



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ, ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

Εργαστήριο πληθυσμιακής γενετικής και εξέλιξης

Μελέτη πατρικής διαρροής του mtDNA, και κληρονόμησης της μιτοχονδριακής ετεροπλασμίας σε υβρίδια *Drosophila*

Μεταπτυχιακή Διατριβή

ΠΜΣ: "Περιβαλλοντική Βιολογία-Διαχείριση Χερσαίων & Θαλάσσιων
Βιολογικών Πόρων"

Ειρήνη-Σλάβκα Πολόβινα

Υπεύθυνος καθηγητής :Εμμανουήλ Λαδουκάκης

Ηράκλειο 2019

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Εμμανουήλ Λαδουκάκης

Νικόλαος Πουλακάκης

Πάυλος Παυλίδης

Περιεχόμενα

Περιεχόμενα	3
Ευχαριστίες	5
Περίληψη	6
Εισαγωγή	7
Μιτοχόνδρια.....	7
Δομή και λειτουργία.....	7
Προέλευση	8
Χαρακτηριστικά του μιτοχονδριακού DNA (mtDNA), κληρονόμηση και ετεροπλασμία	9
Το μιτοχονδριακό DNA.....	9
Κληρονόμηση και ετεροπλασμία.....	10
Εξέλιξη του μιτοχονδριακού DNA	13
Μητρική (Μονογονεϊκή) κληρονόμηση	13
Muller's ratchet	14
Πατρική διαρροή.....	15
Ετεροπλασμία.....	15
Ανασυνδυασμός.....	16
Σχετικά με το υπό μελέτη γένος <i>Drosophila</i>	17
Σκοπός της εργασίας	18
Υλικά και Μέθοδοι	19
Διασταυρώσεις.....	19
Διαειδικές διασταυρώσεις	19
Διαδικασία και συνθήκες διασταυρώσεων	20
Εξαγωγή ολικού DNA	22
Έλεγχος ετεροπλασμίας με αντιδράσεις PCR.....	23
PCR σε F1 υβρίδια:	24
PCR σε F2 υβρίδια:	24
Σύνοψη διασταυρώσεων και μιτότυπων που ανιχνεύθηκαν	25
Στατιστική ανάλυση	27
Αποτελέσματα	29
Γενικές παρατηρήσεις	29

Διαρροή πατρικού mtDNA.....	31
F1 υβρίδια:	31
F2 υβρίδια:	35
Κληρονόμηση ετεροπλασμίας	43
F2 υβρίδια:	43
Συσχέτιση κληρονομούμενης μητρικής ετεροπλασμίας και πατρικής διαρροής mtDNA..	49
Συζήτηση	51
Μέθοδος PCR για ανίχνευση ετεροπλασμίας.....	51
Πατρική Διαρροή mtDNA.....	52
Φύλο.....	52
Γενετική απόσταση των γονέων.....	53
Οικογένεια.....	54
Ηλικία της μητέρας.....	55
Ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας	56
Κληρονόμηση ετεροπλασμίας	56
Συσχέτιση πατρικής διαρροής mtDNA και μητρικής κληρονόμησης ετεροπλασμίας	57
Βιβλιογραφία	58
Παράρτημα.....	72

Ευχαριστίες

Η πτυχιακή εργασία ήταν ένα μεγάλο βήμα στην έρευνα γύρω από την εξέλιξη. Θα ήθελα να εκφράσω τις δημόσιες ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή Εμμανουήλ Λαδουκάκη, επίκουρο καθηγητή τμήματος Βιολογίας πανεπιστημίου Κρήτης πρώτα απ' όλα γιατί με δέχτηκε στο εργαστήριο του και έπειτα για την προθυμία στήριξη, την βοήθεια και τις πολύτιμες συμβουλές του καθ' όλη την διάρκεια της ερευνητικής εργασίας. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω εγκάρδια την Μαριλένα Παρακατσελάκη και την Μαρία Δραμουντάνη για την διαθεσιμότητα τους, την υποστήριξη και την βοήθεια που μου έδειξαν, τις επικοινωνητικές συζητήσεις και την φιλική ατμόσφαιρα στο εργαστήριο. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω εγκάρδια την ερευνήτρια Jelena Radojicic από το Ελληνικό Κέντρο Θαλάσσιας Έρευνας (ΕΛΚΕΘΕ), η οποία με εκπαίδευσε και με καθοδήγησε στα πρώτα στάδια της επαφής μου με την έρευνα κατά την διάρκεια των προπτυχιακών μου σπουδών, και με στήριξε καθ' όλη τη διάρκεια πραγματοποίησης της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Έπειτα θα ήθελα να δώσω θερμές ευχαριστίες στο κοινωφελές Ίδρυμα Μποδοσάκη για την χρηματική υποτροφία κατά της διάρκεια του ακαδημαϊκού έτους 2017-2018, καθώς η οικονομική ενίσχυση του Ιδρύματος μου επέτρεψε να αφοσιωθώ απερίσπαστα στην διατριβή μου

Τέλος, πρέπει να εκφράσω την πολύ βαθιά μου ευγνωμοσύνη στην οικογένεια μου και στον σύντροφό μου, για την παροχή αδιάκοπης υποστήριξης και συνεχούς ενθάρρυνσης καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Αυτό το επίτευγμα δεν θα ήταν εφικτό χωρίς αυτούς. Μαζί με την οικογένεια μου ευχαριστώ πολύ και την κυρία Ευαγγελία Μάμου για την αγάπη και την φροντίδα της

Περίληψη

Η κληρονόμηση του γενετικού υλικού των μιτοχονδρίων (mtDNA) γίνεται στην πλειονότητα των ειδών μητρικά. Μια ερμηνεία στο πλεονέκτημα της μητρικής κληρονόμησης του mtDNA είναι ο περιορισμός της εξάπλωσης «εγωιστικών» μεταλλάξεων στον πληθυσμό. Παρά τους ποικίλους μηχανισμούς παρεμπόδισης της πατρικής διαρροής του mtDNA, το φαινόμενο της διαρροής και της μιτοχονδριακής ετεροπλασμίας αναφέρεται ολοένα και συχνότερα στη βιβλιογραφία. Με βάση την επικρατούσα υπόθεση η κατάσταση της ετεροπλασμίας δίνει την δυνατότητα να συμβεί ανασυνδυασμός μεταξύ διαφορετικών mtDNA. Ο ανασυνδυασμός στο mtDNA μπορεί να έχει σημαντικές εξελικτικές συνέπειες, καθώς πολύ χαμηλής συχνότητας ανασυνδυασμός θα επαρκούσε για να αντιστρέψει τις συνέπειες της συνεχούς συσσώρευσης επιβλαβών μεταλλαγών εξ' αιτίας της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης (Muller's Ratchet).

Στην παρούσα εργασία διερευνήσαμε κατά πόσο τα φαινόμενα της πατρικής διαρροής του mtDNA και της μητρικής κληρονόμησης της ετεροπλασμίας αποτελούν στοχαστικές διαδικασίες ή επηρεάζονται σημαντικά από γενετικούς παράγοντες. Με σκοπό να απαντήσαμε τα ερωτήματά μας, πραγματοποιήσαμε μια σειρά διαειδικών διασταυρώσεων σε δύο διαδοχικές γενιές σε είδη του γένους *Drosophila*.

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η διαρροή του πατρικού mtDNA σχετίζεται σημαντικά με παράγοντες όπως το φύλο, η οικογένεια, η ηλικία και η ετεροπλασμία της μητέρας. Επίσης παρατηρήσαμε ότι η μητρική κληρονόμηση της μιτοχονδριακής ετεροπλασμίας επηρεάζεται σημαντικά από την οικογένεια που προέρχονται οι απόγονοι.

Συμπεραίνουμε ότι οι διαφορές στα επίπεδα πατρικής διαρροής και κληρονόμησης της ετεροπλασμίας μεταξύ των ατόμων και των οικογενειών δηλώνουν ότι τα φαινόμενα αυτά επηρεάζονται από εξειδικευμένους, άγνωστους προς το παρόν γενετικούς μηχανισμούς.

Εισαγωγή

Μιτοχόνδρια

Δομή και λειτουργία

Τα μιτοχόνδρια είναι κυτταρικά οργανίδια και συναντώνται στους περισσότερους ευκαρυωτικούς οργανισμούς. Το κάθε μιτοχόνδριο περιέχει DNA (μιτοχονδριακό DNA, mtDNA) το οποίο οργανώνεται σε πολλά αντίγραφα του ενός, συνήθως κυκλικού, χρωμοσώματος. Ο αριθμός των μιτοχονδρίων, το μέγεθος, το σχήμα και η κατανομή τους στο κύτταρο μπορεί να διαφέρει ανάλογα τον οργανισμό ή τον κυτταρικό τύπο στον οποίο βρίσκονται. Το μέγεθος τους κυμαίνεται συνήθως από 0,75-3μm σε διάμετρο (Wiemerslage and Lee 2016), το σχήμα τους ενώ συνήθως είναι επίμηκες, σφαιρικό ή ωοειδές και μπορεί να κυμαίνεται από μεμονωμένες δομές έως και σωληνοειδή δίκτυα (Bereiter-Hahn and Vöth 1994; Anesti and Scorrano 2006; Campello and Scorrano 2010). Τέλος ο αριθμός τους και η κατανομή τους είναι μεγαλύτερη σε κύτταρα/κυτταρικές περιοχές όπου οι ενεργειακές ανάγκες είναι μεγαλύτερες (Anesti and Scorrano 2006; Bereiter-Hahn and Vöth 1994). Η ποικιλομορφία και η δυναμική που παρουσιάζουν τα μιτοχόνδρια πιθανά να αντικατοπτρίζει την πλειονότητα των λειτουργιών και των διαδικασιών στις οποίες εμπλέκονται. Η εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων διαθέτει τα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης, μια διαδικασία που παράγει το μεγαλύτερο μέρος της ενέργειας (ATP) στο κυττάρου (Formosa and Ryan 2018). Εκτός όμως από την παραγωγή ενέργειας, τα μιτοχόνδρια εμπλέκονται σε αρκετές άλλες διεργασίες. Πρόσφατα, αυξανόμενα στοιχεία δείχνουν ότι τα μιτοχόνδρια μπορούν να λειτουργήσουν ως κόμβος σε σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν την κυτταρική διαφοροποίηση και ανάπτυξη (Noguchi and Kasahara 2018), επίσης, έχει διαπιστωθεί ότι τα μιτοχόνδρια παίζουν ενεργό ρόλο στη ρύθμιση των διάφορων φάσεων του κυτταρικού κύκλου με την ρύθμιση διάφορων κυκλικών (Mitra et al. 2009; Finkel and Hwang 2009). Επιπλέον, τα μιτοχόνδρια συμμετέχουν στην ενεργοποίηση της απόπτωσης σε κύτταρα θηλαστικών (Wang and Youle 2009) και σε πολλές άλλες λειτουργίες.

Η δυσλειτουργία των μιτοχονδρίων έχει συνδεθεί με πληθώρα ασθενειών στον άνθρωπο (μιτοχονδριακές ασθένειες). Υπάρχουν ενδείξεις για συσχέτιση της μιτοχονδριακής δυσλειτουργίας με φαινοτύπους πρώιμης γήρανσης (Bratic and Larsson 2013), και με άλλες ασθένειες όπως μιτοχονδριακή εγκεφαλοπάθεια, η γαλακτική οξέωση, εγκεφαλικά επεισόδια (MELAS), μυοκλονική επιληψία (MERRF) και πολλές κοινές εκφυλιστικές διαταραχές, συμπεριλαμβανομένου του νευροεκφυλισμού (James B. Stewart and Chinnery 2015; Hahn and Zuryn 2018).

Προέλευση

Η επικρατέστερη θεωρία για την προέλευση των μιτοχονδρίων είναι η ενδοσυμβιωτική θεωρία (Margulis 1981), σύμφωνα με την οποία τα μιτοχόνδρια ήταν αρχικά προκαρυωτικά κύτταρα, ικανά να εφαρμόσουν οξειδωτικούς μηχανισμούς (αερόβια αναπνοή) οι οποίοι ήταν αδύνατοι για τα ευκαρυωτικά κύτταρα (Margulis and Sagan 1986). Τα προκαρυωτικά κύτταρα κατέληξαν μέσα στα ευκαρυωτικά, όπου αντί να υποστούν πέψη από το ξενιστή τους μετατράπηκαν σε ενδοσυμβιώτες (Margulis and Sagan 1986). Η μετάβαση που μετέτρεψε αυτά τα προγονικά βακτήρια (πρώτο-μιτοχόνδρια) στα σημερινά μιτοχόνδρια υπήρξε θεμελιώδης στην εξέλιξη της ζωής (Lane and Martin 2010). Σύμφωνα με την τρέχουσα συναίνεση, το γεγονός αυτό συνέβη μόνο μία φορά, τουλάχιστον πριν από 1,5 δισεκατομμύριο χρόνια, και ακολούθησε διαφορετικές εξελικτικές πορείες που κατέληξαν από τροποποιημένες μορφές οργανιδίων προσαρμοσμένων σε αναερόβιες συνθήκες (M. Muller et al. 2012; Mentel et al. 2014) μέχρι τα λειτουργικά αλλά και πολύ διαφορετικά μιτοχόνδρια των φυτών και των ζώων. Οι πρώτες μοριακές ενδείξεις που δηλώνουν ότι τα μιτοχόνδρια είναι υπολείμματα ενός α-πρωτεοβακτηρίου εμφανίστηκαν στα τέλη της δεκαετίας του '80 με φυλογενετικές αναλύσεις γονιδίων ριβοσωμικού RNA (Yang et al. 1985; M W Gray et al. 1989). Μεταγενέστερες αναλύσεις γονιδίων που κωδικοποιούν συστατικά της αναπνευστικής αλυσίδας στα μιτοχόνδρια καθώς και φυλογενετικές προσεγγίσεις έδωσαν πρόσθετη υποστήριξη στην προέλευση των βακτηρίων από τα α-πρωτεοβακτήρια (S. G. E. Andersson et al. 1998; Sicheritz-Pontén, Kurland, and Andersson 1998; M W Gray, Burger, and Lang 1999; G. E. Andersson et al. 2003; Brochier-Armanet, Talla, and Gribaldo 2009; Sousa et al. 2012; Burger et al. 2013; Degli Esposti et al. 2014). Επιπλέον στοιχεία για την βακτηριακή προέλευση των μιτοχονδρίων αποτελούν: η παρουσία του λιπιδίου καρδιολιπίνη αποκλειστικά στις βακτηριακές μεμβράνες και στις εσωτερικές μιτοχονδριακές μεμβράνες (Mileykova and Dowhan 2009), η ύπαρξη πορινών τόσο στην εξωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων όσο και στη μεμβράνη των βακτηρίων (Zeth and Thein 2010), η κυτταρική διαίρεση με τον μηχανισμό της διχοτόμησης κοινή στα βακτήρια και τα μιτοχόνδρια (Kuroiwa et al. 2006) και τέλος η μεταφορά γονιδίων από τον ενδοσυμβιώτη στον ξενιστή κατά την ενδοσυμβίωση (Keeling and Archibald 2008), που στην περίπτωση των μιτοχονδρίων ισχύει, αφού η πλειοψηφία των απαραίτητων για τη λειτουργία τους πρωτεϊνών βρίσκεται στον πυρήνα (Berg and Kurland 2000).

εξελικτική του πορεία το γονιδίωμα αυτό έχασε μεγάλο μέρος του, ενώ ένα άλλο μέρος μεταφέρθηκε στον πυρήνα του ευκαρυώτη, με αποτέλεσμα να υπάρχει σημαντική μείωση στον αριθμό των γονιδίων στα σημερινά μιτοχόνδρια (Ballard and Rand 2005) ο οποίος κυμαίνεται από 97 πρωτεϊνικά γονίδια στο πρωτόζωο *Reclinoma samericana* (Berg and Kurland 2000) μέχρι μόλις 3 πρωτεϊνικά γονίδια στο παράσιτο της ελονοσίας *Plasmodium falciparum* (Ballard and Rand 2005). Στους ζωικούς οργανισμούς για την ολοκλήρωση οποιασδήποτε βιοχημικής διεργασίας στο μιτοχόνδριο, συμπεριλαμβανομένων των διαδικασιών της αντιγραφής, της μεταγραφής και της μετάφρασης, είναι απαραίτητη η παρουσία ενζύμων που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα, όπως είναι το κυτόχρωμα c και οι DNA πολυμεράσες. Γι' αυτό τον λόγο υπάρχει μια συνεργασία μεταξύ των ενδογενών μιτοχονδριακών γονιδίων και των γονιδίων που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα, τα οποία μπορεί είτε να προέρχονται από μιτοχονδριακά γονίδια που μεταφέρθηκαν στον πυρήνα κατά τη διάρκεια της εξέλιξης είτε να αποτελούν πυρηνικά γονίδια του ευκαρυώτη που έχουν αποκτήσει σηματοδοτικό ρόλο στα μιτοχόνδρια και σχετίζονται με λειτουργίες που απέκτησε κατά την συμβίωση του με τον ευκαρυώτη (Rand, Haney, and Fry 2004).

Το mtDNA χρησιμοποιείται ευρέως σε μελέτες πληθυσμιακής γενετικής, φυλογεωγραφίας και φυλογενετικής. Για τέτοιου είδους μελέτες το mtDNA αποτελεί ένα αρκετά πρακτικό δείκτη καθώς προσφέρει ένα σύνολο ορθόλογων γονιδίων με ελάχιστο ή καθόλου ανασυνδυασμό και ταχεία εξέλιξη (Ballard and Rand 2005). Προϋπόθεση σε αυτές τις μελέτες είναι ότι οι συχνότητες απλοτύπων καθορίζονται πρωτίστως από την μετανάστευση και την τυχαία γενετική παρέκκλιση και ότι η ενδοειδική ποικιλομορφία είναι ουδέτερη (Ballard and Rand 2005).

Κληρονόμηση και ετεροπλάσμία

Η κληρονόμηση των μιτοχονδρίων και κατά συνέπεια του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, στους οργανισμούς με φυλετική αναπαραγωγή δεν ακολουθεί την κλασική Μεντελική κληρονομικότητα, αλλά συμβαίνει στο μεγαλύτερο ποσοστό των ειδών από τον ένα γονέα, που συνήθως είναι η μητέρα (Dawid and Blackler 1972; Giles et al. 1980; Shitara et al. 1998; C W Birky 1995). Στους φυλετικά αναπαραγόμενους οργανισμούς, παρόλη την παρουσία μιτοχονδρίων στο σπερματοζώαριο, υπάρχουν μηχανισμοί οι οποίοι παρεμποδίζουν την πατρική κληρονόμησή τους (Shitara et al. 1998; M. Sato and Sato 2013). Τέτοιοι μηχανισμοί, ανάλογα με το αν δρουν πριν την γονιμοποίηση (κατά τον σχηματισμό των γαμετών) ή κατά τη διάρκεια/μετά την γονιμοποίηση ονομάζονται προζυγωτικοί ή μεταζυγωτικοί αντίστοιχα (C W Birky 1995). Όσον αφορά τους προζυγωτικούς μηχανισμούς μια περίπτωση είναι η ενεργητική εξάλειψη των μιτοχονδρίων από το σπερματοζώαριο κατά την σπερματογένεση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι ο μηχανισμός παρεμπόδισης της κληρονόμησης του πατρικού mtDNA στη *D.*

melanogaster (DeLuca and O'Farrell 2012) καθώς και σε θηλαστικά όπου έχει δειχθεί η αποβολή πατρικού mtDNA σε υπολειμματικά σώματα στο στάδιο των σπερματίδων (Hecht et al. 1984; Breucker, Schäfer, and Holstein 1985). Μία δεύτερη περίπτωση προζυγωτικού μηχανισμού που δρα παθητικά για τον περιορισμό του mtDNA είναι η αραίωση των πατρικών μιτοχονδρίων μέσα στο ωάριο (dilution hypothesis) (Wolff and Gemmell 2008). Λόγω της διαφοράς στο μέγεθος μεταξύ του ωαρίου και του σπερματοζωαρίου (ανισογαμία) ο αριθμός των μιτοχονδρίων στο σπέρμα είναι πολύ μικρότερος από αυτόν στο ωάριο με αποτέλεσμα να υπάρχουν πολύ λιγότερα μόρια πατρικού mtDNA στο ζυγωτό σε σχέση με τον αριθμό μητρικών μορίων mtDNA (Wolff and Gemmell 2008). Το mtDNA υφίσταται και μια δεύτερη αραίωση λόγω της στενωπού (bottleneck) από την οποία διέρχεται στα αρχικά στάδια της εμβρυογένεσης, κατά τα οποία ο αριθμός των μιτοχονδριακών αντιγράφων παραμένει σταθερός, ενώ τα κύτταρα διαιρούνται συνεχώς (Wolff and Gemmell 2008). Έτσι, τα τυχόν υπάρχοντα πατρικής προέλευσης μόρια είναι δύσκολο να εντοπιστούν, καθώς θα έχουν εγκαθιδρυθεί τυχαία σε ένα μόνο μικρό μέρος των κυττάρων (C W Birky 1995).

Όσον αφορά τους μεταζυγωτικούς μηχανισμούς διακρίνουμε αρχικά τους μηχανισμούς που δρουν κατά την διάρκεια της γονιμοποίησης, οι οποίοι παρεμποδίζουν τα πατρικά μιτοχόνδρια να εισέλθουν στο ωάριο (Ursprung, Heinrich and Schabtach 1965; Yanagimachi et al. 1983; Xu 2005). Τέλος διακρίνουμε τους μηχανισμούς οι οποίοι δρουν μετά την γονιμοποίηση οι οποίοι περιλαμβάνουν την στοχευμένη αναγνώριση και καταστροφή των πατρικών μιτοχονδρίων. Ο μεγαλύτερος αριθμός μηχανισμών παρεμπόδισης που έχει βρεθεί αποτελεί τέτοιους μεταζυγωτικούς μηχανισμούς οι οποίοι εμφανίζουν μεγάλη ποικιλομορφία στην βιοχημική τους βάση (Hiraoka and Hiraoka 1988; Shalgi et al. 1994; Kaneda et al. 1995; Cummins, Wakayama, and Yanagimachi 1997; P Sutovsky et al. 1999; P Sutovsky et al. 2000; P. Sutovsky 2002; Nishimura et al. 2002; Moriyama and Kawano 2003; Peter Sutovsky et al. 2004; Nishimura et al. 2006; Al Rawi et al. 2011; M. Sato and Sato 2011; Chan and Schon 2012; Song et al. 2016; Wen et al. 2016)

Παρόλα αυτά μιτοχονδριακή ετεροπλασμία, δηλαδή ύπαρξη παραπάνω του ενός τύπων mtDNA σε ένα άτομο, μπορεί να προκύψει σε μεμονωμένα άτομα (Barr, Neiman, and Taylor 2005). Η συνύπαρξη δύο ή περισσότερων τύπων mtDNA σε ένα άτομο μπορεί να συμβεί με τρεις τρόπους. Ένας από αυτούς είναι οι σωματικές μεταλλαγές που μπορούν να συμβούν στο mtDNA ενός ομοπλάσμιου ατόμου κατά τη διάρκεια της ζωής του (Hauswirth and Lairis 1982; Abbott et al. 2005; Parr et al. 2006). Επειδή το κάθε άτομο περιλαμβάνει τεράστιο αριθμό mtDNA τα οποία προκύπτουν από αντιγραφή, και επειδή οι μηχανισμοί επιδιόρθωσης του mtDNA δεν είναι τόσο αυστηροί όσο αυτοί του πυρηνικού, μπορούν να υπάρξουν σωματικές μεταλλαγές στο mtDNA με αποτέλεσμα το κάθε άτομο να φέρει μεγάλο αριθμό ελαφρώς διαφορετικών mtDNA μορίων. Επομένως, παρά την ύπαρξη

μηχανισμών που είναι ικανοί να περιορίσουν τη μιτοχονδριακή ποικιλομορφία κατά την ωογένεση (Bergstrom and Pritchard 1998; C William Birky 2001), έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που μεμονωμένα άτομα φέρουν παραπάνω του ενός τύπου mtDNA, οι οποίοι προέκυψαν από ενδογενείς κυτταρικούς μηχανισμούς.

Ένας άλλος τρόπος να προκύψει μιτοχονδριακά ετεροπλασμικό άτομο είναι μέσω διαρροής πατρικών μιτοχονδρίων στο ωάριο κατά την γονιμοποίηση (Wagner et al. 1991; Kvist et al. 2003; Sherengul, Kondo, and Matsuura 2006). Από τις μελέτες φαίνεται ότι η πατρική διαρροή συμβαίνει σε ένα μεγάλο εύρος ειδών σε φυσικούς, ακόμα και εργαστηριακούς πληθυσμούς, οι οποίοι εκτός από φυτά περιλαμβάνουν και ζώα όπως έντομα, ψάρια, δίθυρα και θηλαστικά. (Zouros, Freeman, aO. Ball, etal. 1992; Meusel&Moritz 1993; Kitagawaetal. 2002; Hattori etal. 2002; Fontaineetal. 2007; Wolff&Gemmell 2008; Paduan&Ribolla 2008; Pearletal. 2009; Nunesetal. 2013; Morganetal. 2013), επίσης, έχει παρατηρηθεί σε ενδοειδικές και διαειδικές διασταυρώσεις (Kondo et al. 1990; Dokianakis and Ladoukakis 2014). Παρόλο που οι μηχανισμοί αποτροπής της κληρονόμησης του πατρικού mtDNA δεν είναι πλήρως κατανοητοί, εικάζεται ότι οφείλεται στην αδυναμία των μηχανισμών του ωαρίου να αναγνωρίσουν το πατρικό μιτοχόνδριο και να το καταστρέψουν ή να αποτρέψουν την είσοδό του στο ωάριο (Kaneda et al. 1995; Kitagawa, Takumi, and Nakamura 2002; James 2007). Τέλος, μιτοχονδριακά ετεροπλασμικό άτομο μπορεί να προκύψει από την γονιμοποίηση ενός ήδη ετεροπλασμικού ωαρίου.

Μία αξιοσημείωτη εξαίρεση στον κανόνα της μονογονεϊκής κληρονόμησης αποτελεί η διπλή μονογονεϊκή κληρονόμηση (DUI), που εμφανίζεται μόνο σε μερικά είδη δίθυρων (Zouros, Ball, et al. 1994). Σε αυτή, τα αρσενικά άτομα εμφανίζονται υποχρεωτικά ετεροπλασμικά (Zouros, Oberhauser Ball, et al. 1994). Συγκεκριμένα, το μητρικής προέλευσης μιτοχονδριακό μόριο DNA, «F» και το πατρικής προέλευσης μιτοχονδριακό μόριο DNA, «M» μεταβιβάζονται σε δύο ξεχωριστές γενεαλογικές γραμμές. Τα θηλυκά μεταφέρουν τα μιτοχόνδρια τους, τα οποία φέρουν τα F μόρια, σε θηλυκούς και αρσενικούς απογόνους, ενώ τα αρσενικά μεταφέρουν τα μιτοχόνδρια τους, τα οποία φέρουν τα M μόρια, μόνο σε αρσενικούς απογόνους (Zouros et al. 1992). Αυτό έχει ως συνέπεια τα αρσενικά άτομα να είναι ετεροπλασμικά ενώ τα θηλυκά άτομα ομοπλασμικά. Στους σωματικούς ιστούς των αρσενικών ατόμων κυριαρχεί το F μόριο, ενώ απουσιάζει στο σπέρμα. Αντίθετα στους ιστούς των γονάδων και στους γαμέτες φαίνεται να υπάρχει αποκλειστικά το M μόριο. Στα θηλυκά άτομα όλοι οι ιστοί περιέχουν το F μόριο (Zouros et al. 1992).

Εξέλιξη του μιτοχονδριακού DNA

Μητρική (Μονογονεϊκή) κληρονομηση

Όπως προαναφέρθηκε στους οργανισμούς με φυλετική αναπαραγωγή η μεταβίβαση του μιτοχονδριακού πραγματοποιείται στις περισσότερες περιπτώσεις από τον ένα γονέα. Αυτός ο γονέας είναι σχεδόν πάντα η μητέρα, ενώ υπάρχουν και ελάχιστες εξαιρέσεις όπου έχουμε αποκλειστική πατρική κληρονομηση (Neale, Marshall, and Sederoff 1989; Chat, Chalak, and Petit 1999). Η καθολικότητα της μονογονεϊκής κληρονομησης δηλώνει ότι υπάρχει κάποιος σοβαρός εξελικτικός λόγος για την ύπαρξη της, ο οποίος ακόμα παραμένει άγνωστος (Hadjivasiliou et al. 2013; Mishra and Chan 2014; Christie, Schaerf, and Beekman 2015).

Μια υπόθεση που εξηγεί το πλεονέκτημα της μονογονεϊκής κληρονομησης είναι εκείνη του εγωιστικού DNA. Με βάση αυτή την θεωρία, εάν κάποια μετάλλαξη αυξήσει τον ρυθμό αντιγραφής του mtDNA και ταυτόχρονα μειώσει την λειτουργικότητα του (εγωιστικό DNA), τότε η μειωμένη αρμοστικότητα του mtDNA θα είναι εις βάρος της αρμοστικότητας του κυττάρου και του οργανισμού (Cosmides and Tooby 1981; Hastings 1992). Έτσι τα πυρηνικά και τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα βρίσκονται δυνητικά σε σύγκρουση συμφερόντων αρμοστικότητας. Η μονογονεϊκή κληρονομηση προέκυψε επειδή η αμφιγονεϊκή κληρονομηση θα διευκόλυε την εξάπλωση τέτοιων εγωιστικών mtDNA (Law and Hutson 1992; Hadjivasiliou et al. 2013; Cosmides and Tooby 1981; Hastings 1992).

Μία δεύτερη θεωρία προτείνει ότι η μονογονεϊκή κληρονομηση διευκολύνει την δράση της φυσικής επιλογής στην απομάκρυνση των επιβλαβών μεταλλάξεων. Μέσω της μονογονεϊκής κληρονομησης μειώνεται η ποικιλομορφία του mtDNA εντός των κυττάρων, αλλά αυξάνει η ποικιλομορφία μεταξύ των κυττάρων, επιτρέποντας την δράση της αρνητικής επιλογής έναντι των κυττάρων με αυξημένο μεταλλακτικό φορτίο (Bergstrom and Pritchard 1998; Hadjivasiliou et al. 2013). Καθοριστική για την αυξημένη διακυτταρική ποικιλομορφία είναι η δράση της στενωπού κατά την ωγένεση, η οποία πρέπει να είναι αρκετά "σφιχτή" (Radzvilavicius, Kokko, and Christie 2017). Μέσω αυτού του διαχωρισμού των mtDNA και της μονογονεϊκής κληρονομικότητας προβλέπεται η αποτροπή του εκφυλισμού του mtDNA (λόγο του Muller's ratchet), χωρίς να είναι απαραίτητος ο ανασυνδυασμός (βλέπε παρακάτω) (Radzvilavicius, Kokko, and Christie 2017).

