

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mirko S. Đorđević

Evolucija starenja kod laboratorijskih
populacija *Acanthoscelides obtectus*: uloga
mitohondrija i oksidativnog stresa

doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mirko S. Đorđević

Evolution of ageing in laboratory populations
of *Acanthoscelides obtectus*: role of
mitochondria and oxidative stress

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016.

Mentorke:

Prof. dr Biljana Stojković, vanredna profesorka
Biološki fakultet
Univerzitet u Beogradu

dr Jelica Lazarević, naučna savetnica
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Darka Šešlija Jovanović, viša naučna saradnica
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Univerzitet u Beogradu

dr Anđeljko Petrović, vanredni profesor
Biološki fakultet
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: _____

Profesoru Nikoli Tuciću

Ova doktorska disertacija je urađena u okviru projekta #173007 „Evolucija u laboratoriji i adaptacije u prirodi“ (rukovodilac dr Branka Tucić) koji je finansiran od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Većina eksperimenata je realizovana na Odeljenju za evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Veliku zahvalnost dugujem:

Dragom prof. dr Nikoli Tuciću na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da od njega učim i postanem deo njegovog tima. Njegov rad će uvek predstavljati moj neiscrpan izvor motivacije.

Divnim mentorkama dr Biljani Stojković i dr Jelici Lazarević na posvećenom angažovanju i korisnim idejama i savetima koji su doprineli realizaciji ove doktorske disertacije.

dr Darki Šešliji Jovanović i prof. dr Anđeljku Petroviću na sugestijama koje su doprinele kvalitetu finalne verzije teksta.

Izrada doktorske teze je dug i kompleksan proces, sa svojim padovima i usponima. Ja sam imao sreće da u tom procesu imam snažnu i iskrenu podršku i pomoć svog prijatelja i kolege dr Uroša Savkovića, na kojima ću mu uvek biti beskrajno zahvalan.

dr Jeleni Jović i njenom timu sa Odseka za štetočine bilja Instituta za zaštitu bilja i životnu sredinu u Beogradu, dr Oliveru Stojkoviću i njegovom timu sa Instituta za sudsku medicinu, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, kao i dr Aleksandri Trifunović i njenom timu sa Instituta za mitohondrijske bolesti i starenje, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Kelnu, na nesebičnoj pomoći u molekulskim analizama laboratorijskih populacija pasuljevog žiška.

Kolegicama i kolegama sa Odeljenja za evolucionu biologiju na saradnji i prijateljstvu i van naučnih okvira.

Konačno, dragoj porodici i prijateljima, zahvaljujem na ogromnoj podršci, razumevanju i ljubavi koje mi neprestano pružaju.

Evolucija starenja kod laboratorijskih populacija *Acanthoscelides obtectus*: uloga mitohondrija i oksidativnog stresa

SAŽETAK:

Ključna pretpostavka evolucione teorije starenja jeste da opadanje uzrasno-specifičnog preživljavanja organizama predstavlja rezultat smanjenja intenziteta prirodne selekcije nakon početka reprodukcije. U osnovi evolucije starenja nalaze se dva populaciono-genetička mehanizma: akumulacija mutacija (AM) i antagonistička plejotropija (AP). U skladu sa pretpostavkama evolucione teorije starenja, kod eksperimentalnih populacija pasuljevog žiška (*Acanthoscelides obtectus*) selektovanih više od 170 generacija za ranu (E režim) ili kasnu (L režim) reprodukciju, uočena je divergencija u dužini života i drugim preadultnim i adultnim osobinama životne istorije. Evolucija veće dužine života u L režimu u saglasnosti je sa pretpostavkama AP modela, dok u evoluciji kraćeg života E žižaka važnu ulogu ima akumulacija mutacija. Tretiranjem E i L žižaka pesticidima (parakvat i tebufenpirad) koji generišu slobodne radikale, potvrđena je pozitivna korelacija između dužine života i otpornosti na oksidativni stres. Budući da mitohondrija predstavlja glavno mesto sinteze energije i slobodnih radikala, u ovoj tezi je istraženo da li je uzrasno-specifična selekcija oblikovala varijabilnost mtDNK, nDNK i njihovih epistatičkih interakcija. Genotipizacijom mitohondrijskog COI gena i mikrosatelitskih lokusa pokazana je efikasnost uzrasno-specifične selekcije u međupopulacionoj divergenciji mitohondrijskog i jedarnog genskog pula kod pasuljevog žiška. Odvijanje procesa mito-jedarne koevolucije analizirano je korišćenjem mito-jedarnih linija u kojima su E i L mitohondrijski genomi kombinovani sa E i L jedarnim genomima. Pokazano je da su linije sa narušenim mito-jedarnim interakcijama imale niže aktivnosti mitohondrijskih kompleksa elektron transportnog lanca i lošiju preadultnu performansu.

KLJUČNE REČI: starenje, mitohondrije, oksidativni stres, mito-jedarne interakcije, elektron transportni lanac, osobine životne istorije, laboratorijska evolucija, *Acanthoscelides obtectus*

NAUČNA OBLAST: Biologija

UŽA NAUČNA OBLAST: Evolucionarna biologija

UDK: 575.827:591.139:576.311.347]:595.768.2(043.3)

**Evolution of ageing in laboratory populations of *Acanthoscelides*
obtectus: role of mitochondria and oxidative stress**

ABSTRACT:

According to the evolutionary theory of ageing, age-specific decline in survival is the result of decreasing intensity of natural selection after the onset of reproduction. The evolution of ageing may be explained by two different, but not mutually exclusive, genetic mechanisms: antagonistic pleiotropy (AP) and mutation accumulation (MA). In accordance with evolutionary theory of ageing, two sets of the seed beetle (*Acanthoscelides obtectus*) experimental lines selected for more than 170 generations for early (E regime) or late (L regime) reproduction, show divergence in longevity and ageing patterns, as well as in other preadult and adult life history traits. Evolution of long life in L regime is predominantly based on antagonistic pleiotropy gene effects, while mutation accumulation plays important role in evolution of short life in E regime. By exposure of E and L beetles to two pesticides (paraquat and tebufenpyrad) that generate free radicals, it was confirmed that extended longevity in L beetles (especially in females) was associated with higher oxidative stress resistance. Additionally, since mitochondria are main site of free radical and energy production, effects of age-specific laboratory selection on mtDNA, nDNA and their epistatic interaction were assessed. Genotyping of mitochondrial COI gene and nuclear microsatellite loci showed that selection in E and L regimes led to divergent evolution of mtDNA and nDNA gene pools. Mitonuclear coevolution was investigated using mitonuclear introgression lines in which E and L mitochondrial genomes were expressed in both E and L nuclear background. It was found that lines with disrupted mitonuclear interactions had lower activity of the mitochondrial electron transport chain complexes and lower preadult performance.

KEY WORDS: ageing, mitochondria, oxidative stress, mitonuclear interactions, electron transport chain, life history traits, laboratory evolution, *Acanthoscelides obtectus*

SCIENTIFIC FIELD: Biology

SPECIFIC SCIENTIFIC FIELD: Evolutionary biology

UDC:575.827:591.139:576.311.347]:595.768.2(043.3)

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
1.1 Evolucionarne teorije starenja	1
1.2 Populaciono-genetički mehanizmi u osnovi evolucije starenja	5
1.2.1 Akumulacija mutacija (Ako ne platiš na mostu, platićeš na ćupriji)	6
1.2.2 Antagonistička plejotropija (Pita starost kakva ti je bila mladost).....	9
1.2.3 Teorija jednokratne some (Ko se rano pari, rano i ostari).....	12
1.2.4 Prestanak starenja je neizbežan	14
1.3 Fiziološke teorije starenja.....	17
1.4 Mitohondrije.....	18
1.4.1 Elektron transportni lanac i oksidativna fosforilacija	20
1.4.2 Mitohondrijske reaktivne vrste molekuskog kiseonika (mROS).....	24
1.5 Mitohondrijska teorija starenja (MFRTA)	25
1.6 Svi putevi vode u mitohondriju, a neki i iz nje - uloga mROS-ova u signalnoj transdukciji.....	27
1.7 Koncept postepenog odgovora na mROS	29
1.8 Od krunskog svedoka do glavnog osumnjičenog - oblikovanje varijabilnosti mtDNK evolucionim procesima.....	32
2. CILJEVI.....	36
3. MATERIJAL I METODE.....	37
3.1 Biologija i osnovne karakteristike životnog ciklusa pasuljevog žiška.....	37
3.2 Uzrasno-specifična selekcija i laboratorijske populacije	37
3.3 Analiza efekata selekcije za ranu i kasnu reprodukciju na preadultne i adultne osobine životne istorije.....	40
3.3.1 Analiza preadultnih osobina žižaka.....	40
3.3.2 Analiza adultnih osobina žižaka.....	41
3.3.3 Određivanje intenziteta prirodne selekcije	42
3.4 Eksperimentalna analiza populaciono-genetičkog modela akumulacije mutacija	43
3.4.1 Formiranje dvostrukih hibrida.....	43
3.4.2 Analiza osobina životne istorije dvostrukih hibrida i nehibridnih E i L populacija	43

3.4.2.1 Fekunditet ženki	44
3.4.2.2 Reproductivna sposobnost mužjaka	44
3.4.2.3 Dužina života.....	45
3.5 Analiza uticaja mitohondrija, jedra i njihovih epistatičkih interakcija na osobine životne istorije.....	46
3.5.1 Formiranje mito-jedarnih linija sa očuvanim i narušenim mito-jedarnim interakcijama metodom povratnog ukrštanja	46
3.5.2 Analiza preadultnih i adultnih osobina životne istorije mito-jedarnih linija sa očuvanim i narušenim mito-jedarnim interakcijama.....	49
3.6. Testiranje otpornosti na oksidativni stres	49
3.7. Određivanje aktivnosti enzima mitohondrijskog elektron transportnog lanca	52
3.7.1 Priprema uzoraka za analizu	52
3.7.2 Određivanje aktivnosti kompleksa I.....	52
3.7.3 Određivanje aktivnosti kompleksa II	52
3.7.4 Određivanje aktivnosti kompleksa III	53
3.7.5 Određivanje aktivnosti kompleksa IV	53
3.7.6 Određivanje koncentracije proteina	53
3.7.7 Određivanje specifične aktivnosti ETL kompleksa	54
3.8 Molekulska karakterizacija laboratorijskih populacija pasuljevog žiška.....	54
3.8.1 Ekstrakcija DNK iz žižaka	54
3.8.2 Utvrđivanje mikrosatelitske varijabilnosti eksperimentalnih populacija pasuljevog žiška	55
3.8.3 Utvrđivanje varijabilnosti mitohondrijskog COI gena eksperimentalnih populacija pasuljevog žiška.....	57
3.8.3.1 Amplifikacija COI gena PCR metodom i sekvenciranje.....	57
3.8.3.2 Virutelna in silico restrikciona analiza i RFLP	59
3.8.4 Populaciono-genetička analiza laboratorijskih populacija korišćenjem mikrosatelitskih genotipova i mitohondrijskih haplotipova.....	60
3.8.5 Test na prisustvo <i>Wolbachia</i>	61
3.9 Demografske analize.....	62
3.10 Statistička obrada podataka.....	64

4. REZULTATI.....	67
4.1 Analiza osobina životne istorije laboratorijskih populacija pasuljevog žiška ...	67
4.1.1 Efekat selekcionih tretmana na preadultne osobine životne istorije	67
4.1.2 Efekat selekcionih tretmana na adultne osobine životne istorije	68
4.1.2.1 Efekat selekcionih režima na dužinu života i preživljavanje neukrštanih žižaka	68
4.1.2.2 Efekat selekcionih režima na dužinu života i preživljavanje ukrštanih žižaka	70
4.1.2.3 Efekat selekcionih režima na fekunditet ženki	72
4.2 Analiza pojave hibridnog vigora u osobinama dužine života i reproduktivnog ponašanja laboratorijskih populacija pasuljevog žiška.....	73
4.3 Analiza osetljivosti eksperimentalnih populacija na oksidativni stres.....	74
4.3.1 Efekti parakvata na preživljavanje i dugovečnost B, E i L eksperimentalnih populacija	75
4.3.2 Efekti tebufenpirada na preživljavanje i dugovečnost E i L dvostrukih hibrida i B žižaka.....	76
4.4 Genetički diverzitet i populaciono-genetička struktura laboratorijskih populacija	77
4.4.1 Mikrosatelitska varijabilnost laboratorijskih populacija	78
4.4.2 Varijabilnost mitohondrijskih COI haplotipova.....	79
4.5 Analiza osobina životne istorije mito-jedarnih linija.....	80
4.5.1 Analiza preadultnih osobina mito-jedarnih linija.....	80
4.5.2 Analiza adultnih osobina mito-jedarnih linija.....	81
4.5.2.1 Dužina života neukrštanih i ukrštanih mito-jedarnih linija	81
4.5.2.2 Ukupni fekunditet ženki	83
4.6 Analiza aktivnosti enzimskih kompleksa mitohondrijskog ETL.....	83
4.7 Analiza povezanosti osobina životne istorije mito-jedarnih linija i aktivnosti kompleksa mitohondrijskog ETL	86
4.8 Analiza osetljivosti mito-jedarnih linija na oksidativni stres	87
4.8.1 Dužina života i preživljavanje mito-jedarnih linija tretiranih niskom koncentracijom (0,5 %) parakvata	87

4.8.2 Dužina života i preživljavanje mito-jedarnih linija tretiranih niskom koncentracijom (1,5 %) tebufenpirada	90
5. DISKUSIJA	94
<i>5.1 Dvadeset godina laboratorijske evolucije za različito vreme reprodukcije kod pasuljevog žiška - šta se promenilo?</i>	<i>95</i>
<i>5.2 Proces starenja evoluira kod laboratorijskih populacija pasuljevog žiška selektovanih za različito vreme reprodukcije - potvrda savremene evolucione teorije starenja</i>	<i>97</i>
<i>5.3 Populaciono-genetički mehanizmi u osnovi evolucije starenja kod eksperimentalnih populacija pasuljevog žiška.....</i>	<i>100</i>
5.3.1 Antagonistička plejotropija - Koja je cena dugovečnosti?	100
5.3.2 Akumulacija mutacija	104
<i>5.4. Uloga seksualnog konflikta u evoluciji polno-specifičnih razlika u dužini života</i>	<i>106</i>
<i>5.5 Žrtvovanje mehanizama održavanja some zarad reprodukcije - povezanost uzrasno-specifične selekcije i otpornosti na oksidativni stres</i>	<i>109</i>
<i>5.6 Provera svedoka i pronalaženje osumnjičenih: Uzrasno-specifična selekcija oblikuje učestalost mitohondrijskih i jedarnih alela, kao i mitohondrijske bioenergetske procese</i>	<i>115</i>
<i>5.7 Pozovi M×N radi evolucije životne strategije: Uloga mito-jedarnih epistatičkih interakcija u evoluciji starenja i drugih osobina životne istorije</i>	<i>121</i>
5.7.1 Analiza preadultnih i adultnih osobina životne istorije.....	121
5.7.2 Aktivnost enzima mitohondrijskog ETL.....	123
<i>5.8 Smetnje na vezi: efekat (ne)pravilne komunikacije mitohondrije i jedra na preživljavanje i dužinu života u homeostazi i nakon ekstrinzičkog oksidativnog stresa.....</i>	<i>128</i>
6. ZAKLJUČCI.....	133
7. TABELE	135
8. SLIKE.....	163
9. LITERATURA	188

1. UVOD

Ne postoji niti jedan aspekt fenotipa višćelijskih organizama kod kog izostaju promene usled procesa starenja. Starenje možemo definisati kao uzrasno-specifično smanjenje verovatnoće preživljavanja i reprodukcije usled akumulacije oštećenja i funkcionalnih promena koje narušavaju homeostazu organizma. Oslanjajući se na ovu definiciju, proces starenja možemo sagledati na individualnom i populacionom nivou. Na individualnom nivou istražujemo stohastičke i sistemske fiziološke promene koje se dešavaju tokom procesa starenja, dok nas na populacionom nivou interesuje varijabilnost dinamike starenja jedinki unutar populacije. Integracija savremenih znanja iz evolucione i molekularne biologije, fiziologije, demografije i biogerontologije neophodna je zarad boljeg razumevanja bioloških fenomena za koje savremena nauka nije dala potpun odgovor: Zašto i na koji način organizmi stare (Flatt & Schmidt, 2009)?

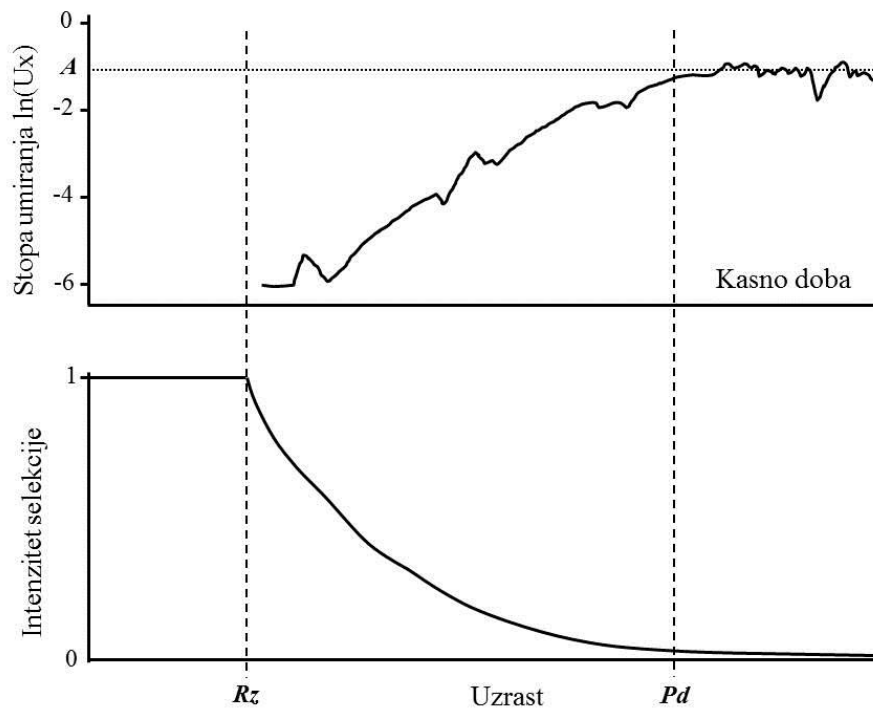
1.1 Evolucione teorije starenja

Do danas je opisan veliki broj stohastičkih i sistemskih fizioloških mehanizama koji imaju važnu ulogu u procesu starenja kod različitih organizama. Velika količina nakupljenih podataka zahteva jedan teorijski kontekst koji bi nam omogućio da sagledamo univerzalne mehanizme u procesu starenja kod filogenetski udaljenih vrsta. Evoluciono-biološka teorija starenja predstavlja konceptualnu osnovu koja omogućava da veliki broj opisanih demografskih podataka, molekularno-bioloških i fizioloških mehanizama, sa važnim ulogama u kompleksnom fenomenu starenja, uklopimo u jednu logičnu celinu.

Prvo evoluciono objašnjenje procesa starenja, na osnovu ideja Alfreda Volasa, potiče od poznatog nemačkog biologa Vajsmana (August Weismann). On je isticao da selekcija favorizuje procese koji dovode do umiranja starih i „istrošenih“ jedinki unutar populacije kako bi se oslobodili resursi i prostor za mlade jedinke. Iako je veliki broj evolucionih biologa odbacio Vajsmanovu grupno-selekcionističku argumentaciju, a sam Vajsman kasnije promenio svoje evolucionne poglede na hipotezu o programiranoj smrti (Gavrilov & Gavrilova, 2002), ova ideja je važna jer je prva podstakla potragu za evolucionim objašnjenjem procesa starenja. Ključni nedostatak Vajsmanove hipoteze bila je pretpostavka da se procesi starenja održavaju zato što su „korisni za grupu“.

Tačnije, svaka jedinka kod koje bi se pojavila mutacija zaslužna za usporavanje ili zaustavljanje starenja bila bi u selektivnoj prednosti u odnosu na druge članove populacije. Ovakve jedinke bile bi favorizovane selekcijom na individualnom nivou i tokom generacija procesi starenja bili bi uklonjeni iz populacija.

Kasniji modeli evolucije starenja zasnivaju se na individualnoj selekciji i uzimaju u obzir okolnosti života u prirodi. Naime, sasvim je jasno da u prirodnim populacijama većina jedinki biva eliminisana delovanjem nepovoljnih faktora životne sredine koji uzrokuju mortalitet (nepovoljni ekološki uslovi, gladovanje, predatorstvo, bolest i nesreća), a ne usled duboke starosti i efekata štetnih mutacija kasnije u životu. Stoga, ključna pretpostavka **savremene evolucione teorije starenja** podrazumeva da starenje, usled neizbežnosti navedenih spoljašnjih uzročnika smrtnosti, evoluirao kao posledica opadanja intenziteta prirodne selekcije nakon dostizanja reproduktivne zrelosti. Ovakva premisa nametnula je zaključak da proces starenja evoluirao usled nakupljanja mutacija koje imaju štetne efekte kasnije u životu i koje prirodna selekcija nije „detektovala“. Navedene mutacije sa uzrasno-specifičnim efektima „promakle“ su selekciji zato što su njihovi nosioci u specifičnim uslovima životne sredine ubrzo nakon reprodukcije uginuli. U teorijskom kontekstu, koncept su prvo opisali Holdejn (Haldane, 1941) i Medavar (Medawar, 1946), dok je kvantitativnu formulaciju ovog verbalnog modela dao Hamilton (1966). Hamiltonova jednačina matematički opisuje obrazac intenziteta prirodne selekcije po kome je vrednost intenziteta selekcije najviša do početka reprodukcije, nakon čega počinje postepeno da opada sa uzrastom, dostižući vrednost blisku nuli po završetku reprodukcije (Slika 1.1.1, Rose *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2011). Dva pronicljiva eksperimentalna „trika“ omogućavaju testiranje pretpostavke savremene evolucione teorije starenja: eksperimentalna manipulacija 1) vremenom reprodukcije i 2) stopom ekstrinzičkog mortaliteta.



Slika 1.1.1 Obrazac promena intenziteta prirodne selekcije i krive mortaliteta tokom razvića i starenja. Selekcija je najefikasnija u juvenilnoj fazi i nakon dostizanja reproduktivne zrelosti (Rz) njen intezitet počinje eksponencijalno da opada. Ovaj obrazac prati kriva mortaliteta i nakon Rz počinje eksponencijalno da raste. Trenutak kada intenzitet selekcije dostigne najnižu vrednost, a kriva mortaliteta uđe u plato, naziva se prelomni dan (Pd) i nakon njega nastupa faza - kasno doba (engl. *late life*). Vrednost A predstavlja stopu mortaliteta u platu.

Prvi eksperimentalni pristup provere evolucione teorije starenja zasniva se na višegeneracijskoj selekciji za ranu i kasnu reprodukciju. Naime, tokom velikog broja generacija u jednoj grupi linija, potomstvo ostavljaju isključivo jedinke iz mlađih uzrasnih klasa (E linije od engl. *early reproduction*), dok drugu grupu čine jedinke iz starijih uzrasnih klasa koje su još uvek u stanju da se reprodukuju (L linija od engl. *late reproduction*). Ovim postupkom očekuje se da će menjanje obrasca reprodukcije izmeniti obrazac delovanja prirodne selekcije koji bi trebao da rezultira promenom dinamike procesa starenja. Ispravnost ove pretpostavke potvrđena je eksperimentima na *Drosophila melanogaster* (Luckinbill *et al.*, 1984; Partridge & Fowler, 1992; Wit *et al.*, 2013), ali i na drugim model sistemima (Nagai *et al.*, 1995; Tucić *et al.*, 1996; Reed & Bryant, 2000). U svim ovim studijama, shodno teorijskim predviđanjima savremene evolucione teorije starenja, pokazano je da obrazac starenja predstavlja kompleksno svojstvo koje evoluira, kao i da se prosečne dužine života povećavaju unutar onih laboratorijskih populacija koje su selektovane za kasnu reprodukciju, dok se obrnut trend uočava u populacijama selektovanim za ranu reprodukciju.

Drugi eksperimentalni pristup predstavlja eksperimentalno variranje stope smrtnosti izazvane uslovima u životnoj sredini (ekstrinzički mortalitet). Oslanjajući se na evolucionu teoriju starenja, povećanje stope ekstrinzičkog mortaliteta tokom većeg broja generacija dovelo bi do povećanja mortaliteta uzrokovano akumulacijom funkcionalnih oštećenja (intrinzički mortalitet) i smanjenja dugovečnosti. Naime, jedinkama populacije izložene visokom riziku od ekstrinzičkog mortaliteta više se „isplati“ da ulažu u ranu produkciju velikog broja potomaka nego u poboljšanje struktura i funkcija koje će smanjiti intrinzički mortalitet, odnosno povećati verovatnoću preživljavanja u starijim uzrastima. U nameri da se testira ova hipoteza, sproveden je niz eksperimenata u laboratoriji i prirodi. Laboratorijske linije vinske mušice koje su izlagane selekcionim režimima sa različitim stopom ekstrinzičkog mortaliteta, potvrdila su predviđanja (Stearns *et al.*, 2000), dok rezultati analiza na populacijama iz prirode nisu konzistentni (Reznick *et al.*, 1990, 2006; Ackermann *et al.*, 2007). Oba eksperimentalna pristupa pokazala su da selekcija može promeniti brzinu procesa starenja shodno predviđanjima savremene evolucione teorije starenja i time je potvrđena njena ispravnost.

1.2 Populaciono-genetički mehanizmi u osnovi evolucije starenja

U jednačinu, koja opisuje promenu intenziteta prirodne selekcije tokom životnog ciklusa, Hamilton uvodi pretpostavku da „sudbina“ mutacije u populaciji zavisi od njenog efekta na adaptivnu vrednost, a ona se izražava kao intrinzička stopa rasta populacije (r). Ova mera adaptivne vrednosti, preko Euler-Lotkine jednačine, tj. tablica životne statistike (engl. *life table*), jeste u vezi sa uzrasno-specifičnim preživljavanjem $l(x)$ i fekunditetom $m(x)$ (Rose *et al.*, 2007). Hamiltonova jednačina (videti Materijal i metode, odeljak 3.3.3), stoga, omogućava izračunavanje intenziteta delovanja prirodne selekcije na bilo koju mutaciju sa uzrasno-specifičnim efektima na preživljavanje i reproduktivnu sposobnost. Jednačina pokazuje da će mutacija sa štetnim efektima u kasnijim fazama ontogenije (tj. kasnijem životnom dobu - uzrastu) biti pod slabim uticajem selekcije, kada je i verovatnoća umiranja usled spoljašnjih uzročnika smrtnosti velika. Posledično, tokom generacija će se povećavati učestalost mutacija sa neutralnim efektima u ranijim, ali štetnim u kasnijim uzrastima. Moguć je i drugačiji scenario. Selekcija može favorizovati mutaciju koja povećava preživljavanje i reproduktivnu

sposobnost u ranijim fazama ontogenije, iako ta mutacija u kasnijem uzrastu jedinke može imati štetne efekte na osobine adaptivne vrednosti (plejotropni efekat). Dakle, starenje evoluiralo kao rezultat ekspresije štetnih mutacija u kasnijem životnom dobu jedinke, imale one u ranijem uzrastu plejotropan pozitivan efekat ili ne. Na opisanim obrascima delovanja mutacija sa uzrasno-specifičnim efektima zasnivaju se (i međusobno razlikuju) dva osnovna populaciono-genetička mehanizma koja se nalaze u osnovi evolucije starenja: **akumulacija mutacija** (AM, Medawar 1952) i **antagonistička plejotropija** (AP, Williams 1957). Oba modela polaze od premise da su faktori koji dovode do procesa starenja nasledni, varijabilni i pod uticajem selekcije. Iako različiti prema pretpostavljenoj genetičkoj osnovi i obrascu genetičke varijabilnosti osobina životnih istorija tokom starenja, dva modela nisu međusobno isključiva, tj. mehanizmi koje oni pretpostavljaju mogu istovremeno uticati na evoluciju starenja i transgeneracijske promene u različitim osobinama životne istorije.

1.2.1 Akumulacija mutacija (Ako ne platiš na mostu, platićeš na ćupriji)

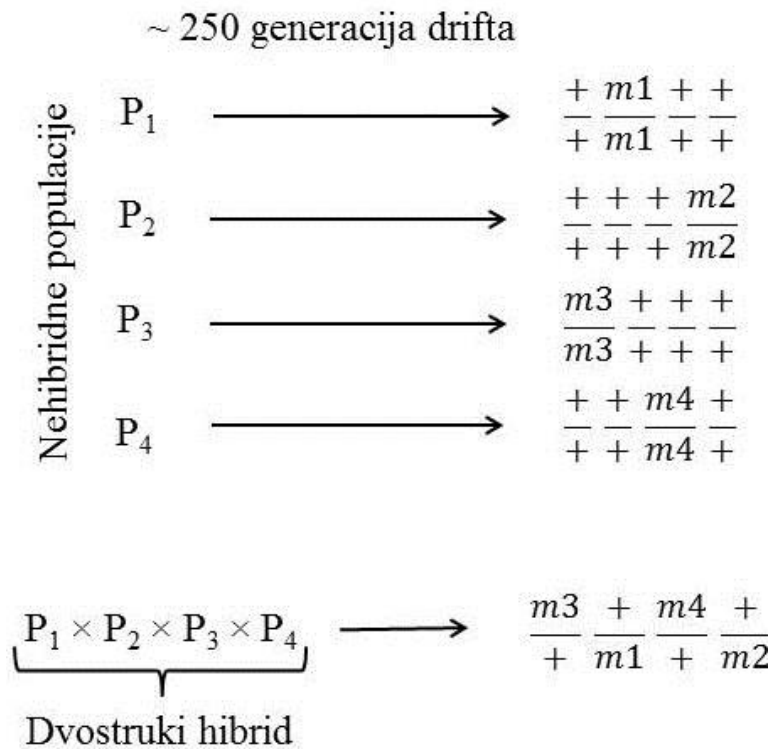
Prema modelu akumulacije mutacija (AM), učestalost mutacija sa štetnim efektima u kasnijem uzrastu organizama će se povećavati usled opadanja efikasnosti selekcije u eliminisanju štetnih mutacija tokom starenja, dok će efekti genetičkog drifta i stope nastanka novih mutacija ostati neizmenjeni. Jednostavnije rečeno, prema AM modelu starenje evoluiralo usled akumulacije mutacija koje imaju neutralne efekte na komponente adaptivne vrednosti u ranijim i štetne efekte u kasnijim fazama ontogenije organizma. Važno je istaći da je AM model neadaptivan: starenje se javlja kao posledica nasumičnog, pasivnog nakupljanja mutacija iz generacije u generaciju, koje selekcija nije bila u stanju da eliminiše.

Pretpostavke Medavarovog verbalnog modela potvrđene su matematičkom analizom (Charlesworth 1980; 2001). Eksperimentalnu potvrdu AM modela u populaciji predstavljalo bi povećanje genetičke varijanse (Charlesworth, 1990) i inbriding depresije (Charlesworth & Hughes, 1996) za osobine životne istorije uporedo sa starenjem jedinke. Uzrasno-specifično povećanje aditivne genetičke varijanse analizirano je na nekoliko komponenti adaptivne vrednosti: uzrasno-specifični fekunditet (Rose & Charlesworth, 1981; Engström *et al.*, 1989), uzrasno-specifični mortalitet (Hughes & Charlesworth, 1994; Promislow *et al.*, 1996) i virilitet mužjaka

(Kosuda, 1985; Hughes, 1995). Iako je u studijama najčešće potvrđeno povećanje aditivne varijanse sa uzrastom, ovaj rezultat nije univerzalan. U slučaju uzrasno-specifičnog fekunditeta, u dva slučaja, na *Callosobruchus chinensis* (Tanaka, 1993) i *Drosophila melanogaster* (Tatar *et al.*, 1996), uočeno je početno povećanje aditivne varijanse, potom pad, i na kraju ponovo povećanje aditivne varijanse kasnije u životu. U slučaju uzrasno-specifičnog mortaliteta, analiza na velikom uzorku pokazala je smanjenje aditivne varijanse u kasnijem uzrastu (Promislow *et al.*, 1996). Virilitet mužjaka je, za sada, jedina osobina koja je u testovima ostala dosledna predviđanjima AM modela, a u vezi sa promenom aditivne genetičke varijanse (Hughes, 1995). Važno je istaći da, za razliku od AM, model antagonističke plejotropije nema jasna teorijska predviđanja o uticaju na genetičku varijabilnost. To znači da, u zavisnosti od kombinacije pretpostavki u modelu, AP može da podrži širok spektar populaciono-genetičkih obrazaca - od potpunog izostajanja uticaja na genetičku varijabilnost do obrasca varijabilnosti koji predviđa i AM model (Moorad & Promislow, 2009). Drugim rečima, teško je na osnovu analize genetičke varijanse jasno izdvojiti uticaj AM ili AP na evoluciju starenja komponenti osobina životne istorije (Charlesworth & Hughes, 1996).

Alternativni eksperimentalni pristup u testiranju AM modela predstavlja analiza pojave heteroze (hibridnog vigora) kod hibrida nastalih ukrštanjem između populacija koje su veliki broj generacija bile izolovane (tzv. nehibridne ili „čiste“ populacije; Slika 1.2.1.1). Oslanjajući se na neadaptivni AM model, može se pretpostaviti da su štetne mutacije, fiksirane delovanjem genetičkog drifta i/ili usled nasumičnog nastanka mutacija - jedinstvene za svaku populaciju (populacije P₁₋₄ na Slici 1.2.1.1). Uz pretpostavku da se štetne mutacije ekspimiraju kao recesivni homozigoti (Simmons & Crow, 1977), očekujemo da međusobnim ukrštanjem nezavisnih populacija nastane hibridno potomstvo kod koga štetne mutacije prelaze iz homozigotnog u heterozigotno stanje (dvostruki hibrid na Slici 1.2.1.1). Ovo bi za rezultat imalo poboljšanje vrednosti osobina adaptivne vrednosti kod hibridnih jedinki u odnosu na svojstva u parentalnim, nezavisnim populacijama, čime bi se potvrdio mehanizam AM u evoluciji te osobine. Za razliku od povećanja aditivne genetičke varijabilnosti sa uzrastom, pojava heteroze kod hibrida predstavlja indirektnu potvrdu AM modela (Promislow *et al.*, 1996; Rose *et al.*, 2002). Ovakav „hibridni“ pristup testiranju uloge AM u evoluciji starenja dao je

mešovite rezultate: nekoliko studija na *D. melanogaster* pokazalo je heterotični efekat kod dugovečnosti i drugih osobina životne istorije (Mueller, 1987; Hughes *et al.*, 2002; Swindell & Bouzat, 2006), dok je u drugim studijama ovaj efekat varirao među populacijama ili bio specifičan za pol (Lesser *et al.*, 2006; Reynolds *et al.*, 2007; Keller *et al.*, 2008). Dodatno, istraživanja na dvema vrstama pasuljevog žiška (*Calusobruchus chinensis*, Tanaka *et al.* 1990; i *C. maculatus*, Fox *et al.* 2006) nisu potvrdile pretpostavke o ulozi AM u evoluciji starenja. Nedoslednost u dosadašnjim rezultatima proističe iz oskudnog broja empirijskih testova koji se bave ispitivanjem uloge akumulacije mutacija u evoluciji starenja, a posebno nedostaje primena metoda eksperimentalne evolucije. Buduće analize trebalo bi da obuhvate veći broj različitih populacija i vrsta sa različitim osobinama životne istorije. Za sada, status ovog populaciono-genetičkog mehanizma možemo okarakterisati kao produktivnu hipotezu koja čeka dalje potvrđivanje (Gavrilov & Gavrilova, 2002).



Slika 1.2.1.1 Eksperimentalna analiza modela AM u evoluciji osobina životne istorije. Četiri nehibridne (čiste) populacije P_{1-4} nisu se međusobno ukrštale veliki broj generacija (~ 250). Pretpostavimo da se u svakoj populaciji, zbog opadanja inteziteta selekcije nakon otpočinjanja reprodukcije, fiksirala specifična mutacija (m_{1-4}) koja u stanju recesivnog homozigota ima štetni efekat na neku osobinu adaptivne vrednosti i dovodi do inbriding depresije. Formiranjem dvostrukih hibrida, međusobnim ukrštanjem jedinki iz populacija P_{1-4} , dolazi do kombinovanja m_{1-4} mutacija u heterozigotno stanje i pojave hibridnog vigora u onim osobinama životne istorije u čijoj evoluciji značajnu ulogu ima model AM.

1.2.2 Antagonistička plejotropija (Pita starost kakva ti je bila mladost)

Ideju o mogućnosti plejotropnog delovanja gena u različitim periodima razvića prvi je uočio Medavar (Medawar, 1952), a u potpunosti teorijski razvio Džordž Vilijams (Williams, 1957). Bazični koncept ovog populaciono-genetičkog mehanizma zasniva se na plejotropnim alelima koji imaju negativno korelisane efekte: „pozitivne efekte tokom juvenilnih ili ranih reproduktivnih perioda, a negativne efekte u kasnim, postreproduktivnim periodima razvića organizma“ (Tucić, 2003, str 212). Geni sa ovakvim antagonističkim efektima proširili bi se u populaciji uprkos štetnim efektima na adaptivnu vrednost u postreproduktivnim periodima zato što bi njihov neto efekat na konačnu adaptivnu vrednost bio pozitivan. Za razliku od AM, antagonistička

plejotropija predstavlja adaptivni model: starenje nastaje kao nusprodukt delovanja antagonistički-plejotropnih alela koji se u genskom pulu održavaju delovanjem selekcije (Gavrilov & Gavrilova, 2002). Održavanjem takvih alela u populaciji, selekcija bi održavala i negativne genetičke korelacije između komponenti adaptivne vrednosti koje se pojavljuju u ranim i kasnim životnim fazama jedinki. Samim tim, uočavanje negativnih genetičkih korelacija između različitih karakteristika životne istorije u ranim i kasnim fazama života predstavljalo bi eksperimentalnu potvrdu AP modela.

Eksperimentima laboratorijske evolucije, prevažno koristeći *D. melanogaster*, potvrđene su pretpostavke AP modela i postojanje uzajamnog ograničenja između osobina životne istorije u ranim fazama razvika i dugovečnosti (Rose & Charlesworth, 1981; Luckinbill *et al.*, 1984). Na primer, direktna selekcija za povećanu dužinu života za rezultat ima korelativno smanjenje fekunditeta u svim uzrastima kod dugoživećih u poređenju sa kratkoživećim linijama (Zwaan *et al.*, 1995b). Dodatno, višegeneracijska selekcija za kasnu reprodukciju rezultirala je smanjenjem fekunditeta u ranijim fazama života i korelisanom produženju dužine života, dok je selekcija za ranu reprodukciju uzrokovala povećanje ranog fekunditeta i skraćivanje dužine života (Rose, 1984; Partridge & Fowler, 1992; Tucić *et al.*, 1996; Reed & Bryant, 2000). Interesantan rezultat uočen je u studiji Liroja i saradnika koji su, tokom desetogodišnje selekcije za ranu i kasnu reprodukciju, analizirali evolucione promene osobina životne istorije i njihovih uzajamnih ograničenja na svake dve godine (Leroi *et al.*, 1994). Pokazalo se da je nakon 10 godina uzajamno ograničenje između dužine života i ranog fekunditeta - nestalo. Sličan rezultat uočen je i u eksperimentima Arkinga i saradnika nakon više od 20 generacija selekcije za kasnu (La) reprodukciju (Arking *et al.*, 2002). Naime, iako je u početku, nakon 9 generacija selekcije, kod La vinskih mušica uočeno prosečno povećanje dužine života za 20 % uz smanjenje ranog fekunditeta u poređenju sa kontrolnim Ra linijama, ponovne analize evolucionih promena osobina životne istorije i njihovih uzajamnih ograničenja nakon više od 20 generacija selekcije ukazale su na gubitak negativne korelisanosti između dužine života i ranog fekunditeta (Arking *et al.*, 2002). Kao moguće rešenje autori su ponudili hipotezu o dvostepenom procesu antagonističke plejotropije. U prvom koraku visok selekcionni pritisak je bio usmeren na smanjenje ranog fekunditeta zarad „uštede“ u energetske resursima i njegovog ulaganja u aktivaciju mehanizama koji smanjuju

curenje H_2O_2 iz mitohondrija, povećanje antioksidativne zaštite, kao i u aktivaciju metaboličkih puteva koji obezbeđuju povišene rezerve NADPH (Arking *et al.*, 2002). Ovo je nakon 9 generacija za rezultat imalo smanjenje ranog fekunditeta i povećanje dužine života La u odnosu na Ra mušice. U drugom koraku, kada je curenje H_2O_2 iz mitohondrija smanjeno, pre svega promenom sastava masnih kiselina mitohondrijske membrane, energetske rezerve, koje su bile namenjene antioksidativnoj zaštiti, su preusmerene natrag u povećanje ranog fekunditeta (Arking *et al.*, 2002). Navedene promene metaboličkih puteva mogle su dovesti do uočenog povećanja ranog i ukupnog fekunditeta dugoživećih La u poređenju sa Ra mušicama nakon 20 generacija selekcije. Kontrolisanjem uslova sredine i hranljive podloge, kao i gustine larvi (broj larvi po semenu), potvrđen je gubitak pozitivne korelacije između dužine života i kasnog fekunditeta kod linija selektovanih za kasnu reprodukciju (Partridge *et al.*, 1999). Studija Kazelija i Kurtsingera dodatno umanjuje značaj AP modela u razumevanju uočenih obrazaca osobina životne istorije na osnovu uzajamnih ograničenja dugovečnosti i reprodukcije (Khazaeli & Curtsinger, 2010, 2013). Naime, u njihovoj studiji namera je bila da se testira da li su dugovečnost i rani fekunditet genetički odvojivi, odnosno mogu li se rekombinovati. Suprotno predviđanjima AP, rekombinovane linije Kazelija i Kurtsingera karakterisale su produžena dugovečnost i povišen rani fekunditet (tj. pozitivna korelacija između ranih i kasnih osobina adaptivne vrednosti), čime je pokazano da reprodukcija i dugovečnost jesu genetički nezavisne osobine (Khazaeli & Curtsinger, 2013).

Pored ranog i kasnog fekunditeta, na linijama selektovanim za ranu i kasnu reprodukciju proučavana su i uzajamna ograničenja između dužine života i trajanja razvića. Kod dve grupe linija selektovanih za kasnu reprodukciju uočeno je produženje u trajanju razvića u odnosu na linije selektovane za ranu reprodukciju (Partridge & Fowler, 1992; Chippindale *et al.*, 1994). Međutim, promena u trajanju razvića izostala je kod linija selektovanih za produženu dužinu života (Zwaan *et al.*, 1995b). Ujedno, kod nekih linija selektovanih za produženo trajanje razvića nije uočen pozitivno korelisan odgovor u dužini života (Zwaan *et al.*, 1995a).

Ne zanemarujući činjenicu da aleli u prirodnim populacijama imaju suptilnije efekte od mutacija indukovanih u laboratoriji, znatan broj analiza osobina životne istorije mutanata detektovalo je alele koji odgovaraju AP. Utišavanjem specifičnih gena kod *D. melanogaster* i *Caenorhabditis elegans* uočeno je produženje dužine života po ceni smanjenja fekunditeta ili fertiliteta (Gems *et al.*, 1998; Rogina *et al.*, 2000; Clancy *et al.*, 2001; Tatar *et al.*, 2001). Ujedno, mutacije koje za rezultat imaju produženje dužine života, produžile su trajanje razvića (Clancy *et al.*, 2001; Tatar *et al.*, 2001).

Iako postoji nekonzistentnost rezultata u proučavanju AP, treba imati u vidu da populaciono-genetički mehanizam antagonističke plejotropije ne zahteva da sve osobine životne istorije odgovore na selekciju antagonistički, kao ni da iste negativne korelacije segregiraju u svim populacijama. Izostanak očekivanih efekata genetičkih korelacija može se javiti i usled zajedničkog delovanja oba populaciono-genetička mehanizma na određenu osobinu koji mogu imati suprotne efekte na osobine životne istorije (Rose *et al.*, 2007). Uprkos različitim odstupanjima od AP, postignut je napredak u boljem razumevanju uloge populaciono-genetičkih mehanizama u evoluciji starenja. Potpunije uvide u ove procese obezbedile bi i analize na drugim model sistemima, pored *Drosophila* sp.

1.2.3 Teorija jednokratne some (Ko se rano pari, rano i ostari)

Fiziološki specifičnu varijantu antagonistički-plejotropne teorije predstavlja **teorija jednokratne some** (JS, engl. *disposable soma*) (Kirkwood & Holliday, 1979). Prema ovom modelu, starenje evoluira kao posledica optimizacije raspodele energije (resursa) između reprodukcije, sa jedne strane, i fizioloških mehanizama održavanja some (zaštita od molekulskih oštećenja i popravka oštećenja), sa druge (Kirkwood, 2005). Osnovna logika JS teorije jeste da intrinzički mortalitet organizma mora biti u saglasnosti sa nivoom ekstrinzičkog mortaliteta. Primera radi, u životnoj sredini sa visokim ekstrinzičkim mortalitetom, za jedinke očekivano kratkog životnog veka uzaludno je ulaganje u mehanizme održavanja some, već prioritet u energetske raspodeli ima reprodukcija. Dakle, mehanizmi održavanja moraju biti funkcionalni samo do trenutka otpočinjanja reprodukcije, nakon čega njihova efikasnost opada i javlja se akumulacija raznovrsnih molekulskih oštećenja koja bi, po modelu JS, predstavljala osnovu procesa starenja (Kirkwood, 2005).

Važno je naglasiti da se i AP i JS modeli, za razliku od AM, zasnivaju na evolucionoj optimizaciji uzajamnog ograničenja između osobina životne istorije u ranom i kasnom periodu razvića, odnosno između dugovečnosti i reprodukcije. Međutim, razlika između ova dva modela leži u specifičnim mehanizmima uzajamnog ograničenja. Naime, dok se AP model zasniva na pojedinačnim alelima sa antagonistički-plejotropnim efektima u ranom i kasnom uzrastu, JS model se zasniva na antagonistički-plejotropnim alelima koji isključivo određuju optimalnu strategiju energetske raspodele između reprodukcije i održavanja some (Robins & Conneely, 2014). Zato se može reći da JS model nastaje sužavanjem AP modela, njegovim svođenjem na fiziološki nivo, omogućavajući da se premosti „raskorak“ između raznovrsnih fizioloških i evolucionih teorija starenja, i što je možda važnije - da se raznovrsni stohastički i sistemski uzroci starenja stave u jedan evoluciono-biološki kontekst.

Veliki broj matematičkih modela potvrdio je predviđanje JS (Robins & Conneely, 2014). Podaci koji ukazuju na pozitivnu korelaciju između otpornosti na oštećenja izazvana oksidativnim stresom i dužine života, nauštrb reprodukcije, u saglasnosti su sa AP/JS modelom. Na primer, uočeno je da su eksperimentalne populacije vinskih mušica selektovane za kasnu reprodukciju otpornije na oksidativni stres od kontrolnih linija (Arking *et al.*, 1991; Harshman & Haberer, 2000; Mockett *et al.*, 2001). Uprkos brojnim istraživanjima, još uvek nemamo dovoljno podataka koji bi nam omogućili bolje razumevanje biološke prirode uzajamnih ograničenja u osnovi JS (Boggs, 2009). Može se zaključiti da je u ovoj oblasti nauke nastupio period kada su zaključcima optimizacijskih matematičkih modela neophodne eksperimentalne potvrde, a one se moraju zasnivati na biološkim markerima starenja, pored demografskih podataka o dugovečnosti i mortalitetu, ili analiza uzajamnih ograničenja između osobina životne istorije u ranijem i kasnijem uzrastu. Naime, dok demografski podaci pružaju informacije o dinamici procesa starenja, biomarkeri starenja pružaju informacije o fiziološkom stanju tokom procesa starenja. Jedan od najvažnijih biomarkera starenja jesu funkcionalnost i stepen oksidativnih oštećenja mitohondrija (Johnson, 2006), pa ne čudi podatak da su ove energetske organele istovremeno i jedan od glavnih činilaca optimizacijskih matematičkih modela starenja (Kirkwood & Kowald, 1997).

1.2.4 Prestanak starenja je neizbežan

Iako su mnoga pitanja koja se odnose na proces starenja ostala otvorena, može se reći da su savremena evolucionarna teorija starenja, kao i populaciono-genetički mehanizmi koji se na nju oslanjaju, potvrđeni brojnim eksperimentima. Dodatno, oni pružaju teorijsku osnovu za razumevanje jednog od najinteresantnijih otkrića u savremenoj biologiji - zaustavljanje demografskog starenja u kasnim fazama razvika kod organizama koji mogu da dožive duboku starost u benignim i stabilnim uslovima životne sredine.

Još od 1825. godine, kada je Bendžamin Gomperc formulisao matematički model mortaliteta po kome uzrasno-specifična verovatnoća umiranja eksponencijalno raste dok svi članovi kohorte ne izumru, smatralo se da je starenje neizbežan i neprekidan proces propadanja (videti Materijal i metode, odeljak 3.9). Međutim, 1992. godine u istom izdanju časopisa *Science* objavljene su dve demografske analize na velikom uzorku *Drosophila melanogaster* (Curtsinger *et al.*, 1992) i *Ceratitis capitata* (Carey *et al.*, 1992) koja su ukazala da, u vrlo kasnom uzrastu, krive mortaliteta nakon eksponencijalnog rasta dostižu plato. Usledila je pojava velikog broja eksperimentalnih podataka na različitim model organizmima, gajenim u kontrolisanim laboratorijskim uslovima, koji su pokazali da se demografsko starenje zaustavlja u vrlo kasnom uzrastu jedinki (Vaupel *et al.*, 1998). Teorijsko objašnjenje pojave usporavanja i ulazak krivih mortaliteta u plato ponudile su Vaupelova teorija celoživotne heterogenosti (Vaupel *et al.*, 1979) i Rouzova evoluciono-biološka teorija kasnog doba (Rose *et al.*, 2002).

Bazična pretpostavka teorije **celoživotne heterogenosti** (engl. *lifelong heterogeneity*), podrazumeva da se populacije sastoje iz „subpopulacija“ koje se značajno razlikuju u vitalnosti (robustnosti). U ovim populacijama najpre će dolaziti do odumiranja manje vitalnih/kratkoživećih članova, dok će vitalniji/dugoživeći članovi preživljavati, formirajući dugoživeću subpopulaciju. Dakle, nakon odumiranja manje vitalnih jedinki, stope mortaliteta će početi da usporavaju i dostižu plato, jer će biti opisane demografskim parametrima specifičnim za vitalnije jedinice koje duže žive.

Da bi se u potpunosti razumela i proverila Vaupelova teorija demografske heterogenosti potrebno je ispitati njene uzroke i njene posledice. Teorijski, demografska heterogenost subpopulacija može poticati od genetičke i/ili sredinske varijabilnosti. Iz navedenog sledi da se kod populacija sastavljenih od genetički identičnih jedinki očekuje nestanak platoa u krivama mortaliteta. Opsežan eksperimentalni rad pokazao je da uklanjanjem genetičke varijabilnosti iz populacije intenzivnim inbridingom (koeficijent inbridinga $> 0,99$) nije došlo do gubitka platoa u krivama mortaliteta (Fukui *et al.*, 1993). Redukovanje sredinske varijabilnosti tokom preadultnog i adultnog razvića kod inbriding linija vinskih mušica, takođe nije dovelo do nestanka platoa (Khazaeli *et al.*, 1998). Nakon ovih eksperimentalnih rezultata zaključeno je da heterogenost uzrokovana genetičkim razlikama i variranjem životne sredine ne predstavlja značajne uzroke usporavanja demografskog starenja u kasnijem životnom dobu (Shahrestani *et al.*, 2009). Ujedno, kompjuterske simulacije matematičkih modela Gompercovih jednačina pokazale su da se plato u krivama mortaliteta javlja isključivo kao posledica ekstremnih razlika u Gompercovim parametrima (Mueller *et al.*, 2011). Naime, prema simulacijama, samo kada je razlika u parametru a (inicijalni mortalitet), odnosno b (uzrasno-specifični mortalitet) četiri puta veća od one koja je ustanovljena kod populacija selektovanih za dužinu života, ili izloženih kalorijskoj restrikciji, plato u krivama mortaliteta počinje da se nazire. U empirijskom kontekstu, međutim, ovakvu ekstremnu razliku u Gompercovim parametrima niti je moguće naći u prirodnim populacijama, niti je moguće dobiti laboratorijskom selekcijom, čak i u slučaju kada je jedini cilj selekcionog režima bio da rezultira ekstremnom razlikom u ovim parametrima. Važno je naglasiti da nema ničeg pogrešnog u iskazu da između jedinki unutar populacije postoji varijabilnost u mnogim karakteristikama adaptivne vrednosti (uključujući i vitalnost) koje predstavljaju posledicu interakcije genetičke i sredinske varijabilnosti. Možemo se složiti i da ta varijabilnost dovodi do razlika u preživljavanju (i drugim komponentama životne istorije) između jedinki unutar populacije. U krajnjem slučaju, to upravo čini Vaupelovu teoriju intuitivno prihvatljivom. Međutim, eksperimentalne i matematičke analize pokazale su da celoživotna heterogenost zahteva ekstremne razlike u genetičkoj i sredinskoj varijabilnosti, a iste je nemoguće naći među živim sistemima (Rose *et al.*, 2007).

Alternativna teorija koja objašnjava pojavu nivelisanja krivih mortaliteta (pojavu platoa) u kasnim fazama razvića jeste **evolucionna teorija kasnog doba** (Mueller *et al.*, 2011). Oslanjajući se na savremenu evolucionu teoriju starenja, očekuje se da će nakon polnog sazrevanja, efekti prirodne selekcije postepeno opadati, dok će verovatnoća umiranja početi eksponencijalno da raste (Slika 1.1.1). Kraće rečeno, krive mortaliteta će pratiti obrazac intenziteta prirodne selekcije. Hamiltonova jednačina predviđa da će nakon završetka reproduktivne faze, u kasnoj fazi razvića, intenzitet selekcije ući u plato fazu kada su vrednosti intenziteta bliske nuli (Hamilton, 1966; Rose *et al.*, 2007). Bazična pretpostavka evolucionne teorije kasnog doba jeste da krive mortaliteta evoluiraju shodno obrascu jačine prirodne selekcije i da je uzrok pojave platoa u krivama mortaliteta zapravo dostizanje niskog platoa intenziteta selekcije (Mueller & Rose, 1996). Ako je navedena pretpostavka tačna, onda bi manipulacijom završetka reprodukcije, odnosno vremenom kada intenzitet selekcije dostiže najniže vrednosti, uticali na obrasce i trenutak dostizanja platoa (tzv. **prelomni dan**, od engl. *breakday*, Slika 1.1.1) u krivama mortaliteta. Prvo eksperimentalno testiranje ove hipoteze izvršili su Rouz i saradnici koristeći tri različita testa i dvadeset pet evoluciono nezavisnih populacija *D. melanogaster* koje imaju zajedničko poreklo, ali su više od 100 generacija bile pod selekcionim režimima koji su se razlikovali u poslednjem danu reprodukcije (Rose *et al.* 2002). U jednom od testova, selekциони režim za ranu reprodukciju (B populacija) dozvoljavao je uspešno ukrštanje do 14 dana starosti, dok je selekциони režim za kasnu reprodukciju (O populacija) dozvoljavao uspešno ukrštanje do 70 dana starosti. Analiza krivih mortaliteta B i O populacija, koje se međusobno razlikuju u 56 dana trajanja reprodukcije, pokazala je statistički značajnu razliku u vremenu dostizanja platoa, tj. u prelomnom danu. Rano reprodukujuće B populacije živele su ~ 30 dana kraće i ~ 35 dana ranije dostizale plato u krivama mortaliteta u odnosu na populacije selektovane za kasnu reprodukciju. Rezultati ove studije nedvosmisleno su potvrdili ispravnost evolucionne teorije kasnog doba.

Iako kritike evolucione teorije kasnog doba postoje (Charlesworth & Partridge, 1997; Pletcher & Curtsinger, 1998) i svakako očekuju detaljniju analizu na većem broju različitih vrsta, jedno je sigurno: evolucione biologe i gerontologe, pored boljeg razumevanja krajnjih (engl. *ultimate*) uzroka starenja, sada dodatno očekuje i istraživanje neposrednih (engl. *proximate*) uzroka, odnosno fizioloških mehanizama, koji se nalaze u osnovi usporavanja i zaustavljanja procesa starenja u kasnom uzrastu jedinki (Shahrestani *et al.*, 2012).

1.3 Fiziološke teorije starenja

Fiziološke teorije starenja možemo podeliti na stohastičke i sistemske (Arking, 2006). Prema **stohastičkim teorijama**, proces starenja nastaje usled postepene akumulacije slučajnih, intrinzičkih oštećenja molekula. Jedna od bazičnih stohastičkih teorija starenja, slobodno-radikalna teorija starenja (engl. *free radical theory of ageing*) (Harman, 1956), zasniva se na konceptu da proces starenja nastaje usled akumulacije nasumičnih oksidativnih oštećenja molekula, izazvanih delovanjem visoko reaktivnih vrsta molekulskog kiseonika (ROS od engl. *reactive oxygen species*). Nakon eksperimentalne potvrde da su mitohondrije mesto najveće produkcije ROS-ova, Harman je proširio svoju teoriju slobodnih radikala u **mitohondrijsku slobodno-radikalnu teoriju starenja** (MFRTA, od engl. *mitochondrial free radical theory of ageing*) (Harman, 1972).

Sve teorije po kojima kaskada međusobno povezanih signalnih puteva reguliše proces starenja, spadaju u grupu **sistemskih teorija starenja**. Važno je naglasiti da se sistemski mehanizmi ne oslanjaju ni na kakav genetički program starenja (Kirkwood & Melov, 2011). Oni regulišu dugovečnost u određenom opsegu, najčešće preko svoje uloge u metabolizmu i povratne sprege sa drugim signalnim putevima (pored sistemske, često se ova grupa naziva i metaboličkom), ali ne izazivaju sâm proces starenja. U signalne puteve koji imaju ulogu u procesu starenja, a na kojima se bazira grupa sistemskih teorija starenja, spadaju signalni putevi **IIS** (insulin/insulinu sličan faktor rasta 1; engl. *insulin/insulin-like growth factor 1*), **mTOR** (engl. *mechanistic target of rapamicin*) i **AMPK** (engl. *adenosine-monophosphate-activated protein kinase*), kao i **sirtuinska klasa proteina** sa deacetilaznom i riboziltransferaznom aktivnošću. Navedeni sistemski putevi imaju važnu ulogu u optimizaciji metabolizma ćelije sa

zahtevima životne sredine. Tačnije, putevi IIS (detektuje nivoe glukoze) i mTOR (detektuje nivoe aminokiselina) signaliziraju da postoji dovoljna količina nutrijenata u biološkom sistemu i aktiviraju anaboličke procese. Smanjenje aktivnosti IIS i mTOR puta povećava dužinu života, najverovatnije preko smanjenog ćelijskog rasta i intenziteta metabolizma (López-Otín *et al.*, 2013). S druge strane, AMPK put, koji se aktivira kada su nivoi AMP-a visoki, i sirtuini koji se aktiviraju u prisustvu visokih koncentracija NAD⁺, signaliziraju da se radi o niskom energetsom stanju biološkog sistema i aktiviraju kataboličke procese. Povećana aktivnost sirtuina i AMPK puta u vezi je sa povećanjem dugovečnosti (López-Otín *et al.*, 2013). Svi navedeni signalni putevi međusobno su zavisni, isprepleteni i učestvuju u finoj optimizaciji funkcionisanja mitohondrija (Houtkooper *et al.*, 2010). U nastavku, biće predstavljene hipoteze i savremena empirijska istraživanja koja ukazuju da su stohastički i sistemski mehanizmi blisko povezani, kao i da mitohondrije predstavljaju „regulatorni centar“ njihovih interakcija.

1.4 Mitohondrije

Sve eukariotske ćelije sadrže ili su nekada sadržale mitohondrije (Stojković & Tucić, 2012). Ova činjenica ukazuje na to da je pojava mitohondrija u ćeliji, pre oko dve milijarde godina, jedan od ključnih događaja u evoluciji eukariota (Williams *et al.*, 2013). Danas je opšteprihvaćeno da su preci mitohondrija bili srodnici savremenih alfa-proteobakterija. Iako se manje zna o prirodi ćelije-domaćina, najverovatnije je reč o srođnicima savremenih arheobakterija. Smatra se da je za tranziciju prokariota u eukariote zaslužna evolucija organela specijalizovanih isključivo za sintezu energije koje su obezbedile dovoljan energetske budžet za povećanje eukariotskog genoma i sintezu proteina, dovodeći do polarizacije eukariotske ćelije na energetske potrošača (jedro odgovorno za sintezu proteina) i energetske proizvođače (mitohondrije odgovorne za sintezu ATP) (Lane, 2011).

Kao i njihovi bakterijski srodnici, mitohondrije takođe poseduju genom (mtDNK), čija se replikacija obavlja nezavisno od replikacije jedarnog genoma i ćelijskog ciklusa. Evolucija velikog genoma eukariota istovremeno je vodila i evoluciji redukcije mitohondrijskog genoma, odnosno njegovom oslobađanju od sekvenci koje kodiraju proteine (sinteza proteina je energetske skup proces) i specijalizaciji za vršenje

oksidativne fosforilacije - procesa koji rezultira sintezom ATP-a. Pokazano je da se ovaj proces odvijao masovnim horizontalnim prenošenjem mitohondrijskih gena za proteine u jedarni genom. Sličnost u strukturama gena koji su ostali u mitohondrijama (i plastidima), kod filogenetski vrlo udaljenih grupa, ukazuje na to da je do transfera gena iz ovih organela došlo veoma davno. Postavlja se pitanje zašto nisu svi mitohondrijski geni prebačeni u jedro. Najviše pristalica ima tzv. CoRR (engl. *Co-location for Redox Regulation*) hipoteza prema kojoj su u mitohondrijama ostali samo geni za proteine čije funkcije u transferu elektrona zahtevaju brzu i direktnu redoks kontrolu njihove sinteze (Allen, 2003). Biofizičke analize su pokazale da u slučaju iznenadnih promena u dostupnosti supstrata, promena koncentracije kiseonika (ili redoks stanja uopšte) i zahteva za ATP-om, brzi lokalni odgovor membranskog potencijala i protok elektrona može biti omogućen samo ako se geni i ribozomi, neophodni za sintezu odgovarajućih proteina, nalaze u neposrednoj blizini bioenergetskih membrana.

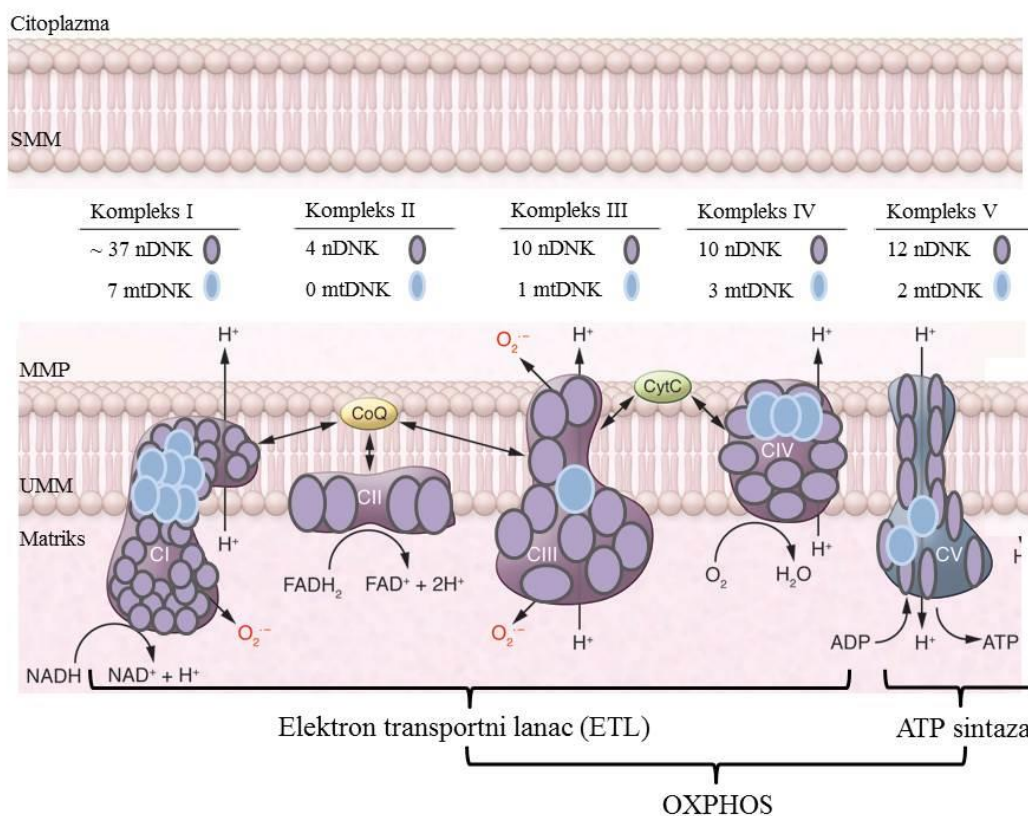
Mitohondrijski genom je haploidan, maternalno se nasleđuje (Birky, 1995) i skoro da ne podleže rekombinacijama (White *et al.*, 2008). Takođe, vrlo je konzervisan - kod svih složenih višćelijskih eukariota veličine je ~ 16 kb i sadrži svega 37 gena: (i) 13 gena čiji produkti sačinjavaju subjednice mitohondrijskih kompleksa I, III, IV i V koji učestvuju u procesu oksidativne fosforilacije, (ii) dva gena za rRNK (12S i 16S) i (iii) 22 gena za tRNK (Boore, 1999). Iako je mtDNK kičmenjaka prevashodno sačinjena od kodirajućih sekvenci, postoje i dva nekodirajuća elementa: (i) D petlja (engl. *D loop*) - sadrži promotore za oba lanca (teški i laki) mtDNK i mesto početka replikacije teškog lanca (ORL, engl. *origin of replication*), i (ii) kraći nekodirajući region (sadrži ORL lakog lanca). Komponente mitohondrijskog proteinskog kompleksa koji vrši oksidativnu fosforilaciju, kao i translacionog sistema, kodirani su genima koji se nalaze u oba genoma - i mitohondrijskom i jedarnom. Još oko 1500 jedarnih gena uključeno je u različite procese neophodne za normalno funkcionisanje mitohondrije (npr. replikacija, transkripcija, apoptoza) (Ryan & Hoogenraad, 2007).

Mitohondrijski matriks i mtDNK obavijeni su dvostrukom membranom. Spoljašnja (SMM) i unutrašnja mitohondrijska membrana (UMM) su funkcionalno različite, a između njih se nalazi međumembranski prostor (MMP). SMM je visoko propustljiva membrana za molekule do 5kDa, dok je za prolazak većih neophodno

funkcionisanje TOM kompleksa (engl. *translocase of outer membrane*). UMM predstavlja visoko specijalizovanu lipidnu membranu koja smanjuje propustljivost jona i molekula (Daum, 1985). Veliki udeo u strukturi UMM imaju proteini - od onih koji omogućavaju transport neophodnih jedinjenja unutar/izvan mitohondrijskog matriksa (TIM kompleks; engl. *translocase of inner membrane*) do kompleksa koji učestvuju u procesu oksidativne fosforilacije i sintezi ATP-a. Jedna od specifičnosti UMM jeste da u njen sastav ulazi lipid kardiolipin koji je neophodan za optimalno funkcionisanje enzima koji učestvuju u procesu oksidativne fosforilacije (Paradies *et al.*, 2010). Značajni metabolički putevi kao što su β -oksidacija masnih kiselina i Krebsov ciklus (ciklus trikarboksilnih kiselina) odvijaju se u mitohondrijskom matriksu. Dodatno, mitohondrije učestvuju u održavanju homeostaze kalcijuma, biosintezi hema i Fe-S klastera, regulaciji ćelijske smrti i kontroli ćelijskog ciklusa.

1.4.1 Elektron transportni lanac i oksidativna fosforilacija

Prethodno opisane strukturne osobine mitohondrija imaju važnu ulogu u omogućavanju jedne od najvažnijih funkcija ove organele - sinteze ATP-a. UMM formira invaginacije, *cristae* (lat. petlova kresta), u kojima su smešteni **elektron transportni lanac - ETL** i **ATP-sintaza** koji zajedno čine **sistem za oksidativnu fosforilaciju - OXPHOS** (engl. *oxidative phosphorylation system*, Slika 1.4.1.1). ETL se sastoji od četiri kompleksa (I-IV) koji omogućavaju transfer elektrona sa donora (NADH i FADH₂) do krajnjeg akceptora - molekula kiseonika (O₂), koji se redukuje u H₂O. Donore elektrona predstavljaju proizvodi i učesnici glikolize, Krebsovog ciklusa i β -oksidacije masnih kiselina. Kod kompleksa I, III i IV, proces transporta elektrona spregnut je sa pumpanjem protona (H⁺) iz matriksa u međumembranski prostor. Naime, razlika u redoks potencijalima pomenutih kompleksa omogućava prenos elektrona, reakcije su egzogene i obezbeđuju slobodnu energiju neophodnu za pumpanje H⁺ u MMP (Slika 1.4.1.1). S obzirom na to da je UMM nepropusna za protone, dolazi do polarizacije (stvaranje „+“ naelektrisanja unutar međumembranskog prostora i „-“ naelektrisanja sa strane matriksa) i formiranja elektrohemijskog membranskog potencijala. Energiju elektrohemijskog potencijala koristi ATP sintaza prilikom endogene sinteze molekula ATP-a. OXPHOS je sastavljen od ~ 80 subjedinica, od kojih je 13 kodirano sa mitohondrijskog genoma (Slika 1.4.1.1; Boore 1999).



Slika 1.4.1.1 Shematski prikaz enzimskog kompleksa koji vrši oksidativnu fosforilaciju (OXPHOS) i produkciju mROS-ova. ATP se sintetise procesom oksidativne fosforilacije koju obavljaju četiri kompleksa elektron transportnog lanca (ETL, kompleks CI-IV) i ATP sintaza (kompleks V) koji su uronjeni u unutrašnju mitohondrijsku membranu (UMM). Energija koja se oslobađa prilikom transporta elektrona sa NADH i FAH₂ do O₂ koristi se za pumpanje protona (H⁺) pomoću CI, CIII i CIV u međumembranski prostor (MMP). Protonski gradijent koji tom prilikom nastaje koristi ATP sintaza za sintezu ATP-a, pri čemu se protoni transportuju nazad u matriks mitohondrije. Iznad svakog kompleksa nalazi se tabelarni prikaz broja subjedinica od kojih je sastavljen, kao i njihovo genomsko poreklo (nDNK - ljubičasto, mtDNK – svetlo plavo). mROS-ovi nastaju kao slučajni nusproizvod OXPHOS procesa. Superoksid anjon radikal (O₂^{•-}) najčešće nastaje „curenjem“ elektrona sa CI i CIII. CoQ – ubihinon, CytC – citohrom c, SMM - spoljašnja membrana. Preuzeto i modifikovano od Bratic & Larsson, 2013.

