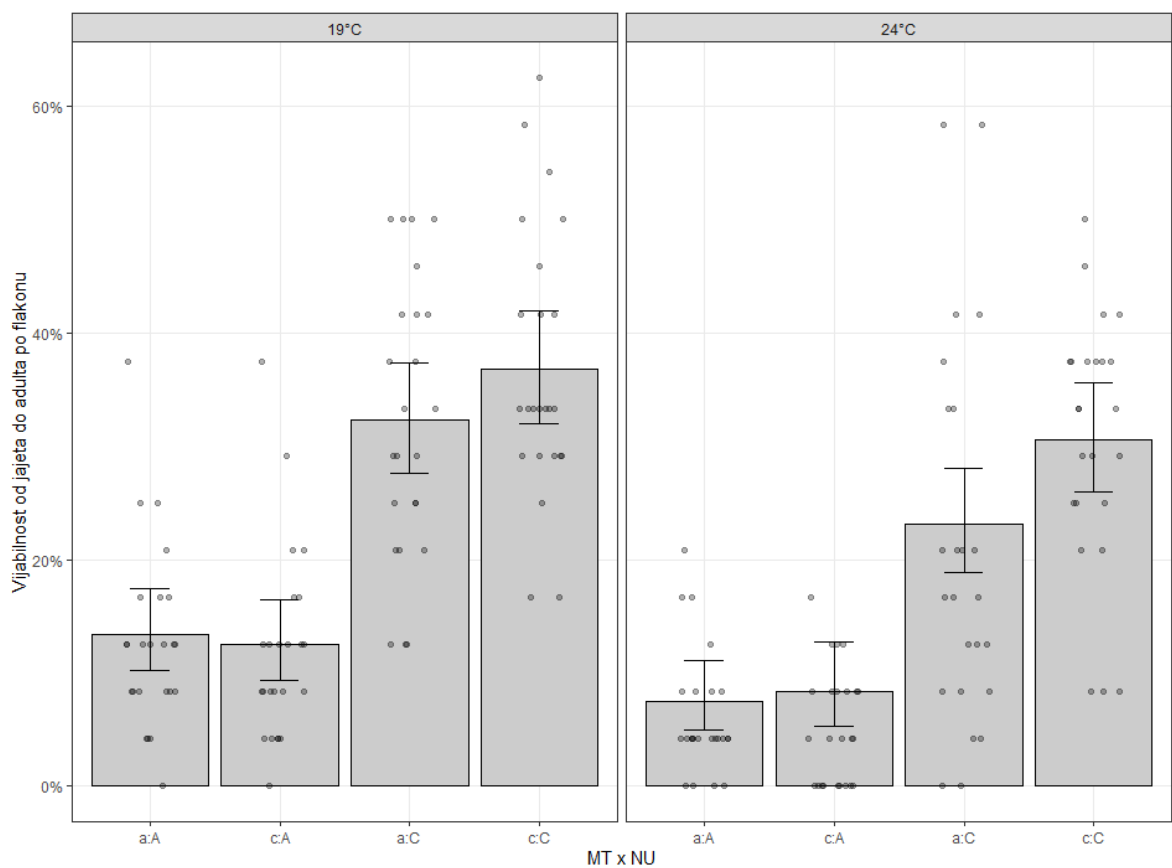
Slika P25. Treći kvartet



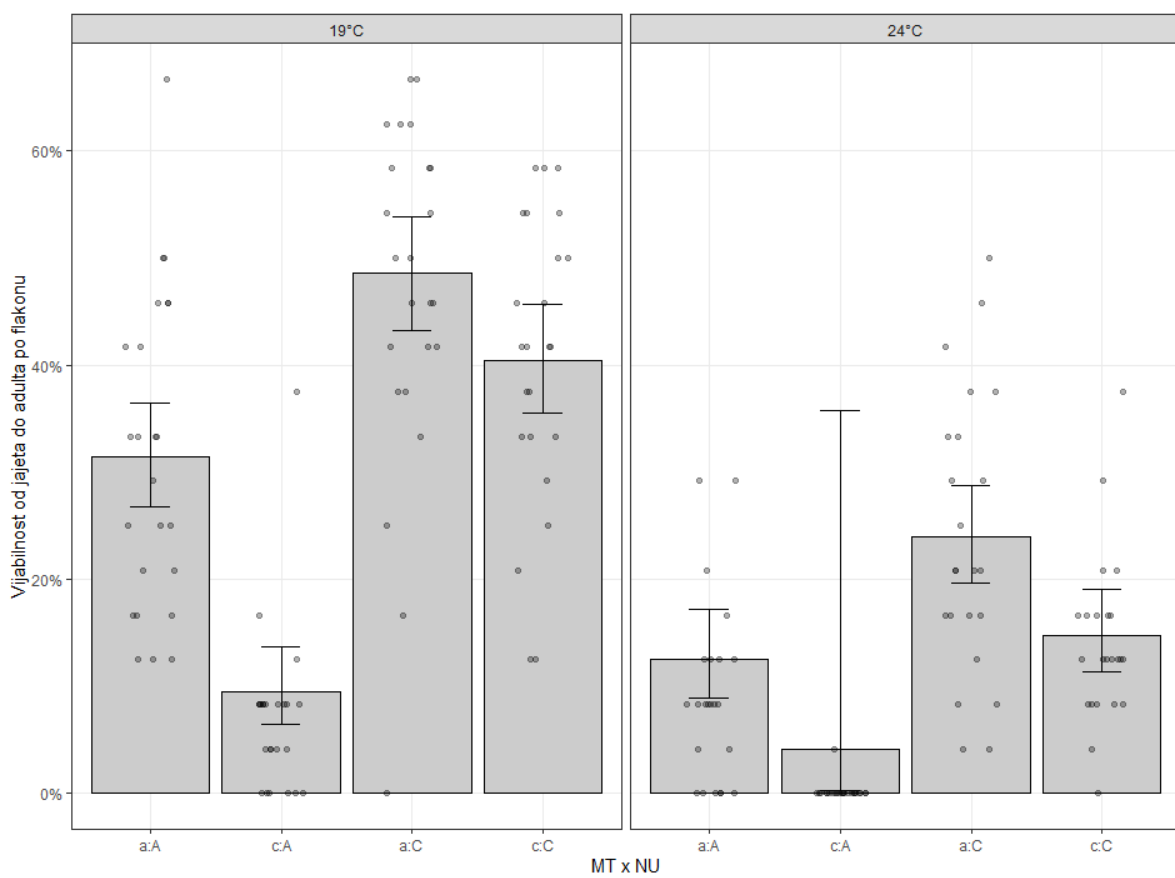
Slika P26. Četvrti kvartet



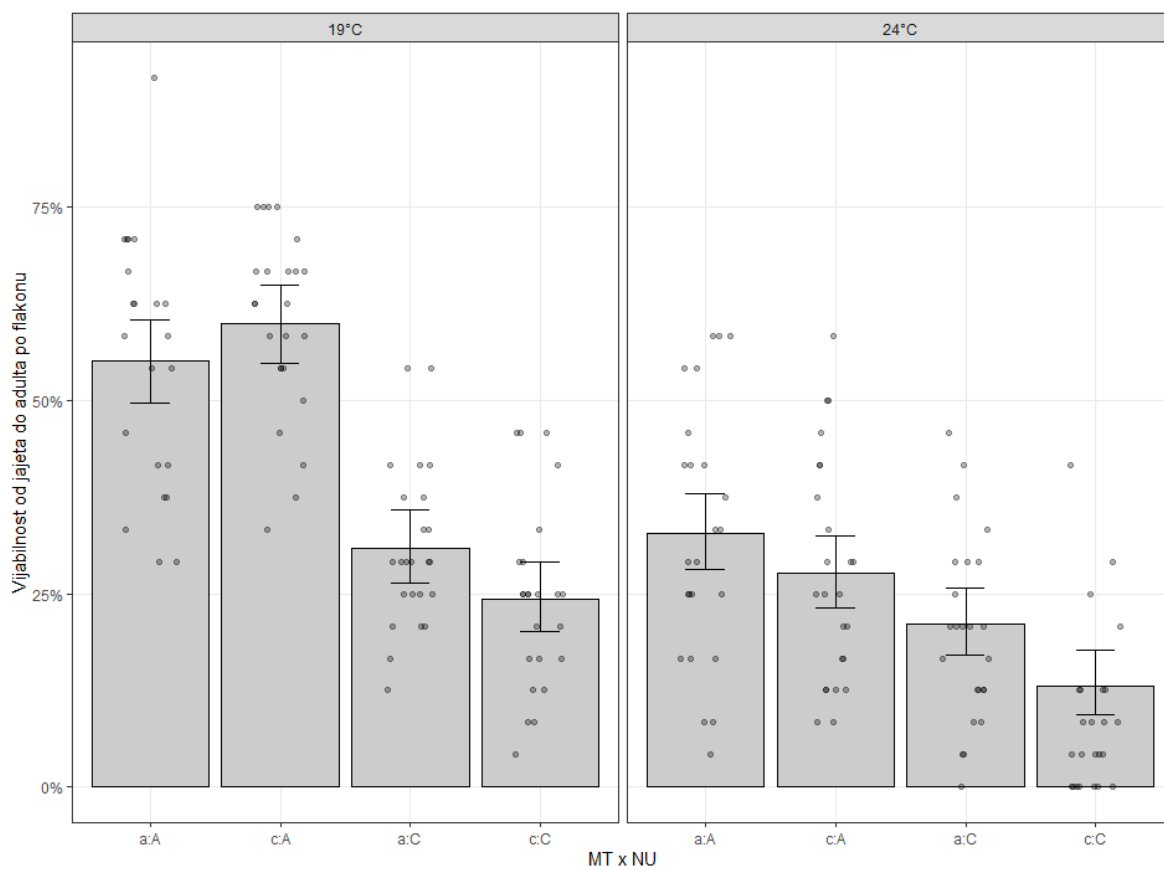
Slika P27. Peti kvartet



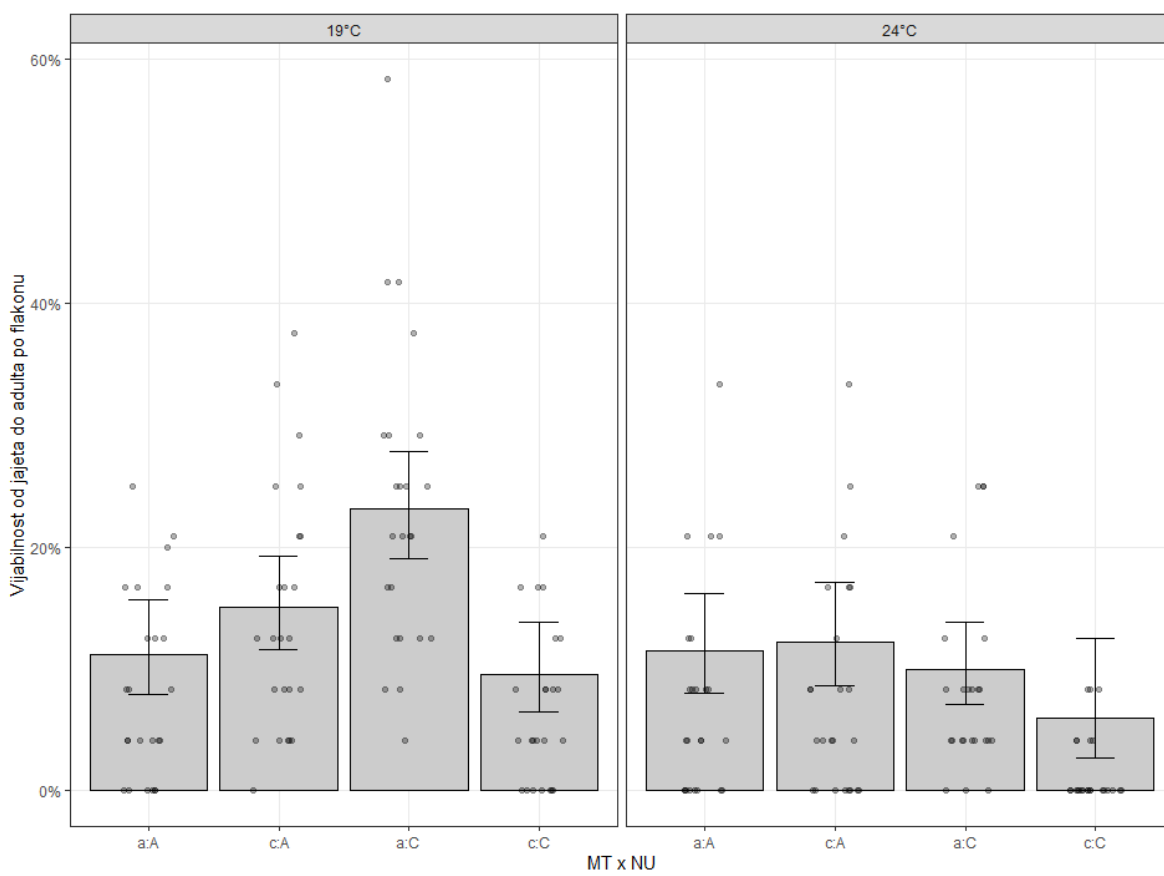
Slika P28. Šesti kvartet



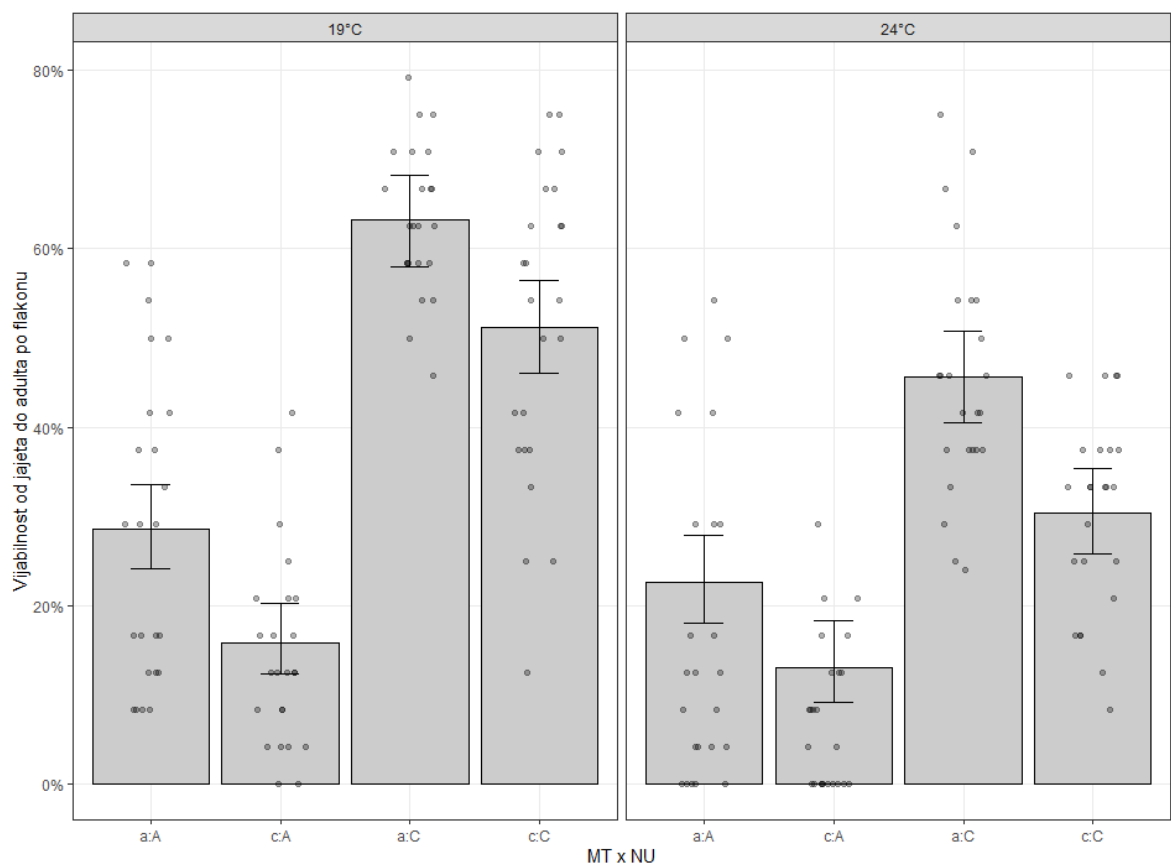
Slika P29. Sedmi kvartet