Μία τρίτη υπόθεση υποστηρίζει ότι, επειδή τα σύμπλοκα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης αποτελούνται από αλληλεπιδρώντα πολυπεπτίδια που κωδικοποιούνται από τον πυρήνα και από τα μιτοχόνδρια, η μονογονεϊκή κληρονομηση θα βελτιστοποιεί την προσαρμογή του μηχανισμού διατηρώντας συνδυασμούς μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων που έχουν συνεξελιχθεί (Hadjivasiliou et al. 2012; Hill 2016; Wernick et al. 2019; Hadjivasiliou et al. 2013).

Σύμφωνα με τους Hadjivasiliou et al. (2012) η μονογονεϊκή κληρονομία του mtDNA μαζί με την στενωπό που υφίσταται το mtDNA βελτιώνουν την συν-προσαρμογή των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων αυξάνοντας έτσι την αρμοστικότητα. Στην συνέχεια η επιλογή υπέρ της συν-προσαρμογής των μιτοχονδριακών και πυρηνικών γονιδίων ευνοεί την εξέλιξη δύο διαφορετικών συζευκτικών τύπων ή δύο φύλων, στα φυλετικά είδη (Hadjivasiliou et al. 2012).

Muller's ratchet

Εξ' αιτίας της (συνήθως) αφυλετικής κληρονομίας του μιτοχονδρίου, το mtDNA δεν θα πρέπει να ανασυνδυάζεται κι επομένως θα πρέπει να είναι επιρρεπές στη συσσώρευση επιβλαβών μεταλλαγών εξαιτίας της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης, φαινόμενο γνωστό ως "Muller's ratchet" (H. J. Muller 1964). Με αυτόν τον τρόπο η απουσία ανασυνδυασμού μπορεί σε εξελικτικό χρόνο να οδηγήσει στη συνεχή μείωση της αρμοστικότητας και τελικά στον εκφυλισμό του mtDNA (Haigh 1978). Όπως προτάθηκε από τον Muller (1964) ο μηχανισμός αυτός ίσως να είναι η αιτία που η φυλετική αναπαραγωγή είναι πιο ευνοϊκή και έχει επικρατήσει έναντι της αφυλετικής. Οι επιπτώσεις αυτού του μηχανισμού είναι πιο έντονες σε πληθυσμούς με μικρό δραστικό πληθυσμιακό μέγεθος (N_e) όπου η δράση της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης γίνεται εντονότερη και η δράση της επιλογής ασθενέστερη σε σχέση με τους πληθυσμούς με μεγαλύτερο δραστικό μέγεθος (Haigh 1978; Santiago and Caballero 2016). Συγκρίσεις μεταξύ φυλετικών και αφυλετικών ευκαρυωτικών γονιδιωμάτων από ίδια είδη έχουν τεκμηριώσει τον παραπάνω μηχανισμό, καθώς φαίνεται ότι στα αφυλετικά γονιδιώματα υπάρχουν περισσότερες επιβλαβείς μεταλλάξεις σε σχέση με τα φυλετικά (Pamilo, Nei, and Li 1987; Normark and Moran 2000; Charlesworth and Wright 2001; Bruggeman et al. 2003; Neiman et al. 2010; Paland and Lynch 2015). Αντίστοιχες συγκριτικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των μιτοχονδριακών γονιδίων και των πυρηνικών έδειξαν ότι τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα των ζώων συσσωρεύουν επιβλαβείς μεταλλάξεις με ταχύτερο ρυθμό από ότι τα πυρηνικά (Lynch 1996; Lynch 1997; Lynch and Blanchard 1998).

Ένας τρόπος να αποφευχθεί η συνεχής εκφυλισμός των γονιδιωμάτων λόγω του Muller's ratchet, είναι μέσω ευνοϊκών μεταλλάξεων οι οποίες θα αντισταθμίσουν τις αρνητικές και θα επαναφέρουν τους αρχικούς απλοτύπους (Howe and Denver 2008). Ένας άλλος τρόπος να αντισταθμιστεί η συσσώρευση των αρνητικών μεταλλαγών είναι μέσω του ανασυνδυασμού (Felsenstein and Yokoyama 1976; Barr, Neiman, and Taylor 2005). Εξαιτίας του ανασυνδυασμού δύο "γονεϊκών" γονιδιωμάτων, τα οποία φέρουν διαφορετικές επιβλαβείς μεταλλάξεις, μπορεί να παραχθεί ένα νέο γονιδίωμα το οποίο να φέρει λιγότερες μεταλλάξεις σε σχέση με τα γονεϊκά. Τέλος ο ανασυνδυασμός με έμμεσο τρόπο, αποτρέπει την συνεχή μείωση του δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους ή οποία συμβαίνει λόγω έντονης

αρνητικής επιλογής όταν υπάρχουν πολλές επιβλαβείς μεταλλάξεις (Ohta and Kimura 1971). Η μονογονεϊκή κληρονόμηση δεν επιτρέπει να έρθουν στο προσκήνιο οι ευνοϊκές συνέπειες του ανασυνδυασμού διότι δεν συνυπάρχουν δύο διαφορετικά μόρια mtDNA στο ίδιο άτομο.

Πατρική διαρροή

Με τον όρο διαρροή ορίζεται η περιστασιακή μεταβίβαση πατρικού mtDNA στους απογόνους παράλληλα με τη μεταβίβαση του μητρικού. Κατά συνέπεια η διαρροή είναι μια σημαντική πηγή ετεροπλασμίας. Όπως προαναφέραμε, η πατρική διαρροή mtDNA έχει παρατηρηθεί σε αρκετά είδη. Δεν υπάρχουν ακόμα δεδομένα που αφορούν το ποσοστό της διαρροής, δηλαδή πόσο από το ολικό mtDNA, κατά την διαρροή αντιστοιχεί στον κάθε γονέα, καθώς επίσης δεν υπάρχουν στοιχεία για την έκταση της διαρροής στην φύση καθώς ο αριθμός των ειδών στα οποία παρατηρήθηκε ετεροπλασμία εξ' αιτίας διαρροής παραμένει χαμηλός, σε σύγκριση με τον αριθμό ειδών, των οποίων αλληλουχίες για το mtDNA έχουν κατατεθεί στο GenBank (Ladoukakis and Zouros 2017). Σύμφωνα με την μέχρι τώρα βιβλιογραφία, η πατρική διαρροή θεωρείται ένα φαινόμενο τυχαίο, το οποίο συμβαίνει όταν για κάποιο λόγο οι μηχανισμοί της μονογονεϊκής κληρονόμησης δεν λειτουργούν αποτελεσματικά (Ladoukakis and Zouros 2017). Έτσι η πιθανότητα να συμβεί διαρροή είναι μεγαλύτερη όσο αυξάνεται η γενετική απόσταση μεταξύ των γονέων. Αυτό συμβαίνει εξ' αιτίας της κατάρρευσης του μηχανισμού αναγνώρισης των πατρικών μιτοχονδρίων από το ωάριο λόγω ασυμβατότητας (Ladoukakis and Zouros 2017). Η υπόθεση αυτή υποδηλώνει ότι η διαρροή και κατά συνέπεια η ετεροπλασμία θα είναι πιο συχνή σε διαειδικές διασταυρώσεις παρά σε ενδοειδικές (Kondo *et al.*, 1990; Dokianakis and Ladoukakis, 2014; Radojicic *et al.*, 2015). Οι μηχανισμοί που μέχρι τώρα ελέγχουν την μητρική κληρονόμηση και αποτρέπουν την πατρική διαρροή είναι πολυπληθείς (K. Sato and Sato 2017), το οποίο δηλώνει ότι η πατρική διαρροή είναι ένα συνεχώς εξελισσόμενο φαινόμενο (Radzvilavicius, Lane, and Pomiankowski 2017). Αυτή η κατάσταση, της συνεχούς "εφεύρεσης" νέων μηχανισμών παρεμπόδισης της διαρροής ερμηνεύεται μέσω του ανταγωνισμού μεταξύ των φύλων (sexual conflict), όπου υπάρχει ανταγωνισμός ανάμεσα στην μητρικό και πατρικό έλεγχο κληρονόμησης των μιτοχονδρίων (Radzvilavicius, Lane, and Pomiankowski 2017). Μία άλλη άποψη είναι ότι η διαρροή μπορεί να βρίσκεται υπό τον έλεγχο της φυσικής επιλογής (Dokianakis and Ladoukakis 2014; Radzvilavicius, Lane, and Pomiankowski 2017)

Ετεροπλασμία

Οι επιπτώσεις που μπορεί να έχει η ετεροπλασμία, δηλαδή η συνύπαρξη διαφορετικών μιτότυπων, σε ένα άτομο ποικίλουν. Σε αρκετές περιπτώσεις η ετεροπλασμία έχει συσχετισθεί με ασθένειες στον άνθρωπο (James B. Stewart and

Chinnery 2015). Οι αρνητικές επιπτώσεις της ετεροπλασμίας έχουν φανεί και σε πειράματα που έχουν γίνει σε ποντίκια (Sharpley et al. 2012). Συγκεκριμένα, τα άτομα έφεραν δύο διαφορετικούς μιτότυπους σε αναλογία 1:1, οι οποίοι δεν έφεραν μεταλλαγές και φαινόταν λειτουργικοί όταν βρίσκονταν σε κατάσταση ομοπλασμίας με δεδομένο πυρηνικό υπόβαθρο. Ωστόσο, τα ετεροπλασμικά ζώα εμφάνισαν μεταβολικές, συμπεριφορικές και νοητικές διαταραχές. Αντίθετα, έχουν αναφερθεί και περιπτώσεις όπου η κατάσταση της ετεροπλασμίας είναι ευνοϊκή και επιλέγεται έναντι της ομοπλασμίας. Χαρακτηριστικό παράδειγμα στην *Drosophila melanogaster* όπου φτιάχτηκαν ετεροπλασμικές γραμμές με δύο μιτότυπους, καθένας από τους οποίους έφερε μια διαφορετική επιβλαβή μεταλλαγή. Τα άτομα αυτά διατηρούσαν σταθερά και τους δύο μιτότυπους καθώς ο ένας μιτότυπος αντιστάθμιζε τη λειτουργική αδυναμία του άλλου (Ma, Xu, and O'Farrell 2014).

Ανασυνδυασμός

Ο ανασυνδυασμός στο mtDNA, είναι γνωστό από παλιά ότι συμβαίνει σε φυτά, μύκητες, και πρώτιστα (Stern and Palmer 1984; Taylor 1986; Michael W. Gray 1989). Αντίθετα στα ζώα θεωρούνταν ότι το mtDNA δεν ανασυνδυάζεται, γεγονός που στηρίχθηκε στην θεωρία της μητρικής κληρονομιάς και της ομοπλασμίας (WILSON et al. 1985). Η άποψη αυτή εξακολούθησε να υποστηρίζεται λόγω έλλειψης ενδείξεων ανασυνδυασμού, όπως η αδυναμία ανίχνευσης ανασυνδυασμένων απλοτύπων σε τεχνητές ετεροπλασμικές γραμμές (Elsion et al. 2001; Berlin, Smith, and Ellegren 2004). Πειραματικά δεδομένα παρ' όλα αυτά έδειξαν ότι τα ζωικά μιτοχόνδρια διαθέτουν όλο το ενζυματικό υπόβαθρο για ανασυνδυασμό (Thyagarajan, Padua, and Campbell 1996), και πρώτη άμεση απόδειξη ανασυνδυασμένου ζωικού mtDNA ήταν στα μύδια (E D Ladoukakis and Zouros 2001). Αργότερα ακολούθησαν και άλλες έρευνες όπου εντοπιζόνταν ανασυνδυασμός ζωικού mtDNA σε πολλά είδη (E D Ladoukakis and Zouros 2001; Gwenaël Piganeau, Gardner, and Eyre-Walker 2004; G Piganeau and Eyre-Walker 2004; Tsoulos et al. 2005; Guo et al. 2006; Ciborowski et al. 2007; Ujvari et al. 2007; Hoolahan et al. 2012), συμπεριλαμβανομένων του ανθρώπου (Kraytsberg et al. 2004) και της *Drosophila* (Ma and O'Farrell 2015). Η δυσκολία ανίχνευσης ανασυνδυασμού έγκειται στην σπανιότητα του φαινομένου, καθώς και στο ότι τα ανασυνδυασμένα μόρια μπορεί να "χαθούν" κατά τον τυχαίο διαχωρισμό τους στα θυγατρικά κύτταρα και να μην περάσουν στην γαμετική σειρά, ενώ ακόμα και αν κληροδοτηθούν είναι δύσκολο να εντοπιστούν μεταξύ των άλλων συχνών απλοτύπων (Ma and O'Farrell 2015). Γι' αυτό τον λόγο, οι τεχνικές αλληλούχισης επόμενης γενιάς (NGS) αποτελούν ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση ανασυνδυασμένων mtDNA, δεδομένης της ικανότητάς τους να ανιχνεύουν DNA σε πολύ μικρές ποσότητες (Ladoukakis and Zouros 2017).

Ο ανασυνδυασμός στο mtDNA μπορεί να έχει σημαντικές εξελικτικές συνέπειες. Το mtDNA δεδομένου του αυξημένου μεταλλακτικού ρυθμού και του μικρού δραστικού πληθυσμιακού μεγέθους του είναι επιρρεπές στη συσσώρευση επιβλαβών μεταλλάξεων (LOEWE 2006). Παρ' όλα αυτά όμως το mtDNA δεν έχει καταρρεύσει εδώ και 1,5 δισεκατομμύρια χρόνια, όταν ξεκίνησε η εξελικτική του ιστορία (Lang, Gray, and Burger 1999). Το γεγονός ότι το mtDNA δεν έχει καταρρεύσει μπορεί να οφείλεται στον ανασυνδυασμό. Είναι γνωστό ότι ακόμη και πολύ χαμηλός ρυθμός ανασυνδυασμού θα επαρκούσε για να αντιστρέψει τις συνέπειες του Muller's Ratchet (Gordo and Charlesworth 2000; Neiman and Taylor 2009).

Συνοψίζοντας, το mtDNA αφενός χρειάζεται τη μονογονεϊκή κληρονομηση για να εμποδίσει την εξάπλωση επιβλαβών εγωιστικών μεταλλαγών, και αφετέρου χρειάζεται κάποιον μηχανισμό που θα το αποτρέψει από τη συσσώρευση επιβλαβών μεταλλαγών εξ' αιτίας της τυχαίας γενετικής παρέκκλισης (Muller's Ratchet). Ένας τρόπος να συμβεί αυτό είναι μέσω της μη εκτεταμένης διαρροής πατρικού mtDNA στους απογόνους, η οποία θα επιτρέψει στον ανασυνδυασμό να συμβεί. Ένας εναλλακτικός τρόπος με τον οποίο μπορούν να αναστέλλονται οι συνέπειες του Muller's Ratchet είναι μέσω της δράσης της στενωπού κατά την ωογένεση. Η αυξημένη διακυτταρική ποικιλομορφία που μπορεί να προκύψει από μία «σφιχτή» στενωπό επιτρέπει στην επιλογή να δράσει αυστηρά μεταξύ των ωαρίων, αφαιρώντας εκείνα που φέρουν επιβλαβείς μεταλλάξεις στο mtDNA χωρίς την επέμβαση του ανασυνδυασμού.

Σχετικά με το υπό μελέτη γένος *Drosophila*

Στην *Drosophila* ανιχνεύθηκε για πρώτη φορά πατρική διαρροή mtDNA σε πληθυσμούς *Drosophila simulans*. Η διαρροή αυτή είχε προκύψει από διαειδικό υβριδισμό με *Drosophila mauritiana* (Satta et al. 1988; Matsuura, Fukuda, and Chigusa 1991). Ο υβριδισμός μεταξύ των *Drosophila simulans* και *Drosophila mauritiana* είναι δυνατός καθώς τα 2 είδη έχουν μικρή γενετική απόσταση και διαχωρίστηκαν πριν από περίπου 250 χιλιάδες χρόνια (McDermott and Kliman 2008). Αργότερα πατρική διαρροή παρατηρήθηκε σε αφρικανικούς πληθυσμούς *Drosophila simulans*, οι οποίοι ήταν ποικιλόμορφοι για τους μιτοχονδριακούς απλοτύπους *sil* και *silll*. Από το σύνολο των ατόμων περίπου το 6% ήταν ετεροπλάσμικά και για τους δύο απλοτύπους. Τα άτομα αυτά προέκυψαν από ενδοειδική διαρροή mtDNA (Dean et al. 2003). Αργότερα από τους Nunes et al. (2013) παρατηρήθηκε εκτεταμένη διαρροή πατρικού mtDNA σε φυσικούς πληθυσμούς της *Drosophila melanogaster*, όπου το ποσοστό των ατόμων που έφεραν παραπάνω από έναν μιτότυπους ήταν τουλάχιστον 14%.

Παράλληλα έχει περιγραφεί βιοχημικά ο μηχανισμός παρεμπόδισης της πατρικής διαρροής του mtDNA στην *Drosophila melanogaster* από τους (DeLuca and O'Farrell 2012). Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό το πατρικό mtDNA περιορίζεται δραματικά στο στάδιο της σπερματογένεσης, καταλήγοντας σε σπερματοζώαρια με ένα μεγάλο μιτοχόνδριο, αποτέλεσμα της σύντηξης μιτοχονδρίων, το οποίο δεν φέρει ανιχνεύσιμο mtDNA. Το γεγονός ότι έχει παρατηρηθεί διαρροή στο ίδιο είδος, δηλώνει ότι υπάρχει ενδοειδική ποικιλομορφία όσον αφορά την αυστηρότητα του μηχανισμού, η οποία επιτρέπει την περιστασιακή διαρροή και κατά συνέπεια την ετεροπλασμία. Ένα άλλο αξιοσημείωτο εύρημα σε διαειδικές διασταυρώσεις *Drosophila melanogaster* species subgroup, είναι ότι παρατηρήθηκε διαφορά στη συχνότητα διαρροής μεταξύ αρσενικών και θηλυκών (Dokianakis and Ladoukakis 2014). Πιο συγκεκριμένα, το ποσοστό αρσενικών με διαρροή ήταν πολύ μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό των θηλυκών, υποδηλώνοντας ότι η διαρροή πατρικού mtDNA μπορεί να μην είναι μια στοχαστική διαδικασία, αλλά να υπόκειται σε κάποιου είδους γενετικό έλεγχο.

Όσον αφορά τη δυναμική της ετεροπλασμίας στον χρόνο, οι Sherengul et al. (2006) θέλοντας να διαπιστώσουν αν η διαρροή κληροδοτείται στην επόμενη γενιά, επαναδιασταύρωσαν γόνιμα υβρίδια *Drosophila* με τα πατρικά τους στελέχη. Παρατήρησαν ότι το πατρικό μόριο mtDNA της F1 γενιάς παρατηρήθηκε σε περίπου 60% των διασταυρώσεων της F2 γενιάς. Σε τεχνητές ετεροπλασμικές γραμμές του είδους *D.simulans*, όπου φτιάχτηκαν άτομα τα οποία έφεραν τους απλοτύπους *sill* και *silll*, παρατηρήθηκε, μέσω της επόμενης γενιάς, ότι κατά την κληρονόμηση των δύο αυτών μορίων ασκούσαν πάντα επιλογή κατά του απλοτύπου *silll* και υπέρ του απλοτύπου *sill* (de Stordeur et al. 1989). Σε μια πιο πρόσφατη αντίστοιχη έρευνα στην *D. melanogaster*, όπου δημιουργήθηκαν ετεροπλασμικές γραμμές που μεταδίδουν δύο μιτοχονδριακούς γονότυπους, παρατηρήθηκε έντονα η δράση της επιλογής (Ma, Xu, and O'Farrell 2014). Συγκεκριμένα σε συνθήκες αυξημένης θερμοκρασίας η επιλογή έδρασε ενάντια των μορίων που έφεραν μεταλλάξεις, οι οποίες καθιστούσαν την κυτοχρωμική οξειδάση ευαίσθητη στην θερμοκρασία. Παράλληλα η επιλογή διατήρησε σταθερή ετεροπλασμία μεταξύ δυο γονιδιωμάτων τα οποία έφεραν αντισταθμιστικές αρνητικές μεταλλάξεις.

Σκοπός της εργασίας

Η διαρροή πατρικού mtDNA είναι ένα φαινόμενο που όπως φαίνεται συμβαίνει αρκετά συχνά. Η διαρροή αυτή απαντάται συχνότερα, ή ανιχνεύεται συχνότερα, σε περιπτώσεις υβριδισμού. Η ετεροπλασμία που προκύπτει από τη διαρροή έχει εξελικτική σημασία για τα μιτοχονδριακά γονιδιώματα, καθώς δίνει την ευκαιρία σε έναν μιτότυπο από μια εξελικτική γραμμή να βρεθεί στο ίδιο κύτταρο με έναν μιτότυπο από μια άλλη εξελικτική γραμμή και να ανασυνδυαστεί, αναστρέφοντας

έτσι τις δυσμενείς συνέπειες του Muller's Ratchet. Επιπλέον, είναι ένα φαινόμενο που έχει βρεθεί να συμβαίνει σε πολλές περιπτώσεις φυσικών πληθυσμών, ενώ έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζει μεροληψία ως προς το φύλο. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της πατρικής διαρροής καθώς και της κληρονομής της μιτοχονδριακής ετεροπλασμίας με σκοπό να προσδιοριστεί αν αυτές συμβαίνουν τυχαία ή όχι. Για τη μελέτη των φαινομένων πραγματοποιήθηκαν διαειδικές διασταυρώσεις σε άτομα *Drosophila* για δύο γενιές. Συγκεκριμένα τα ερωτήματα που διερευνήθηκαν στο κομμάτι της πατρικής διαρροής αφορούν το κατά πόσο η διαρροή σχετίζεται με παράγοντες όπως το φύλο, η οικογένεια από την οποία προέρχεται ένα άτομο, οι μιτότυποι που φέρουν οι γονείς, και η ηλικία και η ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας και η γενετική απόσταση των γονέων. Στο κομμάτι της κληρονομής της ετεροπλασμίας τέθηκαν αντίστοιχα ερωτήματα με τα ερωτήματα που φορούν την διαρροή, και συγκεκριμένα κατά πόσο η μεταβίβαση δύο διαφορετικών μιτοχονδριακών απλοτύπων από την μητέρα στους απογόνους εξαρτάται από το φύλο των απογόνων, από την οικογένεια των ατόμων, την ετεροπλασμική κατάσταση και την οικογένεια προέλευσης του θηλυκού γονέα. Τέλος διερευνήθηκε το κατά πόσο τα φαινόμενα της διαρροής και της κληρονομής της ετεροπλασμίας σχετίζονται και με τι τρόπο.

Υλικά και Μέθοδοι

Διασταυρώσεις

Διαειδικές διασταυρώσεις

Διασταυρώσεις P γενιάς

Για τη μελέτη της μιτοχονδριακής ετεροπλασμίας πραγματοποιήσαμε μια σειρά από διαειδικές διασταυρώσεις. Ο σχεδιασμός των διασταυρώσεων βασίστηκε στις αναπαραγωγικές σχέσεις μεταξύ των ειδών του *Drosophila melanogaster species* subgroup (Daniel Lachaise et al. 1986; D Lachaise et al. 2000; LEE and WATANABE 1987; Cariou et al. 2001; Δοκιανάκης 2011) (Παράρτημα, Πίνακας 21). Στην παρούσα εργασία τα άτομα της πατρικής γενιάς (P γενιά) αποτελούνταν από θηλυκά άτομα *D.simulans* με αρσενικά άτομα *D.mauritiana*. Από την συγκεκριμένη διασταύρωση είναι γνωστό ότι προκύπτουν γόνιμα θηλυκά υβρίδια και στείρα αρσενικά (LEE and WATANABE 1987) τα οποία αποτέλεσαν τα υβρίδια της F1 γενιάς. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήσαμε 4 διαφορετικά εργαστηριακά στελέχη, καθένα από τα οποία έφερε διαφορετικό μιτότυπο με αποτέλεσμα στην πατρική γενιά να έχουμε διασταυρώσεις με 4 διαφορετικούς συνδυασμούς μιτότυπων (Τύποι διασταύρωσης) (Πίνακας 1). Για κάθε τύπο διασταύρωσης πραγματοποιήσαμε έναν αριθμό διασταυρώσεων (Πίνακας 1) τοποθετώντας σε ένα σωλήνα καλλιέργειας ένα θηλυκό άτομο (*D.simulans*) με τρία αρσενικά (*D.mauritiana*) (Εικόνα 2).

Πίνακας 1: Συνδυασμοί μιτότυπων -τύποι διασταυρώσεων- που πραγματοποιήθηκαν στις διασταυρώσεις P και της F1 γενιάς. Οι συμβολισμοί *si* και *mau* αντιστοιχούν στα είδη *D. simulans* και *D. mauritiana* αντίστοιχα. Τα σύμβολα I και II αντιστοιχούν σε παραλλαγές (variants) μιτότυπων του ίδιου είδους.

Τύπος Διασταύρωσης	Μιτότυποι P γενιάς (P)	Αριθμός διασταυρώσεων P	Μιτότυπος backcross	Αριθμός διασταυρώσεων F1
1	<i>sil x mauI</i>	6	<i>simII</i>	116
2	<i>sil x mauII</i>	6	<i>simII</i>	179
3	<i>sill x mauI</i>	9	<i>simI</i>	244
4	<i>sill x mauII</i>	3	<i>simI</i>	63
		Σύνολο 24		Σύνολο 602

Διασταυρώσεις F1 γενιάς

Τα αρσενικά υβρίδια της F1 γενιάς αφού συλλέχθηκαν, διατηρήθηκαν σε απόλυτη αιθανόλη, ενώ τα θηλυκά υβρίδια ένα προς ένα επαναδιασταυρώνονταν με αρσενικά *Drosophila simulans* (backcross), τα οποία ήταν μεν *simulans* όπως και η μητέρα της πατρικής γενιάς αλλά διέθεταν μιτότυπο διαφορετικό από αυτήν (Πίνακας 1) (Εικόνα 2). Με αυτό τον τρόπο μπορούσαμε στην F2 γενιά να διακρίνουμε την ετεροπλάσμία που κληροδοτήθηκε από τη μητέρα στους απογόνους από τη διαρροή πατρικού mtDNA. Όπως και στις διασταυρώσεις της πατρικής γενιάς, έτσι και για τις F1 πραγματοποιήσαμε έναν αριθμό διασταυρώσεων (Πίνακας 1), όπου σε κάθε διασταύρωση τοποθετήσαμε σε κάθε σωλήνα καλλιέργειας ένα θηλυκό υβρίδιο με τρία αρσενικά *D.simulans* (Εικόνα 2). Οι υβριδικοί απόγονοι των παραπάνω διασταυρώσεων αποτέλεσαν τα άτομα της F2 γενιάς (Εικόνα 2), οι οποίοι αφού συλλέχθηκαν διατηρήθηκαν σε απόλυτη αιθανόλη.

Διαδικασία και συνθήκες διασταυρώσεων

Τα στελέχη των ειδών *Drosophila* διατηρούνταν σε θάλαμο στο εργαστήριο Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης με θερμοκρασία 25°C και φωτοπερίοδο 12h, μέσα σε σωλήνες καλλιέργειας κλεισμένους με βαμβάκι. Η τροφή τους αποτελούνταν από ένα μείγμα άγαρ, σουκρόζης, μαγιάς και καλαμποκάλευρου (Ashburner, Golic, and Hawley 2005).

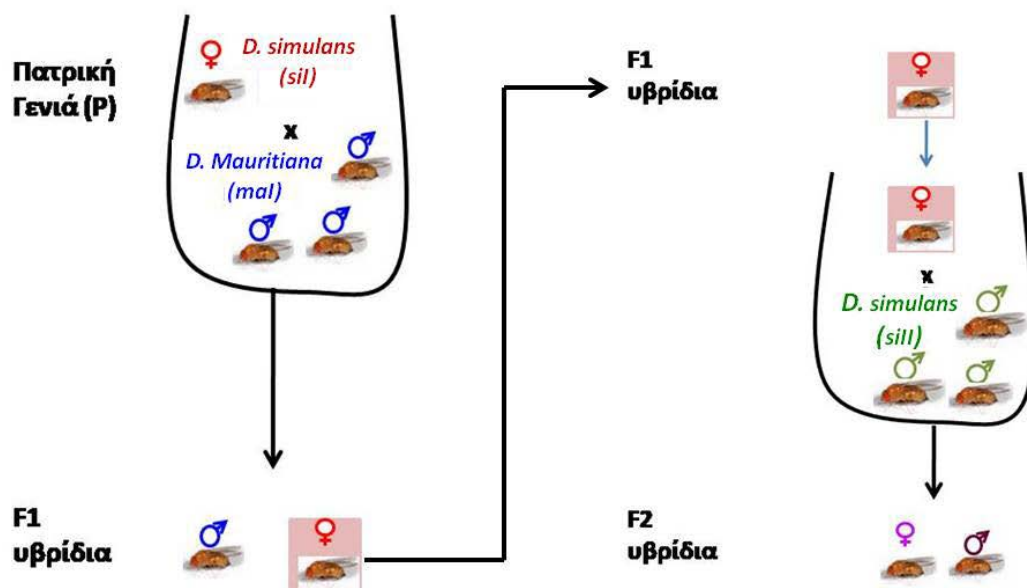
Διασταυρώσεις Ρ γενιάς

Οι διασταυρώσεις της πατρικής γενιάς (Ρ) πραγματοποιήθηκαν με παρθένα θηλυκά ηλικίας 3-5 ημερών και αρσενικά ίδιας ή μεγαλύτερης ηλικίας. Τα παρθένα θηλυκά προέκυπταν από το άδειασμα των σωλήνων καλλιέργειας από μύγες, συλλογή νεαρών μυγών μέσα σε διάστημα έξι ωρών και προσδιορισμό του φύλου τους. Οι διασταυρώσεις έγιναν σε θερμοκρασία 25°C, ενώ σε κάθε σωλήνα τοποθετήσαμε ένα θηλυκό άτομο με τρία αρσενικά (μία διασταύρωση), ώστε να εξασφαλιστεί η επιτυχής σύζευξη (Εικόνα 2). Οι γονείς αφήνονταν στους σωλήνες μέχρι την εμφάνιση *ryrae* (περίπου 15 μέρες) και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε άλλους σωλήνες, ώστε να μην μπερδευτούν με τους απογόνους. Η μεταφορά αυτή πραγματοποιήθηκε από 2 έως 5 φορές για τις διαφορετικές ομάδες γονέων (ένα θηλυκό+ τρία αρσενικά). Οι σωλήνες με *ryrae* (F1 γενιά), από τους οποίους είχαν αφαιρεθεί οι γονείς, διατηρούνταν σε θάλαμο με σταθερή θερμοκρασία 18 °C. Οι απόγονοι (F1 γενιά) αφαιρούνταν το αργότερο κάθε 18 h, και γινόταν προσδιορισμός του φύλου τους. Το χρονικό διάστημα των 18 ωρών στην θερμοκρασία των 18 °C εξασφαλίζει ότι οι απόγονοι δεν θα έχουν ωριμάσει αναπαραγωγικά από την στιγμή της εκκόλαψης του ενηλίκου. Με αυτόν τον τρόπο αποφύγαμε την πιθανή σύζευξη των απογόνων μεταξύ τους. Μετά από κάθε αφαίρεση των F1 απογόνων και προσδιορισμό του φύλου τους, τοποθετούσαμε τα αρσενικά σε απόλυτη αιθανόλη, ενώ διατηρήσαμε τα θηλυκά σε σωλήνες για 4-6 μέρες και έπειτα τα χρησιμοποιήσαμε για την επόμενη σειρά διασταυρώσεων.