Najveći proteinski kompleks ETL-a je **kompleks I** (tj. **NADH dehidrogenaza**) koji je kod sisara sastavljen je od ~ 44 subjedinica (14 centralnih i ~ 30 pomoćnih). Ovaj kompleks L-oblika može se podeliti na transmembranski i periferni deo. U sastavu perifernog dela nalazi se sedam centralnih subjedinica kodiranih sa jedarnog genoma. One sadrže sve redoks centre i transportuju elektrone. Preostalih sedam centralnih subjedinica kodiranih sa mitohondrijskog genoma se nalazi u transmembranskom delu, i učestvuju u transportu H^+ (Brandt, 2006). S druge strane, **kompleks II** (tj. **sukcinat dehidrogenaza**) predstavlja najmanji kompleks ETL. On direktno povezuje Krebsov ciklus i oksidativnu fosforilaciju. Kompleks je sastavljen od četiri subjedinice kodirane isključivo sa jedarnog genoma i sadrži kovalentno vezane FAD i Fe-S klaster (Scheffler, 2008). Dva najveća peptida čine periferni deo kompleksa i odgovorna su za vršenje funkcije sukcinat dehidrogenaze, dok preostala dva služe da pozicioniraju kompleks unutar membrane. Elektroni se provode preko kompleksa I i II do kompleksa III preko liposolubilnog benzohinona **koenzima Q₁₀** (**CoQ**, **ubihinon/ubihinol** u zavisnosti od toga da li je redukovano/oksidovano). Više od 70 % koenzima Q₁₀ nije vezano za proteine i nalazi se u slobodnom stanju u UMM (Lass & Sohal, 1999). Pored kompleksa I i II, UMM sadrži još nekoliko enzima (poput G3F- (od glicerol-3-fosfat) i ETF- (od elektron transportujući flavoprotein) dehidrogenaze) koji u manjem obimu uvode elektrone u ETL preko ubihinona (Lenaz *et al.*, 2007). G3F-dehidrogenaza vrši oksidaciju G3F-a do dihidroaceton fosfata (DHF) uz istovremenu redukciju FAD do FADH₂ i transfer elektrona do CoQ. Preko ovog procesa G3F-dehidrogenaza predstavlja mesto povezivanja procesa glikolize, sinteze masnih kiselina i oksidativne fosforilacije (Mráček *et al.*, 2013). ETF-dehidrogenaza učestvuje u β oksidaciji i prenosi elektrone sa FADH na CoQ i dalje na kompleks III, zaobilazeći kompleks I (Guarente, 2008). **Kompleks III** (tj. **citohrom bc₁**) provodi elektrone sa redukovanog CoQ₁₀ na citohrom c. Svi do danas opisani citohrom bc₁ kompleksi sastavljeni su od najmanje tri subjedinice: citohroma b, citohroma c₁ i Rieskovog Fe-S proteina (ISP) (Scheffler, 2008). Govedi citohrom bc₁ kompleks, pored ove tri osnovne, sadrži još 8 pomoćnih subjedinica koje formiraju protomer koji dimerizuje. Jedina subjedinica ovog kompleksa kodirana sa mitohondrijskog genoma je citohrom b. **Citohrom c** (**Cyt c**), membranski protein koji se nalazi sa spoljašnje strane UMM-a, povezuje kompleks III i IV učestvuju u provođenju elektrona između njih. **Kompleks IV** (tj. **citohrom c**

oksidaza, COX) predstavlja poslednji enzim u ETL. On redukuje O_2 u H_2O transportom pojedinačnih elektrona sa četiri molekula citohroma c, istovremeno pumpajući četiri H^+ u međumembranski prostor (Navarro & Boveris, 2007). COX se kod eukariota sastoji od 8-13 subjedinica od kojih su tri najveće i najhidrofobnije subjedinice (I, II, i III) kodirane mitohondrijskim genima i formiraju katalitički centar enzima. Dugo se smatralo da su kompleksi respiratornog lanca mobilni, međutim razvoj finih metoda razdvajanja komponenti unutrašnje mitohondrijske membrane (npr. BN PAGE od engl. *Blue Native Polyacrylamid Gel Electrophoresis*) pokazao je da su kod mnogih organizama kompleksi I, III i IV udruženi u **superkomplekse** (Dudkina *et al.*, 2010). Smatra se da udruživanje omogućava efikasniji protok elektrona usled smanjenja razdaljine između koenzima Q_{10} , citohroma c i kompleksa ETL (Heinemeyer *et al.*, 2007). Zbog svoje važne uloge u Krevsovom ciklusu, kompleks II skoro nikad ne učestvuje u formiranju superkompleksa (Dudkina *et al.*, 2010).

Protoni se iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrije vraćaju putem F_0 jedinice ATP sintaze, u smeru gradijenta koncentracije protona nastalog tokom transporta elektrona u ETL (Voet & Voet, 2011). Tom prilikom **ATP sintaza** (tj. **F_1F_0 -ATPaza ili kompleks V**) posredstvom jedinice F_1 prevodi mehaničku silu, nastalu protokom protona kroz jedinicu F_0 , u hemijsku energiju fosfoanhidridne veze ADP i P_i . F_0 jedinica predstavlja hidrofobni transmembranski protein sastavljen od 8 različitih subjedinica (samo 3 kod *E. coli*) koji formira protonski transportni kanal. F_1 jedinica je hidrofilni, periferni membranski protein uronjen u matriks i sastavljena je od 5 različitih subjedinica. Jedinica F_0 ATP sintaze *E. coli* sastoji se od tri transmembranske subjedinice *a*, *b* i *c* koje čine *ab2cn* kompleks. Određeni broj (*n*) subjedinica *c* formira hidrofobni prsten udružen sa transmembranskim *ab2* subjedinicama. Mitohondrijska F_1 jedinica predstavlja $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon$ nonamer. Subjedinice γ , δ i ϵ povezuju $\alpha\beta\beta_3$ deo F_1 sa F_0 jedinicom. Subjedinice α i β ciklično su raspoređene kao kriške narandže na vrhu dugačke γ subjedinice. Razlikujemo tri konformaciona stanja β subjedinice: βTP (vezuje ATP), βDP (vezuje ADP) i βE (engl. *empty*, oslobađa ATP). Konformacija $\alpha\beta DP$ formira prostor za ADP i P_i , u konformaciji $\alpha\beta TP$ formira se ATP, koji se potom oslobađa u matriks prelaskom u $\alpha\beta E$. Jednim punim okretom $\gamma\epsilon$ -nc rotora sintetišu se 3 ATP, odnosno 1 ATP na svakih 3-4 H^+ (Voet & Voet, 2011).

1.4.2 Mitohondrijske reaktivne vrste molekulskog kiseonika (mROS)

Reaktivne vrste molekulskog kiseonika (ROS-ovi) predstavljaju slobodne radikale koji efikasno vrše oksidaciju makromolekula (lipida, nukleinskih kiselina i proteina) i na taj način ih oštećuju. U ROS-ove spadaju superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$), vodonik peroksid (H_2O_2) i hidroksidni anjon ($\cdot OH$). Iako je poznat veliki broj enzima unutar ćelije koji učestvuje u njihovoj produkciji (npr. ciklooksigenaze, familija NADPH oksidaza), mesto najveće sinteze ROS-ova kod eukariota predstavlja mitohondrijski elektron transportni lanac (Balaban *et al.*, 2005; Murphy, 2009). Otuda se reaktivne vrste molekulskog kiseonika nastale funkcijom ETL označavaju kao mROS-ovi.

Superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$, poluživot na $37^\circ C$ iznosi 1×10^{-6} s) nastaje redukcijom jednog elektrona sa molekula kiseonika (O_2) usled neefikasnog transporta elektrona kroz ETL (Slika 1.4.1.1). Unutar mitohondrija postoji osam najverovatnijih mesta nastanka superoksida (Brand, 2010). Od navedenog broja, samo se sa mesta IIIQo (deo kompleksa III) i glicerol-3-fosfatne dehidrogenaze, superoksidi oslobađaju u međumembranski prostor i dalje u citoplazmu, dok se sa svih ostalih mesta oslobađaju isključivo u mitohondrijski matriks. Superoksid se konvertuje u **vodonik peroksid** (H_2O_2) delovanjem enzima superoksid dismutaze (SOD). Redukcijom H_2O_2 nastaju vrlo reaktivni **hidroksidni radikali** ($\cdot OH$, poluživot na $37^\circ C$ iznosi 1×10^{-9} s) koji vrše oksidaciju lipida, proteina i DNK. Procene su da, u fiziološkim uslovima bazalnog metabolizma mitohondrija, od ukupne količine utrošenog kiseonika u mROS-ove prelazi $\sim 0,2\%$ (St-Pierre *et al.*, 2002).

Regulacija koncentracije mROS-ova obavlja se antioksidativnim enzimima i neenzimskim antioksidantima. U **antioksidativne enzime** spadaju pomenute superoksid dismutaze (SOD) koje prevode superoksid anjon radikal ($O_2^{\cdot-}$) u vodonik peroksid (H_2O_2). Unutar citoplazme i međumembranskog prostora citoplazme nalazi se Cu/ZnSOD, dok je MnSOD lokalizovana u mitohondrijskom matriksu. Peroksiredoksini (PRx), glutation peroksidaze (GPx) i katalaze prevode H_2O_2 u vodu. Peroksiredoksini poseduju najviši afinitet ka H_2O_2 i nalaze se u najvećoj koncentraciji u ćeliji, dok najniži afinitet ka H_2O_2 imaju katalaze, lokalizovane isključivo u peroksizomima. U **neenzimske antioksidante** spadaju α -tokoferol (vitamin E), askorbinska kiselina

(vitamin C) i glutation. Uprkos aktivnosti enzimskih i neenzimskih antioksidanata, nije moguće u potpunosti izbeći oksidativna oštećenja. Važnu ulogu u ispravljanju oksidativnih oštećenja imaju metionin sulfoksid reduktaze, dok u uklanjanju oštećenih molekula učestvuju proteini toplotnog stresa (HSP engl. *heat shock proteins*) (Costantini, 2014). HSP-ovi predstavljaju šaperone koji se vezuju za denaturisane proteine i eliminišu ih, sprečavajući njihovu agregaciju. **Oksidativni stres** predstavlja narušeni balans između produkcije ROS-ova sa jedne strane, i eliminacije ROS-ova i reparacije oksidativnih oštećenja makromolekula, sa druge.

1.5 Mitohondrijska teorija starenja (MFRTA)

Prema **mitohondrijskoj teoriji starenja (MFRTA)** primarni uzrok procesa starenja predstavljaju reaktivne vrste molekulskog kiseonika koje nastaju kao slučajni nusproizvod procesa oksidativne fosforilacije unutar mitohondrija i koje dovode do oksidativnih oštećenja ćelijskih makromolekula (Harman, 1972). Osnovna pretpostavka MFRTA podrazumeva da kumulativna oštećenja mitohondrijskih lipida, proteina, a posebno njene DNK, vremenom smanjuju efikasnost transporta elektrona kroz ETL i procesa oksidativne fosforilacije, dovode do „curenja“ elektrona i povećavaju produkciju mROS-ova. Na ovaj način, formira se jedan neprestani, spiralni proces (engl. *vicious cycle*) u kome mROS-ovi oštećujući mitohondrijski ETL povećavaju sopstvenu produkciju. Opisani teorijski okvir podržan je eksperimentima koji su pokazali negativnu korelaciju između koncentracije mROS-ova i dugovečnosti (Lambert *et al.*, 2007), povećavanje nivoa mROS-ova i količine oksidativnih oštećenja tokom hronološkog starenja (Muller *et al.*, 2007), kao i da se inhibicijom mitohondrijske funkcije povećava sinteza mROS-ova (Turrens, 2003). U saglasnosti sa MFRTA jesu i eksperimentalni podaci na mutantima vinskih mušica kod kojih delecija gena za mitohondrijsku i citoplazmatičnu SOD za rezultat ima smanjenu dugovečnost (Duttaroy *et al.*, 2003), dok je trend povećanja dužine života uočen kod mutanata sa pojačanom ekspresijom Cu/ZnSOD i MnSOD gena (Sun & Tower, 1999). Ujedno, pokazano je da linije *Drosophila* selektovane za dug život produkuju manje količine reaktivnih vrsta kiseonika u odnosu na kontrolne linije, kao i da kod obe linije produkcija mROS-ova raste sa hronološkim starenjem i spregnuta je sa opadanjem funkcionalnosti ETL (Ross, 2000).

Teorijski okvir mitohondrijske teorije starenja značajno je uzdrman pojavom radova koji ukazuju na značajna odstupanja od pretpostavki MFRTA. Kod nematode *C. elegans*, mutacije u subjedinicama mitohondrijskog ETL dovode do povećane sinteze superoksid anjona, ali i do značajnog produženja dužine života (Yang & Hekimi, 2010b). Pokazano je da je efekat produženja dužine života kod mutanata moguće anulirati tretiranjem neenzimskim antioksidansima (Yang & Hekimi, 2010a) ili fenokopirati tretiranjem kontrolnih linija niskim koncentracijama sintetičkih induktora oksidativnog stresa (npr. parakvat) (Lee *et al.*, 2010). Dodatno, inaktivacijom gena za mitohondrijsku SOD kod nematoda, povećava se količina oksidativnih oštećenja, ali i dužina života mutanata (Doonan *et al.*, 2008; Van Raamsdonk & Hekimi, 2009). Vrlo sličan efekat javlja se usled inaktivacije jedne kopije gena za mitohondrijsku SOD2 i GPx kod miševa, što rezultira povećanjem oksidativnog stresa, međutim bez promene dužine života u odnosu na kontrolne linije (Zhang *et al.*, 2009). Takođe, kod miševa sa povećanom antioksidativnom zaštitom ne dolazi do promene u dužini života (Pérez *et al.*, 2009). Najveće odstupanje od MFRTA, posebno od mROS-spiralnog puta, predstavljaju rezultati eksperimenata na miševima koji imaju mutaciju u genu za katalitičku subjedinicu mitohondrijske DNK polimeraze PolG koja vrši replikaciju mtDNK (Trifunovic *et al.*, 2004; Kujoth *et al.*, 2005). Navedena mutacija kod mutator miševa uzrokuje intenzivnu akumulaciju mutacija unutar mtDNK, supstituciju aminokiselina unutar subjedinica ETL i nestabilnost ETL superkompleksa. Kuriozitet je da, iako dolazi do preuranjenog otpočinjanja procesa starenja kod PolG mutator miševa, izostaje povećanje sinteze mROS-ova i količine oksidativnih oštećenja (Trifunovic *et al.*, 2005). Zanimljivo je da komparativne studije često ne ukazuju na negativnu korelaciju između produkcije mROS-ova, odnosno oksidativnih oštećenja, i dugovečnosti (Perez-Campo *et al.*, 1998; Brunet-Rossinni & Austad, 2004; Pamplona *et al.*, 2006). U tom kontekstu, zanimljivi su eksperimentalni podaci na pustinjskom kućetu (engl. *naked mole-rat*; *Heterocephalus glaber*) koje žive 8 puta duže od laboratorijskih miševa. Ono što je u suprotnosti sa pretpostavkama MFRTA jeste da *H. glaber*, u poređenju sa miševima, produkuje značajno više mROS-ova (Labinsky *et al.*, 2006), odnosno ima veću količinu oksidativnih oštećenja (Andziak *et al.*, 2006). Dodatno, *H. glaber* imaju približno istu aktivnost katalaze, neznatno višu aktivnost Cu/ZnSOD, i čak 70 puta nižu aktivnost glutacion peroksidaze (Andziak *et al.*, 2005).

1.6 Svi putevi vode u mitohondriju, a neki i iz nje - uloga mROS-ova u signalnoj transdukciji

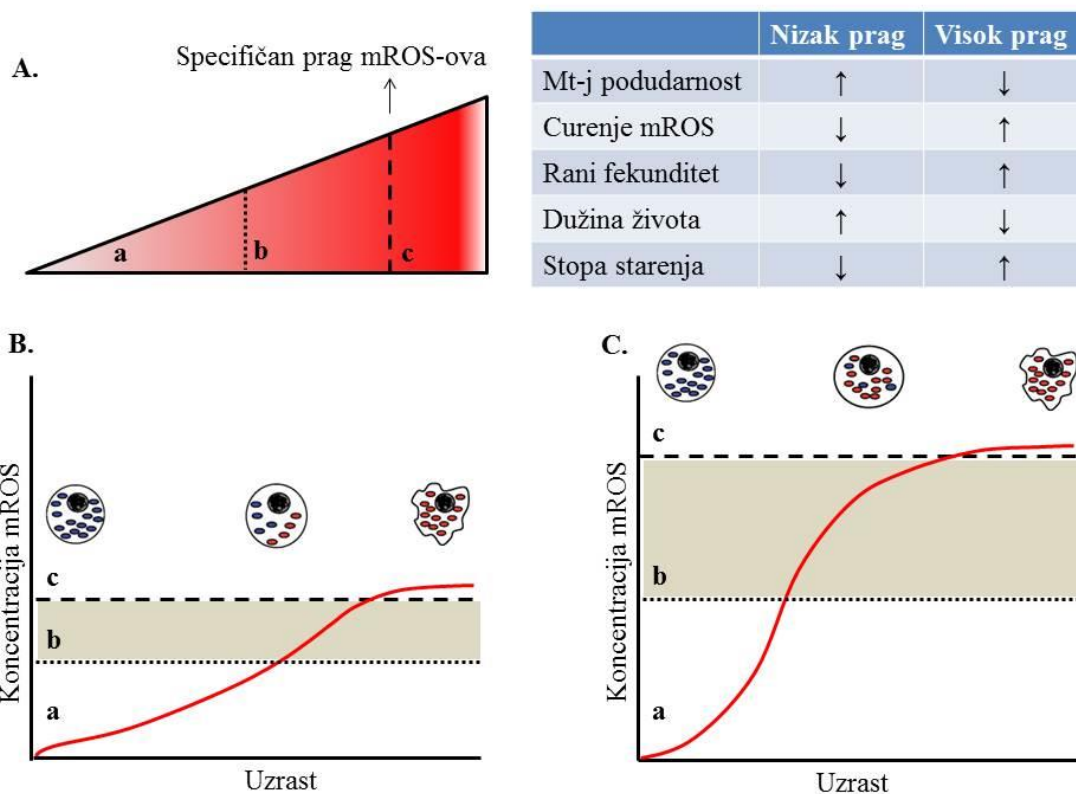
Imajući u vidu navedene izuzetke od dogmatske pretpostavke mitohondrijske slobodno-radikalske teorije, može se zaključiti da toksičnost mROS-ova predstavlja samo jedan aspekt njihove funkcije u ćeliji (Sena & Chandel, 2012). Naime, dualna priroda reaktivnih vrsta kiseonika ogleda se u tome što pored izazivanja oksidativnih oštećenja oni mogu, zavisno od koncentracije, igrati ulogu sekundarnih glasnika - malih, unutarćelijskih signalnih molekula koji učestvuju u ćelijskoj transdukciji signala aktivirajući i regrutujući signalne enzime (Veal *et al.*, 2007; Groeger *et al.*, 2009; Lushchak, 2011). Kao sekundarni glasnici, mROS-ovi oksiduju cisteinske sulfhidril grupe menjajući protein-protein interakcije, DNK-vezujuću aktivnost transkripcionih faktora i katalitičku aktivnost enzima. Ove osobine omogućavaju mROS-ovima da učestvuju u **retrogradnom odgovoru**, odnosno u regulaciji ekspresije jedarnih gena signalima iz organela (Liu & Butow, 2006). Primera radi, mROS-ovi interaguju sa MAPK i JNK fosfatazama (Kamata *et al.*, 2005) koje učestvuju u ERK, JNK i MAPK kaskadama signala, modifikujući aktivnost transkripcionih faktora poput NF-kB, AP-1, Nrf2, FOXO, HIF-1 α i p53 (Hamanaka & Chandel, 2010; Quirós *et al.*, 2016). Ovi transkripcioni faktori funkcionišu unutar jedra i aktiviraju se u odgovoru na stres, odnosno od izuzetnog su značaja za procese preživljavanja, proliferacije i diferencijacije ćelija. Sledeći primer je aktivacija familije faktora indukovanih hipoksijom (HIF od engl. *hypoxia inducible factors*) usled povećanja koncentracije mROS-ova koji nastaju u uslovima smanjenja koncentracije O₂ unutar ćelija na 0,3 - 3 %. Ova familija transkripcionih faktora ima važnu ulogu u metabolizmu i razviću (Semenza, 2012). Uloga HIF-a u adaptivnom odgovoru na hipoksiju ogleda se u daljoj aktivaciji signalne transdukcije koja dovodi do istovremenog povećanja zaliha i smanjenja potrošnje O₂, najčešće prelaskom sa oksidativnog na glikolitički metabolizam. Pored toga, pokazano je da mROS-ovi učestvuju i u regulaciji jedarnog epigenoma, delujući na proces DNK metilacije (O'Hagan *et al.*, 2011). Učestvovanje mROS-ova u **anterogradnim signalnim putevima** (iz jedra ka organelama) odvija se kroz interakciju sa metaboličkim signalnim putevima koji imaju važnu ulogu u starenju (Sena & Chandel, 2012). Na primer, inhibicijom TOR puta kod kvasca povećavaju se nivoi mROS-ova i produžava dugovečnost organizma (Pan *et al.*, 2011). Isti efekat uočen je kada se kod

mutanta *C. elegans* *daf-2* inhibira IIS put (Zarse *et al.*, 2012). Navedeni podaci vrlo su značajni u kontekstu postojanja dvosmerne komunikacije između dva genoma. Interesantan je podatak da su i aktivnosti antioksidativnih enzima (PRx, GPx i katalaze) regulisane fosfatazama i kinazama koje su takođe podložne oksidativnim modifikacijama od strane mROS-ova (Cadenas & Packer, 2010).

Dakle, reč je o jednoj kompleksnoj regulatornoj mreži u kojoj mROS-ovi, kao sekundarni glasnici, imaju važnu ulogu u alarmiranju ćelije o endogenom i egzogenom stresu, i u omogućavanju da se adekvatno odgovori na promenu (Finkel, 2012). Smatra se da navedena kompleksna regulatorna mreža predstavlja molekulsku osnovu procesa **mitohormeze** (Yun & Finkel, 2014). Nalik procesu hormeze, u kome blagi toksični tretmani aktiviraju blagotvorne, kompenzacione odgovore koji dovode do popravke oštećenja i poboljšanja adaptivne vrednosti organizma u odnosu na netretiranu kontrolnu grupu organizama, mitohormeza je bazirana na konceptu da oksidativna oštećenja i energetska destabilizacija usled delimičnog narušavanja funkcije OXPHOS-a poboljšava ukupni status ćelije aktivacijom kompenzacionih odgovora. Eksperimentalnu potvrdu procesa mitohormeze predstavljaju rezultati po kojima niske koncentracije metformina i rezveratrola, inhibitora OXPHOS-a, dovode do poboljšane adaptivne vrednosti organizma i produženja života aktivacijom AMPK puta, glavnog modulatora antioksidativne zaštite - NRF2, aktivatora sirtuina SIRT1 i PGC-1 α (Onken & Driscoll, 2010; Anisimov *et al.*, 2011; Minor *et al.*, 2011). Dodatno, značajna uloga mROS-ova u mitohormetičkom odgovoru potvrđena je kod *C. elegans* i *Drosophila* sp. (Xie & Roy, 2012; Owusu-Ansah *et al.*, 2013).

1.7 Koncept postepenog odgovora na mROS

Oba aspekta funkcionisanja mROS-ova (mitohormeza kao pozitivni i izazivanje oksidativnih oštećenja kao negativni) mogu se obujmiti teorijskim konceptom **postepenog odgovora na mROS** (Slika 1.7.1A, engl. *gradual ROS response*) (Hekimi *et al.*, 2011). Naime, bazalne koncentracije mROS-ova neophodne su za održavanje ćelijske homeostaze, diferencijacije i proliferacije. Oksidativni stres je stanje u kojem se postepeno povećava koncentracija mROS-ova, što ujedno predstavlja signal da oksidativna fosforilacija ne funkcioniše pravilno. mROS retrogradna signalizacija omogućava aktivaciju adaptivnih, kompenzacionih signalnih puteva i mehanizama koji vrše optimizaciju respiracije (kompenzacioni odgovor). Kako hronološko starenje odmiče, ćelijski stres i oksidativna oštećenja se povećavaju, povećavajući koncentracije mROS-ova. Prelaskom **species-specifičnog praga koncentracije mROS-ova**, oni preuzimaju ulogu u oksidativnim oštećenjima molekula i spiralnom ciklusu mROS-ova, aktivirajući signalne puteve i mehanizame koji indukuju proces apoptoze i ćelijske smrti. Navedeni teorijski model nam omogućava da razumemo pomenute, naizgled kontraintuitivne, rezultate poput povećanja dugovečnosti, odnosno smanjenja oksidativnih oštećenja kod mutanata sa povećanim nivoima mROS-ova (Lapointe *et al.*, 2009; Yang & Hekimi, 2010b). Prema konceptu postepenog odgovora na mROS, navedene mutacije povećavaju sintezu mROS-ova, aktiviraju kompenzacione mehanizme koji usporavaju starenje i odlažu dostizanje specifičnog praga koncentracije mROS-ova, odnosno aktiviranje procesa apoptoze. Ujedno, navedeni teorijski koncept pomaže nam i da razumemo zašto prekomerna ekspresija antioksidativnih enzima ne dovodi do očekivanog povećanja dužine života, dok je u nekim slučajevima čak i smanjuje (Lapointe & Hekimi, 2008; Gutteridge & Halliwell, 2010). Imajući u vidu da mROS-ovi imaju ulogu u očuvanju ćelijske homeostaze, povećanje antioksidativne zaštite eliminacijom mROS-ova maskira postojanje „problema“ u ćeliji, blokira aktivaciju kompenzacionih odgovora i umanjuje ukupnu adaptivnu vrednost organizma.



Slika 1.7.1. Shematski prikaz teorijskog modela postepenog odgovora na mROS i posledica različitih visina specifičnog praga mROS-ova. **A.** Gradijent koncentracije mROS-ova. **a** - bazalne koncentracije mROS-ova neophodne za normalno funkcionisanje ćelije, **b** - koncentracije mROS-ova koje se nalaze ispod praga apoptoze i aktiviraju kompenzacione mehanizme zaštite, **c** - koncentracije mROS-ova koje prelaze specifičan prag i aktiviraju proces apoptoze. **B.** Niži prag mROS-ova uslovljava precizno funkcionisanje ETL i veću dužinu života (pogledati tabelu). **C.** Visok prag mROS-ova tolerantan je na mito-jedarnu nepodudarnost, ali nauštrb dužine života (pogledati tabelu). Mt-j - mito-jedarna podudarnost. Prema Lejn (2011).

Teorijska razmatranja ukazuju na to da specifični prag mROS-ova ima centralno mesto u evoluciji starenja i dugovečnosti (Lane, 2011). Imajući u vidu da je sinteza mROS-ova spregnuta sa kvalitetom mito-jedarnih interakcija, mitohondrijskom sintezom ATP-a i metaboličkim signalnim putevima, kod vrsta čija strategija osobina životne istorije zahteva veliko i/ili rano ulaganje u reprodukciju i fekunditet (ekološka r strategija), odnosno povećanu sintezu mROS-ova, evolucija bi išla u smeru visokog praga mROS-ova (Slika 1.7.1C). Ujedno, visok prag bi značio tolerisanje veće mito-jedarne nepodudarnosti, veću akumulaciju mtDNK mutacija i heteroplazmiju, što bi za rezultat dalo kraću dužinu života, veću adaptabilnost i širi opseg koncentracija mROS-ova koje mogu da iniciraju proces mitohormeze (Slika 1.7.1C). Nizak prag mROS-ova evoluirao bi kod vrsta koje duže žive i imaju malo i/ili odloženo ulaganje u reprodukciju i fekunditet (ekološka K strategija) (Slika 1.7.1B). Niži prag dirigovao bi preciznu mito-jedarnu koadaptaciju (svako veće curenje mROS-ova aktiviralo bi proces apoptoze), sa vrlo uskim opsegom koncentracija mROS-ova koje bi mogle da iniciraju mitohormezu, dok bi, sa druge strane, stopa akumulacije mtDNK mutacija bila niska, praćena povećanjem dužine života (Slika 1.7.1B). U tom kontekstu, interesantno je, ali očekivano, da se proces mitohormeze češće eksprimira kod kratkoživećih nego kod dugoživećih eksperimentalnih populacija (Kuether & Arking, 1999). Značaj Lejnovog modela ogleda se u mogućnosti da se objasni na koji način mitohondrije i mROS-ovi, preko specifičnog praga mROS-ova, učestvuju u evolucionoj optimizaciji uzajamnih ograničenja osobina životne istorije u ranom i kasnom uzrastu (antagonistička plejotropija), odnosno dugovečnosti i reprodukcije (jednokratna soma) (Dowling & Simmons, 2009; Ballard & Pichaud, 2014). Prednosti višeg praga mROS-ova u ranom uzrastu uzimale bi svoj danak u kasnijem uzrastu, dok bi smanjenje ulaganja u reprodukciju u ranom uzrastu i produžena dužina života bili uslovljeni niskim pragom mROS-ova. Konačno, Lejnov model implicira i da je visina optimalnog praga mROS-ova oblikovana selekcijom za specifičnu životnu strategiju.

1.8 Od krunskog svedoka do glavnog osumnjičenog - oblikovanje varijabilnosti mtDNK evolucionim procesima

Mitohondrijski genom se decenijama koristi kao marker izbora u populaciono-genetičkim i filogenetskim analizama. Ovu popularnost duguje osobinama kao što su uniparentalno nasleđivanje (preko majke), izostanak rekombinacija i visoka stopa mutacija. Naime, ekskluzivno maternalna transmisija genoma podrazumeva umanjenu efektivnu veličinu populacije (N_e) četiri puta u odnosu na jedarni genom, čime se stvaraju uslovi za povećanje uticaja genetičkog drifta i smanjenja efikasnosti selekcije u favorizovanju adaptivnih mutacija. Ujedno, imajući u vidu da učestvuje u procesima apsolutno neophodnim za funkcionisanje ćelije, svaka štetna mutacija biće efikasno eliminisana (Stewart *et al.*, 2008a; b). Dakle, pretpostavka je da će se tokom evolucije akumulirati pretežno neutralne mutacije, odnosno da bi uočena genetička varijabilnost mitohondrijskog genofonda jedne populacije morala biti - neutralna. Pretpostavka o selektivnoj neutralnosti transgeneracijskih promena mtDNK promovisala je ovaj genom kao idealnog svedoka evolucionih istorija populacija (Galtier *et al.*, 2009). Brojni populaciono-genetički modeli, upravo zbog pretpostavljene neutralnosti i posledične konstantne stope nukleotidnih supstitucija, koriste analizu mitohondrijske DNK za odgovore na brojna evolucionna pitanja, kao što su pitanja migracija, filogeografije ili vremena divergencije populacija/vrsta organizama (koncept molekuskog sata).

Iz neutralne teorije mitohondrijskog genoma sledi pretpostavka da postoji pozitivna korelacija između genetičke varijabilnosti unutar populacija i N_e (Gillespie, 1999). Naime, pošto je uticaj genetičkog drifta kod populacija sa velikom N_e umanjen, očekivano je da se u njima zadržava više novih alela nego u populacijama sa malom N_e . Eksperimentalna provera ovog očekivanja pokazala je da se varijabilnost mtDNK između taksona sa različitom N_e - ne menja. Ovaj neočekivan rezultat autori su pripisali delovanju prirodne selekcije na mtDNK (Bazin *et al.*, 2006). Ako pozitivna selekcija deluje na varijabilnost mtDNK, onda bi mitohondrijske genetičke varijante morale imati značajan fenotipski efekat, odnosno nisu neutralne. Danas je u velikom broju studija eksperimentalno potvrđena veza između mitohondrijskog genotipa i fenotipa organizma (Rand *et al.*, 2001; Dowling *et al.*, 2008; Ballard & Pichaud, 2014). Na promenu evolucione „mitohondrijske paradigme“ - od neutralnosti do značajnih efekata selekcije

u oblikovanju mtDNK svake biološke vrste i populacije, uticale su i empirijske potvrde povezanosti između specifičnih mtDNK haplotipova i fekunditeta, odnosno dugovečnosti (Ballard & Melvin, 2010). Pitanje koje se logično nameće jeste: Na koji način selekcija održava varijabilnost mtDNK unutar populacija?

Jedan od važnih molekulskih fenomena preko kojih selekcija deluje na održavanje varijabilnosti u mtDNK jeste epistatička interakcija između mitohondrijskih i jedarnih gena (**selekcija za međugenomsku podudarnost, od engl. *selection for genomic match*; M × N interakcija**). Naime, da bi funkcionisanje mitohondrija i OXPHOS kompleksa bilo pravilno, neophodna je vrlo koordinisana sinteza i precizna interakcija produkata kodiranih sa dva različita genoma (Lane, 2011). Interakcija produkata sa mitohondrijskog i jedarnog genoma ostvaruje se na više nivoa: (i) protein-protein interakcije unutar OXPHOS kompleksa I, III, IV i V (kompleks II je sastavljen isključivo od jedarnih proteina); (ii) interakcije jedarnih proteina sa mitohondrijskim rRNK i tRNK; (iii) interakcije jedarnih proteina i mitohondrijske iRNK; (iv) interakcije jedarnih transkripcionih i replikacionih faktora sa vezujućim mestima na mtDNK (Levin *et al.*, 2014). Dva genoma moraju da koevoluiraju ili mitohondrijski bioenergetski procesi neće funkcionisati pravilno (Dowling *et al.*, 2008). Ovo načelo potvrđeno je mnogobrojnim studijama - ukoliko su eksperimentalno u jednom organizmu spojeni jedarni i mitohondrijski genomi koji nisu koevoluirali u istoj populaciji pod istim uslovima životne sredine (tj. selektivnim pritiscima), to uzrokuje negativne efekte na mitohondrijske bioenergetske procese i različite komponente adaptivne vrednosti (osobine životne istorije) (Rand *et al.*, 2001; Dowling *et al.*, 2008; Ballard & Pichaud, 2014). Nesporno je pokazano je da u jednoj populaciji selekcija favorizuje takve kombinacije alela sa oba genoma koje omogućavaju da mitohondrija optimalno odgovori na zahteve životne sredine konkretnog staništa, dovodeći do populaciono-specifične **koevolucije dva genoma zavisne od ekološkog konteksta (M × N × E interakcija)**. Navedeni ekološki kontekst obuhvata abiotičke (npr. temperatura) i biotičke (npr. reproduktivni režim, kvalitet hrane) ekološke faktore. Eksperimenti na *Callosobruchus maculatus* ukazali su da je efekat mito-jedarnih interakcija na varijabilnost preadultnih osobina i metaboličku aktivnost zavisio od temperature na kojoj su insekti gajeni (Dowling *et al.*, 2007; Arnqvist *et al.*, 2010). Takođe, Dauling i saradnici pokazali su ne samo da mito-jedarne interakcije imaju efekat na dužinu života

ženki *C. maculatus*, već i da je ishod narušenih interakcija zavisio od reproduktivnog režima (neukršthane/ukršthane) (Dowling *et al.*, 2010). Sveukupno, navedene studije potvrđuju da je efekat mito-jedarnih interakcija na osobine životne istorije mnogo kompleksniji nego što se ranije smatralo i da zavisi od ekološkog konteksta u kome se određena mito-jedarna kombinacija eksplicira. Novije studije ukazuju da **negativna selekcija zavisna od učestalosti** ima značajnu ulogu u održavanju polimorfizma mtDNK unutar populacije kada su uslovi životne sredine heterogeni i postoji interakcija između genotipa i sredine (Kazancıoğlu & Arnqvist, 2014).

Pored smanjene efektivne veličine populacije, uniparentalno nasleđivanje mitohondrija za rezultat ima još jednu posledicu - mužjaci predstavljaju evolucionu „čorsokak“ u prenošenju mitohondrijskog genetičkog materijala. Drugim rečima, selekcija nije u mogućnosti da eliminiše mutacije u mitohondrijskom genomu koje su štetne za mužjake, dok su istovremeno neutralne ili korisne za ženke. Ovo ne predstavlja problem za ekspresiju onih osobina životne istorije koje su podjednako važne za ženke i mužjake. Međutim, kada je reč o osobinama koje su seksualno-antagonističke i/ili kod kojih postoji polni dimorfizam, mužjaci „prolaze“ kroz polno-specifično selekciono sito, u literaturi poznatije kao **materinska kletva** (engl. *mother's curse*). Eksperimentalno je pokazano da mužjaci postaju „žrtve“ polno-specifične asimetrije u delovanju selekcije koja dovodi do akumulacije štetnih mitohondrijskih mutacija (mutaciono opterećenje) sa negativnim efektom na njihove reproduktivne osobine (Innocenti & Morrow, 2010; Innocenti *et al.*, 2011), ali i drugih osobina životne istorije, kao što je starenje (Camus *et al.*, 2012; Wolff & Gemmell, 2013). Dodatna pretpostavka, koja se oslanja na materinsku kletvu, jeste da polno-specifično selekciono sito stvara kod mužjaka uslove za pojavu jakog selekcionog pritiska na evoluciju kontraadaptacija (engl. *counteradaptation*) u vidu mehanizama koji će dovesti do oporavka oslabljenih osobina životne istorije kod mužjaka, ali ne i kod ženki (Rand *et al.*, 2004; Majerus & Majerus, 2010). Koncept „**kontra kletve**“ nudi teorijsko objašnjenje za češću pojavu mitohormeze u uslovima vrlo blagog oksidativnog stresa kod mužjaka nego kod ženki (Wolff & Gemmell, 2013). Dakle, na osnovu predloženih hipoteza koje proizilaze iz materinske kletve, očekuje se da su seksualno-antagonističke osobine životne istorije osetljivije na narušavanje mito-jedarnih interakcija kod ženki u odnosu na mužjake. Međutim, kod mužjaka se očekuje veća varijabilnost u odgovoru na

mito-jedarnu nepodudarnost - od veće osetljivosti u poređenju sa ženkama zbog akumulacije mutacionih opterećenja, do izostanka bilo kakvog efekta usled pojave mitohormeze i aktivacije kompenzacionih mehanizama zaštite (Wade, 2014).

Na osnovu svega izloženog možemo zaključiti da je varijabilnost mtDNK unutar svake populacije oblikovana kompleksnim interakcijama između protoka gena, genetičkog drifta, mito-jedarnih epistatičkih interakcija, uslova životne sredine, polno-specifične selekcije, kao i negativne selekcije zavisne od učestalosti. Međutim, s obzirom na to da su u dosadašnjim istraživanjima korišćene isključivo populacije adaptirane na različita staništa (npr. populacije *Drosophila* sp. sa hladnih i toplih staništa; Clancy 2008), dobijeni zaključci predstavljaju samo indirektnu potvrdu uloge navedenih činioca u mito-jedarnoj koevoluciji. Još uvek nije razjašnjeno na koji način, tokom evolucione istorije populacije, navedeni mehanizmi oblikuju varijabilnost mtDNK u skladu sa energetskeim zahtevima životne sredine i specifičnim strategijama osobina životne istorije (Wolff *et al.*, 2014). Rešenje ove nepoznanice ne treba tražiti u analizi prošlosti, već u analizi budućnosti. U tom kontekstu, prepoznati pravac istraživanja jeste primena metodologije eksperimentalne evolucije u kojoj višegeneracijska selekcija u specifičnim kontrolisanim laboratorijskim uslovima (npr. temperatura, biljke domaćini), ili prema ciljanom programu evolucije životnih strategija (npr. uzrasno-specifična selekcija), pruža mogućnost direktne analize evolucionih promena populacija kroz generacije. Na taj način, moguće je sagledati uticaj konkretnih ekoloških faktora (tj. poznatih i kontrolisanih selekcionih pritisaka) na varijabilnost mtDNK i mito-jedarnih interakcija, kao i njihovu povezanost sa evolucionim promenama životnih strategija i obrazaca starenja organizama. Upravo ovakav pristup primenjen je u ovom radu.

2. CILJEVI

Naučni cilj predložene disertacije jeste analiza osnovnih postavki savremene evolucione teorije starenja i testiranje populaciono-geničkih modela koji se na nju oslanjaju. U cilju povezivanja proksimalnih i ultimativnih uzroka evolucionih obrazaca starenja, evoluciona teorija povezana je sa različitim fiziološkim teorijama starenja. Kroz pristup eksperimentalne evolucije, u radu su korišćene laboratorijske populacije *Acanthoscelides obtectus* (Say, 1831) koje su tokom 30 godina (više od 170 generacija) selektovane za ranu ili kasnu reprodukciju i za koje je pokazana značajna evoluciona divergencija u komponentama adaptivne vrednosti, uključujući dužinu života. Analiza osobina životne istorije, pre svega dugovečnosti, fizioloških i biohemijskih osobina mito-jedarnih linija sa očuvanim i narušenim mito-jedarnim interakcijama, doprineće formulisanju odgovora na pitanje - da li i na koji su način adaptivne promene životnih strategija povezane sa evolucijom mitohondrijskog i jedarnog genoma.

Specifični ciljevi ove disertacije su:

- Analiza obrazaca i intenziteta selekcije na osobine životne istorije u laboratorijskim populacijama selektovanim za ranu (E) i kasnu (L) reprodukciju, kao i u kontrolnoj (B) populaciji;
- Testiranje modela akumulacije mutacija i antagonističke plejotropije u evoluciji dugovečnosti i reproduktivnog obrasca u E i L populacijama;
- Demografska analiza i ispitivanje variranja u otpornosti na ekstrinzički oksidativni stres kod žižaka selektovanih za različite životne strategije: primena parakvata (nespecifičnog generatora ROS-ova) i tebufenpirada (specifičnog inhibitora kompleksa I mitohondrijskog ETL);
- Procena divergencije između populacija selektovanih za različite životne strategije: analiza mikrosatelitskih lokusa (jedarni genom, nDNK) i COI gena (mitohondrijski genom, mtDNK);
- Testiranje efekata selekcije za dugovečnost na mtDNK, nDNK i mtDNK-nDNK interakcije kroz analize osobina životne istorije i aktivnosti enzima ETL u mito-jedarnim linijama sa očuvanim i narušenim mito-jedarnim koadaptacijama;
- Analize efekata ekstrinzičkog i intrinzičkog oksidativnog stresa na procese starenja i evolucije otpornosti na oksidativni stres.

3. MATERIJAL I METODE

3.1 *Biologija i osnovne karakteristike životnog ciklusa pasuljevog žiška*

Pasuljev žižak - *Acanthoscelides obtectus* je insekt iz reda Coleoptera, porodice Bruchidae, potporodice Bruchinae i predstavlja štetnu, kosmopolitsku vrstu koja danas najčešće naseljava skladišta semena leguminoznih biljaka. *A. obtectus* i njegov optimalan domaćin - pasulj, *Phaseolus vulgaris*, vode poreklo iz Centralne Amerike (današnji Meksiko) i u Evropu su preneti krajem XIX veka (Oliveira *et al.*, 2013). Nakon uspešne kopulacije, ženka polaže jaja u blizini semena pasulja. Jaja su beličasta i elipsoidnog oblika, dužine ~ 0,7 mm. Posle nekoliko dana, iz jaja se razvijaju larve koje se aktivno kreću i hitinizovanim mandibulama probijaju opnu semenjače, ubušavaju se u endosperm i nastavljaju razviće u njemu. Tokom mesec dana larva prolazi kroz stadijum lutke i adulta, nakon čega jединke probijaju opnu zrna pasulja i izlaze van semena. Ženke se od mužjaka razlikuju po većim dimenzijama tela i svetloj šari na kraju abdomena. Dva sata po izleganju iz semena, jединke su spremne za kopulaciju. Iako u velikom procentu odbijaju ponovno ukrštanje nekoliko dana nakon oplodjenja, ženke su poliandrične. Nakon oplodjenja, oogeneza se nastavlja samo u prisustvu biljke domaćina. Adulti su fakultativno afagni - za somatsko održavanje i reprodukciju koriste resurse stečene tokom larvenog razvića, tj. odraslim jединkama nije neophodno da koriste hranu i vodu. U prirodnim uslovima, na poljima leguminoznih biljaka, odrasle jединke se mogu hraniti nektarom i polenom (Leroi, 1981). Diploidni set hromozoma kod pasuljevog žiška iznosi $2n = 20$, ženke su homogametni pol (XX), dok su mužjaci heterogametni (XY) (Rozek *et al.*, 1999).

3.2 *Uzrasno-specifična selekcija i laboratorijske populacije*

Eksperimentalna evolucija (sin. laboratorijska evolucija) i selekcion eksperimenti predstavljaju osnovno oruđe savremene evolucione biologije (Garland, 2003). Za razliku od eksperimenata veštačke selekcije u kojima se za roditelje naredne generacije odabiraju jединke nosioci određenih karakteristika, laboratorijska evolucija podrazumeva višegeneracijsko gajenje populacija u kontrolisano-izmenjenim uslovima životne sredine, gde se evolucione promene dešavaju u kontekstu novih životnih okolnosti bez direktne eksperimentalne manipulacije pravcima i brzinom delovanja

evolucionih mehanizama (Garland, 2003). U uslovima laboratorijske evolucije istovremeno deluju prirodna selekcija, genetički drift i mutacioni događaji, a promene mogu obuhvatiti bilo koju osobinu; u kontekstu prirodne selekcije, to može biti bilo koja osobina koja doprinosi adaptivnoj vrednosti date populacije. Rezultati skoro jednog veka primene ovog pristupa i njegovih kombinacija sa drugim metodama, doprineli su otkrivanju i boljem razumevanju genetičke komponente u procesu evolucije i evolucionoj teoriji (Falconer, 1992). To se, između ostalog, odnosi i na stvaranje baza podataka korisnih za mnoge druge biološke discipline - od izračunavanja stopa mutacija, do molekularnih, biohemijskih i fizioloških osnova varijacija osobina (Garland & Rose, 2009).

Svi selekcionni režimi i laboratorijske populacije koje su korišćene u ovom radu oslanjaju se na koncept laboratorijske evolucije i vode poreklo od **kontrolnog (B, engl. base) režima, tj. osnovne B populacije**. Osnovni režim predstavlja sintetičku populaciju formiranu 1983. godine ukrštanjem tri velike populacije jedinki *Acanthoscelides obtectus* iz zaraženog pasulja sakupljenog u magacinima leguminoza iz okoline Beograda (Tucić *et al.*, 1996). Od osnivačke populacije, nakon 3 godine prilagođavanja na laboratorijske uslove, izvedena su dva selekciona režima koja se razlikuju u vremenu otpočinjanja reprodukcije: selekcionni režim za ranu reprodukciju - E (engl. *early reproduction*) i selekcionni režim za kasnu reprodukciju - L (engl. *late reproduction*). Imajući u vidu da promene u svakoj laboratorijskoj populaciji mogu biti uzrokovane stohastičkim procesima - genetičkim driftom i mutacijama, a ne samo prirodnom selekcijom, u okviru svakog selekcionnog režima formirane su po četiri populacije (replike). Razlike između populacija unutar istog režima ukazuju na efekte stohastičkih mehanizama u međupopulacionoj divergenciji, dok isti pravci evolucionih promena osobina u svim replikama istog režima oslikavaju rezultate prirodne selekcije u konkretnom sredinskom kontekstu. Drugim rečima, eksperimentalni dizajn sa populacionim replikama omogućava, uz primenu odgovarajućih matematičkih modela, procenu pravaca i intenziteta delovanja prirodne selekcije (divergencija između režima) uzimajući u obzir efekte drugih evolucionih mehanizama koji uslovljavaju interpopulaciono variranje unutar selekcionnih režima.

Procedure uzrasno-specifične selekcije tokom 30 godina laboratorijske evolucije bile su sledeće:

U **selekcionom režimu za ranu reprodukciju** novoizleženim žiškama (oko 500 jedinki po populaciji, odnos polova 1:1) omogućeno je slobodno ukrštanje i polaganje jaja u staklenim posudama sa semenima pasulja samo tokom 48 sati, nakon čega su sve adultne jedinke uklanjane iz posude. Dakle, u formiranju svake sledeće generacije učestvovala su isključivo jaja „mladih roditelja“ formirana u toku prva dva dana od početka reprodukcije. Ovaj postupak je ponavljan u formiranju svake naredne generacije. Osnovna logika ovakvog dizajna selekcije životnih strategija podrazumevala je favorizovanje onih jedinki koje imaju brže preadultno razviće i veći rani fekunditet.

U **selekcionom režimu za kasnu reprodukciju** jedinkama je omogućena uspešna reprodukcija nakon desetog dana starosti do smrti. To je postignuto na sledeći način: nakon izleganja iz semena pasulja približno 1000 mužjaka i ženki po populaciji (odnos polova 1:1) čuvano je u staklenim epruvetama bez supstrata (semena), gde im je dozvoljeno slobodno ukrštanje do desetog dana starosti. Nakon dostizanja uzrasta od 10 dana, „stari roditelji“ su prebačeni u staklene posude sa semenima pasulja. Posledično, samo jaja koja su oplodena i izležena nakon 10og dana starosti roditelja, učestvovala su u formiranju sledeće generacije. U ovakvom dizajnu eksperimentalne procedure, selektivni pritisak podrazumevao je veću adaptivnu vrednost jedinki koje odlažu reprodukciju i polaganje jaja i, konačno, žive dovoljno dugo da bi ostvarile svoju reproduktivnu funkciju.

Sve laboratorijske populacije održavane su u kontrolisanim uslovima u termostatima na 30°C. Pre upotrebe, semena pasulja su zamrzavana 24 sata na -20°C kako bi se uklonili insekti koji se eventualno već nalaze u semenima i tako izbegla potencijalna kontaminacija laboratorijskih populacija.

3.3 Analiza efekata selekcije za ranu i kasnu reprodukciju na preadultne i adultne osobine životne istorije

Eksperiment u kom su analizirane osobine životne istorije urađen je koristeći četiri populacije iz režima za ranu reprodukciju (populacije E₁₋₄) i za kasnu reprodukciju (populacije L₁₋₄, indeks označava broj populacije). E populacije bile su selektovane tokom 252 generacije, a L populacije tokom 174 generacije. Iako su E i L populacije formirane istovremeno (pre 30 godina), produženo vreme generacije u L režimu i skraćeno vreme generacije u E režimu, što su posledice evolucionih promena životnih strategija, dovelo je do razlike od skoro 80 generacija u relativnom trajanju evolucionog procesa u ovim populacijama. Eksperimentalne populacije bile su upoređene sa osnovnom populacijom (kontrolni, B režim) koja nije bila pod selekcijom.

3.3.1 Analiza preadultnih osobina žižaka

Iz svake populacije (po četiri populacije unutar E i L režima i jedna B populacija) izdvojeno je ~ 100 parova žižaka, starih 1-3 dana, kojima je dozvoljeno slobodno ukrštanje i polaganje jaja tokom 24 časa. Za svaku populaciju posebno, jaja su sakupljena i podeljena u pet grupa od po ~ 150 jaja. Svaka grupa jaja je postavljena u posebnu Petri šolju napunjenu semenima pasulja (ukupno pet Petri šolja po populaciji). Nakon oko tri nedelje, kada otpočinje izleganje adultnih jedinki iz semena, svakodnevno je beležen broj ženki i mužjaka koji su izlazili iz okaca semena. Semena su pregledana dok sve žive jedinke nisu izašle iz pasulja. Ovakav dizajn eksperimenta omogućio je merenje dve preadultne osobine:

- ***preadultni vijabilitet*** (skraćeno *vijabilitet*) - odnos između broja adultnih žižaka i broja postavljenih jaja po Petri šolji (procenjeno pet mera vijabiliteta po populaciji),

- ***trajanje razvića*** - vreme (u danima) koje protekne od trenutka kada je jaje izleženo do trenutka pojave adulta iz semena pasulja (procenjeno za svaku jedinku).

Navedene preadultne osobine analizirane su na uzorku od ukupno 3256 jedinki.

3.3.2 Analiza adultnih osobina žižaka

Imajući u vidu da, prema teoriji, reproduktivna aktivnost može smanjiti dužinu života, kao i da eksperimentalna procedura uzrasno-specifične selekcije može, pored efekata na učestalost alela gena koji determinišu fiziološke procese tokom starenja, uticati i na gene koji regulišu reproduktivno ponašanje, analiza dugovečnosti žižaka urađena je u dva eksperimenta - na neukrštanim i na ukrštanim jedinkama oba pola.

Procenjene su vrednosti šest adultnih osobina životne istorije:

- **masa tela** - individualna mera (u mg) izmerena na vagi (Chyo JL - 200; 200 g/0,1 mg) nakon izleganja žiška iz semena pasulja,
- **dužina života** - vreme (u danima) od trenutka izlaska adultne jedinke iz semena pasulja do njene smrti,
- **prvi i poslednji dan fekunditeta** - vreme (u danima) kada je ženka položila prvo i poslednje jaje (samo u eksperimentu sa ukrštanim jedinkama),
- **rani fekunditet** - broj jaja koja ženka položi u prva dva dana od početka reprodukcije (samo u eksperimentu sa ukrštanim jedinkama),
- **ukupni fekunditet** - broj jaja koja ženka položi tokom čitavog života (samo u eksperimentu sa ukrštanim jedinkama).

U prvom eksperimentu, praćeno je 150 neukrštanih (engl. *virgin*) ženki i mužjaka po populaciji E i L režima, kao i 180 neukrštanih ženki i mužjaka poreklom iz B režima ((150 jedinki \times 2 pola \times 4 populacije) \times 2 selekciona režima + 180 B jedinki \times 2 pola = 2760 jedinki). Da bi se dobile neukrštane jedinke oba pola, semena pasulja su pregledana na svaka dva sata (tokom dva sata od izlaska iz semena adulti nisu reproduktivno aktivni). Izdvojene jedinke su pojedinačno smeštane u tubicu od 1,5 ml sa perforiranim otvorom za dotok vazduha, bez semena pasulja, vode i hrane. Pre ubacivanja u tubice, svaka adultna jedinka je izmerena. Broj uginulih jedinki je beležen svakog dana i procenjena je dužina života svakog žiška.

U drugom eksperimentu, praćeno je 30 ukrštanih (engl. *mated*) ženki i mužjaka po populaciji E i L režima i 190 parova poreklom iz B režima $((30 \times 2 \times 4) \times 2 + 190 \times 2 = 860$ jedinki). Svakoj neukrštanjoj ženki nasumično je dodeljen, dva sata nakon izlaska iz semena pasulja, jedan neukrštan mužjak iste starosti i populacionog porekla (npr. $1 \text{ ♀E}_1 \times 1 \text{ ♂E}_1$, $1 \text{ ♀E}_2 \times 1 \text{ ♂E}_2$ itd.; indeks označava broj populacije). Svaki par smešten je u staklenu Petri šolju sa jednim semenom pasulja, gde im je omogućeno slobodno ukrštanje i polaganje jaja tokom celog života. Pre ubacivanja u Petri šolju izmerena je masa tela ženki i mužjaka. Pored broja uginulih jedinki, svakog dana beležen je i broj položenih jaja. Na ovaj način procenjene su dužine života svake jedinke, prvi i poslednji dan fekunditeta, kao i rani i ukupni fekunditet svake ženke.

3.3.3 Određivanje intenziteta prirodne selekcije

Vilijam Hamilton je prvi kvantitativno opisao smanjenje intenziteta prirodne selekcije sa uzrastom (Hamilton, 1966) koje, prema Holdejnu i Medavaru, predstavlja evoluciono objašnjenje za pojavu procesa starenja (Haldane, 1941; Medawar, 1946). Intenzitet selekcije izračunava se iz odnosa:

$$s(x)/T$$

gde x predstavlja uzrast i T srednje vreme generacije populacije (Rose *et al.*, 2007). Funkcija s opisana je sledećom jednačinom:

$$s(x) = \sum_{y=x+1} e^{-ry} l(y) m(y)$$

U ovom modelu, r predstavlja intrinzičku stopu rasta populacije, l funkciju preživljavanja, a m funkciju broj potomaka u uzrastu y . Varijabla y predstavlja zbir neto očekivane reprodukcije nakon uzrasta x . Dakle, funkcija $s(x)$ je opadajuća i opisuje neposredan uticaj adaptivne vrednosti na buduću reprodukciju jedinke. Pre početka reprodukcije, odnosno polaganja jaja, $s(x)$ ima vrednost 1, nakon početka reprodukcije počinje da opada, da bi prestankom polaganja jaja dostigla nultu vrednost. Za procene populaciono-ekoloških parametara (r , T , $l(x)$ i $m(x)$) korišćene su vrednosti preadultnog vijabiliteta, odnos polova, dužina života ukrštanih ženki i broj položenih jaja po uzrasnim klasama (tj. tablice životne statistike svake populacije). Za izračunavanje je korišćen program koji su razvili Maja i saradnici za statistički paket SAS (Maia *et al.*, 2000).

3.4 Eksperimentalna analiza populaciono-genetičkog modela akumulacije mutacija

Pojava heteroze u osobinama životne istorije kod hibridnih jedinki, a u poređenju sa potomcima iz ukrštanja jedinki poreklom iz iste populacije, predstavlja indirektnu potvrdu uloge akumulacije mutacija u evoluciji ovih osobina (pogledati Uvod, odeljak 1.2.1). Cilj ovog eksperimenta bio je da se poređenjem adultnih osobina žižaka između dvostrukih hibrida i nehibridnih E i L populacija (unutar svakog režima posebno) testiraju pretpostavke AM modela.

3.4.1 Formiranje dvostrukih hibrida

U cilju povećanja genetičke varijabilnosti i narušavanja specifičnih epistatičkih interakcija između gena/genoma nastalih u svakoj populaciji tokom višegeneracijske selekcije za različito vreme reprodukcije, obavljena su ukrštanja između populacija unutar selekcionih režima. Procedura formiranja dvostrukih hibrida E, odnosno L režima sastojala se iz sledećih koraka: najpre je oko 100 novoizleženih, neoplođenih jedinki iz populacije br. 1 ukrštano sa oko 100 novoizleženih jedinki iz populacije br. 2 ($\text{♀E}_1 \times \text{♂E}_2$, odnosno $\text{♀L}_1 \times \text{♂L}_2$). Na isti način ukrštane su ženke i mužjaci iz populacija br. 3 i 4 ($\text{♀E}_3 \times \text{♂E}_4$, odnosno $\text{♀L}_3 \times \text{♂L}_4$). Potom je omogućeno da se oko 300 novoizleženih hibridnih ženki i mužjaka iz F_1 generacije reprodukuje unutar svog selekcionog režima po principu: $(E_1 \times E_2) \times (E_3 \times E_4)$, odnosno $(L_1 \times L_2) \times (L_3 \times L_4)$.

3.4.2 Analiza osobina životne istorije dvostrukih hibrida i nehibridnih E i L populacija

Pre početka eksperimenta, tj. analize osobina životne istorije, novoformirane linije dvostrukih hibrida tokom dve generacije nisu bile izložene selekciji za vreme reprodukcije (tzv. relaksirana selekcija). Istovremeno, kroz dve generacije relaksirane selekcije prošle su i populacije E_{1-4} nakon 271 generacija selekcije za ranu reprodukciju, i L_{1-4} nakon 187 generacija selekcije za kasnu reprodukciju. Kod žižaka poreklom iz linija dvostrukih hibrida i nehibridnih E i L populacija analizirane su i upoređene sledeće osobine:

- *uzrasno-specifični fekunditet* - broj položenih jaja nakon ukrštanja u različitim uzrastima ženke (dva uzrasta u E i tri uzrasta u L režimu),

- **uzrasno-specifični virilitet (reproduktivna sposobnost) mužjaka** - broj ženki sa kojima se mužjak ukrstio tokom perioda od 48 sati (vrednost od 0 do 6) u dva uzrasta (E režim) i tri uzrasta (L režim),
- **brzina ukrštanja mužjaka** - vreme (u minutima) koje protekne od trenutka kada se mužjaku ponudi ženka do trenutka kada kopulacija otpočne,
- **trajanje ukrštanja mužjaka** - vreme (u minutima) koje protekne od početka do kraja kopulacije,
- **dužina života** - vreme (u danima) od trenutka izlaska adultne jedinke iz semena pasulja do njene smrti.

3.4.2.1 Fekunditet ženki

Ženke iz svake eksperimentalne grupe ukrštane su sa B mužjacima starim 1-3 dana. Korišćenje mužjaka iz kontrolne B populacije imalo je za cilj da se eliminiše potencijalni efekat porekla mužjaka na fekunditet analiziranih ženki. Ovako formiran par smeštan je u staklenu Petri šolju sa jednim semenom pasulja. Praćeno je 120 parova (30 po populaciji) koji su uključivali ženke iz nehibridnih populacija E i L režima, i po 60 parova sa ženkama dvostrukih hibrida iz E i L režima. Broj izleženih jaja praćen je svakodnevno. Budući da prosečna dužina života žižaka poreklom iz E režima iznosi 9 dana, kod ovih ženki fekunditet je analiziran u dva uzrasna doba: 1-2 i 7-8 dana života. Kod žižaka poreklom iz L režima analiziran je fekunditet ženki u tri uzrasna doba: 1-2, 7-8 i 14-15 dana života. Da bi se obezbedila statistička nezavisnost merenja u različitim adultnim dobima, u svakom analiziranom uzrastu korišćena je nova grupa neukrštanih (*virgin*) ženki odgovarajuće starosti.

3.4.2.2 Reproductivna sposobnost mužjaka

Slično analizama fekunditeta, reproduktivna sposobnost mužjaka poreklom iz E i L populacija, kao i njihovih dvostrukih hibrida, praćena je u dva, odnosno tri uzrasna doba (1-2, 7-8, 14-15 dana starosti). S obzirom na to da reproduktivna aktivnost, uključujući homoseksualnu, može skratiti dužinu života (Stojković *et al.*, 2010), mužjaci su sakupljani na svaka dva sata i čuvani pojedinačno u perforiranim tubicama do trenutka kada su korišćeni u eksperimentu. U esejima po uzrasnim dobima korišćene

su nezavisne grupe neukrštanih (*virgin*) mužjaka odgovarajuće starosti. Mužjacima su ponuđene B ženke (do 3 dana starosti) kako bi se eliminisao uticaj porekla ženke na reproduktivno ponašanje mužjaka. Eksperimentalna procedura se sastojala iz tri koraka: (1) po dostizanju odgovarajućeg uzrasta svakom mužjaku je unutar Petri šolje ponuđena jedna B ženka; (2) praćeno je reproduktivno ponašanje mužjaka tokom 30 minuta; (3) ženka je uklonjena, a mužjaci su ostajali bez partnera 2 sata. Ista procedura je ponavljana tri puta sa novim B ženkama tokom jednog dana. Nakon toga, mužjaci su ostajali bez partnerke 18 sati (tj. do narednog dana), kada su ponovo ukrštani kao prethodnog dana. Dakle, nakon 48 sati jedan mužjak je imao prilike da se ukrsti sa šest različitih B ženki. U zavisnosti od broja ukrštanja, virilitet svakog mužjaka mogao je imati vrednosti od 0 do 6. Pored viriliteta, ovakav dizajn eksperimenta, u kom je reproduktivno ponašanje sa svakom ženkom praćeno tokom 30 min, omogućio je procenu brzine i trajanja ukrštanja. U svakom uzrasnom dobu (1-2 i 7-8 dana života u E režimu i 1-2, 7-8 i 14-15 dana života u L režimu) praćeno je po 120 mužjaka (30 po populaciji) E i L režima i po 60 mužjaka E i L dvostrukih hibrida. Ukupan broj B ženki koje su ponuđene mužjacima iznosio je $5400 ((120 \text{ L mužjaka} + 60 \text{ L hibridnih mužjaka}) \times 3 \text{ uzrasna doba} + (120 \text{ E mužjaka} + 60 \text{ E hibridnih mužjaka}) \times 2 \text{ uzrasna doba}) \times 6 \text{ ženki} = 5400 \text{ ženki}$.

3.4.2.3 Dužina života

Postavka eksperimenta i merenje dužine života dvostrukih hibrida i nehibridnih jedinki identična je eksperimentu opisanom u odeljku 3.3.2, Materijal i metode. Dva sata nakon izleganja žišci su razdvajani po polu i smeštani pojedinačno u perforirane tubice od 1,5 ml. Broj uginulih jedinki je beležen svakog dana. U ovom testu korišćeno je po 600 E i L ženki i mužjaka (120 po populaciji) i po 120 ženki i mužjaka E i L dvostrukih hibrida koji nisu bili reproduktivno aktivni.

3.5 Analiza uticaja mitohondrija, jedra i njihovih epistatičkih interakcija na osobine životne istorije

Osnovni cilj ovog eksperimenta bio je da se poređenjem fenotipa mito-jedarnih linija sa očuvanim ili narušenim mito-jedarnim interakcijama analizira uloga jedra, mitohondrija i njihovih epistatičkih interakcija u evoluciji preadultnih i adultnih osobina životne istorije žižaka pod uzrasno-specifičnom selekcijom.

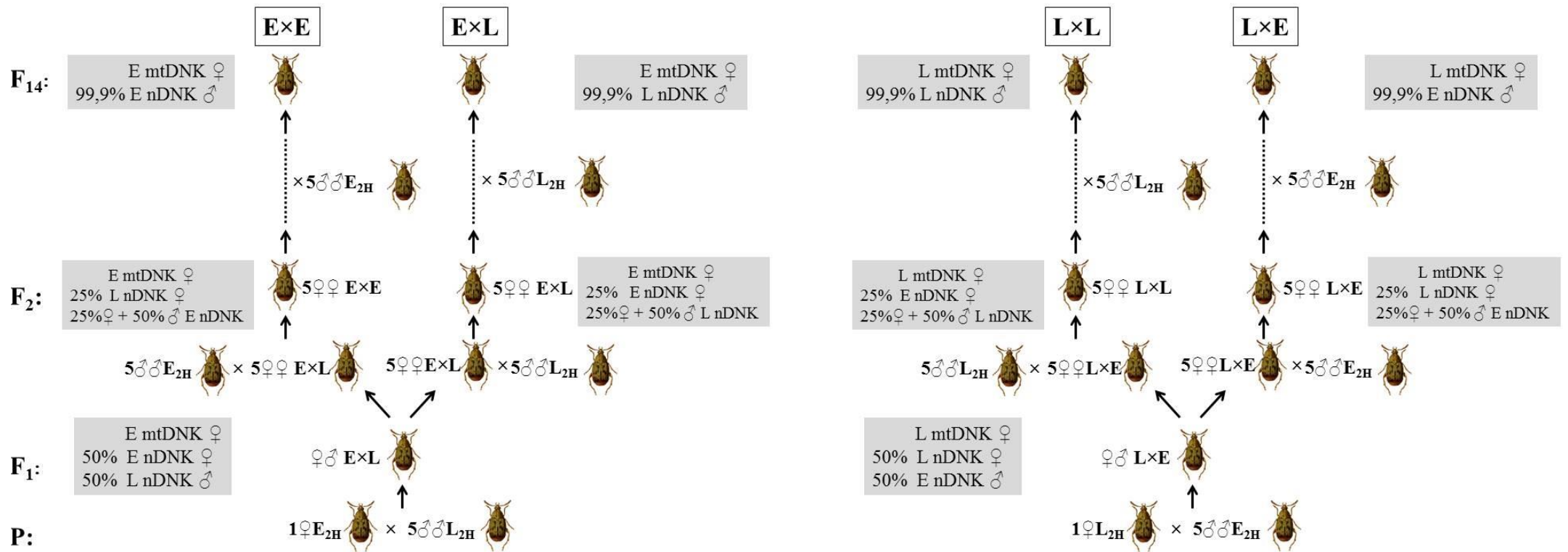
3.5.1 Formiranje mito-jedarnih linija sa očuvanim i narušenim mito-jedarnim interakcijama metodom povratnog ukrštanja

Zahvaljujući uniparentalnom nasleđivanju haploidnog genoma mitohondrija, u mogućnosti smo da kontrolisanim ukrštanjima vršimo kombinovanje specifične mtDNK sa različitim jedarnim genomima. Korišćenjem metode povratnog ukrštanja, nakon 14 generacija, moguće je maternalnu mtDNK „razdvojiti” od nativnog jedarnog genoma i „pripojiti” stranom jedarnom genomu sa kojim ta mtDNK nije koevoluirala (Slika 3.5.1).

U inicijalnom formiranju mito-jedarnih (mt-j) linija, u kojima svaka linija ima jedinstven mitohondrijski haplotip, korišćeni su dvostruki hibridi E i L žižaka (pogledati odeljak 3.4.1, Materijal i metode). Eksperimentalna procedura povratnog ukrštanja (Slika 3.5.1) započeta je sa 50 novoizleženih, neoplođenih ženki E, odnosno L dvostrukih hibrida, koji predstavljaju osnivače mito-jedarnih linija (tzv. mitohondrijske Eve). Svaka pojedinačna mitohondrijska Eva ukrštena je sa 5 nasumično izabranih mužjaka iz suprotnog selekcionog režima ($1 \text{ ♀E} \times 5 \text{ ♂♂L}$ i $1 \text{ ♀L} \times 5 \text{ ♂♂E}$). Ovim putem dobijene su jedinke F_1 generacije koje su od majke nasledile mitohondriju i 50 % maternalnog jedarnog genoma koji je koevoluirao sa nasleđenom mtDNK u istom selekcionom režimu, dok su od očeva nasledile drugu polovinu jedarnog genoma, poreklom iz drugog selekcionog režima, koji nije koevoluirao sa maternalnom mtDNK. Potom su sakupljene neoplođene F_1 ženke poreklom od iste majke i podeljene u dve grupe. **Prvu grupu** su činile ženke koje su nastavile da se ukrštaju sa mužjacima iz suprotnog selekcionog režima, odnosno režima odakle potiče otac ($5 \text{ ♀♀E} \times 5 \text{ ♂♂L}$ i $5 \text{ ♀♀L} \times 5 \text{ ♂♂E}$), dok su **drugu grupu** činile ženke koje su nastavile da se ukrštaju sa mužjacima iz nativnog selekcionog režima, odnosno linije iz koje potiče majka (5 ♀♀E

$\times 5 \text{ ♂♂E}$ i $5 \text{ ♀♀L} \times 5 \text{ ♂♂L}$). Cilj ove procedure je da se dobiju eksperimentalna i kontrolna mt-j linija koje poseduju identičnu mitohondriju, ali različite jedarne genome (Slika 3.5.1). Teorijski, nakon 14 generacija ponavljanja povratnog ukrštanja na opisan način, jedinke sadrže 99,99 % paternalnog jedarnog genoma i maternalni mitohondrijski genom.

Prva grupa predstavlja mt-j linije sa mitohondrijskim i jedarnim genomima koji nisu međusobno koevoluirali (sadrže **narušene mito-jedarne interakcije**) i čine je: **E×L** linije (E mitohondrija i L jedarni genom) i **L×E** linije (L mitohondrija i E jedarni genom). U drugoj grupi, povratnim ukrštanjem formirane su mt-j linije u kojima je rekonstituisan jedarni genom sa kojim je mitohondrija koevoluirala (**očuvane mito-jedarne interakcije**): **E×E** linije (E mitohondrija i E jedarni genom) i **L×L** linije (L mitohondrija i L jedarni genom) (Slika 3.5.1). Po svakoj mt-j grupi formirano je 50 mt-j linija (ukupno 200). Na osnovu opisane procedure, može se zaključiti da dve linije, u dve mt-j grupe, potiču od iste mitohondrijske Eve. Na primer, $E \times E_{37}$ i $E \times L_{37}$ imaju identičan mitohondrijski genom, ali različito poreklo jedarnih genoma i pripadaju grupama E×E i E×L.



Slika 3.5.1 Eksperimentalni dizajn formiranja mito-jedarnih linija sa narušenim (E×L i L×E) i rekonstituisanim (E×E i L×L) mito-jedarnim epistatičkim interakcijama metodom povratnog ukrštanja. U parentalnoj generaciji (P) ukrštene su ženke E ili L dvostrukih hibrida (E_{2H} i L_{2H}) sa pet mužjaka iz alternativnog selekcionog režima. Ženke iz F₁ generacije (E×L i L×E) podeljene su u dve grupe. U prvoj grupi (strelica levo) ženke su ukrštane sa mužjacima iz selekcionog režima majke i nakon 14 generacija povratnog ukrštanja dobijene su rekonstituisane mito-jedarne linije (E×E i L×L). U drugoj grupi (strelica desno) ženke su ukrštane sa mužjacima iz selekcionog režima oca i nakon 14 generacija povratnog ukrštanja dobijene su mito-jedarne linije sa narušenim mito-jedarnim interakcijama (E×L i L×E). Procedura višegeneracijskog povratnog ukrštanja omogućava da se maternalni mitohondrijski genom (mtDNK) očuva, dok se maternalni jedarni genom (nDNK) iz ukrštanja u F₁ generaciji postepeno zamenjuje željenom (nativnom/alternativnom) paternalnom nDNK. U sivim poljima predstavljene su proporcije genoma različitog porekla (iz E ili L režima) koje su prisutne u potomačkim jedinkama sukcesivnih generacija ukrštanja (od F₁ do F₁₄).

3.5.2 Analiza preadultnih i adultnih osobina životne istorije mito-jedarnih linija sa očuvanim i narušenim mito-jedarnim interakcijama

U ovom eksperimentalnom eseju korišćeni su žiști iz 20 mito-jedarnih linija poreklom iz 4 mito-jedarne grupe (5 mt-j linija po mt-j grupi - E×E, E×L, L×L i L×E) koje su formirane nakon 14 generacija povratnog ukrštanja.