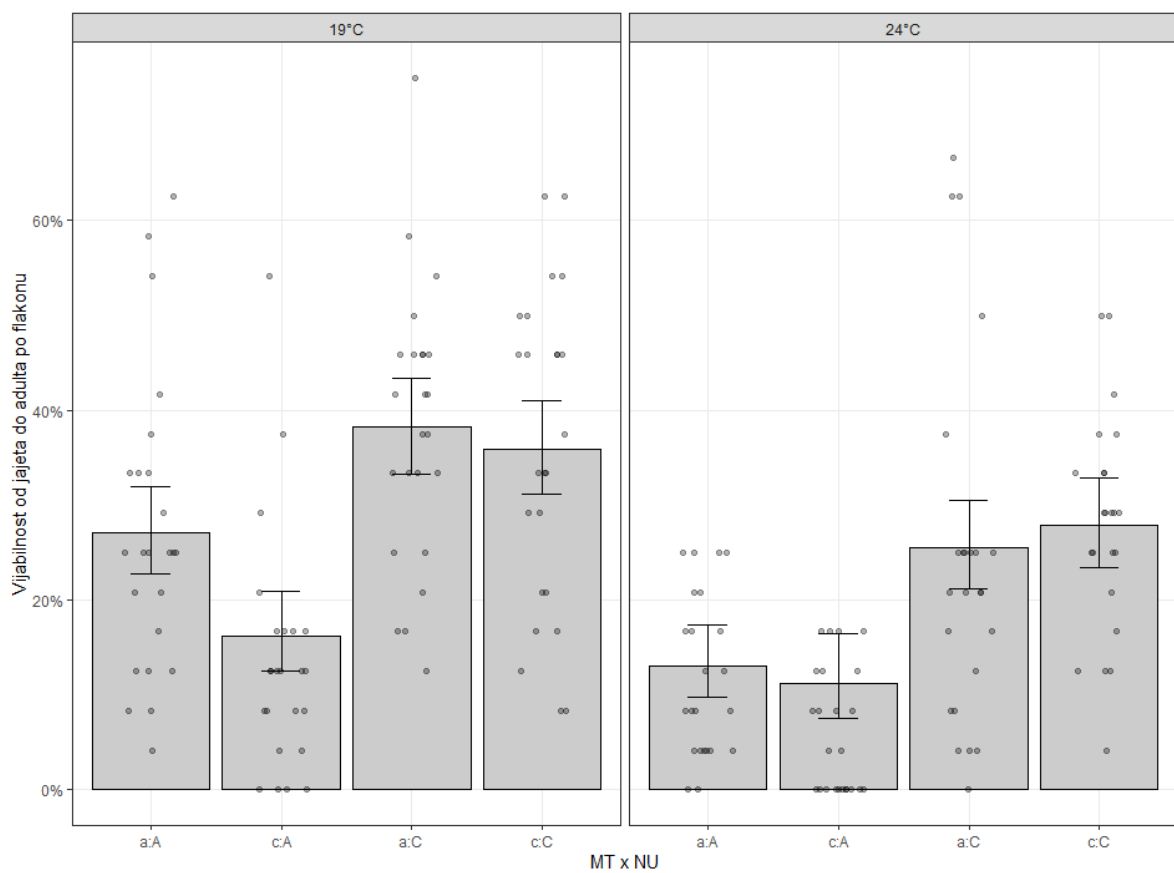
Slika P30. Osmi kvartet



Slika P31. Deveti kvartet

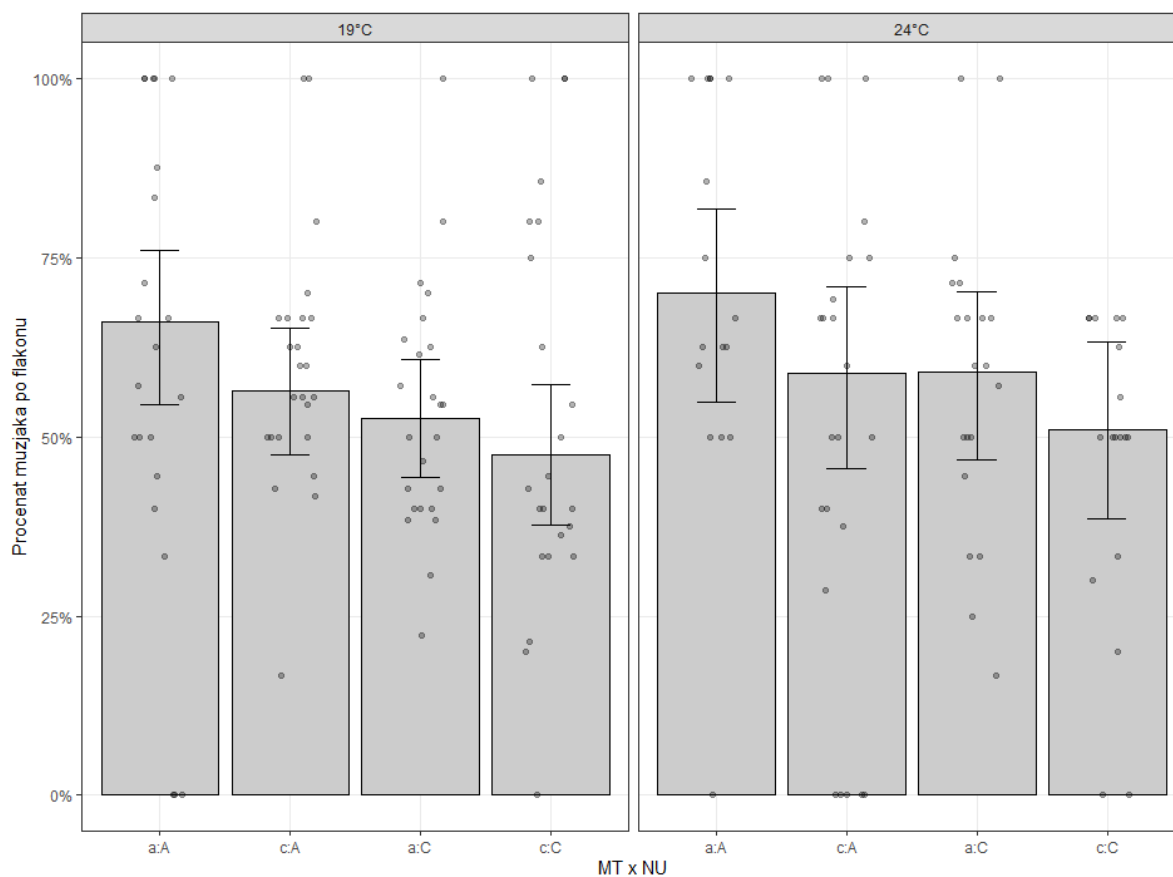


Slika P32. Deseti kvartet

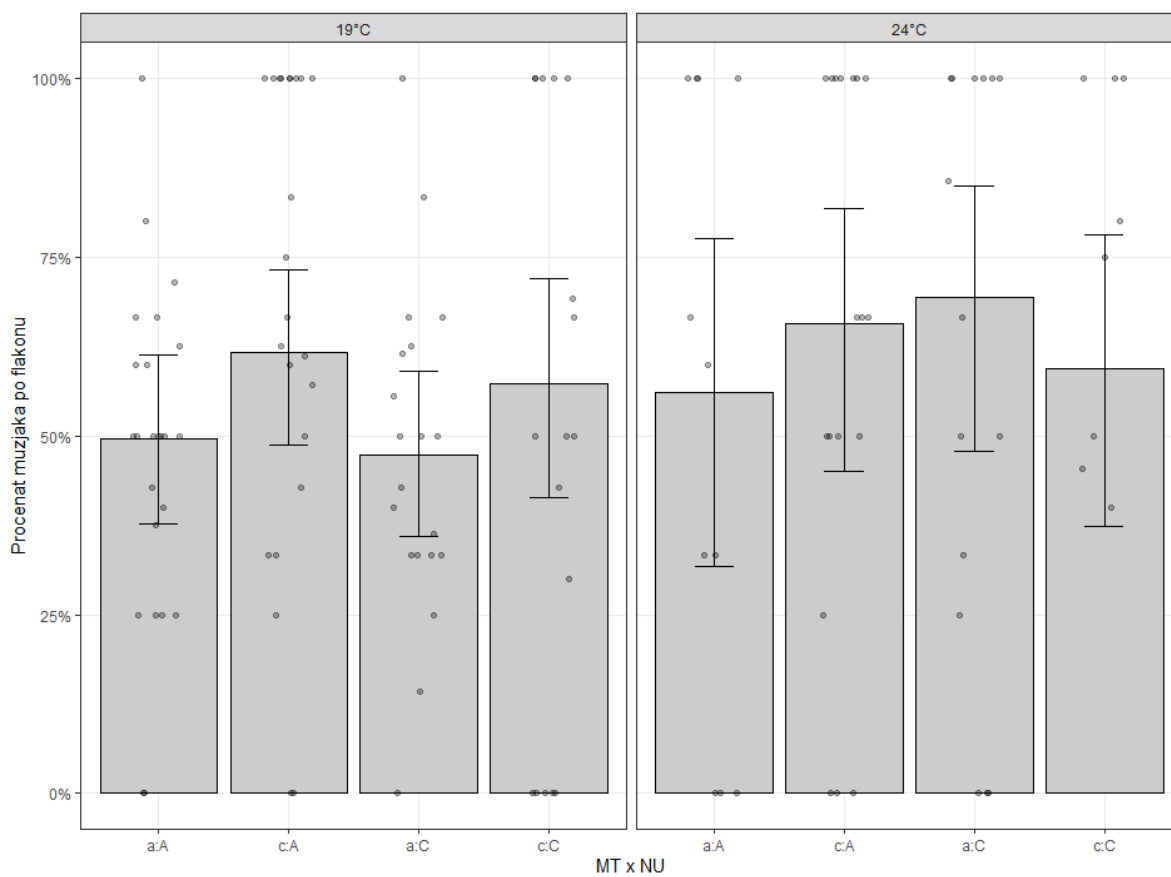


Slika P33. Jedanaesti kvartet

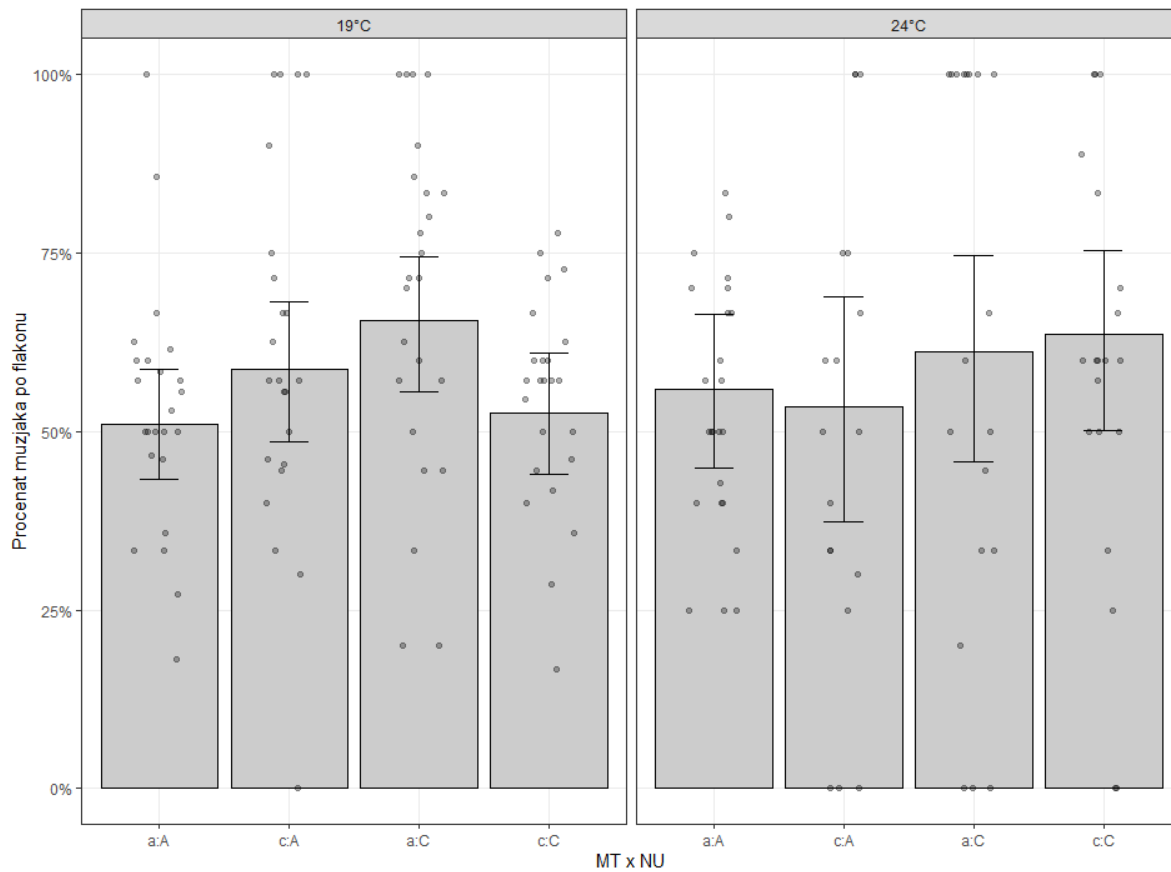
Slika P34-P44. Prosečni procenat mužjaka po flakonu *D. subobscura* za sve kombinacije genotipova na dve eksperimentalne temperature kod svakog od jedanaest kvarteta. Malo slovo označava mtDNK haplotip (MT) gde je „a“ haplotip I, dok je „c“ haplotip II. Velika slova označavaju odgovarajuću jedarnu pozadinu (NU). Tačke predstavljaju procenat mužjaka u pojedinačnim flakonima. Predstavljani su intervali poverenja od 95%.