Διασταυρώσεις F1 γενιάς

Επειδή η ετεροπλασμία σε αυτές τις διαειδικές διασταυρώσεις είναι σπάνια στους θηλυκούς απογόνους (αντίθετα είναι συχνή στους αρσενικούς), κι επειδή θέλαμε να ελέγξουμε την κληρονόμηση της ετεροπλασμίας στην F2 γενιά, διασταυρώσαμε όλα τα θηλυκά υβρίδια της F1 γενιάς ένα προς ένα, με αρσενικά *D.simulans*. Οι διαφορετικοί τύποι διασταυρώσεων φαίνονται στον Πίνακα 1. Με αυτό τον τρόπο, κρατούσαμε τους απογόνους (F2 γενιά) του κάθε υβριδικού θηλυκού. Μπορούσαμε εκ των υστέρων να ελέγξουμε ποια θηλυκά ήταν ετεροπλασμικά και να ανιχνεύσουμε την κληρονόμηση της ετεροπλασμίας των θηλυκών στους απογόνους τους. Και σε αυτήν την περίπτωση των F1 διασταυρώσεων, το κάθε σωληνάκι περιείχε ένα θηλυκό με τρία αρσενικά άτομα (μία διασταύρωση) σε θερμοκρασία 25°C (Εικόνα 2). Οι γονείς F1 μεταφέρονταν σε δεύτερο σωληνάκι με την εμφάνιση *ryrae* (περίπου μετά από 10-15 ημέρες). Στο δεύτερο σωληνάκι οι γονείς παρέμεναν για 11 ημέρες και έπειτα αφαιρούνταν. Μετά την αφαίρεση τους, διατηρούσαμε τα θηλυκά F1 (μητέρες) σε απόλυτη αιθανόλη. Από τη στιγμή εμφάνισης του πρώτου ενηλίκου ατόμου στην F2 γενιά αφαιρούσαμε τους απογόνους για 10-15 ημέρες. Η συλλογή τους γίνονταν περίπου κάθε 24 ώρες ενώ

οι σωλήνες ανάπτυξης βρίσκονταν σε θερμοκρασία 25°C. Μετά την συλλογή τους διατηρούσαμε τα άτομα της F2 γενιάς σε απόλυτη αιθανόλη.



Εικόνα 2: Διαδικασία που ακολουθήθηκε κατά τις διασταυρώσεις στην P και την F1 γενιά. Τα σύμβολα για του μιτότυπους *sil*, *mal* και *sill* αποτελούν ενδεικτικά σύμβολα του τύπου διασταύρωσης 1 όπως φαίνεται στον Πίνακα 1.

Εξαγωγή ολικού DNA

Η εξαγωγή ολικού DNA πραγματοποιήθηκε για κάθε άτομο χωριστά (single fly extraction) με βάση το πρωτόκολλο των O'Neill et al. 1992 (STE extraction method). Επειδή τα άτομα ήταν διατηρημένα στην αιθανόλη, πριν την εξαγωγή τοποθετήσαμε την κάθε μύγα σε 50μl TE buffer (10mM Tris-ClpH 8.0, 1mM EDTA, αποστειρωμένο nano-pure H₂O) για 16-17 ώρες στους 4°C με σκοπό να απομακρυνθεί η αιθανόλη.

Πρωτόκολλο εξαγωγής DNA με την μέθοδο STE

Προσθήκη 50μl Squishing buffer (10 mM Tris-Cl pH 8.2, 1 mM EDTA, 25 mM NaCl) στον ιστό σε 1,5μl Eppendorf tube

- ομογενοποίηση του ιστού με pestle
- προσθήκη 2μl Proteinase K (20mg/ μl)
- Επώαση στους 55°C για 1-3 ώρες
- Επώαση στους 95°C για 2-5'
- Φυγοκέντρηση για 5' (13.000 rpm)

Σε όλα τα υβρίδια από τα οποία πραγματοποιήθηκε εξαγωγή ολικού DNA, ελέγξαμε την επιτυχία της εξαγωγής μέσω PCR με τους εκκινητές που πολλαπλασίαζαν το μητρικό mtDNA.

Έλεγχος ετεροπλασμίας με αντιδράσεις PCR

Μετά την εξαγωγή ολικού DNA, ελέγξαμε τα υβρίδια F1 και F2 για την ύπαρξη των μητρικών και πατρικών απλοτύπων με την μέθοδο αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) με την χρήση ειδικών, για τον κάθε μιτότυπο, εκκινητών. Οι περισσότεροι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε υπήρχαν στο εργαστήριο πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης και είχαν σχεδιαστεί και χρησιμοποιηθεί σε παλαιότερες εργασίες (Παράρτημα, Πίνακας 22)

Κάθε αντίδραση PCR πραγματοποιούταν σε όγκο 15 μl και περιείχε 1 μl από το διάλυμα εξαγωγής (το οποίο περιέχει και DNA), 0,4μM από το κάθε εκκινητή, 1.5mM MgCl₂ για τα ζεύγη εκκινητών 1-4 (Παράρτημα, Πίνακας 22) και 2mM MgCl₂ για το ζεύγος εκκινητών 5 (Παράρτημα, Πίνακας 22). 0.2 mM dNTPs, 0,4μM BSA, 1U/μl Taq DNA Polymerase, 1x Taq Buffer και αποστειρωμένο nano-pure H₂O. Τα προϊόντα των αντιδράσεων οπτικοποιήθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 1% w/v με χρώση βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr).

Πριν της διεξαγωγή αντιδράσεων PCR στα δείγματα πραγματοποιήσαμε μια σειρά αντιδράσεων PCR για κάθε ζεύγος εκκινητών, με σκοπό να εντοπίσουμε τις κατάλληλες συνθήκες στις οποίες οι εκκινητές πολλαπλασίαζαν το επιθυμητό προϊόν έναντι του μη επιθυμητού. Οι παράμετροι που μεταβάλλαμε ήταν η θερμοκρασία υβριδοποίησης, η συγκέντρωση MgCl₂, και οι χρόνοι υβριδοποίησης και επιμήκυνσης του προϊόντος. Οι έλεγχοι για τις κατάλληλες συνθήκες πραγματοποιήθηκαν σε άτομα των γονικών στελεχών και οι βέλτιστες συνθήκες που επιλέχθηκαν για κάθε ζεύγος φαίνονται στον Πίνακας 23 (Παράρτημα).

Για δύο ζεύγη εκκινητών Mall_1699_F/MaurI_2531_R και Mall_1819_F/MaurI_2531_R, προκειμένου να επιτευχθεί ειδικότητα ως προς τους *mal* και *mali* μιτότυπους αντίστοιχα, εφαρμόσαμε την μέθοδο touch-down PCR (Don et al. 1991; Wu et al. 2005). Ιδιαίτερο χαρακτηριστικό αυτής της τεχνικής είναι η σταδιακή μείωση της θερμοκρασίας υβριδοποίησης των εκκινητών στο υπόστρωμα ανά κύκλο, με αφετηρία μία θερμοκρασία μεγαλύτερη από τη θερμοκρασία τήξης των εκκινητών (Παράρτημα Πίνακας 23) .Στη συνέχεια, η θερμοκρασία υβριδοποίησης φτάνει σε ένα σημείο μικρότερο της θερμοκρασίας τήξης των εκκινητών και παραμένει σταθερή για έναν αριθμό κύκλων. Η προσέγγιση αυτή εμποδίζει την ενίσχυση ανεπιθύμητων προϊόντων, καθώς υπάρχει μεγαλύτερη αυστηρότητα στην εκθετική φάση της αντίδρασης που είναι και η πιο σημαντική για τον επιλεκτικό πολλαπλασιασμό του επιθυμητού προϊόντος. Η ρύθμιση των

παραμέτρων για το συγκεκριμένο τύπο PCR βασίστηκε στο πρωτόκολλο των (Korbie and Mattick 2008; M.-E. Παρακατσελάκη 2016).

PCR σε F1 υβρίδια:

Αρχικά πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις PCR σε θηλυκά και αρσενικά άτομα της F1 γενιάς για την ανίχνευση των μητρικών και πατρικών απλοτύπων. Η ανίχνευση του μητρικού απλοτύπου δηλώνει την σωστή εξαγωγή DNA, καθώς και το ότι οι διασταυρώσεις διεκπεραιώθηκαν σωστά. Η ανίχνευση του πατρικού μιτότυπου δηλώνει την ύπαρξη ετεροπλασμίας μέσω διαρροής. Συνολικά εξετάστηκαν όλα τα θηλυκά άτομα F1 και ένα δείγμα αρσενικών. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε τύπο διασταύρωσης φαίνονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τους διαφορετικούς τύπους διασταυρώσεων σε θηλυκά και αρσενικά υβρίδια F1 για την ανίχνευση μητρικών και πατρικών μιτότυπων.

Τύπος Διασταύρωσης (♀ x ♂)	Εκκινητές για μητρικό mtDNA	Εκκινητές για πατρικό mtDNA
1 (<i>sil</i> x <i>mal</i>)	Sil_1737_F/ Sil_2531_R (ανιχνεύει <i>sil</i>)	Mall_1819_F/ MaurI_2531_R (ανιχνεύει <i>mall</i>)
2 (<i>sil</i> x <i>mall</i>)		Mall_1699_F/ MaurI_2531_R (ανιχνεύει <i>mall</i>)
3 (<i>sill</i> x <i>mal</i>)	Sill_1737_F/ Sill_2531_R (ανιχνεύει <i>sill</i>)	Sil_1737_F/ MaurI_2531_R (ανιχνεύει <i>mal</i> και <i>mall</i>)
4 (<i>sill</i> x <i>mall</i>)		

PCR σε F2 υβρίδια:

Αφού χαρακτηρίσαμε τα θηλυκά της F1 γενιάς σαν ετεροπλασμικά ή ομοπλασμικά, πραγματοποιήσαμε αντιδράσεις PCR σε ένα δείγμα υβριδίων της F2 γενιάς. Το δείγμα αυτό δεν ήταν τυχαίο αλλά τα άτομα που εξετάσαμε προέρχονταν από θηλυκά F1 τα οποία είχαν χαρακτηριστεί σαν ετεροπλασμικά ή από θηλυκά F1 που στην ύπαρξη του πατρικού μιτότυπου είχαν χαρακτηριστεί σαν ομοπλασμικά αλλά προέρχονταν από οικογένειες στις οποίες παρατηρούνταν μεγάλη συχνότητα διαρροής πατρικού mtDNA. Στα υβρίδια F2 εξετάσαμε τα άτομα για την ύπαρξη τριών διαφορετικών μιτότυπων μέσω PCR. Αρχικά ανιχνεύσαμε το συχνό μιτότυπο της μητέρας τους (mtDNA που είχε προέλθει από το P θηλυκό), ώστε να επιβεβαιωθεί ότι οι διασταυρώσεις και η εξαγωγή DNA έγιναν σωστά. Έπειτα ελέγξαμε για τον σπάνιο μιτότυπο της μητέρας (mtDNA που είχε διαρρεύσει από το P αρσενικό), ώστε να εξεταστεί το ενδεχόμενο κληρονόμησης της ετεροπλασμίας. Τέλος ελέγξαμε την ύπαρξη του πατρικού μιτότυπου, ώστε να εξεταστεί το ενδεχόμενο διαρροής πατρικού mtDNA. Εξετάσαμε 10 θηλυκά και 10 αρσενικά άτομα από κάθε οικογένεια (απόγονοι F2 που προέρχονταν από ένα F1 υβρίδια,

Εικόνα 2), για 19 οικογένειες που είχαν προέλθει από ετεροπλάσμικά F1 θηλυκά και για 20 οικογένειες που είχαν προέλθει από ομοπλάσμικά F1 θηλυκά. Όλες οι οικογένειες προέρχονταν από τους τύπους διασταύρωσης 1 και 2 (Πίνακας 1). Οι εκκινητές που χρησιμοποιήσαμε για κάθε τύπο διασταύρωσης φαίνονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν για τους διαφορετικούς τύπους διασταυρώσεων σε θηλυκά και αρσενικά υβρίδια F2 για την ανίχνευση των δύο μητρικών και του ενός πατρικού μιτότυπου.

Τύπος Διασταύρωσης	F1 Διασταύρωση	Εκκινητές για συχνό μητρικό mtDNA	Εκκινητές για σπάνιο μητρικό mtDNA	Εκκινητές για πατρικό mtDNA
1	♀ (<i>sil / mal</i>) x ♂ <i>sill</i>	Sil_1737_F/ Sil_2531_R (ανιχνεύει <i>sil</i>)	Mall_1819_F/ MaurI_2531_R and Sil_1737_F/ MaurI_2531_R (ανιχνεύουν <i>mal</i>)	Sill_1737_F/ Sill_2531_R (ανιχνεύει <i>sill</i>)
2	♀ (<i>silxmall</i>) x ♂ <i>sill</i>		Mall_1699_F/ MaurI_2531_R and Sil_1737_F/ MaurI_2531_R (ανιχνεύουν <i>mall</i>)	

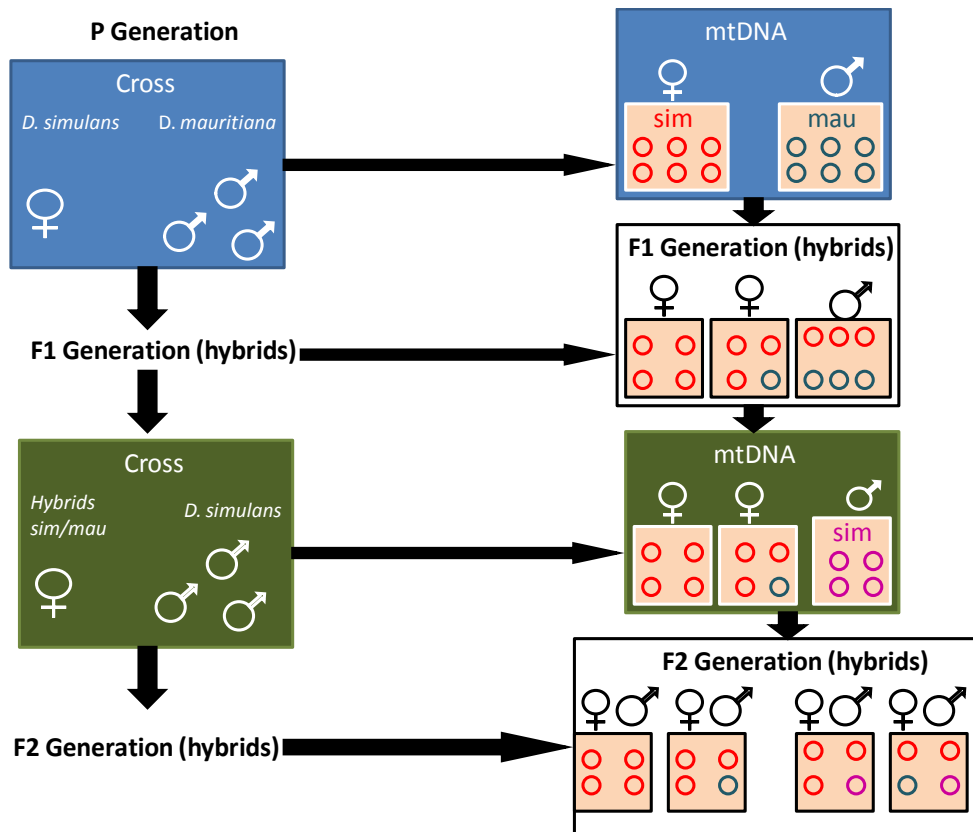
Σύνοψη διασταυρώσεων και μιτότυπων που ανιχνεύθηκαν

Συνοψίζοντας, πραγματοποιήσαμε υβριδικές διασταυρώσεις σε άτομα *Drosophila* για δύο γενιές. Η πατρική γενιά (P) αποτελούνταν από θηλυκά άτομα *D.simulans* και αρσενικά άτομα *D.mauritiana* (Εικόνα 3, μπλε πλαίσιο (Cross)). Κάθε διασταύρωση αποτελούνταν από ένα θηλυκό και τρία αρσενικά άτομα για να εξασφαλίσουμε την επιτυχή σύζευξη. Για τους απογόνους που προέκυψαν από κάθε διασταύρωση δεν μπορούμε με βεβαιότητα να πούμε ότι προέκυψαν από την σύζευξη του θηλυκού με ένα αρσενικό άτομο καθώς η πολυανδρία είναι μια συμπεριφορά που παρατηρείται στην *D.simulans* (Ala-Honkola and Manier 2016) Η πατρική γενιά ήταν ομοπλάσμική για τους απλοτύπους *si* και *ma* (Εικόνα 3, μπλε πλαίσιο (mtDNA)). Από τις διασταυρώσεις της P γενιάς προέκυψαν τα υβρίδια της F1 γενιάς. Στα υβρίδια αυτά αναμέναμε να συμβεί πατρική διαρροή στο μεγαλύτερο ποσοστό των αρσενικών υβριδίων και σε ένα μικρό ποσοστό των θηλυκών (Εικόνα 3, (F1 generation hybrids)), καθώς οι ίδιες διασταυρώσεις είχαν πραγματοποιηθεί από τους Dokianakis & Ladoukakis(2014). Αυτό σημαίνει ότι τα αρσενικά θα είχαν δύο μιτότυπους *si* και *ma*, ενώ τα περισσότερα θηλυκά θα έφεραν μόνο τον μητρικό μιτότυπο *si*, και ένα μικρό ποσοστό των θηλυκών θα έφερε και τον μιτότυπο *ma*. Όλα τα αρσενικά F1 αποθηκεύτηκαν σε απόλυτη αιθανόλη και όλα τα θηλυκά F1 επαναδιασταυρώθηκαν με αρσενικά *D.simulans* (Εικόνα 3, πράσινο πλαίσιο (Cross)),

τα οποία έφεραν διαφορετικό μιτότυπο *si* από εκείνο που έφεραν τα F1 υβρίδια (συνολικά 602 διασταυρώσεις) (Εικόνα 3, πράσινο πλαίσιο(mtDNA)). Και σε αυτήν την περίπτωση κάθε διασταύρωση αποτελούνταν από ένα θηλυκό F1 και τρία αρσενικά *D.simulans* με σκοπό να εξασφαλίσουμε την επιτυχή σύζευξη. Από τις διασταυρώσεις αυτές προέκυψε η υβριδική γενιά F2 την οποία συλλέξαμε και αποθηκεύσαμε σε απόλυτη αιθανόλη.

Μετά το πέρας των διασταυρώσεων ελέγξαμε τα υβρίδια της F1 γενιάς για διαρροή πατρικού mtDNA (συνολικά ελέγξαμε 731 άτομα). Ο έλεγχος έγινε με αντιδράσεις PCR, όπου στα ετεροπλασμικά άτομα ενισχύονταν ο μητρικός μιτότυπος *si* και ο πατρικός μιτότυπος *ma*, ενώ αντίθετα στα ομοπλασμικά άτομα ενισχύονταν μόνο ο μητρικός μιτότυπος *si*. Όπως αναμενόταν ένα μικρό ποσοστό των θηλυκών F1 υβριδίων έφερε τον πατρικό μιτότυπο *ma* μαζί με τον μητρικό *si*. Αφού καταγράψαμε τα ετεροπλασμικά υβρίδια στην F1 γενιά, παρατηρήσαμε ότι η ετεροπλασμία στα θηλυκά ήταν συχνότερη σε κάποιες οικογένειες σε σχέση με κάποιες άλλες (δες αποτελέσματα). Από τις οικογένειες εκείνες που εμφάνιζαν υψηλά ποσοστά διαρροής στα θηλυκά επιλέξαμε την F2 γενιά. Οι οικογένειες F2 προέρχονταν από ετεροπλασμικά και ομοπλασμικά F1 θηλυκά, τα οποία ανήκαν όλα σε οικογένειες με υψηλά ποσοστά ετεροπλασμίας. Ο λόγος για τον οποίο επιλέξαμε τις οικογένειες της F2 με τέτοιο τρόπο, είναι επειδή υποθέσαμε ότι η διαρροή σε πολλά φαινομενικά ομοπλασμικά F1 θηλυκά θα μπορούσε να είναι υπαρκτή αλλά μη ανιχνεύσιμη, εξαιτίας χαμηλών συχνοτήτων του *ma* μιτότυπου. Με αυτόν τον τρόπο θα μπορούσαμε να εντοπίσουμε τον σπάνιο μιτότυπο *ma* στην F1 γενιά μέσω κληρονόμησής του στην F2.

Στα υβρίδια της F2 γενιάς ελέγξαμε για διαρροή πατρικού mtDNA και για κληρονόμηση μητρικής ετεροπλασμίας (Εικόνα 3, (F2 Generation (hybrids)) (συνολικά ελέγξαμε 780 άτομα). Ο έλεγχος έγινε επίσης με αντιδράσεις PCR, όπου στα ετεροπλασμικά άτομα λόγω διαρροής ενισχύονταν μαζί με τον μητρικό μιτότυπο *si* και ο πατρικός μιτότυπος *si*, ενώ στα ετεροπλασμικά άτομα λόγω κληρονόμησης ενισχύονταν ο σπάνιος μητρικός μιτότυπος *ma* (Εικόνα 3, (F2 Generation (hybrids))).



Εικόνα 3: Σύνοψη διασταυρώσεων που πραγματοποιήθηκαν στις 2 γενιές και μιτότυποι των γονέων και των απογόνων. Τα δύο αριστερά πλαίσια δηλώνουν τις διασταυρώσεις της P γενιάς (μπλε πλαίσιο) και της F1 γενιάς (πράσινο πλαίσιο). Σε κάθε πλαίσιο φαίνονται ο αριθμός, το φύλο και τα είδη των ατόμων που διασταυρώθηκαν σε κάθε περίπτωση. Τα δεξιά πλαίσια δηλώνουν τους μιτοχονδριακούς απλοτύπους που αντιστοιχούν στα άτομα που δείχνουν τα βέλη από την αριστερή στήλη. Στην P γενιά (μπλε πλαίσιο) είχαμε ομοπλασικά θηλυκά για τον μιτότυπο *si* και ομοπλασικά αρσενικά για τον μιτότυπο *ma*. Στην F1 γενιά (Λευκό πλαίσιο (F1 Generation (hybrids)) είχαμε ετεροπλασικά αρσενικά και θηλυκά υβρίδια *si/mau*, και θηλυκά υβρίδια ομοπλασικά *si*. Στις διασταυρώσεις της F1 (πράσινο πλαίσιο) γενιάς είχαμε ομοπλασικά και ετεροπλασικά F1 θηλυκά υβρίδια να διασταυρώνονται με ομοπλασικά αρσενικά για τον μιτότυπο *si*. Τέλος στην F2 γενιά (Λευκό πλαίσιο (F2 Generation (hybrids)) είχαμε αρσενικά και θηλυκά ομοπλασικά με τον μιτότυπο *si* (μητρικός μιτότυπος), ετεροπλασικά λόγω κληρονομής με τους μιτότυπους *si* και *mau* (μητρικοί μιτότυποι), ετεροπλασικά λόγω διαρροής με δυο διαφορετικούς μιτότυπους *si* (ένας μητρικός και ένας πατρικός μιτότυπος) και τριπλασικά με τους δύο διακριτούς *si* μιτότυπους (μητρικός και πατρικός) και τον *ma* μιτότυπο (σπάνιος μητρικός).

Στατιστική ανάλυση

Μετά το πέρας των αντιδράσεων PCR, αναλύσαμε στατιστικά τα δεδομένα που προέκυψαν. Στα υβρίδια της F1 γενιάς εξετάσαμε το κατά πόσο η διαρροή πατρικού mtDNA σχετίζεται με το φύλο των ατόμων, την οικογένεια των ατόμων, τους μιτότυπους που φέρουν οι γονείς (τύπος διασταύρωσης), και την ηλικία της μητέρας. Στα υβρίδια της F2 γενιάς πραγματοποιήσαμε τριών τύπων έλεγχους. Αρχικά, όπως και στην F1 γενιά, μελετήσαμε το φαινόμενο της διαρροής, και συγκεκριμένα ελέγξαμε εάν επηρεάζεται από το φύλο των ατόμων, από την οικογένεια των ατόμων, από την ετεροπλασική κατάσταση των μητέρων, την οικογένεια προέλευσης των μητέρων, καθώς και την γενετική απόσταση των

γονέων. Έχει διατυπωθεί η υπόθεση ότι όσο μεγαλύτερη είναι η γενετική απόσταση των γονέων τόσο πιθανότερο είναι να συμβεί πατρική διαρροή (Rokas, Ladoukakis, and Zouros 2003). Σε δεύτερη φάση εξετάσαμε το φαινόμενο της κληρονομήσιμης ετεροπλασμίας, όπου μελετήσαμε εάν σχετίζεται με τους ίδιους παράγοντες που ελέγχθηκαν στην πατρική διαρροή. Τέλος εξετάστηκε αν τα φαινόμενα της πατρικής διαρροής και την μητρικής κληρονομής της ετεροπλασμίας συσχετίζονται.

Για τη στατιστική ανάλυση των δεδομένων χρησιμοποιήσαμε τη γλώσσα προγραμματισμού R (version 3.5.2). Τα περισσότερα δεδομένα είχαν τη μορφή παρουσία/απουσία ετεροπλασμίας σε άτομα ή σε οικογένειες ατόμων για τα φαινόμενα της διαρροής και της κληρονομής ετεροπλασμίας χωριστά. Σε κάθε περίπτωση η παρουσία/απουσία ετεροπλασμίας συσχετιζόταν με διάφορες παραμέτρους των ατόμων (φύλο, οικογένεια, ηλικία μητέρας, ετεροπλασμική κατάσταση μητέρας, οικογένεια προέλευσης μητέρας και γενετική απόσταση των γονέων) ή των οικογενειών (τύπος διασταύρωσης, ετεροπλασμική κατάσταση μητέρας και οικογένεια προέλευσης μητέρας) αντίστοιχα. Εκτός από τα δεδομένα παρουσίας/απουσίας ετεροπλασμίας, είχαμε και δεδομένα ποσοστού ετεροπλασμίας σε οικογένειες (μόνο στις F2 οικογένειες) για τα φαινόμενα της διαρροής και της κληρονομής ετεροπλασμίας χωριστά. Τα δεδομένα αυτά τα συσχετίσαμε με τον παράγοντα «ετεροπλασμική κατάσταση μητέρας».

Για τον έλεγχο των παραπάνω υποθέσεων, όταν τα δεδομένα είχαν την μορφή συχνοτήτων ετεροπλασμίας (προυσία/απουσία), εφαρμόσαμε το στατιστικό τεστ χ^2 (Pearson's chi-square) (Dytham 2011; Nayak and Hazra 2011). Σε περιπτώσεις όπου η προσέγγιση χ^2 δεν ήταν αξιόπιστη, επειδή είχαμε πολύ ασύμμετρες τιμές στους πίνακες ή μικρά δείγματα, εξετάσαμε τα δεδομένα επιπλέον με το στατιστικό τεστ: Fisher's exact test (Kang and Ahn 2008) είτε κάναμε χ^2 τεστ με προσομοιωμένη τιμή p-value χρησιμοποιώντας την μέθοδο της επανάληψης με μετάθεση (permutations) με 1000 επαναλήψεις. Στις περιπτώσεις που είχαμε αριθμητικά δεδομένα ποσοστού ετεροπλασμίας σε οικογένειες αρχικά κάναμε έλεγχο για την κανονικότητα των δεδομένων (Shapiro-Wilk normality test) (Dytham 2011) και για την ομοιογένεια των διασπορών (Levene's Test for Homogeneity of Variance) (Dytham 2011). Έπειτα λόγω της μη κανονικής κατανομής των δεδομένων εφαρμόσαμε μη παραμετρικούς ελέγχους (Wilcoxon rank sum test και Kruskal-Wallis rank sum test) (Dytham 2011) για να ελέγξουμε κατά πόσο υπάρχουν διαφορές στα ποσοστά της ετεροπλασμίας μεταξύ των οικογενειών σε σχέση με τον παράγοντα «ετεροπλασμία στην μητέρα». Το επίπεδο σημαντικότητας σε όλους τους στατιστικούς ελέγχους ορίστηκε στο 0,05 (5%).

Αποτελέσματα

Γενικές παρατηρήσεις

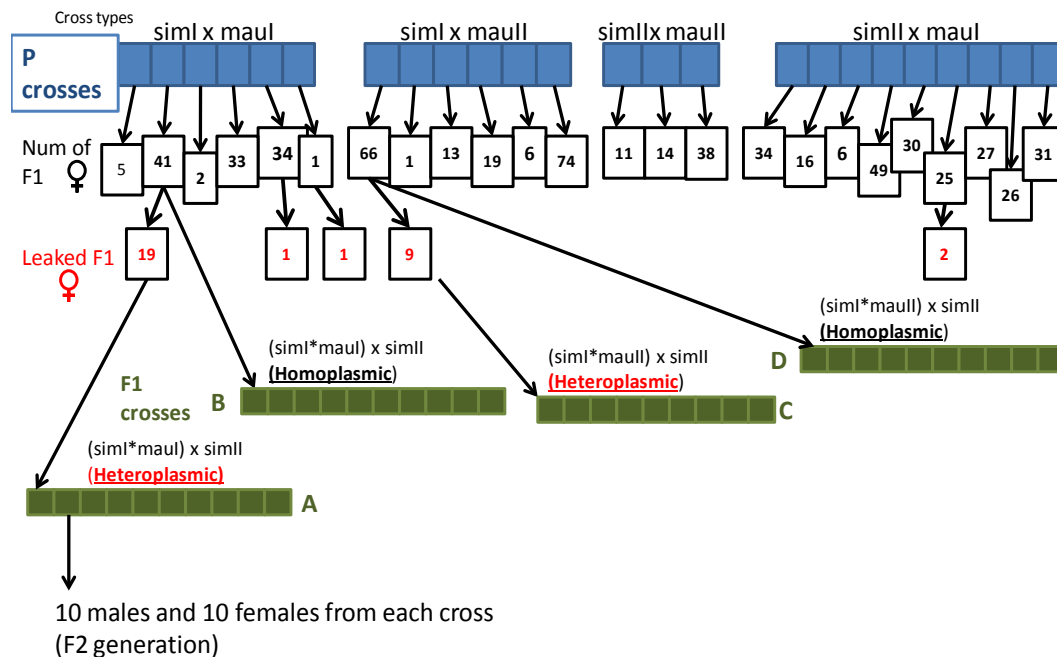
Συνολικά στην πατρική γενιά κάναμε τέσσερις τύπους διασταυρώσεων, διασταυρώνοντας άτομα με διαφορετικούς μιτότυπους (Πίνακας 1). Για κάθε έναν τύπο διασταύρωσης πραγματοποιήσαμε έναν αριθμό διασταυρώσεων, ο οποίος ήταν αρχικά ίδιος για όλους τους τύπους διασταυρώσεων (10 διασταυρώσεις). Κάθε μια διασταύρωση αποτελούνταν από ένα θηλυκό και 3 αρσενικά άτομα. Πρέπει να τονιστεί ότι επρόκειτο για διαειδικές διασταυρώσεις οι οποίες δεν είναι εύκολα επιτυχείς. Στο τέλος ο αριθμός των επιτυχών διασταυρώσεων ανά τύπο διασταύρωσης κυμαινόταν από 3-9 (Πίνακας 1, Αριθμός διασταυρώσεων P)

Τα άτομα της F1 γενιάς κατατάχθηκαν σε οικογένειες. Με τον όρο «οικογένεια» εννοούμε την μητέρα με τα τρία αρσενικά και τους απογόνους τους. Για παράδειγμα, στη διασταύρωση τύπου I (Πίνακας 1) (*silxmal*), είχαμε 6 πατρικά θηλυκά δηλαδή 6 οικογένειες. Οι απόγονοι F2 (που προέρχονταν από τα θηλυκά F1) κατατάχθηκαν επίσης σε οικογένειες, όπου η κάθε οικογένεια περιλάμβανε το F1 θηλυκό, τα 3 αρσενικά με τα οποία διασταυρώθηκε και τους F2 απογόνους τους.