Postavka i izvođenje analize preadultnih osobina kod mito-jedarnih linija ista je kao u slučaju merenja preadultnih osobina žižaka poreklom iz B, E i L režima (videti odeljak 3.4.1, Materijal i metode). Tokom tri dana unutarpopulacionog ukrštanja, položena jaja su sakupljena, prebrojana i postavljena u pet Petri šolja napunjenih semenima pasulja. Nakon tri nedelje, svakodnevno je beležen broj ženki i mužjaka koji su izlazili iz okaca semena. Ovakav istraživački pristup omogućio je merenje *vijabiliteta* i *trajanje razvića* ženki i mužjaka. Analize preadultnih osobina obavljene su na uzorku od ukupno 3897 žižaka.

Od adultnih osobina analizirane su *masa tela*, *dužina života* neukrštanih i ukrštanih žižaka, *ukupni fekunditet* ženki i *sterilnost*. Sterilnost je izražena kao procenat parova sa manje od 5 položenih jaja. Ovi parovi nisu ušli u statističku analizu fekunditeta ženki. Dizajn eksperimenta za merenje adultnih osobina mito-jedarnih linija detaljno je opisan u odeljku 3.4.1, Materijal i metode. U prvom ogledu, neukrštane ženke i mužjaci smeštane su pojedinačno u tubicu od 1,5 ml sa perforiranim otvorom, bez semena pasulja, vode i hrane. Pre ubacivanja u tubice, svaki žižak je izmeren. Broj uginulih jedinki je beležen svakog dana. Dužina života neukrštanih žižaka merena je na uzorku od 150 jedinki po polu i mt-j liniji (150 jedinki × 2 pola × 20 mt-j linija = 6000). U drugom ogledu svakodnevno je praćena dužina života i fekunditet kod 120 parova unutar svake mt-j linije (ukupno 120 × 2 × 20 = 4800). Dakle, analize adultnih osobina obavljene su na uzorku od ukupno 10800 žižaka.

3.6. Testiranje otpornosti na oksidativni stres

Prvi cilj ovog eksperimenta je bio da se odredi efekat kratkotrajnog (24 sata) ekstrinzički izazvanog oksidativnog stresa, u vidu tretmana različitim koncentracijama rastvora pesticida, na preživljavanje žižaka. *Preživljavanje* (engl. *short-term survival*) izraženo je kao procenat preživelih jedinki nakon 24-časovnog tretmana pesticidom. Pre

samog tretmana, neukrštni žišci su sakupljeni 2 sata nakon izleganja, razdvojeni po polovima i ostavljani u istopolnim grupama tokom 24 sata u termostatu na 30°C. Nakon ovog perioda, po 10 žižaka istog pola i starosti, stavljeno je u Petri šolje prečnika 50 mm na čijem dnu se nalazi filter papir koji je prethodno tretiran sa 400 µl vode (kontrolna grupa) ili rastvora pesticida određene koncentracije. Petri šolje sa žižcima vraćene su u termostat na 30°C. Posle 24 sata, Petri šolje su pregledane i zabeležen je broj uginulih jedinki. Jedinke koje su preživele 24-časovni tretman pesticidom prebačene su u nove Petri šolje bez filter papira i vraćene u termostat. Broj uginulih je praćen svakodnevno. Ovim postupkom omogućena je analiza uticaja 24-časovnog tretmana pesticidom na *dužinu života* (engl. *post-stress longevity*), čime je ostvaren drugi cilj ovog eksperimenta: procena sposobnosti jedinki da se oporave od kratkotrajnog ekstrinzičkog oksidativnog stresa.

Od pesticida su korišćeni parakvat (metil viologen ili 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridinium dihidroklorid) i tebufenpirad (N-(4-tert-butilbenzil)-4-hloro-3-etil-1-metilpirazol-5-karboksamid). Parakvat (PQ) spada u nespecifične generatore ROS-ova koji se često koriste u testovima otpornosti na oksidativni stres. Iako sâm mehanizam delovanja nije do kraja razjašnjen, zna se da parakvat preuzima elektrone sa kompleksa I-IV mitohondrijskog ETL, aktivira mikrozomalne enzime i NO sintazu i na taj način sintetiše superoksid anjon radikale, a potom i druge ROS-ove (Mohammadi-Bardbori & Ghazi-Khansari, 2008). S druge strane, tebufenpirad (TBF), povećava produkciju mROS-ova blokiranjem transporta elektrona preko PSST subjedinice kompleksa I mitohondrijskog ETL (Sherer *et al.*, 2007). Korišćenjem ovog specifičnog generatora mROS-ova moguće je analizirati udeo efekta koji mitohondrija ima u varijabilnosti dugovečnosti eksperimentalnih populacija žižaka.

U analizi otpornosti laboratorijskih populacija na parakvat korišćeni su neukrštni žišci poreklom iz B režima, E režima nakon 250 generacija selekcije za ranu reprodukciju i L režima nakon 174 generacije selekcije za kasnu reprodukciju. Tretmani su obuhvatali 4 koncentracije PQ rastvora: 1 g/l ili ~ 4 mM (označena kao PQ1), 5 g/l ili ~ 20 mM (PQ5), 10 g/l ili ~ 40 mM (PQ10) i 20 g/l ili ~ 80 mM (PQ20), i vodu kao kontrolni tretman. U okviru svake od 4 koncentracije PQ, tretirano je 30 jedinki (3 Petri šolje; ukupno $4 \times 30 = 120$ jedinki), a vodom 40 jedinki (4 Petri šolje). Tretmani su

urađeni po polu i populaciji unutar dva selekcionog režima (ukupno 2 pola \times 4 populacije \times 2 režima \times 160 tretiranih jedinki = 2560 jedinki). Analize na B režimu su uključivale 100 ženki i mužjaka po PQ tretmanu ($100 \times 2 \times 4 = 800$ jedinki) i 160 ženki i mužjaka po kontrolnom tretmanu (320 jedinki). Kod E ženki na najnižim koncentracijama uočena je pojava hormeze, pa su tretmani sa PQ1, PQ5, PQ10 ponovljeni na E ženkama i mužjacima ($3 \times 2 \times 4 \times 30 = 720$ jedinki). Sveukupno, analizama je obuhvaćeno 2118 ženki i 2073 mužjaka.

Dvostruki hibridi E i L žižaka (pogledati odeljak 3.4.1, Materijal i metode), kao i B žišci, korišćeni su u analizi otpornosti laboratorijskih populacija na tebufenpirad. U eksperimentu su korišćene 4 koncentracije rastvora tebufenpirada: TBF 0,5 %, 1,5 %, 2,5 % i 5 %, i kontrola (voda). Analizama je obuhvaćeno 100 jedinki po tretmanu, režimu i polu (ukupno $100 \times 5 \times 3 \times 2 = 3000$ jedinki).

Korišćenje mito-jedarnih linija sa očuvanim (E \times E, odnosno L \times L) i narušenim mt-j interakcijama (L \times E, odnosno E \times L) omogućilo je da jasnije sagledamo doprinos mitohondrijskih i jedarnih gena, kao i njihove interakcije, u oblikovanju dugovečnosti i otpornosti na ekstrinzički izazvan oksidativni stres kod žižaka selektovanih za ranu i kasnu reprodukciju. Ujedno, analiziran je uticaj kako intrinzičkog oksidativnog stresa nastalog usled narušenih mt-j interakcija, tako i zajedničkog efekta intrinzičkog i ekstrinzičkog oksidativnog stresa na ove osobine. Mito-jedarne linije tretirane su najnižim koncentracijama rastvora pesticida koje su u prethodnim analizama kod mužjaka, kao senzitivnijeg pola, uzrokovale statistički značajne promene u preživljavanju kratkotrajnog stresa i dužini života nakon stresa. Imajući u vidu da su mužjaci osetljiviji na oksidativni stres od ženki, ove koncentracije su omogućile dobijanje dovoljnog broja preživelih jedinki za analize osobina životne istorije. U analizi uloge mitohondrija, jedra i njihove interakcije u otpornosti na tebufenpirad, 40 ženki i mužjaka iz pet mt-j linija svake mt-j grupe (E \times E, E \times L, L \times L i L \times E) tretirano je 1,5 % TBF ili vodom (40 jedinki \times 2 pola \times 5 mt-j linija \times 4 mt-j grupe \times 2 tretmana = 3200 žižaka). Eksperiment na parakvatu obuhvatao je 20 mt-j linija poreklom iz 4 grupe, koje su tretirane 0,5 % rastvorom parakvata ili vodom. Iz svake mt-j linije testirano je 50 ženki i mužjaka (50 jedinki \times 2 pola \times 20 mt-j linija \times 4 mt-j grupe \times 2 tretmana = 16000 žižaka).

3.7. Određivanje aktivnosti enzima mitohondrijskog elektron transportnog lanca

3.7.1 Priprema uzoraka za analizu

Za određivanje aktivnosti kompleksa mitohondrijskog ETL korišćene su 1 dan stare, neukrštane jedinke. Pet ženki ili mužjaka ručno je homogenizovano na ledu u saharoznom (STE) puferu (0,25 M saharoza, 5 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 7,4). Homogenat je potom centrifugiran 15 minuta na $700 \times g$ na 4°C . Dobijeni supernatant prebačen je u nove tubice i ponovo centrifugiran 20 minuta na $16000 \times g$ na 4°C . Dobijeni supernatant je odbačen, a talog resuspendovan u 200 ml STE pufera i do daljih analiza čuvan na -80°C . Analizirano je po pet uzoraka po polu, u svakoj od pet mt-j linija (haplotipova) unutar svake od 4 mt-j grupe (ukupno 200 uzoraka).

3.7.2 Određivanje aktivnosti kompleksa I

Aktivnost kompleksa I određena je spektrofotometrijski, praćenjem pada apsorbanace na talasnoj dužini od 600 nm usled redukcije DCIP (2,6-dihloroindofenol) na 30°C ($\epsilon = 19,1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Metoda se zasniva na sposobnosti kompleksa I da oksiduje NADH i preko decilubihinona redukuje DCIP (Janssen *et al.*, 2007). Reakcija otpočinje dodavanjem NADH (0,2 mM) u kivetu koja sadrži mitohondrijske proteine (homogenat celih žižaka), 25 mM kalijum fosfatni pufer (pH 7,6), goveđi serum albumin (BSA - 3,5 g/l), DCIP (60 μM), decilubihinon (70 μM) i inhibitor kompleksa III - antimicin A (1 μM). Decilubihinon i antimicin A su rastvarani u dimetil sulfoksidu. Rezidualna aktivnost enzima nakon dodavanja rotenona, specifičnog inhibitora kompleksa I, bila je zanemarljiva u reakciji. Ovo ukazuje da je redukcija DCIP-a vršena isključivo aktivnošću kompleksa I.

3.7.3 Određivanje aktivnosti kompleksa II

Za određivanje aktivnosti kompleksa II spektrofotometrijski je meren pad apsorbanace na talasnoj dužini od 600 nm usled redukcije DCIP na 30°C (Janssen *et al.*, 2007). U reakcionoj smeši nalaze se mitohondrijski proteini (homogenat), 25 mM kalijum fosfatni pufer pH 7,6, BSA (1 mg/ml), DCIP (75 μM), EDTA (2 mM), supstrat - sukcinat (20 mM), ATP (0,2 mM), inhibitor kompleksa I - rotenon (3 mM), inhibitor kompleksa III - antimicin A (1 μM) i inhibitor kompleksa IV - KCN (1 mM). Pre

početka reakcije, kompleks II je aktiviran inkubacijom sa sukcinatom u trajanju od 10 minuta (Barrientos, 2002). Reakcija otpočinje dodatkom akceptora elektrona - decilubihinona (65 μM). Slepna proba merena je u prisustvu 10 mM malonata koji specifično inhibira kompleks II.

3.7.4 Određivanje aktivnosti kompleksa III

Prilikom merenja aktivnosti kompleksa III spektrofotometrijski je praćen pad apsorbanca na talasnoj dužini od 550 nm, usled redukcije oksidovanog citohroma c na temperaturi od 30°C ($\epsilon = 21,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Donor elektrona u reakciji je decilubihinol, dobijen od decilubihinona po metodi Lua i saradnika (Luo *et al.*, 2008). U kivetu za analizu nalaze se mitohondrijski proteini, 25 mM kalijum fosfatni pufer (pH 7,6), BSA (0,1 g/l), Tween20 (0,05 %), inhibitor kompleksa IV -natrijum azid (4 mM), inhibitor kompleksa I - rotenon (4 μM), ATP (0,2 mM) i oksidovani citohrom c (50 μM). Istovremeno je određivana rezidualna aktivnost enzima nakon dodatka inhibitora kompleksa III, antimicina A (1 μM).

3.7.5 Određivanje aktivnosti kompleksa IV

Aktivnost kompleksa IV merena je prateći uputstva Sigminog protokola (Cytochrome c oxidase assay kit, Sigma) koji se zasniva na spektrofotometrijskom praćenju pada apsorbanca na talasnoj dužini od 550 nm usled oksidacije redukovano citohroma c na sobnoj temperaturi ($\epsilon = 21,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Reakciona smeša sastoji se od pufera (10 mM Tris/HCl pH 7, 120 mM KCl) i mitohondrijskih proteina (homogenat žižaka) rastvorenih u puferu za razblaživanje (10 mM Tris/HCl pH 7, 250 mM saharoza, 0,1 mM n-dodecil- β -D-maltozid). Slepna proba sadržala je sve komponente osim mitohondrijskih proteina.

3.7.6 Određivanje koncentracije proteina

Koncentracija ukupnih proteina procenjena je metodom Bredforda i saradnika (Bradford, 1976). Kao standard za određivanje koncentracije proteina korišćen je goveđi serum albumin od kog je pripremljena serija razblaženja za standardnu pravu.

3.7.7 Određivanje specifične aktivnosti ETL kompleksa

Aktivnost enzima izražena je u enzimskim jedinicama (U) po miligramu proteina. Jedinica aktivnosti kompleksa I, II i III definiše se kao količina (μM) redukovano terminalnog akceptora elektrona u minuti (DCIP za kompleks I i II, odnosno oksidovani citohrom c za kompleks III). Jedinica aktivnosti kompleksa IV izražena je u količini (μM) oksidovanog citohroma c u minuti.

3.8 Molekulska karakterizacija laboratorijskih populacija pasuljevog žiška

Molekulske analize obuhvatale su utvrđivanje varijabilnosti 6 mikrosatelitskih lokusa i mitohondrijskog gena za subjedinicu I enzima citohrom c oksidaze (COI). U analizi mikrosatelita korišćeno je ukupno 300 jedinki laboratorijskih populacija *A. obtectus*. Iz B režima analizirano je 60 jedinki, dok je iz E i L režima analizirano po 30 jedinki iz svake populacije (2 režima \times 4 populacije \times 30 jedinki = 240 jedinki). Analiza mitohondrijskog COI gena obuhvatila je ukupno 540 jedinki. Iz B režima analizirano je 60 jedinki, dok je iz E i L režima analizirano po 60 jedinki iz svake populacije (2 \times 4 \times 60 = 480 jedinki). Genotipizirani E žišci bili su više od 220 generacija pod selekcijom za ranu reprodukciju, dok su L žišci selektovani za kasnu reprodukciju tokom više od 160 generacija.

3.8.1 Ekstrakcija DNK iz žižaka

Ukupne nukleinske kiseline ekstrahovane su iz pojedinačnih žižaka po TES (TRIS-EDTA-SDS) protokolu ekstrakcije opisanom od strane Rees *et al.* (2001).

Zarad očuvanja primeraka za moguću fenotipsku karakterizaciju, pod binokularnom lupom izvršeno je pažljivo, obostrano punktiranje primeraka medicinskom sterilnom iglom u lateralnom delu trećeg torakalnog sternita. Svaki pojedinačni punktirani uzorak smešten je u tubicu zapremine 1,5 ml sa 0,4 ml pufera za homogenizaciju (20mM Tris, 10 mM EDTA, 0,5 % SDS) koja je sadržala proteinazu K (187,5 $\mu\text{g/ml}$). Uzorci su inkubirani preko noći na 40°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije, u svaki uzorak dodata je jednaka količina hloroforma (0,4 ml) i DNK je izdvojena centrifugiranjem 10 minuta na 11000 obrt/min na 4°C. Supernatant je prebačen u novu tubicu zapremine 1,5 ml i korak sa hloroformom je ponovljen još

jednom. Izdvojena DNK je iz rastvora istaložena dodavanjem jednake količine izopropanola (0,4 ml) i centrifugiranjem 15 minuta na 12000 obrt/min na 4°C. Izolovana DNK je isprana 96 % etanolom, osušena pod strujom sterilnog vazduha u digestoru i rastvorena u 50 µl TE pufera (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,6). Ekstrahovana DNK je čuvana na -20°C.

3.8.2 Utvrđivanje mikrosatelitske varijabilnosti eksperimentalnih populacija pasuljevog žiška

Za utvrđivanje DNK varijabilnosti jedarnog genoma korišćeno je šest mikrosatelitskih lokusa (*AcobtE01*, *AcobtE07*, *AcobtC12*, *AcobtF01*, *AcobtF09* i *AcobtG08*) (Alvarez *et al.*, 2004). Reverzni prajmeri su obeleženi na 5' kraju fluoroforama NED i HEX (Applied Biosystems) i to: *AcobtE01*, *AcobtE07*, i *AcobtC12* zelenom HEX, dok su *AcobtF01*, *AcobtF09* i *AcobtG08* obeležene žutom NED fluoroforom (Tabela 3.8.2). Mikrosateliti su amplifikovani u dve multipleks reakcije. Prva je sadržala *AcobtC12*, *AcobtE07* i *AcobtF01* prajmere, dok je druga sadržala *AcobtE01*, *AcobtF09* i *AcobtG08*. Za amplifikaciju je korišćen Qiagen Multiplex PCR kit i u finalnoj PCR smeši nalazilo se 5 µl 2× Multiplex PCR Master Mix (Qiagen), 1 µl 5× Q-Solution (Qiagen), 0,2 µM svakog prajmera koji pripada multipleksu i ~ 5 ng ekstrahovane DNK. PCR amplifikacija je uključivala inicijalnu denaturaciju u trajanju od 15 minuta na 95°C, a zatim 30 ciklusa koji su obuhvatili: denaturaciju na 94°C 30 s, elongaciju na 57°C za prvu multipleks smešu, odnosno 60°C za drugu multipleks smešu 90 s i ekstenziju na 72°C 60 s. Nakon 30 ciklusa, primenjena je finalna elongacija na 72°C u trajanju od 10 minuta. Amplifikovani produkti analizirani su na automatskom sekvenatoru ABI Prism 3130 (Applied Biosystems) sa standardom za dužinu ROX500 (Applied Biosystems). Dužina amplifikovanih fragmenata određivana je u softveru GeneScan Analysis v.3.7 i Genotyper v.3.7 (Applied Biosystems). Amplifikacija prajmerima za lokus *AcobtG08* nije bila uspešna, dok se za lokuse *AcobtC12* i *AcobtE01* pokazalo da zbog previše nultih alela imaju vrlo malu heterozigotnost. U analizi molekularne varijanse korišćeni su lokusi *AcobtE07*, *AcobtF01* i *AcobtF09*.

Tabela 3.8.2 Prajmeri korišćeni za amplifikaciju mikrosatelitskih lokusa:

Mikrosatelitski lokus	Sekvenca prajmera u 5'→3' smeru
<i>AcobtC12</i>	F: GATCCTCTGATGCTACATTTGGTC R: GAGCACGAGCACACGCA
<i>AcobtE01</i>	F: ATTCACTTAACCACAATACG R: GCTCCTTGAACCTTCTAC
<i>AcobtE07</i>	F: ACACAGTCATGATGACAGC R: AAGTAGAAAATGACGACGAC
<i>AcobtF01</i>	F: CATAAGGATATTGATTTTCGTC R: TG TTCACAATTT CACAGC
<i>AcobtF09</i>	F: AGCAGACGACAAGCAGCACAC R: CGAGCCGCATACGCATTG
<i>AcobtG08</i>	F: GGTGGAGGGACCGCACAC R: CCTTCGGAATCGTGGATACCC

3.8.3 Utvrđivanje varijabilnosti mitohondrijskog COI gena eksperimentalnih populacija pasuljevog žiška

Od ukupno 60 jedinki poreklom iz B režima 20 je analizirano metodom sekvenciranja umnoženog PCR fragmenta, a 40 metodom analize restrikcionim enzimima (RFLP metoda, engl. *Restriction fragment length polymorphism*). Iz svake populacije poreklom iz E i L režima (4 populacije unutar svakog režima) po 3 jedinke su analizirane metodom sekvenciranja, a 57 RFLP metodom. Metoda sekvenciranja umnoženih fragmenata mtDNA korišćena je u cilju preciznog određivanja nukleotidne sekvence analiziranog fragmenta i opsega varijabilnosti. Na osnovu ovih analiza sprovedena je virtuelna digestija dobijenih sekvenci i definisana RFLP procedura koja je kasnije primenjena na ostale primerke.

3.8.3.1 Amplifikacija COI gena PCR metodom i sekvenciranje

Region mitohondrijske DNK koji kodira subjedinicu I enzima citohrom oksidaze (COI) umnožen je PCR metodom pomoću prajmera LCO1490 i HCO2198 (Folmer *et al.*, 1994) (Tabela 3.8.3.1). Ovi prajmeri kod insekata amplifikuju produkt COI gena mtDNK ukupne dužine 709 bp (engl. *base pair*) zajedno sa prajmerskim pozicijama od 17 do 725 bp ovog gena (658 bp bez prajmera). Ukupna dužina ovog gena iznosi oko 1500 bp, a prva porcija gena koju umnožavaju ovi prajmeri definisana je kao barkod region za identifikaciju i genetičku karakterizaciju insekata (Hebert *et al.*, 2003).

PCR amplifikacija je urađena u Eppendorf Mastercycler[®]ep po sledećem protokolu: inicijalna denaturacija 95°C 5 min; denaturacija 94°C 60 s, elongacija 54°C 60 s, ekstenzija 72°C 90 s (35 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 7 min. PCR smeša je u finalnom volumenu od 20 µl sadržala:

- 2 µl PCR pufera (10×)
- 1,2 µl smeše dNTP-a (smeša je sadržala 2 mM svakog nukleotida)
- 3 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl LCO1490 prajmera (ukupna koncentracija 10 µM)
- 1 µl HCO2198 prajmera (ukupna koncentracija 10 µM)
- 0,4 µl Taq polimeraze (Fermentas; koncentracije 5 jedinica/µl)
- 1 µl 1:10 razređene ekstrahovane DNK uzorka (koncentracije ~ 50 µg/µl)

Tabela 3.8.3.1 Prajmeri korišćeni za amplifikaciju COI i 12S rRNK:

Region	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera u 5'→3' smeru
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG
	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA
	2183	CAACATTTATTTTGATTTTTTTGG
	UAE8	AAAAATGTTGAGGGAAAAATGTTA
12S rRNK	12SAI	AAACTAGGATTAGATACCCTATTAT
	12SBI	AAGAGCGACGGGCGATGTGT

Da bi se eliminisala mogućnost unakrsne kontaminacije tokom pripreme uzoraka, na svakih 10 uzoraka stavljana je negativna kontrola. Negativnu kontrolu je predstavljala dodatna tubica sa svim reagensima potrebnim za umnožavanje DNK, ali je umesto 1 µl uzorka sipan 1 µl vode (Molecular Biology Grade Water, Eppendorf). Da bi se proverila uspešnost sinteze COI regiona mtDNK uzoraka, kao i da nije došlo do amplifikacije u negativnim kontrolama, 5 µl PCR produkta svakog uzorka pušteno je na horizontalnu elektroforezu (korišćen je 1 % agarozni gel obojen etidijum bromidom), nakon čega je urađena vizuelizacija pod UV transluminatorom.

Kod dve jedinke *A. obtectus*, kod kojih je utvrđena značajna genetička divergencija na COI genu u odnosu na sve druge analizirane jedinke, ali i dostupne sekvence ovog gena za vrstu *A. obtectus* u NCBI bazi (engl. *National Center for Biotechnology Information*), sprovedene su dodatne analize. Prva analiza je obuhvatala amplifikaciju COI gena sa 2183 (Simon *et al.*, 1994) i UAE8 (Lunt *et al.*, 1996) prajmerima (Tabela 3.8.3.1) koji umnožavaju zadnju porciju ovog gena od 688 do 1285 bp (ukupna dužina fragmenta 597 bp), a druga amplifikaciju fragmenta dužine 1268 bp upotrebom prajmera koji obuhvataju skoro ceo COI gen (LCO1490 i UAE8). Uslovi reakcije primenjeni na reakcionu smešu sa 2183-UAE8 prajmerima (3 mM MgCl₂, 0,4 mM dNTPs, 0,7 µM prajmeri, 0,75 U Fermentas *Taq* polimeraze) bili su sledeći: inicijalna denaturacija 94°C 3 min; denaturacija 94°C 60 s, elongacija 48°C 60 s, ekstenzija 72°C 90 s (30 ciklusa); finalna ekstenzija 72°C 7 min. Sadržaj reakcione smeše za amplifikaciju dugačkog fragmenta COI gena sa LCO1490 i UAE8 prajmerima bio je isti kao protokol amplifikacije sa LCO1490-HCO2198 prajmerima, dok su uslovi reakcije bili isti kao za 2183-UAE8, osim što je vreme ekstenzije produženo na 3 min.

Amplifikovani produkti COI gena mtDNK namenjeni za sekvenciranje, prečišćeni su pomoću QIAquick[®] PCR Purification Kit-a (QIAGEN) prateći upustvo proizvođača. Provera čistoće prečišćenih uzoraka izvršena je na 1 % agaroznom gelu. Njihova molekulska težina i količina DNK određena je vizuelnim poređenjem sa markerom DNA 100 Bp DNA Ladder (SERVA). Reakcije sekvenciranja su urađene u BMR Genomics (Padova, Italy) na ABI Prism 3700 automatskom kapilarnom sekvenatoru. Amplifikovani COI gen svakog uzorka je sekvenciran u oba smera upotrebom oba prajmera koja su korišćena za amplifikaciju DNK.

Za kompletiranje dobijenih sekvenci COI gena korišćen je program FinchTV (dostupan na <http://www.geospiza.com/>). Pomoću softverskog paketa MEGA 4.0 (Tamura *et al.*, 2007), sekvence su analizirane radi utvrđivanja nukleotidnih razlika, razdvajanja haplotipova, kao i identifikaciju značajnih supstitucijskih mesta. Međusobno poređenje sekvenci vršeno je u CLUSTAL W (Thompson *et al.*, 1994) programu integrisanom unutar programa MEGA 4.0. Dobijene sekvence su upoređene BLAST (engl. *Basic Local Alignment Search Tool*) analizom sa dostupnim sekvencama COI gena vrste *A. obtectus* u NCBI bazi.

3.8.3.2 *Virutelna in silico restrikciona analiza i RFLP*

U cilju utvrđivanja restrikcionih enzima pogodnih za jednostavno detektovanje različitih haplotipova, dobijene sekvence su eksportovane u *in silico* restrikcionu analizu i analizu obrazaca razdvajanja restrikcionih fragmenata na virtuelnom gelu u programu pDRAW32, razvijenog od strane AcaClone Software (www.acaclone.com). U ovom programu je urađena virtuelna digestija sekvence COI gena svih registrovanih haplotipova. Analiza je pokazala da je smeša restrikcionih enzima *AluI* (AG'CT) i *Hpy8I* (GTN'NAC) (Fermentas) najpogodnija za identifikaciju specifičnih COI haplotipova, u smislu broja i dužine restrikcionih fragmenata. Naime, enzimaska digestija LCO1490/HCO2198 COI PCR produkta pomoću *AluI* i *Hpy8I* restrikcionih enzima dovodi do nastanka:

- 1) restrikcionog profila haplotipa H1 koji se sastoji od tri fragmenta dužine 299, 190 i 157 bp;
- 2) restrikcionog profila haplotipa H2 koji se sastoji od četiri fragmenta dužine 192, 190, 157 i 107 bp;
- 3) restrikcionog profila haplotipa H3 koji se sastoji od dva fragmenta dužine 487 i 157 bp.

Digestija je urađena u ukupnoj zapremini od 15 μ l RFLP smeše koja je sadržala 1x pufer za digestiju, 1U oba enzima, 1-5 μ l PCR produkta u zavisnosti od prinosa svakog pojedinačnog umnoženog PCR produkta, i 8-12 μ l H₂O (Eppendorf). Digestija je trajala 16 sati na temperaturi od 37°C u skladu sa uputstvom proizvođača. Produkti digestije su razdvojeni vertikalnom elektroforezom na 13 % poliakrilamidnom gelu u TBE puferu (Tris-Borate 90 mM, EDTA 1 mM), a zatim obojeni etidijum bromidom, čime je omogućena vizuelizacija pod UV transiluminatorom.

3.8.4 Populaciono-genetička analiza laboratorijskih populacija korišćenjem mikrosatelitskih genotipova i mitohondrijskih haplotipova

Kako bismo matematički razložili izvore genetičke varijabilnosti jedarnog i mitohondrijskog genoma na individualnu i međugrupnu varijansu (između eksperimentalnih režima) primenjena je hijerarhijska analiza molekularne varijanse (AMOVA). Stepenn međupopulacione diferencijacije mikrosatelitskih genotipova opisan je Rajtovom F statistikom - upotrebom F_{ST} indeksa. Populaciono-genetička analiza mikrosatelitskih genotipova obuhvatila je izračunavanje vrednosti dobijene (H_D) i očekivane (H_O) heterozigotnosti i koeficijenta inbridinga (F_{IS}) koji procenjuje smanjenje heterozigotnosti usled neslučajnog ukrštanja u laboratorijskim populacijama (povećanje homozigotnosti u odnosu na očekivane učestalosti homozigota okarakterisano pozitivnim vrednostima F_{IS}). Za procenu diferencijacije između parova populacija prema mtDNK haplotipovima korišćen je parametar F_{ST} modifikovan za haploidne podatke. Sve analize sprovedene su u programu Arlequin, verzija 3.5.1.2 (Excoffier *et al.*, 1992).

3.8.5 Test na prisustvo *Wolbachia*

Veliki broj literarnih podataka ukazuje da kod insekata infekcija unutarćelijskom, α -proteobakterijom iz roda *Wolbachia*, koja se vertikalno nasleđuje preko citoplazme jajne ćelije, u značajnoj meri oblikuje varijabilnost mtDNK unutar populacije. Naime, infekcija ovom bakterijom, za koju je procenjeno da inficira 65 % vrsta insekata (10^6 vrsta; Hilgenboecker et al. 2008), značajno utiče na reproduktivne sposobnosti domaćina (Werren et al., 2008). Najčešće dolazi do citoplazmatske inkompatibilnosti, tj. nepodudarnosti jajne ćelije i spermatozoida u ukrštanjima između neinficirane ženke i inficiranog mužjaka, što uzrokuje zaustavljanje razvića embriona (Werren et al., 2008). Ovakav reproduktivni parazitizam dovodi do povećanja učestalosti inficiranih jedinki u populaciji, odnosno soja *Wolbachia* sa kojim se prenosi i specifični mtDNK haplotip (Jiggins, 2003). Dodatno, pokazano je da *Wolbachia* značajno utiče i na osobine adaptivne vrednosti, posebno na dugovečnost (Driver et al., 2004). Zbog svega navedenog, provera eksperimentalnih linija *A. obtectus* na prisustvo *Wolbachia* neophodna je za validnu interpretaciju odnosa između mitohondrija i jedra, kao i njihovih posledica za evoluciju osobina životne istorije.

Testiranje eksperimentalnih linija *A. obtectus* na prisustvo *Wolbachia* obavljeno je PCR metodom uz pomoć prajmera specifičnih za *Wolbachia* 16S rRNK:

76-99 forward (5'-TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT-3') i

1012-994 reverse (5'-GAATAGGTATGATTTTCATGT-3') (O'Neill et al., 1992).

Prajmeri umnožavaju fragment dužine 869 bp. Za kontrolu kvaliteta DNK izolacije korišćeni su prajmeri specifični za mitohondrijsku 12S rRNK insekata - 12SAI i 12SBI (O'Neill et al., 1992) (Tabela 3.8.3.1). Kao pozitivne kontrole na prisustvo *Wolbachia* korišćene su zaražene linije *D. melanogaster* stock br. 5 (Bloomington Stock Center, SAD). U analizi je korišćena ukupna genomska DNK 50 žižaka iz B linije i po 60 žižaka iz E i L linije (15 jedinki po populaciji). PCR amplifikacija je uključivala inicijalnu denaturaciju u trajanju od 15 minuta na 94°C, a zatim 35 ciklusa koji su obuhvatili: denaturaciju na 95°C 60 s, elongaciju na 52°C 60 s i ekstenziju na 72°C 60 s.

Nakon 35 ciklusa, primenjena je finalna elongacija na 72°C u trajanju od 10 min. PCR smeša je u finalnom volumenu od 20 µl sadržala:

- 11,24 µl H₂O
- 2 µl PCR pufera (10×)
- 2 µl smeše dNTP-a (smeša je sadržala 2 mM svakog nukleotida)
- 2 µl MgCl₂ (25 mM)
- 0,8 µl „76-99 forward“ prajmera (ukupna koncentracija 10 µM)
- 0,8 µl „1012-994 reverse“ prajmera (ukupna koncentracija 10 µM)
- 0,16 µl Taq polimeraze (koncentracije 5 jedinica/µl)
- 1 µl 1:10 razređene ekstrahovane DNK uzorka (koncentracije ~ 50 µg/µl)

3.9 Demografske analize

Neizostavan analitički metod u komparativnim analizama starenja predstavlja određivanje uzrasno-specifičnih stopa mortaliteta. Možemo ih definisati kao uzrasno-specifične verovatnoće umiranja jedinki unutar većih kohorti usled pogoršanja svih aspekata funkcionisanja organizma (tzv. intrinzički mortalitet). Njihova prednost u odnosu na druge demografske parametre jeste nezavisnost stope smrtnosti od događaja u drugim uzrasnim dobima. Na taj način, moguće je uporediti uzrasno-specifične stope mortaliteta između dve populacije. Ova poređenja zahtevaju primenu specifičnih matematičkih modela mortaliteta koji omogućavaju da se podaci iz obimnih tablica života, opisani krivama preživljavanja i mortaliteta, sumiraju, interpretiraju i razlože kao zbir doprinosa nekoliko demografskih parametara. Najzastupljeniji, osnovni Gompercov model, oslanja se na pretpostavku da se verovatnoća umiranja eksponencijalno povećava nakon dostizanja reproduktivne zrelosti. Osnovna Gompercova funkcija definisana je jednačinom:

$$u_{(x)} = ae^{bx}$$

gde $u_{(x)}$ predstavlja stopu mortaliteta u uzrastu x , a označava inicijalnu, bazičnu ili uzrasno-nespecifičnu stopu mortaliteta i b opisuje uzrasno-specifičnu ili eksponencijalnu stopu mortaliteta. Ujedno, parametar a predstavlja tačku u kojoj Gompercova funkcija preseca y-osu i opisuje vigor genotipa (genetički determinisanu osetljivost populacije na uzročnike intrinzičkog mortaliteta). Nagib Gompercove

funkcije definisan je parametrom b i interpretira se i kao stopa starenja populacije. Dakle, primenom Gompercovog modela u mogućnosti smo da promenu u dugovečnosti između dve populacije izrazimo preko odnosa promene inicijalne stope smrtnosti, koja nije povezana sa procesima starenja, i eksponencijalne stope smrtnosti koja predstavlja meru starenja.

Svi ostali pristupi iz Gompercove familije matematičkih modela mortaliteta, kao što su Gomperc-Makenhamov i logistički model, predstavljaju modifikacije osnovnog modela i sadrže dodatni, model-specifični, treći parametar (Pletcher *et al.*, 2000). Na primer, logistički model dozvoljava, nakon eksponencijalnog rasta krivih mortaliteta, usporavanje stope starenja u kasnijem uzrastu i nivelisanje (poravnanje) krivih. Funkcija logističkog modela opisana je jednačinom $u_{(x)} = ae^{bx} / 1+s(a/b)(e^{bx} - 1)$, u kojoj se, pored gore opisanih parametara, javlja parametar s koji označava smanjenje stope starenja u kasnijem uzrastu. Interesantno je uočiti da osnovni Gompercov model mortaliteta predstavlja specifičan oblik logističkog modela kada je $s = 0$.

U analizi krivih mortaliteta velikih grupa jedinki često se primenjuje metoda dvostepenog Gomperca (engl. *two-stage Gompertz*; Fukui *et al.* 1993). Dvostepeni Gomperc, slično logističkom modelu, opisuje eksponencijalni rast krivih mortaliteta koje u kasnijem uzrastu dostižu plato. Dan u kome kriva mortaliteta prelazi iz eksponencijalnog rasta u plato naziva se **prelomni dan** (Pd). Da bi se odredio Pd za svaku populaciju, selekcionu režim ili eksperimentalnu grupu, analizirano je više kasnijih uzrasta u kojima kriva mortaliteta ulazi u poravnanje i statistički je određena značajnost eksponencijalnog modela krive mortaliteta (korišćenjem programa GraphPad Prism 5). Uzrast u kasnijem dobu u kome R^2 ima najveću vrednost, uzima se za prelomni dan te populacije. Za sve uzraste pre prelomnog dana ($x \leq Pd$) uzrasno-specifične stope mortaliteta rastu eksponencijalno i opisane su Gompercovom jednačinom $u_x = ae^{bx}$ (Shahrestani *et al.*, 2016). Za dane $x > Pd$, stopa mortaliteta jednaka je vrednosti A (engl. *plateau mortality rate*). Vrednost A predstavlja stopu mortaliteta u danu $x = Pd + 1$, jer nakon tog uzrasta kriva mortaliteta ulazi u plato (pogledati Uvod, Slika 1.1.1). Razlika između dvostepenog Gomperca i logističkog modela mortaliteta jeste u tome što dvostepeni Gomperc izbegava korišćenje parametra s koji nema jasan biološki značaj. Ovaj parametar zamenjen je prelomnim danom i

stopom mortaliteta u platou - značajnijim parametrima za analizu evoluciono bioloških teorija starenja.

Određivanje parametara osnovnog Gomperevog i logističkog modela mortaliteta vršena su u programu WinModest (Pletcher, 1999). Pomoću ovog programa testirane su i razlike u parametrima a , b ili s , između analiziranih grupa, korišćenjem testa logaritamskog indeksa verodostojnosti (engl. *log-likelihood-ratio*).

Za opis i poređenje krivih mortaliteta neukrštanih i ukrštanih ženki i mužjaka poreklom iz B, E i L selekcionih režima unutar istog pola, kao i za poređenje ženki i mužjaka unutar istog selekcionog režima, korišćen je model dvostepenog Gompereca. Uticaj pesticida na krive mortaliteta B, E i L žižaka, odnosno mito-jedarnih linija, analiziran je pomoću osnovnog Gomperevog modela. Ovaj osnovni model je u ovom eksperimentu mogao biti korišćen budući da tretman pesticidima dovodi do gubljenja platoa u krivama mortaliteta. Pošto na većim koncentracijama nije preživelo dovoljno jedinki da bi analize krivih preživljavanja i mortaliteta bile pouzdane, analizirane su samo grupe koje su tretirane malim koncentracijama rastvora pesticida (1 % i 5 % rastvor parakvata i 0,5 % i 1,5 % rastvor tebufenpirada). Za opis i poređenje krivih mortaliteta neukrštanih i ukrštanih ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa narušenim i očuvanim mito-jedarnim interakcijama ($E \times E$ i $L \times E$, odnosno $L \times L$ i $E \times L$) korišćen je logistički model.

3.10 Statistička obrada podataka

Srednje vrednosti i standardne greške osobina životne istorije, osobine reproduktivnog ponašanja, aktivnosti kompleksa I, II, III i IV mitohondrijskog ETL i preživljavanja nakon 24-časovnog tretmana pesticidima izračunati su PROC MEANS procedurom u SAS softverskom paketu (SAS Institute, 2010). Parna poređenja prosečnih vrednosti fenotipskih osobina između grupa izvršena su t-testom, Tukey i Scheffe post-hoc testovima (PROC TTEST i PROC GLM; 9.3 SAS Institute 2010).

Mešani model analize varijanse korišćen je za analizu uzroka variranja preadultnih osobina (vijabilitet, trajanje razvića i masa tela), ranog, prvog i poslednjeg dana fekunditeta osnovne populacije i laboratorijskih populacija selektovanih za ranu i kasnu reprodukciju. Fiksirane faktore u analizi predstavljali su selekcionni režim, pol i

njihova interakcija. Imajući u vidu da su eksperimentalne populacije definisane selekcionim režimom, efekat populacije ugnježđen je u selekcionu režim i predstavljao je nasumičan (engl. *random*) faktor u modelu. Kako bi bili zadovoljeni uslovi parametarskih testova - normalnost podataka i homogenost varijanse za podatke koji se nalaze u opsegu od 0 do 1, vrednosti vijabiliteta su transformisane arc sin kvadratni koren transformacijom.

Prilikom analize adultnih osobina (ukupni fekunditet i dužina života ukrštanih i neukrštanih žižaka) korišćen je mešani model analize kovarijanse. Masa i ukupni fekunditet figurirali su kao kovarijable u analizi dužine života ukrštanih ženki, dok je u svim ostalim analizama kovarijablu predstavljala samo masa. Kao i u prethodnom modelu, efekti populacije su ugnježđeni u selekcionu režim i predstavljali su nasumičan faktor. Vrednosti dužine života su logaritmovane da bi zadovoljili uslove normalnosti raspodele i homogenosti varijanse.

Mešani model analize varijanse korišćen je za analizu uticaja 24-časovnog tretmana pesticida (parakvat i tebufenpirad) na preživljavanje i dužinu života B, E i L žižaka, gde su selekcionu režim, pol i njihova interakcija predstavljali fiksirane faktore u modelu. Podaci za preživljavanje transformisane su arc sin kvadratni koren transformacijom, a vrednosti dužine života \log_{10} transformacijom.

Formiranje mito-jedarnih linija omogućilo je testiranje efekata mitohondrija, jedra i njihove epistatičke interakcije na variranje osobina životne istorije. U analizi varijanse preadultnih osobina (vijabilitet, trajanje razvića i masa tela) i aktivnosti enzima mitohondrijskog ETL (kompleks I, II, III i IV) fiksirane faktore predstavljali su mitohondrija, jedro, pol i njihove interakcije, dok su nasumičan faktor predstavljale mt-j linije ugnježdene u interakciju mitohondrija \times jedro. Masa je korišćena kao kovarijabla u ANCOVA analizi dužine života neukrštanih i ukrštanih ženki i mužjaka sa očuvanim i narušenim mito-jedarnim interakcijama, kao i ukupnog fekunditeta. Pored mase, u analizi variranja vrednosti dužine života ukrštanih ženki dodatnu kovarijablu je predstavljao u ukupni fekunditet. Analiza varijanse urađena je i prilikom testiranja efekta mitohondrija, jedra, 24-časovnog blagog tretmana pesticidima (0,5 % parakvat i 1,5 % tebufenpirad) i njihove interakcije na preživljavanje i dužinu života mito-jedarnih grupa. Logaritamska transformacija vrednosti dužine života i arc sin kvadratni koren

transformacija vrednosti vijabiliteta zadovoljavale su pretpostavke normalne raspodele podataka. Mešani modeli analize varijanse i kovarijanse urađeni su procedurom PROC GLM u SAS softveru (SAS Institut 2010).

Kako bi se uočila veza između osobina životne istorije mito-jedarnih grupa i dinamike starenja sa mitohondrijskim bioenergetskim procesima izračunati su parcijalni korelacioni koeficijenti za svaku od tri osobine životne istorije (trajanje razvića, dužina života i masa neukrštanih žižaka) i tri parametra logističkog modela mortaliteta (a , b i s) gde su kao nezavisne varijable korišćene aktivnosti kompleksa I, II, III i IV koji čine mitohondrijski ETL. U analizi su korišćene srednje vrednosti osobina svake od pet mito-jedarnih populacija poreklom iz četiri mito-jedarne linije. Ujedno, testovi su urađeni unutar svakog pola ($N = 10$), kao i na uzorcima kada su oba pola zajedno analizirana ($N = 20$). Kako bi utvrdili uticaj svakog od četiri kompleksa na variranje osobina adaptivne vrednosti i demografsku dinamiku, primenjena je multivarijantna regresiona analiza čiji model je uključivao aktivnosti sva četiri kompleksa kao prediktore. Multivarijantna regresiona analiza urađena je prema sledećem linearnom modelu:

$$\text{osobina životne istorije} = \text{konstanta} + \beta \times [\text{prediktori (kompleks I, II, III i IV)}]$$

Svi testovi urađeni su PROC CORR i PROC REG procedurom u SAS softverskom paketu (SAS Institut 2010).

4. REZULTATI

4.1 Analiza osobina životne istorije laboratorijskih populacija pasuljevog žiška

4.1.1 Efekat selekcionih tretmana na preadultne osobine životne istorije

Cilj ovog eksperimenta bio je da se analiziraju efekti višegeneracijske selekcije za vreme reprodukcije na variranje tri preadultne osobine: preadultni vijabilitet, trajanje razvića i masu tela.

Srednje vrednosti i standardne greške za osobinu preadultni vijabilitet su prikazane na Slici 1. Jednofaktorska ANOVA pokazala je da primenjeni selekcionni tretmani nisu doveli do značajnih razlika u procentu izleženih adulata (Slika 1; $F_{2, 3,04} = 0,73$, $P = 0,5508$). S druge strane, mešani model analize varijanse pokazao je da selekcionni režim ima značajan efekat na ukupnu varijansu trajanja razvića (Tabela 1). Nezavisno od pola, žišci selektovani za ranu reprodukciju imaju značajno kraće razviće od L i B žižaka (Scheffe test: $P < 0,05$), dok selekcija za kasnu reprodukciju (L selekcionni režim) nije značajno promenila trajanje razvića u odnosu na osnovnu populaciju (Slika 1). Značajan efekat pola i izostanak interakcije selekcionog režima i pola u mešanom modelu analize varijanse, ukazuju na opšti trend ranijeg završavanja preadultnog razvića mužjaka u odnosu na ženke, tj. da je fenomen protandrije nezavisan od selekcionog režima (Tabela 1).

Budući da je pasuljev žižak fakultativni afag i da u laboratorijskim uslovima koristi samo resurse koje usvoji tokom larvenog razvića, masa tela je, u ovim analizama, posmatrana kao preadultna osobina. Trofaktorska ANOVA je pokazala da se žišci poreklom iz različitih režima, nezavisno od pola, značajno razlikuju u masi tela. Selekcija za različito vreme reprodukcije rezultirala je razvićem sitnijih jedinki u E i krupnijih jedinki u L režimu (Slika 1; statistički značajan efekat selekcionog režima u Tabeli 1). Veća masa tela ženki u odnosu na mužjake predstavlja karakteristiku polnog dimorfizma vrste i može se uočiti kako u osnovnoj tako i u selekcionisanim populacijama (Slika 1; statistički značajan efekat pola u Tabeli 1). Značajna interakcija režima i pola, zajedno sa rezultatima srednjih vrednosti, ukazuje da su razlike u masi između mužjaka i ženki izraženije u L, nego u B i E selekcionom režimu (Slika 1; Tabela 1).

4.1.2 Efekat selekcionih tretmana na adultne osobine životne istorije

4.1.2.1 Efekat selekcionih režima na dužinu života i preživljavanje neukrštanih žižaka

Imajući u vidu da je, u mnogim studijama, pokazano da je masa tela pozitivno korelisana sa dužinom života, u statističkim modelima analize varijanse, kroz uvođenje mase kao kovarijable, izuzet je efekat ove osobine na ukupnu varijansu dugovečnosti. Uticaji glavnih faktora i njihovih interakcija, stoga, analizirani su nezavisno od akumulacije resursa tokom preadultnog razvića. Rezultati ukazuju da nezavisno od pola, a u odnosu na B režim, selekcija za ranu reprodukciju (E) dovodi do značajnog smanjenja srednje vrednosti dužine života, dok je selekcija za kasnu reprodukciju imala suprotan trend (Slika 2; statistički značajan efekat selekcionog režima u Tabeli 2, neukrštane). Tačnije, pokazano je da neukrštane ženke i mužjaci poreklom iz L režima u proseku žive 6 dana (37,5 %) duže od B žižaka, i duplo duže (12 dana tj. 119 %) od E žižaka. Iako u proseku ženke žive duže od mužjaka (značajan faktor pol u Tabeli 2, neukrštane), polni dimorfizam nije jednako izražen u različitim selekcionim režimima (značajna interakcija selekcionog režim \times pol u Tabeli 2). Naime, dok u L i B režimu ženke žive 21 % i 22 % duže od mužjaka, u E selekcionom režimu ovaj trend se gubi. Mešani model ANCOVA pokazao je i značajnu varijabilnost u dužini života neukrštanih žižaka između populacija (značajan faktor populacija u Tabeli 2). Međutim, naknadna dvofaktorska ANCOVA unutar selekcionih režima pokazala je značajnu međupopulacionu divergenciju u prosečnoj dužini života samo unutar L režima ($F_{3, 1180} = 47,85, P < 0,0001$). Populacije L_1 i L_2 žive u proseku 3 dana (oko 13 %) duže od populacija L_3 i L_4 (Tukey test: $P < 0,05$). Zbog značajnog efekta pola i njegove interakcije sa selekcionim režimom u ukupnom variranju dužine života, urađena je dodatna analiza kovarijanse u okviru svakog pola (Tabela 3, neukrštane). Ovim je potvrđeno da višegeneracijske razlike u pravcima selektivnih pritisaka na vreme reprodukcije rezultiraju divergencijom u dužini života ženki i mužjaka pasuljevog žižaka, što je trend koji se uočava kod jedinki koje nisu reproduktivno aktivne (značajan efekat selekcionog režima u Tabeli 3).

Krive preživljavanja ženki i mužjaka sve tri analizirane grupe (B, E i L) predstavljene su na Slici 2. Rezultati χ^2 testa pokazuju da se sve kombinacije parnih poređenja krivih preživljavanja (kako između selekcionih režima unutar istog pola, tako i između polova unutar režima) statistički značajno razlikuju. Nezavisno od pola, najranije počinju da umiru E žišci, a najkasnije žišci iz L režima.

S obzirom na to da krive preživljavanja ne daju uvid u dinamiku promena uzrasno-specifične verovatnoće umiranja ženki i mužjaka poreklom iz različitih režima, urađeno je poređenje parametara Gompercovog modela. Naime, razlika u prosečnoj dužini života između dve grupe organizama može biti rezultat razlike u inicijalnoj stopi mortaliteta (parametar $\ln a$) i/ili razlike u stopi povećanja verovatnoće umiranja sa uzrastom (parametar b). Sva poređenja demografskih parametara između režima u okviru istog pola, predstavljena su u Tabeli 4. U odnosu na osnovnu (kontrolnu) populaciju (B režim), selekcija za ranu reprodukciju kod oba pola rezultovala je ranijim otpočinjanjem umiranja (statistički značajno veći parametar $\ln a$; Tabela 4, neukrštane ženke i mužjaci, poređenje B-E), dok je eksponencijalna stopa mortaliteta ostala nepromenjena (parametar b ; Tabela 4, neukrštane ženke i mužjaci, poređenje B-E). S druge strane, iako selekcija za kasnu reprodukciju dovodi, kod oba pola, do značajnog povećanja inicijalnog mortaliteta (veći parametar $\ln a$) u odnosu na referentni B režim, L žišci skoro trostruko sporije stare (manji parametar b , neukrštane ženke i mužjaci, poređenje B-L, Tabela 4). Rezultati demografskih poređenja kod neukrštanih žižaka poreklom iz E i L režima pokazuju da je dvostruko povećanje dužine života L žižaka u odnosu na E žiške prevashodno posledica značajnog usporavanja stope starenja (neukrštane ženke i mužjaci, poređenje E-L, Tabela 4). Analiza ostalih parametara dvostepenog Gomperca potvrdila je predviđanja evolucione teorije nastanka platoa u krivama mortaliteta. Naime, pokazane su značajne razlike u prelomnom danu između E i L ženki i mužjaka (parametar Pd u Tabeli 4, neukrštane; t-test: ženke: $t = 9,67$, $df = 6$, $P < 0,0001$; mužjaci: $t = 5,60$, $df = 6$, $P = 0,0014$). Dodatno, t-testom je pokazano da kod ženki ne postoji razlika u visini platoa (parametar A u Tabeli 4, neukrštane), odnosno verovatnoća umiranja pri ulasku u kasnu fazu života je ista (t-test: $t = -2,74$, $df = 3,19$, $P = 0,07$), ali kod mužjaka razlika postoji i ukazuje na veću stopu umiranja E mužjaka (t-test: $t = -4,13$, $df = 6$, $P = 0,006$).

Statistički značajna interakcija između selekcionog režima i pola, dobijena mešanim modelom analize kovarijanse (neukršthane, Tabela 2), ukazuje da postoji različit odgovor polova na selekciju za vreme reprodukcije. Ovakav rezultat zahtevao je dodatna testiranja dužine života i Gompercovih parametara $\ln a$ i b između polova unutar svakog režima (Tabela 5). Pokazalo se da neukršthane ženke poreklom iz L režima žive 17 % duže od mužjaka (Slika 2; t-test: $t = 14,32$, $df = 1184$, $P < 0,0001$) i to usled značajnog smanjenja stope starenja (statistički značajna razlika u parametru b , Tabela 5). Iako je razlika u dužini života između polova unutar B režima slična razlici u L režimu (neukršthane ženke žive 21 % duže od mužjaka; t-test: $t = 10,64$, $df = 356$, $P < 0,0001$), ne postoje značajne razlike u parametrima $\ln a$ i b (neukršthane, Tabela 5). Ovakav rezultat predstavlja posledicu zajedničkog dejstva manjeg inicijalnog mortaliteta i neznatno veće stope starenja ženki u odnosu na mužjake. Međutim, suprotan trend u odnosu na prethodna dva režima uočen je kod neukrštanih ženki i mužjaka poreklom iz E režima. Naime, mužjaci žive 3 % duže od ženki (t-test: $t = -2,84$, $df = 1194$, $P = 0,0046$). Analiza Gompercovih parametara pokazala je da, iako E ženke sporije stare, one počinju da umiru pre E mužjaka što uzrokuje značajno smanjenje srednje dužine života ženki (statistički značajne razlike u parametrima $\ln a$ i b , neukršthane, Tabela 5).

4.1.2.2 Efekat selekcionih režima na dužinu života i preživljavanje ukrštanih žižaka

Kao i kod većine insekata, reproduktivna aktivnost umanjuje dugovečnost žižaka, nezavisno od pola i selekcionog režima (Slike 2 i 3). Mešani model analize sa masom kao kovarijablom, nije utvrdio efekat selekcionog režima na dužinu života ukrštanih žižaka. Međutim, imajući u vidu značajne efekte pola i njegove interakcije sa selekcionim režimom (Tabela 2), kao i predviđanja da ženke više ulažu u reprodukciju od mužjaka, analize kovarijanse urađene su u okviru svakog pola (ukršthane, Tabela 3). Budući da dužina života ženki zavisi, pored mase tela, i od ukupnog broja položenih jaja, obe osobine su uključene kao kovarijable (Tabela 3). Ženke poreklom iz različitih režima statistički se značajno razlikuju u dužini života (Slika 3; značajan efekat selekcionog režima, Tabela 3; Tukey test za sve parove poređenja: $P < 0,0001$). Kod mužjaka, iako je selekcija za različito vreme reprodukcije načelno značajno uticala na

dužinu života (značajan efekat selekcionog režima, Tabela 3), nije bilo razlike između B i E režima (Tukey test: $P = 0,3754$), dok su poređenja B-L i E-L ove razlike potvrdile ($P < 0,0001$). Oblik krivih preživljavanja bio je različit u svim poređenjima, uključujući i poređenje B i E mužjaka koji imaju sličnu dužinu života (χ^2 test: $P = 0,018$).

Komparativne analize Gompercovih parametara E i L populacija u odnosu na osnovni režim (izuzetak je B-E poređenje kod mužjaka) pokazala su da razlike u dužini života proizilaze prevashodno iz razlike u stopi starenja (ukrštane, Tabela 4). Poređenje E i L režima ukazuje na polno-specifičan odgovor populacija pasuljevog žiška na selekciju za različito vreme reprodukcije. Razlika u dužini života između E i L ženki u najvećoj meri potiče od razlike u stopi starenja. Naime, iako imaju niži inicijalni mortalitet, E ženke imaju trostruko veću brzinu starenja od L ženki (statistički značajno različiti parametri $\ln a$ i b , Tabela 4). Za razliku od ženki, stope starenja kod L i E mužjaka su slične, ali L mužjaci znatno kasnije počinju da umiru od E mužjaka (značajna razlika u parametru $\ln a$, Tabela 4).

Testiranje vremena ulaska u kasnu fazu života između ukrštanih E i L mužjaka i ženki, analizom dvostepenog Gomperca, potvrdilo je teorijska predviđanja evolucione teorije po kojima se očekuje da žišci poreklom iz E režima ranije dostižu plato u krivama mortaliteta u odnosu na jedinke iz L režima (parametar Pd u Tabeli 4, ukrštane ženke: t-test: $t = 5,72$, $df = 6$, $P = 0,0012$; ukrštani mužjaci: t-test: $t = 7,35$, $df = 6$, $P = 0,0003$). Dodatno, reproduktivna aktivnost nije promenila trend uočen kod neukrštane grupe žižaka: verovatnoća umiranja u kasnoj fazi života značajno se razlikuje između E i L mužjaka, dok kod ženki ta razlika ne postoji (parametar A u Tabeli 4; ukrštane ženke: t-test: $t = -2,10$, $df = 6$, $P = 0,08$; ukrštani mužjaci: t-test: $t = -3,46$, $df = 6$, $P = 0,013$).

Mešani model analize kovarijanse pokazao je da ukrštane ženke u proseku žive duže od mužjaka (Slika 3; statistički značajan faktor pol, Tabela 2), iako je ta razlika marginalna u slučaju L režima (t-test: $t = 1,95$, $df = 217$, $P = 0,0527$). Analiza Gompercovih parametara u L režimu pokazala je da ženke počinju ranije da umiru, ali je stopa starenja skoro dvostruko sporija nego kod mužjaka (ukrštane, Tabela 5). Kada se ovaj odnos uporedi sa odnosom parametara neukrštanih L ženki i mužjaka, može se izvesti zaključak da reproduktivna aktivnost i polaganje jaja iniciraju raniji početak

umiranja kod L ženki, ali ne menjaju odnos u stopi starenja (neukršthane, Tabela 5). Poređenje Gompercovih parametara ukrštanih B mužjaka i ženki pokazuje polni dimorfizam u obrascu starenja sličan obrascu ukrštanih L žižaka (Tabela 5). Interesantan rezultat uočen je kod E režima gde polno-specifične razlike u demografskom obrascu starenja imaju suprotan trend u odnosu na B i L režim. Naime, ženke skoro dvostruko brže stare od mužjaka, ali imaju niži inicijalni mortalitet (ukršthane, Tabela 5). Jedno od ponuđenih objašnjenja ovakvog rezultata podrazumeva da je selekcija za energetski skupu ranu reprodukciju favorizovala ženke koje su robusnije u ranim fazama života. Zanimljivo je da, iako unutar selekcionih režima za različito vreme reprodukcije dolazi do evolucije potpuno različitih obrazaca demografskih dinamika, oni rezultiraju većom dužinom života kod ukrštanih ženki u odnosu na ukršthane mužjake (Slika 3; E, B i L režim, ukršthane, Tabele 2 i 5).

4.1.2.3 Efekat selekcionih režima na fekunditet ženki

Srednje vrednosti i standardne greške nekoliko osobina - prvi i poslednji dan polaganja jaja, rani i ukupni fekunditet ženki poreklom iz B, E i L selekcionih režima, prikazane su u Tabelama 6 i 7. Selekcioni režim za kasnu reprodukciju doveo je do značajnog odlaganja prvog i poslednjeg dana polaganja jaja u odnosu na B i E režime (značajan efekat selekcionog režima u Tabeli 6). Ujedno, L ženke imaju 88,2 % odnosno 82,4 % manji rani fekunditet od B i E ženki (značajan efekat selekcionog režima u Tabeli 7). Međutim, dvofaktorska ANCOVA za variranje ukupnog fekunditeta, u kojoj je masa korišćena kao kovarijabla, pokazala je da, iako L ženke ukupno polažu duplo više jaja od E ženki, efekat selekcionog režima na ovu osobinu nije značajan (Tabela 7). Budući da je zavisnost fekunditeta od mase jedinki visoko značajna (kovariranje sa masom, Tabela 7), iz ovakvih nalaza može se doneti zaključak da su razlike u totalnom fekunditetu između selekcionih režima prevashodno posledica divergencije u masi jedinki, dok su selektivni pritisci značajno manje bili direktno usmereni na relativno ulaganje u reprodukciju. Najilustrativniji prikaz navedenih trendova predstavlja grafički prikaz dinamike polaganja jaja ženki poreklom iz B, E i L režima (Slika 4).

4.2 Analiza pojave hibridnog vigora u osobinama dužine života i reproduktivnog ponašanja laboratorijskih populacija pasuljevog žiška

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije jeste testiranje uticaja akumulacije mutacija (AM) na evoluciju fekunditeta ženki, reproduktivno ponašanje mužjaka, kao i dužinu života neukrštanih jedinki oba pola kod žižaka selektovanih za ranu i kasnu reprodukciju. Kako bi se detektovala potencijalna inbriding depresija unutar E i L režima, vršena su poređenja ovih osobina između E i L populacija (združene vrednosti četiri populacije) i odgovarajućih dvostrukih hibrida. Ako je AM važan populaciono-genetički mehanizam u evoluciji navedenih osobina, kod hibridnih linija očekuje se pojava heteroze, tj. hibridnog vigora.

Dvostruki hibridi između populacija selektovanih za ranu reprodukciju žive duže od nehibridnih, čistih populacija E žižaka, nezavisno od pola (Slika 5; t-test: ženke: $t = 5,67$, $df = 715$, $P < 0,001$; mužjaci: $t = 2,78$, $df = 717$, $P < 0,01$). Prema t vrednosti hibridni vigor je izraženiji kod E ženki nego kod E mužjaka. S druge strane, ni u jednom polu unutar L režima, t-testom nije detektovana statistički značajna razlika u dužini života između združenih vrednosti čistih populacija i njihovih dvostrukih hibrida (Slika 5; t-test: $P > 0,05$).

Imajući u vidu da veći rani fekunditet predstavlja karakteristiku ženki unutar E režima, pojava hibridnog vigora kod E dvostrukih hibrida u broju položenih jaja u prva dva dana predstavlja neočekivan rezultat (Slika 6). Dvofaktorska analiza varijanse, u kojoj su uzrast, nehibridne-hibridne (N-H) populacije i njihova interakcija fiksirani faktori, potvrdila je heterozu za rani fekunditet u E režimu (značajan efekat N-H populacije; $F_{1, 389} = 100,59$, $P < 0,001$). Međutim, u kasnijem uzrastu (7-8 dan) trend se menja i E hibridi imaju značajno niži fekunditet u poređenju sa nehibridnim E populacijama (Slika 6; značajan efekat uzrasta ($F_{1, 389} = 320,94$, $P < 0,001$) i interakcije uzrast \times N-H populacije ($F_{1, 389} = 54,48$, $P < 0,001$)). Suprotno očekivanjima, u L režimu u kome je vršena selekcija za kasnu reprodukciju, L dvostruki hibridi ispoljili su hibridni vigor u svim uzrastima (L režim, Slika 6; značajan efekat N-H populacije; $F_{1, 532} = 284,85$, $P < 0,001$). S obzirom na to da se fekunditet delimično povećava sa uzrastom dvofaktorska analiza varijanse detektovala je značajan efekat faktora uzrast ($F_{1, 532} = 51,08$, $P < 0,001$). Uočeni hibridni vigor za rani fekunditet kod E ženki i

fekunditet u svim uzrastima kod L ženki u suprotnosti je sa očekivanjima AM modela. Prema AM očekivana je pojava hibridnog vigora u kasnijim uzrastima kod E ženki, odnosno njegovo odsustvo u svim uzrasnim dobima kod L ženki.

Kod mužjaka, u ranom uzrastu ne dolazi do pojave heteroze ni u jednoj od reproduktivnih osobina u E režimu (Slika 7; t-test za sve tri osobine: $P > 0,05$). U kasnijem uzrastu, međutim, mužjaci E hibrida imaju značajno bolji učinak u reproduktivnom ponašanju od mužjaka iz nehibridnih E populacija (za sve tri reproduktivne osobine: t-test: $P < 0,001$; značajan efekat faktora N-H populacije u Tabeli 8). Ujedno, mužjaci iz nehibridnih E populacija su u kasnijem uzrastu najslabiji učinak imali u virilitetu, što je rezultiralo značajnim efektom faktora uzrast u dvofaktorskoj analizi varijanse (Tabela 8). U L režimu, pojava heteroze zabeležena je kod svih L dvostrukih hibrida, nezavisno od uzrasnog doba (za sve reproduktivne osobine i uzraste: t-test: $P < 0,05$; značajan efekat N-H populacije u Tabeli 8). Imajući u vidu da se hibridni vigor ispoljava kod mužjaka E hibrida u kasnijim uzrastima, navedeni rezultati u saglasnosti su sa pretpostavkama AM modela kod E mužjaka. S druge strane, prisustvo inbriding depresije kod L mužjaka u svim uzrastima nije u skladu sa pretpostavkama AM modela u evoluciji starenja unutar selekcionog režima za kasnu reprodukciju.

4.3 Analiza osetljivosti eksperimentalnih populacija na oksidativni stres

Centralno mesto u teoriji jednokratne some zauzima optimizacija raspodele energije između reprodukcije i mehanizama odbrane od molekulskih oštećenja. Ujedno, veliki broj studija ukazao je na pozitivnu korelaciju između otpornosti na oksidativni stres i dužine života. Tretiranjem žižaka poreklom iz B, E i L režima specifičnim i nespecifičnim generatorima oksidativnog stresa, indirektno se može utvrditi da li je i u kom smeru selekcija za različito vreme reprodukcije i dužinu života uticala i na evoluciju otpornosti na oksidativni stres.

4.3.1 Efekti parakvata na preživljavanje i dugovečnost B, E i L eksperimentalnih populacija

Nakon 24-časovnog tretmana različitim koncentracijama parakvata, u svim eksperimentalnim grupama dolazi do smanjenja vrednosti preživljavanja i dužine života ženki i mužjaka sa povećanjem koncentracije pesticida (Slika 8). Ujedno, uočava se da podaci dobijeni na B žiškama predstavljaju međuvrednosti osobina izmerenih kod E i L jedinki. Navedeni trend upućuje na zaključak da je selekcija za kasnu reprodukciju i povećanje dugovečnosti rezultirala povećanjem otpornosti na oksidativni stres, dok je povećana osetljivost na oksidativni stres evoluirala unutar režima selekcije za ranu reprodukciju i smanjenu dugovečnost. Dodatno, poređenje srednjih vrednosti preživljavanja na Slici 8 ukazuje da su B i E žišci međusobno sličniji u osetljivosti na oksidativni stres od žižaka poreklom iz L režima. Odsustvo statistički značajnih razlika između B i E žižaka, posebno na višim koncentracijama, na jasan način potvrđuje ovo zapažanje (preživljavanje, Slika 8). Imajući u vidu broj generacija koji je bio potreban da se postigne uočena divergencija u osetljivosti na PQ (250 generacija kod E i 174 generacija kod L režima), otkriva se obrazac brže evolucije povećanja otpornosti na oksidativni stres unutar režima za kasnu reprodukciju, nego evolucije povećanja osetljivosti na PQ kod E režima.

Trofaktorska analiza varijanse, u kojoj su populacije ugnježdene u selekzione režime, potvrdila je uočenu divergenciju u preživljavanju i dugovečnosti na svim PQ koncentracijama između E i L žižaka (značajan efekat selekcionog režima, Tabela 9). Pored toga, ženke su otpornije od mužjaka na oksidativni stres, što je prikazano statistički značajnim efektom pola na svim PQ koncentracijama i osobinama (Tabela 9, Slika 8). Zanimljivo je i zapažanje da interakcija selekcionog režima i pola ima značajan efekat na dužinu života, ali ne i na preživljavanje (Tabela 9). U slučaju preživljavanja, obrazac opadanja otpornosti sa povećanjem koncentracija PQ sličan je kod ženki i mužjaka, i nezavisan je od režima (Slika 8), ukazujući na paralelne evolucione odgovore polova. S druge strane, pad u dugovečnosti L ženki i mužjaka nakon tretmana najnižim koncentracijama PQ, nije toliko izražen kod E ženki i mužjaka. Ove razlike objašnjavaju značajan efekat interakcije između selekcionog režima i pola na variranje dužine života na svim koncentracijama (Tabela 9).

Krive preživljavanja i mortaliteta ženki i mužjaka iz sva tri selekciona režima i tretmana (kontrola, PQ1 i PQ5), predstavljene su na Slikama 9 i 10. Kako su pokazale i prethodne analize, u svim eksperimentalnim grupama dolazi do smanjenja preživljavanja sa povećanjem koncentracija generatora ROS-a. Zanimljivo je da se obrasci krivih preživljavanja B i E žižaka ne menjaju značajno nakon tretmana blagim oksidativnim stresom, dok kod L žižaka dolazi do jasnog pomeranja ulevo u odnosu na netretirane kontrole (Slika 9; značajne razlike potvrđene χ^2 testom). Sličan trend uočava se i analizom krivih mortaliteta (Slika 10). Navedeni rezultati potvrđuju da su L žišci osetljiviji na blagi oksidativni stres (PQ1) od B i E žižaka. Poređenje Gompercovih parametara mortaliteta u Tabeli 10 otkriva da, povećanjem ekstrinzičkog oksidativnog stresa, u svim režimima dolazi do smanjenja dužine života usled ranijeg otpočinjanja umiranja, dakle povećanja inicijalnog mortaliteta, za kojim sledi usporavanje stope starenja. Ovakav trend se jasno uočava na koncentracijama PQ5 gde je, nezavisno od pola ili režima, značajno povećanje inicijalnog mortaliteta praćeno smanjenjem stope starenja (Tabela 10). Podaci na najnižim koncentracijama parakvata (PQ1) ukazuju da blagi oksidativni stres, u zavisnosti od selekcionog režima, može izazvati značajno smanjenje dužine života bez značajne promene u $\ln a$ i b parametrima (npr. L ženke i mužjaci), ali i značajno odlaganje početka umiranja i hormezu (E ženke na PQ1, Tabela 10).

4.3.2 Efekti tebufenpirada na preživljavanje i dugovečnost E i L dvostrukih hibrida i B žižaka

Podaci dobijeni iz eksperimenta sa tebufenpiradom u saglasnosti su sa trendovima uočenim u eksperimentu sa parakvatom: nakon 24-časovnog tretmana, specifični generator oksidativnog stresa najveći uticaj na smanjenje preživljavanja i dužine života ima na E žiške, manji na B žiške i najmanji na L žiške (Slika 11). Evolucija veće otpornosti na oksidativni stres u režimu za kasnu reprodukciju potvrđena je značajnim efektom selekcionog režima na preživljavanje (sa izuzetkom najniže koncentracije) i dužinu života na svim koncentracijama tebufenpirada kod E i L žižaka (Tabela 11). Ženke su otpornije na oksidativni stres od mužjaka (Slika 11), što je potvrđeno značajnim efektom pola na preživljavanje i dužinu života (Tabela 11). Dvofaktorska analiza varijanse ukazala je na različite odgovore polova u evoluciji

otpornosti na oksidativni stres u B, E i L režimu (značajan efekat interakcije sel. režima i pola na preživljavanje i dužinu života u Tabeli 11). Naime, dok kod L mužjaka preživljavanje i dužina života postepeno opadaju sa povećanjem koncentracije TBF, kod B i E mužjaka mogu se zapaziti dve pojave: tretman sa 1,5 % TBF kod E mužjaka i 2,5 % kod B mužjaka drastično smanjuje preživljavanje, dok najniža koncentracija TBF (0,5 %) značajno povećava dužinu života u odnosu na kontrolu (Slika 11).

