

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Mihailo Đ. Jelić

**HROMOZOMSKA, MIKROSATELITSKA I  
MITOHONDRIJALNA DNK VARIJABILNOST  
POPULACIJA *Drosophila subobscura* U  
KLISURAMA I KANJONIMA SRBIJE**

doktorska disertacija

Beograd, 2012.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Mihailo Đ. Jelić

**CHROMOSOMAL, MICROSATELLITE AND  
MITOCHONDRIAL DNA VARIABILITY OF  
*Drosophila subobscura* POPULATIONS FROM  
GORGES AND CANYONS IN SERBIA**

doctoral dissertation

Belgrade, 2012

MENTORI:

**akademik Marko Andelković,**

redovni profesor Biološkog fakulteta

naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Univerzitet u Beogradu

**dr Marina Stamenković-Radak**

vanredni profesor Biološkog fakulteta

naučni savetnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Univerzitet u Beogradu

ČLANOVI KOMISIJE:

**dr Zorana Kurbalija Novčić**

naučni saradnik Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“

Univerzitet u Beogradu

**dr Jasmina Ludoški**

docent Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta

Univerzitet u Novom Sadu

**datum odbrane:**



Eksperimentalni deo doktorske disertacije ostvaren je u Odeljenju za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“ u Beogradu, u okviru projekata:

*Adaptivni značaj genetičkog polimorfizma populacija Drosophila*, finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj, br. pr. 143014, i

*Dinamika genofonda, genetička i fenotipska varijabilnost populacija u zavisnosti od promenljivosti sredine*, finansiranog od strane Ministarstva za prosvetu i nauku, br. pr. 173012.

Veliku zahvalnost dugujem:

*akademiku Marku Anđelkoviću* na prilici da učestvujem u naučnim istraživanjima u okviru njegovog tima. Na pravim smernicama koje su mi dale drugačiji i širi pogled na naučne i prosvetne izazove. Na idejama, podsticaju, prijateljskim savetima, strpljenju, izdvojenom vremenu i uvođenju u svet terenskih istraživanja. Hvala na prilici da upoznam lepote naših predela!

*prof. dr Marini Stamenković-Radak*, na velikom razumevanju, na prilici da razvijem prosvetno-akademski deo karijere. Hvala na podršci, podsticajima, efikasnosti i pruženim mogućnostima tik pre nego što sam ih poželeo.

*dr Zorani Kurbalija Novčić* na prijateljstvu, nesebičnosti, podršci, entuzijazmu, pomoći pri analizi podataka. Hvala na prijatnom zajedničkom radu u laboratoriji, prenetom znanju i izdvojenom vremenu. Hvala za vetar u leđa kada sam zastajao.

*dr Jasmini Ludoški*, na efikasnosti, profesionalizmu, pedantnosti i korisnim sugestijama tokom pisanja doktorske disertacije.

*Mariji Savić Veselinović*, na strpljenju, prijateljstvu i uvođenju u svet držanja vežbi. Hvala na preciznosti, posvećenosti, razumevanju i pruženim pogledima.

*prof. dr Vladimiru Stevanoviću*, dopisnom članu SANU, na stručnoj pomoći pri izboru i opisu lokaliteta u klisurama i kanjonima Srbije.

*prof. dr José A. Castro*, na osvetljenom putu u interesantnom svetu mitohondrijalne DNK varijabilnosti *D. subobscura*.

Veliku zahvalanost dugujem *dr Bojanu Kenigu* i *Mariji Tanasković*, sa kojima sam zajedno sakupljao materijal, i analizirao haplotipove. Takođe se zahvaljujem *Bojanu* i *Zorani* na strpljenju i izdvojenom vremenu u obuci inverzionog polimorfizma; *Tatjani Savić* na prenetom znanju; *Aleksandri Patenković* na podršci i spremnosti da uvek pomogne; *Ivani Bukvic Cvetković* na velikoj pomoći; *dr Tanji Adnađević* što je dozvoljavala da je stalno prekidam u radu i tražim sitne i krupne praktične savete; *prof. dr Kostas Burtzisu* i *dr Aggeliki Saridaki* sto su mi poslali linije zaražene bakterijom *Wolbachia*, te *dr Jeleni Jović* sto mi je ustupila restrikcione enzime. Zahvaljujem se i *Danici Dimitrijević*, *Katarini Zeljić*, *Milošu Jovanoviću*, *Jovani Šerbanović-Canić*, *dr Vladimiru Jovanoviću*, *dr Jasni Banković*, *dr Tijani Anđelković*, *dr Predragu Kalajdžiću*, *doc. dr Sofiji Pavković Lučić* i *Ljupki Filipović*.