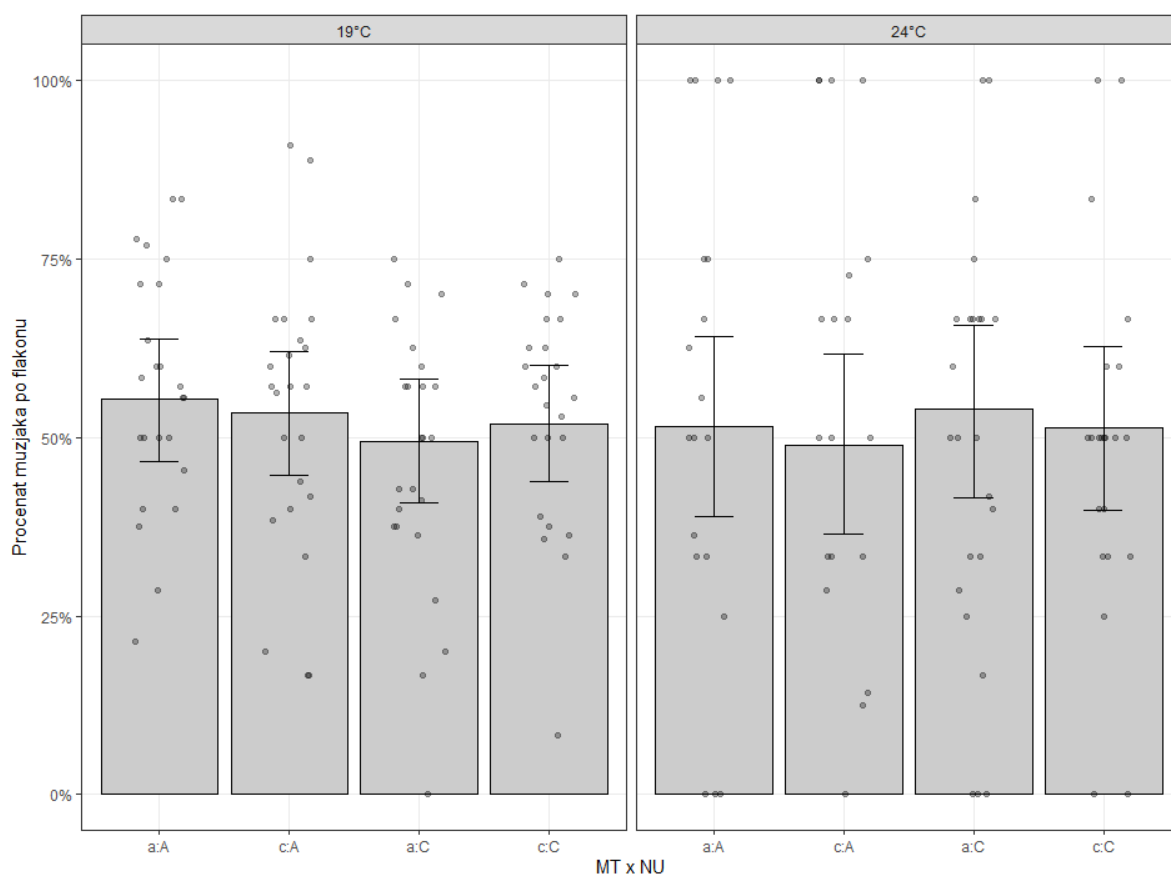
Slika P34. Prvi kvartet



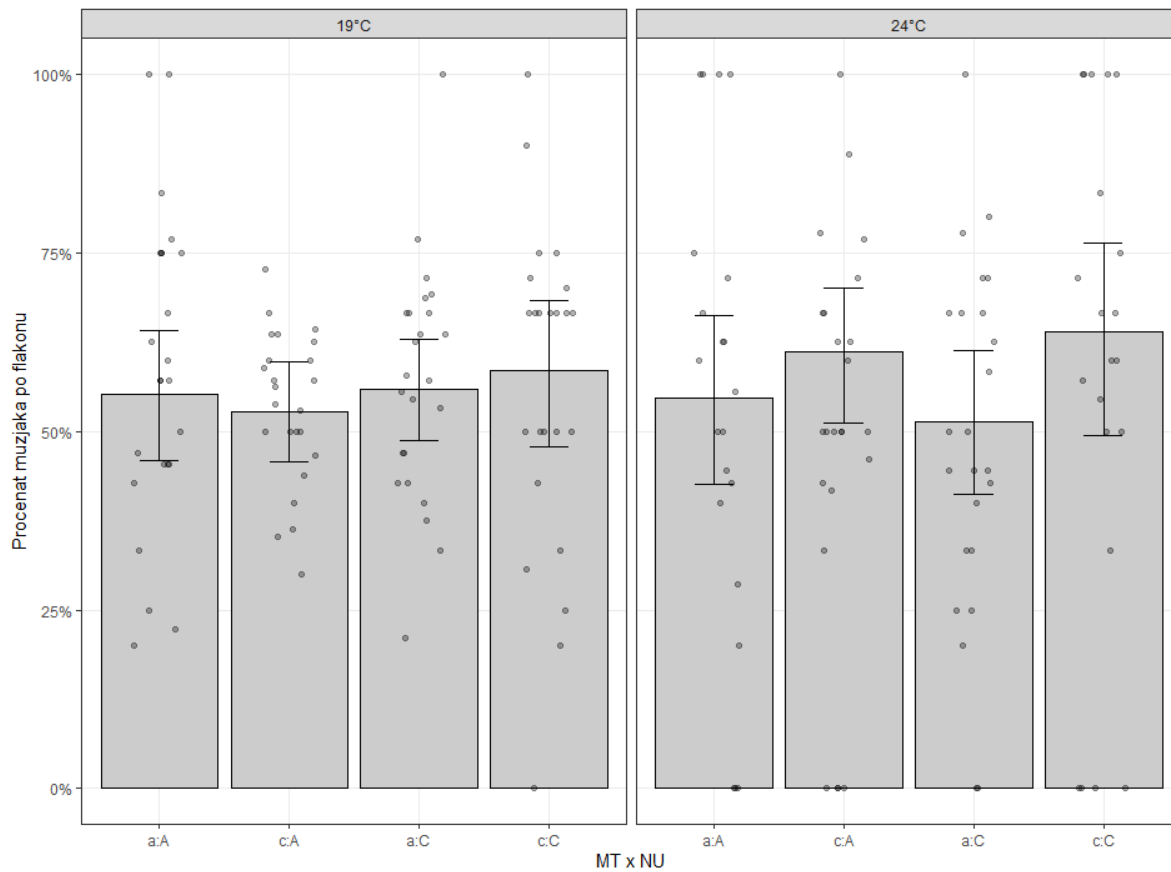
Slika P35. Drugi kvartet



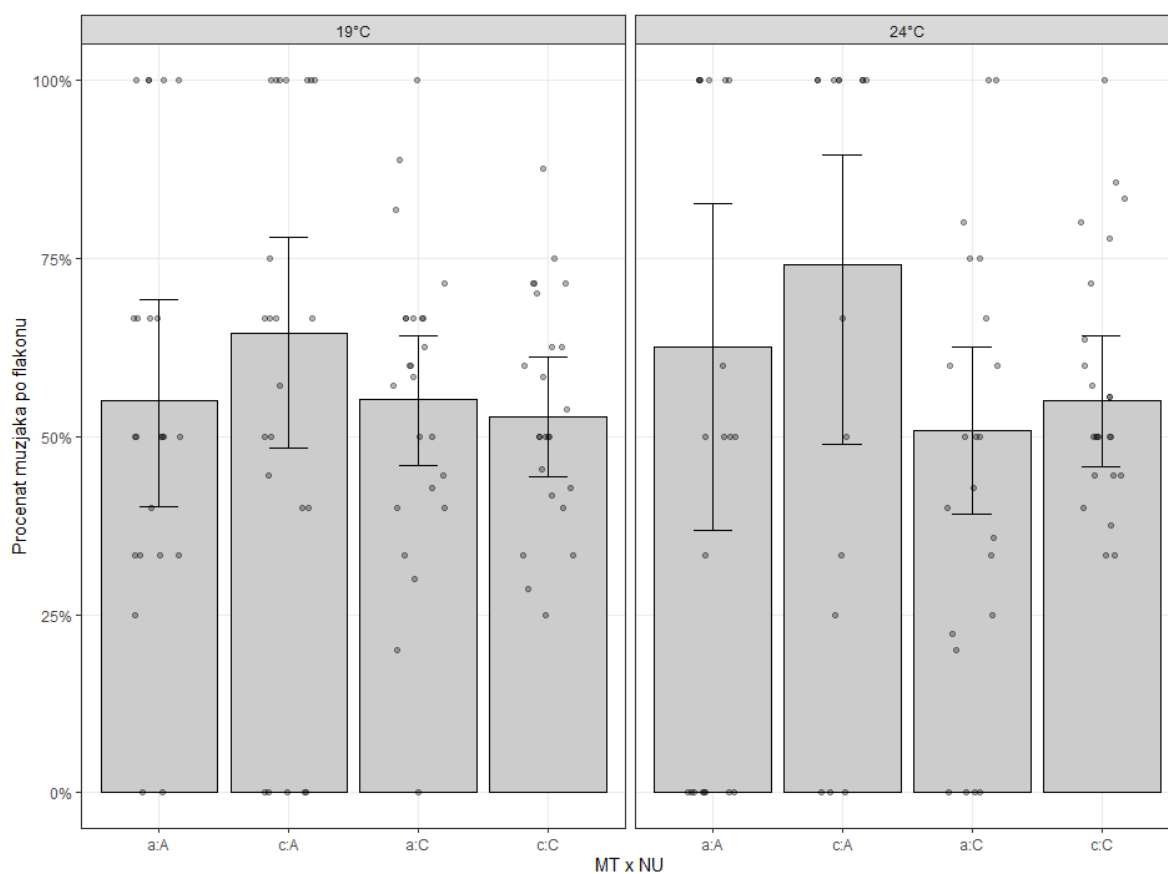
Slika P36. Treći kvartet



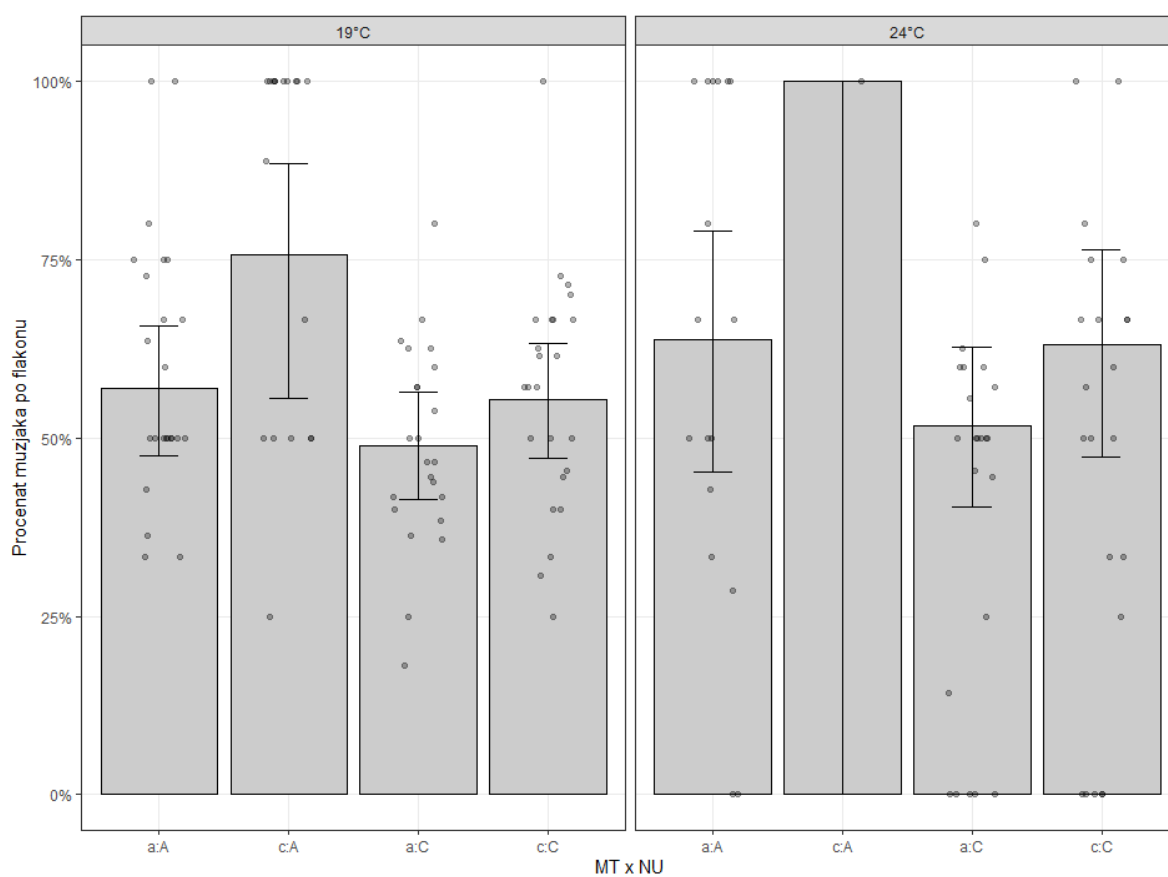
Slika P37. Četvrti kvartet



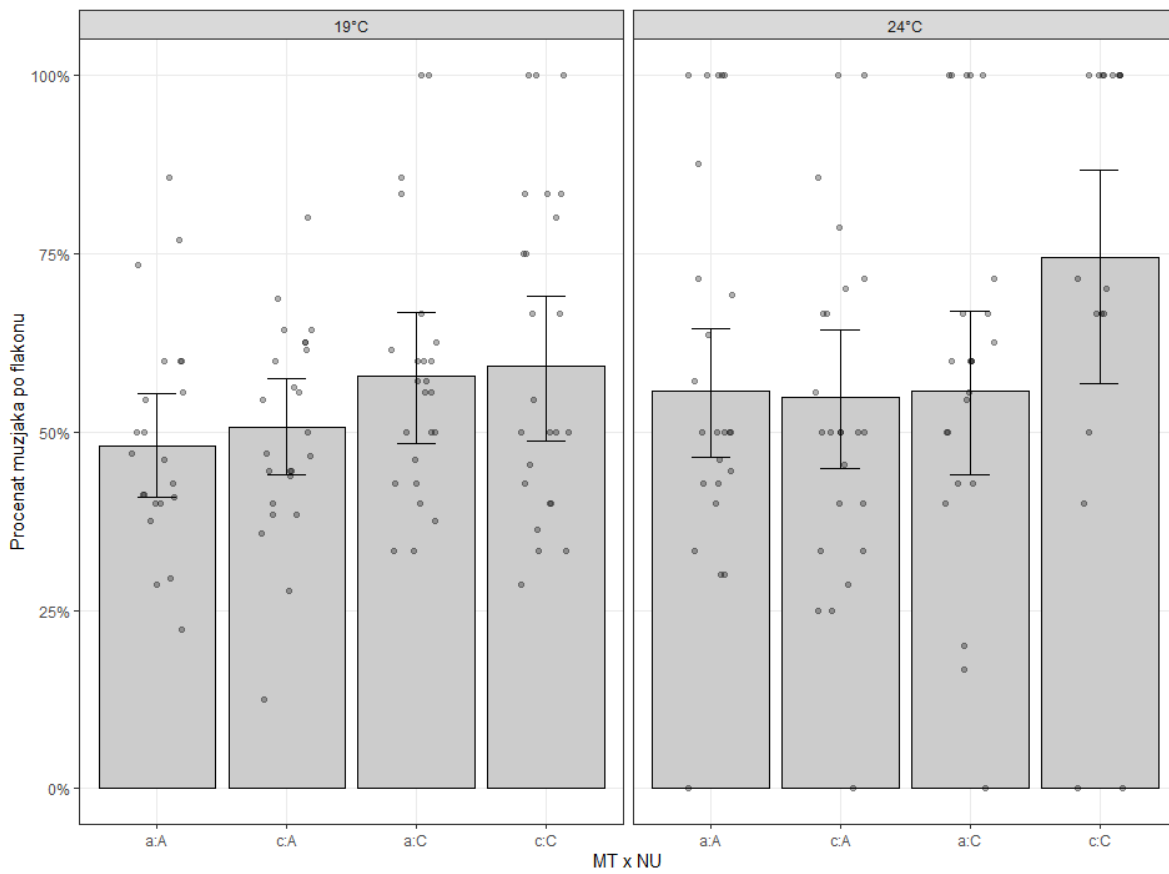