Συνολικά, για όλους τους τύπους διασταυρώσεων είχαμε 24 οικογένειες στην πατρική γενιά (Πίνακας 1). Το σύνολο των ατόμων που ελέγχθηκαν για διαρροή πατρικού mtDNA ήταν 129 αρσενικά και 602 θηλυκά υβρίδια F1. Ενώ από τα αρσενικά ελέγξαμε ένα δείγμα του συνόλου, στα θηλυκά ελέγξαμε το σύνολο των ατόμων που παράχθηκαν στην F1. Τα θηλυκά ελέγχθηκαν για ετεροπλασμία, αφού πρώτα είχαν διασταυρωθεί ανάδρομα (backcross) και είχαν δώσει απογόνους. Όλα τα αρσενικά που ελέγχθηκαν (100%) ήταν ετεροπλασμικά αλλά μόνο το 5,3% των θηλυκών (Εικόνα 4, Leaked F1). Τα ετεροπλασμικά θηλυκά περιορίζονταν σε συνολικά 5 οικογένειες, από τις οποίες μία έδωσε 19 ετεροπλασμικά από τα 41 θηλυκά (οικογένεια 24B), μια άλλη έδωσε 9 ετεροπλασμικά θηλυκά από τα 66 (οικογένεια 22E), δύο οικογένειες έδωσαν 1 ετεροπλασμικό θηλυκό η κάθε μία και τέλος μία οικογένεια έδωσε 2 (Εικόνα 4, Leaked F1). Υπενθυμίζουμε ότι είχαμε και τους απογόνους των θηλυκών της F1. Για να ελέγξουμε την κληρονομία της ετεροπλασμίας από τη μάνα και τη διαρροή πατρικού mtDNA χρησιμοποιήσαμε τις δύο οικογένειες που έδωσαν μεγάλο αριθμό ετεροπλασμικών θηλυκών υβριδίων (οικογένειες 24B και 22E). Πήραμε 10 τυχαία θηλυκά από τα 19 ετεροπλασμικά θηλυκά της οικογένειας 24B της πατρικής γενιάς, (Εικόνα 4, πράσινα πλαίσια A), και άλλα 10 ομοπλασμικά θηλυκά της ίδιας οικογένειας (Εικόνα 4, πράσινα πλαίσια B). Από καθένα από αυτά ελέγξαμε 20 απόγονους (F2 υβρίδια, 10 αρσενικούς και 10 θηλυκούς) τόσο για την παρουσία σε αυτά της ετεροπλασμίας της μητέρας τους όσο και διαρροής πατρικού mtDNA από τον πατέρα τους (Εικόνα 4). Ομοίως πράξαμε και για τη δεύτερη ετεροπλασμική οικογένεια (οικογένεια 22E). Σε αυτήν,

μελετήσαμε την κληρονομία της ετεροπλάσμιας και της πατρικής διαρροής στους απογόνους των 9 ετεροπλάσμικών και 10 ομοπλάσμικών θηλυκών F1 (Εικόνα 4), πράσινα πλαίσια C,D). Οι απόγονοι F2 του κάθε θηλυκού που ελέγχθηκαν ήταν 10 αρσενικά και 10 θηλυκά άτομα .

Στην F2 γενιά συνολικά εξετάστηκαν 780 άτομα για την ύπαρξη τριών απλοτύπων: των δύο μητρικών *si* και *ma* καθώς και του πατρικού *si*. Το σύνολο των F2 ατόμων έφεραν τον μιτότυπο *si*, ο οποίος ήταν ο κύριος μητρικός μιτότυπος. Επιπλέον, 56 άτομα έφεραν τον σπάνιο εκτός από τον κοινό μητρικό μιτότυπο *ma* και 70 άτομα έφεραν τον πατρικό μιτότυπο *si* μαζί με τον κύριο μητρικό μιτότυπο. Ο «κοινός μητρικός μιτότυπος» ονομάστηκε έτσι διότι, όπως φαινόταν σε πηκτώματα αγαρόζης, η ποσότητά του στα άτομα ήταν πολύ περισσότερη σε σχέση με τις ποσότητες αυτών του μητρικού *ma* και του πατρικού *si*.



Εικόνα 4: Αριθμός διασταυρώσεων στην P και στην F1 γενιά (μπλε και πράσινα πλαίσια αντίστοιχα). Με μαύρα γράμματα στα πλαίσια απεικονίζεται ο αριθμός των θηλυκών που προέκυψαν στην F1 γενιά από κάθε οικογένεια, ενώ με κόκκινα ο αριθμός των ετεροπλάσμικών θηλυκών από κάθε οικογένεια. Πάνω από τα μπλε και πράσινα πλαίσια φαίνονται οι μιτότυποι των γονέων που διασταυρώθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Διαρροή πατρικού mtDNA

F1 υβρίδια:

Φύλο

Στα υβρίδια της F1 γενιάς ελέγξαμε 129 αρσενικά και 602 θηλυκά για την ύπαρξη ετεροπλασμίας που προέρχεται από τη διαρροή πατρικού mtDNA. Το 100% των αρσενικών και το 5,3% των θηλυκών ήταν ετεροπλασμικά. Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική (Πίνακας 4).

Πίνακας 4: Συχνότητα ετεροπλασμίας σε θηλυκά και αρσενικά F1 υβρίδια και τιμές σημαντικότητας για τον έλεγχο της συσχέτισης φύλου-διαρροής

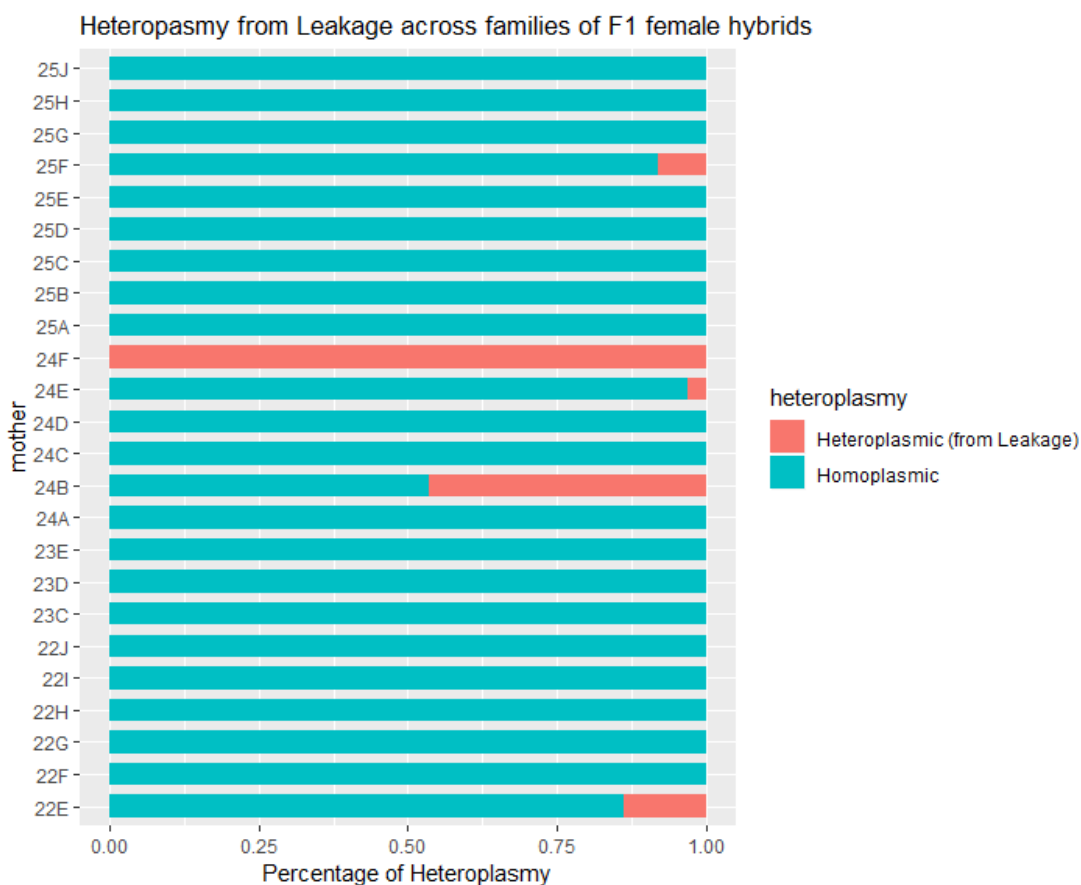
	LEAKAGE	Heteroplasmic (From Leakage)	Homoplasmic
SEX			
Females		32	570
Males		129	0
Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction (P-value< 2.2e-16)			
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value< 2.2e-16)			

Οικογένεια

Ένας δεύτερος παράγοντας τον οποίο ελέγξαμε αν σχετίζεται με τη διαρροή είναι ο παράγοντας της οικογένειας. Σε κάθε διασταύρωση είχαμε ένα θηλυκό με τρία αρσενικά άτομα, οπότε με τον παράγοντα οικογένεια αναφερόμαστε περισσότερο στην επίδραση της μητέρας. Η υπόθεση που ελέγχθηκε σε αυτήν την περίπτωση είναι εάν η διαρροή είναι ένα φαινόμενο που συμβαίνει τυχαία στα άτομα ή καθορίζεται από την οικογένεια. Η συγκεκριμένη ανάλυση καθώς και οι υπόλοιπες που αφορούν την F1 γενιά έγιναν μόνο για τα θηλυκά υβρίδια F1 καθώς στα αρσενικά το ποσοστό ετεροπλασμίας είναι 100%. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαρροή δεν κατανέμεται τυχαία μεταξύ των οικογενειών αλλά εξαρτάται από την οικογένεια από την οποία προέρχονται τα άτομα (Πίνακας 5, Γράφημα 1).

Πίνακας 5: Αριθμός ετεροπλασμικών (δεύτερη στήλη) και ομοπλασμικών (τρίτη στήλη) θηλυκών ατόμων F1 ανά οικογένεια πατρικής γενιάς (πρώτη στήλη). Στη βάση του πίνακα φαίνεται η στατιστική ανάλυση που δείχνει ότι η ετεροπλασμία δεν κατανέμεται τυχαία. Οι χρωματικές διαβαθμίσεις δηλώνουν τις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν από τους Post-hoc ελέγχους.

HETEROPLASMY	Heteroplasmic Females(From Leakage)	Homoplasmic Females
FAMILY(mother)		
22E	9	57
22F	0	1
22G	0	13
22H	0	19
22I	0	6
22J	0	74
23C	0	11
23D	0	14
23E	0	38
24A	0	5
24B	19	22
24C	0	2
24D	0	33
24E	1	33
24F	1	0
25A	0	34
25B	0	16
25C	0	6
25D	0	49
25E	0	30
25F	2	23
25G	0	27
25H	0	26
25J	0	31
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (1000 replicates) (P-value = 9.999e-05)		
Fisher's Exact Test for Count Data with simulated p-value (2000 replicates) (P-value = 0.0004998)		



Γράφημα 1: Ποσοστό ετεροπλασμικών θηλυκών υβριδίων F1 λόγο διαρροής ανά οικογένεια πατρικής γενιάς.

Οι εκ των υστέρων (post-hoc) έλεγχοι δεν έδωσαν σαφή εικόνα για την ομαδοποίηση των οικογενειών εξαιτίας της ανισοκατανομής των ατόμων ανά οικογένεια. Εξάιρεση αποτελούν τρεις οικογένειες οι οποίες συνιστούν από μόνες τους διακριτές ομάδες. Συγκεκριμένα η οικογένεια 24B η οποία φέρει ένα σχετικά μέτριο αριθμό ατόμων (41) με το εύρος του αριθμού των θηλυκών στις F1 οικογένειες (1-74 άτομα) με ποσοστό σε ετεροπλασμικά άτομα 46%. (Πίνακας 5). Έπειτα η οικογένεια 22J η οποία έχει τα περισσότερα θηλυκά σε σχέση με τις υπόλοιπες οικογένειες (74) με κανένα ετεροπλασμικό άτομο, και τέλος η οικογένεια 22E η οποία έχει και αυτή υψηλό αριθμό ατόμων (66) σε σχέση με το εύρος του αριθμού των θηλυκών στις F1 οικογένειες (1-74 άτομα) με μικρότερο ποσοστό ετεροπλασμικών θηλυκών (14%), απ' ότι η οικογένεια 24B.

Τύπος διασταύρωσης

Κατά την πειραματική διαδικασία στην πατρική γενιά είχαμε οικογένειες από 4 διαφορετικούς τύπους διασταύρωσης, που ο κάθε τύπος αποτελούνταν από διαφορετικό συνδυασμό απλοτύπων των ίδιων ειδών (Πίνακας 1). Γι' αυτό τον λόγο διερευνήσαμε το ερώτημα εάν οι μιτότυποι των γονέων επηρεάζουν την διαρροή. Η μηδενική υπόθεση ήταν ότι οι διαφορετικοί τύποι διασταύρωσης δεν σχετίζονται με

το ποσοστό των ετεροπλασμικών οικογενειών. Ο έλεγχος της παραπάνω υπόθεσης έγινε σε επίπεδο ετεροπλασμικών οικογενειών και όχι ετεροπλασμικών ατόμων, καθώς προηγουμένως δείξαμε ότι η πατρική διαρροή σχετίζεται σημαντικά με την οικογένεια κι αν κάναμε τον έλεγχο σε επίπεδο ατόμων, θα συμπεριλαμβάναμε και την επίδραση της οικογένειας. Επίσης μεταξύ των οικογενειών υπάρχει ανισοκατανομή στον αριθμό των ατόμων. Οι έλεγχοι που κάναμε δεν δείχνουν σημαντική διαφορά στον αριθμό των ετεροπλασμικών οικογενειών μεταξύ των τεσσάρων τύπων διασταύρωσης (Πίνακας 6) κι επομένως οι οικογένειες όλων των τύπων μπορούν να αντιμετωπιστούν συνολικά.

Πίνακας 6: Συχνότητα οικογενειών με διαρροή στους 4 τύπους διασταύρωσης και τιμές σημαντικότητας για τον έλεγχο της συσχέτισης τύπος διασταύρωσης- οικογένειες με διαρροή

CROSS TYPE(Fem*Mal)	<i>Sil*Mal</i>	<i>Sil*MalI</i>	<i>Sill*Mal</i>	<i>Sill*MalI</i>
LEAKAGE				
Leaked Families	2	1	1	0
Non Leaked Families	4	5	8	3
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (1000 repicates) (P-value= 0.7946)				
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value= 0.7866)				

Ηλικία μητέρας

Ένας παράγοντας που εξετάσαμε ήταν κατά πόσο η πατρική διαρροή επηρεάζεται από την ηλικία της μητέρας. Οι οικογένειες 22E και 24A έδωσαν 9 και 19 ετεροπλασμικά θηλυκά άτομα αντίστοιχα (Πίνακας 5), αριθμός ικανός για μια τέτοιου είδους ανάλυση. Η ηλικία των μητέρων χωρίστηκε σε τέσσερις κλάσεις: πολύ νεαρή, νεαρή, μέση και μεγάλη. Οι κατηγορίες αυτές προέκυψαν ως εξής: Όπως προαναφέραμε, οι γονείς (P γενιά) αφήνονταν στους σωλήνες μέχρι την εμφάνιση *ruptae*, ενώ στη συνέχεια μεταφέρονταν σε άλλους σωλήνες, ώστε να μην μπερδεύονται με τους απογόνους. Επομένως θεωρήσαμε ότι οι απόγονοι που γεννήθηκαν από το πρώτο σωλήνα προέρχονταν από πολύ νεαρή μητέρα, οι απόγονοι της πρώτης μεταφοράς προέρχονταν από νεαρή μητέρα, οι απόγονοι της δεύτερης μεταφοράς από μητέρα μέσης ηλικίας και οι απόγονοι της τρίτης μεταφοράς από ηλικιωμένη μητέρα.

Στην οικογένεια 22E δεν παρατηρήσαμε σημαντική συσχέτιση των ατόμων με διαρροή σε σχέση με την ηλικία της μητέρας (Πίνακας 7). Στην οικογένεια 24B όμως, παρατηρήσαμε ισχυρή θετική συσχέτιση του ποσοστού των ετεροπλασμικών ατόμων με την ηλικιακή κλάση της μητέρας (Πίνακας 8). Το γεγονός ότι δεν παρατηρήσαμε συσχέτιση στην οικογένεια 22E μπορεί να οφείλεται στον μικρό αριθμό θηλυκών υβριδίων με αποτέλεσμα ο έλεγχος να μην έχει αρκετή ισχύ.

Πίνακας 7: Διαρροή σε θηλυκά F1 υβρίδια της οικογένειας 22E για διαφορετικές ηλικίες της μητέρας και τιμές σημαντικότητας για τον έλεγχο της συσχέτισης ηλικία μητέρας-διαρροή.

LEAKAGE	Heteroplasmic F1 Females	Homoplasmic F1 Females
MOTHER'S AGE		
Very young	3	10
Young	3	17
Moderate	3	27
Old	0	3
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (10000 replicates) (P-value=0.5979)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value= 0.6521)		

Πίνακας 8: Διαρροή σε θηλυκά F1 υβρίδια της οικογένειας 24B για διαφορετικές ηλικίες της μητέρας και τιμές σημαντικότητας για τον έλεγχο της συσχέτισης ηλικία μητέρας-διαρροή.

LEAKAGE	Heteroplasmic F1 Females	Homoplasmic F1 Females
MOTHER'S AGE		
Very young	0	6
Young	5	12
Moderate	9	4
Old	5	0
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (10000 replicates) (P-value= 0.0006999)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value= 0.0005615)		

F2 υβρίδια:

Στα υβρίδια F2 ελέγξαμε δύο παράγοντες που καθορίζουν την ετεροπλασμία των ατόμων. Α. Την πατρική διαρροή στους απόγονους της F1 γενιάς (δλδ. Τα άτομα της F2). Β. Την κληροδότηση της ετεροπλασμίας από τη μητέρα στους απογόνους της.

Φύλο

Παρόμοια με τα υβρίδια της F1 γενιάς, τα υβρίδια της F2 γενιάς εξετάστηκαν αν παρουσιάζουν διαφορές στα επίπεδα της διαρροής μεταξύ των φύλων. Στα F2 υβρίδια φάνηκε ότι το φύλο δεν σχετίζεται με την διαρροή, καθώς δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα διαρροής μεταξύ θηλυκών και αρσενικών υβριδίων F2 (Πίνακας 9).

Πίνακας 9: Συχνότητα ετεροπλασμίας λόγω διαρροής σε θηλυκά και αρσενικά F2 υβρίδια και τιμές σημαντικότητας για τον έλεγχο της συσχέτισης φύλου-διαρροής

SEX	LEAKAGE	Heteroplasmic (From Leakage)	Homoplasmic
Females		36	354
Males		34	356
Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction (P-value= 0.9003)			

Οικογένεια

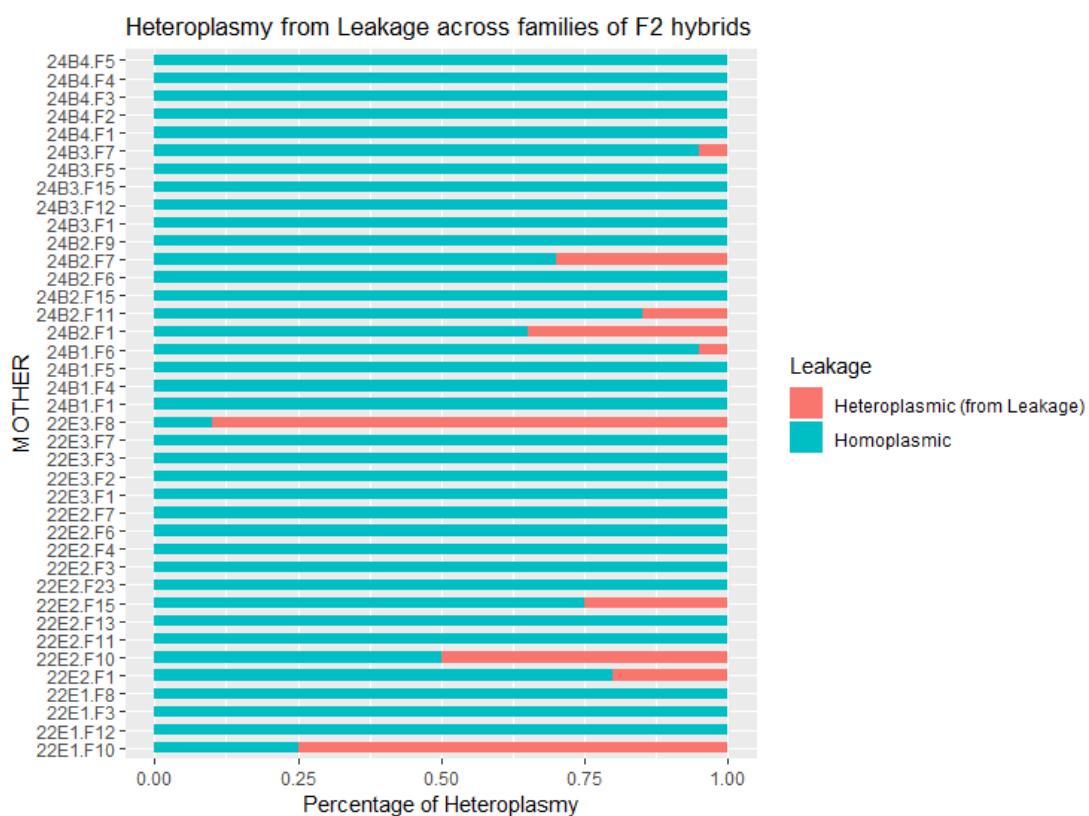
Όπως και στα υβρίδια της F1, ελέγξαμε την επίδραση της οικογένειας στην πατρική διαρροή του mtDNA. Στις οικογένειες των F2 υβριδίων συυπολογίστηκαν μαζί τα αρσενικά και τα θηλυκά άτομα , καθώς προηγουμένως δείξαμε ότι το φύλο είναι ένας παράγοντας που δεν επηρεάζει την διαρροή (Πίνακας 9).

Συνολικά στην F2 γενιά είχαμε 39 οικογένειες. Οι 19 οικογένειες προέρχονταν από τα 9 ετεροπλασμικά και από 10 ομοπλασμικά θηλυκά, υβρίδια της F1, απόγονοι του θηλυκού 22E. Οι υπόλοιπες 20 F2 οικογένειες (10 από ετεροπλασμικές μάνες και 10 από ομοπλασμικές) προέρχονταν από θηλυκό 24B. Αντίστοιχα με την F1 τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η διαρροή δεν συμβαίνει τυχαία στα άτομα άλλα εξαρτάται από την οικογένεια (Πίνακας 10, Γράφημα 2).

Πίνακας 10: Αριθμός ετεροπλασμικών (δεύτερη στήλη) και ομοπλασμικών (τρίτη στήλη) ατόμων F2 ανά οικογένεια πατρικής γενιάς (πρώτη στήλη). Στη βάση του πίνακα φαίνεται η στατιστική ανάλυση που δείχνει ότι η ετεροπλασμία δεν κατανέμεται τυχαία. Οι χρωματικές διαβαθμίσεις δηλώνουν τις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν από τους Post-hoc ελέγχους.

HETEROPLASMY	Heteroplasmic	Homoplasmic Individuals
FAMILY(mother)	Individuals(From Leakage)	
22E1.F8	0	20
22E1.F12	0	20
22E2.F3	0	20
22E2.F6	0	20
22E2.F11	0	20
22E3.F1	0	20
22E2.F13	0	20
22E3.F3	0	20
22E3.F8	18	2
22E1.F3	0	20
22E1.F10	15	5
22E2.F1	4	16
22E2.F4	0	20
22E2.F7	0	20
22E2.F10	10	10
22E2.F15	5	15
22E3.F2	0	20
22E3.F7	0	20
22E2.F23	0	20
24B2.F6	0	20
24B2.F9	0	20
24B3.F5	0	20
24B3.F12	0	20
24B3.F15	0	20
24B4.F1	0	20
24B4.F2	0	20

24B4.F3	0	20
24B4.F4	0	20
24B4.F5	0	20
24B1.F1	0	20
24B1.F4	0	20
24B1.F5	0	20
24B1.F6	1	19
24B2.F1	7	13
24B2.F7	6	14
24B2.F11	3	17
24B2.F15	0	20
24B3.F1	0	20
24B3.F7	1	19
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (1000 replicates) (P-value = 9.999e-05)		
Fisher's Exact Test for Count Data with simulated p-value (2000 replicates) (P-value = 0.0004998)		



Γράφημα 2: Ποσοστό ετεροπλασμικών υβριδίων F2 λόγω διαρροής ανά οικογένεια.

Λόγω της ισοκατανομής των ατόμων εντός των οικογενειών, αναπαραστήσαμε την κατανομή της διαρροής που εμφανίζουν οι οικογένειες μας (Γράφημα 4

(Παράρτημα)) και συμπεράναμε ότι ο μέσος όρος της διαρροής στις οικογένειες είναι εξαιρετικά χαμηλός ($mean = 0.08974359$), παρόλο που παρατηρήθηκε μεγάλο εύρος στο ποσοστό της ετεροπλασμίας μεταξύ των οικογενειών ($min = 0$ (κανένα άτομο με διαρροή από τα 20) και $max = 0.9$ (18 άτομα με διαρροή από τα 20)) (Γράφημα 4 (Παράρτημα), Πίνακας 10).

Έπειτα πραγματοποιήσαμε εκ των υστέρων (Post-Hoc) ελέγχους με σκοπό να διερευνήσουμε τον τρόπο με τον οποίο ομαδοποιούνται οι διάφορες οικογένειες, όσον αφορά την συχνότητα ετεροπλασμίας που παρουσιάζουν. Σε σχέση με την F1 γενιά οι ομαδοποιήσεις ήταν περισσότερο ξεκάθαρες εξαιτίας του ίδιου αριθμού ατόμων που είχαμε σε κάθε οικογένεια. Από το Post-Hoc test φάνηκαν να ομαδοποιούνται όλες οι ομοπλασμικές οικογένειες μαζί. Οι οικογένειες 22E3.F8 και 22E1.F10 αποτέλεσαν μια άλλη ομάδα λόγω της υψηλού ποσοστού διαρροής (Πίνακας 10), και η οικογένεια 22E2.F10 μία χωριστή ομάδα από μόνη της καθώς είχε 0,5 ποσοστό διαρροής (Πίνακας 10). Οι υπόλοιπες οικογένειες με μικρότερα ποσοστά διαρροής κατατάχθηκαν σε μια χωριστή κατηγορία.

Ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας

Το επόμενο ερώτημα που διερευνήσαμε ήταν εάν η πατρική διαρροή που παρατηρείται στους απογόνους εξαρτάται από το αν η μητέρα είναι ήδη ετεροπλασμική ή όχι. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ετεροπλασμία της μητέρας επηρεάζει σημαντικά την διαρροή πατρικού mtDNA στους απογόνους της. Συγκεκριμένα παρατηρήσαμε ότι οι απόγονοι F2 που προέρχονταν από ετεροπλασμικές μητέρες είχαν μικρότερη πιθανότητα να εμφανίσουν διαρροή πατρικού mtDNA σε σχέση με αυτούς που προέρχονταν από ομοπλασμικές μητέρες.

Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις. Ειδικότερα, οι ομοπλασμικές μητέρες έδωσαν στην F2 γενιά σημαντικά περισσότερα άτομα με διαρροή πατρικού mtDNA, περισσότερες οικογένειες με διαρροή και μεγαλύτερη μέση συχνότητα διαρροής εντός των οικογενειών (Πίνακας 11).

Πίνακας11: (A):Αριθμός οικογενειών με και χωρίς πατρική διαρροή που προέκυψαν από ομοπλασμικές και ετεροπλασμικές μητέρες. (B) Αριθμός ατόμων με και χωρίς πατρική διαρροή που προέκυψαν από ομοπλασμικές και ετεροπλασμικές μητέρες. (C): Μέση συχνότητα διαρροής πατρικούmtDNAσε οικογένειες που προέκυψαν από ετεροπλασμικές και ομοπλασμικές μητέρες. Για κάθε επίπεδο ανάλυσης της συσχέτισης: ετεροπλασμία μητέρας- κληρονομούμενη ετεροπλασμία((A),(B),(C)) αναγράφονται οι τιμές σημαντικότητας .