Krive preživljavanja i mortaliteta ženki i mužjaka iz sva tri eksperimentalna režima na nižim koncentracijama TBF (0,5 i 1,5 %) predstavljene su na Slikama 12 i 13. Rezultati ukazuju da su L ženke osetljivije na blagi oksidativni stres od B i E ženki. Dodatno, kod B i E mužjaka tretiranih najnižom koncentracijom TBF krive preživljavanja se pomeraju udesno u poređenju sa kontrolama (Slika 12; značajne razlike su potvrđene χ^2 testom). Ova pojava potvrđena je i analizom krivih mortaliteta koje u slučaju E i B mužjaka pokazuju da u svim uzrastima žiŝci tretirani blagim oksidativnim stresom imaju manju verovatnoću umiranja nego kontrole (Slika 13). Analiza Gompercovih parametara otkrila je da statistički značajno produženje dužine života kod E mužjaka, nakon tretmana sa 0,5 % TBF, predstavlja posledicu značajnog usporavanja starenja (statistički značajna razlika u parametru b u poređenju sa kontrolom u Tabeli 12; Slika 13). Kod B mužjaka značajno produženje života u odnosu na kontrolu posledica je prevashodno značajnog odlaganja početka umiranja (statistički značajna razlika u parametrima $\ln a$ i b , poređenje kontrola-TBF 0,5 %, Tabela 12; Slika 13). Kod L mužjaka, odnos demografskih parametara, sličan B mužjacima, nije doveo do statistički značajne razlike u dužini života (statistički značajna razlika u parametrima $\ln a$ i b , poređenje kontrola-TBF 0,5 %, Tabela 12; Slika 13). Generalno, smanjenje dužine života, uporedo sa povećanjem ekstrinzičkog oksidativnog stresa u svim režimima, predstavlja rezultat ranijeg otpočinjanja umiranja i usporavanja stope starenja (Tabela 12, Slika 13).

4.4 Genetički diverzitet i populaciono-genetička struktura laboratorijskih populacija

U cilju utvrđivanja efekata uzrasno-specifične selekcije na genetičkom nivou, urađena je analiza varijabilnosti 3 mikrosatelitska lokusa i 658 bp dugačke sekvence mitohondrijskog gena za subjedinicu I citohrom c oksidaze (COI).

4.4.1 Mikrosatelitska varijabilnost laboratorijskih populacija

Vrednosti dobijene (H_D) i očekivane (H_O) heterozigotnosti sva tri mikrosatelitska lokusa kod žižaka poreklom iz B, E i L režima predstavljene su u Tabeli 13. U skladu sa očekivanjima, u osnivačkoj populaciji (B režim) ustanovljena je najviša prosečna dobijena i očekivana heterozigotnost (Tabela 13), odnosno najveća genetička varijabilnost. U poređenju sa osnivačkom populacijom, prosečna H_D u E populacijama je 36,4 % niža, odnosno 45,1 % niža u L populacijama, dok su prosečne očekivane heterozigotnosti niže za 23,4 % u E i 35,8 % u L populacijama. Prema teoriji, manja genetička varijabilnost unutar L režima u odnosu na E režim ukazuje da je selekcionni pritisak na jedarne gene unutar režima za kasnu reprodukciju veći u odnosu na režim selekcije za ranu reprodukciju.

Analizom molekularne varijanse između B i E režima (četiri E populacije su pulirane u režim) utvrđeno je da 17 % od ukupnog genetičkog variranja na mikrosatelitskim lokusima potiče od variranja između režima (značajna F_{ST} vrednost u Tabeli 14). S druge strane, 29,85 % od ukupne genetičke varijanse između B i L režima (četiri L populacije su pulirane u L režim) potiče od značajne međurežimske divergencije (značajna F_{ST} vrednost u Tabeli 15). Očekivano, rezultati AMOVA između populacija koje su evoluirale pod različitim pravcima uzrasno-specifične selekcije (E u odnosu na L populacije) pokazali su veću genetičku divergenciju sa značajnom F_{ST} vrednošću i 47,04 % udela međurežimske varijanse u totalnoj genetičkoj varijansi (Tabela 16). U sledećoj analizi, u modelu je dodat još jedan nivo u hijerarhijskoj strukturi AMOVA - populacije unutar E i L režima. Pored niskog prosečnog indeksa fiksacije unutar populacija (vrednost $F_{IS} = -0,009$, Tabela 17), dobijene su i niske, iako statistički značajne, vrednosti genetičke varijabilnosti između populacija unutar režima (vrednost $F_{SC} = 0,049$, Tabela 17). I ovaj model AMOVA je pokazao da veliki deo ukupnog genetičkog variranja odražava značajnu genetičku divergenciju između dva selekcionna režima (vrednost $F_{CT} = 0,464$, Tabela 17).

Uporedne vrednosti diferencijacije pojedinačnih populacija po F_{ST} indeksima date su u Tabeli 18. Kako je i očekivano, najviše vrednosti F_{ST} indeksa zabeležene su između parova E i L populacija. Iako su u nekim međupopulacionim poređenjima unutar režima takođe zabeležene značajne vrednosti indeksa fiksacije, te vrednosti su

desetostruko niže od genetičke diferencijacije između parova poreklom iz različitih režima. Prikazane analize genetičke varijanse nesporno ilustruju veličinu efekta selekcije (divergencija između režima), u odnosu na stohastičke mehanizme (divergencija između populacija unutar režima), u evoluciji laboratorijskih populacija pasuljevog žiška.

4.4.2 Varijabilnost mitohondrijskih COI haplotipova

Analiza prisustva *Wolbachia* na 170 jedinki žižaka nije ukazala na inficiranost B, E i L žižaka ovom bakterijom, čime je odbačena mogućnost da je ova α -proteobakterija imala uticaja na oblikovanje varijabilnosti mtDNK unutar eksperimentalnih populacija *A. obtectus*.

Sekvenciranjem 44 jedinke iz laboratorijskih populacija i primenom dva diskriminativna restrikciona enzima ustanovljeno je prisustvo tri mitohondrijska haplotipa koji su označeni kao H1, H2 i H3. Na osnovu sekvence, haplotipovi H1 i H2 razlikuju se u samo jednoj supstituciji na 257 poziciji LCO1490/HCO2198 prajmerima ograničenog fragmenta COI gena. Haplotip H3 se u odnosu na H1 razlikuje u 3 supstitucije na pozicijama 365, 371 i 509, a u odnosu na H2 u 4 supstitucije na pozicijama 257, 365, 371, 509. Sve detektovane nukleotidne zamene su sinonimne, tj. kvalitativno ne menjaju aminokiselinski sastav proteinskog produkta koga kodira ovaj gen mtDNK.

Učestalosti COI haplotipova date su u Tabeli 13. U osnivačkoj populaciji najveća je učestalost haplotipa H1 (73,3 %), za kojim slede haplotipovi H2 (20 %) i H3 (5 %). Unutar E režima, H1 haplotip, najučestaliji u osnivačkoj B populaciji, odsustvuje, tj. eliminisan je iz populacija selektovanih za ranu reprodukciju. U E populacijama, haplotipovi H2 i H3 nalaze u odnosu 3:1. S druge strane, u L režimu eliminisan je haplotip H2, a kod tri od četiri L populacije potpuno je fiksiran haplotip H1.

Rezultati AMOVA, prilagođene za mitohondrijske haploidne podatke, iz poređenja B i E selekcionog režima (četiri E populacije su pulirane u režim) pokazale su da se 30,18 % ukupnog genetičkog variranja može objasniti značajnim variranjem između režima (značajna F_{ST} vrednost u Tabeli 19). Analizom molekularne varijanse

između B i L selekcionog režima (četiri L populacije su pulirane u režim), takođe je utvrđena značajna međurežimska diferencijacija od 14,27 % (značajna F_{ST} vrednost u Tabeli 20). Očekivano, najviše vrednosti genetičke diferencijacije između grupa dobijene su u poređenju puliranih E i L režima i iznose 50,13 % (značajna F_{ST} vrednost u Tabeli 21). Kada se hijerarhija F-statistike poveća za jedan nivo, poređenjem E i L režima sastavljenih od po četiri populacije, dobija se isti trend - međugrupna genetička diferencijacija ($F_{CT} = 0,478$, $P = 0,034$, Tabela 22) je pet puta veća od unutargrupne ($F_{SC} = 0,183$, $P = 0,000$, Tabela 22). Dodatno, velika diferencijacija u varijabilnosti COI lokusa, pri poređenju parova populacija, postoji jedino između E i L populacija (Tabela 18). Jedini izuzetak predstavlja populacija L_4 u kojoj je, za razliku od ostalih L populacija, zadržan haplotip H3 - u parnim poređenjima sa ostalim L populacijama vrednosti F_{ST} su visoke i statistički značajne.

4.5 Analiza osobina životne istorije mito-jedarnih linija

4.5.1 Analiza preadultnih osobina mito-jedarnih linija

Srednje vrednosti i standardne greške za preadultni vijabilitet prikazane su na Slici 14. Dvofaktorska analiza varijanse za preadultni vijabilitet nije ukazala na značajan efekat jedra ($F = 0,18$, $df = 1$, $16,02$, $P = 0,68$), niti mitohondrije ($F = 1,61$, $df = 1$, $16,02$, $P = 0,22$), u ukupnom variranju ove osobine. Međutim, statistički značajan efekat interakcije između mitohondrije i jedra ($F = 18,45$, $df = 1$, $16,02$, $P = 0,0006$) pokazao je da uticaj E i L mitohondrija na vijabilitet zavisi od porekla jedra. U obe mito-jedarne (mt-j) grupe sa narušenim mito-jedarnim interakcijama ($L \times E$ i $E \times L$) vijabilitet značajno pada u odnosu na grupe sa rekonstituisanim mito-jedarnim odnosima (Scheffe test: $P < 0,05$; Slika 14).

Statistički značajan efekat jedra na variranje trajanja razvića (Tabela 23) demonstrirao je ulogu jedarnih gena u procesima ontogeneze - linije sa E jedrom imaju kraće razviće od linija sa L jedrom (Slika 14). S druge strane, iako direktan uticaj tipa mitohondrije na trajanje razvića nije pokazan, prisustvo značajne interakcije između mitohondrije i jedra ukazuje na indirektno efekte koje mitohondrije, u interakcijama produkata svojih gena sa molekulima kodiranim sa jedra, imaju u procesima razvića (Tabela 23). Kod ženki i mužjaka sa narušenim mito-jedarnim interakcijama ($L \times E$ i

E×L) razviće značajno duže traje u odnosu na odgovarajuće kontrole (E×E, odnosno L×L; Slika 14). Analize na mt-j linijama dodatno su potvrdile fenomen protandrije kod žiška, koji se ogleda u bržem razviću mužjaka u odnosu na ženke (statistički značajan efekat pola i izostanak značajnosti u svakoj interakciji u kojoj taj faktor učestvuje, Tabela 23).

U skladu sa očekivanjima, žišci sa E jedrom, koje karakteriše brže razviće, imaju manju masu od žižaka sa L jedrom (Slika 14, statistički značajan efekat jedra na masu tela u Tabeli 23). Slično trajanju razvića, mitohondrije svoj efekat na masu ostvaruju indirektno preko interakcija sa jedarnim genima u procesu ontogeneze (značajan efekat interakcije mitohondrija × jedro u Tabeli 23). U odnosu na kontrolne mt-j grupe sa očuvanim mito-jedarnim interakcijama, E mitohondrija u L jedarnoj sredini značajno smanjuje masu tela, dok taj efekat izostaje u L×E grupi (Scheffe test: $P < 0,05$; Slika 14). Imajući u vidu da se ova pojava uočava kod oba pola, javlja se i značajna interakcija mitohondrija × pol (Tabela 23). Statistički značajna interakcija jedro × pol ukazuje da su razlike u masi između polova izraženije kod mt-j linija sa E jedrom, nego sa L jedrom (Tabela 23).

4.5.2 Analiza adultnih osobina mito-jedarnih linija

4.5.2.1 Dužina života neukrštanih i ukrštanih mito-jedarnih linija

Na osnovu grafičkog prikaza srednjih vrednosti dužine života ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim i narušenim mito-jedarnim interakcijama, može se zaključiti da, u oba reproduktivna režima (neukrštan/ukrštan), žišci sa L jedrom žive duže od žižaka sa E jedrom (Slika 15; značajan efekat faktora jedro kod ukrštanih i neukrštanih ženki i mužjaka u Tabeli 24). Sa izuzetkom E×L mužjaka, narušavanje mito-jedarnih interakcija kod neukrštanih žižaka nije rezultiralo značajnim smanjenjem dužine života (Slika 15), što je potvrđeno odsustvom statistički značajnog efekta porekla mitohondrije i interakcije mitohondrija × jedro kod neukrštanih ženki i mužjaka (Tabela 24). Međutim, kod ženki i mužjaka sa E jedrom i mužjaka sa L jedrom, reproduktivna aktivnost je uzrokovala značajno smanjenje dužine života kod mito-jedarnih grupa sa narušenim mt-j interakcijama (E×L i L×E ukrštan žišci, Slika 15). Trofaktorska ANCOVA je pokazala značajan efekat porekla mitohondrije na

varijabilnost u dužini života ukrštanih žižaka kod oba pola i epistatičkih interakcija mitohondrija \times jedro samo kod reproduktivno aktivnih mužjaka (Tabela 24).

Krive preživljavanja i mortaliteta **neukrštanih** mito-jedarnih linija predstavljene su na Slici 16. Poređenje krivih preživljavanja neukrštanih L \times L i E \times L mužjaka ukazuje da narušavanje mito-jedarnih epistatičkih interakcija unutar selekcionog režima za kasnu reprodukciju smanjuje prosečnu dužinu života usled ranijeg početka umiranja populacije (Slika 16, značajne razlike potvrđene χ^2 testom). Iz odgovarajućih krivih mortaliteta i analize Gompercovih parametara (L \times L i E \times L mužjaci, Slika 16, Tabela 25) uočava se da, pored većeg inicijalnog mortaliteta, verovatnoća umiranja postaje veća nakon uzrasta od 23 dana kod E \times L mužjaka, što rezultira značajnim smanjenjem parametra s (veći porast stope mortaliteta u kasnijem uzrastu u odnosu na L \times L mužjake). Interesantno je da, iako se značajnije ne odražava na dužinu života, narušavanje mito-jedarnih epistatičkih interakcija kod E \times L ženki značajno smanjuje inicijalni mortalitet i ubrzava stopu starenja u poređenju sa ženkama sa rekonstituisanim mt-j interakcijama (L \times L i E \times L ženke, Slika 16; Tabela 25).

Iz krivih preživljavanja i mortaliteta **ukrštanih** mito-jedarnih linija i pratećih analiza demografskih parametara uočava se nekoliko interesantnih trendova (Slika 17; Tabela 26). Kao i u slučaju neukrštanih mužjaka, značajno smanjenje prosečne dužine života i promena obrazaca krivih preživljavanja (značajne razlike potvrđene χ^2 testom) kod reproduktivno aktivnih E \times L mužjaka u odnosu na L \times L mužjake sa očuvanim mt-j interakcijama, posledice su povećanja inicijalnog mortaliteta, ali za razliku od neukrštanih mužjaka, bez razlike u s parametru (L \times L i E \times L mužjaci, Slika 16 i 17; Tabela 25 i 26). S druge strane, narušavanje mito-jedarnih interakcija značajno smanjuje dužinu života i pomera obrazac krivih preživljavanja ulevo (značajne razlike potvrđene χ^2 testom) kod reproduktivno aktivnih ženki i mužjaka selekcionisanih za ranu reprodukciju, usled istovetnog obrasca promena Gompercovih parametara - smanjenja inicijalnog mortaliteta, bržeg starenja u ranijem i sporijeg starenja u kasnijem uzrastu (E \times E i L \times E ženke i mužjaci, Slika 17; Tabela 26). Kod L \times E ženki je smanjenje parametra lna i povećanje parametra b značajno, dok je kod L \times E mužjaka značajno povećanje usporenja starenja u kasnijem uzrastu (Tabela 26).

4.5.2.2 Ukupni fekunditet ženki

Narušavanje mito-jedarnih interakcija smanjuje broj položenih jaja samo u L režimu (poređenje $L \times L$ i $E \times L$ na Slici 15). Međutim, kada se u proceni uzroka varijabilnosti fekunditeta izuzme uticaj mase na broj položenih jaja, kroz dvofaktorsku ANCOVA sa masom kao kovarijablom (efekat mase: $F = 748,42$, $df = 1$, 2270, $P < 0,0001$), efekti mitohondrije ($F = 0,38$, $df = 1$, 16,40, $P = 0,54$) i epistatičkih interakcija mitohondrije i jedra ($F = 0,02$, $df = 1$, 16,09, $P = 0,89$) odsustvuju. Takođe, ni jedro nije pokazalo statistički značajan uticaj na varijabilnost relativnog ulaganja u reprodukciju ($F = 0,25$, $df = 1$, 23,71, $P = 0,61$). Navedeni rezultati su, između ostalog, posledica i velike varijabilnosti fekunditeta između mt-j linija ($F = 13,36$, $df = 1$, 2270, $P < 0,0001$).

Na Slici 15 prikazani su procenti sterilnih parova u različitim kombinacijama mitohondrija i jedra. Kada se nalazi u neodgovarajućoj jedarnoj sredini, E mitohondrija smanjuje, a L mitohondrija povećava sterilnost ($E \times L$, odnosno $L \times E$ linija), iako same razlike između linija nisu statistički značajne. I dok je dvofaktorska ANOVA detektovala graničnu vrednost značajnosti efekta mitohondrija ($F = 3,43$, $df = 1$, 16, $P = 0,08$), izostaje efekat jedra ($F = 1,37$, $df = 1$, 16, $P = 0,26$) i njihove epistatičke interakcije ($F = 0,06$, $df = 1$, 16, $P = 0,81$).

4.6 Analiza aktivnosti enzimskih kompleksa mitohondrijskog ETL

Srednje vrednosti aktivnosti kompleksa I, II, III i IV mitohondrijskog elektron transportnog lanca ženki i mužjaka mito-jedarnih grupa sa narušenim ($L \times E$ i $E \times L$) i očuvanim ($E \times E$ i $L \times L$) mito-jedarnim interakcijama predstavljene su na Slici 18. Poređenjem $E \times E$ i $L \times L$ grupe uočava se da je selekcija za kasnu reprodukciju rezultirala pre svega značajnim povećanjem aktivnosti kompleksa III, koja je u proseku 1,5 puta veća kod L u odnosu na E žiške. Dodatno, L mužjaci imaju značajno višu aktivnost kompleksa I (Tukey test: $P = 0,0169$) i manju aktivnost kompleksa IV (Tukey test: $P < 0,001$) od E mužjaka, dok ti trendovi izostaju kod ženki. Statistički značajan efekat selekcionog režima na varijabilnost aktivnosti kompleksa III u dvofaktorskoj ANOVA (Tabela 27), i izostanak značajnosti efekta režima u varijabilnosti preostalih kompleksa ETL, potvrđuju uočen trend. Utvrđeno je i da kompleks II ima polno-specifičnu

aktivnost (značajan faktor pol u Tabeli 27) i da je seksualni dimorfizam u aktivnosti ovog enzima izraženiji kod L ($F_{1,8} = 8,07$, $P = 0,022$), nego kod E žižaka ($F_{1,8} = 1,24$, $P = 0,297$) iako interakcija selekcionni režim \times pol nije pokazala značajan efekat. Analiza proseka smanjenja aktivnosti kompleksa I, III i IV usled narušavanja mito-jedarnih interakcija ukazala je da su E žišci osetljiviji na mito-jedarnu nepodobnost od L žižaka. Naime, kod L \times E žižaka ukupno prosečno smanjenje aktivnosti za oba pola iznosilo je 29,02 %, dok kod E \times L žižaka iznosi duplo manje - 14,66 %.

Formiranjem mito-jedarnih linija i merenjem aktivnosti njihovih mitohondrijskih ETL kompleksa sastavljenih od subjednica koje su istovremeno kodirane sa mitohondrijskog i jedarnog genoma (kompleks I, III i IV), testirana je hipoteza po kojoj uzrasno-specifična selekcija može, delovanjem na mito-jedarne interakcije i njihovu koevoluciju, indirektno oblikovati mitohondrijske bioenergetske procese specifične za različite životne strategije (E i L režim). Pokazalo se da je u 12 od 12 poređenja došlo do očekivanog pada aktivnosti kompleksa I, III i IV usled narušavanja mito-jedarnih interakcija unutar L \times E i E \times L mt-j grupe, dok su u 10 slučajeva ta smanjenja bila i statistički značajna (t-test; kompleksi I, III i IV, Slika 18). Izostanak statističke značajnosti pada aktivnosti u odnosu na kontrolne grupe detektovan je samo kod E \times L mužjaka (poređenje L \times L i E \times L, kompleksi I i IV, Slika 18).

Divergencija u koevoluciji mito-jedarnih interakcija između dva selekcionna režima potvrđena je rezultatima mešanog modela analize varijanse. Statistički značajan efekat interakcije mitohondrija \times jedro uočen je u analizi varijanse aktivnosti kompleksa I, III i IV, ali ne i u aktivnosti kompleksa II koji je sastavljen isključivo od jedarnih subjednica (Tabela 28). Aktivnost kompleksa I, II i III viša je kod žižaka sa L jedrom u odnosu na nosioce E jedra (Slika 18; značajan faktor jedro u Tabeli 28). Ujedno, ženke imaju višu aktivnost kompleksa I, II i IV od mužjaka (Slika 18, značajan faktor pol u Tabeli 28). Značajan efekat interakcije mitohondrija \times jedro \times pol na aktivnost kompleksa I ukazuje da je selekcionni pritisak na mito-jedarnu koadaptaciju bio jači kod ženki nego kod mužjaka (u proseku smanjenje od 25 % kod ženki i 9 % kod mužjaka; značajna trostruka interakcija u Tabeli 28; značajna interakcija mitohondrije i jedra kod ženki, ali ne i kod mužjaka u Tabeli 29).

Imajući u vidu da je kompleks II ETL sastavljen isključivo od subjedinica kodiranih sa jedarnog genoma, zanimljiv je rezultat u analizi ovog kompleksa koji pokazuje da mitohondrija i interakcija mitohondrija \times jedro \times pol imaju značajan uticaj na varijansu aktivnosti ovog enzima (Tabela 28). Naime, prisustvo L mitohondrije u E jedarnoj sredini smanjilo je aktivnost kompleksa II u odnosu na „očuvanu“ kontrolu (E \times E), dok je suprotan efekat, odnosno povećanje aktivnosti u poređenju sa L \times L kontrolom, izazvalo prisustvo E mitohondrije u L jedarnoj sredini (Slika 18). Značajan faktor mitohondrija u Tabeli 28 javlja se kao posledica povećanja prosečne aktivnosti kompleksa II kod nosioca E mitohondrije, dok se značajna interakcija mitohondrija \times jedro \times pol javlja usled izraženijih promena kod mužjaka nego kod ženki. Uticaj mitohondrije na aktivnost ovog jedarno kodiranog kompleksa može se razumeti u kontekstu indirektnog, kompenzacionog odgovora aktivnosti sukcinat dehidrogenaze na „stranu“ mitohondriju. Na kraju, značajna interakcija mitohondrija \times pol u slučaju kompleksa IV ukazala je da postoji polno-specifična razlika u aktivnosti kod nosioca E i L mitohondrije (kod ženki razlika ne postoji, dok kod mužjaka nosioci E imaju veću aktivnost od nosilaca L mitohondrija, Slika 18).

Da bi se detaljnije razumele uočene polno-specifične razlike u aktivnosti kompleksa ETL, pre svega I i IV, primenjen je mešani model analize varijanse za svaki pol (Tabela 29). Narušavanje mito-jedarnih interakcija ima veći efekat na ženke nego na mužjake u slučaju aktivnosti kompleksa I (efekat interakcije mitohondrija \times jedro, ženke, $F = 9,48$ i mužjaci $F = 2,72$, Tabela 29), dok je suprotan odgovor detektovan za kompleks IV (efekat interakcije mitohondrija \times jedro, ženke, $F = 3,69$ i mužjaci $F = 7,20$, Tabela 29). Navedeni rezultat posledica je, pre svega, većeg pada u aktivnosti kompleksa I kod ženki i kompleksa IV kod mužjaka usled mito-jedarne nepodobnosti jedinki sa E jedrom u poređenju sa jedinkama koje imaju L jedro. Tačnije, narušavanje mito-jedarnih interakcija smanjilo je aktivnost kompleksa I za 31,4 % kod L \times E ženki i 14,70 % kod L \times E mužjaka u odnosu na kontrolu. S druge strane, kod kompleksa IV uočeno je 17,21 % smanjenja kod L \times E ženki i 30,33 % smanjenja kod L \times E mužjaka. Kod žižaka sa L jedrom, narušavanje mito-jedarnih interakcija je za rezultat imalo veću osetljivost ženki na mito-jedarnu nepodudarnost, i to za oba kompleksa (E \times L ženke, 18,41 % smanjenja aktivnosti za kompleks I i 16,51 % za kompleks IV u odnosu na L \times L ženke), a u odnosu na mužjake (E \times L mužjaci, 3 % smanjenja aktivnosti za

kompleks I i 2,2 % za kompleks IV). Posledično, uočen je izraženiji efekat porekla mitohondrije (E ili L) na varijansu u aktivnosti kompleksa IV kod mužjaka, nego kod ženki (značajan efekat faktora mitohondrije u Tabeli 29 za mužjake, ali ne i za ženke). Na kraju, analiza varijanse je potvrdila i rezultate t-testa, odnosno, pokazano je da L mužjaci imaju značajno višu aktivnost kompleksa I od E mužjaka (značajan efekat faktora jedro na aktivnost kompleksa I u Tabeli 29), dok ta razlika izostaje kod ženki.

4.7 Analiza povezanosti osobina životne istorije mito-jedarnih linija i aktivnosti kompleksa mitohondrijskog ETL

Imajući u vidu da je veliki broj studija ukazao na vezu između mitohondrijskih bioenergetskih procesa i osobina životne istorije, testirana je asocijacija između aktivnosti kompleksa ETL, s jedne strane, i trajanja razvića, mase i dužine života neukrštanih jedinki, kao i demografskih parametara logističkog modela mortaliteta, s druge strane. Parcijalni koeficijenti korelacije dobijeni na puliranim podacima ženki i mužjaka (Tabela 30) ukazali su da se duže trajanje razvića, veća masa i dugovečnost, odnosno smanjenje stope starenja, mogu povezati sa povećanjem aktivnosti kompleksa II i III (pozitivne vrednosti koeficijenta korelacije) i smanjenjem aktivnosti kompleksa IV (negativne vrednosti koeficijenta korelacije). Ovi odnosi opisani su i jednačinama u kojoj vrednosti koeficijentata β imaju isti znak kao i koeficijenti korelacije. Nisu uočene značajne parcijalne korelacije između aktivnosti ETL kompleksa i parametra $\ln a$.

Relativni doprinos svakog kompleksa obrascu variranja pojedinačnih osobina životne istorije testiran je pomoću multivarijantne regresione analize. Regresioni model statistički značajno opisuje 48-72 % varijabilnosti osobina životne istorije mito-jedarnih linija (R^2 u Tabeli 30). Najbolje prediktore regresionog modela za masu, dužinu života, parametre b i s predstavljaju aktivnosti kompleksa II, III i IV (Tabela 30).

Kada je korelaciona analiza urađena u okviru svakog pola, detektovana je polno-specifična asocijacija aktivnosti kompleksa ETL sa osobinama životne istorije (Tabela 30). Naime, aktivnost kompleksa II i III predstavlja značajne prediktore vrednosti osobina kod ženki, a kod mužjaka aktivnost kompleksa IV. Multivarijantna regresiona analiza, urađena za svaki pol, ukazuje da linearni model u kome kao prediktori figuriraju aktivnosti ETL kompleksa statistički značajno objašnjava više od 63 %

varijanse vrednosti osobina životne istorije mito-jedarnih linija. Očekivano, značajne prediktore regresionog modela kod ženki predstavljaju kompleks II i III, dok kod mužjaka ulogu glavnog prediktora preuzima kompleks IV.

4.8 Analiza osetljivosti mito-jedarnih linija na oksidativni stres

4.8.1 Dužina života i preživljavanje mito-jedarnih linija tretiranih niskom koncentracijom (0,5 %) parakvata

Prosečne vrednosti preživljavanja i dužine života ženki i mužjaka mito-jedarnih grupa sa narušenim ($L \times E$ i $E \times L$) i rekonstituisanim ($E \times E$ i $L \times L$) mt-j interakcijama, nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i 0,5 % rastvorom parakvata, predstavljene su na Slici 19. Nakon tretmana nespecifičnim generatorom ROS-a niskih koncentracija, nezavisno od pola, dolazi do statistički značajnog smanjenja preživljavanja i dužine života (Scheffe test: $P < 0,05$). Postojanje statistički značajnog efekta tretmana na preživljavanje i dužinu života ženki i mužjaka u četvorofaktorskoj analizi varijanse, u kojoj su linije ugnježdene u interakciju mitohondrija \times jedro, potvrđuje ovo zapažanje (ženke i mužjaci, Tabela 31). Otpornost na oksidativni stres zavisi od porekla jedra - grupe sa L jedrom ($L \times L$ i $E \times L$) imaju veći procenat preživljavanja i žive duže od grupa koje poseduju E jedro ($E \times E$ i $L \times E$) (Slika 19; značajan efekat jedra u Tabeli 31). Međutim, kao i u analizi efekata parakvata na dužinu života B, E i L populacija (pogledati Rezultate, odeljak 4.3.1), polno-specifičan efekat niskih koncentracija parakvata izražen je kod grupa sa L jedrom (Slika 19 i 20). Nivo uticaja insekticida na dužinu života zavisio je od porekla jedra kod ženki, ali ne i kod mužjaka (značajan efekat interakcije tretmana i jedra u Tabeli 31), dok je efekat PQ na preživljavanje zavisio od porekla jedra samo kod mužjaka (značajan efekat interakcije tretmana i jedra u Tabeli 31). Ovaj rezultat posledica je boljeg preživljavanja $E \times L$ nakon tretmana (Slika 19). Varijabilnost dužine života ženki i mužjaka značajno je zavisila od porekla mitohondrije (Tabela 31). U proseku, veću dužinu života imaju jedinke mito-jedarnih linija koje poseduju E mitohondrije. Ovakvom proseku doprinosi i hormetički efekat intrinzičkog stresa kod $E \times L$ grupe (Slika 19).

Poređenjem preživljavanja i dužine života mito-jedarnih grupa sa očuvanim mt-j interakcijama (E×E, odnosno L×L) i odgovarajućeg „jedarnog para“ sa narušenim mt-j interakcijama (L×E, odnosno E×L) koji nisu tretirani pesticidom, analiziran je uticaj intrinzičkog oksidativnog stresa, nastalog usled narušenih mt-j interakcija, na navedene osobine. Kada se ovom eksperimentalnom pristupu doda 24-časovni tretman generatorom oksidativnog stresa (0,5 % PQ), može se steći uvid u to da li postoji povezanost između efekata intrinzičkog i ekstrinzičkog oksidativnog stresa, odnosno da li veća osetljivost na intrinzički stres podrazumeva povećanje ili smanjenje osetljivosti na ekstrinzički stres. Intrinzički oksidativni stres, usled narušavanja mito-jedarnih interakcija, nije uzrokovao statistički značajne razlike u preživljavanju odgovarajućeg jedarnog para (E×E i L×E, odnosno L×L i E×L), nezavisno od tretmana i pola (PQ 0,5 %, Slika 19). Međutim, mito-jedarna nepodudarnost unutar grupa koje poseduju L jedro (poređenje L×L i E×L), nezavisno od tretmana i pola, značajno produžava život (u proseku 15,1 % kod ženki i 19,3 % kod mužjaka; Slika 19), što nije slučaj sa grupama koje poseduju E jedro (izuzetak je statistički značajno povećanje dužine života za 7 % kod L×E u odnosu na E×E ženke nakon tretmana pesticidom, Slika 19). Iz navedenih rezultata proizilazi statistički značajni efekat interakcije između mitohondrije i jedra na varijansu dužine života ženki i mužjaka (Tabela 31). Ujedno, efekat narušavanja epistatičkih interakcija na posledice ekstrinzičkog oksidativnog stresa u dužini života bio je polno-specifičan i značajan samo kod ženki (značajna interakcija mitohondrija × jedro × tretman u Tabeli 31).

Demografske analize pokazale su da statistički značajno smanjenje dužine života kod ženki svih mito-jedarnih grupa, nakon 24-časovnog tretmana 0,5 % parakvatom, predstavlja posledicu značajnog povećanja kako inicijalnog mortaliteta tako i povećanja stope starenja (Tabela 32). Mužjaci, sa druge strane, pokazuju velike razlike između mt-j grupa u promenama demografskih parametara u odgovoru na blagi ekstrinzički oksidativni stres. Kod mužjaka mito-jedarnih grupa sa L mitohondrijama (L×L i L×E), značajno smanjenje dužine života posledica je značajnog povećanja inicijalnog mortaliteta praćenog značajnim smanjenjem stope starenja (Tabela 32). Kod E×E tretiranih mužjaka, smanjenje dužine života u odnosu na kontrolu posledica je isključivo ranijeg početka umiranja jedinki, dok povećanje stope starenja, predstavlja uzrok značajnog smanjenja dužine života kod E×L mužjaka nakon tretmana 0,5 % parakvatom

(Tabela 32). Međutim, pažljivija analiza promena demografskih parametara ukazala je da, nakon tretmana niskim koncentracijama parakvata, kod ženki i mužjaka mt-j grupa sa očuvanim epistatičkim interakcijama umiranje populacije otpočinje ranije (povećanje parametra $\ln a$, E×E i L×L u Tabeli 32). Moguća aktivacija kompenzacionih mehanizama zaštite kod grupa sa mito-jedarnom nepodudarnošću (L×E i E×L) umanjila je negativan efekat parakvata na inicijalni mortalitet, ali usloвила brže starenje u poređenju sa kontrolnim E×E i L×L grupama (povećanje parametra b , L×E i E×L u Tabeli 32). Ukratko, tretman 0,5 % parakvatom imao je veći negativan efekat na parametar $\ln a$ kod linija sa rekonstituisanim epistatičkim interakcijama (E×E i L×L), i veći efekat na parametar b kod linija sa narušenim mito-jedarnim interakcijama (L×E i E×L).

Krive preživljavanja i mortaliteta jedarnih grupa (E, odnosno L) sa očuvanim i narušenim mt-j interakcijama (E×E i L×E, odnosno L×L i E×L), koje su tretirane vodom i 0,5 % parakvatom, predstavljene su na Slikama 20 i 21. Poređenje krivih preživljavanja E×E sa L×E na kontrolnom tretmanu (voda) ukazalo je na izostanak razlika u preživljavanju usled intrinzičkog oksidativnog stresa (preklapanje krivih preživljavanja na kontroli, Slika 20). Međutim, nakon tretmana parakvatom, dolazi do značajnog pomeranja L×E krivih preživljavanja udesno u odnosu na E×E, posebno kod ženki (poređenje E×E-L×E, Slika 20, značajne razlike potvrđene χ^2 testom). U poređenju krivih preživljavanja L×L i E×L, pozitivan efekat narušavanja epistatičkih interakcija još je izraženiji i detektuje se kod oba tretmana (kontrola i parakvat, Slika 20, značajne razlike potvrđene χ^2 testom). Ovi rezultati u saglasnosti su sa značajnim povećanjem prosečne dužine života E×L grupe na odgovarajućem tretmanu (Slika 19). Iz krivih mortaliteta uočava se da E×L grupa, nezavisno od pola ili tretmana, u svakom uzrastu ima manju verovatnoću umiranja u poređenju sa L×L grupom (Slika 21). **Intrinzički stres** (tretman vodom) inicirao je statistički značajno povećanje prosečne dužine života E×L ženki i mužjaka putem značajnog smanjenja stope starenja, uprkos povećanju inicijalnog mortaliteta (poređenje L×L-E×L kontrola, ženke i mužjaci, Tabela 33). Tretman 0,5 % parakvatom (**ekstrinzički stres**) imao je efekat istog intenziteta na stopu starenja kod L×L i E×L žižaka (kao i na kontrolnom tretmanu, parametar b ostaje značajno niži kod E×L u odnosu na L×L ženke i mužjake). Međutim, efekat ekstrinzičkog oksidativnog stresa na inicijalni mortalitet bio je veći kod L×L

nego kod E×L žižaka (u proseku 21 % povećanje parametra *ln a* kod L×L žižaka u odnosu na 6 % povećanja kod E×L žižaka, poređenje PQ 0,5 % i Kontrola, Tabela 32). Kod L×E ženki produženje života usled istovremenog dejstva intrinzičkog i ekstrinzičkog stresa posledica je odloženog početka umiranja, ali po ceni brže stope starenja (poređenje E×E-L×E, Slika 21, ženke, PQ 0,5 %, Tabela 33).

4.8.2 Dužina života i preživljavanje mito-jedarnih linija tretiranih niskom koncentracijom (1,5 %) tebufenpirada

Mito-jedarne grupe sa narušenim (L×E i E×L) i očuvanim mt-j interakcijama (E×E i L×L) tretirane su niskom koncentracijom tebufenpirada (1,5 %) koji je, sa izuzetkom preživljavanja kod L×L ženki (Scheffe test: $P > 0,05$), doveo do značajnog smanjenja preživljavanja i dužine života u odnosu na kontrole kod svih grupa, nezavisno od pola (Scheffe test: $P < 0,05$; Slika 22; značajan efekat faktora tretman na preživljavanje i dužinu života u Tabeli 34). Dodatno, grupe sa L jedrom (L×L i E×L) imaju veći procenat preživljavanja i žive duže od grupa koje poseduju E jedro (E×E i L×E) (Slika 22). Postojanje statistički značajnog efekta jedra na preživljavanje i dužinu života ženki i mužjaka u četvorofaktorskoj analizi varijanse potvrđuje ovo zapažanje (Tabela 34). Veličina efekta tebufenpirada na preživljavanje i dužinu života kod ženki i mužjaka svih grupa, zavisio je od porekla jedra (statistički značajan efekat interakcije jedro × tretman u Tabeli 34). Navedeni rezultat posledica je pojave veće otpornosti kako na intrinzički, tako i na istovremeno delovanje intrinzičkog i ekstrinzičkog oksidativnog stresa, kod E×L žižaka u odnosu na L×L žiške, dok taj efekat nije uočen u poređenju E×E i L×E (osobine preživljavanje i dužina života na Slici 22). Samostalno, mitohondrije nisu imale značajan efekat na preživljavanje i dužinu života ženki i mužjaka (Tabela 34). Međutim, stepen dejstva tebufenpirada na dužinu života značajno je zavisio od porekla mitohondrije kod ženki (značajna interakcija mitohondrija × tretman u Tabeli 34). Navedeni efekat posledica je izraženog polno-specifičnog pozitivnog dejstva strane mitohondrije na dužinu života nakon tretmana (poređenje L×L-E×L, ženke, TBF 1,5 %, Slike 22, 23 i 24).

Na grafičkom prikazu preživljavanja, nakon tretmana 1,5 % TBF, uočava se da zajedničko delovanje intrinzičkog i ekstrinzičkog oksidativnog stresa nije imalo značajnih efekata na ovu osobinu (poređenja E×E i L×E, odnosno L×L i E×L, ženki i

mužjaka u okviru kontrolnih i tretiranih jedinki na Slici 22). Izostaje i efekat intrinzičkog i istovremenog delovanja intrinzičkog i ekstrinzičkog stresa na dužinu života ženki i mužjaka, netretiranih i tretiranih E×E i L×E mito-jedarnih grupa (Slika 22). Međutim, mito-jedarna nepodudarnost unutar E×L grupe, kod kontrolnih i TBF tretiranih ženki i kontrolnih mužjaka, značajno povećava dužinu života u odnosu L×L grupu sa očuvanim mt-j interakcijama (u proseku 13,2 % kod ženki i 7,9 % kod mužjaka, Slika 22). Razlike u odgovorima mt-j linija detektuju se i kroz graničnu značajnost efekta interakcije mitohondrija × jedro na dužinu života kod ženki i mužjaka u mešovitom modelu analize varijanse ($F_{1, 16,17} = 3,89$, $P = 0,07$ kod ženki i $F_{1, 16,67} = 3,46$, $P = 0,08$). Rezultati dvofaktorske ANOVA unutar grupa sa E i L jedrom, kako bi se utvrdio specifičan efekat mitohondrije i tretmana, ukazuju na odsustvo značajnog efekta mitohondrije na dužinu života u grupama sa E jedrom ($F_{1,850} = 0,64$, $P = 0,42$ kod ženki i $F_{1,664} = 1,62$, $P = 0,20$ kod mužjaka), dok je identitet mitohondrije značajno menjao dužinu života u grupama sa L jedrom ($F_{1,805} = 41,14$, $P < 0,0001$ kod ženki i $F_{1,814} = 21,02$, $P < 0,001$ kod mužjaka).

U analizi unutar polova, kod mužjaka efekat tretmana na dužinu života zavisi od epistatičkih mt-j interakcija (statistički značajna trostruka interakcija mitohondrija × jedro × tretman u Tabeli 34). Ovaj rezultat proizilazi iz nalaza da se u prisustvu ekstrinzičkog oksidativnog stresa (TBF 1,5 %) kod mužjaka gubi pozitivan efekat mitohormoze (intrinzički oksidativni stres) u L jedarnom okruženju, što rezultira izostankom produženja prosečne dužine života (Slika 22). Ženke, s druge strane, zadržavaju pozitivan efekat mito-jedarne nepodudarnosti u oba tretmana (odsustvo značajnosti interakcije mitohondrija × jedro × tretman u Tabeli 34).

Kao i u prethodnim demografskim analizama uticaja ekstrinzičkog oksidativnog stresa na promene demografskih parametara (pogledati Rezultate, odeljak 4.3.2), tretman 1,5 % tebufenpiradom uglavnom povećava inicijalni mortalitet (6 od 8 poređenja) što, uprkos usporavanju starenja, dovodi do smanjenja prosečne dužine života tretiranih u odnosu na netretirane žiške (Tabela 35). Promene parametara po opisanom obrascu statistički su značajne, međutim, samo kod mužjaka (Tabela 35). Kod ženki, značajno povećanje inicijalnog mortaliteta detektovano je samo unutar grupa sa E jedrom (E×E i L×E ženke, Tabela 35). Ipak, analiza promena demografskih parametara

pokazuje da negativan efekat tretmana 1,5 % TBF ima intenzivniji negativan efekat na demografske promene kod grupa sa očuvanim mito-jedarnim interakcijama u poređenju sa grupama sa narušenim epistatičkim interakcijama (Tabela 35). Na primer, nakon tretmana E×E mužjaka tebufenpiradom, parametar $\ln a$ povećao se za 54 %, a parametar b se smanjio za 51 % (mužjaci E×E, poređenje kontrola-TBF 1,5 %). S druge strane, nakon tretmana tebufenpiradom L×E mužjaka, parametar $\ln a$ povećao se za 21,5 %, a parametar b se smanjio za 19,2 % (mužjaci L×E, poređenje kontrola-TBF 1,5 %). Vrednost χ^2 testa iznosio je 10,63 za $\ln a$ i 6,76 za stopu starenja (mužjaci L×E, poređenje kontrola-TBF 1,5 %). Dakle, dinamika starenja linija sa narušenim mt-j interakcijama je u manjem stepenu pogođena ekstrinzičkim oksidativnim stresom od linija sa očuvanim epistatičkim interakcijama.

Pregledom krivih preživljavanja i mortaliteta (Slika 23 i 24) i tabelarnog prikaza demografskih parametara (Tabela 36) jedarnih grupa (E, odnosno L) sa očuvanim i narušenim mt-j interakcijama (E×E i L×E, odnosno L×L i E×L), koje su tretirane vodom i 1,5 % tebufenpiradom, uočava se nekoliko interesantnih trendova. Iz krivih preživljavanja ženki i mužjaka tretiranih vodom, u poređenju E×E-L×E, uočava se negativan efekat narušavanja mito-jedarnih interakcija (Slika 23, debela linija). Međutim, u poređenju E×E-L×E nakon tretmana TBF, usled mogućnosti da je mito-jedarna nepodudarnost aktivirala kompenzacione mehanizme koji su smanjili osetljivost L×E ženki i mužjaka na ekstrinzički oksidativni stres, uočeno je značajno smanjenje inicijalnog mortaliteta, ali po cenu ubrzanja dinamike starenja (Slika 23, tanka linija; poređenje E×E-L×E, TBF 1,5 %, Tabela 36).

Pozitivni efekti mito-jedarne nepodudarnosti na dinamiku starenja uočavaju se u svim poređenjima L×L-E×L, nezavisno od pola ili tretmana. Kod E×L ženki, efekat mitohormeze je vrlo izražen, te nakon tretmana TBF 1,5 % one idalje imaju bolje verovatnoće preživljavanja od netretiranih L×L ženki (ženke, poređenje L×L-E×L, Slika 23). Ovaj efekat potvrđen je i krivama mortaliteta koje pokazuju da tretirane i netretirane E×L ženke u svim uzrastima, do 20 dana, imaju manju verovatnoću umiranja od netretiranih L×L ženki (ženke, poređenje L×L-E×L, Slika 24). Iz navedenih odnosa proizašao je značajan efekat interakcije između mitohondrije i tretmana na variranje dužine života kod ženki (Tabela 34). S druge strane, veći stepen promena demografskih

parametara nakon tretmana TBF 1,5 % uočen je kod mužjaka (poređenje E×E-L×E i L×L-E×L, Tabela 36). Konačno, mitohormeza je, nezavisno od tretmana i pola, za posledicu imala isti trend promene demografskih parametara kao i u poređenju E×E-L×E nakon tretmana TBF 1,5 % - smanjenje inicijalnog mortaliteta i povećanje stope starenja (kontrola i TBF 1,5 %, poređenje L×L-E×L, Tabela 36).

5. DISKUSIJA

Osnovni predmet ovog istraživanja jeste ispitivanje evolucionih i fizioloških mehanizama starenja kod dve grupe laboratorijskih populacija fitofagnog insekta, *Acanthoscelides obtectus*, koje su više od 170 generacija selektovane za ranu (kratkoživeće, E populacije) i kasnu reprodukciju (dugoživeće, L populacije). Analiza rezultata ove studije podeljena je u dve tematske celine, koje su orijentisane na istraživanje dva različita nivoa uzroka starenja.

Prva tematska celina bavi se ultimativnim, odnosno evolucionim pitanjima nastanka i transgeneracijskog modelovanja specifičnih obrazaca starenja u populacijama koje su izložene različitim selektivnim pritiscima. U tom kontekstu, testirane su pretpostavke savremene evolucionne teorije starenja, kao i populaciono-genetičkih modela koji se na nju oslanjaju: antagonističke plejotropije (AP) i akumulacije mutacija (AM). Analiza je zasnovana na praćenju preadultnih i adultnih osobina životne istorije žižaka iz dva selekciona režima (E i L) i osnovne (B) populacije, kao i hibridnih linija nastalih ukrštanjem populacija unutar režima selektovanih za ranu i kasnu reprodukciju. Dodatno, oslanjajući se na pretpostavke evolucionog modela jednokratne some, koji predviđa raspodelu energije između funkcija reprodukcije i održavanja some, ispitivano je da li su kratkoživeći-ranoreprodukujući i dugoživeći-kasnoreprodukujući žižci evoluirali u različitim pravcima otpornosti na ekstrinzički oksidativni stres primenom dva pesticida (parakvata i tebufenpirada). Ovim eksperimentima istovremeno je testirana slobodno-radikalska fiziološka teorija starenja, koja previđa da su mehanizmi koji određuju dugovečnost i otpornost na oksidativni stres međusobno slični. S obzirom na to da demografska analiza uzrasno-specifičnih stopa mortaliteta predstavlja neizostavan analitički metod u komparativnim analizama starenja, na svim eksperimentalnim populacijama ispitana je razlika u uzrasno-specifičnim stopama mortaliteta analizom matematičkih modela mortaliteta.

Druga grupa pitanja o evoluciji starenja odnosi se na razumevanje proksimalnih, tj. neposrednih uzroka povećavanja verovatnoće umiranja tokom života, kao i individualnih genetičkih razlika koje predstavljaju „materijal” za delovanje selekcije (i drugih evolucionih mehanizama) i usmeravanje pravaca evolucije obrazaca starenja u različitim populacijama. U tom kontekstu, analizirane su uloge mitohondrija, jedra i

njihovih epistatičkih interakcija u oblikovanju dugovečnosti, kao i drugih preadultnih i adultnih osobina životne istorije. Zahvaljujući specifičnim genetičkim osobinama haploidnog mitohondrijskog genoma, kao što su materinsko nasleđivanje i skoro potpuni izostanak rekombinacija, moguće je manipulirati kombinacijama jedarnih i mitohondrijskih genoma, tj. kontrolisati u kojoj jedarnoj sredini će se mitohondrijski geni eksprimirati. Istraživanje posledica intrinzičkog oksidativnog stresa, usled narušavanja mito-jedarnih koadaptacija, urađeno je korišćenjem mito-jedarnih linija koje poseduju mitohondrije i jedra poreklom iz istih selekcionih režima, odnosno „narušenih“ mito-jedarnih linija kod kojih su porekla mitohondrije i jedra različita. Ovde su ispitane aktivnosti prva četiri kompleksa mitohondrijskog elektron transportnog lanca kod mito-jedarnih linija budući da efikasnost ETL zavisi od koadaptiranosti mitohondrijskog i jedarnog genoma. Konačno, poređenjem performansi mito-jedarnih linija sa narušenim i rekonstituisanim mito-jedarnim interakcijama, na fenotipskom i fiziološkom nivou, odgovoreno je na pitanje da li su mitohondrije, jedro i njihove interakcije bile značajan faktor u laboratorijskoj evoluciji kratkoživećih i dugoživećih linija, odnosno da li su predstavljale jedinice delovanja selekcije za ranu i kasnu reprodukciju.

5.1 Dvadeset godina laboratorijske evolucije za različito vreme reprodukcije kod pasuljevog žiška - šta se promenilo?

Eksperimentalna selekcija za vreme reprodukcije predstavlja praktičan i sveobuhvatan pristup u razumevanju evolucije starenja. Prve analize efekata selekcije za ranu (B) i kasnu (O) reprodukciju, urađene osamdesetih godina prošlog veka na vinskim mušicama *Drosophila* sp., pokazale su očekivano skraćenje dužine života mušica iz B režima, odnosno produženja dužine života kod O režima (Rose, 1984; Partridge & Fowler, 1992). Dodatno, uvidelo se da je produženje dužine života često negativno korelisano sa adaptivnom vrednošću u ranom životu, odnosno uočen je smanjen rani fekunditet kod dugoživećih u odnosu na kratkoživeće vinske mušice (Luckinbill *et al.*, 1984; Rose, 1984). Ovakvi podaci oslanjaju se na predviđanja modela antagonističke plejotropije (AP). Naknadne analize na istim linijama, tokom desetogodišnjeg perioda laboratorijske selekcije za različito vreme reprodukcije, ukazale su na trend povećanja razlika u dužini života između B i O mušica (Leroi *et al.*, 1994). Međutim, odstupanje

od očekivanog rezultata ogledalo se u postepenom povećanju ranog fekunditeta, tokom vremena, unutar O režima, da bi nakon 10 godina selekcije vrednosti bile više nego kod B mušica (Leroi *et al.*, 1994). Ovakav rezultat autori su pripisali razlikama u načinu gajenja i hranljivim podlogama između rano- i kasnoreprodukujućih režima.

Eksperimentalne populacije pasuljevog žiška selektovane za ranu i kasnu reprodukciju formirane su krajem osamdesetih godina prošlog veka. Prva analiza efekata selekcije za različito vreme reprodukcije na pasuljevom žišku obavljena je nakon više od 30 generacija selekcije za ranu (E režim) i kasnu (L režim) reprodukciju (Tucić *et al.*, 1996). Slično rezultatima na mušicama, očekivani odgovor na više od 30 generacija selekcije za vreme reprodukcije predstavljalo je produženje dužine života kod L žižaka i smanjenje dužine života kod E žižaka, bez obzira na to da li jedinke jesu ili nisu bile reproduktivno aktivne. Analiza Gompercovih parametara na ukrštanim žiškima pokazala je promene u obrascima krivih mortaliteta u smeru značajnog povećanja stope starenja (parametar b) kod E žižaka u poređenju sa L žiškima. Dodatno, u analizama obrazaca fekunditeta bilo je očigledno da kratkoživeće populacije karakteriše značajno veći rani fekunditet, raniji početak i završetak polaganja jaja, što je bilo negativno korelisano sa kasnim fekunditetom, dok se, prosečno, ukupan broj položenih jaja nije razlikovao između E i L ženki. Takođe, žišci iz dugoživećih populacija (L) imali su duže trajanje preadultnog razvića i veću masu od E žižaka. Analiza osobina životne istorije B populacija, kod kojih je izostajala primena bilo kakvog oblika selekcionog režima, ukazala je da se vrednosti svih parametara nalaze između vrednosti ustanovljenih za E i L populacije. Dakle, nedvosmisleno je pokazano da primenjeni selekcionni režimi uzrokuju evolucionu divergenciju između populacija u svim osobinama životne istorije, uključujući dužinu života i obrasce starenja.

Na istim eksperimentalnim populacijama pasuljevog žiška, u ovom radu, urađena su istraživanja nakon više od 20 godina selekcije, odnosno nakon 252 generacije selekcije za ranu reprodukciju i 174 generacije selekcije za kasnu reprodukciju. U odnosu na početne faze divergentne selekcije pravci evolucije strategija životne istorije kod E i L populacija ostali su načelno isti. Međutim, razlike u dužini života između ukrštanih E i L žižaka postale su izraženije. U početnim fazama višegeneracijske selekcije, prosečna dužina života neukrštanih L žižaka bila je u

proseku 55 % viša u odnosu na E jedinke, a nakon dodatnih 20 godina selekcije, razlika je povećana na 90 %. Sličan odnos uočava se poređenjem razlika u prosečnim dužinama života ukrštanih žižaka - u početnim fazama selekcije iznosi 50 %, a nakon više od 170 generacija selekcije iznosi 80 % više kod L u odnosu na E žiške. Demografske analize na ukrštanim jedinkama potvrdile su očuvanje trenda značajno veće prosečne stope starenja kod E u odnosu na L žiške, kao i sličnog trenda u divergenciji obrazaca fekunditeta. Jedini izuzetak od rezultata početnih faza laboratorijske evolucije u kojoj nije uočena razlika u prosečnoj vrednosti ukupnog fekunditeta, predstavlja 63 % manja vrednost totalnog fekunditeta E u poređenju sa L režimom. Međutim, kada se uporedi relativno ulaganje u reprodukciju (količnik ukupnog fekunditeta i mase) razlika između E i L režima nestaje. Imajući u vidu da je isti odnos uočen kod populacija analiziranih pre 20 godina, može se zaključiti da su razlike u ukupnom fekunditetu prevashodno posledica divergencije mase ženki. U evolucionoj teoriji životnih istorija (engl. *life-history evolution*) ovakvi rezultati nisu neočekivani budući da se u ovim modelima predviđa pozitivna korelacija između mase i fekunditeta (Stearns, 1992). S druge strane, E i L režim se razlikuju u relativnom ulaganju u rani fekunditet, i ta razlika je veća kod današnjih populacija (rani fekunditet/masa: E = 3,10, L = 0,32 jaja/mg) nego kod populacija analiziranih pre 20 godina (rani fekunditet/masa: E = 2,24, L = 1,20 jaja/mg). Očigledno, divergentna selekcija je delovala na uzrasno specifični obrazac relativnog ulaganja u reprodukciju.

5.2 Proces starenja evoluira kod laboratorijskih populacija pasuljevog žiška selektovanih za različito vreme reprodukcije - potvrda savremene evolucione teorije starenja

Ograničavanje reprodukcije na ranije uzraste (prva dva dana) u E selekcionom režimu rezultiralo je, kako i predviđa Hamiltonov model uzrasno-specifične promene intenziteta selekcije, ranijim otpočinjanjem slabljenja selekcije (Slika 25). Iz skraćivanja dužine perioda u kome je efekat selekcije najintenzivniji, dok intenzitet genetičkog drifta i stopa mutacija ostaju nepromenjeni, omogućena je akumulacija mutacija sa štetnim efektima u ranijem uzrastu nego što se to očekuje u B i L populacijama (*sensu* Connallon & Clark, 2012). Dodatno, period intenzivnog delovanja selekcije isuviše je kratak da bi se favorizovale antagonistički plejotropne mutacije sa pozitivnim dejstvom

u ranom uzrastu (*sensu* Garland & Rose, 2009). Iz svega navedenog očekuje se da selekcija za ranu reprodukciju rezultira evolucijom ubrzanog starenja. Eksperimentalne populacije pasuljevog žiška selektovane za ranu reprodukciju potvrdile su očekivanja zasnovana na savremenoj evolucionoj teoriji starenja: unutar E populacija uočeno je značajno smanjenje prosečne dužine života u poređenju sa B i L populacijama, nezavisno od pola ili reproduktivnog statusa (Slike 2 i 3). Dodatno, demografske analize pokazale su da je kraća dužina života E u odnosu na L jedinke prevashodno posledica veće stope starenja kod E žižaka.

Selekcija za kasnu reprodukciju (nakon desetog dana) u L režimu rezultirala je evolucijom značajno veće dužine života u odnosu na kontrolni i E režim, nezavisno od pola ili reproduktivnog statusa (Slike 2 i 3). Odlaganjem početka reprodukcije kod L režima produžio se period u kome selekcija intenzivno eliminiše mutacije sa štetnim uzrasno-specifičnim efektima i favorizuje AP mutacije sa pozitivnim efektima ranije u životu (Slika 25), što je rezultiralo evolucijom usporenog starenja kod L žižaka (*sensu* Rose *et al.*, 2007). U skladu sa tim, demografske analize su ukazale da L žišci imaju značajno niže stope starenja u poređenju sa B i E režimom, bez obzira na pol ili reproduktivni status. Povećanje dužine života i evolucija usporenog starenja potvrđena je i na drugim populacijama, pretežno vinskih mušica, selektovanim za kasnu reprodukciju kojima je eksperimentalno povećan intenzitet selekcije u kasnijem uzrastu (Luckinbill *et al.*, 1984; Partridge *et al.*, 1999; Wit *et al.*, 2013), iako uočeni obrazac dinamike starenja u tim linijama nije konzistentan (Zwaan, 1999). Kurtsinger i saradnici pokazali su da je produženje dužine života kod kasnoreprodukujućih vinskih mušica posledica smanjenja inicijalnog mortaliteta (Curtsinger *et al.*, 1995), dok je suptoran rezultat, odnosno smanjenje stope mortaliteta, uočen u demografskoj analizi Servisa i saradnika na vinskim mušicama (Service *et al.*, 1998).

Na osnovu rezultata ove studije može se zaključiti da je specifična dinamika procesa starenja evoluirala shodno obrascu delovanja selekcije. Dodatno, analize na laboratorijskim populacijama pasuljevog žiška pokazale su i da, u saglasnosti sa pretpostavkama evolucione teorije starenja, krive mortaliteta prate obrazac promene intenziteta selekcije. Na osnovu poređenja Slika 3 i 25, koje opisuju krive mortaliteta i intenziteta selekcije u uzrasno-specifičnom obrascu, jasno je da kod E ženki i mužjaka

krive mortaliteta započinju da eksponencijalno rastu ubrzo nakon početka opadanja efekata selekcije (nakon dva dana), dok je kod L režima rast mortaliteta odložen na period od 4 dana. Imajući u vidu evoluciono objašnjenje pojave kasnog doba, očekuje se da populacije, koje se tokom velikog broja generacija razlikuju u vremenu početka reprodukcije, pokazuju i razlike u uzrastu kada dostižu prelomni dan i ulaze u kasno životno doba. Kako se pokazalo, intenzitet selekcije u E režimu dostiže nultu vrednost 6 dana nakon izleganja adulta (što je vreme neposredno pred prelomni dan - 6,8 i 6,5 kod ženki i mužjaka), odnosno 32 dana od stadijuma jajeta, nakon čega krive mortaliteta ulaze u plato (Slika 25). Kod L režima, 13 dana nakon izleganja adulta i 45 dana od stadijuma jajeta, intenzitet selekcije dostiže nultu vrednost, a krive mortaliteta ulaze u plato (vrednosti prelomnog dana za ženke i mužjake su 13,2 i 12,5). Značajna razlika između prelomnog dana E i L režima, praćena je i očekivanom razlikom u visini platoa - za E mužjake i ženke u kasnom dobu postoji veća verovatnoća umiranja nego kod L žižaka. Ovi rezultati potvrđuju predviđanja Rouza i saradnika da je stabilizacija uzrasno-specifičnog mortaliteta rezultat ulaska intenziteta selekcije u plato niskih vrednosti (Rose *et al.*, 2002). Iako za neke istraživače sporna (Chen *et al.*, 2013), koncepcija kasnog doba u dinamici životne istorije, koja podrazumeva zaustavljanje demografskog starenja u kasnijim uzrastima, potvrđena je kod svih eksperimentalnih populacija pasuljevog žiška.

Prema teorijskim očekivanjima, u kasnijem životnom dobu dolazi do stabilizacije fizioloških mehanizama, ali smer njihovih promena nakon prelomnog dana teško je predvideti budući da je intenzitet selekcije tada zanemarljiv (Shahrestani *et al.*, 2016). U skladu sa tim, analize fizioloških karakteristika tokom starenja i u kasnom dobu kod *D. melanogaster* pokazale su usporavanje nekih fizioloških procesa (npr. vreme provedeno u kretanju), ubrzavanje drugih (npr. negativna geotaksija), dok neki fiziološki procesi imaju polno-specifičnu ekspresiju (npr. otpornost na gladovanje) (Shahrestani *et al.*, 2012, 2016). Međutim, najvažniji zaključak koji su ove analize pružile jeste to da se fiziološka osnova hronološkog starenja i kasnog doba značajno razlikuju (Shahrestani *et al.*, 2012). Dodatno, na osnovu analize ekspresije gena zaključeno je da više od 75 % svih gena kod *Drosophila* sp. nema uzrasno-specifičnu ekspresiju, odnosno da samo 4-9 % ima uzrasno-specifični profil u velikom broju različitih tkiva (Zhan *et al.*, 2007; Graves, 2012). Imajući u vidu da veliki broj gena ne

menja svoju ekspresiju sa uzrastom, moguće je teorijski pretpostaviti postojanje genetičke mreže koja će biti aktivna i održavati fiziološke funkcije na stabilnom, bazalnom nivou u jako kasnom uzrastu jedinke (Graves, 2012). Ukoliko je tako, onda u kasnom dobu može preovladati homeostaza između nastanka i ispravke oštećenja. Od tog trenutka nadalje, u zaštićenim, benignim uslovima sredine, verovatnoća umiranja postaje ista za sve jedinke, što se detektuje kao prestanak demografskog starenja.

Problem u analizi fizioloških mehanizama u osnovi kasnog doba predstavlja činjenica da jako mali broj jedinki u populaciji dostiže taj uzrast, te je teško sakupiti dovoljno veliki uzorak za biohemijske analize. Eksperimenti na velikim uzorcima, kao u ovoj studiji, mogu pomoći u prevazilaženju ovih ograničenja. Naime, za pasuljevog žiška karakteristična je ranija pojava platoa u krivama mortaliteta, pa kasno doba dostiže više od 40 % ukupno analiziranih jedinki. U tom kontekstu, jedan od planova za buduće studije jesu poređenja aktivnosti enzima antioksidativnog stresa i mitohondrijskih enzima koji učestvuju u oksidativnoj fosforilaciji i nastanku reaktivnih kiseoničnih vrsta, pre i posle prelomnog dana kod žižaka iz E i L režima.

5.3 Populaciono-genetički mehanizmi u osnovi evolucije starenja kod eksperimentalnih populacija pasuljevog žiška

Evolucija bilo kog svojstva organizama podrazumeva promene u genetičkoj strukturi populacije, odnosno promene učestalosti alela onih gena čiji se produkti nalaze u molekularnoj osnovi formiranja konkretnog svojstva. U tom kontekstu, u razmatranjima evolucije specifičnih obrazaca starenja postavlja se pitanje u kojoj meri su u taj proces uključene mutacije sa antagonistički-plejotropnim efektom, a koliko mutacije sa štetnim efektom u kasnijem uzrastu jedinke.

5.3.1 Antagonistička plejotropija - Koja je cena dugovečnosti?

Populaciono-genetički model antagonističke plejotropije (AP) u evoluciji starenja oslanja se na fenomen uzajamnih ograničenja između ranih i kasnih osobina životne istorije, pogotovo između dužine života i ranog fekunditeta. Imajući u vidu teorijske pretpostavke AP i jednokratne some (JS), očekivani rezultati eksperimentalne evolucije populacija pasuljevog žiška podrazumevaju da će ekspresija fenotipa

povećane/smanjene dužine života imati za posledicu promene u vrednostima preadultnih i adultnih osobina životne istorije (Arking *et al.*, 2002; Boggs, 2009).

Selekcionni eksperimenti na pasuljevom žišku, u kojima se kontroliše vreme reprodukcije, pokazali su da je moguće produžiti i skratiti dužinu života, ali po cenu ranog i kasnog fekunditeta. U skladu sa postavkama laboratorijske procedure, gde u formiranju naredne generacije učestvuju samo jaja položena tokom prva dva dana ili nakon 10 dana starosti roditelja (E i L režimi), tokom generacija došlo je do selektivnog odgovora koji podrazumeva promenu obrazaca fekunditeta - L ženke značajno odlažu početak reprodukcije i polaganje jaja, te imaju smanjen rani i povećan kasni fekunditet u poređenju sa B i E ženkama, dok je selekcija za ranu reprodukciju rezultovala ranijim otpočinjanjem i užim vremenskim opsegom polaganja jaja (Slika 4). U korelativnom selekcionom odgovoru na vreme reprodukcije, evoluirala je i dužina života - E jedinke žive dvostruko kraće u odnosu na L žiške. Međutim, vrednosti ranog fekunditeta E ženki značajno su niže nego kod B ženki, iako je period polaganja jaja kraći, a kasni fekunditet u svim kasnijim uzrastima niži. Sličan trend opisan je i kod vinskih mušica selektovanih za ranu reprodukciju u odnosu na kontrole (Arking *et al.*, 2002). Ovakvo smanjenje reproduktivne adaptivne vrednosti u odgovoru na selekciju za ranu reprodukciju kod vinskih mušica i pasuljevog žiška može predstavljati posledicu „nedovoljno efikasnog sistema somatskog održavanja koji je inicijalno odgovoran za ubrzano starenje“ (Arking *et al.*, 2002). Ovi rezultati ukazuju da značaj AP u evoluciji bržeg starenja verovatno nije veliki zbog toga što je i period u kom selekcija intenzivno deluje na osobine životne istorije kratak, onemogućavajući efikasno povećanje učestalosti AP mutacija sa pozitivnim efektom u ranom uzrastu. Ukoliko je to tačno, onda se može očekivati da je značaj mehanizama AP modela veći ukoliko pravac evolucije podrazumeva produžavanje života, što je ovde i pokazano (videti kasnije). Skraćenje perioda polaganja jaja u E režimu navodi na zaključak da je selekcija za ranu reprodukciju bila prevashodno usmerena na evoluciju bržeg preadultnog razvića i ranijeg dostizanja polne zrelosti, nego na povećanje samog fekunditeta. Uzimajući sve rezultate u obzir, uočene negativne korelacije između dužine života i kasnog fekunditeta, sa jedne strane, i ranog fekunditeta, sa druge, u saglasnosti su sa rezultatima dobijenim na laboratorijskim populacijama *Drosophila* sp. (Prasad & Joshi, 2003; Wit

et al., 2013) i upućuju na važnost i kompleksnost uloge koju antagonistička plejotropija ima u evoluciji starenja kod pasuljevog žiška.

Imajući u vidu da kod žižaka postoji značajna zavisnost fekunditeta od mase, odnos između fekunditeta i dužine života velikim delom proističe iz značajnih razlika u masi tela između dva selekciona režima. U skladu sa pretpostavkama teorije JS, po kojima uzajamna ograničenja između fekunditeta i dugovečnosti proizilaze iz činjenice da su za obe funkcije neophodni isti resursi (Graves *et al.*, 1992; Zera & Harshman, 2001), uočena je divergencija u metaboličkim rezervama kod pasuljevog žiška poreklom iz B, E i L režima (Lazarević *et al.*, 2012). Selekcija za ranu reprodukciju za rezultat ima smanjenje količine ugljenih hidrata i lipida, i povećanje količine proteina kod E u odnosu na B ženke. Na osnovu ovog rezultata pretpostavlja se da je kod E selekcionog režima evoluirala specifična metabolička strategija ulaganja resursa u konkretna svojstva životne istorije, slična kratkokrilnim oblicima vaši i cvrčaka (Zera, 2005; Shi *et al.*, 2010). Suprotan odgovor, tj. povećanje sadržaja glikogena, bez promena sadržaja proteina, lipida i ugljenih hidrata, karakterističan je za kasnoreprodukujuće L ženke. Povećanje sadržaja glikogena takođe je detektovano kod vinskih mušica selektovanih za produženu dužinu života (Rose, 1984; Graves *et al.*, 1992; Djawdan *et al.*, 1996, 1997). Kako se može zaključiti, kod dugoživećih L žižaka evoluirala je metabolička strategija akumulacije resursa i povećanja mase tela, dok je kod kratkoživećih E žižaka alokacija resursa evoluirala u smeru intenzivnog ulaganja u ubrzano razviće, pa i rani fekunditet (*sensu* Djawdan *et al.* 1996).

Prvobitna pretpostavka Linde Partridž i Kevina Faulera podrazumevala je da povećanje mase kod dugoživećih jedinki nastaje usled produženog trajanja razvića koje omogućava više vremena za formiranje „superiorne some“ (Partridge & Fowler, 1992). Međutim, naknadne analize na populacijama vinske mušice, selektovanih za odloženo vreme reprodukcije (Wit *et al.*, 2013), kao i direktna selekcija za trajanje razvića kod koje nije uočena promene dužine života i *vice versa* (Zwaan *et al.*, 1995a; b), nisu potvrdile postojanje veze između trajanja razvića, mase i dužine života. Analiza trajanja razvića kod žižaka selektovanih za kasnu reprodukciju u saglasnosti je sa navedenim studijama - povećanje mase i dužine života L žižaka nije povezano sa dužim trajanjem razvića u odnosu na kontrolni režim, već je ono i delimično smanjeno (Slike 1, 2 i 3).

Štaviše, kod L režima nijedna preadultna osobina, sem mase, nije dala korelativni odgovor na produženje života. S druge strane, trajanje razvića E žižaka je značajno ubrzano, a masa značajno manja, u poređenju sa B i L žižcima. Ovakav odgovor, pored mogućnosti postojanja direktne korelacije između trajanja razvića i mase, može biti i neminovna posledica promena sredinskog konteksta i evolucije drugih karakteristika žižaka. Naime, u E režimu polaganje jaja dešava se u kratkom vremenskom intervalu što rezultuje visokom gustinom larvi i posledičnom kompeticijom za dostupne resurse (semena pasulja). Takve interakcije mogu usloviti selekciju za kraće trajanje razvića, kako bi se ranije u odnosu na kompetitore pristupilo resursima, dok manja masa može biti direktna posledica smanjene količine dostupnih resursa po svakoj jedinki. Partridž i saradnici pokazali su da kontrolisanjem gustine larvi i selekcije za adultno sazrevanje, unutar selekcionog režima za ranu reprodukciju, korelacije između trajanja razvića, mase i dužine života mogu izostati, tj. ove osobine mogu nezavisno evoluirati (Partridge *et al.*, 1999).

Jedna od zamerki koje se pripisuju selekcionim eksperimentima za kasnu reprodukciju jeste da se na taj način indirektno selektuju jedinke koje duže žive (jedinke moraju da prežive do kasnijih uzrasta da bi se ukrštale), te da na taj način detektovane pozitivne korelacije između odlaganja reprodukcije i dužine života, kao i negativne korelacije između ranog fekunditeta i dužine života zapravo predstavljaju artefakt (Partridge *et al.*, 1999). Drugim rečima, ustanovljene korelacije ne moraju odražavati zajedničku (plejotropnu) genetičku osnovu (ili vezano nasleđivanje gena u osnovi ovih osobina), već paralelne, ali nezavisne odgovore dve osobine na isti selektivni pritisak. Međutim, osnove ove teorijske zamerke poljuljane su elegantnim eksperimentom koji je pokazao da direktna selekcija za dužinu života dovodi do korelisanog smanjenja ranog fekunditeta kod dugoživećih populacija vinskih mušica (Zwaan *et al.*, 1995b). Interesantan je i podatak da se kod nekih eksperimentalnih režima ova negativna korelacija izgubila tokom kasnijih faza selekcije (Leroi *et al.*, 1994; Arking *et al.*, 2002), odnosno da je kod dugoživećih mušica fekunditet u svim uzrastima postao viši od fekunditeta mušica iz kontrolnih i rano-reprodukujućih režima. Autori su ovu pojavu „super mušica“ objasnili evolucijom specifičnih metaboličkih puteva, kao i mogućim promenama lipidnog sastava mitohondrijske membrane koje smanjuju „curenje“ mROS-ova iz mitohondrije u citoplazmu (Arking *et al.*, 2002).