Slika P38. Peti kvartet



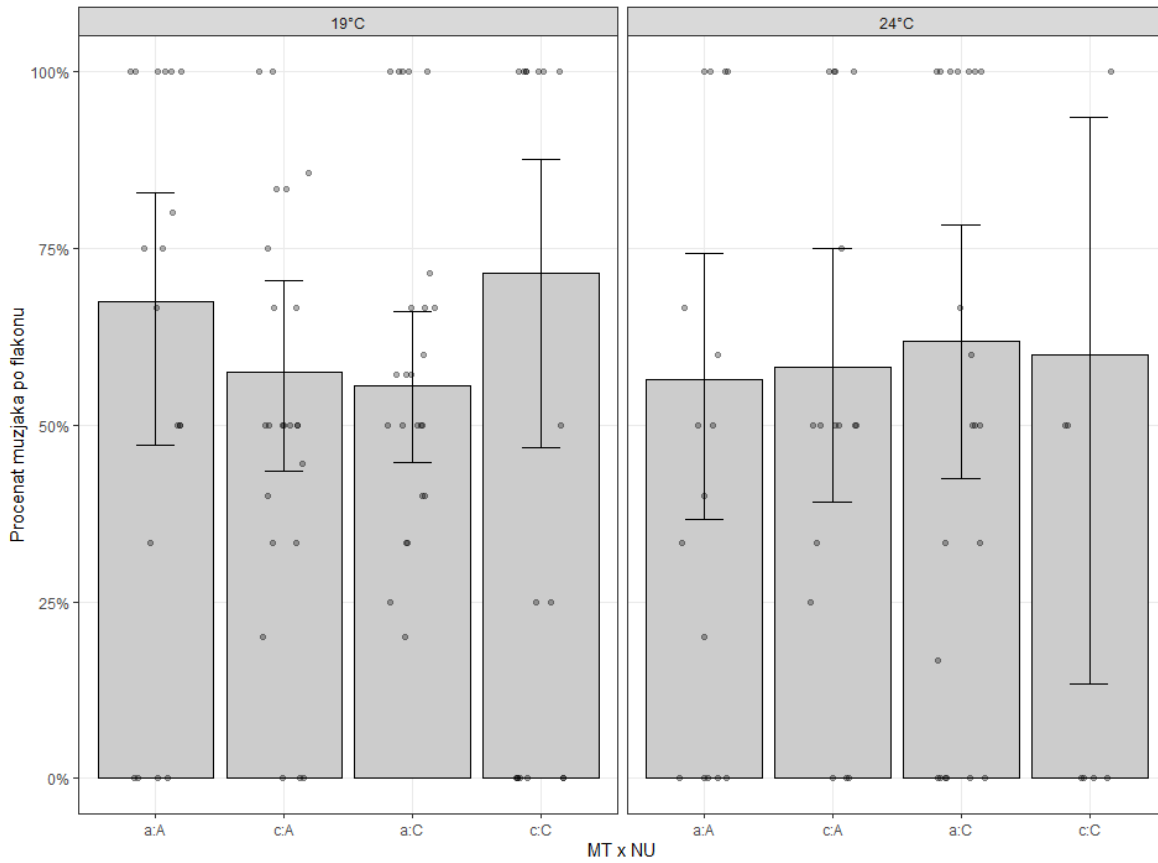
Slika P39. Šesti kvartet



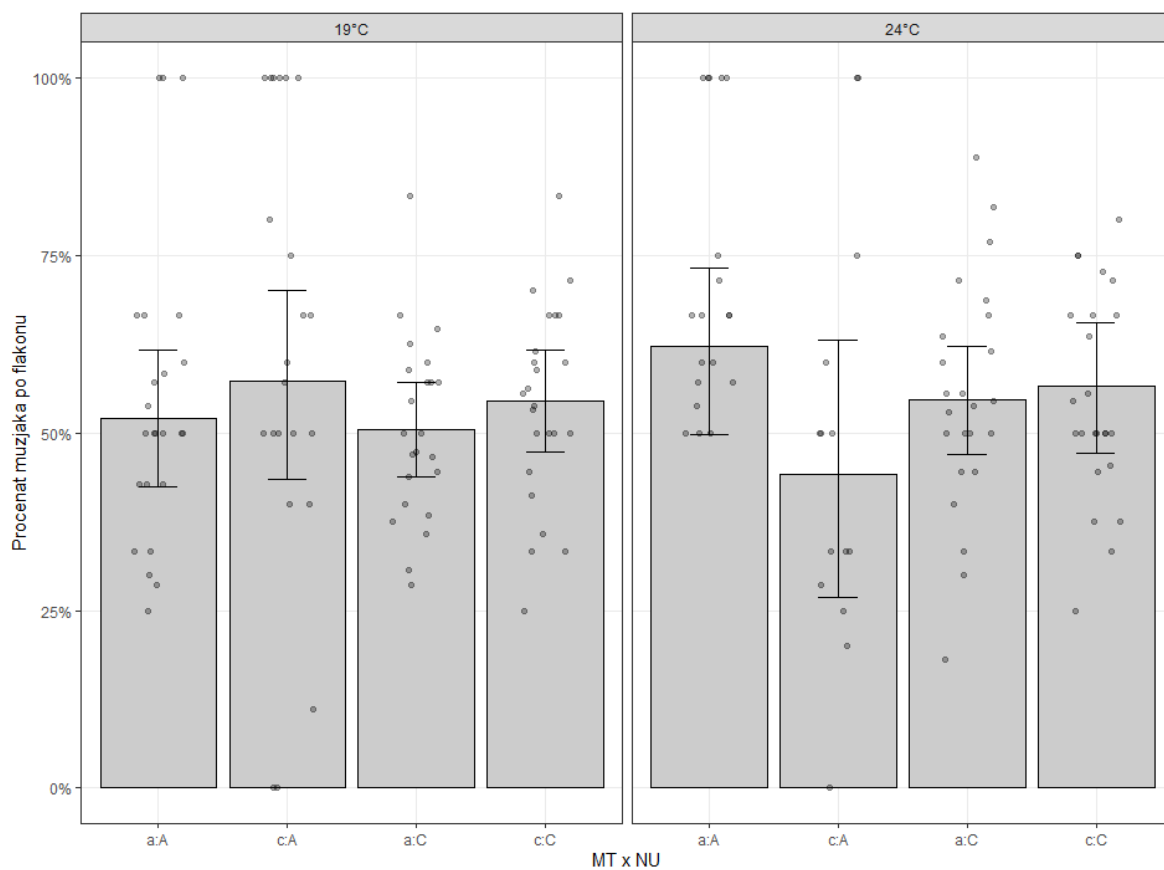
Slika P40. Sedmi kvartet



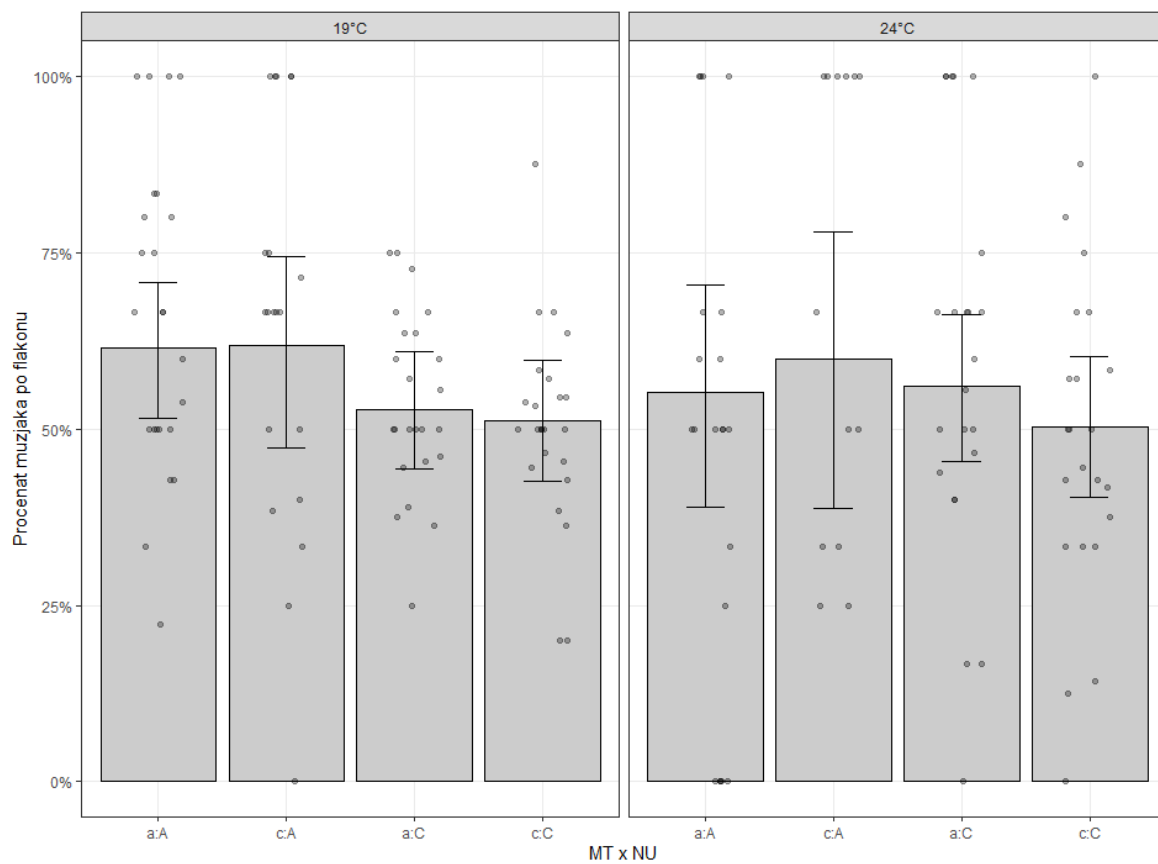
Slika P41. Osmi kvartet



Slika P42. Deveti kvartet



Slika P43. Deseti kvartet



Slika P44. Jedanaesti kvartet

Tabela P1. Uticaj mtDNK haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na vijabilnost od jajeta do lutke (EtP) kod model vrste *D. subobscura*. Za jedanaest kvartetnih modela predstavljeni su rezultati ANOVA-e. Df – Stepeni slobode; Dev – Devijacija; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