HETEROPLASMY OF MOTHER	Heteroplasmic Mother	Homoplasmic Mother
LEAKAGE IN FAMILIES (A)		
Leaked families	1	9
Non leaked families	18	11
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (10000 replicates) (P-value = 0.007399)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value = 0.008362)		
LEAKAGE IN INDIVIDUALS (B)		
Leaked individuals	18	52
Non leaked individuals	362	348
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (10000 replicates) (P-value = 9.999e-05)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value = 4.943e-05)		
MEAN FAMILY HETEROPLASMY(C)		
Mean Family Frequency of Leakage	0.047	0.953
Wilcoxon rank sum test with continuity correction (P-value = 0.009847)		
Kruskal-Wallis rank sum test (P-value = 0.009337)		

Οικογένεια προέλευσης της μητέρας

Οι οικογένειες από την F2 γενιά που επιλέξαμε να μελετήσουμε αποτελούνταν από F1 μητέρες οι οποίες προέρχονταν από δύο διαφορετικές πατρικές οικογένειες (Εικόνα 4). Συγκεκριμένα, οι F1 μητέρες προέρχονταν από τις πατρικές διασταυρώσεις 22E και 24B. Το ερώτημα που θέσαμε ήταν εάν η πατρική διαρροή που παρατηρείται στους απογόνους εξαρτάται από το αν η μητέρα προέρχεται από διαφορετική πατρική οικογένεια. Η μία μηδενική υπόθεση ήταν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό των οικογενειών με πατρική διαρροή μεταξύ των μητέρων με διαφορετική προέλευση, ενώ η δεύτερη ήταν ότι δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στον αριθμό ατόμων με πατρική διαρροή μεταξύ των μητέρων με διαφορετική προέλευση (Πίνακας 12). Οι στατιστικοί έλεγχοι έδειξαν ότι υπάρχει διαφορά μόνο στον αριθμό ατόμων με διαρροή (Πίνακας 12, B), και όχι στον αριθμό οικογενειών με διαρροή (Πίνακας 12, A) μεταξύ των μητέρων με διαφορετική προέλευση. Η διαφορά αυτή θα μπορούσε να

ερμηνευθεί λόγω του ότι υπάρχει διαφοροποίηση στα επίπεδα διαρροής μεταξύ οικογενειών (βλέπε αποτελέσματα F2 υβρίδια : Οικογένεια, Πίνακας 10).

Πίνακας 12:Αριθμός οικογενειών με και χωρίς πατρική διαρροή που προέκυψαν από μητέρες με οικογένεια προέλευσης 22E και 24B. (B) Αριθμός ατόμων με και χωρίς πατρική διαρροή που προέκυψαν από μητέρες με οικογένεια προέλευσης 22E και 24B.

FAMILY OF THE MOTHER	22E	24B
LEAKAGE IN FAMILIES (A)		
Leaked families	5	5
Non leaked families	14	15
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (10000 replicates) (P-value = 1)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value = 1)		
LEAKAGE IN INDIVIDUALS (B)		
Leaked individuals	52	18
Non leaked individuals	328	382
Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction (P-value =1.298e-05)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value = 7.853e-06)		

Γενετική απόσταση των γονέων (διαφορές μεταξύ F1 και F2 υβριδίων)

Τα υβρίδια της F1 γενιάς, προέκυψαν από την διασταύρωση δύο διακριτών ειδών (*D.simulans* και *D.mauritiana*), ενώ τα υβρίδια της F2 γενιάς προέκυψαν από τη διασταύρωση υβριδίων *simulans/mauritiana* και καθαρών ατόμων *D.simulans*. Αυτό σημαίνει ότι το πυρηνικό γονιδίωμα των υβριδίων της F1 γενιάς αποτελούνταν από 50% από το γονιδίωμα του κάθε γονικού είδους, ενώ τα υβρίδια της F2 είχαν κατά 75% από το γονιδίωμα της *simulans* και κατά 25% το γονιδίωμα της *mauritiana*. Επομένως, η γενετική απόσταση των γονέων που έδωσαν την F1 γενιά είναι μεγαλύτερη σε σχέση με την γενετική απόσταση των γονέων που έδωσαν την F2 γενιά. Ένας παράγοντας που εξετάσαμε στην επίδραση της διαρροής είναι η γενετική απόσταση των γονέων. Συγκεκριμένα ερευνήσαμε εάν υπάρχουν στατιστικά σημαντικές διαφορές στη συχνότητα διαρροής μεταξύ των F1 και F2 υβριδίων στο σύνολο των ατόμων, στο σύνολο των θηλυκών ατόμων και στο σύνολο των αρσενικών ατόμων (Πίνακας 13). Οι στατιστικοί έλεγχοι έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική διαφορά στα επίπεδα διαρροής μεταξύ F1 και F2 υβριδίων, μεταξύ θηλυκών F1 και F2 υβριδίων και μεταξύ αρσενικών F1 και F2 υβριδίων. Ειδικότερα η διαρροή να είναι μεγαλύτερη στην F1 γενιά όταν εξετάσαμε το σύνολο των ατόμων (22% ετεροπλασμία στην F1 και 9% ετεροπλασμία στην F2) (Πίνακας 13, (A)) και όταν εξετάσαμε μόνο τα αρσενικά άτομα (100% ετεροπλασμία στην F1 9% ετεροπλασμία F2) (Πίνακας 13, (B)). Αντίθετα στην περίπτωση που εξετάσαμε μόνο τα θηλυκά, παρατηρήσαμε ότι στην F2 (9% των θηλυκών ήταν ετεροπλασματικά) γενιά είχαμε παραπάνω διαρροή απ'ότι στην F1 γενιά (5% των θηλυκών ήταν ετεροπλασματικά) (Πίνακας 13, (C)).

Πίνακας 13:(Α) Συχνότητα διαρροής στα F1 και F2 υβρίδια. (Β) Συχνότητα διαρροής στα αρσενικά F1 και F2 υβρίδια. (C) Συχνότητα διαρροής στα θηλυκά F1 και F2 υβρίδια. Για κάθε ανάλυση συσχέτισης διαρροής -γενιά υβριδίων οι στατιστικοί έλεγχο αναγράφονται οι στατιστικοί έλεγχοι και οι τιμές σημαντικότητας

HYBRID GENERATION	F1	F2
LEAKAGE IN MALES AND FEMALES (A)		
Leaked	161	70
Nonleaked	570	710
Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction (P-value = 3.104e-12)		
LEAKAGE IN MALES (B)		
Leaked	129	34
Nonleaked	0	356
Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction (P-value = 2.2e-16)		
LEAKAGE IN FEMALES(C)		
Leaked	32	36
Nonleaked	570	354
Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction (P-value = 0.02413)		

Συγκεντρωτικός πίνακας

Συνοψίζοντας, μελετήσαμε το φαινόμενο της πατρικής διαρροής του μιτοχονδριακού DNA στα υβρίδια F1 και F2, και ελέγξαμε κατά πόσο το φαινόμενο της διαρροής σχετίζεται με το φύλο, την ηλικία της μητέρας, τους μιτότυπους των γονέων, την οικογένεια (επίδραση της μητέρας), την ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας, και την καταγωγή της μητέρας. Στον Πίνακα 14 συνοψίζονται όλα τα αποτελέσματα που αφορούν την πατρική διαρροή. Καταρχάς, παρατηρούμε ότι το φύλο είναι ένας παράγοντας που καθορίζει σε πολύ μεγάλο ποσοστό το φαινόμενο της διαρροής στα υβρίδια της F1 γενιάς ενώ, στην F2 φαινόμενο της διαρροής "συμπεριφέρεται" με τον ίδιο τρόπο και στα δύο φύλα. Δεύτερον η ηλικία της μητέρας είναι ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάσει το φαινόμενο της διαρροής. Από τις δύο οικογένειες F1 που εξετάσαμε, στην μία (24B) παρατηρήσαμε ότι η συχνότητα ετεροπλασμίας στα θηλυκά αυξάνει σημαντικά με την αύξηση στην ηλικία της μητέρας. Το γεγονός ότι δεν παρατηρήσαμε στην δεύτερη οικογένεια (22E) κάποια συσχέτιση μπορεί να οφείλεται στον μικρό αριθμό θηλυκών. Τρίτον, ο παράγοντας της οικογένειας φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τα ποσοστά πατρικής διαρροής mtDNA και στις 2 γενιές υβριδίων. Στην F1 γενιά μόνο στα θηλυκά υβρίδια, ενώ στην F2 γενιά και στα δύο φύλα, καθώς και στις δύο γενιές υβριδίων παρατηρούμε σημαντική ανισοκατανομή των ατόμων με διαρροή μεταξύ των οικογενειών. Όπως εξηγήσαμε με τον παράγοντα οικογένεια αναφερόμαστε στην επίδραση της μητέρας, εφόσον κάθε οικογένεια προέκυψε από ένα θηλυκό με τρία αρσενικά άτομα. Επιπλέον ο τύπος διασταύρωσης των οικογενειών της F1 γενιάς, δεν επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό των οικογενειών F1 που εμφανίζουν διαρροή. Μια ακόμη παρατήρηση είναι ότι η ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας, δηλαδή το αν η μητέρα θα είναι ετεροπλασμική ή όχι επηρεάζει σημαντικά το φαινόμενο

της διαρροής στους απογόνους. Το συμπέρασμα αυτό προέκυψε από τα υβρίδια της F2 γενιάς, όπου παρατηρήσαμε ότι από τα ομοπλάσμικά F1 θηλυκά υβρίδια προέκυψαν περισσότερα F2 άτομα με διαρροή, περισσότερες οικογένειες με διαρροή, οικογένειες με υψηλότερο μέσο ποσοστό διαρροής σε σχέση με τα ετεροπλάσμικά F1 θηλυκά υβρίδια. Τέλος παρατηρήσαμε ότι η οικογένεια καταγωγής της μητέρας μπορεί να επηρεάσει σημαντικά μόνο τον αριθμό των ατόμων που θα έχουν διαρροή, αλλά όχι τον αριθμό των οικογενειών με διαρροή. Η παρατήρηση αυτή συμφωνεί με το γεγονός ότι το φαινόμενο της διαρροής καθορίζεται σημαντικά από την οικογένεια, άρα F2 οικογένειες με μητέρες κοινής προέλευσης έχουν κοινά πρότυπα διαρροής μεταξύ τους.

Πίνακας 14: Συνολικός πίνακας με παράγοντες που μελετήθηκαν σε σχέση με την διαρροή πατρικού mtDNA, μαζί με τους στατιστικούς ελέγχους και τις τιμές σημαντικότητας. Με κόκκινα γράμματα αναγράφονται οι τιμές σημαντικότητας που είναι μικρότερες από $\alpha=0,05$

Παράγοντας	Γενιά	Στατιστικό τεστ (τιμή στατιστικού)	P-value
Φύλο	F1	Chi-square test (549.07)	< 2.2e-16
		Fisher's Exact Test	< 2.2e-16
	F2	Chi-squared test (0.015694)	0.9003
Ηλικία της μητέρας	F1 (22E οικογένεια)	simulated chi-squared test (1.8259)	0.5979
		Fisher's Exact Test	0.6521
	F1 (24B οικογένεια)	simulated chi-squared test (15.67)	0.0006999
		Fisher's Exact Test	0.0005615
Οικογένεια	F1 (μόνο θηλυκά)	Simulated chi-squared test (189.16)	9.999e-05
		Simulated Fisher's Exact Test	0.0004998
	F2	Simulated chi-squared test (404.19)	9.999e-05
		Simulated Fisher's Exact Test	0.0004998
Μιτότυποι των γονέων	F1	Simulated chi-squared test (2)	0.7946
		Fisher's Exact Test	0.7866
Ετεροπλάσμια της μητέρας	F2 (Διαρροή σε οικογένειες)	Simulated chi-squared test (8.0693)	0.007399
		Fisher's Exact Test	0.008362
	F2 (Διαρροή σε άτομα)	Simulated chi-squared test (16.288)	9.999e-05
		Fisher's Exact Test	4.943e-05
F2 (Μέση διαρροή στις οικογένειες)	Wilcoxon rank sum test (119)	0.009847	
	Kruskal-Wallis rank sum test (6.7571)	0.009337	
Οικογένεια προέλευσης της μητέρας	F2 (Διαρροή σε οικογένειες)	Simulated chi-squared test (0.0088475)	1
		Fisher's Exact Test	1
	F2 (Διαρροή σε άτομα)	Simulated chi-squared test (19.013)	1.298e-05
		Fisher's Exact Test	7.853e-06
Γενετική απόσταση των γονέων (Διαφορές μεταξύ F1 και F2 υβριδίων)	F1-F2 (όλα τα άτομα)	Chi-square test(48.622)	3.104e-12
	F1-F2 (μεταξύ αρσενικών)	Chi-square test(370.71)	2.2e-16
	F1-F2 (μεταξύ θηλυκών)	Chi-square test(5.0852)	0.02413

Κληρονόμηση ετεροπλασμίας

F2 υβρίδια:

Η κληρονόμηση της ετεροπλασμίας μελετήθηκε στην F2 γενιά καθώς αυτή προέκυψε από διασταύρωση F1 υβριδικών (*D. simulans* x *D. mauritiana*) θηλυκών με αρσενικά *D. simulans*. Τα υβρίδια F2 που μελετήσαμε προέρχονταν από ετεροπλασμικά F1 και από ομοπλασμικά F1 θηλυκά τα οποία ήταν αδέρφια με τα ετεροπλασμικά. Τα ετεροπλασμικά υβρίδια F1 διαθέτουν ένα συχνό μιτότυπο *sil* τον οποίο κληρονόμησαν από την μητέρα τους (*D. simulans*) και έναν σπάνιο μιτότυπο *mal* ή *mall* (ανάλογα αν προέρχονται από την οικογένεια 24B ή 22E αντίστοιχα), τον οποίο κληρονόμησαν από τον πατέρα τους (*D. mauritiana*). Ειδικότερα, διερευνήσαμε εάν η μεταβίβαση της ετεροπλασμίας στην F2 γενιά (η μεταβίβαση των μιτότυπων *sil* μαζί με τον *mal* ή *mall*) σχετίζεται με διάφορους παράγοντες οι οποίοι είναι:

Φύλο

Στα υβρίδια της F2 γενιάς ελέγξαμε αν το φύλο των ατόμων παίζει ρόλο στην κληρονόμηση της ετεροπλασμίας από τη μητέρα τους. Φάνηκε ότι το φύλο δεν σχετίζεται με την κληρονόμηση της ετεροπλασμίας, καθώς δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στην συχνότητα ετεροπλασμίας (λόγο κληρονόμησης) μεταξύ θηλυκών και αρσενικών υβριδίων F2 (Πίνακας 15).

Πίνακας 15: Συχνότητα ετεροπλασμίας λόγω μητρικής κληρονόμησης σε θηλυκά και αρσενικά F2 υβρίδια και τιμές σημαντικότητας για τον έλεγχο της συσχέτισης φύλου-διαρροής

INHERITED HETEROPLASMY	Heteroplasmic individuals	Homoplasmic individuals
SEX		
Females	31	359
Males	25	365

Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction (P-value = 0.488)

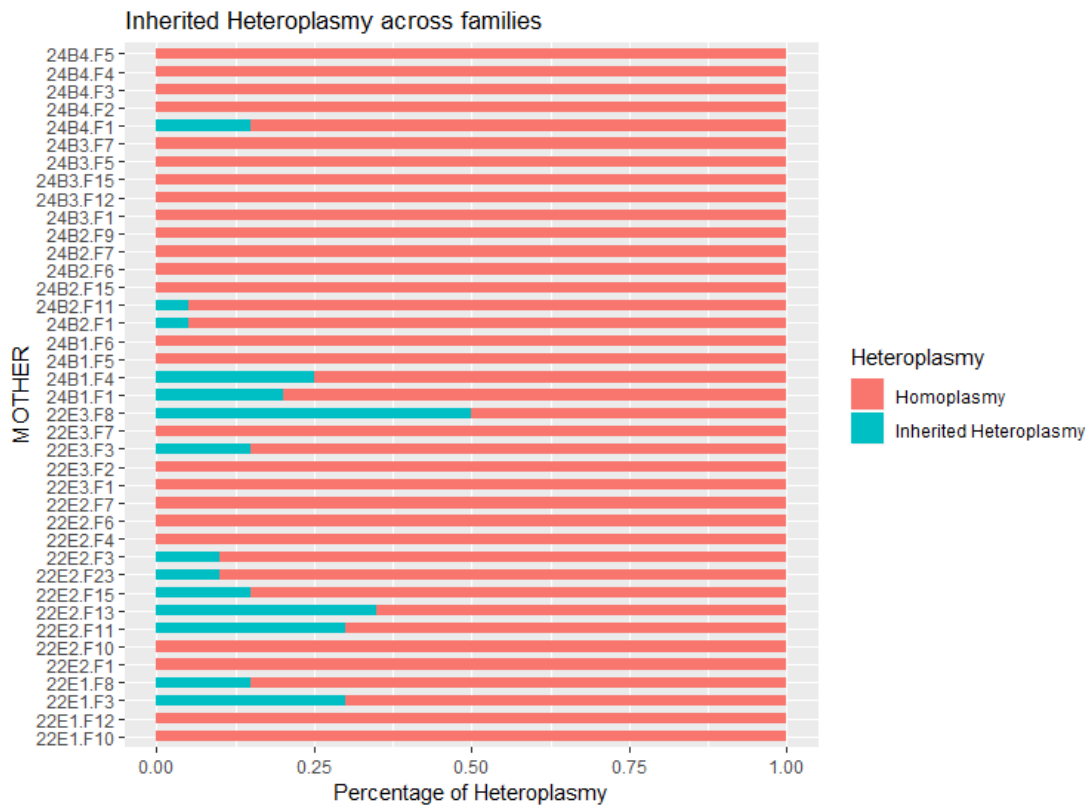
Οικογένεια

Προηγουμένως είδαμε ότι η οικογένεια είναι καθοριστικός παράγοντας για την πατρική διαρροή του mtDNA, καθώς παρατηρήθηκε σημαντική διακύμανση στα ποσοστά διαρροής μεταξύ των οικογενειών. Το ερώτημα που εξετάσαμε ήταν κατά πόσο υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των οικογενειών στο ποσοστό κληρονομούμενης ετεροπλασμίας. Όπως προαναφέραμε επειδή κάθε οικογένεια προέκυπτε την διασταύρωση ενός θηλυκού με το πολύ τρία αρσενικά άτομα, με τον παράγοντα οικογένεια αναφερόμαστε περισσότερο στην επίδραση της μητέρας. Οι αναλύσεις έδειξαν ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική διαφορά στα επίπεδα της κληρονομούμενης ετεροπλασμίας μεταξύ των οικογενειών (Πίνακας 16, Γράφημα 3), το οποίο σημαίνει ότι η ετεροπλασμία δεν κληρονομείται το ίδιο σε όλες τις οικογένειες.

Πίνακας 16 : Αριθμός ετεροπλασμικών (δεύτερη στήλη) και ομοπλασμικών (τρίτη στήλη) ατόμων F2 ανά οικογένεια πατρικής γενιάς (πρώτη στήλη), για ετεροπλασμία που προέκυψε από κληρονόμηση. Στη βάση του πίνακα φαίνεται η στατιστική ανάλυση που δείχνει ότι η ετεροπλασμία δεν κατανέμεται τυχαία. Οι χρωματικές διαβαθμίσεις δηλώνουν τις ομαδοποιήσεις που προέκυψαν από τους Post-hocελέγχους.

INHERITED HETEROPLASMY FAMILY(mother)	Individuals with inherited heteroplasmy	Homoplasmic Individuals
22E1.F8	3	17
22E1.F12	0	20
22E2.F3	2	18
22E2.F6	0	20
22E2.F11	6	14
22E3.F1	0	20
22E2.F13	7	13
22E3.F3	3	17
22E3.F8	10	10
22E1.F3	6	14
22E1.F10	0	20
22E2.F1	0	20
22E2.F4	0	20
22E2.F7	0	20
22E2.F10	0	20
22E2.F15	3	17
22E3.F2	0	20
22E3.F7	0	20
22E2.F23	2	18
24B2.F6	0	20

24B2.F9	0	20
24B3.F5	0	20
24B3.F12	0	20
24B3.F15	0	20
24B4.F1	3	17
24B4.F2	0	20
24B4.F3	0	20
24B4.F4	0	20
24B4.F5	0	20
24B1.F1	4	16
24B1.F4	5	15
24B1.F5	0	20
24B1.F6	0	20
24B2.F1	1	19
24B2.F7	0	20
24B2.F11	1	19
24B2.F15	0	20
24B3.F1	0	20
24B3.F7	0	20
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (1000 replicates) (P-value =9.999e-05)		
Fisher's Exact Test for Count Data with simulated p-value (2000 replicates) (P-value =0.0004998)		



Γράφημα 3: Ποσοστό ετεροπλασμικών υβριδίων F2 λόγω κληρονομής εντός των οικογενειών

Έπειτα πραγματοποιήσαμε εκ των υστέρων (Post-Hoc) ελέγχους με σκοπό να διερευνήσουμε τον τρόπο με τον οποίο ομαδοποιούνται οι διάφορες οικογένειες, όσον αφορά την συχνότητα της ετεροπλασμίας που παρουσιάζουν. Μια διακριτή κατηγορία αποτελούν οι οικογένειες οι οποίες έχουν 0 συχνότητα ετεροπλασμίας (Πίνακας 16, Γράφημα 3), το οποίο σημαίνει ότι τα θηλυκά F1 υβρίδια δεν κληροδότησαν σε κανέναν F2 απόγονο τον σπάνιο μιτότυπο (*mal/mall*) παρά μόνο τον συχνό *sil*. Μια δεύτερη κατηγορία αποτελεί η οικογένεια 22E3.F7 από μόνη της η οποία είχε το μεγαλύτερο ποσοστό κληρονόμησης του μιτότυπου *ma* (50% των απογόνων) (Πίνακας 16, Γράφημα 3). Στις υπόλοιπες οικογένειες με μικρότερες συχνότητες η ομαδοποίηση δεν ήταν αρκετά σαφής (Πίνακας 16, Γράφημα 3).

Εξ αιτίας της ισοκατανομής των ατόμων εντός των οικογενειών, αναπαραστήσαμε την κατανομή της κληρονομήσιμης ετεροπλασμίας που εμφανίζουν οι οικογένειες (Πίνακας 16, Γράφημα 5 (Παράρτημα)). Φαίνεται ότι η μέση κληρονομούμενη ετεροπλασμία ανά οικογένεια είναι εξαιρετικά χαμηλή (mean= 0.07179487), με εύρος min = 0 (κανένα ετεροπλασμικό άτομο από τα 20) και max=0,5 (10 ετεροπλασμικά άτομα από τα 20) (Πίνακας 16, Γράφημα 5 (Παράρτημα)).

Ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας

Κάποια από τα θηλυκά της F1, που αποτέλεσαν τις μητέρες για τα υβρίδια της F2, ήταν ετεροπλασμικά και τα υπόλοιπα ομοπλασμικά. Τα ετεροπλασμικά και ομοπλασμικά F1 θηλυκά των οποίων οι οικογένειες μελετήθηκαν ήταν αδέρφια (ανήκαν στην ίδια οικογένεια F1), και προέρχονταν από δύο οικογένειες της F1 γενιάς. Στην F2 γενιά παρατηρήσαμε μεταβίβαση της ετεροπλασμίας τόσο από τις μητέρες που ήταν ετεροπλασμικές όσο και από αυτές που εμφανιζόταν ομοπλασμικές. Αυτό δείχνει ότι τουλάχιστον κάποια από τα άτομα που καταγράψαμε στην F1 ως ομοπλασμικά, περιείχαν τον σπάνιο μιτότυπο της μητέρας (*ma*), σε επίπεδα μη ανιχνεύσιμα με την PCR. Η ετεροπλασμικότητα αυτών των θηλυκών εντοπίστηκε μέσω των απογόνων τους. Επομένως οι ομοπλασμικές F1 μητέρες θεωρήθηκαν ως μητέρες με καθόλου ή ελάχιστη ετεροπλασμία, ενώ οι ετεροπλασμικές F1 μητέρες θεωρήθηκαν ότι έχουν παραπάνω ποσοστό του σπάνιου μιτότυπου σε σχέση με τις ομοπλασμικές.

Ελέγξαμε στατιστικά αν οι ετεροπλασμικές μητέρες κληροδοτούν σε μεγαλύτερο βαθμό την ετεροπλασμία τους σε σχέση με τις ομοπλασμικές και βρήκαμε ότι δεν υπάρχει διαφορά. Η παρατήρηση αυτή έγινε σε τρία διαφορετικά επίπεδα καθώς οι οικογένειες από ομοπλασμικές και ετεροπλασμικές μητέρες δεν έδωσαν σημαντικά διαφορετικό αριθμό ατόμων με κληρονομούμενη ετεροπλασμία στην F2 ούτε

σημαντικά διαφορετικό αριθμό οικογενειών με ετεροπλασμία ούτε διαφορετική μέση συχνότητα ετεροπλασμίας στις οικογένειες (Πίνακας 17).

Πίνακας 17:(Α)Αριθμός οικογενειών με και χωρίς μητρική κληρονόμηση ετεροπλασμίας που προέκυψαν από ομοπλασμικές και ετεροπλασμικές μητέρες. (Β) Αριθμός ατόμων με και χωρίς μητρική κληρονόμηση ετεροπλασμίας που προέκυψαν από ομοπλασμικές και ετεροπλασμικές μητέρες. (C): Μέση συχνότητα μητρικής κληρονόμησης ετεροπλασμίας σε οικογένειες που προέκυψαν από ετεροπλασμικές και ομοπλασμικές μητέρες. Για κάθε επίπεδο ανάλυσης της συσχέτισης: ετεροπλασμία μητέρας- κληρονομούμενη ετεροπλασμία((Α),(Β),(C)) αναγράφονται οι τιμές σημαντικότητας .

HETEROPLASMY OF MOTHER	Heteroplasmic mothers	Homoplasmic Mothers
HETEROPASMY IN FAMILIES (A)		
Families with inherited heteroplasmy	7	7
Families with homoplasmy	12	13
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (10000 replicates) (P-value = 1)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value = 1)		
HETEROLASMY IN INDIVIDUALS (B)		
Individuals with inherited heteroplasmy	34	22
Individuals with homoplasmy	346	378
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (10000 replicates) (P-value = 0.07249)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value = 0.07133)		
MEAN FAMILY HETEROPLASMY(C)		
Mean Family Frequency of inherited heteroplasmy	0.08947368	0.055
Wilcoxon rank sum test with continuity correction (P-value = 0.6942)		
Kruskal-Wallis rank sum test (P-value = 0.6822)		

Οικογένεια προέλευση της μητέρας

Από οικογένειες F2 που επιλέξαμε να αναλύσουμε, κάποιες από τις μητέρες (F1) των οικογενειών αυτών προέρχονταν από την πατρική διασταύρωση 22E και οι υπόλοιπες από την πατρική διασταύρωση 24B. Όπως και στην περίπτωση της διαρροής του πατρικού mtDNA έτσι και στην περίπτωση της κληρονομήσιμης ετεροπλασμίας διερευνήσαμε αν η οικογένεια προέλευσης της μητέρας σχετίζεται με τη μεταβίβαση της ετεροπλασμίας στους απογόνους της. Το ερώτημα αυτό το διερευνήσαμε σε δύο διαφορετικά επίπεδα: α) κατά πόσο η προέλευση της μητέρας επηρεάζει τον αριθμό των οικογενειών με ετεροπλασμία λόγω κληρονόμησης και β) κατά πόσο επηρεάζει τον αριθμό ατόμων στα οποία θα μεταβιβάσουν την ετεροπλασμία. Οι αναλύσεις έδειξαν ότι η διαφορετική προέλευση της μητέρας μπορεί να επηρεάσει την κληρονόμηση της ετεροπλασμίας μόνο σε επίπεδο ατόμων (Πίνακας 18 Β) και όχι σε επίπεδο οικογενειών. Συγκεκριμένα, τα F1 θηλυκά που προέρχονται από την οικογένεια 22E μεταβιβάσαν τον σπάνιο μιτότυπο (*mall*) σε περισσότερα F2 άτομα απ' ότι τα θηλυκά που προέρχονται από την οικογένεια 24B.

Πίνακας 18: Αριθμός οικογενειών με και χωρίς μητρική ετεροπλασμία που προέκυψαν από μητέρες με οικογένεια προέλευσης 22E και 24B. (B) Αριθμός ατόμων με και χωρίς μητρική ετεροπλασμία που προέκυψαν από μητέρες με οικογένεια προέλευσης 22E και 24B.

FAMILY OF THE MOTHER	22E	24B
HETEROPASMY IN FAMILIES (A)		
Families with inherited heteroplasmy	9	5
Families with homoplasmy	10	15
Pearson's Chi-squared test with simulated p-value (10000 replicates) (P-value = 0.1949)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value = 0.1908)		
HETEROLASMY IN INDIVIDUALS (B)		
Individuals with inherited heteroplasmy	42	14
Individuals with homoplasmy	338	386
Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction (P-value =7.966e-05)		
Fisher's Exact Test for Count Data (P-value =4.288e-05)		

Συγκεντρωτικός πίνακας

Συνοψίζοντας, μελετήσαμε το φαινόμενο κληρονόμησης της μιτοχονδριακής ετεροπλασμίας στα υβρίδια F2, και ελέγξαμε κατά πόσο το φαινόμενο της διαρροής σχετίζεται με το φύλο, την οικογένεια (επίδραση της μητέρας), την ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας, και την καταγωγή της μητέρας. Στον Πίνακα 19 συνοψίζονται τα αποτελέσματα που αφορούν την κληρονόμησης της μιτοχονδριακής ετεροπλασμίας. Αρχικά παρατηρήσαμε ότι το φύλο είναι ένας παράγοντας που δεν καθορίζει το φαινόμενο της μεταβίβασης της ετεροπλασμίας. Δεύτερον, όπως και στην πατρική διαρροή έτσι και στην μεταβίβαση της ετεροπλασμίας, η οικογένεια, (επίδραση της μητέρας), σχετίζεται σημαντικά με τη μεταβίβαση της ετεροπλασμίας, καθώς οι αναλύσεις δείχνουν να υπάρχει ετερογένεια στα ποσοστά ετεροπλασμίας μεταξύ των οικογενειών. Τρίτον η ετεροπλασμική κατάσταση των μητέρων, δηλαδή εάν οι F1 μητέρες διέθεταν καθόλου - ελάχιστη ετεροπλασμία ή περισσότερη ετεροπλασμία, δεν επηρέασε σημαντικά την μεταβίβαση της ετεροπλασμίας στην επόμενη γενιά. Τέλος, όσον αφορά τον παράγοντα της προέλευσης της μητέρας, τα θηλυκά F1 και από τις δύο πατρικές οικογένειες προέλευσης έδωσαν στατιστικά τον ίδιο αριθμό οικογενειών με κληρονόμηση ετεροπλασμίας, αλλά οι F1 μητέρες που προέρχονταν από την οικογένεια 22E μεταβίβασαν την ετεροπλασμία τους σε περισσότερα F2 άτομα απ' ό,τι τα θηλυκά που προέρχονταν από την 24B. Παρόμοια αποτελέσματα είχαμε και στην περίπτωση, όπου συσχετίσαμε την πατρική διαρροή με την προέλευση της μητέρας.