5.3.2 Akumulacija mutacija

Oslanjajući se na populaciono-genetički model akumulacije mutacija, osnovne pretpostavke u radu podrazumevale su da je skraćanjem perioda intenzivnog delovanja selekcije unutar E režima dolazilo, tokom generacija, do povećanja učestalosti mutacija koje imaju neutralne efekte u ranom i štetne u kasnom uzrastu. Uzimajući u obzir i da je nastanak mutacija stohastički proces, specifičan za svaku E populaciju, kod dvostrukih E hibrida očekuje se pojava hibridnog vigora u osobinama adaptivne vrednosti. Selekcijom za kasne osobine životne istorije u L režimu dolazilo bi do eliminacije mutacija sa štetnim efektom u ranijem uzrastu kod svih L populacija, pa se ovde ne može očekivati pojava heteroze u analiziranim osobinama.

Obe pretpostavke potvrđene su u analizama dužine života nehibridnih E i L populacija i njihovih odgovarajućih dvostrukih hibrida (Slika 5). Veća dužina života kod E dvostrukih hibrida ukazuje da selekcija unutar E režima, u kratkom periodu kada je najefikasnija, nije bila usmerena na selekciju alela sa važnim ulogama u produženju života, odnosno nije eliminisala alele koji doprinose kraćem životnom veku. Suprotan scenario odigrao se unutar L selekcionog režima - selekcija je favorizovala alele sa pozitivnim dejstvom na produženje života i vrlo efikasno eliminisala alele sa štetnim uzrasno-specifičnim efektima. Kao rezultat, hibridni vigor kod L dvostrukih hibrida je izostao. U studiji Boraša i saradnika sa sličnim dizajnom eksperimenta, nije pokazana značajna uloga AM u evoluciji kratkoživećih i dugoživećih populacija *D. melanogaster* (Borash *et al.*, 2007). Potvrda uloge AM kao populaciono-genetičkog mehanizma sa značajnom ulogom u evoluciji starenja kod laboratorijskih populacija *A. obtectus* nije u suprotnosti sa prethodno navedenim rezultatima uzajamnih ograničenja između rane reprodukcije i dugovečnosti koji podržavaju mehanizam AP. Teorijski, ova dva mehanizma se ne moraju međusobno isključivati. Imajući u vidu da je proces starenja pod kompleksnom kontrolom velikog broja gena, genetička osnova starenja nužno je oblikovana kako alelima koji se održavaju mutaciono-selekcionim balansom, tako i alelima koji imaju antagonističko-plejotropni efekat. U slučaju evolucije starenja kod pasuljevog žiška, ukazali smo na značajnu ulogu oba mehanizma.

Zanimljiv rezultat u analizi AM kao genetičkog mehanizma u osnovi evolucije reproduktivnih osobina uočen je kod žižaka selektovanih za ranu reprodukciju. Naime,

ne samo da se E ženke i mužjaci razlikuju u genetičkoj osnovi reproduktivne adaptivne vrednosti, nego je samo kod mužjaka uzrasno-specifični obrazac hibridnog vigora u saglasnosti sa pretpostavkama AM (Slike 6 i 7). U još jednoj studiji ustanovljen je sličan uzrasno-specifični vigor kod hibridnih mužjaka *D. melanogaster*, dok je heteroza izostala u fekunditetu hibridnih ženki (Borash *et al.*, 2007). Imajući u vidu prethodno objašnjenje o AP modelu i obrascu fekunditeta kod E ženki (pogledati Diskusiju, odeljak 5.3.1), može se zaključiti da je selekcija u E režimu kod ženki favorizovala životnu strategiju koju karakteriše ubrzavanje razvića i brz ulazak u period polaganja jaja, ali ne i povećanje ranog fekunditeta. Drugim rečima, u E selekcionom režimu adaptivna vrednost ženki je slabo povezana sa brojem položenih jaja u prva 2 dana, što je za rezultat imalo povećanje učestalosti mutacija sa štetnim efektima na tu osobinu u ranom uzrastu i pojavu hibridnog vigora u ranom fekunditetu kod ženki E dvostrukih hibrida. Postavlja se pitanje šta može biti uzrok drugačije genetičke osnove reproduktivne adaptivne vrednosti kod E mužjaka. Budući da je protandrija izražena kod pasuljevog žiška, za E mužjake je značajno da svoje reproduktivne osobine usaglase za brzim adultnim sazrevanjem E ženki (Stojković *et al.*, 2015). Tačnije, za adaptivnu vrednost E mužjaka važno je što ranije otpočinjanje inseminacije E ženki i kopulacija sa što većim brojem ženki tokom prva dva dana života, kada su seksualne interakcije jedino i moguće u postavljenom programu E selekcije. S obzirom na to da je ovakav deterministički pravac delovanja selekcije isti u svim populacijama unutar E režima, odnosno da se može pretpostaviti selektivno favorizovanje alela sa sličnim pozitivnim efektima, hibridni vigor u reproduktivnom ponašanju mužjaka kod E dvostrukih hibrida nije ni očekivan.

Kod ženki i mužjaka L dvostrukih hibrida ustanovljen je hibridni vigor u reproduktivnim osobinama broj položenih jaja (ženke) i broj oplođenih ženki (mužjaci). Ovaj rezultat u suprotnosti je sa hipotezom izvedenom na osnovu obrasca selekcije u L režimu - produžen period visokog intenziteta selekcije trebalo je da eliminiše štetne recesivne mutacije. Postoji mogućnost da je povećanje inbriding depresije kod L žižaka posledica primene selekcije za kasnu reprodukciju tokom velikog broja generacija (187) u kojoj mali broj jedinki preživi do uzrasta kada može da učestvuje u formiranju sledeće generaciji te dolazi do smanjenja efektivne veličine populacija i većeg uticaja drifta u svakoj od L populacija. U tom kontekstu možemo postaviti pitanje zbog čega dužina

života nije pokazala efekte inbridinga i akumulacije mutacija. Jedno od objašnjenja podrazumeva da je dužina života L ženki i mužjaka, a ne reproduktivne osobine, bila pod direktnim uticajem unutar selekcionog režima za kasnu reprodukciju (Stojković *et al.*, 2015). Dodatno, imajući u vidu da je za L režim karakterističan visok stepen seksualnog (Šešlija *et al.*, 2008, 2009), seksualno antagonističke osobine mogu biti pod velikim uticajem genetičkog drifta. Prema Konelonu i Klarku antagonistička seksualna selekcija - gde aleli na jednom lokusu imaju različite efekte na osobine adaptivne vrednosti ženki i mužjaka - mogu dovesti do neto smanjenja intenziteta selekcije i nakupljanja mutacija sa štetnim efektima u tim lokusima (Connallon & Clark, 2012). Dakle, uočena uzrasno-specifična heteroza u fekunditetu ženki L dvostrukih hibrida i reproduktivnom ponašanju mužjaka L dvostrukih hibrida u svim uzrastima može biti posledica različitih pravaca delovanja seksualne selekcije kod ženki i mužjaka u selekcionom režimu za kasnu reprodukciju.

5.4. Uloga seksualnog konflikta u evoluciji polno-specifičnih razlika u dužini života

Polno-specifična osetljivost reproduktivnih osobina na inbriding unutar E selekcionog režima, kao i neočekivana pojava heteroze u reproduktivnim osobinama ženki i mužjaka unutar L režima ukazuju da pored prirodne selekcije, važnu ulogu u evoluciji polnog dimorfizma u dužini života i stopi mortaliteta ima i seksualna selekcija. Polno-specifična selekcija se odigrava kada se optimalna reproduktivna strategija razlikuje između polova. Dodatno, ona oblikuje evoluciju životnih strategija preko mehanizama inter- i intralokusnog seksualnog konflikta.

Kada je seksualno antagonistička adaptacija optimalna za jedan pol, ali štetna za drugi, mehanizam evolucije osobine zasniva se na **interlokusnom seksualnom konfliktu** (Chapman *et al.*, 2003). Ove osobine kodirane su različitim setovima gena kod ženki i mužjaka i mogu voditi seksualno antagonističkoj evoluciji kontraadaptacija i koevoluciji reproduktivnih strategija. Na primer, reproduktivne osobine mužjaka mogu negativno uticati na dužinu života ženki direktno (npr. nanošenjem fizičkih oštećenja) i indirektno (npr. manipulacijom obrazaca reproduktivnih aktivnosti ženki) i predstavljaju evolucionu odgovor na kompeticiju između mužjaka (intraseksualna selekcija). S druge strane, kod ženki, kao odgovor na ovakve adaptacije mužjaka, evoluiraju kontraadaptacije, kao što su ingestija ejakulata (Bonduriansky *et al.*, 2005) i/ili

oslobađanje jedinjenja sa antiafrodizijačkim dejstvom (Andersson *et al.*, 2004), koje istovremeno mogu imati i negativan efekat na adaptivnu vrednost mužjaka. Kako je pokazano, izražen interlokusni seksualni konflikt može oslabiti efikasnost selekcije u eliminaciji alela sa štetnim efektom u kasnijem uzrastu (Promislow, 2003). Rezultati eksperimentalne evolucije na *C. maculatus* ukazali su na manju stopu mortaliteta i veću dužinu života kod neukrštanih ženki iz monogamnog u poređenju sa poliandričnim selekcionim režimom (Maklakov *et al.*, 2009). Sličan rezultat uočen je kod ženki *D. melanogaster* kod kojih je detektovana veća dužina života nakon reprodukcije sa mužjacima selektovanim za monogamiju nego nakon reprodukcije sa mužjacima iz poliandričnih populacija (Holland & Rice, 1999). Iz navedenih rezultata može se zaključiti da selekcija za monogamiju rezultira evolucijom veće dužine života kod ženki usled gubitka energetske ulaganja u skupe kontraadaptacije. Ujedno, unutar selekcionih režima za monogamiju, produžena dugovečnost mužjaka posledica je promene raspodele energetske resursa između reproduktivnog ulaganja (kompeticije) i mehanizama održavanja same u korist mehanizama zaštite (Lazarević *et al.*, 2013; Šešlija Jovanović *et al.*, 2014).

Za razliku od interlokusnog seksualnog konflikta, **intralokusni seksualni konflikt** zasniva se na postojanju fenotipskih osobina u čijoj se genetičkoj osnovi nalaze isti geni kod ženki i mužjaka, a na koje seksualna selekcija deluje u različitim smerovima (Van Doorn, 2009). Dakle, ključna pretpostavka intralokusnog konflikta jeste da osobine, koje su pod jakim uticajem ovog oblika seksualne selekcije, za rezultat imaju polno-specifičnu genetičku arhitekturu. U skladu sa ovom pretpostavkom nalaze se rezultati eksperimentalnih studija koje su pokazale da geni sa važnim ulogama u produženju dužine života imaju dominantan efekat kod ženki, a recesivni kod mužjaka (Fox *et al.*, 2004; Šešlija *et al.*, 2008). Poređenje laboratorijskih linija *D. melanogaster* ukazalo je na polno-specifične obrasce ekspresije gena koji kodiraju za iste osobine kod ženki i mužjaka (Baker *et al.*, 2007; Wayne *et al.*, 2007). Vrlo je zanimljiva ideja da važan izvor intralokusnog seksualnog konflikta u optimizaciji osobina životne istorije ženki i mužjaka predstavlja maternalno nasleđivanje mtDNK (Rand *et al.*, 2006; Bonduriansky *et al.*, 2008).

U selekcionom režimu za ranu reprodukciju i kratak život polni dimorfizam u dužini života je smanjen u poređenju sa predačkim B režimom. Ovakav rezultat najverovatnije proizilazi iz smanjenja inter- i intraseksualnog konflikta unutar E režima, pa samim tim i njihove uloge u oblikovanju dugovečnosti. Naime, s obzirom na to da je monoandrija karakteristična za E režim (Šešlija *et al.*, 2009), kod E ženki i mužjaka očekivan je manji intenzitet interlokusnog konflikta, odnosno izostanak evolucije energetske skupih polno-antagonističkih adaptacija i kontraadaptacija. U tom kontekstu može se sagledati i neočekivan rezultat značajno veće dužine života neukrštanih E mužjaka od ženki. Na primer, izostanak kompeticije između mužjaka mogao je voditi preusmeravanju ulaganja resursa u mehanizme zaštite same umesto u skupe reproduktivne adaptacije. Evolucija reverznog polnog dimorfizma u dužini života u stopama mortaliteta kod E populacija, u poređenju sa predačkim B žiškama, prethodno je uočena i u studiji Stojkoviće i Savkovića (Stojković & Savković, 2011). S druge strane, direktna potvrda smanjenog intralokusnog seksualnog konflikta unutar E režima proističe iz analize aktivnosti mitohondrijskog ETL koje su pokazale izostanak polnog dimorfizma u aktivnostima svih kompleksa (videti kasnije).

Evolution poliantričnog sistema reprodukcije unutar L selekcionog režima, međutim, uslovlila je povećanje polnog dimorfizma u dugovečnosti u odnosu na B režim. Kako navode Stojković i saradnici, procedura održavanja E i L populacija, pored selekcije za vreme reprodukcije, posredno je nametnula i različite režime seksualne selekcije (Stojković *et al.*, 2011). U E režimu, u kom je reprodukcija omogućena tokom samo dva dana života i podrazumeva, najčešće, samo jedno ukrštanje svake jedinke, intenzitet svakog oblika seksualne selekcije je očekivano mali. S druge strane, neprekidne interakcije između mužjaka i ženki tokom čitavog života, koje su karakteristika L selekcionog režima, neminovno povećavaju inter- i intraseksualnu selekciju, kao i, najverovatnije, intenzitet seksualnog konflikta. S tim u vezi, alokacijski prioritet za L mužjake bilo bi ulaganje energetskih resursa u osobine uključene u kompeticiju sa drugim mužjacima, a nauštrb mehanizama održavanja same. Važno je napomenuti da će ovaj „trošak“ kod mužjaka biti prisutan nezavisno od reproduktivnog statusa mužjaka. Kontraadaptacije kod ženki, kao što je, na primer, sinteza jedinjenja koje smanjuju toksično dejstvo proteina iz ejakulata mužjaka (Goenaga *et al.*, 2015), aktiviraju se tek nakon kopulacije, zbog čega je dugovečnost oplodjenih ženki manja, a

polni dimorfizam se smanjuje u odnosu na neoplođene jedinke. Kao posledica izraženog seksualnog konflikta u L režimu može se interpretirati i povećana otpornost L ženki na oksidativni stres (videti kasnije, odeljak 5.5). U saglasnosti sa ovom pretpostavkom je i detekcija više aktivnosti antioksidativnog enzima SOD u kasnijem uzrastu kod L, ali ne i E ženki (Šešlija *et al.*, 1999). Pored polnog dimorfizma u dužini života i otpornosti na oksidativni stres, unutar L režima detektovana je i značajna razlika u aktivnosti ETL kompleksa, posebno kompleksa II koji je pokazao veću aktivnost kod L ženki nego kod L mušjaka (videti kasnije, odeljak 5.6). Imajući u vidu da je multivarijantna regresiona analiza ukazala da je kompleks II značajan prediktor osobine dužina života kod ženki, ali ne i kod mušjaka, može se zaključiti da je intralokusni konflikt imao značajnu ulogu u evoluciji polnog dimorfizma dugovečnosti unutar selekcionog režima za kasnu reprodukciju.

5.5 Žrtvovanje mehanizama održavanja some zarad reprodukcije - povezanost uzrasno-specifične selekcije i otpornosti na oksidativni stres

Fiziološki-specifična varijanta antagonistički-plejotropne teorije - teorija jednokratne some, zasniva se na pretpostavci da optimizacija raspodele energije između reprodukcije i somatskog održavanja predstavlja adaptivni odgovor na zahteve okolnosti životne sredine u kojima populacija evoluira. Međutim, ostaje nepoznanica kojim putevima prirodna selekcija oblikuje strategije raspodele energetske zaliha između reprodukcije i mehanizama održavanja some. Drugim rečima, nije u potpunosti razjašnjeno kakav je odgovor mehanizama zaštite i ispravke oštećenja, izazvanim reaktivnim vrstama kiseonika, na promenu obrazaca fekunditeta i reprodukcije. Višegeneracijska uzrasno-specifična selekcija predstavlja efikasno oruđe u potrazi za odgovorima na ovakva pitanja.

Iako postoje razlike u mehanizmima generisanja ROS-ova između parakvata i tebufenpirada, tretiranje eksperimentalnih populacija pasuljevog žiška ovim pesticidima izazvali su slične odgovore - kasnoreprodukujući L žišci otporniji su na oksidativni stres od ranoreprodukujućih E žižaka, dok kontrolni, B režim, karakterišu intermedijarne vrednosti. Prethodna istraživanja pokazala su da L žišci imaju višu aktivnost antioksidativnog enzima SOD u kasnijem uzrastu (Šešlija *et al.*, 1999), kao i veće koncentracije proteina Hsp70 (Šešlija, 2005) i redukovano glutaciona (neobjavljeni

rezultati) u poređenju sa E žiškima. Navedeni podaci, interpretirani zajedno sa rezultatima ove studije kroz prizmu teorije JS, ukazuju da je unutar selekcionog režima za kasnu reprodukciju optimizacija energije išla u smeru većeg ulaganja u mehanizme održavanja some, a nauštrb ranog fekunditeta. Suprotna strategija optimizacionog modela evoluirala je u selekcionom režimu za ranu reprodukciju - E žišci ulažu resurse, sakupljene tokom kratkog trajanja razvića, u ranu reprodukciju, žrtvujući mehanizme koji imaju važnu ulogu u oblikovanju dužine života.

Unutar svih eksperimentalnih populacija žižaka uočena je evolucija polno-specifične otpornosti na oksidativni stres. Pokazalo se da su ženke otpornije od mužjaka na oksidativni stres izazvan PQ i TBF, kao i da je ova razlika posebno izražena kod L ženki na visokim koncentracijama pesticida. Šta se nalazi u osnovi otpornosti i na koji način je seksualna selekcija mogla oblikovati povećanu otpornost na oksidativni stres kod ženki? Pre svega, ženke ulažu mnogo više od mužjaka u reprodukciju, što je spregnuto sa povećanjem stope metabolizma i oksidativnog stresa. Dodatno, za vrstu *A. obtectus* karakteristično je da ejakulat mužjaka sadrži jedinjenja koja su toksična za ženke (Šešlija *et al.*, 2009). Ovo je posebno izraženo unutar L režima u kome je evoluirao poligamni sistem ukrštanja, pa su L ženke, pored visoke koncentracije toksičnih jedinjenja, izložene i visokoj učestalosti ponovnih ukrštanja koja mogu fizički oštetiti ženke. Svi ovi selektivni pritisci mogli su doprineti bržoj evoluciji mehanizama zaštite od stresa, posebno od oksidativnog stresa, kod ženki u odnosu na mužjake. Slični rezultati na *Drosophila* sp. pokazali su polno-specifične razlike u antioksidativnoj zaštiti (Magwere *et al.*, 2006; Kremntsova *et al.*, 2012), kao i manju sintezu mROS-ova kod ženki u odnosu na mužjake (Viña *et al.*, 2003). Dodatno, polno-specifičnoj razlici u starenju i otpornosti na oksidativni stres značajno doprinosi i evolucioni proces opisan kao fenomen materinske kletve. Maternalno prenošenje mitohondrijskih gena uzrokuje slabljenje uticaja koji selekcija ima na eliminaciju mitohondrijskih mutacija sa štetnim efektom na osobine životne istorije kod mužjaka (Gemmell *et al.*, 2004; Wolff & Gemmell, 2013). Drugim rečima, intenzivna selekcija mitohondrijskih genetičkih varijanti u ženskoj liniji nasleđivanja uslovljava smanjenje mutacionog opterećenja u odnosu na mužjake, zbog čega ženke predstavljaju pol otporniji na oksidativni stres. Eksperiment na vinskim mušicama pokazao je da mtDNK varijabilnost koja se javlja u prirodi, u prisustvu istovetnog jedra (*wild type*), značajno utiče na varijabilnost u dužini

života i stopi starenja kod mužjaka, ali ne i ženki (Camus *et al.*, 2012). Ovim je potvrđeno da mtDNK mutacije imaju važnu ulogu u polno-specifičnim razlikama u starenju i odgovoru na oksidativni stres izazvan nepravilnim funkcionisanjem bioenergetskih procesa unutar mitohondrija. U eksperimentima na *A. obtectus*, u kojima su žišci tretirani pesticidima, dobijena je eksperimentalna podrška pretpostavkama modela materinske kletve, pre svega većoj osetljivosti mužjaka na oksidativni stres izazvan inhibitorima mitohondrijskih kompleksa i generatorima ROS-ova.

Smanjenje prosečne dužine života kod svih laboratorijskih populacija nakon 24-časovnog tretmana parakvatom i tebufenpiradom, praćeno je sličnim obrascem promena Gompercovih parametara mortaliteta - povećanjem koncentracije PQ i TBF povećavaju se vrednosti inicijalnog mortaliteta i usporava se stopa starenja. Dobijeni negativan odnos između $\ln a$ i b parametara očekivan je i detektovan i u drugim studijama (Min & Tatar, 2006; Krementsova *et al.*, 2012). Naime, u genetički heterogenoj populaciji, ekstrinzički izazvan oksidativni stres eliminiše manje otporne jedinke, dovodeći do povećanja inicijalnog mortaliteta u demografskim analizama. Robusnije i otpornije jedinke, koje prežive tretman, sporije stare, te u demografskim analizama preostalog dela populacije detektujemo manju stopu starenja u odnosu na kontrolnu grupu (Yashin *et al.*, 2002). Međutim, u dva slučaja detektovano je odstupanje od opisanog trenda.

Prvo, iako nije značajno uticala na promenu srednje dužine života, tretman najnižom koncentracijom parakvata (1 % rastvor) rezultovao je kod E ženki pozitivnom korelacijom između ranog ulaganja u reprodukciju i sposobnosti odbrane od blagog oksidativnog stresa. Značajno odlaganje početka umiranja E ženki i brže starenje u odnosu na kontrole najverovatnije je posledica činjenice da E ženke brže sazrevaju od B i L ženki, pa samim tim imaju veći broj zrelih jaja sa akumuliranim vitelogeninom i antioksidantima (Lazarević *et al.*, 2013). Eksperimentalno je potvrđeno da proteini žumanceta, kao što su vitelogenin, transferin, i feritin, kod insekata imaju ulogu u antioksidativnoj zaštiti i regulaciji homeostaze gvožđa (Kim *et al.*, 2008; Pham & Winzerling, 2010; Geiser & Winzerling, 2012). Vitelogenin može imati antioksidativnu ulogu jer učestvuje u neutralizaciji efekata parakvata (Seehuus *et al.*, 2006). Uloga gvožđa u organizmu je antagonistička - neophodan je nutrijent za veliki broj metaboličkih procesa, dok, sa druge strane, katalizuje sintezu hidroksi radikala koji

oštećuju makromolekule (Nichol *et al.*, 2002). Dakle, postoji mogućnost da kod E ženki, nakon ingestije niskih doza PQ, dolazi do oslobađanja gvožđa iz njegovih makromolekulskih kompleksa u jajima, koje proteini žumanceta, pre svega transferin i feritin, vezuju za sebe i učestvuju u antioksidativnoj zaštiti u ranom uzrastu. Međutim, akumulacija gvožđa u vidu feritina u oocitama može imati štetne efekte na preživljavanje u kasnijem uzrastu zbog nedostatka ovog esencijalnog nutrijenta. Opisani antagonistički plejotropni efekat proteina koji vezuju gvožđe na osobine adaptivne vrednosti u ranijem i kasnijem uzrastu detektovan je i kod sisara (Arosio *et al.*, 2009).

U drugom odstupanju od pretpostavljenih promena demografskih parametara i dugovečnosti pod uticajem pesticida, tretman najnižim koncentracijama tebufenpirada rezultirao je značajnim povećanjem dužine života kod B i E mužjaka u odnosu na netretirane kontrole (Slika 12; Šešlija Jovanović *et al.* 2014). Produženje dugovečnosti kod B mužjaka posledica je odlaganja početka umiranja, dok je kod E mužjaka to posledica usporavanja stope starenja (Slika 13). Imajući u vidu specifičnost delovanja tebufenpirada, tj. inhibicije mitohondrijskog kompleksa I, efekat produženja dužine života, u oba slučaja, posledica je procesa mitohormeze. Dobijeni rezultati nisu neočekivani, imajući u vidu rezultate studija koje su utvrdile da tačkaste mutacije u genima *C. elegans*, koji kodiraju za subjediničice kompleksa I (*nuo-6* gen) i kompleksa III (*isp-1* gen), povećavaju oksidativni stres, ali i prosečnu dužinu života mutanta (Yang & Hekimi, 2010a). Iako su molekularni mehanizmi koji se nalaze u osnovi mitohormeze još uvek nedovoljno istraženi (Le Bourg, 2009; Yun & Finkel, 2014), eksperimenti na vinskih mušicama i valjkastim crvima potvrdili su značajnu ulogu nekoliko signalnih puteva. Aktivacija intrinzičkog apoptotskog signalnog puta dovodi do produženja dužine života tako što mROS-ovi interaguju sa CED4 (Bcl-2 sličan protein) i CED9 (Apaf-1 sličan protein) koji su smešteni u spoljašnjoj mitohondrijskoj membrani i preko njih utiču na ekspresiju p53 homologa *C. elegans* - CEP-1 (Baruah *et al.*, 2014; Yee *et al.*, 2014). Veliki broj studija ukazao je i na važnu ulogu MnSOD (Curtis *et al.*, 2007; Cabreiro *et al.*, 2011). Put aktivacije ovog enzima odvija se retrogradnom mROS signalizacijom u okviru koje dolazi do inhibicije IIS puta i aktivacije FOXO transkripcionog faktora (Honda & Honda, 1999; Sun *et al.*, 2002). Dodatno, ulogu u odgovoru na mitohondrijski oksidativni stres imaju proteini toplotnog stresa, posebno mitohondrijski Hsp22 (Morrow *et al.*, 2000; Landis *et al.*, 2004). Dakle, reč je o

velikom broju signalnih puteva koji učestvuju u mROS retrogradnom odgovoru i koji imaju pozitivan efekat na osobine adaptivne vrednosti, odnosno produženje dužine života. Ovi rezultati nalaze se u suprotnosti sa osnovnim pretpostavkama mitohondrijske teorije starenja, jer odstupaju od dogmatskog mišljenja da povećanje koncentracije mROS-ova *de facto* izaziva proces starenja. Navedene studije ukazuju na kompleksniji proces - mROS-ovi, ukoliko ne pređu specifični prag koncentracije, predstavljaju deo signalnih puteva koji štite od pojave oksidativnih oštećenja tokom procesa starenja (Wang & Hekimi, 2015).

Zanimljivo je da je nekoliko studija pokazalo veću zastupljenost procesa mitohormeze kod mužjaka nego kod ženki (Sarup & Loeschcke, 2011; Tower, 2015). Predloženi mehanizam u osnovi polno-specifične mitohormeze jeste pozitivan efekat jedarnih alela koji su evoluirali kod mužjaka kao kompenzacioni odgovor na mehanizam materinske kletve (Wolff & Gemmell, 2013). Drugim rečima, usled polno-specifične asimetrije u delovanju selekcije na mitohondrijske mutacije sa štetnim efektima na osobine životne istorije kod mužjaka, očekuje se jak selekcionni pritisak koji će favorizovati mehanizme kontraadaptacije (engl. *counteradaptation*) sa ulogama u poništavanju negativnih efekata materinske kletve (Rand *et al.*, 2004; Majerus & Majerus, 2010). Jedan primer „kontra kletve“ jeste pojava citoplazmatskog steriliteta mužjaka (CMS od engl. *cytoplasmatic male sterility*) kod biljaka, koji može biti poništen jedarnim alelima oporavka (engl. *nuclear restorer alleles*) (Schnable & Wise 1998). Polna asimetrija u obrascu ekspresije jedarnih gena detektovana je kod vinskih mušica koje su posedovale različite varijante mitohondrijskog genoma u genetičkom okruženju standardizovanog jedra w^{1118} (Innocenti *et al.*, 2011). Mitohondrijska varijabilnost značajno je uticala na ekspresiju 1172 jedarna gena kod mužjaka (9,3 % celokupnog transkriptoma) i samo 7 gena kod ženki (0,06 % celokupnog transkriptoma). Dodatno, pokazano je da se radi o transkriptima koji imaju važnu ulogu ne samo u bioenergetskim procesima u mitohondrijama, već i u lokalizaciji makromolekula, formiranju struktura unutar mitohondrija i posttranskripcionim modifikacijama (Innocenti *et al.*, 2011). Ova studija ukazala je na značajnu ulogu polno-specifične retrogradne signalizacije između dva genoma u odbrani mužjaka od „nasledne nepravde“. Na osnovu svega navedenog, može se pretpostaviti da se duži život B i E mužjaka, nakon tretmana niskim koncentracijama specifičnog generatora

mitohondrijskih ROS-ova, javlja kao posledica aktivacije mehanizama oporavka putem mROS retrogradne signalizacije. Ovakav mitohormetički efekat izostaje kod ženki žižaka, jer je evolucija ovih mehanizama polno-specifična i javlja se kao indirektan, kompenzacioni odgovor na proces materinske kletve.

Još jedan interesantan rezultat ove studije odnosi se na različit odgovor u dinamici starenja nakon pretrpljenog blagog stresa kod kratkoživećih (B i E) i dugoživećih (L) žižaka, iako najniža koncentracija parakvata nije značajno smanjila procenat preživljavanja jedinki (Slike 8 i 9). U odnosu na netretirane kontrole, prosečna dužina života bila je značajno smanjena nakon blagog stresa kod L ženki i mužjaka, dok je negativan efekat izostao kod E žižaka. Ujedno, smanjenje dužine života nakon tretmana najnižim koncentracijama PQ kod L žižaka bilo je posledica ranijeg početka umiranja (Slika 9 i 10). Drugim rečima, nakon tretmana niskim koncentracijama parakvata L žišci počinju ranije sa umiranjem, dok kod E žižaka taj odgovor izostaje. Objašnjenje ovih rezultata može pružiti Lejnov koncept specifičnog praga mROS-ova (Lane, 2011). Prema Lejnovom modelu, za životne strategije sa manjim ulaganjima u rani fekunditet, što odgovara dugoživećem L režimu, očekuje se evolucija niskog praga koncentracije mROS-ova. Posledica niskog praga mROS-ova bio bi visok stepen eliminacije svakog oblika mito-jedarne nepodudarnosti, heteroplazmije i drugih fenomena koji dovode do povećanja curenja mROS-ova. Kao rezultat javljala bi se visoka osetljivost embrionalnih i larvenih stadijuma na mito-jedarnu inkompatibilnost, manja stopa molekulskih oštećenja usled oksidativnog stresa kod adulta i usporavanje starenja. Ujedno, u ovakvom sistemu postojao bi vrlo uzak opseg prilično niskih koncentracija mROS-ova koje bi indukovale mehanizme oporavka, dok bi se nakon prelaska niskog praga aktivirali procesi apoptoze. Dakle, smanjenje dužine života L ženki i mužjaka nakon blagog oksidativnog stresa, u odnosu na netretiranu kontrolu, u skladu je sa pretpostavkom o evoluciji niskog praga mROS-ova unutar L selekcionog režima. Važno je naglasiti da se evolucija niskog praga mROS-ova i signalnih puteva, u kojima mROS-ovi učestvuju kao signalni molekuli unutar mitohondrija, odvija nezavisno od evolucije mehanizama zaštite i održavanje some (u koju spada i antioksidativna zaštita). Upravo se odvojenost evolucije ta dva procesa ogleda u većoj otpornosti na oksidativni stres kod L u odnosu na E žiške, iako niže koncentracije ispoljavaju veći negativan efekat kod tretiranih L žižaka u odnosu na netretirane, što

nije slučaj kod E žižaka. Unutar E režima, u skladu sa velikim ulaganjem u ranu reprodukciju, a nauštrb smanjenja dužine života, može se postulirati evolucija visokog praga mROS-ova. Režim selekcije za ranu reprodukciju karakterisala bi manja osetljivost na nepodudarnost mito-jedarnih interakcija i heteroplazmiju, samim tim i veće curenje mROS-ova, manja osetljivosti embrionalnih i larvenih stadijuma na mito-jedarnu inkompatibilnost i viša stopa molekulskih oštećenja i akumulacije mtDNK mutacija kod adulta. Ujedno, unutar E režima postojao bi širi opseg koncentracija mROS-ova koje omogućavaju aktivaciju mehanizama oporavka. Indirektna potvrda ovih postulata može se pronaći u izostanku negativnog efekta blagog oksidativnog stresa na dužinu života i oblik krivih preživljavanja kod tretiranih u odnosu na netretirane E žiške. Prilikom tretiranja žižaka niskim koncentracijama PQ, kod E žižaka aktivirani su mehanizmi oporavka od oštećenja koji su „zamaskirali“ negativne efekte generatora ROS-ova. Postojanje razlika u visini praga kod kratkoživećih (E i B) i dugoživećih žižaka saglasno je i sa pojavom mitohormeze na niskim koncentracijama TBF kod B i E mužjaka, dok je isti efekat izostao kod L mužjaka. Nizak prag mROS-ova, s druge strane, karakterističan za dugoživeće L žiške, može voditi specijalizaciji za efikasne mitohondrijske bioenergetske procese, u kojima nije tolerisana inkompatibilnost mito-jedarnih interakcija (Kuether & Arking, 1999).

5.6 Provera svedoka i pronalaženje osumnjičenih: Uzrasno-specifična selekcija oblikuje učestalost mitohondrijskih i jedarnih alela, kao i mitohondrijske bioenergetske procese

Određivanje stepena uticaja genetičke varijabilnosti na fenotipske osobine organizama predstavlja jedno od najaktuelnijih pitanja u biologiji i veliki izazov postgenomske ere (Ballard & Melvin, 2010). Iako mitohondrijski bioenergetski procesi imaju ključnu ulogu u oblikovanju starenja i drugih osobina životne istorije, značaj mtDNK varijabilnosti u oblikovanju komponenti adaptivne vrednosti je tradicionalno zanemarivan. U poslednjoj deceniji, nekoliko studija ukazalo je na povezanost mtDNK varijabilnosti sa starenjem (Rand *et al.*, 2006; Clancy, 2008), metaboličkim procesima (Meiklejohn *et al.*, 2013) i drugim osobinama životne istorije (Dowling *et al.*, 2008) i time je uzdrmano stanovište po kome je varijabilnost mitohondrijskog genoma selektivno neutralna. Najbolja ilustracija veze između mtDNK haplotipa i fenotipa

organizma može se pronaći u studiji Balarda i saradnika u kojoj su analizirana uzajamna ograničenja u osobinama životne istorije kod tri mitohondrijska haplotipa (*siI*, *siII* i *siIII*) *Drosophila simulans* (Ballard *et al.*, 2007). Naime, *siII* haplotip povezan je sa većim fekunditetom, višom stopom oksidativnih oštećenja i većom otpornošću na niske temperature. S druge strane, vinske mušice sa *siIII* haplotipom imaju veću aktivnost kompleksa IV, manje curenje mROS-ova i otpornije su na izgladnjivanje, dok *siI* imaju najkraće trajanje razvića i najmanju verovatnoću preživljavanja u kasnijim uzrastima (James & Ballard, 2003; Ballard *et al.*, 2007). Dodatno, imajući u vidu značaj vrlo koordinisane sinteze i precizne interakcije produkata sa mitohondrijskog i jedarnog genoma, koje se nalaze u osnovi normalnog funkcionisanja mitohondrijskih bioenergetskih procesa, efekat mtDNK varijabilnosti na osobine adaptivne vrednosti ispoljava se i u velikoj meri zavisi od epistatičkih interakcija sa jedarnim genomom (Wolff *et al.*, 2014, 2016). Otuda narušavanje mito-jedarnih interakcija, dovodi do značajnog pada vijabiliteta kod kvasca (Chou & Leu, 2010), vodenih račića (Burton *et al.*, 2013), vinskih mušica (Meiklejohn *et al.*, 2013) i riba (Bolnick *et al.*, 2008). Složenosti problematike povezanosti mito-jedarnih interakcija sa osobinama adaptivne vrednosti doprinosi i činjenica da funkcionalne posledice promena koje su se dogodile u mitohondrijskim i jedarnim genima i regulatornim sekvencama koje na njih utiču, predstavljaju rezultat procesa adaptacije bioloških sistema na faktore životne sredine (Cheviron & Brumfield, 2012; Wilson *et al.*, 2013). Dakle, selekcija u specifičnim i varijabilnim uslovima životne sredine oblikuje populaciono-specifičnu strategiju osobina životne istorije delujući na mitohondrijske bioenergetske procese. Ovim putem, selekcija optimizuje kombinacije mitohondrijskih i jedarnih alela koji povećavaju neto adaptivnu vrednost, povećavajući njihovu učestalost u populaciji, što rezultira populaciono-specifičnom mtDNK evolucijom i mito-jedarnom koevolucijom. Iako je ova teorijska perspektiva jasna i često se koristi u tumačenjima empirijskih podataka, nedostaju studije koje bi je direktno testirale. Laboratorijska evolucija je jedan od načina da se testira uloga selekcije u oblikovanju varijabilnosti mtDNK, mitohondrijskih bioenergetskih procesa i mito-jedarne koevolucije. Metod laboratorijske evolucije primenjen je u ovoj doktorskoj disertaciji kako bi se analizirala povezanost uočenih divergencija u životnim strategijama E i L režima sa promenom

učestalosti mitohondrijskih i jedarnih alela, kao i aktivnošću kompleksa mitohondrijskog elektron transportnog lanca.

Molekulske analize laboratorijskih populacija pasuljevog žiška ukazuju da je višegeneracijska uzrasno-specifična selekcija na pasuljevom žišku uzrokovala značajnu divergenciju u mitohondrijskim i jedarnim molekulskim markerima. Haplotip H1 COI gena, koji je u osnivačkoj B populaciji najučestaliji, nakon više od 220 generacija potpuno je eliminisan selekcijom za ranu reprodukciju (E populacije), dok je selekcija za kasnu reprodukciju rezultovala potpunom fiksacijom ovog haplotipa u tri od četiri populacije nakon više od 170 generacija. Ujedno, u L populacijama eliminisan je H2 mitohondrijski haplotip. Iako nukleotidne razlike između mitohondrijskih haplotipova ne predstavljaju nesinonimne supstitucije (ne uzrokuju razlike u aminokiselinskom sastavu proteinskog produkta koji kodira COI gen), pa samim tim i nije očekivano da za posledicu imaju fenotipske efekte, zbog odsustva rekombinacija u mitohondrijskom genomu ipak se može tvrditi da uočena divergencija između populacija jeste posledica uzrasno-specifične selekcije. Naime, fenomen genetičkog autostopiranja (engl. *genetic hitchiking*) (Galtier *et al.*, 2009) ukazuje da se promene u učestalosti neutralnih alela mogu odvijati prema scenariju selektivno prepoznatljivih genetičkih varijanti ukoliko se neutralni aleli vezano nasleđuju sa varijantama gena koji jeste selektovan (tj. ukoliko se neutralna i selekcionisana varijanta nalaze na istom molekulu DNK i učestalost rekombinacija između njih je mala). Imajući u vidu izostanak rekombinacija unutar mitohondrijskog genoma, ceo mtDNK se može predstaviti kao jedinstven „supergen“ pa se i svi polimorfizmi unutar mtDNK nasleđuju kao jedan haplotip.

Rezultati ove studije predstavljaju direktnu potvrdu hipoteze da mitohondrije imaju centralnu ulogu u procesu starenja (Guarente, 2008), kao i da predstavljaju važan element u evoluciji životnih strategija i dugovečnosti. Drugim rečima, efikasna fenotipska selekcija za različito vreme reprodukcije i dužinu života ostvarena je, između ostalog, i preko selekcije za specifične haplotipove u laboratorijskim populacijama. Rezultati matematičkog modeliranja oblika selekcije koji su uticali na ustanovljene obrasce varijabilnosti COI haplotipova u E i L režimu, pokazali su da je fiksiranje H1 haplotipa u L populacijama posledica direkcione selekcije za produženje života. S druge strane, H2 i H3 asocirani su sa kraćim životnim vekom, a prisustvo oba haplotipa u

kratkoživećim populacijama rezultat je delovanja negativne selekcije zavisne od učestalosti (engl. *negative frequency dependent selection*) - inverznog odnosa između učestalosti haplotipa i relativne adaptivne vrednosti u E populacijama (Stojković *et al.*, 2016).

Budući da se funkcije mitohondrija u energetsom metabolizmu ne mogu ostvariti bez proteina kodiranih jedarnim genima, evolucija mitohondrijskog genskog pula podrazumeva modelovanje mito-jedarnih epistatičkih interakcija u kontekstu životnih sredina populacija. Indirektnu potvrdu ovoj hipotezi dali su rezultati na mikrosatelitskim (jedarnim) lokusima koji su takođe pokazali značajnu međupopulacionu divergenciju. Iako selektivno neutralni, diferencijacija mikrosatelitskih lokusa nedvosmisleno ukazuje na delovanje pozadinske selekcije kroz vezanost za gene koji imaju fenotipski efekat povezan sa dvema životnim strategijama u E i L režimu. U tom kontekstu, pretpostavlja se i da je selekcija za epistatičke interakcije mitohondrije i jedra uzrok odstupanja u učestalosti haplotipa H1 (detektovana 63 % učestalost haplotipa H3) unutar populacije L₄. Naime, značajno manja prosečna dužina života populacije L₄ u odnosu na L₁ i L₂, najverovatnije je posledica promene u jedarnom genomu koja je preko mito-jedarnih interakcija uzrokovala favorizovanje haplotipa H3 u toj populaciji (Stojković *et al.*, 2016).

Na osnovu spektrofotometrijskih analiza aktivnosti enzima mitohondrijskog elektron transportnog lanca (ETL) žižaka poreklom iz L×L i E×E mito-jedarnih grupa, moguće je pretpostaviti koji su proksimalni uzroci uočene divergencije između selekcionih režima u mitohondrijskim haplotipovima. Selekcija za kasnu reprodukciju i veću dužinu života mogla je povećati učestalost haplotipa H1 usled njegove uključenosti u veću aktivnost kompleksa III mitohondrijskog ETL. Naime, žišci iz L×L mito-jedarne grupe imaju u proseku 1,5 puta veću aktivnost kompleksa III u odnosu na E×E žiške, dok kod ostalih kompleksa ETL nisu uočene značajne razlike u aktivnostima (Đorđević *et al.*, 2016). S obzirom na to da je kompleks III sastavljen od 10 subjedinica kodiranih sa jedarnog genoma i jedne subjedinice - citohroma b (cyt b) koji je kodiran sa mitohondrijskog genoma, pretpostavke o genetičkom autostopiranju H1 varijante COI gena usled direktne selekcije na konkretan alel gena za cyt b, i/ili usled efekata mito-jedarne interakcije koja omogućava visoku aktivnost kompleksa III u kombinaciji

sa određenim varijantama jedarnih gena, jesu u skladu sa dobijenim rezultatima. Navedena hipoteza podržana je rezultatima studije u kojoj je ustanovljena pozitivna korelacija između stope evolucije citohroma b i evolucije veće dužine života kod ptica pevačica i sisara (Rottenberg, 2007a; b).

Oslanjajući se na mitohondrijsku slobodno-radikalnu teoriju starenja (MFRTA), veća aktivnost kompleksa III unutar dugoživećih L žižaka, predstavlja kontraintuitivni rezultat budući da kompleksi I i III u mitohondrijama predstavljaju glavna mesta sinteze mROS-ova (Balaban *et al.*, 2005). Međutim, pokazalo se da u intaktnim mitohondrijama kompleks III sintetizuje zanemarljivu količinu mROS-ova i da do veće sinteze dolazi samo u slučaju inhibicije tog kompleksa antimicinom A (St-Pierre *et al.*, 2002). U fiziološkim uslovima, povećana aktivnost kompleksa III ima važnu ulogu u smanjenju jednog od glavnih procesa sinteze mROS-ova - obrnutog transporta elektrona (OTE, engl. *reverse electron transport*). Naime, kompleks I sintetizuje veću količinu mROS-ova u dva slučaja: kada je odnos NADH/NAD⁺ u matriksu visok, što rezultira redukcijom FMN centra kompleksa I, i kada je visok elektrohemijski gradijent spregnut sa donacijom elektrona CoQ u obrnutom smeru ka kompleksu I (Murphy, 2009). Iako samo mesto sinteze mROS-ova tokom OTE-a nije poznato, najveća količina mROS-ova u mitohondriji sintetizuje se upravo ovim procesom (Lambert & Brand, 2004; Hurd *et al.*, 2007). Povećana aktivnost kompleksa III, s obzirom na to da povećava stopu oksidacije ubihinola u odnosu na njegovu redukciju kompleksom I, pospešuje transport elektrona kroz ETL i sprečava obrnuti transport elektrona ka kompleksu I, a time i mogućnost povećane sinteze mROS-ova (Brown *et al.*, 2009). Opisani biohemijski proces (povećana aktivnost kompleksa ETL nizvodno od mesta sinteze mROS-ova) nalazi se u osnovi hipoteze „rezervnog oksidativnog kapaciteta“ (engl. *spare oxidative capacity*, Lane, 2006). Kako se pokazalo, rezultati poređenja aktivnosti kompleksa ETL između dugoživećih (vrabac - *Passer domesticus* i slepi miš - *Eptesicus fuscus*) i kratkoživećih (miš - *Mus musculus*) vrsta (Brown *et al.*, 2009) jesu u skladu sa navedenom hipotezom. Studija Brauna i saradnika detektovala je veće aktivnosti kompleksa III kod vrapca i slepog miša u poređenju sa običnim mišem. Visoki oksidativni kapacitet kompleksa III vrapcima i slepim miševima najverovatnije omogućuje dve fiziološke prednosti: i) veću sintezu ATP koja odgovara njihovim većim metaboličkim zahtevima prilikom letenja i ii) smanjuje sintezu mROS-ova po jedinici

unetog O₂ kada nisu fizički aktivni. Slična interpretacija može se primeniti i u slučaju dugoživećih L žižaka. Dakle, postoji mogućnost da je veća aktivnost kompleksa III u saglasnosti sa povećanim zahtevima za ATP-om unutar dugoživećeg režima, gde su veći fekunditet i aktivnost antioksidativne zaštite/mehanizama odbrane, uz istovremeno smanjenje curenja mROS-ova. Povećana aktivnost kompleksa III takođe ukazuje na metaboličko „reprogramiranje“ ka akumulaciji lipida i ugljenih hidrata, što je uočeno kod L žižaka (Lazarević *et al.*, 2012). Ovi procesi uključuju veći ulazak elektrona u ETL preko FAD-dehidrogenaza i kompleksa III, zaobilazeći ulaz elektrona preko kompleksa I (Lenaz *et al.*, 2007). Jedan od takvih enzima je i glicerol 3-fosfat dehidrogenaza, koji je vrlo aktivan kod insekata (Miwa *et al.*, 2003), i ima važnu regulatornu ulogu u glikolizi, lipogenezi i oksidativnoj fosforilaciji (Mráček *et al.*, 2013).

Opšti zaključak zasnovan na genetičkoj analizi varijanti mitohondrijskog i jedarnog genoma jeste da u molekularnoj osnovi različitih životnih strategija E i L režima leži značajna divergencija u varijabilnosti mitohondrijske i jedarne DNK. Ovi zaključci u skladu su sa teorijskim očekivanjima prema kojima različiti mtDNK haplotipovi svoj efekat ostvaruju preko mitohondrijskih bioenergetskih procesa (Pichaud *et al.*, 2012). U našim laboratorijskim populacijama detektovani haplotipovi svoj efekat najverovatnije ostvaruju oblikovanjem aktivnosti kompleksa III. Iako je vrlo bliska veza između dinamike starenja i mitohondrijskih bioenergetskih procesa ranije detektovana pomoću korelacionih studija dužine života i oksidativne fosforilacije prirodnih populacija vinskih mušica (Melvin & Ballard, 2006), kao i u velikom broju studija korišćenjem RNK interferencije i indukovanih mutacija (Balaban *et al.*, 2005), korišćenjem metode eksperimentalne evolucije u ovom radu je po prvi put direktno testirana i potvrđena povezanost uzrasno-specifične selekcije i evolucije starenja sa oblikovanjem učestalosti mtDNK haplotipova i promene bioenergetskih svojstava mitohondrija. Rezultati ove studije dodatno su podržali zaključak Daulinga i saradnika da mitohondrijski genom nije samo „krunski svedok evolucionih i populaciono-genetičkih procesa, već i glavni igrač u evoluciji adaptacija“ (Dowling *et al.*, 2008).

5.7 Pozovi $M \times N$ radi evolucije životne strategije: Uloga mito-jedarnih epistatičkih interakcija u evoluciji starenja i drugih osobina životne istorije

U cilju boljeg razumevanja povezanosti između evolucione divergencije životnih strategija laboratorijskih populacija selektovanih za ranu i kasnu reprodukciju, s jedne strane, i adaptivnih promena mitohondrijskog genoma i koevolucije mito-jedarnih interakcija, s druge strane, studija je podrazumevala poređenje osobina životne istorije i mitohondrijskih bioenergetskih procesa kod mt-j linija sa očuvanim i narušenim mito-jedarnim interakcijama. Na ovaj način bilo je moguće testirati efekat mitohondrije, jedra i njihove interakcije na evoluciju različitih osobina životne istorije. Drugim rečima, ukoliko je uzrasno-specifična selekcija rezultirala evolucijom različitih osobina životne istorije i mitohondrijskih bioenergetskih procesa unutar E i L režima, kroz divergentnu evoluciju mtDNK i mito-jedarnih interakcija, onda se očekuje da će unutar mt-j linija sa narušenim mt-j interakcijama biti detektovan pad adaptivnih vrednosti u poređenju sa kontrolnim linijama kod kojih mt-j interakcije nisu narušene.

5.7.1 Analiza preadultnih i adultnih osobina životne istorije

Narušavanje mito-jedarnih interakcija imalo je najveći negativan efekat na preadultne osobine životne istorije. Smanjenje preadultnog vijabiliteta za 20 % unutar $L \times E$ linije u odnosu na $E \times E$ kontrolu i 30 % unutar $E \times L$ linije u odnosu na $L \times L$ kontrolu ukazuje na to da je koordinisano (tj. koevoluirano) funkcionisanje mitohondrijskih i jedarnih gena veoma važno za procese preadultnog razvića - embrionalnih i larvenih stupnjeva koji uključuju metabolički vrlo skupe procese i mogu se smatrati svojevrsnom „energetskom kontrolnom tačkom“ (Lane, 2011). Kod larvi sa narušenim mito-jedarnim interakcijama ($L \times E$ i $E \times L$) koje su preživele ovakvo „energetsko selektivno sito“ i dostigle adultni stupanj, razviće je značajno produženo, ali nije bilo korelisano sa povećanjem mase tela, što indirektno ukazuje na nepravilno funkcionisanje metaboličkih procesa. Može se pretpostaviti da je duže vreme razvića posledica savladavanja intrinzičkog stresa, a ne vreme akumulacije veće mase i telesnih rezervi. Slični rezultati na preadultnim osobinama dobijeni su kod međupopulacionih hibrida vrste *Tigriopus californicus* (Burton, 1990; Ellison & Burton, 2006) i hibridima između vrsta *Nasonia vitripennis* i *N. giraulti* (Ellison *et al.*, 2008), odnosno *Drosophila simulans* i *D. mauritiana* (Sackton *et al.*, 2003). Suprotno očekivanjima, „strana“

mitohondrija i narušavanje mt-j interakcija, nisu imali značajne efekte na adultne osobine životne istorije, odnosno na ukupni fekunditet ženki, sterilnost i dužinu života neukrštanih žižaka. Jedini značajan adultni efekat narušavanja koadaptiranih kombinacija mitohondrija i jedra ustanovljen je za dužinu života jedinki koje su bile reproduktivno aktivne (Đorđević *et al.*, 2015). Značajniji efekti „strane“ mitohondrije i narušavanja mito-jedarnih interakcija na dužinu života detektovan je kod unutarpopulacionih hibrida *Drosophila melanogaster* (Clancy, 2008).

Jedno od sveobuhvatnijih objašnjenja za uočene fenotipske posledice narušavanja mito-jedarnih epistatičkih interakcija jeste ranije pomenuti model praga (Lane, 2011). Kako je pretpostavljeno, prag koncentracije mROS-ova iznad koga se pokreću mehanizmi apoptoze nije isti za dva režima - E režim ima visok, a L režim nizak prag. U tom kontekstu, kod mito-jedarnih grupa sa E jedrom očekuje se veća tolerancija na narušavanje mito-jedarnih interakcija u odnosu na jedinke sa L jedrom. Detekcija značajno manjeg vijabiliteta $E \times L$ u poređenju sa $L \times E$ linijama, kao i značajno dužeg trajanja razvića i manje mase tela u $E \times L$ - $L \times L$ poređenju, dok isti trend izostaje u poređenju $L \times E$ - $E \times E$, u saglasnosti je sa navedenim hipotezama o evolucionoj divergenciji visine praga mROS-ova (Slika 14). Kod preživelih jedinki, moguća aktivacija velikog broja različitih zaštitnih mehanizama, koji kompenzuju oslabljenu funkcionalnost mitohondrije i umanjuju negativne efekte mROS-ova (ispod praga), omogućava efikasan adultni život sličan žižcima sa nenarušenim mito-jedarnim interakcijama. Energetski zahtevi reprodukcije, međutim, koji podrazumevaju i dodatnu aktivnost ETL-a, mogu pomeriti mito-jedarni sistem iznad granične koncentracije mROS-ova aktivirajući mehanizme degradacije same i, posledično, skraćujući život jedinkama. Navedeno objašnjenje najbolje oslikava rezultate prema kojima reproduktivna aktivnost jedinki sa nepodudarnošću mitohondrijskog i jedarnog genoma značajno umanjuje dugovečnost u odnosu na izvorne linije (Slika 15). Ovaj pad dugovečnosti je, usled mehanizama materinske kletve, očekivano izraženiji kod mužjaka u svim kombinacijama mitohondrija i jedra, pa čak i kod neukrštanih mužjaka u $E \times L$ mito-jedarnim linijama.

Rezultati ove studije jasno upućuju na zaključak da su mtDNK i mito-jedarne interakcije važna jedinica na koju je delovala uzrasno-specifična selekcija prilikom

evolucije divergentnih životnih strategija unutar E i L režima. U skladu sa hipotezom da se mito-jedarne interakcije nalaze u osnovi uzajamnih ograničenja osobina životne istorije, jesu i rezultati studija koje su pokazale da biogeneza mitohondrija, koja se javlja kao kompenzacioni odgovor na nepravilnosti u funkcionisanju OXPHOS sistema, rezultira povećanjem ranog fekunditeta, ali nauštrb smanjenja dužine života (Ballard *et al.*, 2010; Ballard & Melvin, 2011). Kako se pokazalo, ishod mito-jedarnih interakcija na dužinu života kod žižaka selektovanih za ranu i kasnu reprodukciju razlikuje se između polova i zavisi od reproduktivnog režima. Dakle, ne samo da je uzrasno-specifična selekcija preko maternalne linije oblikovala seksualno-antagonističke fenotipske osobine delovanjem na mito-jedarne interakcije, već je i ishod efekata tih interakcija na dužinu života zavisio od konteksta biotičkih ekoloških faktora. Ovi rezultati ukazuju na veliki značaj koji složene interakcije životna sredina × mitohondrija × jedro imaju u održavanju populaciono-specifične učestalosti mtDNK haplotipova kod pasuljevog žižka, ali i drugih model organizama (Arnqvist *et al.*, 2010; Dowling *et al.*, 2010).

5.7.2 Aktivnost enzima mitohondrijskog ETL

Precizne i sinhronizovane interakcije između produkata i regulatornih sekvenci mitohondrijskog i jedarnog genoma neophodne su za pravilnu sintezu ATP-a procesom oksidativne fosforilacije unutar mitohondrija. Iz navedenog sledi pretpostavka da mito-jedarne koadaptacije predstavljaju centralno mesto u evoluciji mitohondrijskih bioenergetskih procesa (Wolff *et al.*, 2014). Eksperimentalnu potvrdu ove hipoteze predstavljala bi detekcija pada aktivnosti enzima ETL kod jedinki koje sadrže mitohondrijski i jedarni genom različitog porekla, odnosno uparivanjem dva genoma koja nisu koevoluirala. Narušavanje mito-jedarnih interakcija rezultiralo bi nepravilnim formiranjem ETL kompleksa i/ili nepravilnim funkcionisanjem transkripcije i translacije mitohondrijskih proteina (Ballard & Pichaud, 2014). Indirektnu potvrdu navedene pretpostavke predstavlja detekcija pada aktivnosti kompleksa I, III i IV, čije su subjedinice kodirane genima sa mitohondrijskog i jedarnog genoma, usled međugenomske inkompatibilnosti kod mito-jedarnih hibrida nastalih ukrštanjem različitih vrsta - *Drosophila simulans* i *D. mauritiana* (Sackton *et al.*, 2003), odnosno *Nasonia giraulti* i *N. vitripennis* (Ellison *et al.*, 2008). Ovi rezultati su očekivani s

obzirom na to da se radi o vrstama koje su se adaptirale na različita staništa, između kojih postoji reproduktivna barijera i koje se veliki broj generacija nisu ukrštale, pa samim tim se i pretpostavlja da se između vrsta odvijao proces divergentne mito-jedarne koevolucije. Međugenomska inkompatibilnost detektovana je i na međupopulacionom nivou unutar iste vrste. Kod mito-jedarnih hibrida, nastalih ukrštanjem populacija morskih račića *Tigriopus californicus* poreklom iz toplih i hladnih staništa Tihog okeana, uočen je izražen hibridni slom (engl. *hybrid breakdown*), produženo trajanje razvića i pad aktivnosti kompleksa I, III i IV (Ellison & Burton, 2006). Rovson i Burton ukazali su da mito-jedarna inkompatibilnost rezultira padom u osobinama adaptivne vrednosti kod hibrida usled narušavanja epistatičkih interakcija jedarnog gena za citohrom c i mitohondrijskih gena koji kodiraju za subjedinice kompleksa IV (Rawson & Burton, 2002). Iako je iz navedenih studija jasno da genetička varijabilnost mtDNK ima ekstenzivan efekat na mitohondrijske bioenergetske procese, nije moguće sa sigurnošću odrediti koji su evolucionarni procesi oblikovali uočenu varijabilnost. Prema autorima, najverovatniji uzrok ovakve funkcionalne promene predstavlja mito-jedarna koadaptacija na staništa sa različitim režimima temperatura/svetlost.

Rezultati studije na *A. obtectus* pokazali su da je više od 170 generacija uzrasno-specifične selekcije dovelo do divergencije u mitohondrijskim bioenergetskim procesima i da je ta divergencija oblikovana mito-jedarnom koevolucijom. Naime, unutar mito-jedarnih grupa koje su sadržale mitohondrijski i jedarni genom poreklom iz različitih režima (E×L i L×E) detektovano je smanjenje aktivnosti kompleksa I, III i IV neukrštanih žižaka u odnosu na kontrole (L×L i E×E). Dodatno, za sva tri kompleksa uočen je značajan efekat interakcije mitohondrija × jedro na varijabilnost njihove aktivnosti. Uzimajući u razmatranje rezultate multivarijantne regresione analize, može se zaključiti da aktivnost mitohondrijskog ETL leži u osnovi životne strategije pasuljevog žiška. Naime, aktivnost kompleksa II, III i IV opisuje više od 65 % varijabilnosti u dužini života, stopi starenja, ali i drugih osobina životne istorije mito-jedarnih grupa. Kod *Drosophila* sp. značajne korelacije između aktivnosti ETL i osobina životne istorije detektovane su u nekim (Melvin & Ballard 2006), ali ne u svim studijama (Jumbo-Lucioni *et al.*, 2012).

Sa izuzetkom E×L mužjaka, značajno smanjenje aktivnosti enzima nije uticalo na dužinu života kod neukrštanih jedinki. Imajući u vidu da u normalnim uslovima respiratorni kompleksi imaju visoke rezervne aktivnosti, odnosno da je samo deo maksimalne aktivnosti enzima dovoljan za optimalnu sintezu ATP-a i funkcionisanje mitohondrija (Dubessay *et al.*, 2007), izostanak negativnog efekta smanjenja aktivnosti ETL na dugovečnost nije neočekivan (videti ranije objašnjenje modela praga). Analiza transkriptoma kod međupopulacionih mito-jedarnih hibrida *T. californicus* utvrdila je da narušavanje mito-jedarnih interakcija i disfunkcija mitohondrija povećava ekspresiju gena za subjediničice OXPHOS-a, enzime antioksidativne zaštite i proteine kutikule (Barreto *et al.*, 2015). Moguće pojačanje ekspresije navedenih gena kod pasuljevog žiška sa mito-jedarnom inkompatibilnošću moglo je da prikrije negativne efekte mitohondrijske disfunkcije. Međutim, u uslovima povećanih zahteva za energijom, kao što je reprodukcija (rezultati ove teze) ili termalni stres (Arnqvist *et al.*, 2010), negativni efekti mito-jedarne inkompatibilnosti na dužinu života došli su do izražaja.

Analiza aktivnosti enzima ETL kod ženki i mužjaka pokazala je da su efekti mitohondrija i interakcije mitohondrija × jedro na mitohondrijske bioenergetske procese polno-specifični i u velikoj meri u skladu sa očekivanjima procesa materinske kletve. Budući da se mito-jedarna koevolucija odvija unutar maternalne linije, očekuje se da će narušavanje mito-jedarnih interakcija imati najveći negativni efekat na ženke. Shodno tome, najizraženiji uticaj mito-jedarne inkompatibilnosti pokazan je u ženskom polu za najveći kompleks ETL lanca - NADH dehidrogenazu (kompleks I), koji je sastavljen od čak sedam subjediničica kodiranih sa mtDNK i oko 40 jedarnih proteina. S obzirom na to da mužjaci predstavljaju evolucionu „čorsokak“ u prenošenju mitohondrijskog genetičkog materijala, kod njih se očekuju dva odgovora na narušavanje mito-jedarnih interakcija: i) veći pad aktivnosti u odnosu na ženke usled štetnih mutacionih opterećenja koja selekcija nije „videla“, ili ii) pojava mitohormeze usled blagog intrinzičkog/ekstrinzičkog oksidativnog stresa koja dovodi do oporavka aktivnosti kompleksa ETL mužjaka, ali ne i ženki. Suštinski, a oslanjajući se na pretpostavke materinske kletve, kod mužjaka se očekuje pojava veće varijabilnosti u odgovoru na intrinzički oksidativni stres. Imajući u vidu značajnu divergenciju u mitohondrijskom COI genu između selekcionih režima, interesantno je da je najveća varijabilnost u odgovoru na narušavanje mito-jedarnih interakcija kod mužjaka uočena upravo u

kompleksu kojem COI pripada (citohrom c oksidaza). Tačnije, dok je kod L×E i E×L ženki pad u aktivnosti citohrom c oksidaze u odnosu na kontrole sličan (17,21 %, odnosno 16,51 %), kod mužjaka odgovor je dijametralno suprotan - kod L×E mužjaka pad je iznosio 30,33 %, a kod E×L mužjaka 2,2 % u odnosu na odgovarajuću kontrolu. Ovi rezultati su značajni jer ukazuju da su trajektorije mito-jedarne koevolucije unutar selekcionih režima različite kod ženki i mužjaka. Ovakav zaključak podržan je rezultatima multivarijantne regresione analize koja je detektovala polno-specifičnu povezanost aktivnosti ETL sa osobinama životne istorije. Aktivnosti kompleksa II i III predstavljaju značajne prediktore regresionih modela koji statistički značajno opisuju do 80 % varijabilnosti dužine života, stope starenja i drugih osobina životne istorije ženki. Štaviše, duže trajanje razvića, veća masa, dužina života i sporije starenje pozitivno su korelisane sa aktivnošću kompleksa II i III. S druge strane, aktivnost kompleksa IV predstavlja značajan prediktor osobina adaptivne vrednosti mužjaka i sa njima je negativno korelisan.

Na ovom mestu može se razmatrati zašto je kod neukrštanih E×L mužjaka moguća aktivacija kompenzacionih mehanizama, usled koje se izgubio značajan pad u aktivnosti kompleksa I i IV u poređenju sa L×L kontrolama, za rezultat imala značajno smanjenje prosečne dužine života. Ovo pitanje posebno je interesantno ako se uzme u obzir da izostanak kompenzacionog odgovora kod E×L ženki, kao i L×E ženki i mužjaka, nije značajno smanjio prosečnu dužinu života. Moguće objašnjenje proizilazi iz studije Janga i Hekimija u kojoj su poredili fiziološke, biohemijske i promene u osobinama životne istorije mutanta *C. elegans* za gene kompleksa ETL (*isp-1(qm150)* i *nuo-6(qm200)*) i *C. elegans* kod kojih su isti geni utišani RNK interferencijom. Studija je pokazala da disfunkcionalnost mitohondrija može produžiti život na dva različita načina kod valjkastih crva: i) smanjenjem aktivnosti ETL kojim se smanjuje sinteza mROS-ova, i ii) anterogradnom i retrogradnom signalnom transdukcijom (Yang & Hekimi, 2010b). Polazeći od ovih predviđanja, energetske skupi kompenzacioni mehanizmi kod E×L mužjaka, koji povećavaju aktivnost kompleksa I, II i IV i anuliraju negativne efekte mito-jedarne inkompatibilnosti u ranijim životnim fazama, mogli su imati negativne efekte u kasnijem uzrastu i, posledično, dovesti do skraćivanja života. Analiza krivih mortaliteta i demografskih parametara pokazala je da se kod E×L mužjaka verovatnoća umiranja izrazito povećava u kasnijem uzrastu, što je potvrđeno

značajnim smanjenjem parametra s . U tom smislu, duži život kod ostalih mt-j grupa proizilazio bi iz smanjenja aktivnosti kompleksa I i IV, a samim tim smanjenja metaboličke aktivnosti i curenja mROS-ova koje smanjuje oksidativna oštećenja molekula. Preciznije objašnjenje ovih procesa zahteva dodatne analize aktivnosti antioksidativnih enzima i statusa oksidativnih oštećenja mito-jedarnih linija.

Jedan od najinteresantnijih rezultata ove studije jesu promene aktivnosti kompleksa II (sukcinat dehidrogenaza) pri narušavanju mito-jedarne kompatibilnosti. S obzirom na to da su subjedinice ovog kompleksa kodirane isključivo jedarnim genima, neočekivan rezultat predstavlja značajno povećanje aktivnosti kompleksa II kod E×L mito-jedarne linije, odnosno smanjenje kod L×E mt-j linije, u odnosu na kontrole sa istim poreklom jedra (Slika 18). Štaviše, na varijabilnost aktivnosti kompleksa II značajan efekat je imalo poreklo mitohondrije. U ranijim studijama analize aktivnosti ETL kod mito-jedarnih hibrida *T. californicus* i *Nasonia* sp., aktivnost kompleksa II nije se razlikovala između mito-jedarnih poređenja (Ellison & Burton, 2006; Ellison *et al.*, 2008), te je ovaj kompleks korišćen kao „interna kontrola jačine mito-jedarnih interakcija, jer nije pod uticajem mitohondrijske sredine“ (str. 1383, Ellison & Burton, 2006). Međutim, sukcinat dehidrogenaza predstavlja jedinstven enzim koji istovremeno učestvuje u oksidativnoj fosforilaciji (preuzima elektrone sa FADH₂) i Krebsovom ciklusu (obavlja oksidaciju sukcinata u fumarat) i omogućava povezivanje kataboličkih procesa ćelije sa ćelijskim disanjem unutar mitohondrija. Ujedno, kompleks II ima važnu ulogu u rezervnom respiratornom kapacitetu (engl. *reserve respiratory capacity*, RRA) (Pfleger *et al.*, 2015). Naime, usled povećanih energetske zahteva ćelije, usaglašavanje povećanja aktivnosti ETL sa povećanim ulaskom supstrata preko Krebsovog ciklusa odvija se upravo preko kompleksa II. Rezervna aktivnost sukcinat dehidrogenaze ne uočava se u normalnim fiziološkim stanjima, odnosno manifestuje se tek u uslovima kada potrošnja O₂ nije spregnuta sa ATP sintezom i ukoliko su energetske zahtevi intenzivirani (Pfleger *et al.*, 2015). Zbog svoje važne uloge u povećanju otpornosti na ćelijsku smrt, mutacije u genima za bilo koju od subjedinica kompleksa II kod *Drosophila* sp. i *C. elegans* za rezultat imaju skraćanje dužine života mutanata (Walker *et al.*, 2006; Bratic & Trifunovic, 2010). Slično rezultatima ovog rada na pasuljevom žišku, studija Vila-Kueste i saradnika detektovala je značajan efekat strane mitohondrije na aktivnost kompleksa II, uz izostanak uticaja na druge komplekse

ETL-a (Villa-Cuesta *et al.*, 2014). Dodatne metaboličke analize ukazale su da strani mtDNK haplotip svoj efekat na kompleks II ostvaruje indirektno, preko mTOR signalnog puta (Villa-Cuesta *et al.*, 2014). Naime, tretman rapamicinom, inhibitorom mTOR signalnog puta, povećava aktivnost kompleksa II, pospešuje oksidativnu fosforilaciju, smanjuje curenje mROS-ova i produžava dužinu života (Villa-Cuesta *et al.*, 2014). Pored toga, u skoro svim slučajevima utišavanja ekspresije subjednica kompleksa I kod *C. elegans* povećava se ekspresija i aktivnost sukcinat dehidrogenaze, kao kompenzacioni odgovor (Pujol *et al.*, 2013; Dancy *et al.*, 2014). Dakle, možemo pretpostaviti da promena u aktivnosti sukcinat dehidrogenaze kod mito-jedarnih linija pasuljevog žiška sa narušenim mito-jedarnim interakcijama predstavlja kompenzacioni odgovor na disfunkciju mitohondrija. Međutim, još uvek ne postoji direktno objašnjenje zašto su odgovori dve jedarne sredine (E i L) na „stranu“ mitohondriju suprotnog smera. Po svoj prilici, odgovor kompleksa II na retrogradne regulatorne signale zavisi od velikog broja endokrinih i metaboličkih puteva oblikovanih plejotropnim efektom mnogih jedarnih gena koji su pod uticajem uzrasno-specifične selekcije i čija se ekspresija nalazi u osnovi divergentnih životnih strategija uočenih kod E i L režima.

Ukratko, korišćenjem žižaka selektovanih za ranu i kasnu reprodukciju i mito-jedarnih linija dobijenih metodom povratnog ukrštanja, u ovom radu je pokazano da je evolucija starenja i divergentnih životnih strategija blisko povezana sa aktivnošću mitohondrijskog ETL i data je „mehaniistička“ potvrda značajne uloge koju mtDNK ima u starenju i adaptivnim procesima (Đorđević *et al.*, 2016).