Porodica, prijatelji i drage osobe, su mogli, i samo mogu da naslute na čemu sam im sve zahvalan. *Tata, Mama, Jovana* i *Nedo*, hvala! Disertaciju posvećujem vama...

# **Hromozomska, mikrosatelitska i mitohondrijalna DNK varijabilnost populacija *Drosophila subobscura* u klisurama i kanjonima Srbije**

## **Rezime**

*Drosophila subobscura* je vrsta sa širokim Palearktičkim rasprostranjenjem. Naseljava gotovo ceo evropski kontinent, severnu Afriku, Malu Aziju i neka atlanska ostrva. Genetička struktura prirodnih populacija ove vrste je opisana upotrebom nekoliko genetičkih markera.

Najtemeljnije je izučena varijabilnost hromozomskog inverzionog polimorfizma, po kome populacije *D. subobscura* pokazuju prostornu i vremensku struktuiranost. Klinalni obrasci ovog tipa varijabilnosti upućuju na značaj selektivnih procesa u njenom oblikovanju, dok razlike između geografski bliskih područja između kojih postoji geografska barijera upućuju na značaj istorijskih procesa. Naime, uočena varijabilnost oslikava procese rekolonizacije Evrope nakon završetka poslednje glacijacije iz primarnog pribežišta lociranog u regionu koji obuhvata Balkan, Malu Aziju i Kavkaz, ali i sekundarnog u regionu Pirinejskog poluostrva.

Mikrosatelitska varijabilnost izučavana je u nekoliko evropskih populacija *D. subobscura*, uglavnom iz zapadnog dela Evrope. Pokazano je da su populacije slabo struktuirane po ovom genetičkom markeru. Populacije u južnom delu areala odlikuju se nešto većom genetičkom raznovrsnošću.

Donekle je slična i slika varijabilnosti prirodnih populacija po mitohondrijalnoj DNK (mtDNK), u slučaju koje je zabeležena homogenost distribucije haplotipova između populacija. U velikoj većini do sada analiziranih populacija zabeleženo je prisustvo dva dominantna haplotipa i veliki broj endemičnih haplotipova niske učestalosti. Pokazano je da nekoliko faktora oblikuje varijabilnost mtDNK *D. subobscura*. Među njima su najznačajniji istorijski procesi, genetički drift, i prirodna selekcija koja najverovatnije deluje preko cito-nukleusne koadaptacije između alelskih kombinacija u okviru inverzija i mtDNK varijanti.

Veliki deo areala *D. subobscura*, uključujući i Balkansko poluostrvo, je ostao, u velikoj meri, neistražen upotrebom molekularnih DNK markera. Takođe, u okviru Balkanskog poluostrva, ni po molekularnim markerima, a ni po inverzionom polimorfizmu nisu ispitivani specifični refugijalni lokaliteti kakvi su klisure i kanjonske doline, za koje je pokazano da su bile od presudnog značaja za preživljavanje tercijernih populacija u periodima glacijacije. Analiza neispitanih područja bi dala potpuniju sliku uloge istorijskih i adaptivnih procesa u oblikovanju varijabilnosti *D. subobscura*. Poseban deo ove disertacije ticao se uloge cito-nukleusnih koadaptacija između alela u okviru inverzionih aranžmana i mtDNK haplotipova u oblikovanju mtDNK varijabilnosti u prirodnim populacijama analizirane vrste.

U ovoj studiji korišćene su prirodne populacije *D. subobscura* uzorkovane na tri refugijalna lokaliteta: Kanjon reke Dervente, Sićevačka klisura i Kanjon Lazareve reke. Takođe su uzorkovane i populacije sa lokaliteta koji nemaju refugijalne osobenosti: dva lokaliteta na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu i Deliblatska peščara. Korišćena su tri genetička markera: Inverzioni polimorfizam, mikrosatelitska varijabilnost i analiza prisustva/odsustva restrikcionijskih mesta mtDNK.

Razmatranjem varijabilnosti Balkanskog poluostrva upotrebom molekularnih markera uočava se odsustvo specifičnih obrazaca kakvi se mogu uočiti u slučaju hromozomske varijabilnosti, gde su prisutni endemični hromozomski aranžmani u visokim učestalostima. Takođe, analizirane populacije su u maloj meri između sebe diferencirane po molekularnim markerima, iako su u nekim slučajevima te male razlike značajne i verovatno uzrokovane adaptivnim procesima. U populaciji iz Sićevačke klisure je zabeleženo prisustvo interesantnog mtDNK haplotipa sa insercijom koja rezultuje u duplikaciji kontrolnog regiona i okolnih gena.