Πίνακας 19: Συνολικός πίνακας με παράγοντες που μελετήθηκαν σε σχέση με την κληρονομήσιμη ετεροπλασμία, μαζί με τα στατιστικά τεστ και τις τιμές σημαντικότητας. Με κόκκινο χρώμα αναγράφονται οι τιμές σημαντικότητας που είναι μικρότερες από $\alpha=0,05$

Παράγοντας	Γενιά	Στατιστικό τεστ(τιμή στατιστικού)	P-value
Φύλο	F2	Chi-squaredtest (0.015694)	0,488
Οικογένεια	F2	simulated chi-squared test (107,76)	9.999e-05
		simulated Fisher's Exact Test	0,0004998
Ετεροπλασμία της μητέρας	F2 (Διαρροή σε οικογένειες)	simulated chi-squared test (0.014368)	1
		Fisher's Exact Test	1
	F2 (Διαρροή σε άτομα)	simulated chi-squared test (3.4753)	0.07249
		Fisher's Exact Test	0.07133
	F2 (Μέση διαρροή στις οικογένειες)	Wilcoxon rank sum test (202.5)	0.6942
		Kruskal-Wallis rank sum test (0.16771)	0.6822
Οικογένεια προέλευσης της μητέρας	F2 (Διαρροή σε οικογένειες)	simulated chi-squared test (2.1186)	0.1949
		Fisher's Exact Test	0.1908
	F2 (Διαρροή σε άτομα)	simulated chi-squared test (15.566)	7.966e-05
		Fisher's Exact Test	4.288e-05

Συσχέτιση κληρονομούμενης μητρικής ετεροπλασμίας και πατρικής διαρροής mtDNA

Το τελευταίο ερώτημα που μελετήσαμε είναι εάν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των φαινομένων της μητρικής κληρονομιάς της ετεροπλασμίας και της πατρικής διαρροής του mtDNA. Η μελέτη έγινε στα υβρίδια της F2 γενιάς όπου μπορούσαν να συμβούν και οι δύο αυτές διαδικασίες. Το ερώτημα αυτό το προσεγγίσαμε σε επίπεδο ατόμων και οικογενειών. Ο πρώτος τρόπος με τον οποίο προσεγγίσαμε τη συσχέτιση της μητρικής ετεροπλασμίας και της πατρικής διαρροής ήταν σε επίπεδο οικογενειών, εφόσον από τα προηγούμενα αποτελέσματα φαίνεται ότι και τα δύο αυτά φαινόμενα σχετίζονται με την οικογένεια. Συγκεκριμένα το ερώτημα που θέσαμε ήταν εάν μια οικογένεια που περιείχε τουλάχιστον ένα απόγονο με ετεροπλασμία κληρονομημένη από την μητέρα του, έχει μεγαλύτερες ή μικρότερες πιθανότητες να εμφανίσει πατρική διαρροή μιτοχονδριακού DNA (έστω και σε ένα άτομο από τα 20), σε σχέση με μία οικογένεια η οποία δεν εμφανίζει ετεροπλασμία λόγω κληρονομιάς (όλα τα άτομα της κληρονόμησαν έναν μιτότυπο από την μητέρα τους. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης χ^2 έδειξαν ότι υπάρχει δεν σημαντική συσχέτιση των δύο αυτών φαινομένων σε επίπεδο οικογενειών (Πίνακας 20).

Στην συνέχεια μελετήσαμε την συσχέτιση των δύο αυτών φαινομένων σε επίπεδο ατόμων. Συγκεκριμένα το ερώτημα που θέσαμε ήταν κατά πόσο ένα άτομο (ανεξάρτητα από την οικογένεια που προέρχεται) που έχει κληρονομήσει δύο μιτότυπους από τη μητέρα του έχει μεγαλύτερη ή μικρότερη πιθανότητα να αποκτήσει πατρική διαρροή σε σχέση με ένα άτομο που έχει κληρονομήσει μόνο

ένα μιτότυπο από την μητέρα του. Για τον έλεγχο αυτό αφαιρέσαμε τα άτομα εκείνα από τις οικογένειες οι οποίες δεν εμφάνιζαν ούτε το φαινόμενο της διαρροής ούτε της κληρονομής της ετεροπλασμίας. Με την αφαίρεση αυτή κρατήσαμε τα άτομα τα οποία ανήκαν σε οικογένειες οι οποίες εμφάνιζαν τουλάχιστον ένα από τα δύο φαινόμενα (μητρική κληρονομία και διαρροή), ώστε να μπορέσουμε να τα συσχετίσουμε. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης χ^2 έδειξαν ότι τα δύο αυτά φαινόμενα δεν συσχετίζονται σε επίπεδο ατόμων (Πίνακας 20).

Στην περίπτωση που δεν αφαιρέσαμε τα άτομα από τις οικογένειες οι οποίες δεν εμφάνιζαν ούτε τη διαρροή ούτε κληρονομία της ετεροπλασμίας, τα αποτελέσματα της ανάλυσης χ^2 έδειξαν ότι υπάρχει σημαντική συσχέτιση των δύο αυτών φαινομένων (Πίνακας 20). Ειδικότερα φαίνεται ότι τα δύο αυτά φαινόμενα σχετίζονται θετικά, δηλαδή τα άτομα τα οποία έχουν κληρονομήσει δύο μιτότυπους από την μητέρα τους έχουν μεγαλύτερη πιθανότητα να κληρονομήσουν και ένα τρίτο μιτότυπο από τον πατέρα τους σε σχέση με τα άτομα που έχουν κληρονομήσει μόνο έναν μητρικό μιτότυπο. Το αποτέλεσμα αυτό συμβαίνει διότι τα άτομα που δεν αφαιρέθηκαν αυξάνουν σημαντικά την κατηγορία των ατόμων που είναι ομοπλασμικά (λόγο μη διαρροής του πατρικού mtDNA, και μη κληρονομής του μητρικού mtDNA).

Πίνακας 20: (Α) Συχνότητα πατρικής διαρροής mtDNA σε ετεροπλασμικές και ομοπλασμικές F2 οικογένειες (λόγο κληρονομής) (Β) Συχνότητα πατρικής διαρροής mtDNA σε ετεροπλασμικά και ομοπλασμικά F2 άτομα (λόγο κληρονομής), μόνο για τα άτομα που ανήκουν σε οικογένειες οι οποίες εκδηλώνουν τουλάχιστον το ένα από τα φαινόμενα της διαρροής και της κληρονομής (C). Συχνότητα πατρικής διαρροής mtDNA σε ετεροπλασμικά και ομοπλασμικά F2 άτομα (λόγο κληρονομής) για όλα τα F2 άτομα. Για κάθε ανάλυση αναγράφονται τα στατιστικά τεστ και οι τιμές σημαντικότητας. Με κόκκινο χρώμα αναγράφονται οι τιμές σημαντικότητας που είναι μικρότερες από $\alpha=0,05$

INHERITED HETEROPLASMY			
LEAKAGE	(A)	Heteroplasmic Families	Homoplasmic families
	Leaked families	4	6
	Non-leaked families	10	19
	Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction(1.2898e-30)(P-value=1)		
	(B)	Heteroplasmic individuals	Homoplasmic individuals
	Leaked Individuals	10	46
	Non-leaked individuals	60	285
	Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction(5.2695e-31)(P-value=1)		
	(C)	Heteroplasmic individuals	Homoplasmic individuals
	Leaked Individuals	10	46
Non-leaked individuals	60	664	
Pearson's Chi-squared test with Yates' continuity correction(4.7148)(P-value= 0.0299)			

Συζήτηση

Μέθοδος PCR για ανίχνευση ετεροπλασμίας

Στην παρούσα εργασία η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση ετεροπλασμίας είναι η PCR. Υπάρχουν ενδείξεις ότι η ποσότητα του σπάνιου μιτότυπου που έπρεπε να ανιχνευθεί, ήταν αρκετά χαμηλή σε σχέση με τον συχνό μιτότυπο κι επομένως ο εντοπισμός της ετεροπλασμίας επηρεάζεται από τη διακριτική ικανότητα των εκκινητών. Ο προσδιορισμός της διακριτικής ικανότητας των εκκινητών της παρούσας εργασίας είχε πραγματοποιηθεί στο παρελθόν (Μ.-Ε. Ε. Παρακατσελάκη 2016) ο οποίος επιτρέποντας μας να καθορίσουμε την ελάχιστη σπάνιου mtDNA που μπορεί να ανιχνευθεί παρουσία του συχνού mtDNA, μας βοηθάει να εκτιμήσουμε ποια είναι η πιθανότητα να υπάρχει κάποιο ετεροπλασμικό άτομο και να μην έγινε δυνατός ο εντοπισμός του. Το ζεύγος *mal_1819F/maurI_2531R* έχει μικρή διακριτική ικανότητα, αφού ανιχνεύει πατρικό mtDNA μέχρι την αραιώση 10^{-2} . Από τη μια πλευρά μπορεί να αποτελεί μειονέκτημα, διότι η πιθανότητα αποτυχίας εντοπισμού κάποιου ετεροπλασμικού ατόμου με πολύ ελάχιστα ποσοστά ετεροπλασμίας είναι μεγάλη. Από τη άλλη όμως, η εύρεση ετεροπλασμικών ατόμων με το συγκεκριμένο ζεύγος, οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το σπάνιο mtDNA βρίσκεται σε αρκετά μεγάλες ποσότητες σε αυτά τα άτομα. Με το συγκεκριμένο ζεύγος στην F1 γενιά εκτός από τα αρσενικά άτομα με διαρροή (*mal* πατρικός μιτότυπος) εντοπίστηκαν 19 θηλυκά της οικογένειας 24B, 1 θηλυκό από την οικογένεια 24E και ένα θηλυκό από την οικογένεια 24F, ενώ στην F2 γενιά εντοπίστηκαν όλα εκείνα τα άτομα που είχαν κληρονομήσει τον σπάνιο μιτότυπο *mal* από την μητέρα τους μαζί με τον συχνό *sil*. Το ζεύγος *mall_1699F/maurI_2531R* έχει αρκετά καλύτερο όριο ανίχνευσης, καθώς καταφέρνει να ενισχύσει πατρικό mtDNA σε αραιώση 10^{-5} (Μ.-Ε. Ε. Παρακατσελάκη 2016). Την καλύτερη διακριτική ικανότητα είχε το ζεύγος *simI_1737F/maurI_2531R*, το οποίο ανιχνεύει το μιτότυπο *mauII* στην αραιώση 10^{-5} και το μιτότυπο *mal* στην αραιώση 10^{-8} (Μ.-Ε. Ε. Παρακατσελάκη 2016). Έτσι, η πιθανότητα να υπήρχε κάποιο ετεροπλασμικό άτομο στους απογόνους των διασταυρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν τα δύο παραπάνω ζεύγη εκκινητών και να μην εντοπίστηκε είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με το ζεύγος *mal_1819F/maurI_2531R*. Αυτό δείχνει, ότι αν υπάρχουν ετεροπλασμικά άτομα που δεν εντοπίστηκαν με τα δύο παραπάνω ζεύγη τότε αυτά φέρουν απειροελάχιστα ποσά του σπάνιου μιτότυπου. Με το ζεύγος *mall_1699F/maurI_2531R* στην F1 γενιά εντοπίστηκαν ετεροπλασμικά αρσενικά (*mall* μιτότυπος) και 9 ετεροπλασμικά θηλυκά της οικογένειας 22E, ενώ στην F2 γενιά εντοπίστηκαν όλα εκείνα τα άτομα που είχαν κληρονομήσει τον σπάνιο μιτότυπο *mall* από την μητέρα τους μαζί με τον συχνό *sil*. Τέλος με το ζεύγος *simI_1737F/maurI_2531R* στην F1 εκτός από αρσενικά ετεροπλασμικά (*mal* και *mall* μιτότυπος) εντοπίστηκαν δυο ετεροπλασμικά θηλυκά από την οικογένεια 25F, ενώ

στην F2 το ζεύγος χρησιμοποιήθηκε σε κάποια άτομα στα οποία είχε συμβεί διαρροή ώστε να εντοπιστεί ο σπάνιος μιτότυπος της μητέρας.

Στα αρσενικά άτομα της F1 γενιάς το πατρικό mtDNA που προέκυψε λόγω διαρροής εντοπιζόταν πάντα με την πρώτη PCR και πάντα έδινε "ισχυρό σήμα" στο πήκτωμα αγαρόζης, οπότε δεν τίθεται θέμα στο εντοπισμό της διαρροής. Αντίθετα στα θηλυκά υβρίδια της F1 γενιάς υπήρξαν άτομα τα οποία ενώ φάνηκαν να είναι ομοπλασμικά, αποδείχτηκαν ετεροπλασμικά μέσω των απογόνων τους. Με άλλα λόγια, δεν καταφέραμε να πολλαπλασιάσουμε τον σπάνιο μιτότυπο στα ίδια τα F1 θηλυκά, αλλά τον πολλαπλασιάσαμε στους απογόνους τους, στους οποίους προφανώς τον είχαν κληροδοτήσει. Αντίστοιχα και στην F2 γενιά δεν μπορεί να εκτιμηθεί το ποσοστό των ατόμων που διέθεταν ένα σπάνιο μιτότυπο αλλά δεν καταφέραμε να τον ανιχνεύσουμε. Μια λύση στον εντοπισμό των σπάνιων απλοτύπων που βρίσκονται σε ποσότητες χαμηλότερες του ορίου ανίχνευσης των εκκινητών είναι οι τεχνικές αλληλούχισης νέας γενιάς (NGS). Οι τεχνικές αυτές αποτελούν είναι ένα ισχυρό εργαλείο στο κομμάτι της ετεροπλασμίας επειδή έχουν την ικανότητα να ανιχνεύουν μόρια που εμφανίζονται σε πολύ μικρές ποσότητες μέσα από μία ομάδα πολλών μορίων DNA (Ladoukakis and Zouros 2017), και παράλληλα δίνουν την δυνατότητα ακριβής ποσοτικοποίησης (Robin et al. 2016).

Πατρική Διαρροή mtDNA

Φύλο

Ο πρώτος σημαντικός παράγοντας που σχετίζεται με την πατρική διαρροή του mtDNA είναι το φύλο. Στα υβρίδια της F1 γενιάς, τα οποία προέκυψαν από την διασταύρωση των ειδών *D. simulans* και *D. mauritiana* παρατηρήθηκε μεγάλη μεροληψία ως προς το φύλο, με την συχνότητα διαρροής να είναι 100% στα αρσενικά και 5,3% στα θηλυκά. Αντίθετα στα υβρίδια της F2 γενιάς τα οποία προέκυψαν από την διασταύρωση υβριδίων *D.simulans /D.mauritiana* με *D .simulans* το ποσοστό της διαρροής υπολογίστηκε στο 0,09 χωρίς να υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των φύλων.

Η διαρροή αυτή είναι πραγματική, καθώς σε όλες τις PCR χρησιμοποιούνταν οι κατάλληλοι αρνητικοί και θετικοί μάρτυρες, με τους οποίους ήταν δυνατό να διαπιστώνεται κάθε φορά ότι οι εκκινητές πολλαπλασίαζαν μόνο το πατρικό mtDNA και όχι το μητρικό. Μία περίπτωση, στην οποία η ετεροπλασμία που διαπιστώνεται σε κάποια άτομα θα μπορούσε να είναι πλασματική, είναι οι εκκινητές να πολλαπλασιάζουν κάποιο NUMT, δηλαδή κάποιο πυρηνικό αντίγραφο του mtDNA. Ωστόσο, αυτό δεν είναι δυνατό να συμβαίνει, καθώς εφόσον πρόκειται για πυρηνική περιοχή, η αλληλουχία θα ενισχυόταν σε όλα τα άτομα.

Η αδυναμία ανίχνευσης διαρροής στα θηλυκά στην F1 θα μπορούσε να οφείλεται σε αδυναμία πολλαπλασιασμού του επιθυμητού υποστρώματος λόγω παρουσίας αναστολέων. Ωστόσο, κάτι τέτοιο είναι αδύνατο, καθώς για όλα τα άτομα, γινόταν PCR και για τον μητρικό μιτότυπο. Έτσι, η παρουσία πιθανών αναστολέων της PCR θα διαπιστωνόταν σε αυτό το στάδιο, αφού δε θα παραγόταν προϊόν. Ωστόσο, σε όλα τα θηλυκά που εξετάστηκαν ο μητρικός μιτότυπος ενισχύθηκε με επιτυχία, ενώ βρέθηκαν και κάποια ετεροπλασμικά θηλυκά, γεγονός που καθιστά την απουσία του πατρικού μιτότυπου από τα θηλυκά και τη male-biased διαρροή πραγματικά γεγονότα, και όχι γεγονότα που προέκυψαν λόγω τεχνικών λόγων.

Τα αποτελέσματα της διαρροής στην F1 γενιά συμφωνούν με τα αποτελέσματα των (M.-E. Παρακατσελάκη 2016; Dokianakis and Ladoukakis 2014), οι οποίοι παρατήρησαν διαφορές στην συχνότητα διαρροής μεταξύ των δύο φύλων και σε άλλες διαιδικές διασταυρώσεις *Drosophila*. Αντίστοιχες μελέτες με τη χρήση παρόμοιων μεθόδων για τον υπολογισμό ποσοστών διαρροής σε διαιδικές διασταυρώσεις έχουν γίνει και από τους (Kondo, Matsuura, and Chigusa 1992; Sherengul, Kondo, and Matsuura 2006), με τη διαφορά ότι τα αποτελέσματα δεν ποσοτικοποιούνταν σε επίπεδο ατόμου ή φύλου. Οι (Rokas, Ladoukakis, and Zouros 2003) πρότειναν ένα μοντέλο σχετικά με το βαθμό της διαρροής του πατρικού mtDNA. Το μοντέλο προτείνει ότι η διαρροή θα πρέπει να είναι υψηλότερη μεταξύ των δια-ειδικών διασταυρώσεων σε σχέση με τις ενδοειδικές και ότι η συχνότητα διαρροής θα πρέπει να αυξάνει με την γενετική απόκλιση των υβριδικών ειδών. Τα αποτελέσματα της παρούσας συμφωνούν με την δεύτερη πρόβλεψη του μοντέλου καθώς η συχνότητα διαρροής στην F2 γενιά είναι πολύ μικρότερη σε σχέση με την συχνότητα διαρροής στην F1, όπου οι γονείς που έδωσαν την F2 γενιά είναι έχουν μικρότερη γενετική απόκλιση σε σχέση με τους γονείς που έδωσαν την F1 γενιά. Η διαφορά που παρατηρήσαμε μεταξύ των δύο φύλων δείχνει ότι σε μία υβριδική διασταύρωση, ο μηχανισμός που εμποδίζει τη διαρροή του πατρικού mtDNA όντως καταρρέει αλλά επηρεάζει δυσανάλογα τα δύο φύλα. Υποδεικνύει ότι η διαρροή πατρικού mtDNA μπορεί να μην είναι στοχαστικό αποτέλεσμα ενός μηχανισμού ο οποίος είναι επιρρεπής σε σφάλματα, αλλά μάλλον, είναι υπό πολύπλοκο γενετικό έλεγχο.

Γενετική απόσταση των γονέων

Στην F2 γενιά παρόλο που παρατηρήσαμε διαρροή, το πρότυπο της δεν συμφωνούσε με το πρότυπο της F1 γενιάς. Στην F1 υπήρξαν έντονες διαφορές μεταξύ των φύλων με τα αρσενικά να εμφανίζουν 100% διαρροή και τα θηλυκά να εμφανίζουν περίπου 5%. Αντίθετα στην F2 παρατηρήσαμε ίδιο ποσοστό διαρροής και στα 2 φύλα (9%). Οι διαφορές στα επίπεδα της διαρροής που παρατηρήσαμε μεταξύ των F1 και F2 υβριδίων ήταν στατιστικά σημαντικές στο σύνολο των υβριδίων, με την F1 γενιά να έχει συνολικά περισσότερα ετεροπλασμικά άτομα από

την F2. Όταν όμως εξετάσαμε το κάθε φύλο χωριστά παρατηρήσαμε ότι υπάρχει στατιστικά σημαντική μείωση στην διαρροή στα αρσενικά υβρίδια από την F1 στην F2 γενιά, και στατιστικά σημαντική αύξηση στην διαρροή στα θηλυκά υβρίδια από την F1 στην F2 γενιά. Συμπεραίνουμε ότι η διαφορά που είδαμε στο σύνολο των ατόμων οφείλεται στην επίδραση των αρσενικών.

Η διαφορά που παρατηρήσαμε στα αρσενικά άτομα ερμηνεύεται στο ότι τα πυρηνικά υπόβαθρα των γονέων της F2 γενιάς έχουν μικρότερη γενετική απόσταση σε σχέση με τα πυρηνικά υπόβαθρα των γονέων της F1 γενιάς, με αποτέλεσμα στην F2 γενιά ο μηχανισμός παρεμπόδισης της διαρροής να δρα πιο αποτελεσματικά. Στην P γενιά, οι γονείς αποτελούσαν δύο διακριτά είδη (*D.simulans* και *D.mauritiana*), με αποτέλεσμα το πυρηνικό γονιδίωμα των F1 υβριδίων να συνίσταται από τα γονιδιώματα *simulans* και *mauritiana* σε με ίση αναλογία από το κάθε γονιδίωμα. Κατά τον σχηματισμό της F2 γενιάς οι γονείς αποτελούνταν από υβρίδια *simulans/mauritiana* και καθαρά είδη *D.simulans*. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τα F2 υβρίδια να έχουν ένα πυρηνικό γονιδίωμα, που συνίσταται από τα γονιδιώματα *simulans* και *mauritiana* σε αναλογία 75% και 25% αντίστοιχα. Όσον αφορά την διαφορά που παρατηρήσαμε στα θηλυκά άτομα, δεν είναι δυνατόν να την ερμηνεύσουμε.

Οικογένεια

Στο φαινόμενο της διαρροής του πατρικού mtDNA παρατηρήσαμε να υπάρχει διακύμανση στο ποσοστό της διαρροής μεταξύ των οικογενειών. Η παρατήρηση αυτή ισχύει για τα υβρίδια της γενιάς F1 (μόνο θηλυκά) και για τα υβρίδια της γενιάς F2. Αυτό το εύρημα είναι μια ισχυρή ένδειξη ότι το φαινόμενο της διαρροής ελέγχεται γενετικά και δεν συμβαίνει πάντα τυχαία ή σε σπάνιες περιπτώσεις κατάρρευσης των μηχανισμών παρεμπόδισης της. Κατά την διάρκεια της πειραματικής εκτέλεσης των διασταυρώσεων σε έναν σωλήνα τοποθετούνταν ένα θηλυκό άτομο με 3 αρσενικά, ώστε να εξασφαλιστεί η επιτυχής σύζευξη. Γι' αυτό τον λόγο δεν μπορούμε να γνωρίζουμε εάν οι απόγονοι μιας διασταύρωσης προέκυψαν από ένα ή περισσότερα αρσενικά. Οπότε στην επίδραση της οικογένειας δεν μπορούμε να πούμε εάν καθοριστικό ρόλο στην διαρροή διαδραματίζει το αρσενικό ή το θηλυκό άτομο, ή ο μοναδικός συνδυασμός τους. Για να ελεγχθεί αυτή η υπόθεση θα μπορούσαν να επαναληφθούν παρόμοιες διασταυρώσεις έχοντας σε κάθε οικογένεια για γονείς, μόνο ένα αρσενικό με ένα θηλυκό άτομο, καθώς επίσης και διασταυρώσεις όπου θα έχουμε πολλές οικογένειες οι οποίες θα προκύπτουν από της σύζευξη του ίδιου αρσενικού ατόμου με διαφορετικά θηλυκά.

Το γεγονός ότι υπάρχει ποικιλομορφία στα ποσοστά διαρροής μεταξύ των οικογενειών, οδηγεί στην υπόθεση ότι είναι ένα επιλεκτικό φαινόμενο.

Προϋπόθεση για να δράσει η φυσική επιλογή σε κάποιον χαρακτήρα, είναι να υπάρχει γενετική ποικιλομορφία σε αυτόν τον χαρακτήρα, η οποία θα αντικατοπτρίζεται σε φαινοτυπική ποικιλομορφία. Εάν θεωρήσουμε ότι η πατρική διαρροή συμβαίνει τακτικά σε χαμηλές συχνότητες για να αποφευχθεί εκφυλισμός του μιτοχονδριακού γονιδιώματος, τότε η επιλογή θα πρέπει να δράσει με τέτοιο τρόπο ώστε κάθε φορά να επιλέγονται οι οικογένειες που θα δίνουν χαμηλές συχνότητες διαρροής. Η επιλογή τέτοιων οικογενειών θα διασφαλίζει σε μεγάλο βαθμό την μητρική κληρονομία και την αποτροπή εξάπλωσης εγωιστικών mtDNA, άλλα ταυτόχρονα θα δίνει την δυνατότητα να συμβεί ανασυνδυασμός.

Η παρατήρηση στα υβρίδια της F2 γενιάς όπου το ποσοστό διαρροής διαφέρει μεταξύ των οικογενειών των οποίων οι μητέρες είχαν διαφορετική καταγωγή, πιθανά να σχετίζεται με τον παράγοντα "οικογένεια" της F1 γενιάς. Στις οικογένειες της F2 γενιάς είχαμε F1 θηλυκά που προέρχονταν από 2 διαφορετικές πατρικές οικογένειες, πράγμα που σημαίνει ότι η διαφορετική καταγωγή, άρα και το διαφορετικό γενετικό υπόβαθρο αντικατοπτρίστηκε σε διαφορές στα ποσοστά διαρροής.

Ηλικία της μητέρας

Στην παρούσα εργασία μελετήσαμε σε δύο οικογένειες της F1 γενιάς (22E, 24B) την επίδραση της ηλικίας της μητέρας στο ποσοστό των ετεροπλασμικών ατόμων που δίνει. Σε μία από αυτές τις οικογένειες, στην 24B, στην οποία είχαμε και μεγαλύτερο δείγμα ατόμων, παρατηρήσαμε σημαντική αύξηση των ετεροπλασμικών θηλυκών εξαιτίας διαρροής με την αύξηση της ηλικίας της μητέρας. Αντίθετα στην 22E οικογένεια, όπου είχαμε μικρότερο δείγμα θηλυκών απογόνων δεν παρατηρήσαμε σημαντικές διαφορές. Είναι γνωστό ότι η ηλικία μια ήδη ετεροπλασμικής μητέρας επιδρά στα ποσοστά της ετεροπλασμίας που η ίδια κληροδοτεί στους απογόνους της. Συγκεκριμένα με βάση τους Kann et al. (1998) ετεροπλασμικά θηλυκά *Drosophila melanogaster* έδιναν απογόνους με μεγαλύτερα ποσοστά ετεροπλασμίας όσο αύξανε η ηλικία των θηλυκών. Επιπλέον στον άνθρωπο έχει βρεθεί να υπάρχει θετική συσχέτιση μεταξύ του ποσοστού της ετεροπλασμίας στο παιδί και την ηλικία της μητέρας κατά την γονιμοποίηση το οποίο αποδίδεται στην γήρανση των ωοκυττάρων (Rebolledo-Jaramillo et al. 2014). Επίσης υπάρχουν αρκετές μελέτες που συσχετίζουν την ηλικία ενός ατόμου με τον αριθμό μιτοχονδριακών αντιγράφων που αυτό φέρει. Πιο συγκεκριμένα, υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι με την αύξηση της ηλικίας, τα μιτοχονδριακά αντίγραφα μειώνονται (van Leeuwen et al. 2014; Mengel-From et al. 2014; Ding et al. 2015). Προς το παρόν δεν υπάρχει επαρκής βιβλιογραφία σχετικά με την επιρροή που έχει η ηλικία της μητέρας στα ποσοστά διαρροής που θα έχουν οι απόγονοί της. Μια ερμηνεία μου θα μπορούσε να δοθεί για την οικογένεια 24B στα - είναι ότι όσο γηραιότερο είναι ένα άτομο, τόσο περισσότερες μεταλλάξεις θα

έχει συσσωρεύσει στο γονιδίωμα του. Επομένως τα γονίδια που ρυθμίζουν την παρεμπόδιση της πατρικής διαρροής έχουν μεγαλύτερες πιθανότητες να έχουν υποστεί μεταλλάξεις σε ένα ηλικιωμένο θηλυκό σε σχέση με ένα νεαρό, με αποτέλεσμα να προκύπτουν ολόένα και περισσότεροι ετεροπλασμικοί απόγονοι με την αύξηση της ηλικίας της μητέρας.

Ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας.

Στην F2 γενιά έγινε συσχέτιση της συχνότητας διαρροής με την ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας. Όπως ήδη περιγράψαμε οι οικογένειες της F2 γενιάς προέρχονταν από μητέρες F1 οι οποίες είχαν από καθόλου-ελάχιστη ετεροπλασμία, και από μητέρες F1 με λίγη ετεροπλασμία. Αυτό που μας έδειξαν τα αποτελέσματα είναι ότι υπάρχει διαφορά στην ποσότητα διαρροής ανάλογα με την ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας, και συγκεκριμένα στις οικογένειες των οποίων η μητέρα είχε από καθόλου-ελάχιστη ετεροπλασμία συνέβαινε διαρροή σε μεγαλύτερο βαθμό απ' ότι στις οικογένειες των οποίων η μητέρα είχε παραπάνω ετεροπλασμία. Βιβλιογραφικά δεν υπάρχουν στοιχεία τα οποία θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν μια τέτοια παρατήρηση. Έχουμε ήδη παρατηρήσει ότι η πατρική διαρροή του mtDNA επηρεάζεται σημαντικά από γενετικούς παράγοντες καθώς, παρατηρήσαμε διαφορές μεταξύ των φύλων και μεταξύ των οικογενειών. Η παρατήρηση, ότι η ετεροπλασμική κατάσταση ενός θηλυκού σχετίζεται με την διαρροή στους απογόνους του ενισχύει την υπόθεση ότι η διαρροή καθορίζεται από γενετικούς μηχανισμούς και, πιθανά, οι ίδιοι μηχανισμοί που συνέβαλαν στην διαρροή των μητέρων, άρα και στην ετεροπλασμική τους κατάσταση, συνέβαλαν και στην διαρροή των απογόνων τους.