5.8 Smetnje na vezi: efekat (ne)pravilne komunikacije mitohondrije i jedra na preživljavanje i dužinu života u homeostazi i nakon ekstrinzičkog oksidativnog stresa

Dodatne analize na velikom broju mito-jedarnih linija pasuljevog žiška ukazale su da narušavanje mito-jedarnih interakcija kod mt-j grupa sa L jedrom može, usled potencijalne aktivacije molekulskih i fizioloških procesa koji usporavaju starenje, značajno produžiti dužinu života neukrštanih jedinki, dok isti efekat nije uočen kod mt-j grupa sa E jedrom (Slike 19 i 22). Produženje dužine života usled intrinzičkog oksidativnog stresa kod pasuljevog žiška nije neočekivan i u velikoj meri se poklapa sa podacima dobijenim u analizama Mit mutanata - dugoživećih *C. elegans* sa mutacijama u genima za subjednice ETL (Batic & Trifunovic, 2010; Sanz, 2016). Na primer,

pokazano je da mutacija u subjediniči za kompleks III kod mutanta *isp-1(qm150)* uzrokuje mitohondrijsku disfunkcionalnost i produženje života (Bratic & Trifunovic, 2010). *C. elegans clk-1* mutant takođe upućuje na vezu neispravnog funkcionisanja ETL i usporenog starenja. Ovim mutantima nedostaje enzim potreban za sintezu ubihinona (koenzima Q) koji je neophodan za funkcionisanje kompleksa I. Valjkasti crvi sa *clk-1* mutacijom imaju sporije razviće, usporeno se kreću i duže žive (Miyadera *et al.*, 2001). Sličan fenotip razvija i dugoživeći mutant *nuo-6(qm200)* sa mutacijom u genu za subjedinicu I (NUDFB4) koja za rezultat ima povećanje sinteze mROS-ova (Yang & Hekimi, 2010b). Štaviše, kao i u slučaju rezultata na B i E žiškama (pogledati Diskusiju, odeljak 5.4), tretmani niskim koncentracijama generatora mROS-ova mogu dramatično povećati dužinu života kod velikog broja vrsta (Yang & Hekimi, 2010a). Svi navedeni podaci, uključujući i rezultate na *A. obtectus*, u suprotnosti su sa pretpostavkama MFRTA. Dodatno, oni ukazuju da je stanovište po kome mROS-ovi *de facto* uzrokuju proces starenja suviše pojednostavljeno i da se njihova dualna priroda može sagledati preko značajne uloge koju mROS-ovi imaju u signalnoj transdukciji aktivacije kompenzacionih mehanizama zaštite od negativnih efekata oksidativnog stresa i usporavanju procesa starenja.

Povezanost intrinzičkog oksidativnog stresa usled mito-jedarne nepodudarnosti i aktivacije mehanizama odbrane od oksidativnog stresa kod linija pasuljevog žiška indirektno je potvrđen analizom preživljavanja, dužine života i dinamike starenja nakon tretmana niskim koncentracijama generatora mROS-ova (parakvat i tebufenpirad). Polazna hipoteza u ovim eksperimentima podrazumevala je da ukoliko je intrinzički oksidativni stres aktivirao mehanizme zaštite, onda se kod linija sa narušenim mito-jedarnim interakcijama očekuje veća otpornost na ekstrinzički oksidativni stres u poređenju sa linijama koje sadrže rekonstituisane epistatičke interakcije. Povećana otpornost na ekstrinzički oksidativni stres mito-jedarnih linija sa narušenim epistatičkim interakcijama uočava se već na nivou preživljavanja. Tačnije, u eksperimentu sa 1,5 % tebufenpiradom detektovan je, iako bez statistički značajnih razlika, viši procenat preživljavanja E×L i L×E žižaka u odnosu na linije sa očuvanim mt-j interakcijama (Slika 22). Jasnu potvrdu pozitivnog efekta narušavanja mito-jedarnih interakcija na dužinu života i otpornost na oksidativni stres ženki i mužjaka predstavlja detekcija značajnog efekta mitohondrija × jedro nakon tretmana sa oba pesticida. Vrlo ilustrativne

pokazatelje pozitivnog efekta intrinzičkog oksidativnog stresa na dužinu života predstavljaju analize krivih preživljavanja i mortaliteta. Primera radi, na kontrolnom tretmanu krive preživljavanja L×E se ili preklapaju ili su pomerene u levo u odnosu na E×E žiške (ranije otpočinju sa umiranjem, Slike 20 i 23), dok nakon tretmana tebufenpiradom ili parakvatom L×E žišci kasnije počinju sa umiranjem, što je u slučaju PQ za rezultat imalo značajno produženje prosečne dužine života L×E ženki (Slika 19). Indirektna potvrda aktivacije mehanizama zaštite usled intrinzičkog oksidativnog stresa u vidu značajnog povećanja prosečne dužine života dobijena je i unutar mt-j grupa sa L jedrom, kako na kontrolama, tako i nakon tretmana generatorima mROS-ova (Slika 19 i 22). U eksperimentu sa tebufenpiradom uočen je izražen pozitivni kompenzacioni efekat kod E×L ženki koje su nakon indukcije ekstrinzičkog oksidativnog stresa imale veću verovatnoću preživljavanja od netretiranih L×L ženki (Slika 23). Otpornost na tretman generatorima mROS-ova u odnosu na mt-j linije sa rekonstituisanim epistatičkim interakcijama ogledala se u manjem stepenu promena Gompercovih parametara ili odlaganju početka umiranja po ceni bržeg starenja, što je u skladu sa pretpostavkom o visokoj energetske ceni aktivacije kompenzacionih mehanizama. Rezultati ove studije u saglasnosti su sa pretpostavkom da narušavanje pravilnog funkcionisanja mitohondrije usled mito-jedarne inkompatibilnost aktivira mehanizme zaštite kod pasuljevog žiška (Šešlija Jovanović *et al.*, 2014). Sličan rezultat, iako je intrinzički oksidativni stres izazvan utišavanjem subjedinica ETL RNKi, dobijen je kod vinskih mušica (Copeland *et al.*, 2009). Tačnije, utišavanje subjedinica kompleksa I (CG9172) i III (CG17856), ali ne i kompleksa IV (CG18809) i V (CG5389), ukazalo je na povezanost produžene dužine života i otpornosti na parakvat (Copeland *et al.*, 2009). S druge strane, tačkaste mutacije u subjedinicama za kompleks I i III (*isp-1(qm150)* i *nuo-6(qm200)*), ali ne i utišavanje istih gena RNKi, kod valjkastih crva rezultira produženjem dužine života i većom otpornošću na ekstrinzički oksidativni stres izazvan parakvatom usled povećane ekspresije Cu/Zn i Mn SOD (Yang & Hekimi, 2010b). Uzimajući u obzir filogenetsku udaljenost valjkastih crva, vinskih mušica i pasuljevog žiška, rezultati ove studije u saglasnosti su sa zaključkom Koplanda da „umereni intrinzički oksidativni stres izazvan nepravilnim funkcionisanjem ETL može predstavljati evoluciono konzervisan mehanizam produženja dužine života“ (str. 1596, Copeland *et al.*, 2009).

Prethodno smo ukazali da je efekat mito-jedarnih interakcija na dužinu života zavisio od zahteva životne sredine, odnosno od reproduktivnog režima (pogledati Diskusiju, odeljak 5.6.1). Drugim rečima, ishod efekta mito-jedarnih interakcija na dužinu života određen je energetske zahtevima reproduktivne aktivnosti. Nalazi eksperimenta 24-časovnog tretmana generatorima mROS-ova mito-jedarnih linija, ukazali su da je uticaj ekstrinzičkog oksidativnog stresa na dužinu života zavisio od: i) efekata intrinzičkog oksidativnog stresa nastalog kao posledica narušavanja mito-jedarnih interakcija, i ii) pola jedinke. Na primer, u prisustvu ekstrinzičkog oksidativnog stresa (PQ 0,5 %) kod ženki, ali ne i mužjaka, eksplicira se pozitivan efekat mitohormeze (intrinzički oksidativni stres) u E jedarnom okruženju, što rezultira značajnim produženjem života (Slika 19). S druge strane, 24-časovni tretman 1,5 % tebufenpiradom utišava stimulatorni efekat intrinzičkog oksidativnog stresa na dužinu života mužjaka u L jedarnom okruženju, što nije slučaj kod ženki (Slika 22). Iako još uvek ne znamo precizne mehanizme koji se nalaze u osnovi različitog polno-specifičnog odgovora intrinzičkog oksidativnog stresa na ekstrinzički oksidativni stres, detekcija značajne interakcije između mitohondrije, jedra i prisustva/odsustva ekstrinzičkog stresa jeste važna jer dodatno podržava hipotezu da ishod mito-jedarnih interakcija zavisi od abiotičkih ekoloških faktora. Imajući u vidu da efekti mito-jedarnih interakcija zavise i od biotičkih (reproduktivna aktivnost) i abiotičkih (tretman pesticidima) ekoloških faktora, nesporan je zaključak da se složenost fenotipskog efekta mitohondrijske genetičke varijabilnosti, koja je zavisna od epistatičkih interakcija sa jedarnim genomom, može sagledati isključivo u kontekstu konkretnih uslova životne sredine.

Veliki broj evoluciono-ekoloških studija zasniva se na pretpostavci da oksidativni metabolizam predstavlja fiziološku osnovu, a mROS-ovi glavne posrednike, u uzajamnim ograničenjima između osobina životne istorije u ranom i kasnom periodu razvića, odnosno između dugovečnosti i reprodukcije (Metcalf & Alonso-Alvarez, 2010; Isaksson *et al.*, 2011). Prema ovom konceptu, sinteza mROS-ova je u pozitivnoj korelaciji sa stopom metabolizma i funkcionisanjem mitohondrijskog ETL (Dowling & Simmons, 2009), i povećava se sa reproduktivnom aktivnošću organizama. U skladu sa pretpostavkama jednokratne some, povećanje reprodukcije ograničava resurse koji bi potencijalno mogli biti uloženi u mehanizme zaštite some i, posledično, uzrokuje skraćanje života usled povećanja oksidativnih oštećenja. Međutim, nekoliko studija,

uključujući rezultate ove teze, ukazalo je da je povezanost oksidativnog metabolizma sa osobinama životne istorije mnogo kompleksnija nego što se ranije smatralo (Speakman & Garratt, 2014). Jedna od mogućnosti u sagledavanju šire slike o tome kakvu ulogu energetski metabolizam ima u evoluciji životnih strategija jeste istraživanje veze između oksidativnog metabolizma u različitim tkivima, a ne jedinke kao celine, jer je pokazano da se strategije mehanizama zaštite razlikuju između tkiva u zavisnost od zahteva sredine (Speakman *et al.*, 2015). Ovaj pravac svakako će predstavljati i jedan od puteva naših budućih istraživanja.

6. ZAKLJUČCI

Analiza evolucionih i fizioloških mehanizama starenja kod dve grupe laboratorijskih populacija pasuljevog žiška, *Acanthoscelides obtectus*, koje su više od 170 generacija selektovane za ranu (kratkoživeće, E populacije) i kasnu reprodukciju (dugoživeće, L populacije), dovela je do sledećih zaključaka:

- Specifična dinamika procesa starenja laboratorijskih populacija evoluirala je u skladu sa obrascima delovanja uzrasno-specifične selekcije, čime su potvrđene pretpostavke evolucione teorije starenja. Analiza demografskih parametara pokazuje da je razlika u procesima starenja između E i L populacija, nezavisno od pola ili reproduktivnog statusa, prevashodno posledica promene u stopi (brzini) starenja.
- Ranije dostizanje prelomnog dana kod E jedinki u poređenju sa L jedinkama u skladu je sa evolucionim objašnjenjem kasnog doba, odnosno potvrđuje da krive mortaliteta prate obrazac promene intenziteta prirodne selekcije.
- Analiza obrazaca fekunditeta i pojave heteroze kod hibridnih linija pasuljevog žiška ukazala je da značajnu ulogu u evoluciji dužeg života u L režimu imaju mutacije sa antagonistički-plejotropnim efektom, dok u evoluciji kraćeg života E žižaka važnu ulogu ima akumulacija mutacija u genima koji se nalaze u osnovi ove osobine životne istorije.
- Pored prirodne selekcije, kod pasuljevog žiška važnu ulogu u evoluciji polnog dimorfizma u dužini života i stopi mortaliteta ima i seksualna selekcija. Inter- i intralokusni seksualni konflikt ima značajnu ulogu u evoluciji polnog dimorfizma dugovečnosti unutar selekcionog režima za kasnu, ali ne i za ranu reprodukciju.
- Selekcioni režimi razlikuju se u otpornosti na oksidativni stres izazvan ekstrinzičkim faktorima - parakvatom i tebufenpiradom. Povećana otpornost na oksidativni stres evoluirala je kao korelativni odgovor selekcije za kasnu reprodukciju. Na osnovu teorijskih predviđanja modela optimizacije energetske raspodele na različite životne funkcije, može se zaključiti da je evolucija dužeg

života podrazumevala veće ulaganje resursa u mehanizme održavanja same, a nauštrb ranog fekunditeta. Evolucija suprotne strategije optimizacionog modela uočena je kod jedinki populacija selektovanih za ranu reprodukciju.

- U skladu sa pretpostavkama procesa materinske kletve, unutar svih eksperimentalnih populacija žižaka uočena je evolucija veće otpornosti ženki na oksidativni stres.
- Detekcija hormetičkog efekta i značajnog povećanja dužine života kod B i E mužjaka nakon tretmana najnižim koncentracijama tebufenpirada, u odnosu na netretirane kontrole, u saglasnosti je sa dvostrukom ulogom prooksidanata koji, pored izazivanja oksidativnog stresa, učestvuju i u signalnim putevima indukujući mehanizme antioksidativne zaštite i reparacije.
- Genetička analiza mitohondrijskog i jedarnog genoma laboratorijskih populacija pasuljevog žiška predstavlja direktnu potvrdu povezanosti uzrasno-specifične selekcije i evolucije starenja sa oblikovanjem učestalosti mtDNK haplotipova i promenama bioenergetskih svojstava mitohondrija, prevashodno kompleksa III mitohondrijskog elektron transportnog lanca.
- Pad aktivnosti mitohondrijskog ETL kompleksa i lošije preadultne performanse jedinki linija sa narušenim mito-jedarnim interakcijama, a u odnosu na linije sa rekonstituisanim epistatičkim interakcijama, ukazuju da su mito-jedarne interakcije važna jedinica na koju je delovala uzrasno-specifična selekcija tokom evolucije divergentnih životnih strategija unutar E i L režima. Ujedno, ovi rezultati predstavljaju „mehaničku“ potvrdu značajne uloge koju mtDNK ima u starenju i procesima adaptacija.
- Imajući u vidu da efekti mito-jedarnih interakcija zavise i od biotičkih (npr. reproduktivna aktivnost) i abiotičkih (npr. hemijski uslovi staništa, u ovom radu testiranih kroz tretman pesticidima) ekoloških faktora, rezultati ove studije potvrđuju da se složenost fenotipskog efekta mitohondrijske genetičke varijabilnosti, koja je zavisna od epistatičkih interakcija sa jedarnim genomom, može sagledati isključivo u kontekstu konkretnih uslova životne sredine.

7. TABELE

Tabela 1. Mešani model analize varijanse za osobine trajanje razvića i masa tela kod laboratorijskih populacija *Acanthoscelides obtectus* iz B, E i L selekcionih režima. Selekcioni režim i pol predstavljaju fiksirane faktore, dok su populacije ugnježdene u selekcioni režim nasumičan faktor. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	df	F	P
Trajanje razvića			
Selekcioni režim	2, 5,14	105,21	<0,0001
Pol	1, 3244	189,71	<0,0001
Sel. režim × Pol	2, 3244	1,60	0,2014
Populacija (Sel. režim)	6, 3244	7,92	<0,0001
Masa tela			
Selekcioni režim	2, 5,96	158,73	<0,0001
Pol	1, 2748	1016,05	<0,0001
Sel. režim × Pol	2, 2748	24,96	<0,0001
Populacija (Sel. režim)	6, 2748	22,72	<0,0001

Tabela 2. Mešani model analize kovarijanse za osobinu dužina života neukrštanih i ukrštanih žižaka *Acanthoscelides obtectus* poreklom iz B, E i L selekcionih režima. Selekcioni režim i pol predstavljaju fiksirane faktore, populacije ugnježdene u selekcioni režim su nasumičan faktor, a masa tela je kovarijabla u modelu. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	Neukrštane		
	df	F	P
Masa	1, 2727	279,49	< 0,0001
Selekcioni režim	2, 6,166	30,33	0,0006
Pol	1, 2727	5,44	0,0197
Sel. režim × Pol	2, 2727	66,80	< 0,0001
Populacija (Sel. režim)	6, 2727	28,21	< 0,0001
Ukrštane			
	df	F	P
Masa	1, 829	8,36	0,0039
Selekcioni režim	2, 0,428	3224,30	0,7749
Pol	1, 829	24,63	< 0,0001
Sel. režim × Pol	2, 829	15,11	< 0,0001
Populacija (Sel. režim)	6, 829	0,57	0,7120

Tabela 3. Mešani model analize kovarijanse za osobinu dužina života neukrštanih i ukrštanih ženki i mužjaka kod laboratorijskih populacija *Acanthoscelides obtectus* poreklom iz B, E i L selekcionih režima. Selekcioni režim predstavlja fiksiran faktor, populacije ugnježdene u selekcioni režim jesu nasumičan faktor, a masa tela kovarijabla u modelu. U slučaju ukrštanih ženki, pored mase tela, u modelu kao kovarijabla učestvuje i ukupni fekunditet. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	Neukrštane					
	Ženke			Mužjaci		
	df	F	P	df	F	P
Masa	1, 1362	163,39	<0,0001	1, 1358	125,85	<0,0001
Selekcioni režim	2, 6,26	42,20	0,0002	2, 6,35	15,17	0,0038
Populacija (Sel. režim)	6, 1362	17,25	<0,0001	6, 1358	14,20	<0,0001
	Ukrštane					
	Ženke			Mužjaci		
	df	F	P	df	F	P
Masa	1, 416	9,11	0,0027	1, 405	6,56	0,0108
Ukupni fekunditet	1, 416	9,68	0,0020	/	/	/
Selekcioni režim	2, 2,53	63,72	0,0069	2, 3,33	62,76	0,0023
Populacija (Sel. režim)	6, 417	1,44	0,1988	6, 405	2,14	0,0476

Tabela 4. Vrednosti parametara dvostepenog Gomperta neukrštanih i ukrštanih ženki i mužjaka poreklom iz osnovnog (B) režima, selekcionog režima za ranu (E) i kasnu (L) reprodukciju. Poređenja su obavljena između selekcionih režima unutar pola. $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, Pd - prelomni dan, A - stopa mortaliteta u platou. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$ i b između režima, unutar pola, izvršena su χ^2 testom. Statistički značajne vrednosti označene su zvezdicama: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$. Poređenja parametara Pd i A između E i L režima izvršena su t-testom, a značajne razlike obeležene su različitim velikim slovima (A i B; $P < 0,05$).

	Neukrštane								Ukrštane							
	Ženke				Mužjaci				Ženke				Mužjaci			
	$\ln a$	b	Pd	A	$\ln a$	b	Pd	A	$\ln a$	b	Pd	A	$\ln a$	b	Pd	A
B režim	-16,64	1,16	15,0	0,30	-13,33	1,00	14,0	0,42	-13,14	1,42	10,0	0,59	-16,53	2,54	7,0	1,08
E režim	-8,62	0,86	11,0	0,74	-9,90	1,07	10,0	0,60	-20,00	3,05	6,8	0,58	-10,41	1,62	6,5	1,11
χ^2	19,22***	3,92			9,54**	0,46			7,5**	21,98***			6,7*	6,7*		
B režim	-16,64	1,16	15,0	0,30	-13,33	1,00	14,0	0,42	-13,14	1,42	10,0	0,59	-16,53	2,54	7,0	1,08
L režim	-9,72	0,39	25,5	0,20	-9,43	0,52	19,2	0,16	-10,82	0,90	13,2	0,28	-17,59	1,54	12,5	0,37
χ^2	13,44***	39,5***			13,06***	38,98***			2,1	11,82***			0,12	9,36***		
E režim	-8,62	0,86	11,0 ^A	0,74 ^A	-9,90	1,07	10,0 ^A	0,60 ^A	-20,00	3,05	6,8 ^A	0,58 ^A	-10,41	1,62	6,5 ^A	1,11 ^A
L režim	-9,72	0,39	25,5 ^B	0,20 ^A	-9,43	0,52	19,2 ^B	0,16 ^B	-10,82	0,90	13,2 ^B	0,28 ^A	-17,59	1,54	12,5 ^B	0,37 ^B
χ^2	4,96*	197,84***			0,66	114,80***			12,26***	42,90***			8,04***	0,08		

Tabela 5. Vrednosti parametara dvostepenog Gomperca neukrštanah i ukrštanah ženki i mužjaka osnovnog (B) režima, selekcionog režima za ranu (E) i kasnu (L) reprodukciju. Poređenja su obavljena između polova, a unutar selekcionog režima. $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, LCI - donji interval poverenja, UCI - gornji interval poverenja. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$ i b izvršena su između polova, unutar režima, pomoću χ^2 testa. Statistički značajne vrednosti označene su zvezdicama: * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

	$\ln a$ (LCI, UCI)	b (LCI, UCI)
E režim		
Neukrštane		
Ženke	-8,62 (-9,21; -8,08)	0,86 (0,80; 0,93)
Mužjaci	-9,90 (-10,82; -9,11)	1,07 (0,98; 1,18)
χ^2	6,54*	13,08***
Ukrštane		
Ženke	-20,00 (-23,03; -14,81)	3,05 (2,37; 3,94)
Mužjaci	-10,41 (-13,10; -7,93)	1,62 (1,26; 2,08)
χ^2	12,46***	12,26***
B režim		
Neukrštane		
Ženke	-16,64 (-20,72; -12,17)	1,16 (0,88; 1,53)
Mužjaci	-13,33 (-15,49; -11,51)	1,00 (0,85; 1,19)
χ^2	1,93	0,82
Ukrštane		
Ženke	-13,14 (-15,18; -11,51)	1,42 (1,22; 1,65)
Mužjaci	-16,53 (-20,72; -12,44)	2,54 (1,99; 3,25)
χ^2	2,46	15,14***
L režim		
Neukrštane		
Ženke	-9,72 (-10,41; -8,95)	0,39 (0,36; 0,42)
Mužjaci	-9,43 (-10,41; -8,68)	0,52 (0,47; 0,58)
χ^2	0,10	18,31***
Ukrštane		
Ženke	-10,82 (-13,26; -8,57)	0,90 (0,72; 1,14)
Mužjaci	-17,59 (-20,72; -12,99)	1,54 (1,18; 2,00)
χ^2	7,72**	8,9**

Tabela 6. Srednja vrednost, standardna greška (\pm SE) i rezultati mešanog modela analize varijanse za osobinu vreme polaganja jaja (prvi i poslednji dan) ženki poreklom iz B, E i L selekcionog režima. U modelu, selekциони režim predstavlja fiksiran faktor, dok su populacije ugnježdene u selekциони režim i predstavljaju nasumičan faktor. Statistički značajne razlike između režima u vrednostima osobina obeležene su različitim slovima (a, b, c) i određene Tukey post hoc testom ($P < 0,0001$). df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Selekциони režim	Prvi dan			Poslednji dan		
	df	F	P	df	F	P
E režim						
B režim						
L režim						
Selekциони režim	2, 3,161	11,62	0,0349	2, 4,884	12,89	0,0113
Populacija (Sel. režim)	6, 410	2,20	0,0419	6, 410	6,17	<0,0001

Tabela 7. Srednja vrednost, standardna greška (\pm SE), rezultati analize varijanse za rani fekunditet (broj jaja položen tokom prva dva dana) i rezultati mešanog modela analize kovarijanse za ukupni fekunditet (ukupan broj položenih jaja) ženki poreklom iz B, E i L selekcionog režima. U modelu analize kovarijanse selekциони režim predstavlja fiksiran faktor, populacije ugnježdene u selekциони režim predstavljaju nasumičan faktor, dok je masa tela kovarijabla. Statistički značajne razlike između režima u vrednostima osobina obeležene su različitim malim slovima (a, b, c) i određene Tukey testom ($P < 0,05$). df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Selekциони režim	Rani fekunditet			Ukupni fekunditet		
	df	F	P	df	F	P
E režim						
B režim						
L režim						
Masa	/	/	/	1, 409	102,30	<0,0001
Selekциони režim	2, 1,003	256,72	0,0437	2, 3,756	4,56	0,0989
Populacija (Sel. režim)	6, 410	1,02	0,4104	6, 409	2,46	0,0024

Tabela 8. Analiza varijanse za osobine virilitet, brzina i trajanje ukrštanja kod mužjaka nehibridnih populacija (vrednosti četiri populacije su združene) i dvostrukih hibrida poreklom iz selekcionih režima za ranu (E) i kasnu (L) reprodukciju. U modelu uzrast i nehibridne-hibridne (N-H) populacije predstavljaju fiksirane faktore. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos. Statistički značajne vrednosti označene su zvezdicama: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

Izvor variranja	Virilitet		Brzina ukrštanja		Trajanje ukrštanja	
	df	F	df	F	df	F
E režim						
Uzrast	1, 354	104,75***	1, 248	0,01	1, 248	0,15
N-H populacije	1, 354	45,70***	1, 248	8,48**	1, 248	10,65**
Uzrast × N-H pop.	1, 354	59,74***	1, 248	5,63*	1, 248	25,02***
L režim						
Uzrast	1, 496	86,00***	1, 338	1,95	1, 338	3,99*
N-H populacije	1, 496	199,94***	1, 338	39,40***	1, 338	13,27***
Uzrast × N-H pop.	1, 496	0,75	1, 338	4,56*	1, 338	0,04

Tabela 9. Mešani model analize varijanse za osobine procenat preživljavanja i dužina života nakon 24-časovnog tretmana ženki i mužjaka poreklom iz E i L selekcionog režima rastvorom različitih koncentracija parakvata (1 %, 5 %, 10 % i 20 %). U modelu selekcionni režim i pol predstavljaju fiksirane faktore, dok su populacije ugnježdene u selekcionni režim nasumičan faktor. Statistički značajne razlike između režima u vrednostima osobina su podebljane. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	Selekcionni režim			Pol			Sel. režim × Pol			Populacija (Sel. režim)		
	df	F	P	df	F	P	df	F	P	df	F	P
PQ1												
Preživljavanje	1, 6	16,43	0,007	1, 57	6,22	0,016	1, 57	1,93	0,169	6, 57	0,45	0,839
Dužina života	1, 6	176,02	<0,001	1, 646	764,60	<0,001	1, 646	261,60	<0,001	6, 646	6,05	<0,001
PQ5												
Preživljavanje	1, 6	38,03	0,001	1, 55	4,70	0,035	1, 55	0,02	0,876	6, 55	0,31	0,932
Dužina života	1, 6	48,72	<0,001	1, 640	139,07	<0,001	1, 640	72,30	<0,001	6, 640	9,38	<0,001
PQ10												
Preživljavanje	1, 6	28,42	0,001	1, 55	28,63	<0,001	1, 55	0,24	0,624	6, 55	1,22	0,309
Dužina života	1, 6	33,92	0,002	1, 640	210,52	<0,001	1, 640	105,21	<0,001	6, 640	13,00	<0,001
PQ20												
Preživljavanje	1, 6	12,52	0,012	1, 38	34,59	<0,001	1, 38	3,44	0,071	6, 38	4,16	0,003
Dužina života	1, 6	12,69	0,012	1, 469	59,75	<0,001	1, 469	27,47	<0,001	6, 469	11,06	<0,001

Tabela 10. Efekat niskih koncentracija parakvata (1 % i 5 %) na parametre Gompertzovog modela mortaliteta kod ženki i mužjaka poreklom iz B, E i L režima. $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, LCI - donji interval poverenja, UCI - gornji interval poverenja. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$ i b između tretmana (PQ1 ili PQ5) i kontrole izvršena su χ^2 testom. Statistički značajne razlike između tretirane grupe i kontrole su označene različitim velikim slovima (A i B).

	Ženke				Mužjaci			
	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)
B režim								
Kontrola	-6,59 ^A	(-7,21; -5,96)	0,38 ^A	(0,34; 0,43)	-4,49 ^A	(-4,89; -4,09)	0,33 ^A	(0,29; 0,37)
PQ1	-5,97 ^A	(-6,46; -5,28)	0,33 ^A	(0,29; 0,39)	-4,43 ^A	(-5,08; -3,79)	0,38 ^A	(0,31; 0,47)
PQ5	-4,73 ^B	(-5,32; -4,12)	0,30 ^B	(0,25; 0,36)	-3,18 ^B	(-3,62; -2,74)	0,25 ^B	(0,20; 0,32)
E režim								
Kontrola	-5,09 ^A	(-5,55; -4,64)	0,39 ^A	(0,35; 0,44)	-5,38 ^A	(-5,94; -4,81)	0,61 ^A	(0,54; 0,69)
PQ1	-5,85 ^B	(-6,38; -5,33)	0,52 ^B	(0,47; 0,58)	-4,54 ^B	(-5,05; -4,15)	0,51 ^B	(0,45; 0,58)
PQ5	-3,57 ^B	(-3,91; -3,24)	0,37 ^A	(0,32; 0,43)	-3,05 ^B	(-3,35; -2,75)	0,34 ^B	(0,29; 0,39)
L režim								
Kontrola	-7,93 ^A	(-8,68; -7,18)	0,30 ^A	(0,27; 0,34)	-6,17 ^A	(-6,77; -5,56)	0,42 ^A	(0,37; 0,48)
PQ1	-7,18 ^A	(-7,93; -6,43)	0,29 ^A	(0,25; 0,33)	-5,62 ^A	(-6,24; -5,00)	0,43 ^A	(0,37; 0,49)
PQ5	-5,30 ^B	(-5,69; -4,57)	0,24 ^B	(0,20; 0,28)	-3,61 ^B	(-4,04; -3,18)	0,22 ^B	(0,17; 0,27)

Tabela 11. Analiza varijanse za osobine procenat preživljavanja i dužina života nakon 24-časovnog tretmana ženki i mužjaka poreklom iz B režima, E i L dvostrukih hibrida rastvorom različitih koncentracija tebufenpirada (0,5 %, 1,5 %, 2,5 % i 5 %). Selekcioni režim i pol predstavljaju fiksirane faktore. Statistički značajne razlike između režima u vrednostima osobina su podebljane. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	Selekcioni režim			Pol			Sel. režim × Pol		
	df	F	P	df	F	P	df	F	P
TBF 0,5%									
Preživljavanje	1, 37	3,43	0,072	1, 37	4,33	0,044	1, 37	1,73	0,197
Dužina života	1, 385	453,42	<0,001	1, 385	428,77	<0,001	1, 385	21,95	<0,001
TBF 1,5%									
Preživljavanje	1, 42	41,83	<0,001	1, 42	21,94	<0,001	1, 42	4,83	0,034
Dužina života	1, 306	197,81	<0,001	1, 306	90,44	<0,001	1, 306	38,05	<0,001
TBF 2,5%									
Preživljavanje	1, 36	50,90	<0,001	1, 36	25,36	<0,001	1, 36	4,10	0,050
Dužina života	1, 215	48,52	<0,001	1, 215	56,87	<0,001	1, 215	27,57	<0,001
TBF 5%									
Preživljavanje	1, 36	28,17	<0,001	1, 36	10,09	0,003	1, 36	4,97	0,032
Dužina života	1, 154	13,65	0,000	1, 154	7,24	0,008	1, 154	11,29	0,001

Tabela 12. Efekat niskih koncentracija tebufenpirada (0,5 % i 1,5 %) na parametre Gompertzovog modela mortaliteta kod ženki i mužjaka poreklom iz B, E i L režima. $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, LCI - donji interval poverenja, UCI - gornji interval poverenja. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$ i b između tretmana (TBF 0,5 ili TBF 1,5) i kontrole izvršena su χ^2 testom. Statistički značajne razlike između tretirane grupe i kontrole su označene različitim velikim slovima (A i B).

	Ženke				Mužjaci			
	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)
B režim								
Kontrola	-8,05 ^A	(-9,11; -7,01)	0,41 ^A	(0,35; 0,48)	-4,52 ^A	(-5,05; -4,00)	0,43 ^A	(0,37; 0,50)
TBF 0,5	-8,22 ^A	(-9,32; -7,16)	0,47 ^A	(0,41; 0,55)	-7,71 ^B	(-8,80; -6,59)	0,71 ^B	(0,61; 0,83)
TBF 1,5	-6,26 ^B	(-9,43; -5,40)	0,37 ^A	(0,31; 0,44)	-4,40 ^A	(-5,01; -3,79)	0,39 ^A	(0,32; 0,47)
E režim								
Kontrola	-7,99 ^A	(-9,03; -6,94)	0,74 ^A	(0,64; 0,85)	-6,09 ^A	(-6,93; -5,25)	0,95 ^A	(0,82; 1,10)
TBF 0,5	-5,93 ^B	(-6,67; -5,18)	0,46 ^B	(0,39; 0,53)	-5,07 ^A	(-5,74; -4,40)	0,60 ^B	(0,51; 0,70)
TBF 1,5	-4,94 ^B	(-5,60; -4,27)	0,50 ^B	(0,42; 0,59)	-3,40 ^B	(-4,18; -2,61)	0,29 ^B	(0,20; 0,42)
L režim								
Kontrola	-7,93 ^A	(-8,68; -6,72)	0,31 ^A	(0,27; 0,37)	-6,22 ^A	(-7,06; -5,38)	0,47 ^A	(0,40; 0,55)
TBF 0,5	-7,68 ^A	(-8,80; -6,87)	0,32 ^A	(0,28; 0,37)	-5,18 ^B	(-5,78; -4,58)	0,36 ^B	(0,31; 0,42)
TBF 1,5	-7,17 ^A	(-8,05; -6,27)	0,32 ^A	(0,27; 0,37)	-4,04 ^B	(-4,52; -3,56)	0,26 ^B	(0,21; 0,30)

Tabela 13. Parametri genetičke varijabilnosti tri mikrosatelitska lokusa (*AcobtE07*, *AcobtF01* i *AcobtF09*) i učestalosti haplotipova mitohondrijskog COI gena (H1, H2 i H3) unutar B, E i L režima. Srednje vrednosti parametara dobijene združivanjem populacija unutar režima (sa izuzetkom B populacije) su podebljane. N - prosečan broj genskih kopija; n_A - veličina opsega alelskog variranja; H_D - dobijena heterozigotnost; H_O - očekivana heterozigotnost.

populacija	Mikrosateliti				COI		
	N	n_A	H_D	H_O	H1	H2	H3
B	118,00	4,00	0,514	0,453	0,733	0,200	0,050
E ₁	57,33	2,33	0,271	0,299	0,00	0,650	0,350
E ₂	60,00	5,00	0,222	0,252	0,00	0,700	0,300
E ₃	57,33	4,67	0,401	0,430	0,00	0,733	0,267
E ₄	58,67	2,00	0,415	0,341	0,00	0,816	0,183
Sr. vrednost E	233,33	5,00	0,327	0,347	0,00	0,725	0,275
L ₁	58,67	1,00	0,226	0,217	1,000	0,00	0,00
L ₂	59,33	3,00	0,300	0,348	1,000	0,00	0,00
L ₃	56,67	3,00	0,319	0,283	1,000	0,00	0,00
L ₄	58,67	1,00	0,282	0,297	0,377	0,00	0,633
Sr. vrednost L	233,33	3,00	0,282	0,291	0,842	0,00	0,158

Tabela 14. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) tri mikrosatelitska lokusa u B i E režimu (četiri E populacije združene u okviru E režima). df - broj stepeni slobode, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	df	komponenta varijanse	procenat varijanse	indeksi fiksacije	P
Između režima	1	0,114 Va	17,04	F_{ST} : 0,170	0,000
Unutar režima	177	-0,018 Vb	-2,71	F_{IS} : -0,033	0,829
Ukupna individualna	179	0,575 Vc	85,66	F_{IT} : 0,143	0,074
Ukupno	357	0,672			

Tabela 15. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) tri mikrosatelitska lokusa u B i L režimu (četiri L populacije združene u okviru L režima). df - broj stepeni slobode, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	df	komponenta varijanse	procenat varijanse	indeksi fiksacije	P
Između režima	1	0,216 Va	29,85	F_{ST} : 0,298	0,000
Unutar režima	177	-0,254 Vb	-3,51	F_{IS} : -0,050	0,921
Ukupna individualna	179	0,534 Vc	73,66	F_{IT} : 0,263	0,001
Ukupno	357	0,724			

Tabela 16. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) tri mikrosatelitska lokusa u E i L režimu (unutar svakog režima združene su po četiri populacije). df - broj stepeni slobode, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	df	komponenta varijanse	procenat varijanse	indeksi fiksacije	P
Između režima	1	0,410 Va	47,04	F_{ST} : 0,470	0,000
Unutar režima	238	0,013 Vb	1,51	F_{IS} : 0,029	0,217
Ukupna individualna	240	0,448 Vc	51,44	F_{IT} : 0,485	0,000
Ukupno	479	0,871			

Tabela 17. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) tri mikrosatelitska lokusa u osam populacija E i L režima. df - broj stepeni slobode, P - statistička značajnost

Izvor variranja	df	komponenta varijanse	procenat varijanse	indeksi fiksacije	P
Između režima	1	0,404	46,41	F_{CT} : 0,464	0,034
Između populacija unutar režima	6	0,022	2,60	F_{SC} : 0,049	0,000
Između individua unutar populacija	232	-0,004	-0,45	F_{IS} : -0,009	0,627
Ukupna individualna	242	0,448	51,44	F_{IT} : 0,486	0,000
Ukupno	479	0,871			

Tabela 18. Usporedne vrednosti F_{ST} indeksa iz parnih poređenja populacija poreklom iz E i L režima dobijene na osnovu mikrosatelitske varijabilnosti (ispod dijagonale) i mitohondrijske varijabilnosti COI lokusa (iznad dijagonale). Statistički značajne vrednosti F_{ST} indeksa su podebljane.

populacije	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	L ₁	L ₂	L ₃	L ₄
E ₁		-0,011	-0,000	0,053	0,537	0,537	0,537	0,413
E ₂	0,069		-0,014	0,020	0,573	0,573	0,573	0,471
E ₃	0,078	0,054		0,003	0,602	0,602	0,602	0,511
E ₄	0,004	0,123	0,094		0,696	0,696	0,696	0,614
L ₁	0,580	0,629	0,481	0,531		0,000	0,000	0,627
L ₂	0,466	0,494	0,342	0,434	0,050		0,000	0,627
L ₃	0,512	0,558	0,407	0,473	0,038	0,016		0,627
L ₄	0,509	0,546	0,398	0,470	0,019	0,008	0,007	

Tabela 19. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) mitohondrijskog COI lokusa u B i E režimu (četiri E populacije združene u okviru E režima). df - broj stepeni slobode, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	df	komponenta varijanse	procenat varijanse	indeksi fiksacije	P
Između režima	1	0,157	30,18	$F_{ST} : 0,302$	0,000
Ukupna individualna	297	0,364	69,82		
Ukupno	298	0,521			

Tabela 20. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) mitohondrijskog COI lokusa u B i L režimu (četiri L populacije združene u okviru L režima). df - broj stepeni slobode, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	df	komponenta varijanse	procenat varijanse	indeksi fiksacije	P
Između režima	1	0,025	14,27	$F_{ST} : 0,143$	0,000
Ukupna individualna	297	0,149	85,73		
Ukupno	298	0,174			

Tabela 21. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) mitohondrijskog COI lokusa u E i L režimu (unutar svakog režim združene su četiri populacije). df - broj stepeni slobode, P - statistička značajnost

Izvor variranja	df	komponenta varijanse	procenat varijanse	indeksi fiksacije	P
Između režima	1	0,269	50,13	$F_{ST} : 0,501$	0,000
Ukupna individualna	478	0,267	49,87		
Ukupno	479	0,536			

Tabela 22. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) mitohondrijskog COI lokusa u populacijama E i L režima. df - broj stepeni slobode, P - statistička značajnost

Izvor variranja	df	komponenta varijanse	procenat varijanse	indeksi fiksacije	P
Između režima	1	0,256 Va	47,77	F_{CT} : 0,478	0,034
Unutar režima	6	0,051 Vb	9,57	F_{SC} : 0,183	0,000
Ukupna individualna	472	0,229 Vc	42,67	F_{ST} : 0,573	0,000
Ukupno	479	0,672			

Tabela 23. Mešani model analize varijanse za osobine trajanje razvića i masa tela kod mito-jedarnih linija *A. obtectus*. Faktori mitohondrija (mt), jedro i pol su fiksirani, dok su linije ugnježdene u interakciju mitohondrije i jedra, i predstavljaju nasumičan faktor. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	df	F	P
Trajanje razvića			
Mt	1, 16,07	0,65	0,4335
Jedro	1, 16,07	123,63	<0,0001
Mt × Jedro	1, 16,07	48,79	<0,0001
Pol	1, 3873	202,79	<0,0001
Mt × Pol	1, 3873	0,41	0,5200
Jedro × Pol	1, 3873	0,01	0,9246
Mt × Jedro × Pol	1, 3873	0,51	0,4733
Linija (Mt × Jedro)	16, 3873	33,19	<0,0001
Masa tela			
Mt	1, 16,00	3,09	0,0979
Jedro	1, 16,00	318,58	<0,0001
Mt × Jedro	1, 16,00	6,68	0,0200
Pol	1, 6187	3288,57	<0,0001
Mt × Pol	1, 6187	0,54	0,4629
Jedro × Pol	1, 6187	155,07	<0,0001
Mt × Jedro × Pol	1, 6187	2,16	0,1418
Linija (Mt × Jedro)	16, 6187	69,99	<0,0001

Tabela 24. Mešani model analize varijanse za osobine dužina života neukrštanih i ukrštanih ženki i mužjaka mito-jedarnih linija *A. obtectus*. Faktori mitohondrija (mt), jedro i pol su fiksirani, dok su linije ugnježdene u interakciju mitohondrije i jedra, i predstavljaju nasumičan faktor. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	df	F	P
<i>Neukrštane</i>			
Ženke			
Masa tela	1, 2976	363,27	<0,0001
Mt	1, 16,03	1,44	0,2472
Jedro	1, 24,39	235,28	<0,0001
Mt × Jedro	1, 16,15	1,17	0,2952
Linija (Mt × Jedro)	16, 2976	15,67	<0,0001
Mužjaci			
Masa tela	1, 2974	361,85	<0,0001
Mt	1, 16,04	1,76	0,2032
Jedro	1, 24,03	43,13	<0,0001
Mt × Jedro	1, 16,16	0,37	0,5515
Linija (Mt × Jedro)	16, 2974	17,46	<0,0001
<i>Ukrštane</i>			
Ženke			
Ukupni fekunditet	1, 2349	101,95	<0,0001
Masa tela	1, 2349	78,99	<0,0001
Mt	1, 16,59	4,62	0,0466
Jedro	1, 27,83	323,21	<0,0001
Mt × Jedro	16, 16,12	0,37	0,5541
Linija (Mt × Jedro)	16, 2349	9,04	<0,0001
Mužjaci			
Masa tela	1, 2347	190,83	<0,0001
Mt	1, 16,00	42,99	<0,0001
Jedro	1, 16,00	768,23	<0,0001
Mt × Jedro	1, 16,00	17,84	<0,0001
Linija (Mt × Jedro)	16, 2347	13,49	<0,0001

Tabela 25. Parametri logističkog modela mortaliteta **neukrštanih** ženki i mužjaka poreklom iz mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama. Poređenja su obavljena između mt-j linija sa istovetnim jedrom, a unutar istog pola. $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, s - smanjenje stope starenja u kasnijem uzrastu, LCI - donji interval poverenja, UCI - gornji interval poverenja. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$, b i s izvršena su χ^2 testom, a statistički značajne vrednosti označene su zvezdicama: * P < 0,05.

	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)	s	(LCI, UCI)
Ženke						
E×E	-11,70	(-13,01; -10,41)	1,02	(0,89; 1,17)	1,97	(1,54; 2,52)
L×E	-12,06	(-13,42; -10,82)	1,10	(0,96; 1,26)	2,30	(1,84; 2,89)
χ^2	0,14		0,54		0,88	
L×L	-10,13	(-10,82; -9,21)	0,35	(0,31; 0,40)	1,11	(0,84; 1,48)
E×L	-11,51	(-12,57; -10,41)	0,42	(0,37; 0,48)	1,24	(0,95; 1,63)
χ^2	4,58*		4,22*		0,30	
Mužjaci						
E×E	-10,41	(-11,51; -9,21)	0,88	(0,77; 1,00)	1,61	(1,26; 2,08)
L×E	-11,51	(-12,56; -10,13)	0,95	(0,83; 1,09)	1,99	(1,56; 2,54)
χ^2	1,46		0,68		1,44	
L×L	-9,57	(-10,41; -8,68)	0,42	(0,37; 0,49)	1,66	(1,28; 2,19)
E×L	-8,52	(-9,43; -7,66)	0,38	(0,32; 0,45)	0,96	(0,64; 1,46)
χ^2	2,70		1,70		5,22*	

Tabela 26. Parametri logističkog modela mortaliteta **ukrštanih** ženki i mužjaka poreklom iz mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama. Poređenja su obavljena između mt-j linija sa istovetnim jedrom, a unutar istog pola. $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, s - smanjenje stope starenja u kasnijem uzrastu, LCI - donji interval poverenja, UCI – gornji interval poverenja. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$, b i s izvršena su χ^2 testom, a statistički značajne vrednosti označene su zvezdicama: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)	s	(LCI, UCI)
Ženke						
E×E	-9,90	(-10,82; -8,80)	1,21	(1,06; 1,39)	1,09	(0,79; 1,51)
L×E	-11,78	(-13,26; -10,41)	1,58	(1,36; 1,83)	1,37	(1,01; 1,87)
χ^2	4,24*		6,82**		1,08	
L×L	-10,13	(-11,51; -9,11)	0,72	(0,62; 0,83)	1,44	(1,08; 1,93)
E×L	-10,41	(-11,75; -9,32)	0,76	(0,66; 0,88)	1,92	(1,48; 2,49)
χ^2	0,22		0,30		2,20	
Mušjaci						
E×E	-10,41	(-11,66; -9,32)	1,29	(1,14; 1,48)	0,81	(0,56; 1,16)
L×E	-11,51	(-12,89; -10,13)	1,54	(1,33; 1,79)	1,04	(0,72; 1,50)
χ^2	1,08		2,92		163,40***	
L×L	-12,98	(-14,37; -11,58)	0,99	(0,87; 1,12)	0,91	(0,67; 1,26)
E×L	-12,15	(-13,55; -10,82)	0,97	(0,84; 1,12)	1,01	(0,72; 1,40)
χ^2	0,74		0,06		0,20	

Tabela 27. Analiza varijanse za aktivnosti kompleksa I, II, III i IV mitohondrijskog ETL žižaka poreklom iz E×E i L×L mito-jedarne linije. Selekcioni režim i pol predstavljaju fiksirane faktore. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos. Statistički značajni efekti faktora na aktivnost enzima su podebljani.

Izvor variranja	kompleks I			kompleks II			kompleks III			kompleks IV		
	df	F	P	df	F	P	df	F	P	df	F	P
Selekcioni režim	1, 16	2,06	0,1706	1, 16	0,25	0,6225	1, 16	31,39	<0,0001	1, 16	0,82	0,3799
Pol	1, 16	2,41	0,1401	1, 16	7,20	0,0163	1, 16	0,05	0,8260	1, 16	0,41	0,5320
Sel. režim × pol	1, 16	0,02	0,8787	1, 16	0,96	0,3430	1, 16	0,17	0,6875	1, 16	2,70	0,1201

Tabela 28. Mešani model analize varijanse za aktivnosti kompleksa I, II, III i IV mitohondrijskog ETL mito-jedarnih linija. Faktori mitohondrija (mt), jedro i pol su fiksirani, dok linije ugnježdene u interakciju mitohondrije i jedra predstavljaju nasumičan faktor. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost. Statistički značajni efekti faktora/interakcija na aktivnost enzima su podebljani.

Izvor variranja	kompleks I			kompleks II			kompleks III			kompleks IV		
	df	F	P	df	F	P	df	F	P	df	F	P
Mitohondrija	1, 16,19	1,21	0,2872	1, 16,19	15,11	0,0013	1, 16	0,05	0,8328	1, 16	1,10	0,3089
Jedro	1, 16,19	5,31	0,0348	1, 16,19	11,21	0,0040	1, 16	55,43	<0,0001	1, 16	0,00	0,9528
Pol	1, 171	13,45	0,0003	1, 166	66,25	<0,0001	1, 176	1,31	0,2535	1, 176	9,03	0,0030
Mt × Jedro	1, 16,19	11,20	0,0040	1, 16,19	0,00	0,9825	1, 16	26,23	<0,0001	1, 16	5,68	0,0299
Mt × Pol	1, 171	0,18	0,6759	1, 166	0,00	0,9974	1, 176	3,33	0,0696	1, 176	21,01	<0,0001
Jedro × Pol	1, 171	1,96	0,1633	1, 166	5,99	0,0154	1, 176	0,11	0,7369	1, 176	9,87	0,0020
Mt × Jedro × Pol	1, 171	17,12	<0,0001	1, 166	4,83	0,0293	1, 176	0,11	0,7391	1, 176	0,00	0,9993
Linija (Mt × Jedro)	16, 171	5,04	<0,0001	16, 166	9,41	<0,0001	16, 176	7,94	<0,0001	16, 176	18,40	<0,0001

Tabela 29. Mešani model analize varijanse za aktivnosti kompleksa I, II, III i IV mitohondrijskog ETL neukrštanih ženki i mužjaka mitohondrijskih linija. Faktori mitohondrija (mt), jedro i pol su fiksirani, dok linije ugnježdene u interakciju mitohondrije i jedra predstavljaju nasumičan faktor. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost. Statistički značajni efekti faktora/interakcija na aktivnost enzima su podebljani.

Izvor variranja	kompleks I			kompleks II			kompleks III			kompleks IV		
	df	F	P	df	F	P	df	F	P	df	F	P
<i>Ženke</i>												
Mitohondrija	1, 15	0,54	0,4749	1, 15	8,08	0,0123	1, 16	0,18	0,6770	1, 16	0,00	0,9887
Jedro	1, 15	1,03	0,3260	1, 15	8,16	0,0120	1, 16	51,42	<0,0001	1, 16	0,41	0,5318
Mt × Jedro	1, 15	9,48	0,0076	1, 15	0,20	0,6605	1, 16	23,99	0,0002	1, 16	3,69	0,0723
Linija (Mt × Jedro)	15, 76	8,23	<0,0001	15, 76	8,78	<0,0001	16, 80	5,05	<0,0001	16, 80	15,01	<0,0001
<i>Mužjaci</i>												
Mitohondrija	1, 16	1,03	0,3249	1, 15	18,44	0,0006	1, 16	0,44	0,5158	1, 16	5,69	0,0297
Jedro	1, 16	10,68	0,0048	1, 15	9,85	0,0068	1, 16	33,96	<0,0001	1, 16	0,57	0,4602
Mt × Jedro	1, 16	2,72	0,1184	1, 15	1,08	0,3146	1, 16	16,30	0,0010	1, 16	7,20	0,0163
Linija (Mt × Jedro)	16, 80	3,62	<0,0001	15, 76	6,95	<0,0001	16, 80	8,33	<0,0001	16, 80	11,05	<0,0001

Tabela 30. Parcijalni koeficijenti korelacije i multivarijantna regresiona analiza u kojoj su aktivnosti četiri kompleksa mitohondrijskog ETL (CI, CII, CIII i CIV) predstavljali nezavisne varijable, a trajanje razvića, masa tela, dužina života neukrštanih jedinki, kao i demografski parametri logističkog modela mortaliteta - zavisne varijable. Predstavljene su samo osobine i demografski parametri koji su značajno povezani sa aktivnostima ETL. Koeficijenti (β) aktivnosti kompleksa ETL koji značajno doprinose obrascu variranja fitnes osobina i demografskih parametara, kao i značajne vrednosti parcijalnih korelacionih koeficijenata, su podebljane ($P < 0,05$).

Združeno	Multivarijantna regresiona analiza			Parcijalni korelacioni koeficijenti			
	Jednačina	R ²	P	CI	CII	CIII	CIV
Tr. razvića	$Y = 31,5 + 3,4(CI) + 123,5(CII) + 5,3(CIII) - 2,9(CIV)$	0,605	<0,0001	+0,110	+0,681	+0,308	-0,615
Masa	$Y = 2,7 + 1,4(CI) + 49,5(CII) + 7,7(CIII) - 1,0(CIV)$	0,635	<0,0001	+0,070	+0,515	+0,601	-0,387
Duž. života	$Y = 11,3 + 1,1(CI) + 239,8(CII) + 38,8(CIII) - 5,4(CIV)$	0,717	<0,0001	+0,014	+0,595	+0,695	-0,518
b	$Y = 1,1 - 0,4(CI) - 9,5(CII) - 2,4(CIII) + 0,3(CIV)$	0,657	<0,0001	-0,081	-0,413	-0,678	+0,472
s	$Y = 2,7 - 0,6(CI) - 20,2(CII) - 3,4(CIII) + 0,3(CIV)$	0,478	0,0005	-0,053	-0,376	-0,476	+0,207
<hr/>							
Ženke							
Tr. razvića	$Y = 30,7 - 6,1(CI) + 107,2(CII) + 7,3(CIII) - 1,1(CIV)$	0,628	0,0081	-0,229	+0,740	+0,470	-0,284
Masa	$Y = 2,3 - 4,3(CI) + 43,9(CII) + 10,8(CIII) - 0,2(CIV)$	0,739	0,0009	-0,262	+0,588	+0,787	-0,086
Duž. života	$Y = 7,4 - 21,1(CI) + 262,5(CII) + 55,6(CIII) - 2,9(CIV)$	0,802	0,0002	-0,288	+0,703	+0,831	-0,272
b	$Y = 1,5 + 0,1(CI) - 13,1(CII) - 3,0(CIII) + 0,2(CIV)$	0,742	0,0009	+0,027	-0,590	-0,767	+0,322
s	$Y = 3,6 - 1,4(CI) - 28,7(CII) - 4,2(CIII) + 0,4(CIV)$	0,708	0,0019	-0,144	-0,625	-0,642	+0,247
<hr/>							
Mušjaci							
Tr. razvića	$Y = 32,3 + 6,7(CI) + 164,3(CII) + 3,7(CIII) - 4,0(CIV)$	0,663	0,0045	+0,155	+0,697	+0,188	-0,772
Masa	$Y = 2,9 + 5,1(CI) + 36,8(CII) + 5,3(CIII) - 1,2(CIV)$	0,633	0,0076	+0,227	+0,301	+0,447	-0,566
Duž. života	$Y = 11,6 + 24,2(CI) + 128,2(CII) + 23,6(CIII) - 5,7(CIV)$	0,748	0,0007	+0,271	+0,263	+0,556	-0,694
b	$Y = 0,9 - 1,0(CI) - 10,9(CII) - 1,8(CIII) + 0,4(CIV)$	0,747	0,0015	-0,172	-0,355	-0,616	+0,682

Tabela 31. Mešani model analize varijanse za preživljavanje i dužinu života neukrštanih ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i 0,5 % rastvorom parakvata. U modelu, mitohondrija (mt), jedro i tretman predstavljaju fiksirane faktore, dok su linije ugnježdene u interakciju mitohondrije i jedra nasumičan faktor. Statistički značajan efekat faktora/interakcije na varijabilnost osobina je podebljan. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	Ženke						Mužjaci					
	Preživljavanje			Dužina života			Preživljavanje			Dužina života		
	df	F	P	df	F	P	df	F	P	df	F	P
Mitohondrija	1, 113,15	0,96	0,3281	1, 76,24	6,88	0,0105	1, 77,23	0,62	0,4348	1, 76,26	9,77	0,0025
Jedro	1, 113,15	0,44	0,5068	1, 76,24	715,67	<0,0001	1, 77,23	18,27	<0,0001	1, 76,26	183,78	<0,0001
Mt × Jedro	1, 113,15	0,56	0,4554	1, 76,24	17,50	<0,0001	1, 77,23	0,01	0,9215	1, 76,26	23,36	<0,0001
Tretman	1, 1648	64,31	<0,0001	1, 7115	2699,13	<0,0001	1, 1725	357,78	<0,0001	1, 7578	2443,88	<0,0001
Linija (Mt × Jedro)	76, 1648	1,19	0,1269	76, 7115	7,51	<0,0001	76, 1725	1,03	0,4128	76, 7578	8,59	<0,0001
Jedro × Tretman	1, 1648	1,44	0,2300	1, 7115	15,28	<0,0001	1, 1725	13,13	0,0003	1, 7578	0,14	0,7037
Mt × Tretman	1, 1648	0,00	0,9656	1, 7115	3,58	0,0585	1, 1725	1,09	0,2971	1, 7578	1,41	0,2345
Mt × Jedro × Tretman	1, 1648	0,51	0,4755	1, 7115	3,92	0,0477	1, 1725	0,16	0,6889	1, 7578	2,29	0,1299

Tabela 32. Vrednosti parametara Gompercovog modela mortaliteta neukrštanih ženki i mužjaka poreklom iz mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i 0,5 % rastvorom parakvata (PQ 0,5). Poređenja su obavljena između tretmana unutar iste mt-j grupe. $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, LCI - donji interval poverenja, UCI - gornji interval poverenja. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$ i b izvršena su χ^2 testom, a statistički značajne vrednosti označene su zvezdicama: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

	Ženke				Mužjaci			
	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)
E×E								
Kontrola	-5,61	(-5,83; -5,39)	0,32	(0,30; 0,33)	-5,34	(-5,55; -5,13)	0,40	(0,39; 0,43)
PQ 0,5	-4,60	(-4,79; -4,42)	0,37	(0,36; 0,40)	-4,30	(-4,49; -4,12)	0,44	(0,41; 0,46)
χ^2	50,00***		20,36***		53,78***		3,84	
L×E								
Kontrola	-5,77	(-5,99; -5,55)	0,33	(0,31; 0,35)	-5,67	(-5,87; -5,46)	0,43	(0,41; 0,45)
PQ 0,5	-5,17	(-5,40; -4,95)	0,41	(0,39; 0,43)	-4,28	(-4,47; -4,09)	0,39	(0,37; 0,42)
χ^2	14,12***		30,38***		94,9***		6,02*	
L×L								
Kontrola	-6,35	(-6,56; -6,13)	0,19	(0,18; 0,20)	-5,14	(-5,32; -4,96)	0,26	(0,25; 0,28)
PQ 0,5	-5,18	(-5,37; -4,98)	0,22	(0,20; 0,23)	-3,86	(-4,01; -3,71)	0,24	(0,22; 0,25)
χ^2	64,56***		11,1***		120,86***		7,76**	
E×L								
Kontrola	-6,00	(-6,18; -5,81)	0,14	(0,14; 0,15)	-4,21	(-4,33; -4,09)	0,13	(0,13; 0,14)
PQ 0,5	-5,42	(-5,61; -5,24)	0,20	(0,19; 0,21)	-4,15	(-4,29; -4,01)	0,21	(0,20; 0,22)
χ^2	18,68***		83,42***		0,42		134,74***	

Tabela 33. Vrednosti parametara Gompercovog modela mortaliteta neukrštanih ženki i mužjaka poreklom iz mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i 0,5 % rastvorom parakvata. Poređenja između mito-jedarnih linija koje poseduju isto jedro, a različite mitohondrije izvršena su χ^2 testom u okviru jedinki tretiranih vodom (Kontrola) ili 0,5 % rastvorom parakvata (PQ 0,5). $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, LCI - donji interval poverenja, UCI - gornji interval poverenja. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$ i b , a statistički značajne vrednosti označene su zvezdicama: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

	Ženke				Mužjaci			
	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)
Kontrola								
E×E	-5,61	(-5,83; -5,39)	0,32	(0,30; 0,33)	-5,34	(-5,55; -5,13)	0,40	(0,39; 0,43)
L×E	-5,77	(-5,99; -5,55)	0,33	(0,31; 0,35)	-5,67	(-5,87; -5,46)	0,43	(0,41; 0,46)
χ^2	1,00		1,66		4,96*		4,08*	
L×L	-6,35	(-6,56; -6,13)	0,19	(0,18; 0,20)	-5,14	(-5,32; -4,96)	0,26	(0,25; 0,28)
E×L	-6,00	(-6,18; -5,81)	0,14	(0,14; 0,15)	-4,21	(-4,33; -4,09)	0,13	(0,13; 0,14)
χ^2	6,04*		69,74***		77,56***		324***	
PQ 0,5								
E×E	-4,60	(-4,79; -4,42)	0,37	(0,36; 0,40)	-4,30	(-4,49; -4,12)	0,44	(0,41; 0,46)
L×E	-5,17	(-5,40; -4,95)	0,41	(0,39; 0,43)	-4,28	(-4,47; -4,09)	0,39	(0,37; 0,42)
χ^2	15,54***		5,08*		0,04		5,66*	
L×L	-5,18	(-5,37; -4,98)	0,22	(0,20; 0,23)	-3,86	(-4,01; -3,71)	0,24	(0,22; 0,25)
E×L	-5,42	(-5,61; -5,24)	0,20	(0,19; 0,21)	-4,15	(-4,29; -4,01)	0,21	(0,20; 0,22)
χ^2	3,48		5,38*		8,22**		8,06**	

Tabela 34. Mešani model analize varijanse za osobine preživljavanje i dužina života neukrštanih ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i 1,5 % rastvorom tebufenpirada. U modelu, mitohondrija (mt), jedro i tretman predstavljaju fiksirane faktore, dok su linije ugnježdene u interakciju mitohondrije i jedra nasumičan faktor. Statistički značajan efekat faktora/interakcije na varijabilnost osobine je podebljan. df - broj stepeni slobode, F - F-odnos, P - statistička značajnost.

Izvor variranja	Ženke						Mužjaci					
	Preživljavanje			Dužina života			Preživljavanje			Dužina života		
	df	F	P	df	F	P	df	F	P	df	F	P
Mitohondrija	1, 16,73	2,79	0,1135	1, 16,17	2,53	0,1309	1, 17,03	0,84	0,3729	1, 16,67	1,57	0,2275
Jedro	1, 16,73	14,64	0,0014	1, 16,17	259,49	<0,0001	1, 17,03	40,35	<0,0001	1, 16,67	95,51	<0,0001
Mt × Jedro	1, 156	0,98	0,3362	1, 16,17	3,89	0,0659	1, 17,03	2,85	0,1095	1, 16,67	3,46	0,0808
Tretman	1, 156	43,40	<0,0001	1, 1639	212,78	<0,0001	1, 17,03	204,04	<0,0001	1, 1462	168,22	<0,0001
Linija (Mt × Jedro)	76, 156	1,30	0,2038	76, 1639	6,81	<0,0001	76, 159	0,91	0,5589	76, 1462	4,36	<0,0001
Jedro × Tretman	1, 156	22,97	<0,0001	1, 1639	35,76	<0,0001	1, 159	32,87	<0,0001	1, 1462	6,99	0,0083
Mt × Tretman	1, 156	1,89	0,1706	1, 1639	7,97	0,0048	1, 159	0,31	0,5573	1, 1462	2,75	0,0976
Mt × Jedro × Tretman	1, 156	0,07	0,7951	1, 1639	2,37	0,1236	1, 159	1,33	0,2498	1, 1462	4,98	0,0258

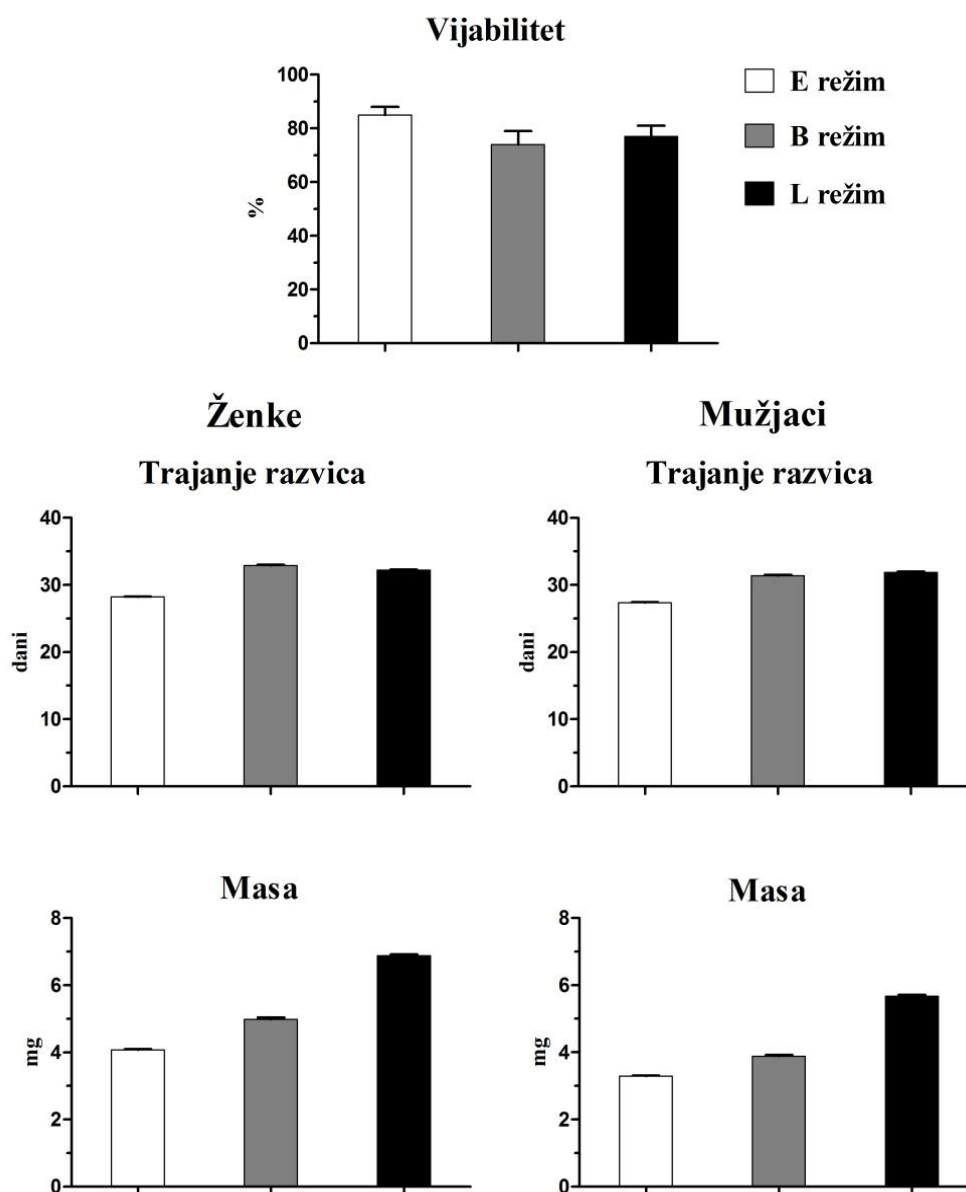
Tabela 35. Vrednosti parametara Gompercovog modela mortaliteta neukrštanih ženki i mužjaka poreklom iz mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i 1,5 % rastvorom tebufenpirada (TBF 1,5). Poređenja su obavljena između tretmana, a unutar iste mt-j grupe. $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, LCI - donji interval poverenja, UCI - gornji interval poverenja. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$ i b izvršena su χ^2 testom, a statistički značajne vrednosti označene su zvezdicama: ** P < 0,01; *** P < 0,001.

	Ženke				Mužjaci			
	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)
E×E								
Kontrola	-6,22	(-6,68; -5,77)	0,46	(0,42; 0,50)	-7,68	(-8,38; -6,98)	0,87	(0,78; 0,96)
TBF 1,5	-4,68	(-5,12; -4,24)	0,41	(0,36; 0,46)	-3,56	(-4,03; -3,09)	0,43	(0,36; 0,51)
χ^2	23,30***		2,15		98,32***		59,12***	
L×E								
Kontrola	-6,66	(-7,26; -6,07)	0,53	(0,47; 0,59)	-6,79	(-7,40; -6,20)	0,78	(0,71; 0,86)
TBF 1,5	-5,26	(-5,75; -4,78)	0,46	(0,41; 0,52)	-5,33	(-5,99; -4,68)	0,63	(0,54; 0,72)
χ^2	13,65***		3,47		10,63**		6,76**	
L×L								
Kontrola	-6,27	(-6,79; -5,76)	0,28	(0,25; 0,31)	-7,93	(-8,68; -7,17)	0,75	(0,67; 0,83)
TBF 1,5	-6,27	(-6,80; -5,73)	0,31	(0,27; 0,34)	-4,73	(-5,15; -4,31)	0,39	(0,35; 0,44)
χ^2	0,00		0,21		61,15***		68,98***	
E×L								
Kontrola	-7,85	(-8,52; -7,21)	0,33	(0,30; 0,37)	-8,57	(-9,32; -7,78)	0,75	(0,68; 0,83)
TBF 1,5	-7,56	(-8,22; -6,92)	0,36	(0,33; 0,40)	-5,90	(-6,41; -5,39)	0,51	(0,46; 0,56)
χ^2	0,40		1,19		34,56***		29,38***	

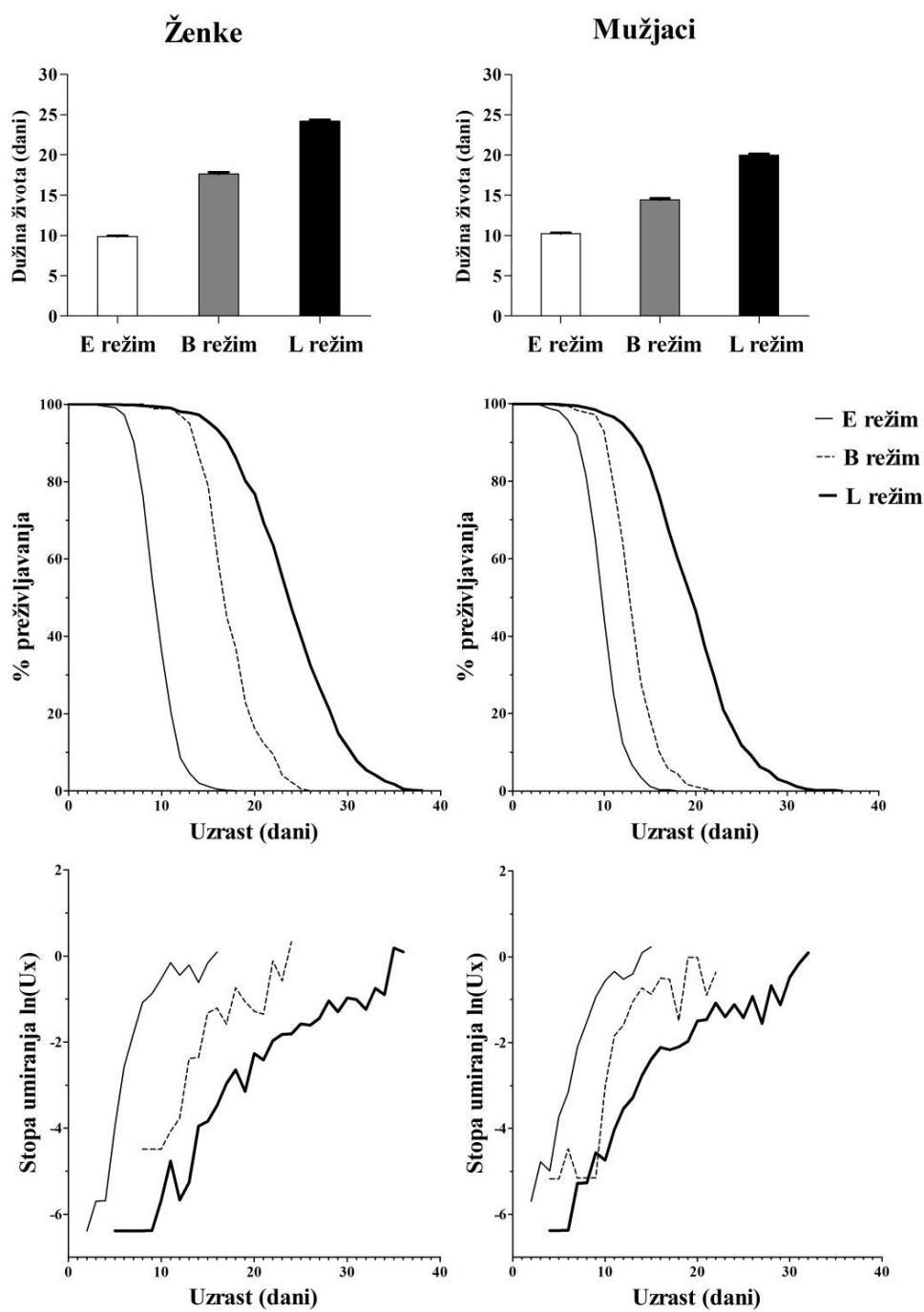
Tabela 36. Vrednosti parametara Gompercovog modela mortaliteta neukrštanih ženki i mužjaka poreklom iz mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i 1,5 % rastvorom tebufenpirada (TBF 1,5). Poređenja su obavljena unutar tretmana, između mito-jedarnih grupa koje poseduju isto jedro, a različite mitohondrije. $\ln a$ - inicijalna stopa mortaliteta, b - eksponencijalna stopa mortaliteta, LCI - donji interval poverenja, UCI - gornji interval poverenja. Parna poređenja vrednosti parametara $\ln a$ i b izvršena su χ^2 testom, a statistički značajne vrednosti označene su zvezdicama: * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001.