	Q1			Q2			Q3		
	Df	Dev	P	Df	Dev	P	Df	Dev	P
MT	1	1,749	0,186	1	2,954	0,0857	1	2,522	0,1123
NU	1	13,172	0,0003	1	7,311	0,0069	1	6,536	0,0106
T	1	42,377	<0,0001	1	47,189	<0,0001	1	88,268	<0,0001
MT:NU	1	33,819	<0,0001	1	0,008	0,9273	1	91,481	<0,0001
MT:T	1	0,116	0,7334	1	7,779	0,0053	1	1,413	0,2346
NU:T	1	0,621	0,4307	1	4,497	0,034	1	0,038	0,8454
MT:NU:T	1	11,009	0,0009	1	3,362	0,0667	1	0,907	0,3408
	Q4			Q5			Q6		
	Df	Dev	P	Df	Dev	P	Df	Dev	P
MT	1	0,577	0,4473	1	1,774	0,1829	1	10,81	0,001
NU	1	3,567	0,059	1	8,699	0,0032	1	344,35	<0,0001
T	1	130,497	<0,0001	1	85,323	<0,0001	1	37,64	<0,0001
MT:NU	1	0,598	0,4394	1	217,274	<0,0001	1	10,11	0,0015
MT:T	1	0,005	0,9431	1	0,097	0,7553	1	0,72	0,3975
NU:T	1	1,816	0,1777	1	0,05	0,8236	1	2,33	0,1272
MT:NU:T	1	1,358	0,2439	1	15,941	<0,0001	1	0,17	0,6842
	Q7			Q8			Q9		
	Df	Dev	P	Df	Dev	P	Df	Dev	P
MT	1	50,079	<0,0001	1	0,245	0,6206	1	6,6665	0,0098
NU	1	124,736	<0,0001	1	304,39	<0,0001	1	0	0,9979
T	1	184,359	<0,0001	1	244,501	<0,0001	1	19,8982	<0,0001
MT:NU	1	37,783	<0,0001	1	9,165	0,0025	1	27,6705	<0,0001
MT:T	1	1,402	0,2363	1	5,916	0,015	1	1,4648	0,2262
NU:T	1	0,137	0,7114	1	5,468	0,0194	1	13,8665	0,0002
MT:NU:T	1	0,123	0,7262	1	0,001	0,9801	1	3,4936	0,0616
	Q10			Q11					
	Df	Dev	P	Df	Dev	P			
MT	1	170,29	<0,0001	1	0	0,9848			
NU	1	851,56	<0,0001	1	230,473	<0,0001			
T	1	48,19	<0,0001	1	64,376	<0,0001			
MT:NU	1	19,08	<0,0001	1	19,664	<0,0001			
MT:T	1	1,46	0,2267	1	4,617	0,0316			
NU:T	1	7,43	0,0064	1	0,75	0,3864			
MT:NU:T	1	1,23	0,268	1	0,656	0,4181			

Tabela P2. Uticaj mtDNK haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na vijabilnost od lutke do adulta (PtA) kod model vrste *D. subobscura*. Za jedanaest kvartetnih modela predstavljeni su rezultati ANOVA-e. Df – Stepeni slobode; Dev – Devijacija; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

	Q1			Q2			Q3		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	7,2483	0,0071	1	0,0856	0,7698	1	1,36	0,2435
NU	1	0,002	0,9645	1	5,4238	0,0199	1	0,114	0,7361
T	1	31,2606	<0,0001	1	14,3305	0,0002	1	103,511	<0,0001
MT:NU	1	16,3204	<0,0001	1	1,7306	0,1883	1	2,413	0,1203
MT:T	1	4,1713	0,0411	1	1,7528	0,1855	1	3,495	0,0616
NU:T	1	0,5061	0,4768	1	4,8219	0,0281	1	5,31	0,0212
MT:NU:T	1	2,0037	0,1569	1	0,1677	0,6821	1	0,681	0,4093
	Q4			Q5			Q6		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	0,0441	0,8337	1	0,09	0,7648	1	1,0504	0,3054
NU	1	28,1595	<0,0001	1	1,441	0,23	1	4,0083	0,0453
T	1	21,5971	<0,0001	1	87,221	<0,0001	1	0,103	0,7483
MT:NU	1	1,8769	0,1707	1	6,062	0,0138	1	3,369	0,0664
MT:T	1	0,0663	0,7967	1	0,001	0,9733	1	1,2049	0,2723
NU:T	1	2,9178	0,0876	1	1,785	0,1815	1	0,9252	0,3361
MT:NU:T	1	6,9782	0,0083	1	0,108	0,7423	1	0,0047	0,9456
	Q7			Q8			Q9		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	8,4726	0,0036	1	9,2377	0,0024	1	0,0073	0,9321
NU	1	3,9279	0,0475	1	0,2936	0,5879	1	5,0579	0,0245
T	1	22,5257	<0,0001	1	1,4522	0,2282	1	0,746	0,3877
MT:NU	1	0,1445	0,7039	1	4,4896	0,0341	1	0,3284	0,5666
MT:T	1	1,8538	0,1733	1	7,1647	0,0074	1	0,0834	0,7727
NU:T	1	4,0989	0,0429	1	17,9116	<0,0001	1	0,0088	0,9253
MT:NU:T	1	1,6178	0,2034	1	0,4415	0,5064	1	0,2692	0,6039
	Q10			Q11					
	Df	Dev	p	Df	Dev	p			
MT	1	18,069	<0,0001	1	13,2747	0,0003			
NU	1	71,769	<0,0001	1	13,7537	0,0002			
T	1	38,974	<0,0001	1	3,1862	0,0743			
MT:NU	1	17,56	<0,0001	1	1,1262	0,2886			
MT:T	1	0,231	0,6307	1	0,9007	0,3426			
NU:T	1	0,046	0,8294	1	0,5686	0,4508			
MT:NU:T	1	0,153	0,6958	1	0,0043	0,9479			

Tabela P3. Uticaj mtDNK haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na vijabilnost od jajeta do lutke (EtP) za ukupni model kod *D. subobscura*. Chisq – Hi kvadrat; df – Stepeni slobode; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

	Ukupni model		
	Chisq	Df	p
MT	4,8338	1	0,0279
NU	145,3216	1	<0,0001
T	188,5685	1	<0,0001
MT:NU	13,9494	1	0,0002
MT:T	2,2318	1	0,1352
NU:T	0,7552	1	0,3848
MT:NU:T	0,0284	1	0,8663

Tabela P4. Uticaj mtDNK haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na vijabilnost od lutke do adulta (PtA) za ukupni model kod *D. subobscura*. Chisq – Hi kvadrat; df – Stepeni slobode; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom.

	Ukupni model		
	Chisq	df	p
MT	1,0927	1	0,2959
NU	2,4927	1	0,1144
T	32,2345	1	<0,0001
MT:NU	0,9422	1	0,3317
MT:T	4,9309	1	0,0264
NU:T	1,2993	1	0,2544
MT:NU:T	6,4334	1	0,0112

Tabela P5. Uticaj mtDNK haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na vijabilnost od jajeta do lutke (EtP) kod model vrste *D. obscura*. Za svaki eksperimentalni blok (EB) predstavljeni su rezultati ANOVA-e modela tri parovna poređenja i model koji analizira ceo EB. df – Stepeni slobode; Dev – Devijacija; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b).