Κληρονόμηση ετεροπλασμίας

Είναι γνωστό ότι τα μιτοχόνδρια "περνάνε" από μια φάση στενωπού στα πρώτα στάδια της εμβρυογένεσης (Pikó and Taylor 1987; Creeetal. 2008), και μια δεύτερη στενωπό κατά την φάση της ωογένεσης (BergstromandPritchard 1998; CoxandSpradling 2003). Η διαδικασία της στενωπού είναι από μόνη της μία τυχαία διαδικασία η οποία μπορεί να δράσει συνδυαστικά με την επιλογή. Για να έχουμε την μεταβίβαση ενός σπάνιου μιτοχονδριακού απλοτύπου από ένα θηλυκό στα αυγά του θα πρέπει έστω τυχαία ο μιτότυπος αυτός να μην χάθηκε. Δεν μπορούμε να έχουμε εκτίμηση του μεγέθους της στενωπού που υπέστησαν οι *ma* μιτότυποι στα F1 υβρίδια. Σε μία εργασία που πραγματοποιήθηκε σε βατράχια του γένους *Pelophylax* (Εργ. Πληθυσμιακής Γενετικής και Εξέλιξης- Μη δημοσιευμένα αποτελέσματα), παρατηρήθηκε η δράση της επιλογής από τα ετεροπλασμικά θηλυκά στα αυγά τους. Συγκεκριμένα ετεροπλασμικά θηλυκά με απειροελάχιστα ποσοστά ετεροπλασμίας, μεταβίβαζαν τον σπάνιο μιτότυπο σε σχεδόν όλα τα αυγά τους. Εκτός από τα βατράχια, η δράση της επιλογής στην μεταβίβαση της

ετεροπλασμίας από το θηλυκό στους απογόνους έχει εντοπιστεί και στα ποντίκια (James Bruce Stewart et al. 2008; Burr, Pezet, and Chinnery 2018)

Τα αποτελέσματά μας δείχνουν ότι η ετεροπλασμία της F2 γενιάς που προέκυψε από το θηλυκό στους απογόνους επηρεάζεται σημαντικά από την οικογένεια, και δεν επηρεάζεται σημαντικά από το ποσοστό ετεροπλασμίας της μητέρας. Το αναμενόμενο αποτέλεσμα εάν η μεταβίβαση ήταν τυχαία θα ήταν να έχουμε περισσότερους ετεροπλασμικούς απογόνους στις οικογένειες όπου οι μητέρες έφεραν περισσότερη ετεροπλασμία. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι πιθανά να υπάρχει να υπάρχει κάποια μορφή επιλογής, προζυγωτική ή μετά ζυγωτική η οποία να ενισχύει τον σπάνιο μιτότυπο *ma* σε συγκεκριμένες οικογένειες, και να τον εξαφανίζει από άλλες, ανεξάρτητα από την ετεροπλασμική κατάσταση της μητέρας. Επομένως η διαφοροποίηση που παρατηρούμε στις οικογένειες θα οφείλεται σε διαφορετική συνεργασία πυρήνα-mtDNA (mito-nuclear interactions).

Συσχέτιση πατρικής διαρροής mtDNA και μητρικής κληρονομής ετεροπλασμίας

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων δείχνουν ότι πιθανά δεν υπάρχει κάποια συσχέτιση μεταξύ των φαινομένων της πατρικής διαρροής και της μητρικής κληρονομής της ετεροπλασμίας, ούτε σε επίπεδο ατόμων ούτε σε επίπεδο οικογενειών. Με άλλα λόγια ένα άτομο/οικογένεια που εμφανίζει ετεροπλασμία λόγω κληρονομής έχει ίδιες πιθανότητες να εμφανίσει και ετεροπλασμία λόγω διαρροής με ένα άτομο/οικογένεια που δεν έχει κληρονομήσει ετεροπλασμία από την μητέρα του. Παρατηρούμε ότι παρόλο που και τα δυο αυτά φαινόμενα φαίνεται να καθορίζονται γενετικά (η οικογένεια παίζει σημαντικό ρόλο) είναι ανεξάρτητα μεταξύ τους, και πιθανά να ρυθμίζονται από διαφορετικούς γενετικούς παράγοντες.

Βιβλιογραφία

- Abbott, Cathryn L., Michael C. Double, John W H Trueman, Anna Robinson, and Andrew Cockburn. 2005. "An Unusual Source of Apparent Mitochondrial Heteroplasmy: Duplicate Mitochondrial Control Regions in *Thalassarche Albatrosses*." *Molecular Ecology* 14 (11): 3605–13. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02672.x.
- Al Rawi, Sara, Sophie Louvet-Vallée, Abderazak Djeddi, Martin Sachse, Emmanuel Culetto, Connie Hajjar, Lynn Boyd, Renaud Legouis, and Vincent Galy. 2011. "Postfertilization Autophagy of Sperm Organelles Prevents Paternal Mitochondrial DNA Transmission." *Science (New York, N.Y.)* 334 (6059): 1144–47. doi:10.1126/science.1211878.
- Ala-Honkola, Outi, and Mollie K. Manier. 2016. "Multiple Mechanisms of Cryptic Female Choice Act on Intraspecific Male Variation in *Drosophila Simulans*." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 70 (4). Springer Berlin Heidelberg: 519–32. doi:10.1007/s00265-016-2069-3.
- Anderson, S., A. T. Bankier, B. G. Barrell, M. H. L. de Bruijn, A. R. Coulson, J. Drouin, I. C. Eperon, et al. 1981. "Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome." *Nature* 290 (5806). Nature Publishing Group: 457–65. doi:10.1038/290457a0.
- Andersson, G. E., Olof Karlberg, Björn Canbäck, and Charles G. Kurland. 2003. "On the Origin of Mitochondria: A Genomics Perspective." Edited by J. F. Allen and J. A. Raven. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 358 (1429): 165–79. doi:10.1098/rstb.2002.1193.
- Andersson, Siv G. E., Alireza Zomorodipour, Jan O. Andersson, Thomas Sicheritz-Pontén, U. Cecilia M. Alsmark, Raf M. Podowski, A. Kristina Näslund, Ann-Sofie Eriksson, Herbert H. Winkler, and Charles G. Kurland. 1998. "The Genome Sequence of *Rickettsia prowazekii* and the Origin Of mitochondria." *Nature* 396 (6707). Nature Publishing Group: 133–40. doi:10.1038/24094.
- Anesti, Vasiliki, and Luca Scorrano. 2006. "The Relationship between Mitochondrial Shape and Function and the Cytoskeleton." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1757 (5–6). Elsevier: 692–99. doi:10.1016/J.BBABIO.2006.04.013.
- Ashburner, M., Kent G. Golic, and R. Scott Hawley. 2005. *Drosophila: A Laboratory Handbook*. Second. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. https://books.google.gr/books?id=S0ZtQgAACAAJ&hl=el&source=gbp_book_other_versions.
- Ballard, J. William O., and David M. Rand. 2005. "The Population Biology of Mitochondrial DNA and Its Phylogenetic Implications." *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36 (1). Annual Reviews: 621–42. doi:10.1146/annurev.ecolsys.36.091704.175513.
- Barr, Camille M., Maurine Neiman, and Douglas R. Taylor. 2005. "Inheritance and Recombination of Mitochondrial Genomes in Plants, Fungi and Animals." *New Phytologist* 168 (1): 39–50. doi:10.1111/j.1469-8137.2005.01492.x.
- Bereiter-Hahn, J., and M. Vöth. 1994. "Dynamics of Mitochondria in Living Cells: Shape Changes, Dislocations, Fusion, and Fission of Mitochondria." *Microscopy Research and Technique* 27 (3): 198–219. doi:10.1002/jemt.1070270303.

- Berg, Otto G., and C. G. Kurland. 2000. "Why Mitochondrial Genes Are Most Often Found in Nuclei." *Molecular Biology and Evolution* 17 (6): 951–61. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a026376.
- Bergstrom, Carl T., and Jonathan Pritchard. 1998. "Germline Bottlenecks and the Evolutionary Maintenance of Mitochondrial Genomes." *Genetics* 149 (4): 2135–46. doi:10.1146/annurev.ge.25.120191.000401.
- Berlin, Sofia, Nick G.C. Smith, and Hans Ellegren. 2004. "Do Avian Mitochondria Recombine?" *Journal of Molecular Evolution* 58 (2). Springer-Verlag: 163–67. doi:10.1007/s00239-003-2537-z.
- Birky, C W. 1995. "Uniparental Inheritance of Mitochondrial and Chloroplast Genes: Mechanisms and Evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (25): 11331–38. doi:10.1073/pnas.92.25.11331.
- Birky, C William. 2001. "THE INHERITANCE OF GENES IN MITOCHONDRIA AND CHLOROPLASTS : Laws , Mechanisms , and Models."
- Boussau, B., E. O. Karlberg, A. C. Frank, B.-A. Legault, and S. G. E. Andersson. 2004. "Computational Inference of Scenarios for -Proteobacterial Genome Evolution." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (26): 9722–27. doi:10.1073/pnas.0400975101.
- Bratic, Ana, and Nils-Göran Larsson. 2013. "The Role of Mitochondria in Aging." *The Journal of Clinical Investigation* 123 (3). American Society for Clinical Investigation: 951–57. doi:10.1172/JCI64125.
- Breucker, H, E Schäfer, and A F Holstein. 1985. "Morphogenesis and Fate of the Residual Body in Human Spermiogenesis." *Cell and Tissue Research* 240 (2): 303–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3995554>.
- Brochier-Armanet, C., E. Talla, and S. Gribaldo. 2009. "The Multiple Evolutionary Histories of Dioxigen Reductases: Implications for the Origin and Evolution of Aerobic Respiration." *Molecular Biology and Evolution* 26 (2): 285–97. doi:10.1093/molbev/msn246.
- Bruggeman, Judith, Alfons J M Debets, Pieter J. Wijngaarden, J. Arjan G M DeVisser, and Rolf F. Hoekstra. 2003. "Sex Slows down the Accumulation of Deleterious Mutations in the Homothallic Fungus *Aspergillus Nidulans*." *Genetics* 164 (2): 479–85.
- Burger, Gertraud, Michael W. Gray, Lise Forget, and B. Franz Lang. 2013. "Strikingly Bacteria-Like and Gene-Rich Mitochondrial Genomes throughout Jakobid Protists." *Genome Biology and Evolution* 5 (2): 418–38. doi:10.1093/gbe/evt008.
- Burr, Stephen P., Mikael Pezet, and Patrick F. Chinnery. 2018. "Mitochondrial DNA Heteroplasmy and Purifying Selection in the Mammalian Female Germ Line." *Development, Growth & Differentiation* 60 (1). John Wiley & Sons, Ltd (10.1111): 21–32. doi:10.1111/dgd.12420.
- Campello, Silvia, and Luca Scorrano. 2010. "Mitochondrial Shape Changes: Orchestrating Cell Pathophysiology." *EMBO Reports* 11 (9). European Molecular Biology Organization: 678–84. doi:10.1038/embor.2010.115.
- Cariou, M L, J F Silvain, V Daubin, J L Da Lage, and D Lachaise. 2001. "Divergence between *Drosophila Santomea* and Allopatric or Sympatric Populations of *D. Yakuba* Using

- Paralogous Amylase Genes and Migration Scenarios along the Cameroon Volcanic Line." *Molecular Ecology* 10 (3): 649–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11298976>.
- Chan, David C, and Eric A Schon. 2012. "Eliminating Mitochondrial DNA from Sperm." *Developmental Cell* 22 (3). NIH Public Access: 469–70. doi:10.1016/j.devcel.2012.02.008.
- Charlesworth, Deborah, and Stephen I Wright. 2001. "Breeding Systems and Genome Evolution." *Current Opinion in Genetics & Development* 11 (6): 685–90. doi:10.1016/S0959-437X(00)00254-9.
- Chat, J., L. Chalak, and R. J. Petit. 1999. "Strict Paternal Inheritance of Chloroplast DNA and Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA in Intraspecific Crosses of Kiwifruit." *Theoretical and Applied Genetics* 99 (1–2). Springer-Verlag: 314–22. doi:10.1007/s001220051238.
- Christie, Joshua R., Timothy M. Schaerf, and Madeleine Beekman. 2015. "Selection against Heteroplasmy Explains the Evolution of Uniparental Inheritance of Mitochondria." Edited by David M. Rand. *PLOS Genetics* 11 (4). Public Library of Science: e1005112. doi:10.1371/journal.pgen.1005112.
- Ciborowski, Kate L, Sofía Consuegra, Carlos García de Leániz, Mark A Beaumont, Jinliang Wang, and William C Jordan. 2007. "Rare and Fleeting: An Example of Interspecific Recombination in Animal Mitochondrial DNA." *Biology Letters* 3 (5): 554–57. doi:10.1098/rsbl.2007.0290.
- Cosmides, L M, and J Tooby. 1981. "Cytoplasmic Inheritance and Intragenomic Conflict." *Journal of Theoretical Biology* 89 (1): 83–129. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7278311>.
- Cox, Rachel T, and Allan C Spradling. 2003. "A Balbiani Body and the Fusome Mediate Mitochondrial Inheritance during Drosophila Oogenesis." *Development (Cambridge, England)* 130 (8). The Company of Biologists Ltd: 1579–90. doi:10.1242/DEV.00365.
- Cree, Lynsey M, David C Samuels, Susana Chuva de Sousa Lopes, Harsha Karur Rajasimha, Passorn Wonnapijit, Jeffrey R Mann, Hans-Henrik M Dahl, and Patrick F Chinnery. 2008. "A Reduction of Mitochondrial DNA Molecules during Embryogenesis Explains the Rapid Segregation of Genotypes." *Nature Genetics* 40 (2): 249–54. doi:10.1038/ng.2007.63.
- Cummins, J M, T Wakayama, and R Yanagimachi. 1997. "Fate of Microinjected Sperm Components in the Mouse Oocyte and Embryo." *Zygote (Cambridge, England)* 5 (1960): 301–8. doi:10.1017/S0967199400003889.
- Dawid, Igor B., and Antonie W. Blackler. 1972. "Maternal and Cytoplasmic Inheritance of Mitochondrial DNA in Xenopus." *Developmental Biology* 29 (2). Academic Press: 152–61. doi:10.1016/0012-1606(72)90052-8.
- de Stordeur, Eric, Michel Solignac, Monique Monnerot, and Jean-Claude Mounolou. 1989. "The Generation of Transplasmic Drosophila Simulans by Cytoplasmic Injection: Effects of Segregation and Selection on the Perpetuation of Mitochondrial DNA Heteroplasmy." Vol. 220. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00260866.pdf>.

- Dean, Matthew D, Kirrie J Ballard, Anne Glass, and J William O Ballard. 2003. "Influence of Two Wolbachia Strains on Population Structure of East African *Drosophila Simulans*." *Genetics* 165 (4): 1959–69. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14704179>.
- Degli Esposti, Mauro, Bessem Chouaia, Francesco Comandatore, Elena Crotti, Davide Sasseria, Patricia Marie-Jeanne Lievens, Daniele Daffonchio, and Claudio Bandi. 2014. "Evolution of Mitochondria Reconstructed from the Energy Metabolism of Living Bacteria." Edited by Hemachandra Reddy. *PLoS ONE* 9 (5): e96566. doi:10.1371/journal.pone.0096566.
- DeLuca, Steven Z., and Patrick H. O'Farrell. 2012. "Barriers to Male Transmission of Mitochondrial DNA in Sperm Development." *Developmental Cell* 22 (3): 660–68. doi:10.1016/j.devcel.2011.12.021.
- Ding, Jun, Carlo Sidore, Thomas J. Butler, Mary Kate Wing, Yong Qian, Osorio Meirelles, Fabio Busonero, et al. 2015. "Assessing Mitochondrial DNA Variation and Copy Number in Lymphocytes of ~2,000 Sardinians Using Tailored Sequencing Analysis Tools." Edited by Greg Gibson. *PLoS Genetics* 11 (7). Public Library of Science: e1005306. doi:10.1371/journal.pgen.1005306.
- Dokianakis, Emmanouil, and Emmanuel D. Ladoukakis. 2014. "Different Degree of Paternal MtDNA Leakage between Male and Female Progeny in Interspecific *Drosophila* Crosses." *Ecology and Evolution* 4 (13): 2633–41. doi:10.1002/ece3.1069.
- Don, R H, P T Cox, B J Wainwright, K Baker, and J S Mattick. 1991. "'Touchdown' PCR to Circumvent Spurious Priming during Gene Amplification." *Nucleic Acids Research* 19 (14): 4008. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1861999>.
- Dytham, Calvin. 2011. *Choosing and Using Statistics: A Biologist's Guide*. Wiley-Blackwell. https://books.google.gr/books/about/Choosing_and_Using_Statistics.html?id=ZvulFAhLIHYC&redir_esc=y.
- Elson, J.L., R.M. Andrews, P.F. Chinnery, R.N. Lightowlers, D.M. Turnbull, and Neil Howell. 2001. "Analysis of European MtDNAs for Recombination." *The American Journal of Human Genetics* 68 (1). Cell Press: 145–53. doi:10.1086/316938.
- Felsenstein, J., and S. Yokoyama. 1976. "The Evolutionary Advantage of Recombination. II. Individual Selection for Recombination." *Genetics* 83 (4): 845–59.
- Finkel, Toren, and Paul M Hwang. 2009. "The Krebs Cycle Meets the Cell Cycle: Mitochondria and the G1-S Transition." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (29). National Academy of Sciences: 11825–26. doi:10.1073/pnas.0906430106.
- Fontaine, Kathryn M., John R. Cooley, and Chris Simon. 2007. "Evidence for Paternal Leakage in Hybrid Periodical Cicadas (Hemiptera: Magicicada Spp.)." *PLoS ONE* 2 (9): 1–8. doi:10.1371/journal.pone.0000892.
- Formosa, Luke E., and Michael T. Ryan. 2018. "Mitochondrial OXPHOS Complex Assembly Lines." *Nature Cell Biology* 20 (5): 511–13. doi:10.1038/s41556-018-0098-z.
- Giles, Richard E, Hugues Blanc, Howard M Cann, and Douglas C Wallace. 1980. "Maternal Inheritance of Human Mitochondrial DNA." *National Academy of Sciences* 77 (11): 6715–19. doi:10.1073/pnas.77.11.6715.

- Gordo, I, and B Charlesworth. 2000. "The Degeneration of Asexual Haploid Populations and the Speed of Muller's Ratchet." *Genetics* 154 (3): 1379–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10757777>.
- Gray, M W, G Burger, and B F Lang. 1999. "Mitochondrial Evolution." *Science (New York, N.Y.)* 283 (5407). American Association for the Advancement of Science: 1476–81. doi:10.1126/SCIENCE.283.5407.1476.
- Gray, M W, R Cedergren, Y Abel, and D Sankoff. 1989. "On the Evolutionary Origin of the Plant Mitochondrion and Its Genome." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (7): 2267–71. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16594021>.
- Gray, Michael W. 1989. "The Evolutionary Origins of Organelles." *Trends in Genetics* 5 (January). Elsevier Current Trends: 294–99. doi:10.1016/0168-9525(89)90111-X.
- Guo, Xinhong, Shaojun Liu, and Yun Liu. 2006. "Evidence for Recombination of Mitochondrial DNA in Triploid Crucian Carp." *Genetics* 172 (3). *Genetics*: 1745–49. doi:10.1534/genetics.105.049841.
- Hadjivasiliou, Z., N. Lane, R. M. Seymour, and A. Pomiankowski. 2013. "Dynamics of Mitochondrial Inheritance in the Evolution of Binary Mating Types and Two Sexes." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280 (1769). The Royal Society: 20131920–20131920. doi:10.1098/rspb.2013.1920.
- Hadjivasiliou, Z., A. Pomiankowski, R. M. Seymour, and N. Lane. 2012. "Selection for Mitonuclear Co-Adaptation Could Favour the Evolution of Two Sexes." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 279 (1734): 1865–72. doi:10.1098/rspb.2011.1871.
- Hahn, Anne, and Steven Zuryn. 2018. "The Cellular Mitochondrial Genome Landscape in Disease." *Trends in Cell Biology*, November. doi:10.1016/j.tcb.2018.11.004.
- Haigh, John. 1978. "The Accumulation of Deleterious Genes in a Population-Muller's Ratchet." *Theoretical Population Biology* 14 (2): 251–67. doi:10.1016/0040-5809(78)90027-8.
- Hastings, I M. 1992. "Population Genetic Aspects of Deleterious Cytoplasmic Genomes and Their Effect on the Evolution of Sexual Reproduction." *Genetical Research* 59 (3): 215–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1511870>.
- Hattori, Nobuaki, Kazuaki Kitagawa, Shigeo Takumi, and Chiharu Nakamura. 2002. "Mitochondrial DNA Heteroplasmy in Wheat, *Aegilops* and Their Nucleus-Cytoplasm Hybrids." *Genetics* 160 (4): 1619–30.
- Hauswirth, W W, and P J Laipis. 1982. "Mitochondrial DNA Polymorphism in a Maternal Lineage of Holstein Cows." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79 (15): 4686–90. doi:10.1073/pnas.79.15.4686.
- Hecht, N B, H Liem, K C Kleene, R J Distel, and S M Ho. 1984. "Maternal Inheritance of the Mouse Mitochondrial Genome Is Not Mediated by a Loss or Gross Alteration of the Paternal Mitochondrial DNA or by Methylation of the Oocyte Mitochondrial DNA." *Developmental Biology* 102 (2): 452–61. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6323235>.

- Hill, Geoffrey E. 2016. "Mitonuclear Coevolution as the Genesis of Speciation and the Mitochondrial DNA Barcode Gap." *Ecology and Evolution* 6 (16). John Wiley & Sons, Ltd: 5831–42. doi:10.1002/ece3.2338.
- Hiraoka, J, and Y Hirao. 1988. "Fate of Sperm Tail Components after Incorporation into the Hamster Egg." *Gamete Research* 19 (4): 369–80. doi:10.1002/mrd.1120190408.
- Hoolahan, Angelique H., Vivian C. Blok, Tracey Gibson, and Mark Downton. 2012. "Evidence of Animal MtDNA Recombination between Divergent Populations of the Potato Cyst Nematode *Globodera Pallida*." *Genetica* 140 (1–3). Springer Netherlands: 19–29. doi:10.1007/s10709-012-9651-z.
- Howe, Dana K, and Dee R Denver. 2008. "Muller's Ratchet and Compensatory Mutation in *Caenorhabditis Briggsae* Mitochondrial Genome Evolution." *BMC Evolutionary Biology* 8: 62. doi:10.1186/1471-2148-8-62.
- James, Mallet. 2007. "Hybrid Speciation." *Nature*, no. 446: 279–83. doi:10.1038/nature05706.
- Kaneda, H, J Hayashi, S Takahama, C Taya, K F Lindahl, and H Yonekawa. 1995. "Elimination of Paternal Mitochondrial DNA in Intraspecific Crosses during Early Mouse Embryogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (10): 4542–46. doi:10.1073/pnas.92.10.4542.
- Kang, Seung-Ho, and Chul W Ahn. 2008. "Tests for the Homogeneity of Two Binomial Proportions in Extremely Unbalanced 2 x 2 Contingency Tables." *Statistics in Medicine* 27 (14). NIH Public Access: 2524–35. doi:10.1002/sim.3055.
- Kann, L M, E B Rosenblum, and D M Rand. 1998. "Aging, Mating, and the Evolution of MtDNA Heteroplasmy in *Drosophila Melanogaster*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (5). National Academy of Sciences: 2372–77. doi:10.1073/PNAS.95.5.2372.
- Kasamatsu, H, and J Vinograd. 1974. "Replication of Circular DNA in Eukaryotic Cells." *Annual Review of Biochemistry* 43 (1): 695–719. doi:10.1146/annurev.bi.43.070174.003403.
- Keeling, Patrick J., and John M. Archibald. 2008. "Organelle Evolution: What's in a Name?" *Current Biology* 18 (8). Cell Press: R345–47. doi:10.1016/J.CUB.2008.02.065.
- Kitagawa, K, S Takumi, and C Nakamura. 2002. "Evidence of Paternal Transmission of Mitochondrial DNA in a Nucleus-Cytoplasm Hybrid of *Timopheevi* Wheat." *Genes & Genetic Systems* 77 (4): 243–50. doi:10.1266/ggs.77.243.
- Kondo, R., Y. Satta, E. T. Matsuura, H. Ishiwa, N. Takahata, and S. I. Chigusa. 1990. "Incomplete Maternal Transmission of Mitochondrial DNA in *Drosophila*." *Genetics* 126 (3): 657–63.
- Kondo, R, E T Matsuura, and S I Chigusa. 1992. "Further Observation of Paternal Transmission of *Drosophila* Mitochondrial DNA by PCR Selective Amplification Method." *Genetical Research* 59 (2): 81–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1628820>.
- Korbie, Darren J, and John S Mattick. 2008. "Touchdown PCR for Increased Specificity and Sensitivity in PCR Amplification." *Nature Protocols* 3 (9): 1452–56. doi:10.1038/nprot.2008.133.

- Kraytsberg, Y., Marianne Schwartz, Timothy A Brown, Konstantin Ebralidse, Wolfram S Kunz, David A Clayton, John Vissing, and Konstantin Khrapko. 2004. "Recombination of Human Mitochondrial DNA." *Science* 304 (5673): 981–981. doi:10.1126/science.1096342.
- Kuroiwa, Tsuneyoshi, Keiji Nishida, Yamato Yoshida, Takayuki Fujiwara, Toshiyuki Mori, Haruko Kuroiwa, and Osami Misumi. 2006. "Structure, Function and Evolution of the Mitochondrial Division Apparatus." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1763 (5–6). Elsevier: 510–21. doi:10.1016/J.BBAMCR.2006.03.007.
- Kvist, Laura, Jochen Martens, Alexander a. Nazarenko, and Markku Orell. 2003. "Paternal Leakage of Mitochondrial DNA in the Great Tit (*Parus Major*)." *Molecular Biology and Evolution* 20 (2): 243–47. doi:10.1093/molbev/msg025.
- Lachaise, D, M Harry, M Solignac, F Lemeunier, V Bénassi, and M L Cariou. 2000. "Evolutionary Novelties in Islands: *Drosophila Santomea*, a New *Melanogaster* Sister Species from São Tomé." *Proceedings. Biological Sciences* 267 (1452). The Royal Society: 1487–95. doi:10.1098/rspb.2000.1169.
- Lachaise, Daniel, Jean R. David, Françoise Lemeunier, Leonidas Tsacas, and Michael Ashburner. 1986. "The Reproductive Relationships of *Drosophila Sechellia* with *D. Mauritiana*, *D. Simulans*, and *D. Melanogaster* from the Afrotropical Region." *Evolution* 40 (2): 262. doi:10.2307/2408806.
- Ladoukakis, E D, and E Zouros. 2001. "Direct Evidence for Homologous Recombination in Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*) Mitochondrial DNA." *Molecular Biology and Evolution* 18 (7): 1168–75. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a003904.
- Ladoukakis, Emmanuel D., and Eleftherios Zouros. 2017. "Evolution and Inheritance of Animal Mitochondrial DNA: Rules and Exceptions." *Journal of Biological Research-Thessaloniki* 24 (1). BioMed Central: 2. doi:10.1186/s40709-017-0060-4.
- Lane, Nick, and William Martin. 2010. "The Energetics of Genome Complexity." *Nature* 467 (7318): 929–34. doi:10.1038/nature09486.
- Law, R, and V Hutson. 1992. "Intracellular Symbionts and the Evolution of Uniparental Cytoplasmic Inheritance." *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 248 (1321): 69–77. doi:10.1098/rspb.1992.0044.
- LEE, Won Ho, and Takao K. WATANABE. 1987. "Evolutionary Genetics of the *Drosophila Melanogaster* Subgroup. I. Phylogenetic Relationships Based on Matings, Hybrids and Proteins." *The Japanese Journal of Genetics* 62 (3). The Genetics Society of Japan: 225–39. doi:10.1266/jjg.62.225.
- LOEWE, LAURENCE. 2006. "Quantifying the Genomic Decay Paradox Due to Muller's Ratchet in Human Mitochondrial DNA." *Genetical Research* 87 (02): 133. doi:10.1017/S0016672306008123.
- Lynch, M. 1996. "Mutation Accumulation in Transfer RNAs: Molecular Evidence for Muller's Ratchet in Mitochondrial Genomes." *Molecular Biology and Evolution* 13 (1): 209–20. doi:10.1093/oxfordjournals.molbev.a025557.
- Lynch, M. 1997. "Mutation Accumulation in Nuclear, Organelle, and Prokaryotic Transfer RNA Genes." *Molecular Biology and Evolution* 14 (9): 914–25.

- Lynch, M, and J L Blanchard. 1998. "Deleterious Mutation Accumulation in Organelle Genomes." *Genetica* 102–103: 25–33. doi:10.1023/a:1017022522486.
- Ma, Hansong, and Patrick H O'Farrell. 2015. "Selections That Isolate Recombinant Mitochondrial Genomes in Animals." *ELife* 4 (August). eLife Sciences Publications, Ltd. doi:10.7554/eLife.07247.
- Ma, Hansong, Hong Xu, and Patrick H O'Farrell. 2014. "Transmission of Mitochondrial Mutations and Action of Purifying Selection in *Drosophila Melanogaster*." *Nature Genetics* 46 (4). Nature Publishing Group: 393–97. doi:10.1038/ng.2919.
- Margulis, Lynn. 1981. *Symbiosis in Cell Evolution: Life and Its Environment on the Early Earth*. W.H. Freeman. https://openlibrary.org/books/OL4111687M/Symbiosis_in_cell_evolution.
- Margulis, Lynn, and Dorion Sagan. 1986. *Origins of Sex: Three Billion Years of Genetic Recombination*. Yale University Press. https://books.google.gr/books/about/Origins_of_Sex.html?id=3hDVTEk3ioIC&source=kp_cover&redir_esc=y.
- Matsuura, Etsuko T., Haruyo Fukuda, and Sadao I. Chigusa. 1991. "Mitochondrial DNA Heteroplasmy Maintained in Natural Populations of *Drosophila Simulans* in Réunion." *Genetical Research* 57 (02). Cambridge University Press: 123. doi:10.1017/S0016672300029189.
- McDermott, Shannon R., and Richard M. Kliman. 2008. "Estimation of Isolation Times of the Island Species in the *Drosophila Simulans* Complex from Multilocus DNA Sequence Data." Edited by Jason E. Stajich. *PLoS ONE* 3 (6). Public Library of Science: e2442. doi:10.1371/journal.pone.0002442.
- Mengel-From, Jonas, Mikael Thinggaard, Christine Dalgård, Kirsten Ohm Kyvik, Kaare Christensen, and Lene Christiansen. 2014. "Mitochondrial DNA Copy Number in Peripheral Blood Cells Declines with Age and Is Associated with General Health among Elderly." *Human Genetics* 133 (9): 1149–59. doi:10.1007/s00439-014-1458-9.
- Mentel, Marek, Mayo Röttger, Sally Leys, Aloysius G. M. Tielens, and William F. Martin. 2014. "Of Early Animals, Anaerobic Mitochondria, and a Modern Sponge." *BioEssays* 36 (10): 924–32. doi:10.1002/bies.201400060.
- Meusel, M S, and R F Moritz. 1993. "Transfer of Paternal Mitochondrial DNA during Fertilization of Honeybee (*Apis Mellifera* L.) Eggs." *Current Genetics* 24 (6): 539–43. doi:10.1007/BF00351719.
- Mileykovskaya, Eugenia, and William Dowhan. 2009. "Cardiolipin Membrane Domains in Prokaryotes and Eukaryotes." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1788 (10): 2084–91. doi:10.1016/j.bbamem.2009.04.003.
- Mishra, Prashant, and David C. Chan. 2014. "Mitochondrial Dynamics and Inheritance during Cell Division, Development and Disease." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15 (10). Nature Publishing Group: 634–46. doi:10.1038/nrm3877.
- Mitra, Kasturi, Christian Wunder, Badrinath Roysam, Gang Lin, and Jennifer Lippincott-Schwartz. 2009. "A Hyperfused Mitochondrial State Achieved at G1-S Regulates Cyclin E Buildup and Entry into S Phase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (29). National Academy of Sciences: 11960–65.

doi:10.1073/pnas.0904875106.