	Ženke				Mužjaci			
	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)	$\ln a$	(LCI, UCI)	b	(LCI, UCI)
Kontrola								
E × E	-6,25	(-6,68; -5,77)	0,45	(0,42; 0,50)	-7,68	(-8,38; -6,98)	0,87	(0,78; 0,96)
L × E	-6,66	(-7,26; -6,07)	0,53	(0,48; 0,59)	-6,79	(-7,40; -6,20)	0,78	(0,71; 0,86)
χ^2	1,38		4,96*		3,72		2,30	
L × L								
L × L	-6,27	(-6,79; -5,76)	0,28	(0,25; 0,31)	-7,93	(-8,68; -7,17)	0,75	(0,67; 0,83)
E × L	-7,85	(-8,52; -7,21)	0,33	(0,30; 0,37)	-8,57	(-9,32; -7,78)	0,75	(0,68; 0,83)
χ^2	14,82***		5,92*		1,30		0,00	
TBF 1,5								
E × E	-4,68	(-5,12; -4,24)	0,41	(0,36; 0,46)	-3,56	(-4,03; -3,09)	0,42	(0,36; 0,51)
L × E	-5,26	(-5,75; -4,78)	0,45	(0,41; 0,52)	-5,33	(-5,99; -4,68)	0,63	(0,54; 0,72)
χ^2	3,20		1,96		20,44***		11,66***	
L × L								
L × L	-6,27	(-6,80; -5,73)	0,31	(0,27; 0,34)	-4,73	(-5,15; -4,31)	0,39	(0,35; 0,44)
E × L	-7,56	(-8,22; -6,92)	0,36	(0,32; 0,40)	-5,90	(-6,41; -5,39)	0,51	(0,46; 0,56)
χ^2	9,62**		4,52*		12,74***		11,62***	

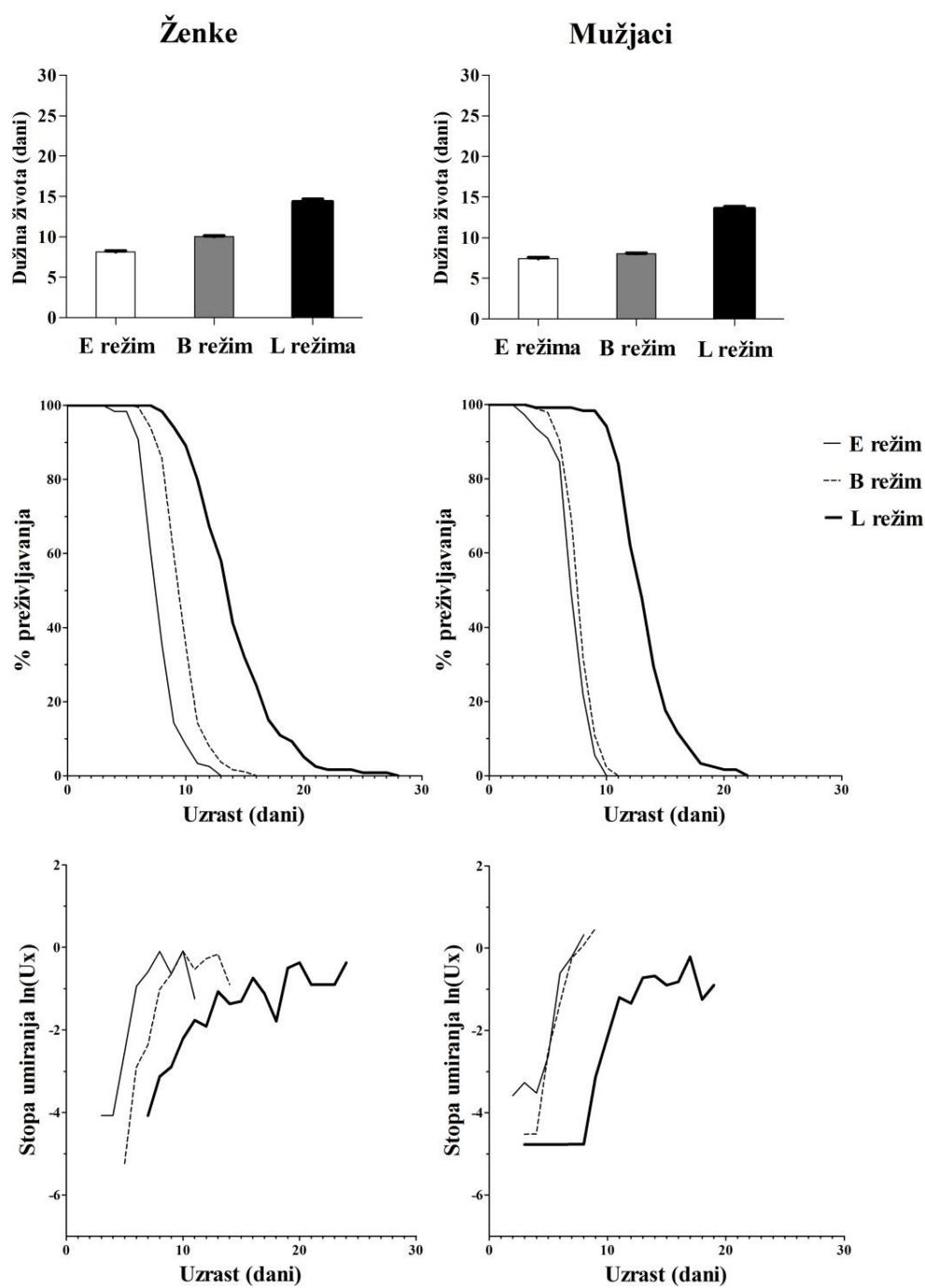
8. SLIKE



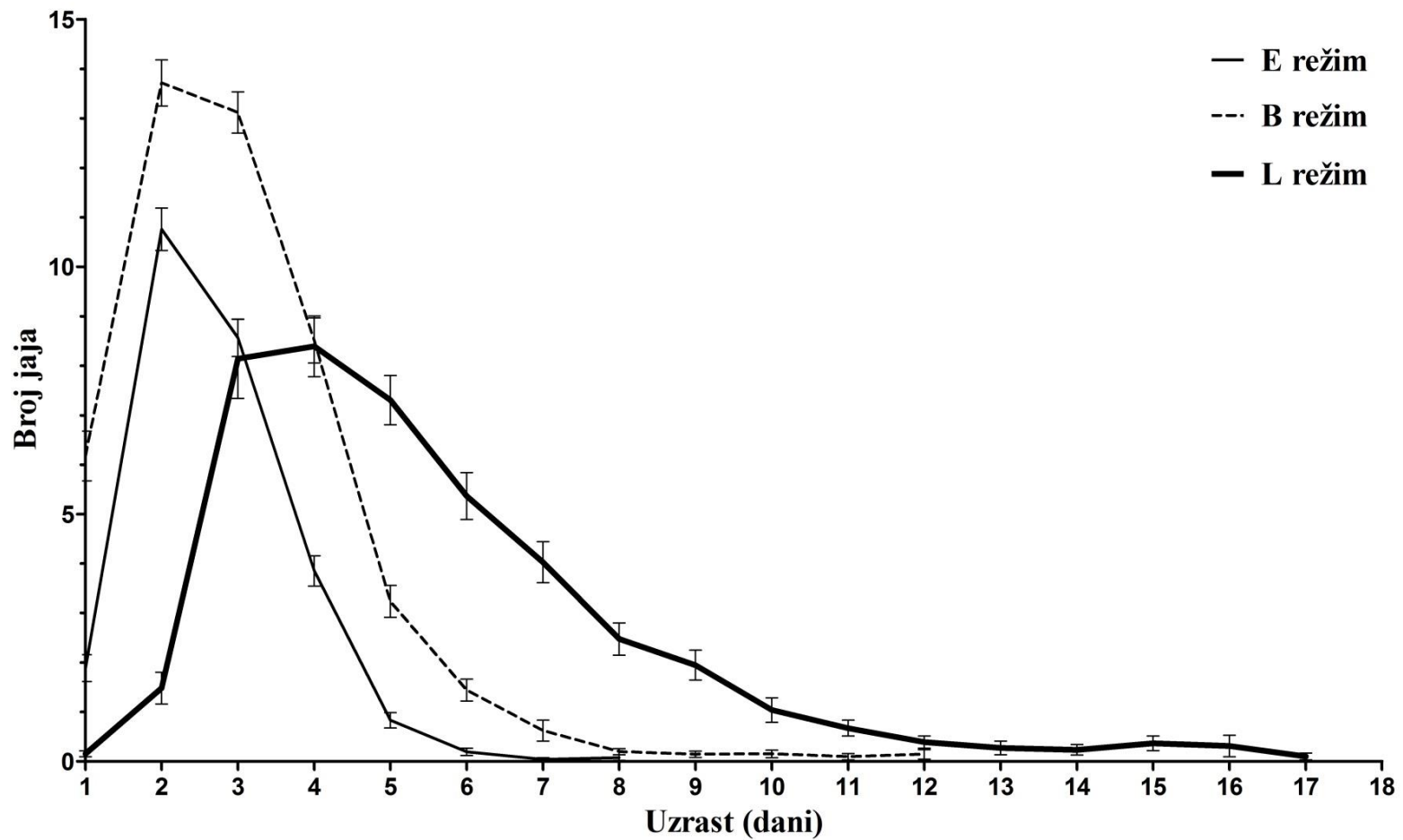
Slika 1. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) preadultnih osobina životne istorije ženki i mužjaka pasuljevog žiška poreklom iz selekcionih režima koji su bili 252 generacije pod selekcijom za ranu (E), 174 generacije pod selekcijom za kasnu (L) reprodukciju, kao i iz osnovnog (B) režima.



Slika 2. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) dužine života, krive preživljavanja i krive mortaliteta neukrštanih ženki i mužjaka pasuljevog žiška poreklom iz osnovnog režima (B) i selekcionih režima za ranu (E) i kasnu (L) reprodukciju.

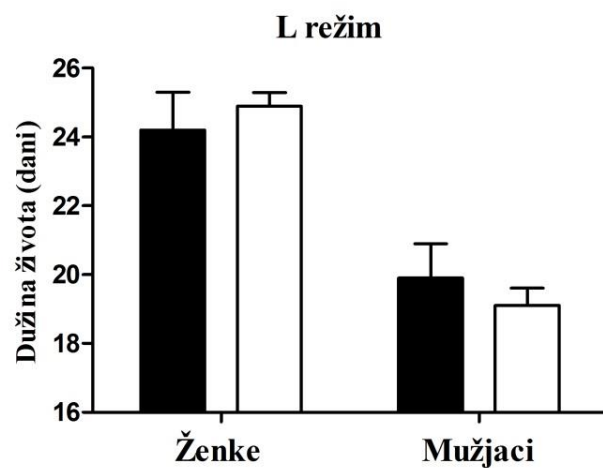
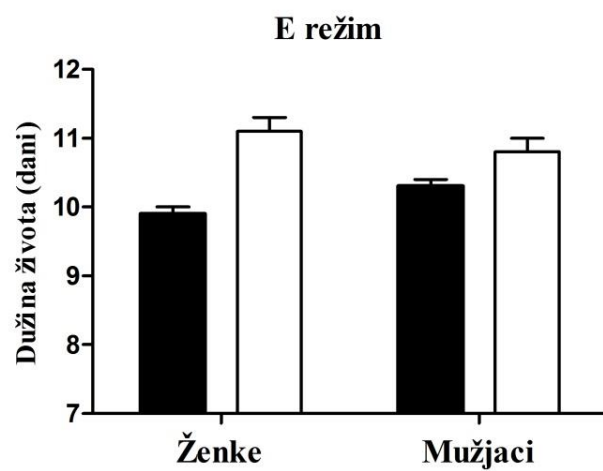


Slika 3. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) dužine života, krive preživljavanja i krive mortaliteta ukrštanih ženki i mužjaka pasuljevog žiška poreklom iz osnovnog režima (B) i selekcionih režima za ranu (E) i kasnu (L) reprodukciju.



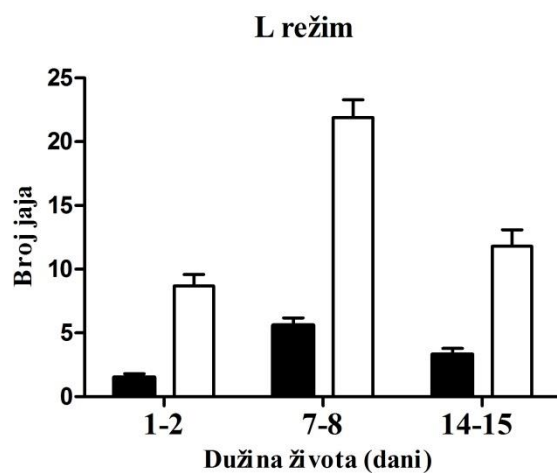
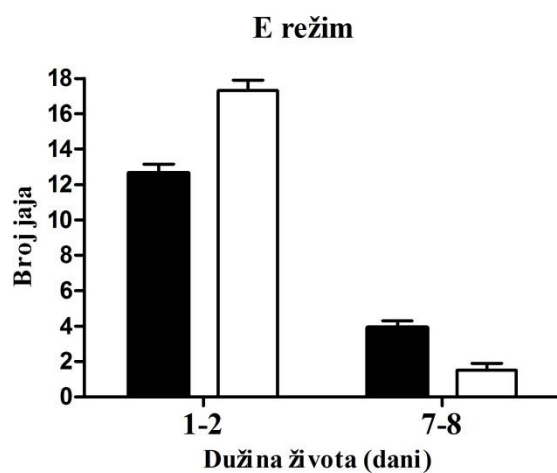
Slika 4. Dinamika promene prosečnih vrednosti broja položenih jaja tokom života ženki poreklom iz selekcionih režima koji su 252 generacije bili pod selekcijom za ranu (E), 174 generacije pod selekcijom za kasnu (L) reprodukciju, kao i iz osnovnog (B) režima.

■ Nehybridne populacije □ Dvostruki hibridi

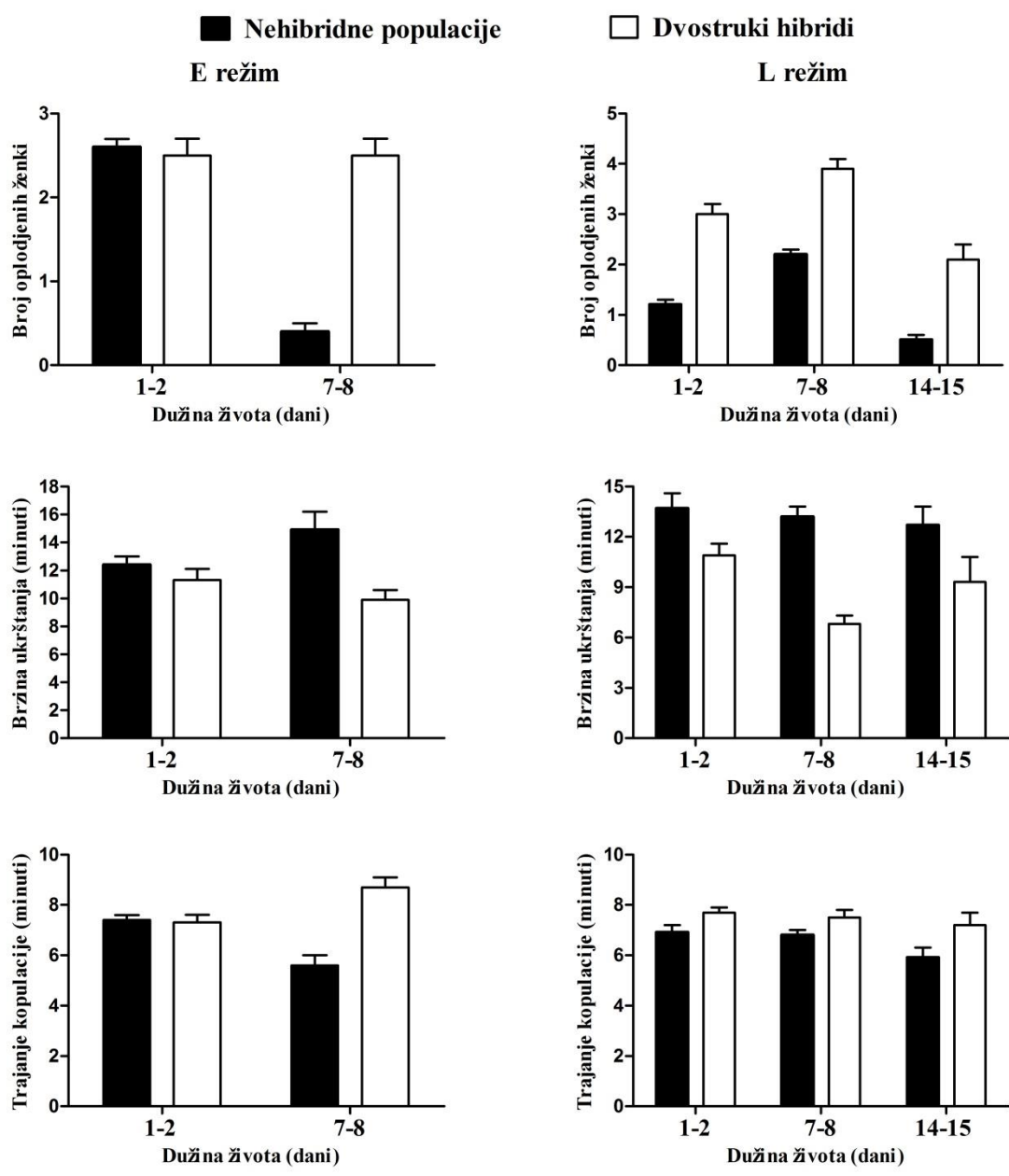


Slika 5. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) dužine života ženki i mužjaka nehibridnih E i L populacija (združene vrednosti četiri populacije) i njihovih dvostrukih hibrida poreklom iz E i L režima

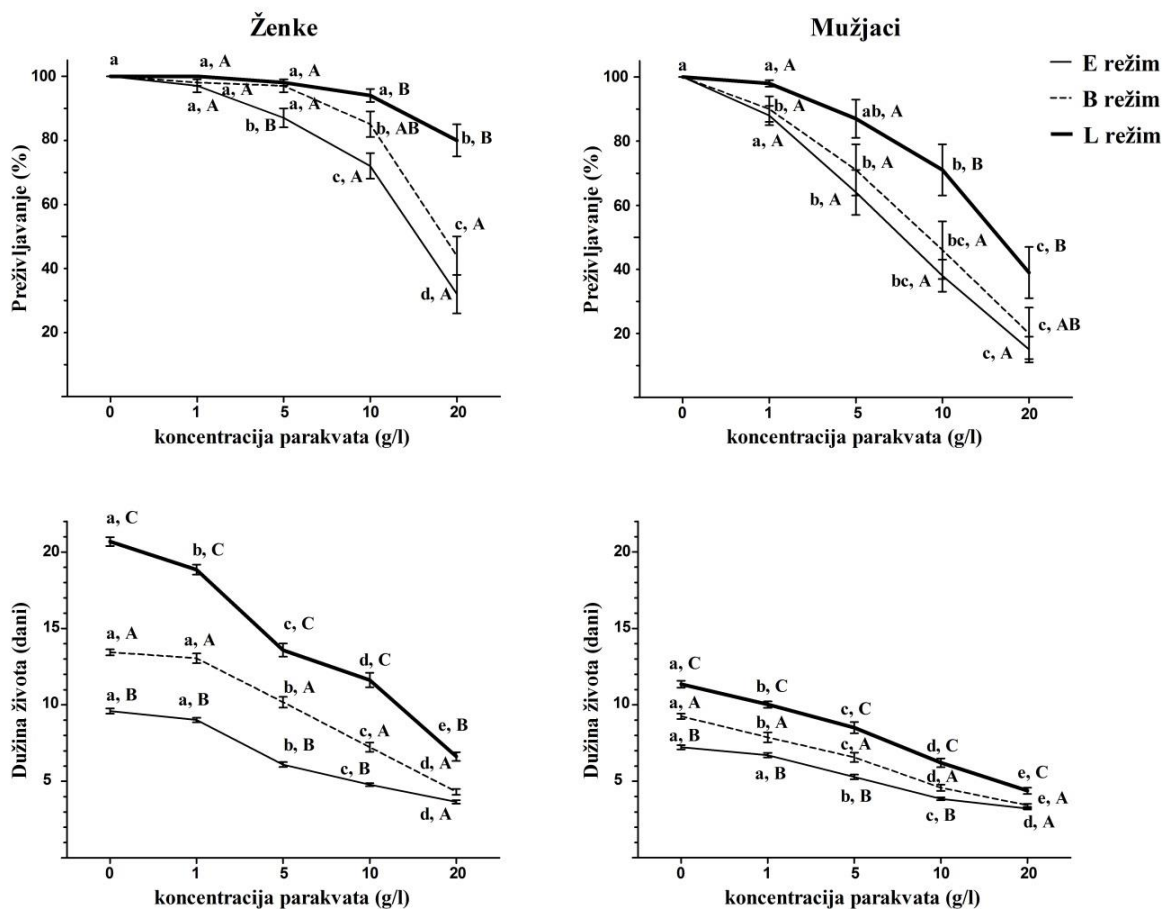
■ Nehibridne populacije □ Dvostruki hibridi



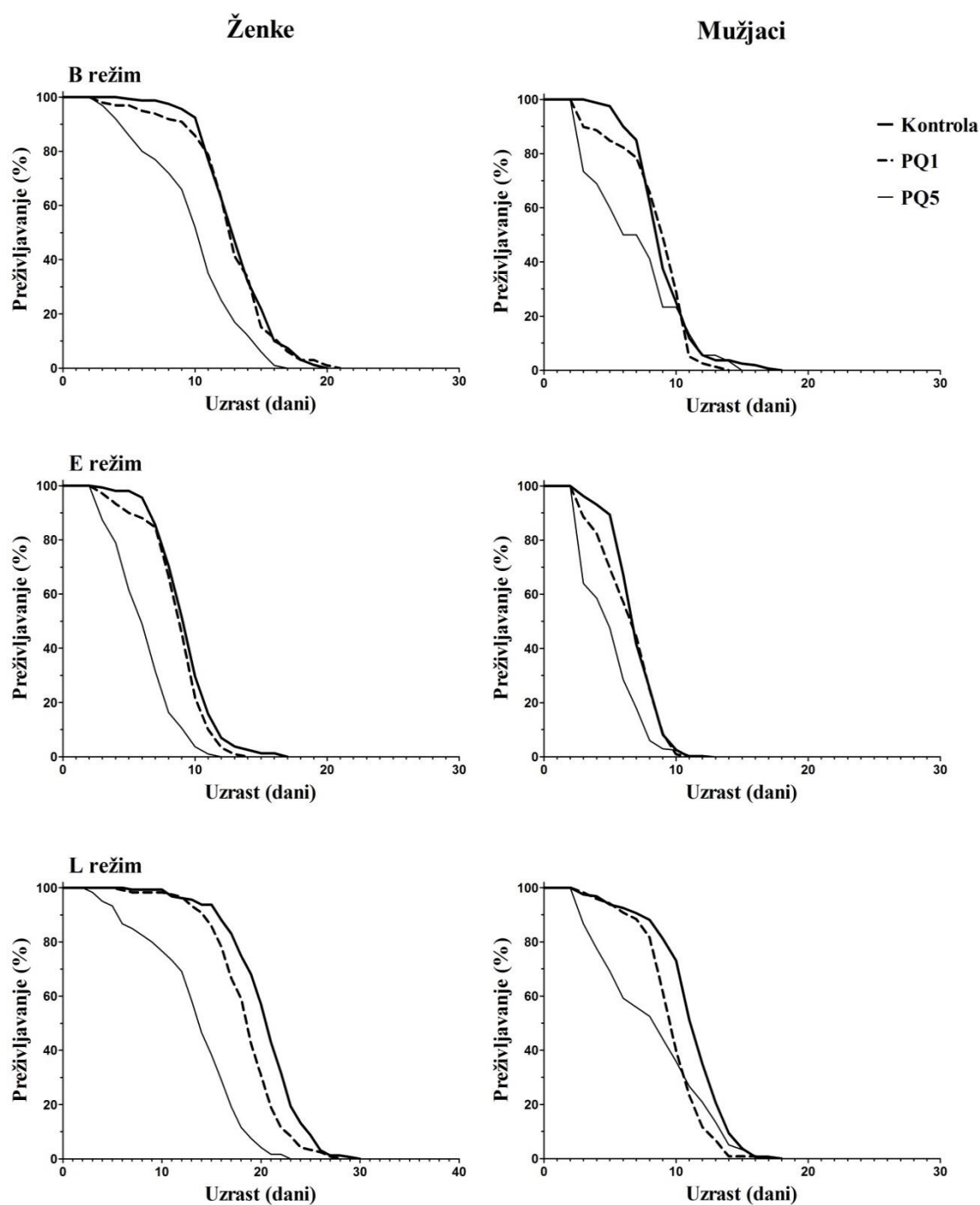
Slika 6. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) fekunditeta u različitim uzrasnim dobima ženki nehibridnih populacija (združene vrednosti četiri populacije) i njihovih dvostrukih hibrida poreklom iz E i L režima



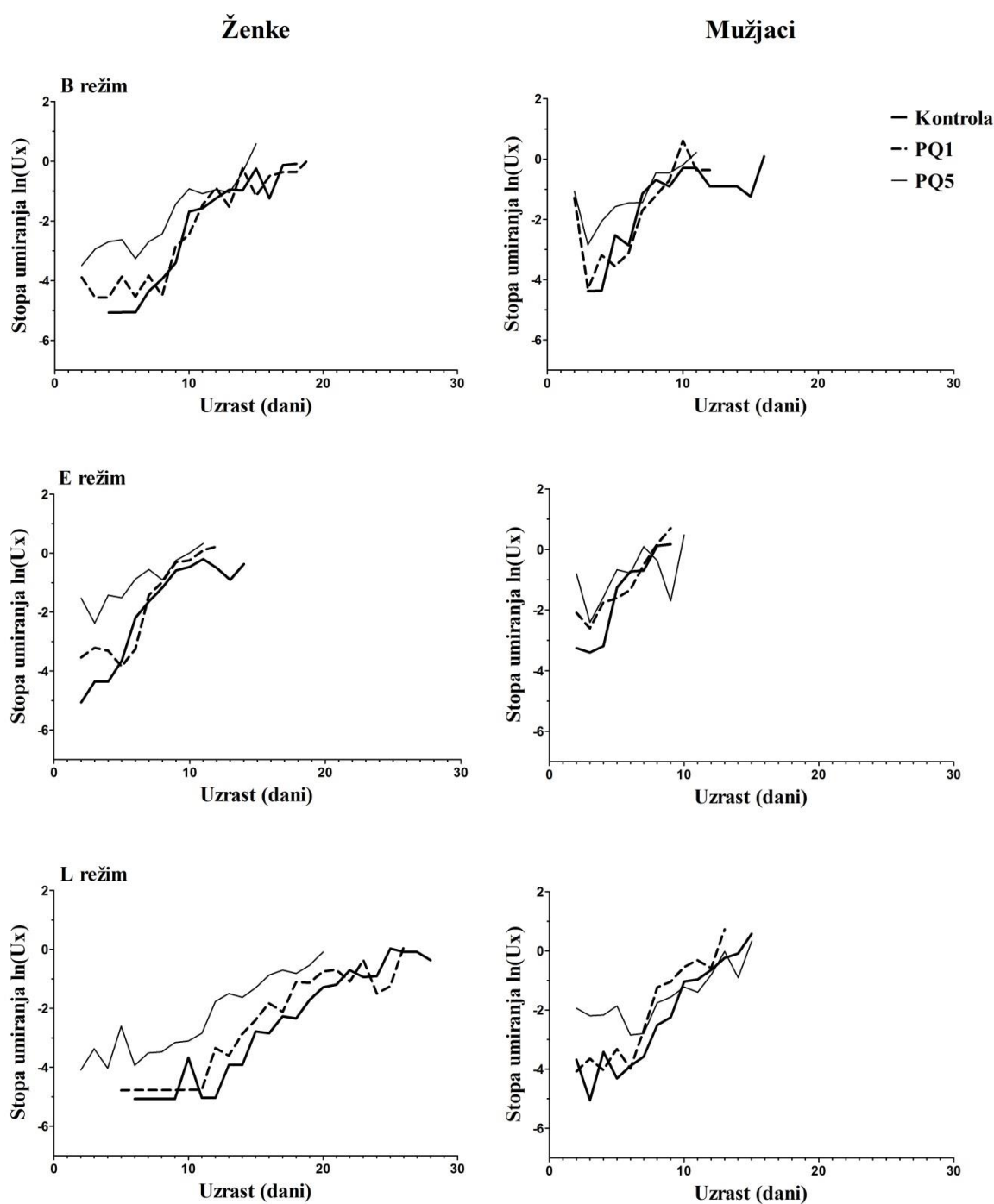
Slika 7. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) osobina virilitet, brzina i trajanje ukrštanja u različitim uzrasnim dobima mužjaka nehibridnih populacija (združene vrednosti četiri populacije) i dvostrukih hibrida poreklom iz E i L režima



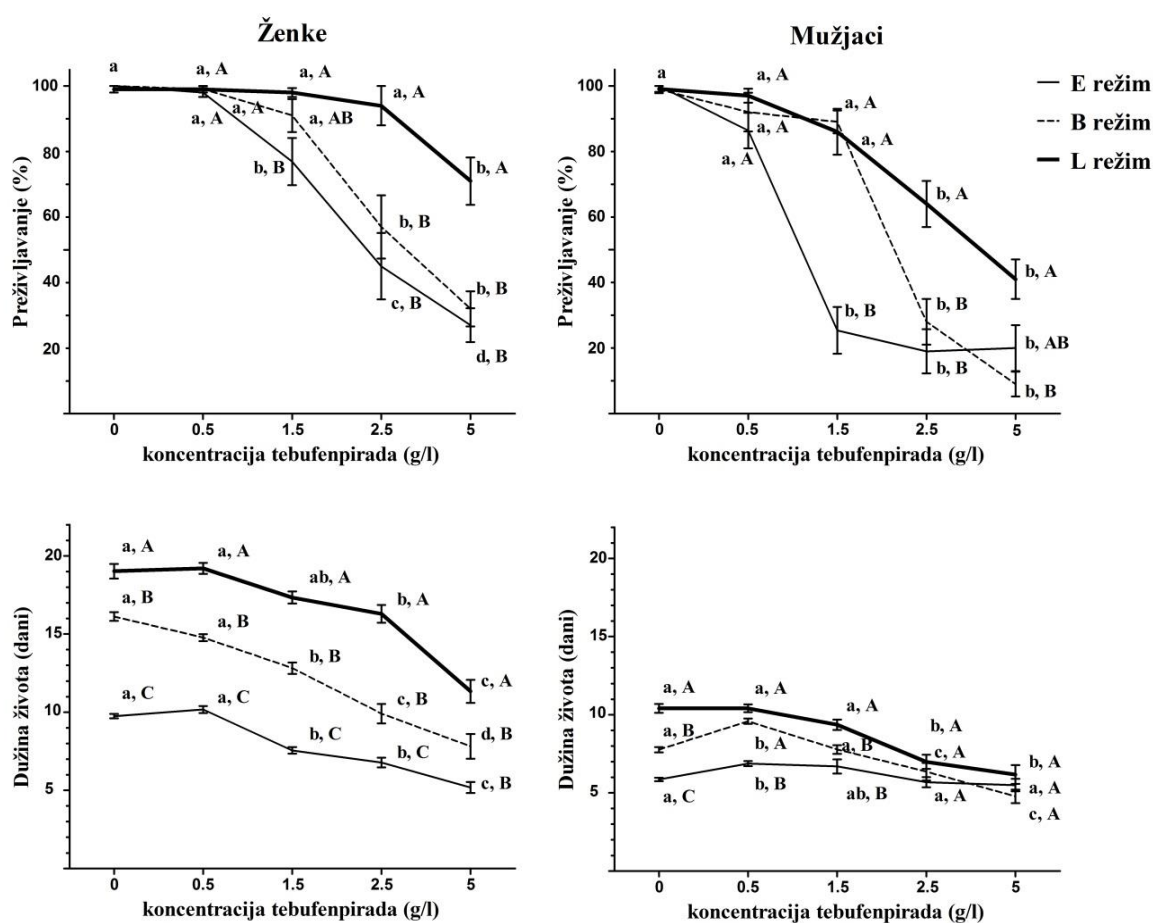
Slika 8. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) osobina preživljavanje i dužina života ženki i mužjaka poreklom iz B, E i L selekcionog režima nakon 24-časovnog tretmana različitim koncentracijama rastvora parakvata. Statistički značajne razlike između tretmana unutar režima obeležene su različitim malim slovima (a, b, c i d) i određene Scheffe testom ($P < 0,05$). Statistički značajne razlike između režima unutar tretmana obeležene su različitim velikim slovima (A, B i C) i određene Scheffe testom ($P < 0,05$).



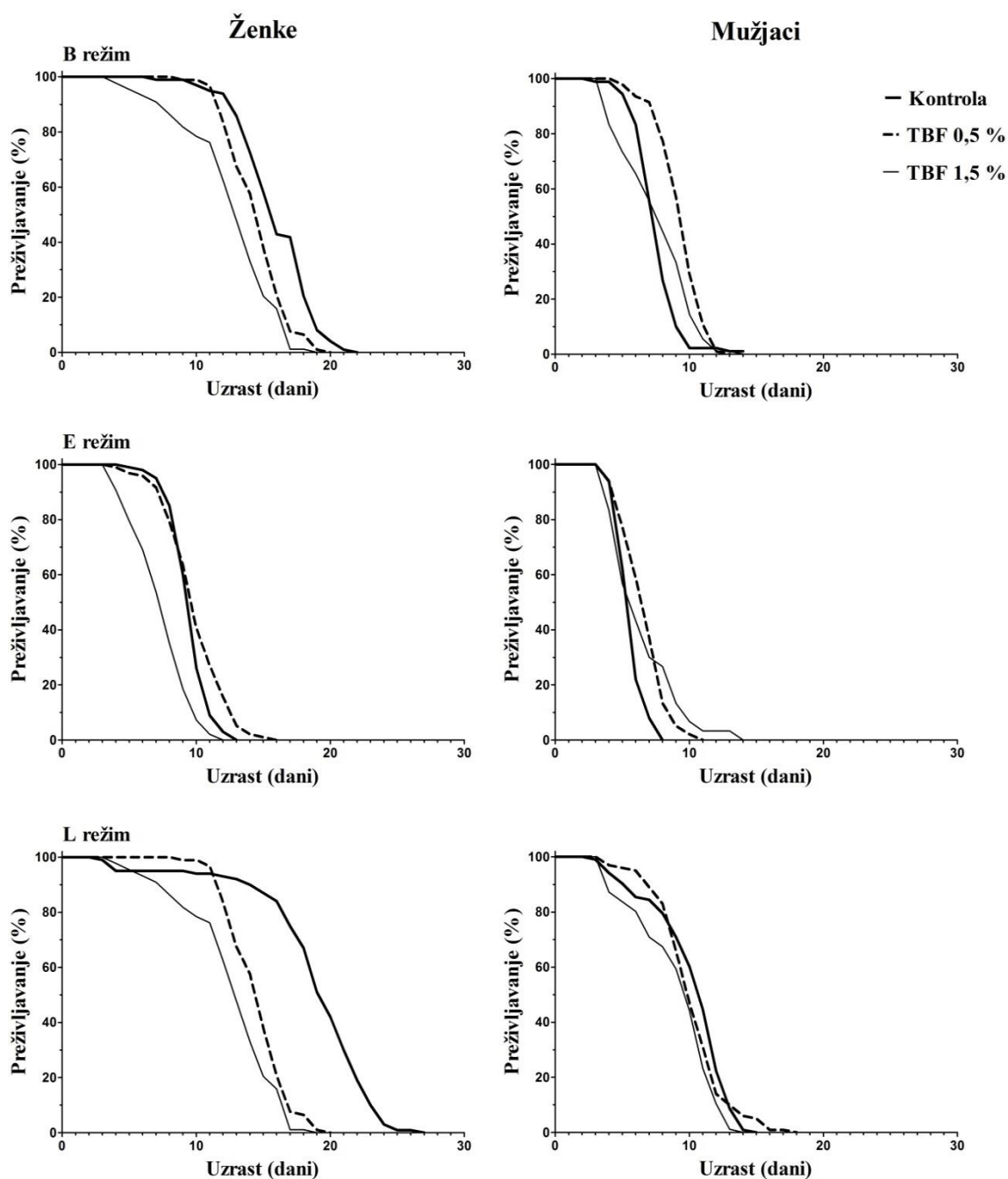
Slika 9. Krive preživljavanja ženki i mužjaka poreklom iz B, E i L selekcionog režima nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i niskim koncentracijama rastvora parakvata (PQ1 = 1 % i PQ5 = 5 %).



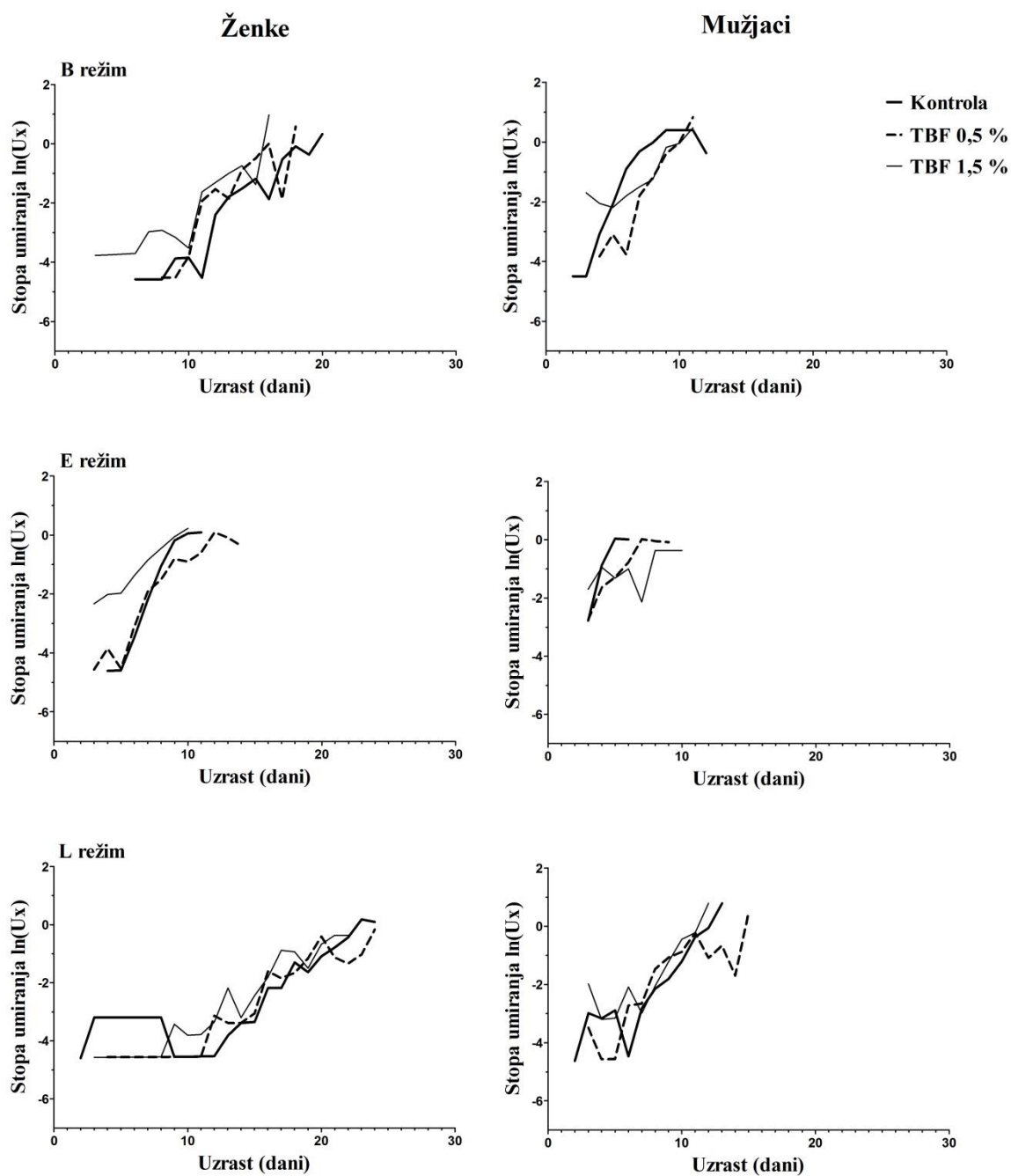
Slika 10. Krive mortaliteta ženki i mužjaka poreklom iz B, E i L selekcionog režima nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i niskim koncentracijama rastvora parakvata (PQ1 = 1 % i PQ5 = 5 %).



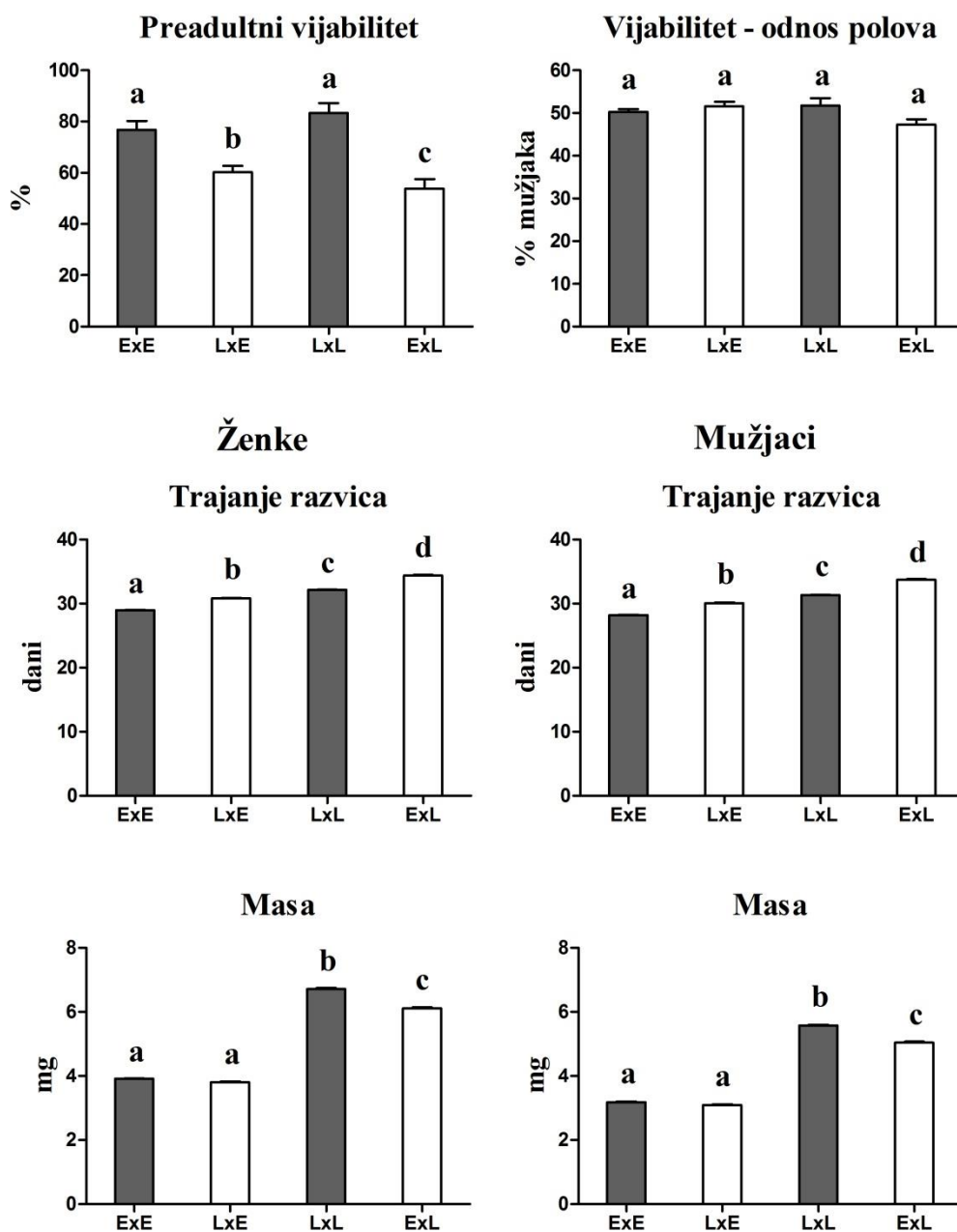
Slika 11. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) osobina preživljavanje i dužina života ženki i mužjaka poreklom iz B režima, E i L dvostrukih hibrida nakon 24-časovnog tretmana različitim koncentracijama rastvora tebufenpirada. Statistički značajne razlike između tretmana unutar režima obeležene su različitim malim slovima (a, b, c i d) i određene Scheffe testom ($P < 0,05$). Statistički značajne razlike između režima unutar tretmana obeležene su različitim velikim slovima (A, B i C) i određene Scheffe testom ($P < 0,05$).



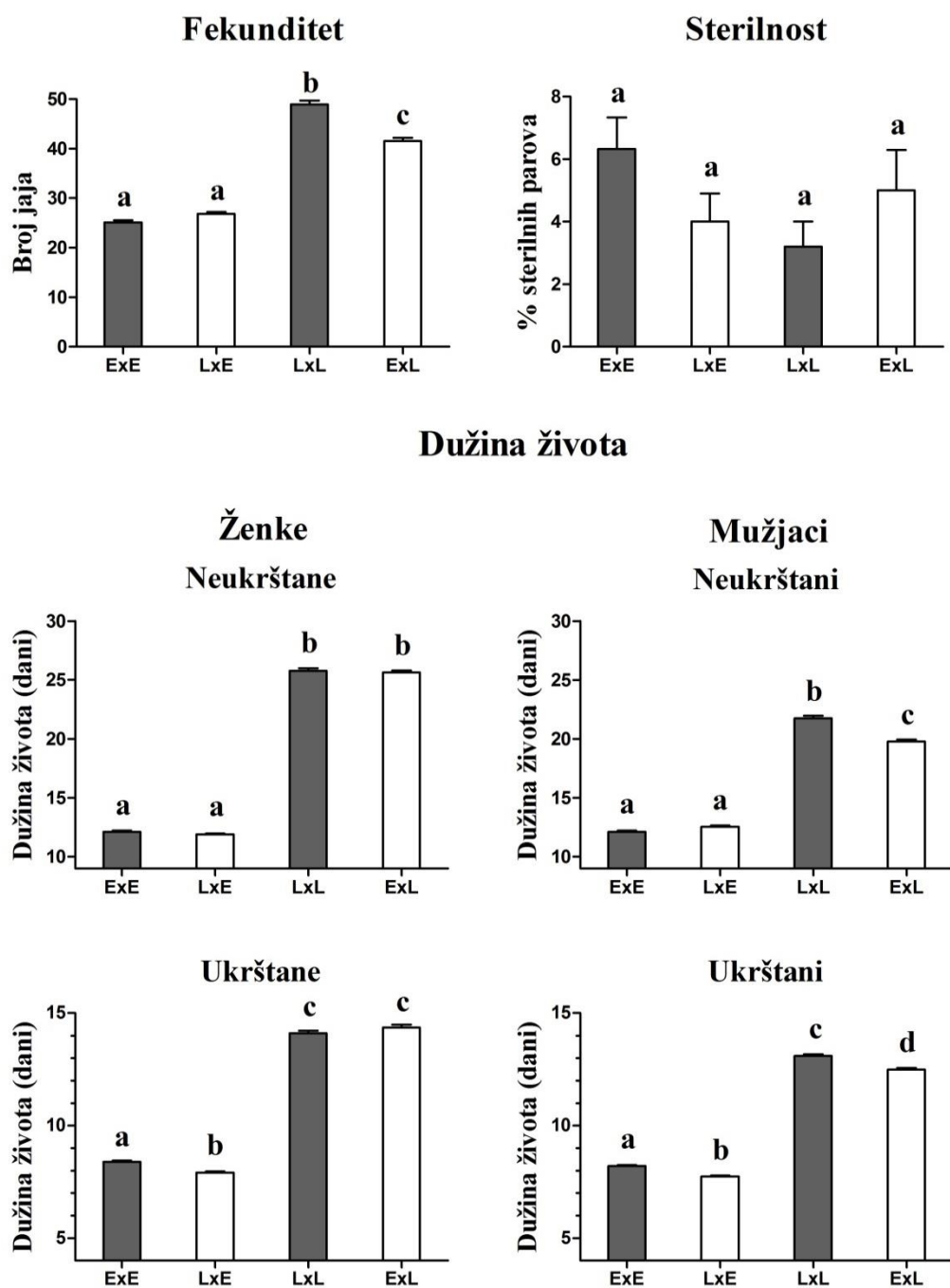
Slika 12. Krive preživljavanja ženki i mužjaka poreklom iz B režima, E i L dvostrukih hibrida nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i niskim koncentracijama rastvora tebufenpirada (0,5 % i 1,5 %).



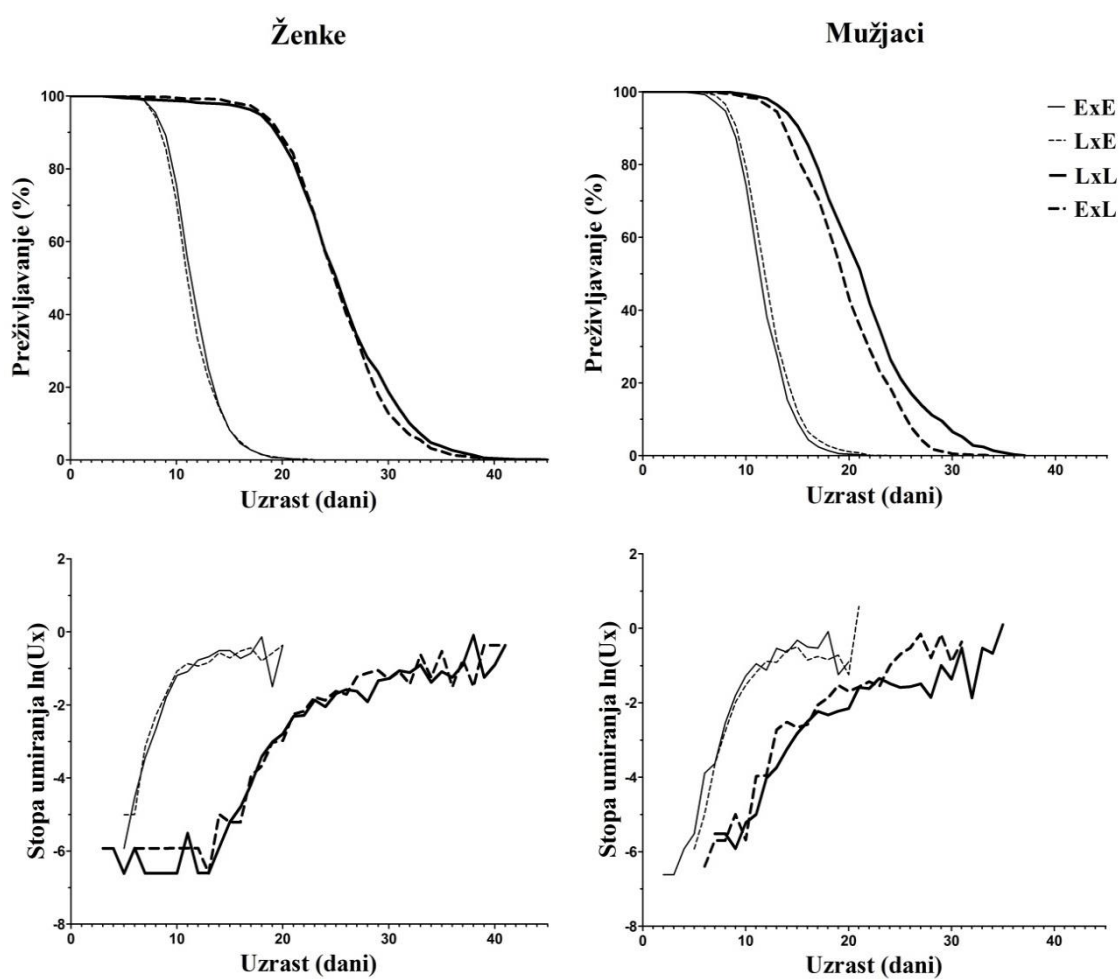
Slika 13. Krive mortaliteta ženki i mužjaka poreklom iz B režima, E i L dvostrukih hibrida nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola) i niskim koncentracijama rastvora tebufenpirada (0,5 % i 1,5 %).



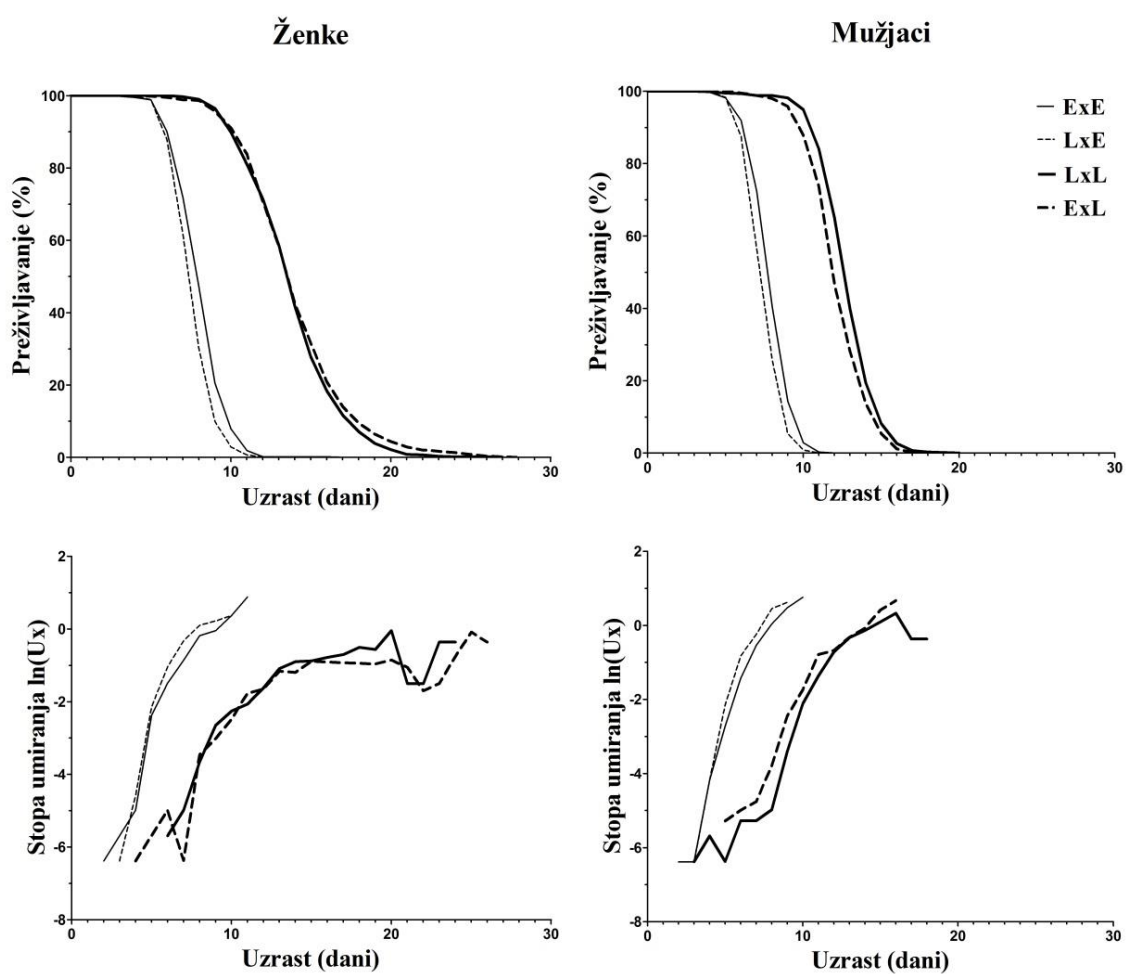
Slika 14. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) preadultnih osobina životne istorije ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama. Statistički značajne razlike između mito-jedarnih linija u vrednostima osobina obeležene su različitim malim slovima (a, b, c i d) i određene Scheffe testom ($P < 0,05$).



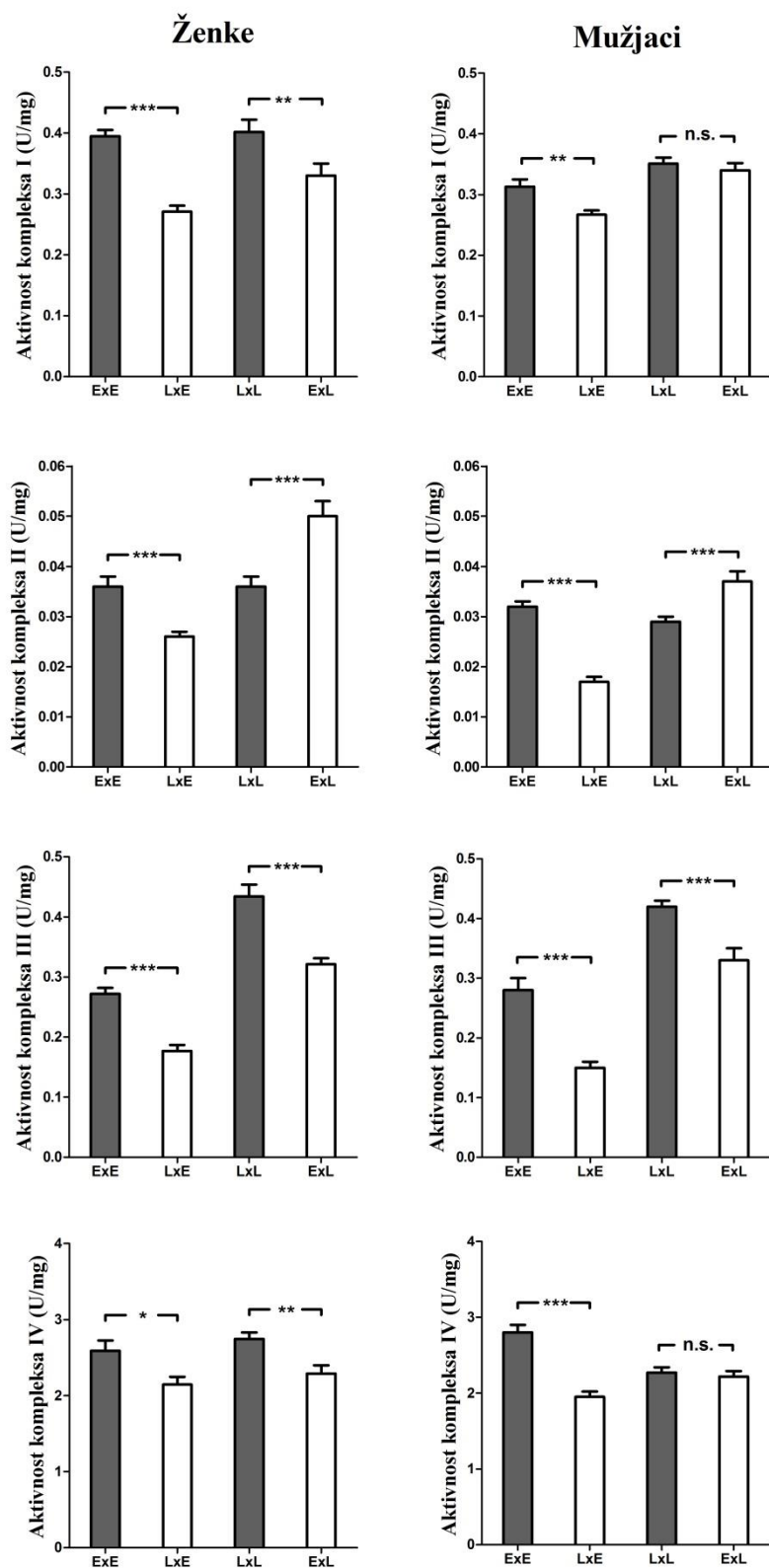
Slika 15. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) adultnih osobina fekunditet, sterilnost ženki i dužina života neukrštanih i ukrštanih ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E \times E i L \times L) i narušenim (L \times E i E \times L) mito-jedarnim interakcijama. Statistički značajne razlike između mito-jedarnih linija u vrednostima osobina obeležene su različitim malim slovima (a, b, c i d) i određene Scheffe testom ($P < 0,05$).



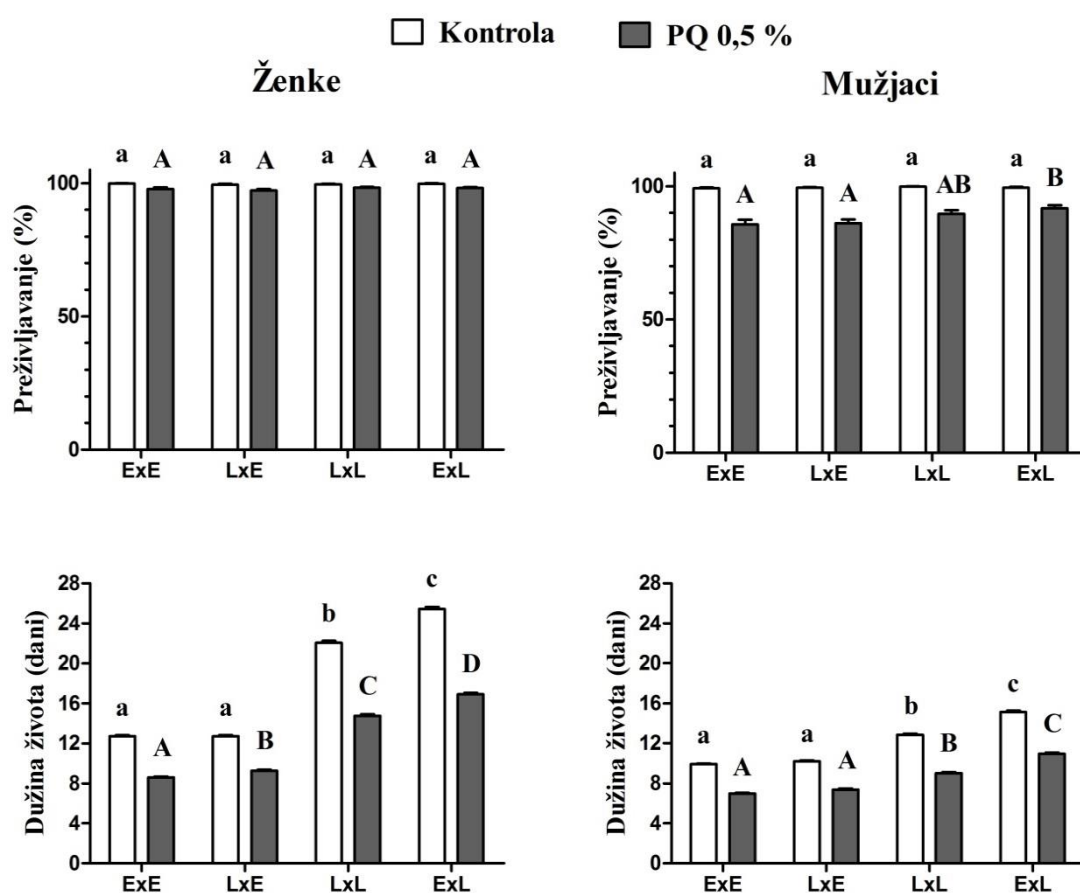
Slika 16. Krive preživljavanja i mortaliteta neukrštanih ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim ($E \times E$ i $L \times L$) i narušenim ($L \times E$ i $E \times L$) mito-jedarnim interakcijama.



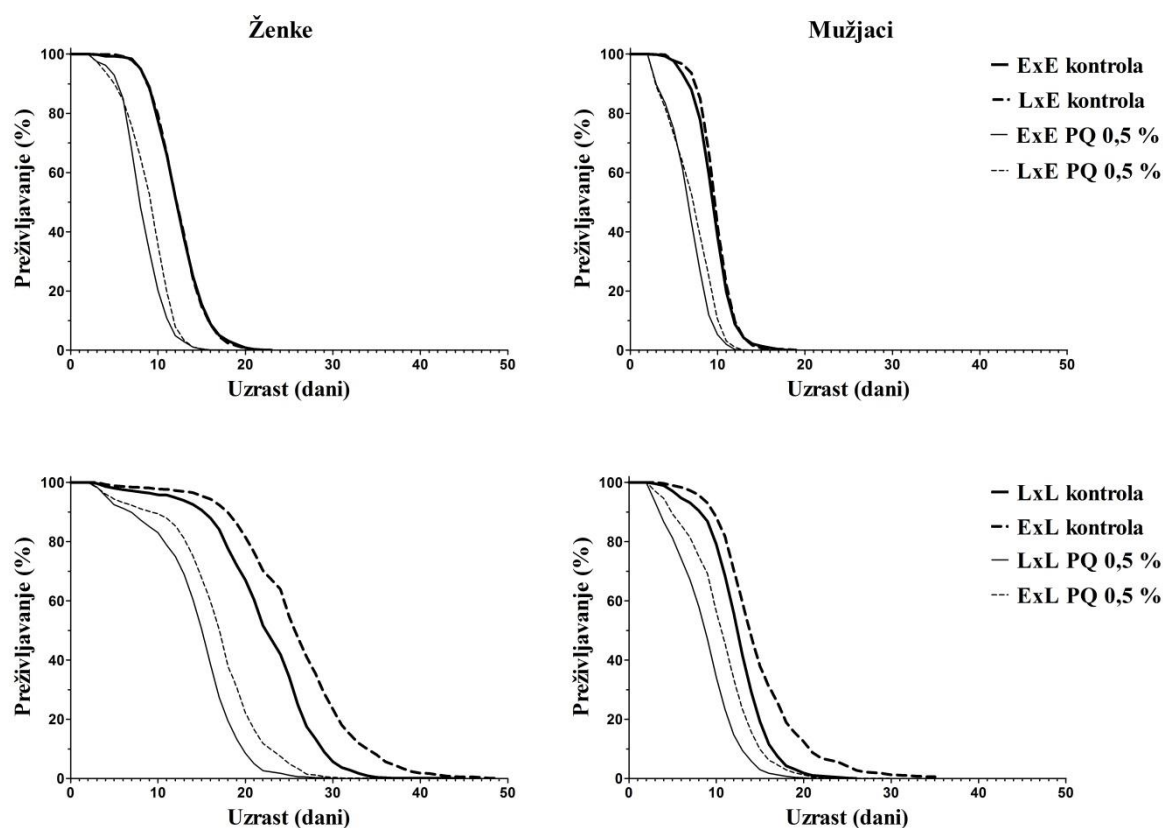
Slika 17. Krive preživljavanja i mortaliteta ukršanih ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim ($E \times E$ i $L \times L$) i narušenim ($L \times E$ i $E \times L$) mito-jedarnim interakcijama.



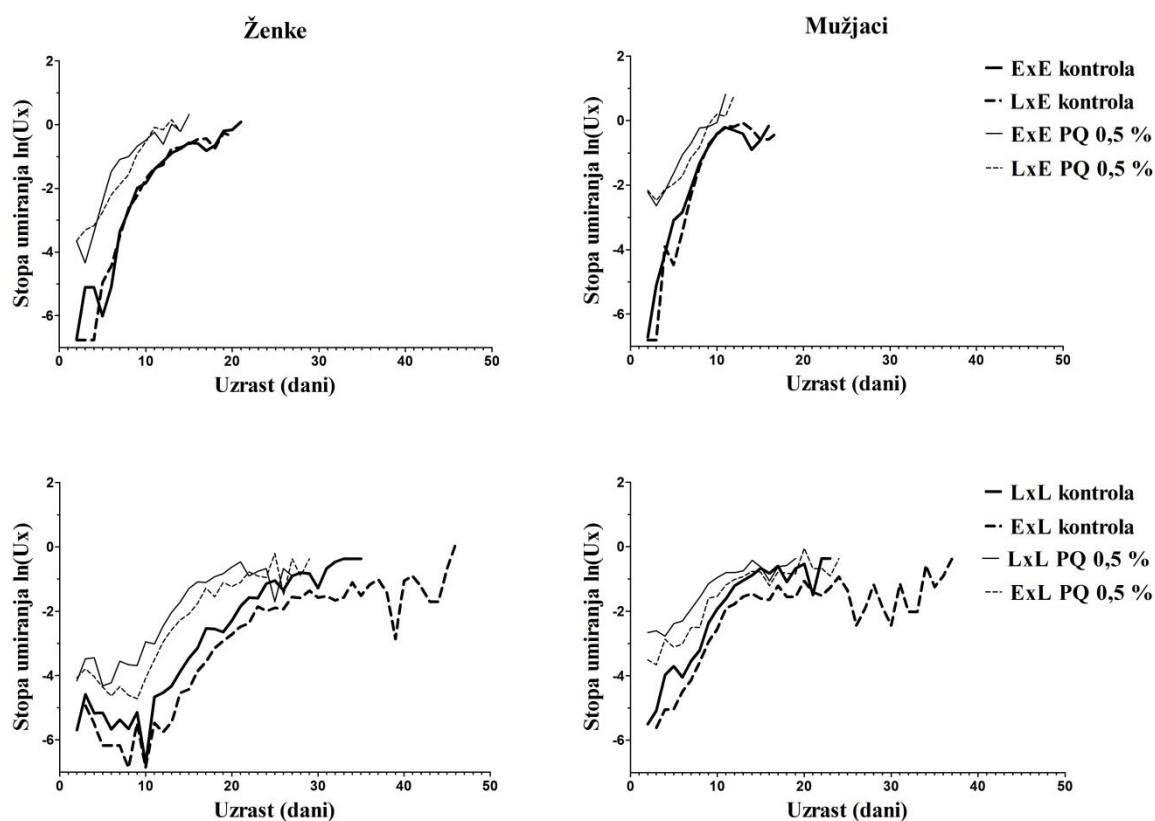
Slika 18. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) aktivnosti kompleksa I, II, III i IV ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E \times E i L \times L) i narušenim (L \times E i E \times L) mito-jedarnim interakcijama. Statistički značajne razlike u aktivnosti enzima mitohondrijskog ETL između odgovarajućih parnih poređenja su određene t-testom i istaknute zvezdicama: n.s. – nema značajne razlike; * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.