Studija je pokazala da neravnoteža vezanosti između hromozomskih aranžmana i mtDNK haplotipova nije široko zastupljena pojava u prirodnim populacijama *D. subobscura*. Diskutovan je način na koji prolazne koadaptacije, ekološki specifični selekcionni pritisci, kao i prisustvo/odsustvo geografskih barijera može uticati na populaciono specifične obrasce ovog tipa neravnoteže vezanosti. Uočeni su trendovi kovariranja hromozomskih i mtDNK varijanti, koji najverovatnije ukazuju na adaptivni značaj cito-nukleusnih interakcija.

Varijabilnost populacija *D. subobscura* klisura i kanjonskih dolina po sva tri genetička markera u velikoj meri odgovara varijabilnosti šireg dela Balkanskog poluostrva. Ipak, uočeno je prisustvo nekih genskih aranžmana niske učestalosti koji nisu prisutni u ostalim populacijama. Takođe, neki genski aranžmani su nešto učestaliji i konzistentnije prisutni u populacijama klisura i kanjona. Studija mikrosatelitske varijabilnosti nije pokazala različitu populacionu istoriju dve grupe populacija. Sa druge strane, testovi koji uočavaju promene populacione demografije, u slučaju mtDNK pokazuju stabilniju populacionu istoriju ispitivane vrste u klisurama i kanjonskim dolinama. Može se pretpostviti da su za ovakvu sliku odgovorni umereniji klimatski uslovi, kao i raznovrsnija staništa u klisurama i kanjonskim dolinama.

Sveobuhvatno, genetički podaci ukazuju da su specifična staništa u klisurama i kanjonskim dolinama mogla biti pribežišta za *D. subobscura*, ali i usputne stanice u nepovoljnim uslovima sredine u toku rekolonizacije evropskog kontinenta.

**Ključne reči:** *Drosophila subobscura*, pribežište, inverzioni polimorfizam, mikrosateliti, mtDNK, cito-nukleusne koadaptacije

**Naučna oblast:** Biologija

**Uža naučna oblast:** Genetika

**UDK broj:** 575.17:575.82]:551.435.11(497.11)(043.3)



# Chromosomal, microsatellite and mitochondrial DNA variability of *Drosophila subobscura* populations from gorges and canyons in Serbia

## Summary

*Drosophila subobscura* shows a wide Palearctic distribution. It inhabits most of Europe, Northern Africa, Asia Minor and some Atlantic islands. The genetic structure in natural populations of this species has been extensively studied with respect to several genetic markers.

The variability of chromosomal inversion polymorphism has been most thoroughly studied showing spatial and temporal structure in natural populations. The clinal pattern of chromosomal variability suggests the action of natural selection on inversion polymorphism, while abrupt changes in gene arrangement frequencies between closely related populations separated by geographical barrier suggest the importance of historical processes on the genetic structure. After the decay of the ice caps, *Drosophila subobscura*, most probably, recolonized Europe mainly from the Balkan Peninsula, Asia Minor and Caucasus, but also, to a lesser degree, from the Iberian Peninsula.

Several populations of *D. subobscura*, mostly from the Western Europe, have been studied with respect to microsatellite variability. The analysis showed absence of structuring of genetic variation, with slightly higher genetic variability in Southern populations.

There is a widespread genetic homogeneity of mitochondrial DNA (mtDNA) variability throughout the species range with high prevalence of two almost equally frequent haplotypes, and a number of population specific, rare haplotypes. Several factors account for the observed distribution in mtDNA variability: historical processes, genetic drift and natural selection, most probably acting through cytonuclear coadaptation of alleles inside inversions and mtDNA haplotypes.

Large area of *D. subobscura* range, including the Balkan Peninsula, has not yet been analyzed with respect to variability of molecular markers. Additionally, populations from specific refugial habitats, such as gorges and canyons, have not been studied either with molecular markers, or with respect to chromosomal variability. These habitats are proven to be very important for the survival of tertiary populations during glaciations. In addition, the role of cytonuclear coadaptations between alleles inside inversion arrangements and mtDNA haplotypes in shaping mtDNA variability in this species has not been studied in the respective region. Assessing genetic variability from Balkan Peninsula and specific refugial habitats would shed more light on the role of historic and adaptive processes in shaping genetic diversity of *D. subobscura*.