- Morgan, Jess A T, Michael Macbeth, Damien Broderick, Paul Whatmore, Raewyn Street, David J. Welch, and Jennifer R. Ovenden. 2013. "Hybridisation, Paternal Leakage and Mitochondrial DNA Linearization in Three Anomalous Fish (Scombridae)." *Mitochondrion* 13 (6). Elsevier B.V.: 852–61. doi:10.1016/j.mito.2013.06.002.
- Moriyama, Y, and S Kawano. 2003. "Rapid, Selective Digestion of Mitochondrial DNA in Accordance with the MatA Hierarchy of Multiallelic Mating Types in the Mitochondrial Inheritance of *Physarum Polycephalum*." *Genetics* 164 (3): 963–75. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12871907>.
- Muller, H.J. 1964. "The Relation of Recombination to Mutational Advance." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 1 (732): 2–9. doi:10.1016/0027-5107(64)90047-8.
- Muller, M., M. Mentel, J. J. van Hellemond, K. Henze, C. Woehle, S. B. Gould, R.-Y. Yu, M. van der Giezen, A. G. M. Tielens, and W. F. Martin. 2012. "Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (2): 444–95. doi:10.1128/MMBR.05024-11.
- Nayak, Barun K, and Avijit Hazra. 2011. "How to Choose the Right Statistical Test?" *Indian Journal of Ophthalmology* 59 (2). Wolters Kluwer -- Medknow Publications: 85–86. doi:10.4103/0301-4738.77005.
- Neale, D B, K a Marshall, and R R Sederoff. 1989. "Chloroplast and Mitochondrial DNA Are Paternally Inherited in *Sequoia Sempervirens* D. Don Endl." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86 (23): 9347–49. doi:10.1073/pnas.86.23.9347.
- Neiman, Maurine, Gery Hehman, Joseph T. Miller, John M. Logsdon, and Douglas R. Taylor. 2010. "Accelerated Mutation Accumulation in Asexual Lineages of a Freshwater Snail." *Molecular Biology and Evolution* 27 (4): 954–63. doi:10.1093/molbev/msp300.
- Neiman, Maurine, and Douglas R Taylor. 2009. "The Causes of Mutation Accumulation in Mitochondrial Genomes." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276 (1660): 1201–9. doi:10.1098/rspb.2008.1758.
- Nishimura, Yoshiki, Osami Misumi, Ko Kato, Noriko Inada, Tetsuya Higashiyama, Yu Momoyama, and Tsuneyoshi Kuroiwa. 2002. "An Mt(+) Gamete-Specific Nuclease That Targets Mt(-) Chloroplasts during Sexual Reproduction in *C. Reinhardtii*." *Genes & Development* 16 (9): 1116–28. doi:10.1101/gad.979902.
- Nishimura, Yoshiki, Tomoya Yoshinari, Kiyoshi Naruse, Takeshi Yamada, Kazuyoshi Sumi, Hiroshi Mitani, Tetsuya Higashiyama, and Tsuneyoshi Kuroiwa. 2006. "Active Digestion of Sperm Mitochondrial DNA in Single Living Sperm Revealed by Optical Tweezers." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (5): 1382–87. doi:10.1073/pnas.0506911103.
- Noguchi, Masafumi, and Atsuko Kasahara. 2018. "Mitochondrial Dynamics Coordinate Cell Differentiation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 500 (1): 59–64. doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.094.
- Normark, B B, and N A Moran. 2000. "Opinion - Testing for the Accumulation of Deleterious Mutations in Asexual Eukaryote Genomes Using Molecular Sequences." *Journal Of*

- Natural History* 34 (9): 1719–29. doi:10.1080/00222930050122147.
- Nunes, Maria D S, Marlies Dolezal, and Christian Schlötterer. 2013. “Extensive Paternal MtDNA Leakage in Natural Populations of *Drosophila Melanogaster*.” *Molecular Ecology* 22 (8): 2106–17. doi:10.1111/mec.12256.
- O’Neill, S L, R Giordano, A M Colbert, T L Karr, and H M Robertson. 1992. “16S rRNA Phylogenetic Analysis of the Bacterial Endosymbionts Associated with Cytoplasmic Incompatibility in Insects.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (7). National Academy of Sciences: 2699–2702. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1557375>.
- Ohta, Tomoko, and Motoo Kimura. 1971. “On the Constancy of the Evolutionary Rate of Cistrons.” *Journal of Molecular Evolution* 1 (1): 18–25. doi:10.1007/BF01659391.
- Ojala, Deanna, Julio Montoya, and Giuseppe Attardi. 1981. “tRNA Punctuation Model of RNA Processing in Human Mitochondria.” *Nature* 290 (5806). Nature Publishing Group: 470–74. doi:10.1038/290470a0.
- Paduan, Karina dos Santos, and Paulo Eduardo Martins Ribolla. 2008. “Mitochondrial DNA Polymorphism and Heteroplasmy in Populations of *Aedes Aegypti* in Brazil.” *Journal of Medical Entomology* 45 (1): 59–67. doi:10.1603/0022-2585(2008)45.
- Paland, Susanne, and Michael Lynch. 2015. “Transitions to Asexuality Result in Excess Amino Acid Substitutions Author(s): Susanne Paland and Michael Lynch Source:” 311 (5763): 990–92. doi:10.1126/science.1118152.
- Pamilo, P, M Nei, and W H Li. 1987. “Accumulation of Mutations in Sexual and Asexual Populations.” *Genetical Research* 49 (2): 135–46. doi:10.1017/S0016672300026938.
- Parr, Ryan L, Jennifer Maki, Brian Reguly, Gabriel D Dakubo, Andrea Aguirre, Roy Wittock, Kerry Robinson, John P Jakupciak, and Robert E Thayer. 2006. “The Pseudo-Mitochondrial Genome Influences Mistakes in Heteroplasmy Interpretation.” *BMC Genomics* 7: 185. doi:10.1186/1471-2164-7-185.
- Pearl, Stephanie a., Mark E. Welch, and David E. McCauley. 2009. “Mitochondrial Heteroplasmy and Paternal Leakage in Natural Populations of *Silene Vulgaris*, a Gynodioecious Plant.” *Molecular Biology and Evolution* 26 (3): 537–45. doi:10.1093/molbev/msn273.
- Piganeau, G, and A Eyre-Walker. 2004. “A Reanalysis of the Indirect Evidence for Recombination in Human Mitochondrial DNA.” *Heredity* 92 (4): 282–88. doi:10.1038/sj.hdy.6800413.
- Piganeau, Gwenaëlle, Michael Gardner, and Adam Eyre-Walker. 2004. “A Broad Survey of Recombination in Animal Mitochondria.” *Molecular Biology and Evolution* 21 (12): 2319–25. doi:10.1093/molbev/msh244.
- Pikó, L, and K D Taylor. 1987. “Amounts of Mitochondrial DNA and Abundance of Some Mitochondrial Gene Transcripts in Early Mouse Embryos.” *Developmental Biology* 123 (2): 364–74. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2443405>.
- Radojić, Jelena M., Imre Krizmanić, Panagiotis Kasapidis, and Eleftherios Zouros. 2015. “Extensive Mitochondrial Heteroplasmy in Hybrid Water Frog (*Pelophylax* Spp.) Populations from Southeast Europe.” *Ecology and Evolution* 5 (20): 4529–41.

doi:10.1002/ece3.1692.

- Radzvilavicius, Arunas L., Nick Lane, and Andrew Pomiankowski. 2017. "Sexual Conflict Explains the Extraordinary Diversity of Mechanisms Regulating Mitochondrial Inheritance." *BMC Biology* 15 (1). BioMed Central: 94. doi:10.1186/s12915-017-0437-8.
- Radzvilavicius, Arunas L, Hanna Kokko, and Joshua R Christie. 2017. "Mitigating Mitochondrial Genome Erosion Without Recombination." *Genetics* 207 (3). Genetics: 1079–88. doi:10.1534/genetics.117.300273.
- Rand, David M., Robert A. Haney, and Adam J. Fry. 2004. "Cytonuclear Coevolution: The Genomics of Cooperation." *Trends in Ecology & Evolution* 19 (12). Elsevier Current Trends: 645–53. doi:10.1016/J.TREE.2004.10.003.
- Rebolledo-Jaramillo, Boris, Marcia Shu-Wei Su, Nicholas Stoler, Jennifer A McElhoe, Benjamin Dickins, Daniel Blankenberg, Thorfinn S Korneliussen, et al. 2014. "Maternal Age Effect and Severe Germ-Line Bottleneck in the Inheritance of Human Mitochondrial DNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (43). National Academy of Sciences: 15474–79. doi:10.1073/pnas.1409328111.
- Robin, Jérôme D., Andrew T. Ludlow, Ryan LaRanger, Woodring E. Wright, and Jerry W. Shay. 2016. "Comparison of DNA Quantification Methods for Next Generation Sequencing." *Scientific Reports* 6 (1). Nature Publishing Group: 24067. doi:10.1038/srep24067.
- Rokas, Antonis, Emmanuel Ladoukakis, and Eleftherios Zouros. 2003. "Animal Mitochondrial DNA Recombination Revisited." *Trends in Ecology and Evolution* 18 (8): 411–17. doi:10.1016/S0169-5347(03)00125-3.
- Santiago, Enrique, and Armando Caballero. 2016. "Joint Prediction of the Effective Population Size and the Rate of Fixation of Deleterious Mutations." doi:10.1534/genetics.116.188250.
- Sato, Ken, and Miyuki Sato. 2017. "Multiple Ways to Prevent Transmission of Paternal Mitochondrial DNA for Maternal Inheritance in Animals." *The Journal of Biochemistry* 162 (4). Oxford University Press: 247–53. doi:10.1093/jb/mvx052.
- Sato, Miyuki, and Ken Sato. 2011. "Degradation of Paternal Mitochondria." *Science* 37 (November): 1141–44. doi:10.1126/science.1210333.
- Sato, Miyuki, and Ken Sato . 2013. "Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA by Diverse Mechanisms to Eliminate Paternal Mitochondrial DNA." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833 (8). Elsevier B.V.: 1979–84. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.03.010.
- Satta, Yoko, Nobue Toyohara, Chiaki Ohtaka, Yumi Tatsuno, Takao K. Watanabe, Etsuko T. Matsuura, Sadao I. Chigusa, and Naoyuki Takahata. 1988. "Dubious Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA in *D. Simulans* and Evolution of *D. Mauritiana*." *Genetical Research* 52 (01). Cambridge University Press: 1. doi:10.1017/S0016672300027245.
- Shalgi, R, a Magnus, R Jones, and D M Phillips. 1994. "Fate of Sperm Organelles during Early Embryogenesis in the Rat." *Molecular Reproduction and Development* 37 (3): 264–71. doi:10.1002/mrd.1080370304.

- Sharpley, Mark S., Christine Marciniak, Kristin Eckel-Mahan, Meagan McManus, Marco Crimi, Katrina Waymire, Chun Shi Lin, et al. 2012. "Heteroplasmy of Mouse MtDNA Is Genetically Unstable and Results in Altered Behavior and Cognition." *Cell* 151 (2). Elsevier: 333–43. doi:10.1016/j.cell.2012.09.004.
- Sherengul, Wushur, Rumi Kondo, and Etsuko T Matsuura. 2006. "Analysis of Paternal Transmission of Mitochondrial DNA in Drosophila." *Genes & Genetic Systems* 81 (6): 399–404. doi:10.1266/ggs.81.399.
- Shitara, Hiroshi, Jun Ichi Hayashi, Sumiyo Takahama, Hideki Kaneda, and Hiromichi Yonekawa. 1998. "Maternal Inheritance of Mouse MtDNA in Interspecific Hybrids: Segregation of the Leaked Paternal MtDNA Followed by the Prevention of Subsequent Paternal Leakage." *Genetics* 148 (2): 851–57.
- Sicheritz-Pontén, Thomas, Charles G. Kurland, and Siv G.E. Andersson. 1998. "A Phylogenetic Analysis of the Cytochrome b and Cytochrome c Oxidase I Genes Supports an Origin of Mitochondria from within the Rickettsiaceae." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1365 (3). Elsevier: 545–51. doi:10.1016/S0005-2728(98)00099-1.
- Song, Won-Hee, Young-Joo Yi, Miriam Sutovsky, Stuart Meyers, and Peter Sutovsky. 2016. "Autophagy and Ubiquitin-Proteasome System Contribute to Sperm Mitophagy after Mammalian Fertilization." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (36): E5261–70. doi:10.1073/pnas.1605844113.
- Sousa, Filipa L., Renato J. Alves, Miguel A. Ribeiro, José B. Pereira-Leal, Miguel Teixeira, and Manuela M. Pereira. 2012. "The Superfamily of Heme–copper Oxygen Reductases: Types and Evolutionary Considerations." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1817 (4): 629–37. doi:10.1016/j.bbabi.2011.09.020.
- Stern, D B, and J D Palmer. 1984. "Recombination Sequences in Plant Mitochondrial Genomes: Diversity and Homologies to Known Mitochondrial Genes." *Nucleic Acids Research* 12 (15): 6141–57. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6473104>.
- Stewart, James B., and Patrick F. Chinnery. 2015. "The Dynamics of Mitochondrial DNA Heteroplasmy: Implications for Human Health and Disease." *Nature Reviews Genetics* 16 (9). Nature Publishing Group: 530–42. doi:10.1038/nrg3966.
- Stewart, James Bruce, Christoph Freyer, Joanna L Elson, Anna Wredenberg, Zekiye Cansu, Aleksandra Trifunovic, and Nils-Göran Larsson. 2008. "Strong Purifying Selection in Transmission of Mammalian Mitochondrial DNA." *PLoS Biology* 6 (1). Public Library of Science: e10. doi:10.1371/journal.pbio.0060010.
- Sutovsky, P. 2002. "Early Degradation of Paternal Mitochondria in Domestic Pig (*Sus Scrofa*) Is Prevented by Selective Proteasomal Inhibitors Lactacystin and MG132." *Biology of Reproduction* 68 (5): 1793–1800. doi:10.1095/biolreprod.102.012799.
- Sutovsky, P, R D Moreno, J Ramalho-Santos, T Dominko, C Simerly, and G Schatten. 1999. "Ubiquitin Tag for Sperm Mitochondria." *Nature* 402 (6760): 371–72. doi:10.1038/46466.
- Sutovsky, P, R D Moreno, J Ramalho-Santos, T Dominko, C Simerly, and G Schatten. 2000. "Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos." *Biology of Reproduction* 63 (2): 582–90. doi:10.1095/biolreprod63.2.582.

- Sutovsky, Peter, Klaus Van Leyen, Tod McCauley, Billy N Day, and Miriam Sutovsky. 2004. "Degradation of Paternal Mitochondria after Fertilization: Implications for Heteroplasmy, Assisted Reproductive Technologies and MtDNA Inheritance." *Reproductive Biomedicine Online* 8 (1). Reproductive Healthcare Ltd, Duck End Farm, Dry Drayton, Cambridge CB23 8DB, UK: 24–33. doi:10.1016/S1472-6483(10)60495-6.
- Taanman, Jan-Willem. 1999. "The Mitochondrial Genome: Structure, Transcription, Translation and Replication." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1410 (2). Elsevier: 103–23. doi:10.1016/S0005-2728(98)00161-3.
- Taylor, John W. 1986. "Fungal Evolutionary Biology and Mitochondrial DNA." *Experimental Mycology* 10 (4). Academic Press: 259–69. doi:10.1016/0147-5975(86)90011-3.
- Thyagarajan, B, R A Padua, and C Campbell. 1996. "Mammalian Mitochondria Possess Homologous DNA Recombination Activity." *The Journal of Biological Chemistry* 271 (44): 27536–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8910339>.
- Tsaousis, a. D., D. P. Martin, E. D. Ladoukakis, D. Posada, and E. Zouros. 2005. "Widespread Recombination in Published Animal MtDNA Sequences." *Molecular Biology and Evolution* 22 (4): 925–33. doi:10.1093/molbev/msi084.
- Ujvari, Beata, Mark Downton, and Thomas Madsen. 2007. "Mitochondrial DNA Recombination in a Free-Ranging Australian Lizard." *Biology Letters* 3 (2): 189–92. doi:10.1098/rsbl.2006.0587.
- Ursprung, Heinrich and Schabtach, Eric. 1965. "Fertilization in Tunicates: Loss of the Paternal Mitochondrion Prior to Sperm Entry." *Journal of Experimental Zoology* 159 (372): 379--383. <http://dx.doi.org/10.1002/jez.1401590310>.
- van Leeuwen, N, M Beekman, J Deelen, E B van den Akker, A J M de Craen, P E Slagboom, and L M 't Hart. 2014. "Low Mitochondrial DNA Content Associates with Familial Longevity: The Leiden Longevity Study." *Age (Dordrecht, Netherlands)* 36 (3). Springer: 9629. doi:10.1007/s11357-014-9629-0.
- Wagner, D. B., J. Dong, M. R. Carlson, and a. D. Yanchuk. 1991. "Paternal Leakage of Mitochondrial DNA in Pinus." *Theoretical and Applied Genetics* 82 (4): 510–14. doi:10.1007/BF00588607.
- Wang, Chunxin, and Richard J Youle. 2009. "The Role of Mitochondria in Apoptosis*." *Annual Review of Genetics* 43. NIH Public Access: 95–118. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850.
- Wen, Ming, Liangyue Peng, Xinjiang Hu, Yuling Zhao, Shaojun Liu, and Yunhan Hong. 2016. "Transcriptional Quiescence of Paternal MtDNA in Cyprinid Fish Embryos." *Scientific Reports* 6 (1): 28571. doi:10.1038/srep28571.
- Wernick, Riana I, Stephen F Christy, Dana K Howe, Jennifer A Sullins, Joseph F Ramirez, Maura Sare, McKenna J Penley, Levi T Morran, Dee R Denver, and Suzanne Estes. 2019. "Sex and Mitonuclear Adaptation in Experimental *Caenorhabditis elegans* Populations." *Genetics*, January. *Genetics*, genetics.301935.2019. doi:10.1534/genetics.119.301935.
- Wiemerslage, Lyle, and Daewoo Lee. 2016. "Quantification of Mitochondrial Morphology in Neurites of Dopaminergic Neurons Using Multiple Parameters." *Journal of Neuroscience Methods* 262 (March). NIH Public Access: 56–65. doi:10.1016/j.jneumeth.2016.01.008.

- WILSON, ALLAN C., REBECCA L. CANN, STEVEN M. CARR, MATTHEW GEORGE, ULF B. GYLLENSTEN, KATHLEEN M. HELM-BYCHOWSKI, RUSSELL G. HIGUCHI, et al. 1985. "Mitochondrial DNA and Two Perspectives on Evolutionary Genetics." *Biological Journal of the Linnean Society* 26 (4). Oxford University Press: 375–400. doi:10.1111/j.1095-8312.1985.tb02048.x.
- Wolff, J N, and N J Gemmell. 2008. "Lost in the Zygote: The Dilution of Paternal MtDNA upon Fertilization." *Heredity* 101 (5): 429–34. doi:10.1038/hdy.2008.74.
- Wolstenholme, David R. 1992. "Animal Mitochondrial DNA: Structure and Evolution." *International Review of Cytology* 141 (January). Academic Press: 173–216. doi:10.1016/S0074-7696(08)62066-5.
- Wu, Wei-Ming, Hsiang-Ju Tsai, Jong-Hwei S. Pang, Hsin-Shih Wang, Hong-Shang Hong, and Yun-Shien Lee. 2005. "Touchdown Thermocycling Program Enables a Robust Single Nucleotide Polymorphism Typing Method Based on Allele-Specific Real-Time Polymerase Chain Reaction." *Analytical Biochemistry* 339 (2): 290–96. doi:10.1016/j.ab.2005.01.037.
- Xu, Jianping. 2005. "The Inheritance of Organelle Genes and Genomes: Patterns and Mechanisms." *Genome* 48 (6): 951–58. doi:10.1139/g05-082.
- Yanagimachi, R., Y. Kamiguchi, S. Sugawara, and K. Mikamo. 1983. "Gametes and Fertilization in the Chinese Hamster." *Gamete Research* 8 (2): 97–117. doi:10.1002/mrd.1120080202.
- Yang, D, Y Oyaizu, H Oyaizu, G J Olsen, and C R Woese. 1985. "Mitochondrial Origins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82 (13): 4443–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3892535>.
- Zeth, Kornelius, and Marcus Thein. 2010. "Porins in Prokaryotes and Eukaryotes: Common Themes and Variations." *Biochemical Journal* 431 (1): 13–22. doi:10.1042/BJ20100371.
- Zouros, E, a O Ball, C Saavedra, and K R Freeman. 1994. "Mitochondrial DNA Inheritance." *Nature* 368 (6474): 818. doi:10.1038/368818a0.
- Zouros, E, K R Freeman, a O Ball, and G H Pogson. 1992. "Direct Evidence for Extensive Paternal Mitochondrial DNA Inheritance in the Marine Mussel *Mytilus*." *Nature* 359 (6394): 412–14. doi:10.1038/359412a0.
- Zouros, E, a Oberhauser Ball, C Saavedra, and K R Freeman. 1994. "An Unusual Type of Mitochondrial DNA Inheritance in the Blue Mussel *Mytilus*." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (16): 7463–67. doi:10.1073/pnas.91.16.7463.
- Δοκιανάκης, Εμμανουήλ. 2011. "Μελέτη Της Διαρροής Πατρικού Μιτοχονδριακού DNA Σε Διασταυρώσεις Ειδών Του Γένους *Drosophila*." University of Crete Library. https://elocus.lib.uoc.gr/search/?search_type=simple&search_help=&display_mode=overview&wf_step=init&show_hidden=0&number=10&keep_number=10&cclterm1=Δοκιανάκης&cclterm2=&cclterm3=&cclterm4=&cclterm5=&cclte.
- Παρακατσελάκη, Μαρία-Ελένη Ε. 2016. "Μελέτη Της Διαρροής Πατρικού Μιτοχονδριακού DNA Και Της Ετεροπλασμίας Σε Ενδο- Και Διαειδικές Διασταυρώσεις *Drosophila*." University of Crete Library. <https://elocus.lib.uoc.gr/dlib/4/b/2/metadata-dlib-1477998178-250097-6547.tkl>.

Παράρτημα

Πίνακας 21: Οι αναπαραγωγικές σχέσεις μεταξύ ειδών του *Drosophila melanogaster* species subgroup

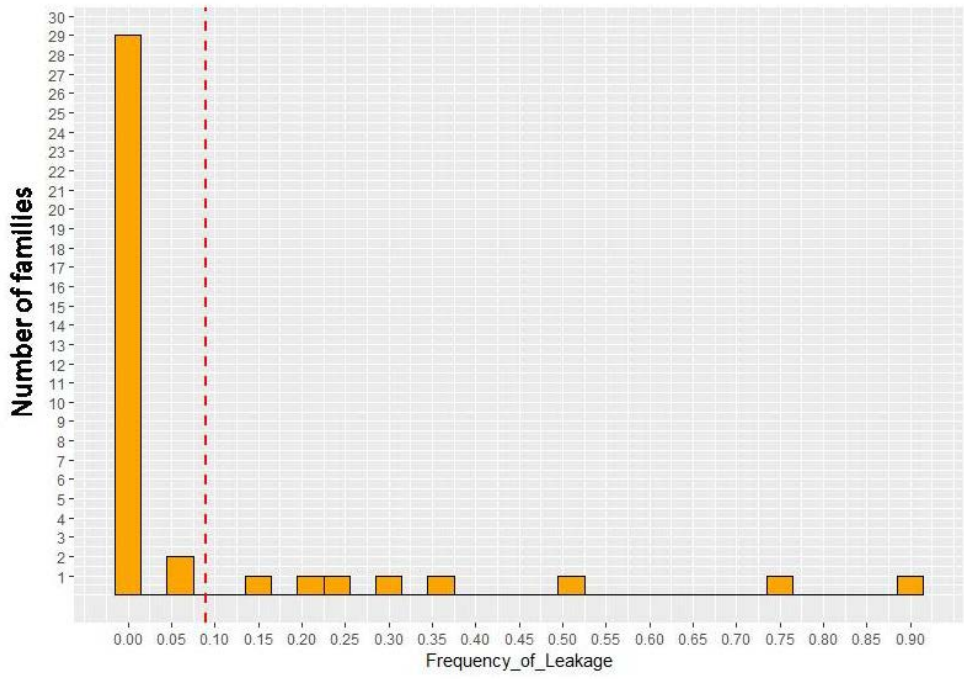
	<i>D. melanogaster</i>	<i>D. simulans</i>	<i>D. mauritiana</i>	<i>D. sechellia</i>	<i>D. teissieri</i>	<i>D. yakuba</i>	<i>D. santomea</i>
<i>D. melanogaster</i>	-	Sterile females No males	Sterile females No males	Sterile females No males	FAIL	FAIL	FAIL
<i>D. simulans</i>	No females Sterile males	-	Fertile females Sterile males	Fertile females Sterile males	FAIL	FAIL	Sterile females No males
<i>D. mauritiana</i>	No females Sterile males	Fertile females Sterile males	-	Fertile females Sterile males	FAIL	FAIL	FAIL
<i>D. sechellia</i>	No females Sterile males	FAIL	Fertile females Sterile males	-	FAIL	FAIL	FAIL
<i>D. teissieri</i>	FAIL	FAIL	Sterile females and males	FAIL	-	FAIL	FAIL
<i>D. yakuba</i>	FAIL	FAIL	Sterile females and males	FAIL	FAIL	-	Fertile females Sterile males
<i>D. santomea</i>	FAIL	FAIL	Sterile females and males	FAIL	FAIL	Fertile females Sterile males	-

Πίνακας 22: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στις αντιδράσεις PCR, αλληλουχία των εκκινητών, μήκος πολλαπλασιαζόμενης αλληλουχίας, καθώς και μιτοχονδρικός απλότυπος που ενισχύει το κάθε ζεύγος

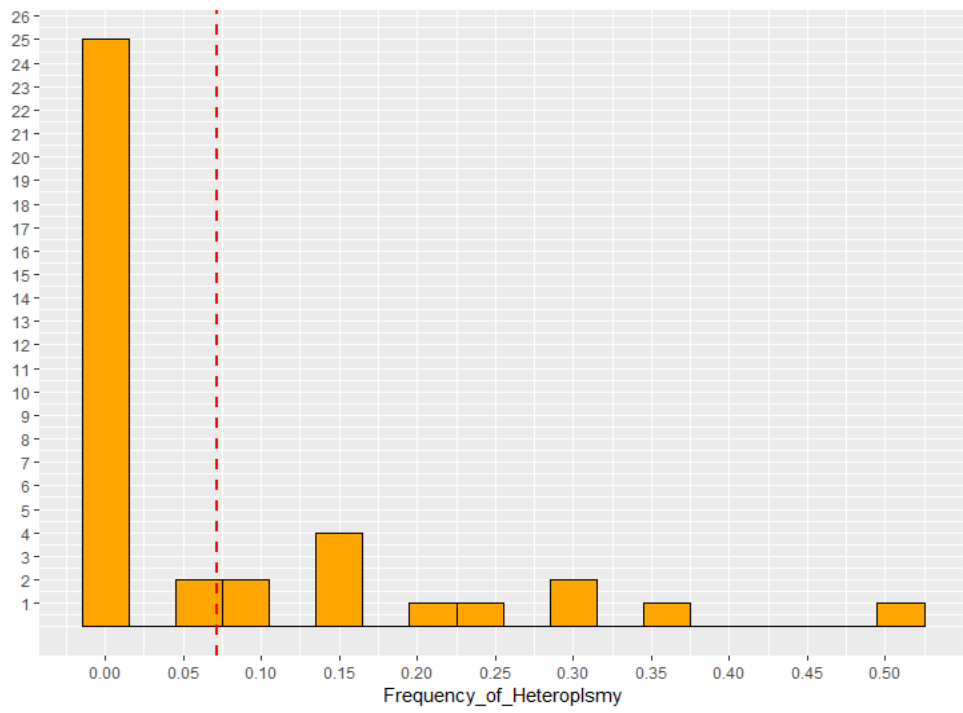
	Ζεύγος εκκινητών	Αλληλουχία Forward (5'-3') Reverse(5'-3')	Μήκος πολλαπλασιαζόμενης αλληλουχίας (bp)	Μιτοχονδριακός Απλότυπος	Αναφορά
1	Sil_1737_F	TCCTGATATAGCATTTC	795	SimI	(Dokianakis & Ladoukakis 2014)
	Sil_2531_R	GTAAATCCTCCTACTGTG			
2	Sill_1737_F	CCCTGATATAGCATTCCCG	795	SimII	Παρούσα μελέτη
	Sill_2531_R	GTAAACCCCTACTGTA			
3	Mall_1699_F	GGTGGATTTGAAATTGATTG	824	MauI, Maul, SimII	(Dokianakis&Ladoukakis 2014; M.-E. Παρακατσελάκη 2016)
	MaurI_2531_R	GTAAACCTCCTACTGTA			
4	Mall_1819_F	AGAATAGTTGAAAATGGGGCTGGG	712	Maul, MauI, SimII	(Dokianakis&Ladoukakis 2014; M.-E. Παρακατσελάκη 2016)
	MaurI_2531_R	CATGATGCAAAAGGTACGAG			
5	Sil_1737_F	TCCTGATATAGCATTTC	795	Maul, MauI	(Dokianakis&Ladoukakis 2014; M.-E. Παρακατσελάκη 2016)
	MaurI_2531_R	CATGATGCAAAAGGTACGAG			

Πίνακας23: ΣυνθήκεςPCRγια τα διαφορετικά ζεύγη εκκινήτων

Sil_1737_F/ Sil_2531_R			
Βήματα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5 min	1
Αποδιάταξη	94°C	30 sec	33
Υβριδοποίηση	55°C	17 sec	
Επέκταση	72°C	1 min	
Τελική επέκταση	72°C	5 min	1
Sill_1737_F/ Sill_2531_R			
Βήματα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	5 min	1
Αποδιάταξη	94°C	15 sec	35
Υβριδοποίηση	58°C	20 sec	
Επέκταση	72°C	40 sec	
Τελική επέκταση	72°C	5 min	1
Mall_1699_F/MaurI_2531_RκαιMall_1819_F/MaurI_2531_R			
Βήματα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	94°C	4 min	1
Αποδιάταξη	94°C	30 sec	13 *(-1 °C/κύκλο)
Υβριδοποίηση	62°C*	20 sec	
Επέκταση	72°C	1min	
Αρχική αποδιάταξη	94°C	30 sec	29
Αποδιάταξη	47°C	20 sec	
Υβριδοποίηση	72°C	1min	
Επέκταση	72°C	5 min	1
Sil_1737_F/ MaurI_2531_R			
Βήματα	Θερμοκρασία	Διάρκεια	Κύκλοι
Αρχική αποδιάταξη	95°C	2 min	1
Αποδιάταξη	95°C	20 sec	40
Υβριδοποίηση	58°C	18 sec	
Επέκταση	72°C	1 min	
Τελική επέκταση	72°C	5 min	1



Γράφημα 4: Κατανομή ετεροπλασμίας λόγω διαρροής στις οικογένειες των F2 υβριδίων



Γράφημα 5: Κατανομή ποσοστού ετεροπλασμίας λόγω κληρονομής στις οικογένειες των F2 υβριδίων