EB I	AB			AC			BC			ABC		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	9,619	0,0019	1	15,753	<0,0001	1	0,225	0,6351	2	28,32	<0,0001
NU	1	31,61	<0,0001	1	204,272	<0,0001	1	194,345	<0,0001	2	396,94	<0,0001
T	1	4,84	0,0278	1	24,753	<0,0001	1	106,103	<0,0001	1	76,44	<0,0001
MT:NU	1	39,487	<0,0001	1	94,602	<0,0001	1	3,132	0,0768	4	141,5	<0,0001
MT:T	1	36,507	<0,0001	1	0,003	0,9565	1	12,058	0,0005	2	22,34	<0,0001
NU:T	1	1,599	0,206	1	74,912	<0,0001	1	3,675	0,0552	2	56,73	<0,0001
MT:NU:T	1	0,547	0,4597	1	0,114	0,7358	1	0,201	0,6537	4	47,46	<0,0001
EB II	DE			DF			EF			DEF		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	11,36	0,0008	1	17,478	<0,0001	1	1,345	0,2462	2	15,209	0,0005
NU	1	85,848	<0,0001	1	43,744	<0,0001	1	34,609	<0,0001	2	153,008	<0,0001
T	1	49,701	<0,0001	1	95,499	<0,0001	1	81,75	<0,0001	1	280,524	<0,0001
MT:NU	1	1,982	0,1591	1	26,937	<0,0001	1	9,392	0,0022	4	80,603	<0,0001
MT:T	1	25,913	<0,0001	1	29,262	<0,0001	1	29,284	<0,0001	2	25,493	<0,0001
NU:T	1	6,684	0,0097	1	21,298	<0,0001	1	57,57	<0,0001	2	28,232	<0,0001
MT:NU:T	1	193,887	<0,0001	1	12,764	0,0004	1	37,02	<0,0001	4	221,934	<0,0001
EB III	LM			LN			MN			LMN		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	1,05	0,3053	1	20,299	<0,0001	1	8,036	0,0046	2	25,03	<0,0001
NU	1	263,56	<0,0001	1	112,658	<0,0001	1	42,94	<0,0001	2	601,66	<0,0001
T	1	402,67	<0,0001	1	45,193	<0,0001	1	298,176	<0,0001	1	375,18	<0,0001
MT:NU	1	11,06	0,0009	1	44,093	<0,0001	1	13,517	0,0002	4	82	<0,0001
MT:T	1	42,11	<0,0001	1	26,51	<0,0001	1	0,257	0,612	2	37,06	<0,0001
NU:T	1	0,08	0,7818	1	0,082	0,7743	1	136,047	<0,0001	2	106,68	<0,0001
MT:NU:T	1	32,27	<0,0001	1	63,281	<0,0001	1	8,084	0,0045	4	161,96	<0,0001
EB IV	OP			OQ			PQ			OPQ		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	6,708	0,0096	1	124,63	<0,0001	1	108,91	<0,0001	2	236,75	<0,0001
NU	1	13,988	0,0002	1	131,548	<0,0001	1	403,91	<0,0001	2	569,42	<0,0001
T	1	73,167	<0,0001	1	7,434	0,0064	1	3,75	0,0528	1	43,83	<0,0001
MT:NU	1	13,441	0,0002	1	0,064	0,7997	1	171,65	<0,0001	4	187,9	<0,0001
MT:T	1	0,267	0,6054	1	95,804	<0,0001	1	3,87	0,0492	2	97,85	<0,0001
NU:T	1	0,91	0,34	1	14,711	0,0001	1	13,34	0,0003	2	14,48	0,0007
MT:NU:T	1	1,717	0,19	1	0,029	0,8643	1	0,04	0,8351	4	26,65	<0,0001

Tabela P6. Uticaj mtDNK haplotipa (MT), jedarne pozadine (NU), temperature (T) i njihovih interakcija na vijabilnost od lutke do adulta (PtA) kod model vrste *D. obscura*. Za svaki eksperimentalni blok (EB) predstavljeni su rezultati ANOVA-e modela tri parovna poređenja i model koji analizira ceo EB. df – Stepeni slobode; Dev – Devijacija; p vrednosti koje su značajne pri $p < 0,05$ predstavljene su boldom. Objavljeno u (Erić i sar. 2022b).

EB I	AB			AC			BC			ABC		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	12,475	0,0004	1	2,7017	0,1002	1	9,568	0,002	2	14,631	0,0007
NU	1	7,7826	0,0053	1	4,7937	0,0286	1	8,1794	0,0042	2	17,462	0,0002
T	1	23,2747	<0,0001	1	0,2161	0,6421	1	2,3916	0,122	1	1,181	0,2772
MT:NU	1	7,7478	0,0054	1	0,1258	0,7229	1	0,0119	0,913	4	11,503	0,0215
MT:T	1	1,3736	0,2412	1	5,7606	0,0164	1	1,6706	0,1962	2	3,232	0,1987
NU:T	1	0,1273	0,7212	1	6,2186	0,0126	1	31,4402	<0,0001	2	28,027	<0,0001
MT:NU:T	1	23,6151	<0,0001	1	11,4435	0,0007	1	6,9251	0,0085	4	33,74	<0,0001
EB II	DE			DF			EF			DEF		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	4,5055	0,0338	1	1,6082	0,2047	1	0,1452	0,7031	2	2,6995	0,2593
NU	1	0,6179	0,4318	1	0,1475	0,701	1	2,5504	0,1103	2	1,3562	0,5076
T	1	7,3089	0,0069	1	1,6117	0,2043	1	15,36	<0,0001	1	5,5053	0,019
MT:NU	1	1,09	0,2965	1	0,0122	0,9121	1	4,9746	0,0257	4	6,0107	0,1984
MT:T	1	4,9657	0,0259	1	15,2255	<0,0001	1	0,5121	0,4743	2	15,7679	0,0004
NU:T	1	7,9991	0,0047	1	0,2847	0,5936	1	10,6933	0,0011	2	24,8265	<0,0001
MT:NU:T	1	1,1043	0,2933	1	0,5458	0,46	1	0,3765	0,5395	4	2,8783	0,5784
EB III	LM			LN			MN			LMN		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	0,0544	0,8155	1	8,93	0,0028	1	0,003	0,9576	2	7,13	0,0283
NU	1	0,5355	0,4643	1	32,722	<0,0001	1	72,774	<0,0001	2	82,538	<0,0001
T	1	7,9118	0,0049	1	26,255	<0,0001	1	2,675	0,102	1	18,229	<0,0001
MT:NU	1	0,0359	0,8497	1	23,147	<0,0001	1	3,443	0,0635	4	30,485	<0,0001
MT:T	1	0,7609	0,383	1	0,216	0,642	1	5,204	0,0225	2	3,724	0,1553
NU:T	1	5,9638	0,0146	1	0,61	0,4348	1	0,076	0,7829	2	6,681	0,0354
MT:NU:T	1	8,5806	0,0034	1	0,328	0,5671	1	2,202	0,1378	4	18,318	0,0011
EB IV	OP			OQ			PQ			OPQ		
	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p	Df	Dev	p
MT	1	19,9412	<0,0001	1	12,7367	0,0004	1	0,1568	0,6921	2	27,3234	<0,0001
NU	1	0,0297	0,8631	1	0,859	0,354	1	0,1193	0,7298	2	0,0359	0,9822
T	1	1,0318	0,3097	1	3,0075	0,0829	1	17,8466	<0,0001	1	12,7003	0,0004
MT:NU	1	0,4342	0,5099	1	5,3698	0,0205	1	8,0723	0,0045	4	10,1333	0,0382
MT:T	1	0,1249	0,7238	1	6,5411	0,0105	1	0,6708	0,4128	2	0,913	0,6335
NU:T	1	3,913	0,0479	1	9,7804	0,0018	1	0,663	0,4155	2	19,1607	<0,0001
MT:NU:T	1	3,1418	0,0763	1	1,8238	0,1769	1	0,8067	0,3691	4	9,8808	0,0425

BIOGRAFIJA AUTORA

Pavle Erić je rođen 23. 2. 1992. godine u Valjevu, gde završava osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, Studijski program Biologija upisuje 2011. godine, gde diplomira 2015. godine sa prosekom 8,55. Odmah nakon završenih osnovnih studija upisuje master akademske studije Biološkog fakulteta, studijski program Biologija, modul Primenjena genetika. Master studije završava 2016. godine sa prosekom 9,00 odbranom master rada pod nazivom „Varijabilnost nukleotidne sekvence mitohondrijske DNK *Drosophila subobscura* sa Stare planine“, pod mentorstvom dr Mihaila Jelića. Iste godine upisuje doktorske akademske studije Biološkog fakulteta na modulu genetika. Zapošljava se na Odeljenju za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju 2017. godine kao istraživač pripravnik u okviru projekta „Dinamika genofonda, genetička i fenotipska varijabilnost populacija u zavisnosti od promenljivosti sredine“, finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj (br. pr. 173012). Zvanje istraživač saradnik stekao je 2021. godine. Pavle Erić je bio član projekta „SERBHIWE, Medonosne pčele Srbije, divlja društva naspram održavanih društava viđena očima populacionih genetičara, u okviru programa za izvrsne projekte mladih istraživača (PROMIS) Fonda za nauku. Autor je ili koautor 9 naučnih radova od kojih je 6 publikovano u vrhunskim međunarodnim časopisima i 20 saopštenja na skupovima međunarodnog i nacionalnog značaja, štampana u celini ili izvodu. Član je Srpskog biološkog društva, Društva genetičara Srbije, Društva entomologa Srbije i DrosEU konzorcijuma.

Изјава о ауторству

Потписани-а Павле Ерић

број индекса Б3013/2016

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**Адаптивни значај унутарпопулационе варијабилности митохондријског генома
Drosophila subobscura и *D. obscura***

- 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. 2. 2024.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Павле Ерић

Број индекса Б3013/2016

Студијски програм Биологија (модул Генетика)

Наслов рада Адаптивни значај унутарпопулационе варијабилности
митохондријског генома *Drosophila subobscura* и *D. obscura*

Ментор др Михаило Јелић, ванредни професор

Потписани/а Павле Ерић

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. 2. 2024.

Изјава о коришћењу

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

Адаптивни значај унутарпопулационе варијабилности митохондријског генома *Drosophila subobscura* и *D. obscura*

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. 2. 2024.

1. Ауторство - Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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. Дозвољава 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.