Three populations from refugial habitats were studied: the Derventa River Canyon, Sićevo Gorge and Lazar's River Canyon. In addition, several other populations, from habitats that do not have refugial characteristics were analyzed: Mountain Goč, Botanical Gardens in Belgrade and Deliblato Sands. The variability was assessed using three genetic markers: chromosomal inversion polymorphism, microsatellites and the restriction site analysis of mtDNA.

Unlike the chromosomal variability of *D. subobscura* in the Balkan Peninsula, which is characterized by endemic chromosomal arrangements in high frequencies, there is absence of distinctiveness in variability of molecular markers in this peninsula. The analyzed populations show weak genetic differentiation with respect to molecular markers. In some cases small differences were significant, and most probably influenced by adaptive processes. In the population from Sićevo Gorge an interesting mtDNA haplotype with the duplication of control region and the surrounding genes was found.

The study showed that linkage disequilibrium between chromosomal arrangements and mtDNA haploypes is not a general occurrence in natural populations of *D. subobscura*. It is discussed how transient coadaptations, ecologically specific selective pressures, and presence of geographical barriers could contribute to population-specific patterns of linkage disequilibrium. The trends of covariation of chromosomal and mtDNA variants were observed, suggesting the adaptive significance of cytonuclear interactions.

The genetic variability in populations collected from gorges and canyons is largely consistent with the variability observed in other populations from the Balkan Peninsula. However, in gorges and canyons specific low frequency gene arrangements were observed that are absent in other populations. In addition, some gene arrangements have slightly higher frequencies and are more consistently present in populations from gorges and canyons. The study of microsatellite variability did not show different population history in gorges and canyons and other populations. On the other hand, in case of mtDNA variability, tests developed to detect change in population demography show more stable population history of *D. subobscura* in gorges and canyons compared to the rest of the populations. More temperate climatic conditions and greater habitat variability in gorges and canyons are probably responsible for the observed results.

This study shows that specific habitats in gorges and canyons might have served as refugia for *D. subobscura*, and/or as stepping-stones in unfavourable conditions in the process of recolonization of Europe.

**Key words:** *Drosophila subobscura*, refugia, inversion polymorphism, microsatellites, mtDNA, cyto-nuclear coadaptations

**Scientific field:** Biology

**Specific scientific field:** Genetics

**UDC number:** 575.17:575.82]:551.435.11(497.11)(043.3)

# Sadržaj

<b>Uvod</b> .....	1
Uloga ledenih doba u oblikovanju genetičke varijabilnosti.....	2
Klisure i kanjonske doline Srbije kao refugijalna staništa retke i reliktnе flore i vegetacije.....	6
<i>Drosophila subobscura</i> .....	9
Varijabilnost inverzionog polimorfizma <i>Drosophila subobscura</i> .....	9
Mikrosatelitska varijabilnost vrste <i>Drosophila subobscura</i> .....	15
Mitohondrijalna DNK varijabilnost vrste <i>Drosophila subobscura</i> i povezanost varijabilnosti mitohondrijalne DNK sa inverzionim polimorfizmom.....	17
<b>Ciljevi istraživanja</b> .....	21
<b>Materijal i metode</b> .....	23
Opis lokaliteta.....	24
Uzorkovanje i uspostavljanje IF linija.....	27
Utvrđivanje genetičke strukture prirodnih populacija iz klisura i kanjona analizom inverzionog polimorfizma.....	29
Utvrđivanje mikrosatelitske varijabilnosti prirodnih populacija.....	31
Utvrđivanje varijabilnosti mitohondrijalne DNK prirodnih populacija.....	35
Testiranje neravnoteže vezanosti između hromozomskih aranžmana i mitohondrijalnih DNK haplotipova.....	39
Isključivanje citoplazmatske inkompatibilnosti čiji je uzročnik <i>Wolbachia</i> .....	40

<b>Rezultati</b> .....	42
Varijabilnost inverzionog polimorfizma u populacijama iz klisura i kanjona... 43	
Mikrosatelitska varijabilnost prirodnih populacija.....	50
Varijabilnost mitohondrijalnih DNK haplotipova.....	61
Povezanost hromozomske i mitohondrijalne DNK varijabilnosti.....	63
<b>Diskusija</b> .....	71
Varijabilnost inverzionog polimorfizma u populacijama iz klisura i kanjona... 72	
Mikrosatelitska varijabilnost prirodnih populacija.....	76
Varijabilnost mitohondrijalnih DNK haplotipova.....	78
Povezanosti hromozomske i mitohondrijalne DNK varijabilnosti.....	83
<b>Zaključci</b> .....	86
<b>Literatura</b> .....	89