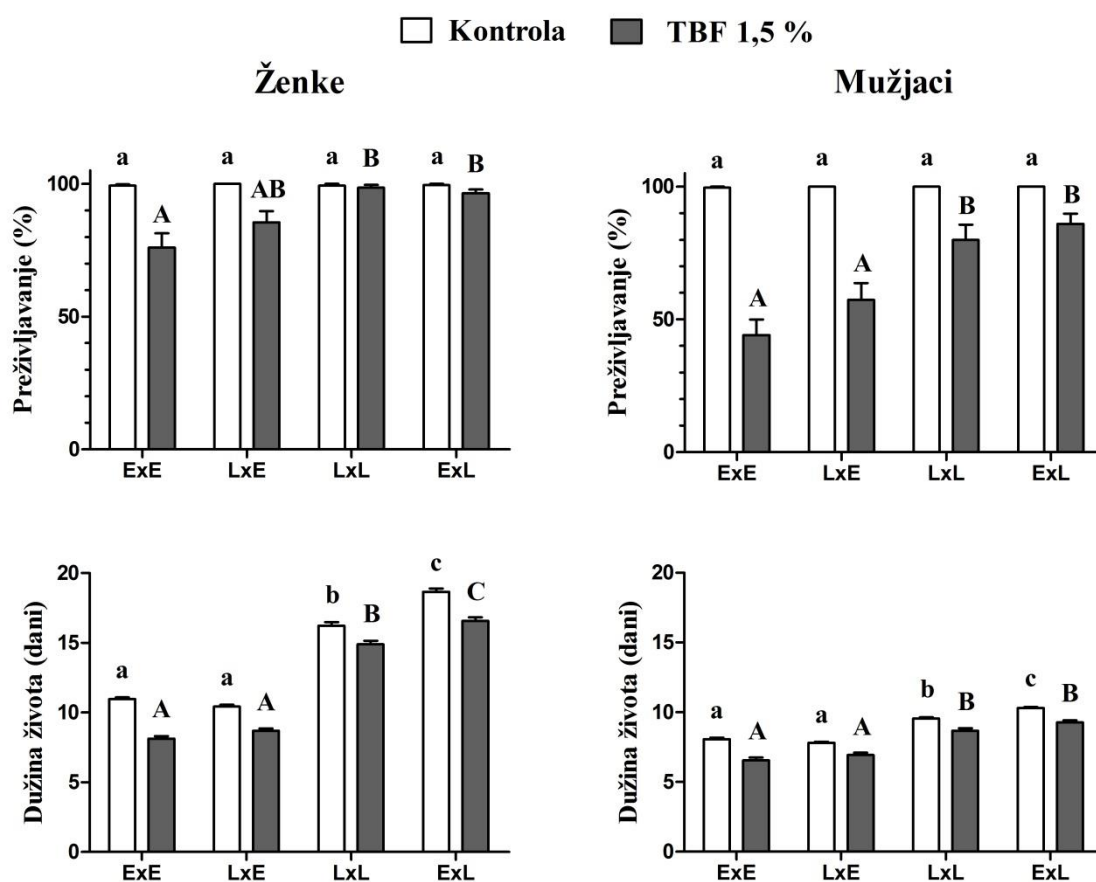
Slika 19. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) preživljavanja i dužine života neukrštanih ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana 0,5 % rastvorom parakvata. Statistički značajne razlike između mito-jedarnih linija određene su Scheffe testom ($P < 0,05$). Kod jedinki tretiranih vodom (kontrola) značajne razlike su obeležene različitim malim slovima (a, b, c i d), a kod jedinki tretiranih parakvatom (0,5 %) obeležene su različitim velikim slovima (A, B, C i D).



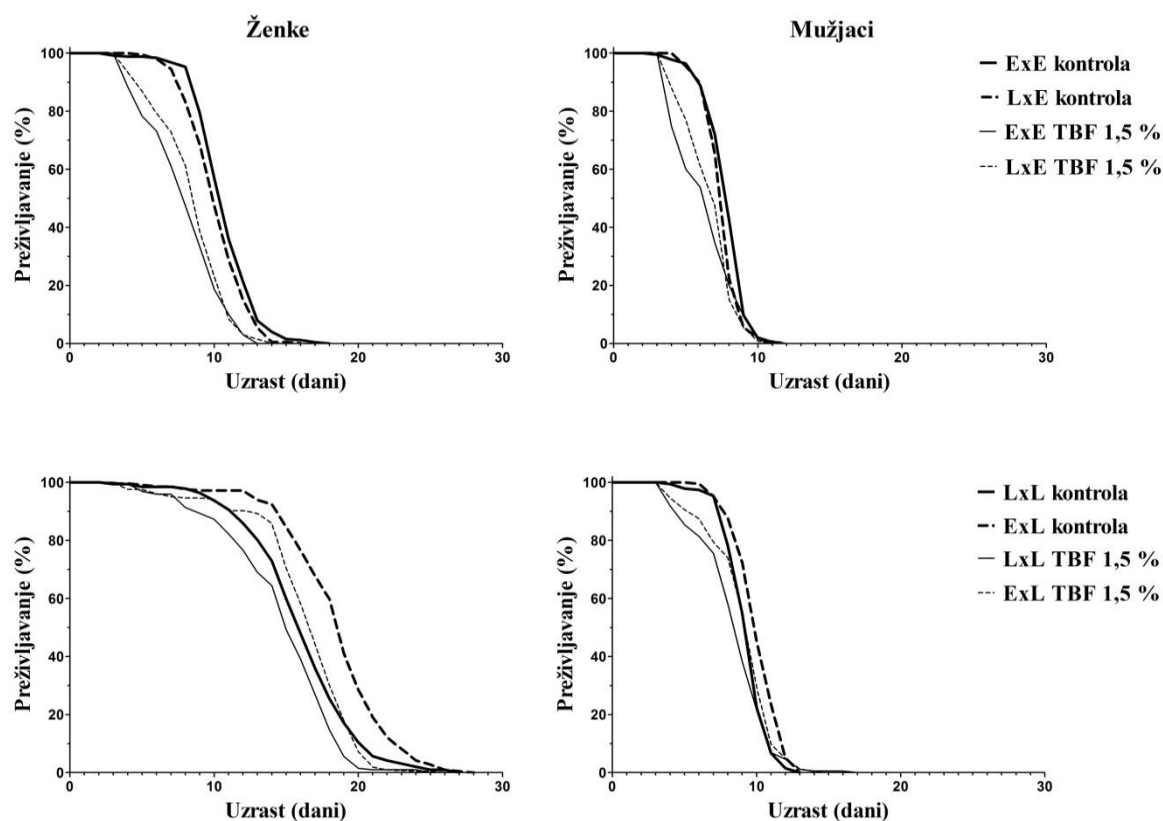
Slika 20. Krive preživljavanja ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L; neisprekidana) i narušenim (L×E i E×L; isprekidana linija) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola; debela linija) i 0,5 % rastvorom parakvata (tanka linija). U gornjem delu slike predstavljene su linije koje sadrže E jedro (E×E i L×E), a u donjem delu slike linije koje poseduju L jedro (L×L i E×L).



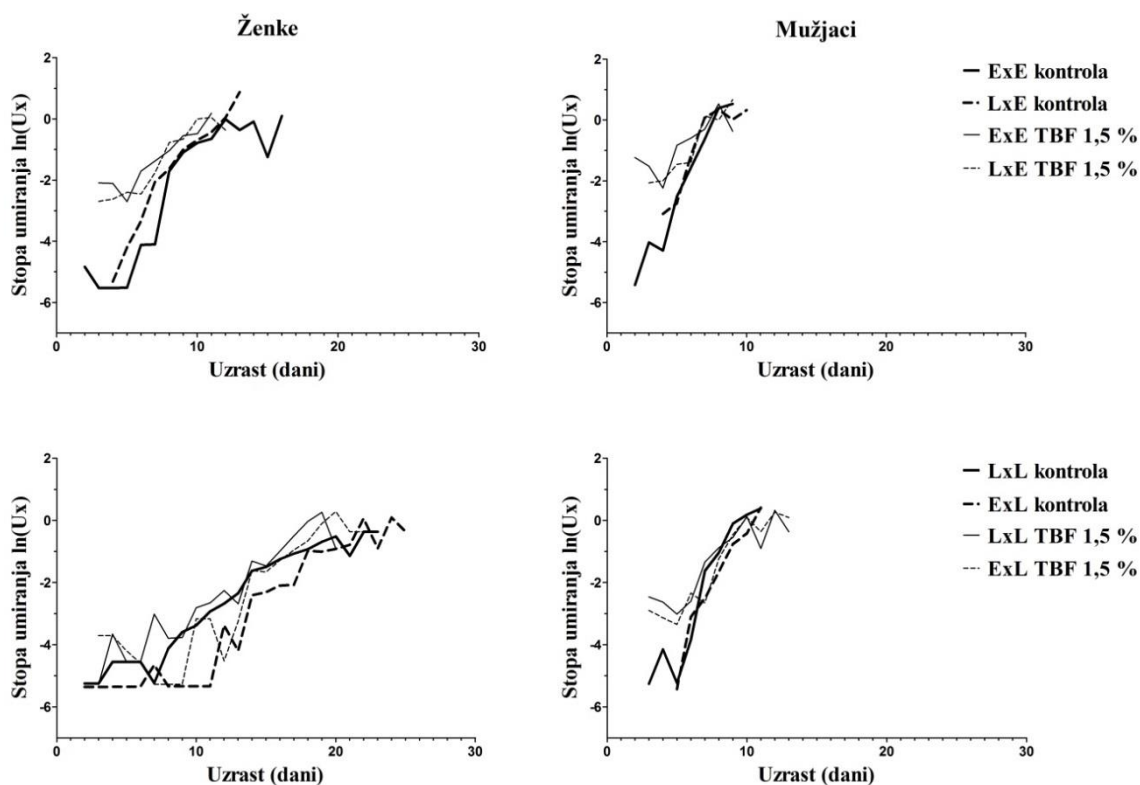
Slika 21. Krive mortaliteta ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L; neisprekidana) i narušenim (L×E i E×L; isprekidana linija) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola; debela linija) i 0,5 % rastvorom parakvata (tanka linija). U gornjem delu slike predstavljene su linije koje sadrže E jedro (E×E i L×E), a u donjem delu slike linije koje poseduju L jedro (L×L i E×L).



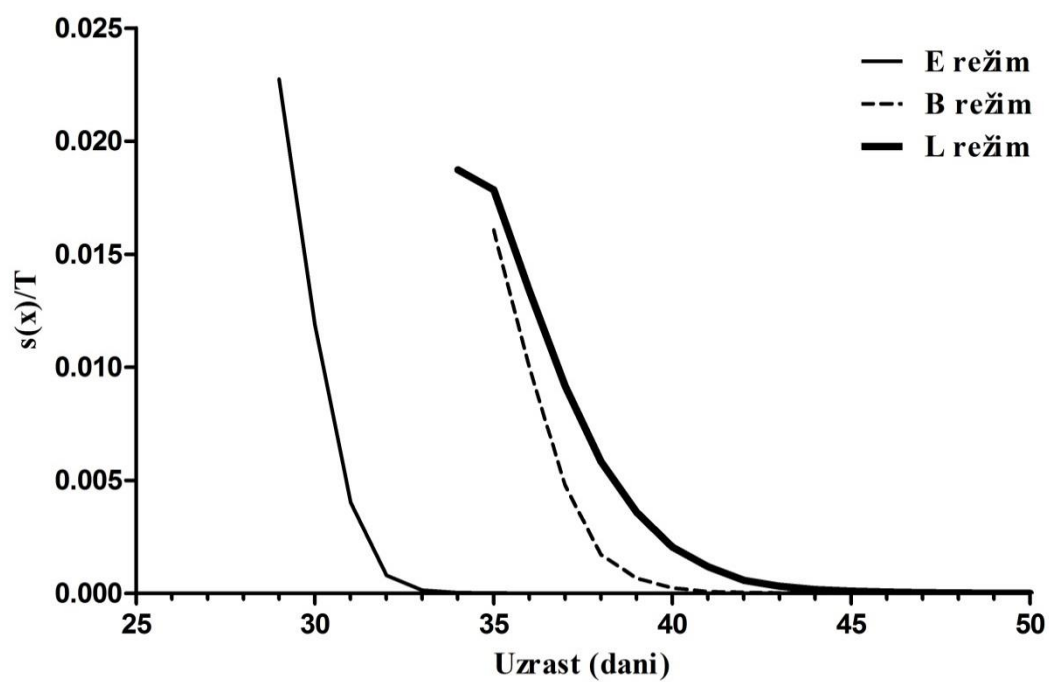
Slika 22. Srednje vrednosti i standardne greške (\pm SE) preživljavanja i dužine života neukrštanih ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L) i narušenim (L×E i E×L) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana 1,5 % rastvorom tebufenpirada. Statistički značajne razlike između mito-jedarnih linija određene su Scheffé testom ($P < 0,05$). Kod jedinki tretiranih vodom (kontrola) značajne razlike su obeležene različitim malim slovima (a, b, c i d), a kod jedinki tretiranih tebufenpiradom (1,5 %) obeležene su različitim velikim slovima (A, B, C i D).



Slika 23. Krive preživljavanja ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim (E×E i L×L; neisprekidana) i narušenim (L×E i E×L; isprekidana linija) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola; debela linija) i 1,5 % rastvorom tebufenpirada (tanka linija). U gornjem delu slike predstavljene su linije koje sadrže E jedro (E×E i L×E), a u donjem delu slike linije sa L jedrom (L×L i E×L).



Slika 24. Krive mortaliteta ženki i mužjaka mito-jedarnih linija sa očuvanim ($E \times E$ i $L \times L$; neisprekidana) i narušenim ($L \times E$ i $E \times L$; isprekidana linija) mito-jedarnim interakcijama nakon 24-časovnog tretmana vodom (kontrola; debela linija) i 1,5 % rastvorom tebufenpirada (tanka linija). U gornjem delu slike predstavljene su linije koje sadrže E jedro ($E \times E$ i $L \times E$), a u donjem delu slike linije sa L jedrom ($L \times L$ i $E \times L$).



Slika 25. Uzrasno-specifične promene intenziteta selekcije od trenutka polaganja jaja do smrti adulta unutar B, E i L režima. Parametar intenziteta selekcije izračunat na osnovu Hamiltonove jednačine (1966).

9. LITERATURA

- Ackermann, M., Schauerte, A., Stearns, S.C. & Jenal, U. 2007. Experimental evolution of aging in a bacterium. *BMC Evol. Biol.* **7**: 126.
- Allen, J.F. 2003. Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comp. Funct. Genomics* **4**: 31–36.
- Alvarez, N., Born, C., Risterucci, A.-M., Sourrouille, P., Benrey, B. & Hossaert-Mckey, M. 2004. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in *Acanthoscelides obtectus* Say (Coleoptera: Bruchidae). *Mol. Ecol. Notes* **4**: 683–685.
- Andersson, J., Borg-Karlson, A.K. & Wiklund, C. 2004. Sexual conflict and anti-aphrodisiac titre in a polyandrous butterfly: male ejaculate tailoring and absence of female control. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **271**: 1765–1770.
- Andziak, B., O'Connor, T.P. & Buffenstein, R. 2005. Antioxidants do not explain the disparate longevity between mice and the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Mech. Ageing Dev.* **126**: 1206–1212.
- Andziak, B., O'Connor, T.P., Qi, W., DeWaal, E.M., Pierce, A., Chaudhuri, A.R., *et al.* 2006. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat. *Aging Cell* **5**: 463–471.
- Anisimov, V.N., Berstein, L.M., Popovich, I.G., Zabezhinski, M.A., Egormin, P.A., Piskunova, T.S., *et al.* 2011. If started early in life, metformin treatment increases life span and postpones tumors in female SHR mice. *Aging (Albany, NY)*. **3**: 148–157.
- Arking, R. 2006. *The Biology of Aging: Observations and Principles*. Oxford University Press, Oxford.
- Arking, R., Buck, S., Berrios, A., Dwyer, S. & Baker, G.T. 1991. Elevated paraquat resistance can be used as a bioassay for longevity in a genetically based long-lived strain of *Drosophila*. *Dev. Genet.* **12**: 362–370.

- Arking, R., Buck, S., Novoseltev, V.N., Hwangbo, D.S. & Lane, M. 2002. Genomic plasticity, energy allocations, and the extended longevity phenotypes of *Drosophila*. *Ageing Res. Rev.* **1**: 209–228.
- Arnqvist, G., Dowling, D.K., Eady, P., Gay, L., Tregenza, T., Tuda, M., *et al.* 2010. Genetic architecture of metabolic rate: Environment specific epistasis between mitochondrial and nuclear genes in an insect. *Evolution* **64**: 3354–3363.
- Arosio, P., Ingrassia, R. & Cavadini, P. 2009. Ferritins: a family of molecules for iron storage, antioxidation and more. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1790**: 589–599.
- Baker, D., Meadows, L., Wang, J., Dow, J. & Russell, S. 2007. Variable sexually dimorphic gene expression in laboratory strains of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* **8**: 454.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. & Finkel, T. 2005. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**: 483–495.
- Ballard, J.W.O. & Melvin, R.G. 2011. Early life benefits and later life costs of a two amino acid deletion in *Drosophila simulans*. *Evolution* **65**: 1400–1412.
- Ballard, J.W.O. & Melvin, R.G. 2010. Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype. *Mol. Ecol.* **19**: 1523–1539.
- Ballard, J.W.O., Melvin, R.G., Katewa, S.D. & Maas, K. 2007. Mitochondrial DNA variation is associated with measurable differences in life-history traits and mitochondrial metabolism in *Drosophila simulans*. *Evolution* **61**: 1735–1747.
- Ballard, J.W.O., Melvin, R.G., Lazarou, M., Clissold, F.J. & Simpson, S.J. 2010. Cost of a naturally occurring two-amino acid deletion in cytochrome c oxidase subunit 7A in *Drosophila simulans*. *Am. Nat.* **176**: E98–E108.
- Ballard, J.W.O. & Pichaud, N. 2014. Mitochondrial DNA: more than an evolutionary bystander. *Funct. Ecol.* **28**: 218–231.

- Barreto, F.S., Pereira, R.J. & Burton, R.S. 2015. Hybrid dysfunction and physiological compensation in gene expression. *Mol. Biol. Evol.* **32**: 613–622.
- Barrientos, A. 2002. In vivo and in organello assessment of OXPHOS activities. *Methods* **26**: 307–316.
- Baruah, A., Chang, H., Hall, M., Yuan, J., Gordon, S., Johnson, E., *et al.* 2014. CEP-1, the *Caenorhabditis elegans* p53 homolog, mediates opposing longevity outcomes in mitochondrial electron transport chain mutants. *PLoS Genet.* **10**: e1004097.
- Bazin, E., Glémin, S. & Galtier, N. 2006. Population size does not influence mitochondrial genetic diversity in animals. *Science* **312**: 570–572.
- Birky, C.W. 1995. Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes: mechanisms and evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**: 11331–11338.
- Boggs, C.L. 2009. Understanding insect life histories and senescence through a resource allocation lens. *Funct. Ecol.* **23**: 27–37.
- Bolnick, D.I., Turelli, M., López-Fernández, H., Wainwright, P.C. & Near, T.J. 2008. Accelerated mitochondrial evolution and “Darwin’s corollary”: asymmetric viability of reciprocal F1 hybrids in centrarchid fishes. *Genetics* **178**: 1037–1048.
- Bonduriansky, R., Maklakov, A., Zajitschek, F. & Brooks, R. 2008. Sexual selection, sexual conflict and the evolution of ageing and life span. *Funct. Ecol.* **22**: 443–453.
- Bonduriansky, R., Wheeler, J. & Rowe, L. 2005. Ejaculate feeding and female fitness in the sexually dimorphic fly *Prochyliza xanthostoma* (Diptera: Piophilidae). *Anim. Behav.* **69**: 489–497.
- Boore, J.L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* **27**: 1767–1780.
- Borash, D.J., Rose, M.R. & Mueller, L.D. 2007. Mutation accumulation affects male virility in *Drosophila* selected for later reproduction. *Physiol. Biochem. Zool.* **80**: 461–472.

- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.
- Brand, M.D. 2010. The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* **45**: 466–472.
- Brandt, U. 2006. Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (complex I). *Annu. Rev. Biochem.* **75**: 69–92.
- Bratic, A. & Larsson, N.-G. 2013. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **123**: 951–957.
- Bratic, I. & Trifunovic, A. 2010. Mitochondrial energy metabolism and ageing. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**: 961–967.
- Brown, J.C.L., McClelland, G.B., Faure, P.A., Klaiman, J.M. & Staples, J.F. 2009. Examining the mechanisms responsible for lower ROS release rates in liver mitochondria from the long-lived house sparrow (*Passer domesticus*) and big brown bat (*Eptesicus fuscus*) compared to the short-lived mouse (*Mus musculus*). *Mech. Ageing Dev.* **130**: 467–476.
- Brunet-Rossinni, A.K. & Austad, S.N. 2004. Ageing studies on bats: a review. *Biogerontology* **5**: 211–222.
- Burton, R.S. 1990. Hybrid breakdown in developmental time in the copepod *Tigriopus californicus*. *Evolution* **44**: 1814–1822.
- Burton, R.S., Pereira, R.J. & Barreto, F.S. 2013. Cytonuclear genomic interactions and hybrid breakdown. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **44**: 281–302.
- Cabreiro, F., Ackerman, D., Doonan, R., Araiz, C., Back, P., Papp, D., *et al.* 2011. Increased life span from overexpression of superoxide dismutase in *Caenorhabditis elegans* is not caused by decreased oxidative damage. *Free Radic. Biol. Med.* **51**: 1575–1582.

- Cadenas, E. & Packer, L. 2010. *Thiol Redox Transitions in Cell Signaling, Part A: Chemistry and Biochemistry of Low Molecular Weight and Protein Thiols*, 1st ed. Elsevier/Academic, Amsterdam; Boston.
- Camus, M.F., Clancy, D.J. & Dowling, D.K. 2012. Mitochondria, maternal inheritance, and male aging. *Curr. Biol.* **22**: 1717–1721.
- Carey, J.R., Liedo, P., Orozco, D. & Vaupel, J.W. 1992. Slowing of mortality rates at older ages in large medfly cohorts. *Science* **258**: 457–461.
- Chapman, T., Arnqvist, G., Bangham, J. & Rowe, L. 2003. Sexual conflict. *Trends Ecol. Evol.* **18**: 41–47.
- Charlesworth, B. 1980. *Evolution in Age-Structured Populations*. Cambridge University Press., Cambridge.
- Charlesworth, B. 1990. Optimization models, quantitative genetics, and mutation. *Evolution* **44**: 520.
- Charlesworth, B. 2001. Patterns of age-specific means and genetic variances of mortality rates predicted by the mutation-accumulation theory of ageing. *J. Theor. Biol.* **210**: 47–65.
- Charlesworth, B. & Hughes, K.A. 1996. Age-specific inbreeding depression and components of genetic variance in relation to the evolution of senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**: 6140–6145.
- Charlesworth, B. & Partridge, L. 1997. Ageing: levelling of the grim reaper. *Curr. Biol.* **7**: R440–R442.
- Chen, H., Zajitschek, F. & Maklakov, A.A. 2013. Why ageing stops: heterogeneity explains late-life mortality deceleration in nematodes. *Biol. Lett.* **9**: 20130217.
- Chevron, Z.A. & Brumfield, R.T. 2012. Genomic insights into adaptation to high-altitude environments. *Heredity (Edinb)*. **108**: 354–361.

- Chippindale, A.K., Hoang, D.T., Service, P.M. & Rose, M.R. 1994. The evolution of development in *Drosophila melanogaster* selected for postponed senescence. *Evolution* **48**: 1880.
- Chou, J.Y. & Leu, J.Y. 2010. Speciation through cytonuclear incompatibility: insights from yeast and implications for higher eukaryotes. *BioEssays* **32**: 401–411.
- Clancy, D.J. 2008. Variation in mitochondrial genotype has substantial lifespan effects which may be modulated by nuclear background. *Aging Cell* **7**: 795–804.
- Clancy, D.J., Gems, D., Harshman, L.G., Oldham, S., Stocker, H., Hafen, E., *et al.* 2001. Extension of life-span by loss of CHICO, a *Drosophila* insulin receptor substrate protein. *Science* **292**: 104–106.
- Connallon, T. & Clark, A.G. 2012. A general population genetic framework for antagonistic selection that accounts for demography and recurrent mutation. *Genetics* **190**: 1477–1489.
- Copeland, J.M., Cho, J., Lo, T., Hur, J.H., Bahadorani, S., Arabyan, T., *et al.* 2009. Extension of *Drosophila* life span by RNAi of the mitochondrial respiratory chain. *Curr. Biol.* **19**: 1591–1598.
- Costantini, D. 2014. *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology. A Marriage Between Mechanistic and Evolutionary Approaches.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Curtis, C., Landis, G.N., Folk, D., Wehr, N.B., Hoe, N., Waskar, M., *et al.* 2007. Transcriptional profiling of MnSOD-mediated lifespan extension in *Drosophila* reveals a species-general network of aging and metabolic genes. *Genome Biol.* **8**: R262.
- Curtsinger, J., Fukui, H., Townsend, D. & Vaupel, J. 1992. Demography of genotypes: failure of the limited life-span paradigm in *Drosophila melanogaster*. *Science* **258**: 461–463.
- Curtsinger, J.W., Fukui, H.H., Khazaeli, A.A., Kirscher, A., Pletcher, S.D., Promislow, D.E., *et al.* 1995. Genetic variation and aging. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 553–575.

- Dancy, B.M., Sedensky, M.M. & Morgan, P.G. 2014. Effects of the mitochondrial respiratory chain on longevity in *C. elegans*. *Exp. Gerontol.* **56**: 245–255.
- Daum, G. 1985. Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Biomembr.* **822**: 1–42.
- Djawdan, M., Rose, M.R. & Bradley, T.J. 1997. Does selection for stress resistance lower metabolic rate? *Ecology* **78**: 828–837.
- Djawdan, M., Sugiyama, T.T., Schlaeger, L.K., Bradley, T.J. & Rose, M.R. 1996. Metabolic aspects of the trade-off between fecundity and longevity in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Zool.* **69**: 1176–1195.
- Doonan, R., McElwee, J.J., Matthijssens, F., Walker, G.A., Houthoofd, K., Back, P., *et al.* 2008. Against the oxidative damage theory of aging: superoxide dismutases protect against oxidative stress but have little or no effect on life span in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* **22**: 3236–3241.
- Dorđević, M., Savković, U., Lazarević, J., Tucić, N. & Stojković, B. 2015. Intergenomic interactions in hybrids between short-lived and long-lived lines of a seed beetle: analyses of life history traits. *Evol. Biol.* **42**: 461–472.
- Dorđević, M., Stojković, B., Savković, U., Immonen, E., Tucić, N., Lazarević, J., *et al.* 2016. Sex-specific mitonuclear epistasis and the evolution of mitochondrial bioenergetics, ageing and life history in seed beetles. *Evolution* doi: 10.1111/evo.13109.
- Dowling, D.K., Abiega, K.C. & Arnqvist, G. 2007. Temperature-specific outcomes of cytoplasmic-nuclear interactions on egg-to-adult development time in seed beetles. *Evolution* **61**: 194–201.
- Dowling, D.K., Friberg, U. & Lindell, J. 2008. Evolutionary implications of non-neutral mitochondrial genetic variation. *Trends Ecol. Evol.* **23**: 546–554.
- Dowling, D.K., Meerupati, T. & Arnqvist, G. 2010. Cytonuclear interactions and the economics of mating in seed beetles. *Am. Nat.* **176**: 131–140.

- Dowling, D.K. & Simmons, L.W. 2009. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **276**: 1737–1745.
- Driver, C., Georgiou, A. & Georgiou, G. 2004. The contribution by mitochondrially induced oxidative damage to aging in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* **5**: 185–192.
- Dubessay, P., Garreau-Balandier, I., Jarrousse, A.-S., Fleuriet, A., Sion, B., Debise, R., *et al.* 2007. Aging impact on biochemical activities and gene expression of *Drosophila melanogaster* mitochondria. *Biochimie* **89**: 988–1001.
- Dudkina, N. V., Kouril, R., Peters, K., Braun, H.-P. & Boekema, E.J. 2010. Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**: 664–670.
- Duttaroy, A., Paul, A., Kundu, M. & Belton, A. 2003. A Sod2 null mutation confers severely reduced adult life span in *Drosophila*. *Genetics* **165**: 2295–2299.
- Ellison, C.K. & Burton, R.S. 2006. Disruption of mitochondrial function in interpopulation hybrids of *Tigriopus californicus*. *Evolution* **60**: 1382–1391.
- Ellison, C.K., Niehuis, O. & Gadau, J. 2008. Hybrid breakdown and mitochondrial dysfunction in hybrids of *Nasonia* parasitoid wasps. *J. Evol. Biol.* **21**: 1844–1851.
- Engström, G., Liljedahl, L.E., Rasmuson, M. & Björklund, T. 1989. Expression of genetic and environmental variation during ageing: 1. Estimation of variance components for number of adult offspring in *Drosophila melanogaster*. *Theor. Appl. Genet.* **77**: 119–122.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491.
- Falconer, D.S. 1992. Early selection experiments. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 1–14.
- Finkel, T. 2012. Signal transduction by mitochondrial oxidants. *J. Biol. Chem.* **287**: 4434–4440.

- Flatt, T. & Schmidt, P.S. 2009. Integrating evolutionary and molecular genetics of aging. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1790**: 951–962.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R. & Vrijenhoek, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **3**: 294–299.
- Fox, C.W., Czesak, M.E. & Wallin, W.G. 2004. Complex genetic architecture of population differences in adult lifespan of a beetle: nonadditive inheritance, gender differences, body size and a large maternal effect. *J. Evol. Biol.* **17**: 1007–1017.
- Fox, C.W., Scheibly, K.L., Wallin, W.G., Hitchcock, L.J., Stillwell, R.C. & Smith, B.P. 2006. The genetic architecture of life span and mortality rates: gender and species differences in inbreeding load of two seed-feeding beetles. *Genetics* **174**: 763–773.
- Fukui, H.H., Xiu, L. & Curtsinger, J.W. 1993. Slowing of age-specific mortality rates in *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* **28**: 585–599.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glemin, S. & Hurst, G. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Mol. Ecol.* **18**: 4541–4550.
- Garland, T. 2003. Selection experiments: An underutilized tool in biomechanics and organismal biology. In: *Vertebrate Biomechanics and Evolution* (J. P. Gasc et al., eds), pp. 23–56. BIOS Scientific, Oxford.
- Garland, T. & Rose, M.R. 2009. *Experimental Evolution*. USA: University of California Press, Berkeley.
- Gavrilov, L.A. & Gavrilova, N.S. 2002. Evolutionary theories of aging and longevity. *Sci. World J.* **2**: 339–356.
- Geiser, D.L. & Winzerling, J.J. 2012. Insect transferrins: multifunctional proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1820**: 437–451.
- Gemmell, N.J., Metcalf, V.J. & Allendorf, F.W. 2004. Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends Ecol. Evol.* **19**: 238–244.

- Gems, D., Sutton, A.J., Sundermeyer, M.L., Albert, P.S., King, K. V, Edgley, M.L., *et al.* 1998. Two pleiotropic classes of daf-2 mutation affect larval arrest, adult behavior, reproduction and longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **150**: 129–155.
- Gillespie, J.H. 1999. The role of population size in molecular evolution. *Theor. Popul. Biol.* **55**: 145–156.
- Goenaga, J., Yamane, T., Ronn, J. & Arnqvist, G. 2015. Within-species divergence in the seminal fluid proteome and its effect on male and female reproduction in a beetle. *BMC Evol Biol* **15**: 266.
- Graves, J.L. 2012. Gene expression in late-life. *Front. Genet.* **3**: 156.
- Graves, J.L., Toolson, E.C., Jeong, C., Vu, L.N. & Rose, M.R. 1992. Desiccation, flight, glycogen, and postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Physiol. Zool.* **65**: 268–286.
- Groeger, G., Quiney, C. & Cotter, T.G. 2009. Hydrogen peroxide as a cell-survival signaling molecule. *Antioxid. Redox Signal.* **11**: 2655–2671.
- Guarente, L. 2008. Mitochondria - a nexus for aging, calorie restriction, and sirtuins? *Cell* **132**: 171–176.
- Gutteridge, J.M.C. & Halliwell, B. 2010. Antioxidants: molecules, medicines, and myths. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **393**: 561–564.
- Haldane, J.B.S. 1941. *New Paths in Genetics*. Allen & Unwin, London.
- Hamanaka, R.B. & Chandel, N.S. 2010. Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem. Sci.* **35**: 505–513.
- Hamilton, W.D. 1966. The moulding of senescence by natural selection. *J. Theor. Biol.* **12**: 12–45.
- Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *J. Gerontol.* **11**: 298–300.

- Harman, D. 1972. The biologic clock: the mitochondria? *J. Am. Geriatr. Soc.* **20**: 145–147.
- Harshman, L.G. & Haberer, B.A. 2000. Oxidative stress resistance: a robust correlated response to selection in extended longevity lines of *Drosophila melanogaster*? *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **55**: B415–B417.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. & DeWaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Biol. Sci.* **270**: 313–321.
- Heinemeyer, J., Braun, H.-P., Boekema, E.J. & Kouril, R. 2007. A structural model of the cytochrome c reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **282**: 12240–12248.
- Hekimi, S., Lapointe, J. & Wen, Y. 2011. Taking a “good” look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* **21**: 569–576.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A. & Werren, J.H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* **281**: 215–220.
- Holland, B. & Rice, W.R. 1999. Experimental removal of sexual selection reverses intersexual antagonistic coevolution and removes a reproductive load. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**: 5083–5088.
- Honda, Y. & Honda, S. 1999. The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* **13**: 1385–1393.
- Houtkooper, R.H., Williams, R.W. & Auwerx, J. 2010. Metabolic networks of longevity. *Cell* **142**: 9–14.
- Hughes, K.A. 1995. The evolutionary genetics of male life-history characters in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **49**: 521–537.
- Hughes, K.A., Alipaz, J.A., Drnevich, J.M. & Reynolds, R.M. 2002. A test of evolutionary theories of aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 14286–14291.

- Hughes, K.A. & Charlesworth, B. 1994. A genetic analysis of senescence in *Drosophila*. *Nature* **367**: 64–66.
- Hurd, T.R., Prime, T.A., Harbour, M.E., Lilley, K.S. & Murphy, M.P. 2007. Detection of reactive oxygen species-sensitive thiol proteins by redox difference gel electrophoresis: Implications for mitochondrial redox signaling. *J. Biol. Chem.* **282**: 22040–22051.
- Innocenti, P. & Morrow, E.H. 2010. The sexually antagonistic genes of *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* **8**: e1000335.
- Innocenti, P., Morrow, E.H. & Dowling, D.K. 2011. Experimental evidence supports a sex-specific selective sieve in mitochondrial genome evolution. *Science* **332**: 845–848.
- Isaksson, C., Sheldon, B.C. & Uller, T. 2011. The challenges of integrating oxidative stress into life-history biology. *Bioscience* **61**: 194–202.
- James, A.C. & Ballard, J.W.O. 2003. Mitochondrial genotype affects fitness in *Drosophila simulans*. *Genetics* **164**: 187–194.
- Janssen, A.J.M., Trijbels, F.J.M., Sengers, R.C.A., Smeitink, J.A.M., Van Den Heuvel, L.P., Wintjes, L.T.M., *et al.* 2007. Spectrophotometric assay for complex I of the respiratory chain in tissue samples and cultured fibroblasts. *Clin. Chem.* **53**: 729–734.
- Jiggins, F.M. 2003. Male-killing *Wolbachia* and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. *Genetics* **164**: 5–12.
- Johnson, T.E. 2006. Recent results: biomarkers of aging. *Exp. Gerontol.* **41**: 1243–1246.
- Jumbo-Lucioni, P., Bu, S., Harbison, S.T., Slaughter, J.C., Mackay, T.F.C., Moellering, D.R., *et al.* 2012. Nuclear genomic control of naturally occurring variation in mitochondrial function in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics* **13**: 659.

- Kamata, H., Honda, S.-I., Maeda, S., Chang, L., Hirata, H. & Karin, M. 2005. Reactive oxygen species promote TNF α -induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. *Cell* **120**: 649–661.
- Kazancıoğlu, E. & Arnqvist, G. 2014. The maintenance of mitochondrial genetic variation by negative frequency-dependent selection. *Ecol. Lett.* **17**: 22–27.
- Keller, L.F., Reid, J.M. & Arcese, P. 2008. Testing evolutionary models of senescence in a natural population: age and inbreeding effects on fitness components in song sparrows. *Proc. Biol. Sci.* **275**: 597–604.
- Khazaeli, A.A. & Curtsinger, J.W. 2010. Life history variation in an artificially selected population of *Drosophila melanogaster*: pleiotropy, superflies, and age-specific adaptation. *Evolution* **64**: 3409–3416.
- Khazaeli, A.A. & Curtsinger, J.W. 2013. Pleiotropy and life history evolution in *Drosophila melanogaster*: uncoupling life span and early fecundity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **68**: 546–553.
- Khazaeli, A.A., Pletcher, S.D. & Curtsinger, J.W. 1998. The fractionation experiment: reducing heterogeneity to investigate age-specific mortality in *Drosophila*. *Mech. Ageing Dev.* **105**: 301–317.
- Kim, B.Y., Lee, K.S., Choo, Y.M., Kim, I., Je, Y.H., Woo, S.D., *et al.* 2008. Insect transferrin functions as an antioxidant protein in a beetle larva. *Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. Mol. Biol.* **150**: 161–169.
- Kirkwood, T.B. & Holliday, R. 1979. The evolution of ageing and longevity. *Proc. R. Soc. London. Ser. B, Biol. Sci.* **205**: 531–546.
- Kirkwood, T.B.L. 2005. Understanding the odd science of aging. *Cell* **120**: 437–447.
- Kirkwood, T.B.L. & Kowald, A. 1997. Network theory of aging. *Exp. Gerontol.* **32**: 395–399.
- Kirkwood, T.B.L. & Melov, S. 2011. On the programmed/non-programmed nature of ageing within the life history. *Curr. Biol.* **21**: R701–R707.

- Kosuda, K. 1985. The aging effect on male mating activity in *Drosophila melanogaster*. *Behav. Genet.* **15**: 297–303.
- Krementsova, A. V., Roshina, N. V., Tsybul'Ko, E.A., Rybina, O.Y., Symonenko, A. V. & Pasyukova, E.G. 2012. Reproducible effects of the mitochondria-targeted plastoquinone derivative SkQ1 on *Drosophila melanogaster* lifespan under different experimental scenarios. *Biogerontology* **13**: 595–607.
- Kuether, K. & Arking, R. 1999. *Drosophila* selected for extended longevity are more sensitive to heat shock. *Age (Omaha)*. **22**: 175–180.
- Kujoth, G.C., Hiona, A., Pugh, T.D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S.E., *et al.* 2005. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**: 481–484.
- Labinsky, N., Csiszar, A., Orosz, Z., Smith, K., Rivera, A., Buffenstein, R., *et al.* 2006. Comparison of endothelial function, O₂- and H₂O₂ production, and vascular oxidative stress resistance between the longest-living rodent, the naked mole rat, and mice. *AJP Hear. Circ. Physiol.* **291**: H2698–H2704.
- Lambert, A.J., Boysen, H.M., Buckingham, J.A., Yang, T., Podlutzky, A., Austad, S.N., *et al.* 2007. Low rates of hydrogen peroxide production by isolated heart mitochondria associate with long maximum lifespan in vertebrate homeotherms. *Aging Cell* **6**: 607–618.
- Lambert, A.J. & Brand, M.D. 2004. Superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) depends on the pH gradient across the mitochondrial inner membrane. *Biochem. J.* **382**: 511–517.
- Landis, G.N., Abdueva, D., Skvortsov, D., Yang, J., Rabin, B.E., Carrick, J., *et al.* 2004. Similar gene expression patterns characterize aging and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**: 7663–7668.
- Lane, N. 2011. Mitonuclear match: optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations. *Bioessays* **33**: 860–869.

- Lane, N. 2006. *Power, Sex, Suicide: Mitochondria and The Meaning of Life*. Oxford University Press, Oxford.
- Lapointe, J. & Hekimi, S. 2008. Early mitochondrial dysfunction in long-lived Mclk1^{+/-} mice. *J. Biol. Chem.* **283**: 26217–26227.
- Lapointe, J., Stepanyan, Z., Bigras, E. & Hekimi, S. 2009. Reversal of the mitochondrial phenotype and slow development of oxidative biomarkers of aging in long-lived Mclk1^{+/-} mice. *J. Biol. Chem.* **284**: 20364–20374.
- Lass, A. & Sohal, R.S. 1999. Comparisons of coenzyme Q bound to mitochondrial membrane proteins among different mammalian species. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 220–226.
- Lazarević, J., Đorđević, M., Stojković, B. & Tucić, N. 2013. Resistance to prooxidant agent paraquat in the short- and long-lived lines of the seed beetle (*Acanthoscelides obtectus*). *Biogerontology* **14**: 141–152.
- Lazarević, J., Tucić, N., Šešlija Jovanović, D., Večeřa, J. & Kodrík, D. 2012. The effects of selection for early and late reproduction on metabolite pools in *Acanthoscelides obtectus* Say. *Insect Sci.* **19**: 303–314.
- Le Bourg, É. 2009. Hormesis, aging and longevity. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1790**: 1030–1039.
- Lee, S.-J., Hwang, A.B. & Kenyon, C. 2010. Inhibition of respiration extends *C. elegans* life span via reactive oxygen species that increase HIF-1 activity. *Curr. Biol.* **20**: 2131–2136.
- Lenaz, G., Fato, R., Formiggini, G. & Genova, M.L. 2007. The role of Coenzyme Q in mitochondrial electron transport. *Mitochondrion* **7**: S8–S33.
- Leroi, A.M., Chippindale, A.K. & Rose, M.R. 1994. Long-term laboratory evolution of a genetic life-history trade-off in *Drosophila melanogaster*. 1. The role of genotype-by-environment Interaction. *Evolution* **48**: 1244–1257.

- Leroi, B. 1981. Feeding, longevity and reproduction of adults of *Acanthoscelides obtectus* Say in laboratory conditions. In: *The Ecology of Bruchids Attacking Legumes (Pulses)* (V. Labeyrie, ed), pp. 101–111. Springer Netherlands, Dordrecht.
- Lesser, K.J., Paiusi, I.C. & Leips, J. 2006. Naturally occurring genetic variation in the age-specific immune response of *Drosophila melanogaster*. *Aging Cell* **5**: 293–295.
- Levin, L., Blumberg, A., Barshad, G. & Mishmar, D. 2014. Mito-nuclear co-evolution: the positive and negative sides of functional ancient mutations. *Front. Genet.* **5**: 448.
- Liu, Z. & Butow, R.A. 2006. Mitochondrial retrograde signaling. *Annu. Rev. Genet.* **40**: 159–185.
- López-Otín, C., Blasco, M. a, Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. 2013. The hallmarks of aging. *Cell* **153**: 1194–217.
- Luckinbill, L.S., Arking, R., Clare, M.J., Cirocco, W.C. & Buck, S.A. 1984. Selection for delayed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **38**: 996–1003.
- Lunt, D.H., Zhang, D.-X., Szymura, J.M. & Hewlitt, O.M. 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Mol. Biol.* **5**: 153–165.
- Luo, C., Long, J. & Liu, J. 2008. An improved spectrophotometric method for a more specific and accurate assay of mitochondrial complex III activity. *Clin. Chim. Acta* **395**: 38–41.
- Lushchak, V.I. 2011. Adaptive response to oxidative stress: bacteria, fungi, plants and animals. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* **153**: 175–190.
- Magwere, T., West, M., Riyahi, K., Murphy, M.P., Smith, R.A.J. & Partridge, L. 2006. The effects of exogenous antioxidants on lifespan and oxidative stress resistance in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **127**: 356–370.

- Maia, A. de H., Luiz, A.J. & Campanhola, C. 2000. Statistical inference on associated fertility life table parameters using jackknife technique: computational aspects. *J. Econ. Entomol.* **93**: 511–518.
- Majerus, T.M.O. & Majerus, M.E.N. 2010. Intergenomic arms races: detection of a nuclear rescue gene of male-killing in a ladybird. *PLoS Pathog.* **6**: 1–7.
- Maklakov, A.A., Bonduriansky, R. & Brooks, R.C. 2009. Sex differences, sexual selection, and ageing: an experimental evolution approach. *Evolution* **63**: 2491–2503.
- Medawar, P. 1952. *An Unsolved Problem of Biology*. H. K. Lewis, London.
- Medawar, P.B. 1946. Old age and natural death. *Mod. Q.* **1**: 30–56.
- Meiklejohn, C.D., Holmbeck, M.A., Siddiq, M.A., Abt, D.N., Rand, D.M. & Montooth, K.L. 2013. An incompatibility between a mitochondrial tRNA and its nuclear-encoded tRNA synthetase compromises development and fitness in *Drosophila*. *PLoS Genet.* **9**: e1003238.
- Melvin, R.G. & Ballard, J.W.O. 2006. Intraspecific variation in survival and mitochondrial oxidative phosphorylation in wild-caught *Drosophila simulans*. *Aging Cell* **5**: 225–233.
- Metcalf, N.B. & Alonso-Alvarez, C. 2010. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Funct. Ecol.* **24**: 984–996.
- Min, K.-J. & Tatar, M. 2006. Restriction of amino acids extends lifespan in *Drosophila melanogaster*. *Mech. Ageing Dev.* **127**: 643–646.
- Minor, R.K., Baur, J.A., Gomes, A.P., Ward, T.M., Csiszar, A., Mercken, E.M., *et al.* 2011. SIRT1720 improves survival and healthspan of obese mice. *Sci. Rep.* **1**: 70.
- Miwa, S., St-Pierre, J., Partridge, L. & Brand, M.D. 2003. Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* **35**: 938–948.

- Miyadera, H., Amino, H., Hiraishi, A., Taka, H., Murayama, K., Miyoshill, H., *et al.* 2001. Altered quinone biosynthesis in the long-lived *clk-1* mutants of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **276**: 7713–7716.
- Mockett, R.J., Orr, W.C., Rahmandar, J.J., Sohal, B.H. & Sohal, R.S. 2001. Antioxidant status and stress resistance in long-and short-lived lines of *Drosophila melanogaster*. *Exp. Gerontol.* **36**: 441–463.
- Mohammadi-Bardbori, A. & Ghazi-Khansari, M. 2008. Alternative electron acceptors: proposed mechanism of paraquat mitochondrial toxicity. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **26**: 1–5.
- Moorad, J.A. & Promislow, D.E.L. 2009. What can genetic variation tell us about the evolution of senescence? *Proc. Biol. Sci.* **276**: 2271–2278.
- Morrow, G., Inaguma, Y., Kato, K. & Tanguay, R.M. 2000. The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein displaying oligomeric organization. *J. Biol. Chem.* **275**: 31204–31210.
- Mráček, T., Drahota, Z. & Houštěk, J. 2013. The function and the role of the mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase in mammalian tissues. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1827**: 401–410.
- Mueller, L.D. 1987. Evolution of accelerated senescence in laboratory populations of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**: 1974–1977.
- Mueller, L.D., Rauser, C.L. & Rose, M.R. 2011. *Does Aging Stop?* Oxford University Press, New York.
- Mueller, L.D. & Rose, M.R. 1996. Evolutionary theory predicts late-life mortality plateaus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 15249–15253.
- Muller, F.L., Lustgarten, M.S., Jang, Y., Richardson, A. & Van Remmen, H. 2007. Trends in oxidative aging theories. *Free Radic. Biol. Med.* **43**: 477–503.
- Murphy, M.P. 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**: 1–13.

- Nagai, J., Lin, C.Y. & Sabour, M.P. 1995. Lines of mice selected for reproductive longevity. *Growth. Dev. Aging* **59**: 79–91.
- Navarro, A. & Boveris, A. 2007. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**: C670–C686.
- Nichol, H., Law, J.H. & Winzerling, J.J. 2002. Iron metabolism in insects. *Annu. Rev. Entomol.* **47**: 535–559.
- O'Hagan, H.M., Wang, W., Sen, S., Destefano Shields, C., Lee, S.S., Zhang, Y.W., *et al.* 2011. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell* **20**: 606–619.
- O'Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M., Karr, T.L. & Robertson, H.M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**: 2699–2702.
- Oliveira, M.R.C., Corrêa, A.S., Souza, G.A. de, Guedes, R.N.C. & Oliveira, L.O. de. 2013. Mesoamerican origin and pre- and post-columbian expansions of the ranges of *Acanthoscelides obtectus* Say, a cosmopolitan insect pest of the common bean. *PLoS One* **8**: e70039.
- Onken, B. & Driscoll, M. 2010. Metformin induces a dietary restriction–like state and the oxidative stress response to extend *C. elegans* healthspan via AMPK, LKB1, and SKN-1. *PLoS One* **5**: e8758.
- Owusu-Ansah, E., Song, W. & Perrimon, N. 2013. Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. *Cell* **155**: 699–712.
- Pamplona, R., Portero-Otín, M., Sanz, A., Ayala, V., Vasileva, E. & Barja, G. 2006. Protein and lipid oxidative damage and complex I content are lower in the brain of budgerigar and canaries than in mice. Relation to aging rate. *Age (Omaha)*. **27**: 267–280.

- Pan, Y., Schroeder, E.A., Ocampo, A., Barrientos, A. & Shadel, G.S. 2011. Regulation of yeast chronological life span by TORC1 via adaptive mitochondrial ROS signaling. *Cell Metab.* **13**: 668–678.
- Paradies, G., Petrosillo, G., Paradies, V. & Ruggiero, F.M. 2010. Oxidative stress, mitochondrial bioenergetics, and cardiolipin in aging. *Free Radic. Biol. Med.* **48**: 1286–1295.
- Partridge, L. & Fowler, K. 1992. Direct and correlated responses to selection on age at reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **46**: 76–91.
- Partridge, L., Prowse, N. & Pignatelli, P. 1999. Another set of responses and correlated responses to selection on age at reproduction in *Drosophila melanogaster*. *Proc. Biol. Sci.* **266**: 255–261.
- Pérez, V.I., Van Remmen, H., Bokov, A., Epstein, C.J., Vijg, J. & Richardson, A. 2009. The overexpression of major antioxidant enzymes does not extend the lifespan of mice. *Aging Cell* **8**: 73–75.
- Perez-Campo, R., López-Torres, M., Cadenas, S., Rojas, C. & Barja, G. 1998. The rate of free radical production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. *J. Comp. Physiol. B.* **168**: 149–158.
- Pfleger, J., He, M. & Abdellatif, M. 2015. Mitochondrial complex II is a source of the reserve respiratory capacity that is regulated by metabolic sensors and promotes cell survival. *Cell Death Dis.* **6**: 1–14.
- Pham, D.Q.D. & Winzerling, J.J. 2010. Insect ferritins: typical or atypical? *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1800**: 824–833.
- Pichaud, N., Ballard, J.W.O., Tanguay, R.M. & Blier, P.U. 2012. Naturally occurring mitochondrial dna haplotypes exhibit metabolic differences: insight into functional properties of mitochondria. *Evolution* **66**: 3189–3197.
- Pletcher, S. & Curtsinger, J. 1998. Mortality plateaus and the evolution of senescence: why are old-age mortality rates so low? *Evolution* **52**: 454–464.

- Pletcher, S.D. 1999. *WinModest, version 1.0. 2*. Max Planck Institute for Demographic Research, Rostock.
- Pletcher, S.D., Khazaeli, A.A. & Curtsinger, J.W. 2000. Why do life spans differ? Partitioning mean longevity differences in terms of age-specific mortality parameters. *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **55**: B381–B389.
- Prasad, N.G. & Joshi, A. 2003. What have two decades of laboratory life-history evolution studies on *Drosophila melanogaster* taught us? *J. Genet.* **82**: 45–76.
- Promislow, D. 2003. Mate choice, sexual conflict, and evolution of senescence. *Behav. Genet.* **33**: 191–201.
- Promislow, D., Tatar, M., Khazaeli, A.A. & Curtsinger, J.W. 1996. Age-specific patterns of genetic variance in *Drosophila melanogaster*. I. Mortality. *Genetics* **143**: 839–848.
- Pujol, C., Bratic-Hench, I., Sumakovic, M., Hench, J., Mourier, A., Baumann, L., *et al.* 2013. Succinate dehydrogenase upregulation destabilize complex I and limits the lifespan of gas-1 mutant. *PLoS One* **8**: e59493.
- Quirós, P.M., Mottis, A. & Auwerx, J. 2016. Mitonuclear communication in homeostasis and stress. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **17**: 213–226.
- Rand, D.M., Clark, A.G. & Kann, L.M. 2001. Sexually antagonistic cytonuclear fitness interactions in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **159**: 173–187.
- Rand, D.M., Fry, A. & Sheldahl, L. 2006. Nuclear-mitochondrial epistasis and *Drosophila* aging: introgression of *Drosophila simulans* mtDNA modifies longevity in *D. melanogaster* nuclear backgrounds. *Genetics* **172**: 329–341.
- Rand, D.M., Haney, R. a. & Fry, A.J. 2004. Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends Ecol. Evol.* **19**: 645–653.
- Rawson, P.D. & Burton, R.S. 2002. Functional coadaptation between cytochrome c and cytochrome c oxidase within allopatric populations of a marine copepod. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 12955–12958.

- Reed, D.H. & Bryant, E.H. 2000. The evolution of senescence under curtailed life span in laboratory populations of *Musca domestica* (the housefly). *Heredity (Edinb)*. **85**: 115–121.
- Rees, D.J., Emerson, B.C., Oromí, P. & Hewitt, G.M. 2001. Mitochondrial DNA, ecology and morphology: interpreting the phylogeography of the Nesotes (Coleoptera: Tenebrionidae) of Gran Canaria (Canary Islands). *Mol. Ecol.* **10**: 427–434.
- Reynolds, R.M., Temiyasathit, S., Reedy, M.M., Ruedi, E.A., Drnevich, J.M., Leips, J., *et al.* 2007. Age specificity of inbreeding load in *Drosophila melanogaster* and implications for the evolution of late-life mortality plateaus. *Genetics* **177**: 587–595.
- Reznick, D.A., Bryga, H. & Endler, J.A. 1990. Experimentally induced life-history evolution in a natural population. *Nature* **346**: 357–359.
- Reznick, D., Bryant, M. & Holmes, D. 2006. The evolution of senescence and post-reproductive lifespan in guppies (*Poecilia reticulata*). *PLoS Biol.* **4**: e7.
- Robins, C. & Conneely, K.N. 2014. Testing evolutionary models of senescence: traditional approaches and future directions. *Hum. Genet.* **133**: 1451–1465.
- Rogina, B., Reenan, R.A., Nilsen, S.P. & Helfand, S.L. 2000. Extended life-span conferred by cotransporter gene mutations in *Drosophila*. *Science* **290**: 2137–2140.
- Rose, M.R. 1984. Laboratory experiment of postponed senescence in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **38**: 1004–1010.
- Rose, M.R. & Charlesworth, B. 1981. Genetics of life history in *Drosophila melanogaster*. I. Sib analysis of adult females. *Genetics* **97**: 173–186.
- Rose, M.R., Drapeau, M.D., Yazdi, P.G., Shah, K.H., Moise, D.B., Thakar, R.R., *et al.* 2002. Evolution of late-life mortality in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **56**: 1982–1991.

- Rose, M.R., Rauser, C.L., Benford, G., Matos, M. & Mueller, L.D. 2007. Hamilton's forces of natural selection after forty years. *Evolution* **61**: 1265–1276.
- Ross, R.. 2000. Age-specific decrease in aerobic efficiency associated with increase in oxygen free radical production in *Drosophila melanogaster*. *J. Insect Physiol.* **46**: 1477–1480.
- Rottenberg, H. 2007a. Coevolution of exceptional longevity, exceptionally high metabolic rates, and mitochondrial DNA-coded proteins in mammals. *Exp. Gerontol.* **42**: 364–373.
- Rottenberg, H. 2007b. Exceptional longevity in songbirds is associated with high rates of evolution of cytochrome b, suggesting selection for reduced generation of free radicals. *J. Exp. Biol.* **210**: 2170–2180.
- Rozek, M., Holecová, M. & Lachowska, D. 1999. Karyological notes on *Acanthoscelides obtectus* (Say 1859) (Coleoptera, Bruchidae). *Cytologia (Tokyo)*. **64**: 367–369.
- Ryan, M.T. & Hoogenraad, N.J. 2007. Mitochondrial-nuclear communications. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 701–722.
- Sackton, T.B., Haney, R.A. & Rand, D.M. 2003. Cytonuclear coadaptation in *Drosophila*: disruption of cytochrome c oxidase activity in backcross genotypes. *Evolution* **57**: 2315–2325.
- Sanz, A. 2016. Mitochondrial reactive oxygen species: do they extend or shorten animal lifespan? *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1857**: 1116–1126.
- Sarup, P. & Loeschcke, V. 2011. Life extension and the position of the hormetic zone depends on sex and genetic background in *Drosophila melanogaster*. *Biogerontology* **12**: 109–117.
- SAS Institute. 2010. The SAS System for Windows. SAS Institute, Cary, NC, USA.
- Scheffler, I.E. 2008. *Mitochondria*, Second. John Wiley & Sons, Hoboken.

- Schnable, P. S. & Wise, R.P. 1998. The molecular basis of cytoplasmic male sterility. *Trends Plant Sci.* **3**: 175–180.
- Seehuus, S.-C., Norberg, K., Gimsa, U., Krekling, T. & Amdam, G. V. 2006. Reproductive protein protects functionally sterile honey bee workers from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 962–967.
- Semenza, G.L. 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**: 399–408.
- Sena, L.A. & Chandel, N.S. 2012. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol. Cell* **48**: 158–167.
- Service, P.M., Michieli, C.A. & McGill, K. 1998. Experimental evolution of senescence: an analysis using a “heterogeneity” mortality model. *Evolution* **52**: 1844.
- Šešlija, D. 2005. *Analiza efekata selekcije na adaptivnu vrednost kod pasuljevog žiška (Acanthoscelides obtectus)*. doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Beograd.
- Šešlija, D., Blagojević, D., Spasić, M. & Tucić, N. 1999. Activity of superoxide dismutase and catalase in the bean weevil (*Acanthoscelides obtectus*) selected for postponed senescence. *Exp. Gerontol.* **34**: 185–195.
- Šešlija, D., Lazarević, J., Janković, B. & Tucić, N. 2009. Mating behavior in the seed beetle *Acanthoscelides obtectus* selected for early and late reproduction. *Behav. Ecol.* **20**: 547–552.
- Šešlija, D., Marečko, I. & Tucić, N. 2008. Sexual selection and senescence: do seed beetle males (*Acanthoscelides obtectus*, Bruchidae, Coleoptera) shape the longevity of their mates? *J. Zool. Syst. Evol. Res.* **46**: 323–330.
- Šešlija Jovanović, D., Đorđević, M., Savković, U. & Lazarević, J. 2014. The effect of mitochondrial complex I inhibitor on longevity of short-lived and long-lived seed beetles and its mitonuclear hybrids. *Biogerontology* **15**: 487–501.

- Shahrestani, P., Mueller, L.D. & Rose, M.R. 2009. Does aging stop? *Curr. Aging Sci.* **2**: 3–11.
- Shahrestani, P., Quach, J., Mueller, L.D. & Rose, M.R. 2012. Paradoxical physiological transitions from aging to late life in *Drosophila*. *Rejuvenation Res.* **15**: 49–58.
- Shahrestani, P., Wilson, J.B., Mueller, L.D. & Rose, M.R. 2016. Patterns of physiological decline due to age and selection in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* doi: 10.1111/evo.13065.
- Sherer, T.B., Richardson, J.R., Testa, C.M., Seo, B.B., Panov, A. V, Yagi, T., *et al.* 2007. Mechanism of toxicity of pesticides acting at complex I: relevance to environmental etiologies of Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **100**: 1469–1479.
- Shi, S.L., Liu, X.X., Zhang, Q.W. & Zhao, Z.W. 2010. Morph-specific differences in metabolism related to flight in the wing-dimorphic *Aphis gossypii*. *Insect Sci.* **17**: 527–534.
- Simmons, M.J. & Crow, J.F. 1977. Mutations affecting fitness in *Drosophila* populations. *Annu. Rev. Genet.* **11**: 49–78.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. & Flook, P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **87**: 651–701.
- Speakman, J.R., Blount, J.D., Bronikowski, A.M., Buffenstein, R., Isaksson, C., Kirkwood, T.B.L., *et al.* 2015. Oxidative stress and life histories: unresolved issues and current needs. *Ecol. Evol.* **5**: 5745–5757.
- Speakman, J.R. & Garratt, M. 2014. Oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays* **36**: 93–106.
- Stearns, S.C. 1992. *The Evolution of Life Histories*. Oxford University Press, London.

- Stearns, S.C., Ackermann, M., Doebeli, M. & Kaiser, M. 2000. Experimental evolution of aging, growth, and reproduction in fruitflies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**: 3309–3313.
- Stewart, J.B., Freyer, C., Elson, J.L. & Larsson, N.-G. 2008a. Purifying selection of mtDNA and its implications for understanding evolution and mitochondrial disease. *Nat. Rev. Genet.* **9**: 657–662.
- Stewart, J.B., Freyer, C., Elson, J.L., Wredenberg, A., Cansu, Z., Trifunovic, A., *et al.* 2008b. Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS Biol.* **6**: e10.
- Stojković, B., Đorđević, M., Janković, J., Savković, U. & Tucić, N. 2015. Heterosis in age-specific selected populations of a seed beetle: sex differences in longevity and reproductive behavior. *Insect Sci.* **22**: 295–309.
- Stojković, B., Jovanović, D.Š., Perovanović, J. & Tucić, N. 2011. Sexual activity and reproductive isolation between age-specific selected populations of seed beetle. *Ethology* **117**: 812–821.
- Stojković, B. & Savković, U. 2011. Gender differences in longevity in early and late reproduced lines of the seed beetle. *Arch. Biol. Sci.* **63**: 129–136.
- Stojković, B., Sayadi, A., Đorđević, M., Jović, J., Savković, U. & Arnqvist, G. 2016. Divergent evolution of lifespan associated with mitochondrial DNA evolution. *Evolution*, doi: 10.1111/evo.13102.
- Stojković, B., Šešlija Jovanović, D., Tucić, B. & Tucić, N. 2010. Homosexual behaviour and its longevity cost in females and males of the seed beetle *Acanthoscelides obtectus*. *Physiol. Entomol.* **35**: 308–316.
- Stojković, B. & Tucić, N. 2012. *Od molekula do organizma: molekularna i fenotipska evolucija*. Službeni glasnik, Beograd.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roebuck, S.J. & Brand, M.D. 2002. Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* **277**: 44784–44790.

- Sun, J., Folk, D., Bradley, T.J. & Tower, J. 2002. Induced overexpression of mitochondrial Mn-superoxide dismutase extends the life span of adult *Drosophila melanogaster*. *Genetics* **161**: 661–672.
- Sun, J. & Tower, J. 1999. FLP recombinase-mediated induction of Cu/Zn-superoxide dismutase transgene expression can extend the life span of adult *Drosophila melanogaster* flies. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 216–228.
- Swindell, W.R. & Bouzat, J.L. 2006. Inbreeding depression and male survivorship in *Drosophila*: implications for senescence theory. *Genetics* **172**: 317–327.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. & Kumar, S. 2007. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* **24**: 1596–1599.
- Tanaka, Y. 1993. A genetic mechanism for the evolution of senescence in *Callosobruchus chinensis* (the azuki bean weevil). *Heredity (Edinb)*. **70**: 318–321.
- Tanaka, Y. 1990. Age specificity of inbreeding depression during a life cycle of *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Res. Popul. Ecol. (Kyoto)*. **32**: 329–335.
- Tatar, M., Kopelman, A., Epstein, D., Tu, M.P., Yin, C.M. & Garofalo, R.S. 2001. A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science* **292**: 107–110.
- Tatar, M., Promislow, D., Khazaeli, A.A. & Curtsinger, J.W. 1996. Age-specific patterns of genetic variance in *Drosophila melanogaster*. II. Fecundity and its genetic covariance with age-specific mortality. *Genetics* **143**: 849–858.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673–4680.
- Tower, J. 2015. Mitochondrial maintenance failure in aging and role of sexual dimorphism. *Arch. Biochem. Biophys.* **576**: 17–31.

- Trifunovic, A., Hansson, A., Wredenberg, A., Rovio, A.T., Dufour, E., Khvorostov, I., *et al.* 2005. Somatic mtDNA mutations cause aging phenotypes without affecting reactive oxygen species production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 17993–17998.
- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., *et al.* 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**: 417–423.
- Tucić, N. 2003. *Evoluciona biologija*. NNK International, Beograd.
- Tucić, N., Gliksman, I., Šešlija, D., Milanović, D., Mikuljanac, S. & Stojković, O. 1996. Laboratory evolution of longevity in the bean weevil (*Acanthoscelides obtectus*). *J. Evol. Biol.* **9**: 485–503.
- Turrens, J.F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol.* **552**: 335–344.
- Van Doorn, G.S. 2009. Intralocus sexual conflict. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1168**: 52–71.
- Van Raamsdonk, J.M. & Hekimi, S. 2009. Deletion of the mitochondrial superoxide dismutase sod-2 extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet.* **5**: e1000361.
- Vaupel, J.W., Carey, J.R., Christensen, K., Johnson, T.E., Yashin, A.I., Holm, N. V., *et al.* 1998. Biodemographic trajectories of longevity. *Science* **280**: 855–860.
- Vaupel, J.W., Manton, K.G. & Stallard, E. 1979. The impact of heterogeneity in individual frailty on the dynamics of mortality. *Demography* **16**: 439.
- Veal, E.A., Day, A.M. & Morgan, B.A. 2007. Hydrogen peroxide sensing and signaling. *Mol. Cell* **26**: 1–14.
- Villa-Cuesta, E., Holmbeck, M.A. & Rand, D.M. 2014. Rapamycin increases mitochondrial efficiency by mtDNA-dependent reprogramming of mitochondrial metabolism in *Drosophila*. *J Cell Sci* **127**: 2282–2290.

- Viña, J., Sastre, J., Pallardó, F. & Borrás, C. 2003. Mitochondrial theory of aging: importance to explain why females live longer than males. *Antioxid. Redox Signal.* **5**: 549–556.
- Voet, D. & Voet, J.G. 2011. *Biochemistry*. John Wiley & Sons, Hoboken.
- Wade, M.J. 2014. Paradox of mother's curse and the maternally provisioned offspring microbiome. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**: a017541.
- Walker, D.W., Hajek, P., Muffat, J., Knoepfle, D., Cornelison, S., Attardi, G., *et al.* 2006. Hypersensitivity to oxygen and shortened lifespan in a *Drosophila* mitochondrial complex II mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**: 16382–16387.
- Wang, Y. & Hekimi, S. 2015. Mitochondrial dysfunction and longevity in animals: untangling the knot. *Science* **350**: 1204–1207.
- Wayne, M.L., Telonis-Scott, M., Bono, L.M., Harshman, L., Kopp, A., Nuzhdin, S. V., *et al.* 2007. Simpler mode of inheritance of transcriptional variation in male *Drosophila melanogaster*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 18577–18582.
- Werren, J.H., Baldo, L. & Clark, M.E. 2008. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 741–751.
- White, D.J., Wolff, J.N., Pierson, M. & Gemmell, N.J. 2008. Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Mol. Ecol.* **17**: 4925–4942.
- Williams, G. 1957. Pleiotropy, natural selection, and the evolution of senescence. *Evolution* **11**: 398–411.
- Williams, T.A., Foster, P.G., Cox, C.J. & Embley, T.M. 2013. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* **504**: 231–236.
- Wilson, R.E., Peters, J. & McCracken, K.G. 2013. Genetic and phenotypic divergence between low- and high-altitude populations of two recently diverged cinnamon teal subspecies. *Evolution* **67**: 170–184.

- Wit, J., Sarup, P., Lupsa, N., Malte, H., Frydenberg, J. & Loeschke, V. 2013. Longevity for free? Increased reproduction with limited trade-offs in *Drosophila melanogaster* selected for increased life span. *Exp. Gerontol.* **48**: 349–357.
- Wolff, J.N. & Gemmell, N.J. 2013. Mitochondria, maternal inheritance, and asymmetric fitness: why males die younger. *BioEssays* **35**: 93–99.
- Wolff, J.N., Ladoukakis, E.D., Enríquez, J.A. & Dowling, D.K. 2014. Mitonuclear interactions: evolutionary consequences over multiple biological scales. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **369**: 20130443.
- Wolff, J.N., Pichaud, N., Camus, M.F., Côté, G., Blier, P.U. & Dowling, D.K. 2016. Evolutionary implications of mitochondrial genetic variation: mitochondrial genetic effects on OXPHOS respiration and mitochondrial quantity change with age and sex in fruit flies. *J. Evol. Biol.* **29**: 736–747.
- Xie, M. & Roy, R. 2012. Increased levels of hydrogen peroxide induce a HIF-1-dependent modification of lipid metabolism in AMPK compromised *C. elegans* dauer larvae. *Cell Metab.* **16**: 322–335.
- Yang, W. & Hekimi, S. 2010a. A mitochondrial superoxide signal triggers increased longevity in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Biol.* **8**: e1000556.
- Yang, W. & Hekimi, S. 2010b. Two modes of mitochondrial dysfunction lead independently to lifespan extension in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* **9**: 433–447.
- Yashin, A.I., Cypser, J.W., Johnson, T.E., Michalski, A.I., Boyko, S.I. & Novoseltsev, V.N. 2002. Heat shock changes the heterogeneity distribution in populations of *Caenorhabditis elegans*: does it tell us anything about the biological mechanism of stress response? *Journals Gerontol. Ser. A Biol. Sci. Med. Sci.* **57**: B83–B92.
- Yee, C., Yang, W. & Hekimi, S. 2014. The intrinsic apoptosis pathway mediates the pro-longevity response to mitochondrial ROS in *C. elegans*. *Cell* **157**: 897–909.
- Yun, J. & Finkel, T. 2014. Mitohormesis. *Cell Metab.* **19**: 757–766.

- Zarse, K., Schmeisser, S., Groth, M., Priebe, S., Beuster, G., Kuhlow, D., *et al.* 2012. Impaired insulin/IGF1 signaling extends life span by promoting mitochondrial L-proline catabolism to induce a transient ROS signal. *Cell Metab.* **15**: 451–465.
- Zera, A.J. 2005. Intermediary metabolism and life history trade-offs: lipid metabolism in lines of the wing-polymorphic cricket, *Gryllus firmus*, selected for flight capability vs. early age reproduction. *Integr. Comp. Biol.* **45**: 511–524.
- Zera, A.J. & Harshman, L.G. 2001. The physiology of life history trade-offs in animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **32**: 95–127.
- Zhan, M., Yamaza, H., Sun, Y., Sinclair, J., Li, H. & Zou, S. 2007. Temporal and spatial transcriptional profiles of aging in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res.* **17**: 1236–1243.
- Zhang, Y., Ikeno, Y., Qi, W., Chaudhuri, A., Li, Y., Bokov, A., *et al.* 2009. Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* **64**: 1212–1220.
- Zwaan, B.J. 1999. The evolutionary genetics of ageing and longevity. *Heredity (Edinb)*. **82**: 589–597.
- Zwaan, B.J., Bijlsma, R. & Hoekstra, R.F. 1995a. Artificial selection for developmental time in *Drosophila melanogaster* in relation to the evolution of ageing - direct and correlated responses. *Evolution* **49**: 635–648.
- Zwaan, B.J., Bijlsma, R. & Hoekstra, R.F. 1995b. Direct selection on life span in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* **49**: 649–659.

BIOGRAFIJA AUTORA

Mirko Đorđević je rođen 27. juna 1986. godine u Požarevcu. Nakon završene osnovne škole i srednje medicinske škole u Požarevcu, smer farmaceutski tehničar, školske 2005/2006 godine upisuje Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu, studijska grupa molekularna biologija i fiziologija. Odbranom diplomskog rada 2010 godine: „Haplotipska varijabilnost COI gena u laboratorijskim populacijama *Acanthoscelides obtectus* Say (Bruchidae: Coleoptera)“, pod mentorstvom doc. dr Biljane Stojković i prof. dr Nikole Tucić, diplomira sa prosečnom ocenom 8,88. Školske 2010/2011. godine upisuje prvu godinu doktorskih studija na modulu Evolucionarna biologija, Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu.

Od 01.01.2011. godine Mirko je zaposlen u Odeljenju za evolucionu biologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, gde radi u zvanju istraživač pripravnik. 29.05.2013. godine, na XIV redovnoj sednici Instituta, stiče istraživačko zvanje istraživač saradnik u koje je reizabran 03.03.2016. godine na III redovnoj sednici Instituta.

Mirko učestvuje u realizovanju projekta osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Evolucija u laboratoriji i adaptacije u prirodi“ (br. 173007, rukovodilac dr Branka Tucić).

Mirkovo dosadašnja naučno-istraživačka aktivnost pretežno se odvijala u oblasti eksperimentalne evolucije insekata. Dosadašnje rezultate svojih istraživanja Mirko je prikazao u devet naučnih radova koji su publikovani u časopisima od međunarodnog značaja. Dodatno, Mirko aktivno učestvuje u različitim programima popularizacije nauke.

Изјава о ауторству

Потписани Мирко Ђорђевић

број уписа Б3043/2010

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Еволуција старења код лабораторијских популација *Acanthoscelides obtectus*: улога
митохондрија и оксидативног стреса

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора

Мирко Ђорђевић

Број уписа

Б3043/2010

Студијски програм

Биологија

Наслов рада

Еволуција старења код лабораторијских популација *Acanthoscelides obtectus*: улога митохондрија и оксидативног стреса

Менторке

проф. др Биљана Стојковић

др Јелица Лазаревић

Потписани Мирко Ђорђевић

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

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

Еволуција старења код лабораторијских популација *Acanthoscelides obtectus*: улога митохондрија и оксидативног стреса

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао 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.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

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