# Uvod

## Uloga ledenih doba u oblikovanju genetičke varijabilnosti

Genetička struktura populacija, vrsta i zajednica kakvu danas poznajemo je u velikoj meri rezultat klimatskih promena u periodu kvartara. U toku tercijera (65-2,6 miliona godina) klima na Zemlji je postala hladnija sa pojavom čestih temperaturnih oscilacija, koje su povećale amplitudu i dovele do serije velikih ledenih doba u periodu kvartara (2,4 miliona godina do danas) (Benett 1997; Williams i sar. 1998). U periodu od 2,4-0,9 miliona godina ledene kape Arktika i Antarktika su napredovale i povlačile na svakih 41 hiljadu godina, nakon čega se ciklus povećao na 100 hiljada godina sa znatno dramatičnijim promenama.

Izrazite klimatske oscilacije su dovele do velikih promena u distribuciji vrsta, vodeći njihovom izumiranju u velikom delu areala i naseljavanju drugih područja. Veliki broj vrsta je preživeo u refugijumima (pripežištima), a potom je iz njih vršio rekolonizaciju u ciklusima koji su pratili cikluse ledenih doba (Benett 1997; Coope 1994). Za većinu vrsta umerenog područja Evrope pripetišta su se nalazila na jugu kontinenta, Iberijskom, Apeninskom i Balkanskom poluostrvu, ali i u kaspijsko-kavkaskom regionu. Vrste su mogle rekolonizovati evropski kontinent iz bilo kog od ova četiri pripetišta. Međutim, procenjuje se da je kod većine vrsta doprinos balkanskog pripetišta genofondu današnjih populacija bio najveći. Za njim sledi Iberijsko, pa Apeninsko poluostrvo, dok doprinos sa istoka nije u potpunosti određen (Hewitt 2000, 2004). Tako su na primer sova, *Strix aluco* i skakavac, *Chorhippus parallelus* rekolonizovali Evropu isključivo iz balkanskog refugijuma, dok je ekspanzija iz Iberijskog i Apeninskog poluostrva ostavila samo regionalne efekte u formiranju hibridnih zona u uskom regionu severno od Pirineja i Alpa (Cooper i sar. 1995; Brito 2005). U slučaju evropskog ježa (*Erinaceus europeus*) populacije sva tri evropska poluostrva su rekolonizovale severni deo areala (Seddon i sar 2001). Mrki medved (*Ursus arctos*) je rekolonizovao Evropu iz Iberijskog poluostrva i kavkasko-karpatskog regiona, dok je doprinos Balkanskog i Apeninskog poluostrva ostao ograničen (Leoanard i sar. 2000; Sommer i Benecke 2005). Međutim, noviji podaci ukazuju na kompleksnije obrasce rekolonizacije mrkog medveda, koje uključuju pripetišta i izvan

evropskih poluostrva u zapadnoj Evropi, kao i na to da evropska poluostrva u određenoj meri nisu bila između sebe izolovana pribežišta (Valdiosera i sar. 2007).

Termin *refugijum* (u daljem tekstu *pribežište*) prvi put je upotrebio Heusser (1955), kada je analizirajući zastupljenost i vrstu polena iz treseta sa područja Kanade zaključio da je vegetacija u periodu ledenih doba opstajala u pribežištima. Od tada pa nadalje termin se sve više upotrebljava u naučnoj literaturi i podrazumeva oblasti gde su elementi savremene flore i faune preživljavali period glacijacije, u znatno smanjenom broju i distribuciji. Prvobitna istraživanja identifikovala su pribežišta iz paleoekoloških podataka (Huntley i Birks 1983), dok se od 90-ih godina XX veka termin sve više upotrebljava u studijama u kojima su genetički markeri ukazivali na oblasti iz kojih su poticale savremene populacije (Bennett i Provan 2008). Termin pribežište tako je bio sinonim za termin glacijalno pribežište jer je oslikavao efekat ledenih doba na sažimanje areala vrsta umerenog područja. U toku nekoliko poslednjih godina koncept pribežišta je proširen i primenjen na planinske vrste i vrste adaptirane na hladnije uslove, kakve su npr. *Lemmus lemmus* i *Picea glauca* (Fedorov i Stenseth 2001; Anderson i sar. 2006), jer ovakve vrste obično imaju širu distribuciju u toku hladnijih epoha (Stewart i Dalén 2008). U ovakvim slučajevima treba upotrebljavati termin *interglacijalno pribežište* (Stewart i sar. 2010). Takođe, ne treba zanemariti ni *kriptična pribežišta* (Stewart i Lister 2001) koja predstavljaju regione zaštićene topografije, povoljne klime, a nalaze se severno od glacijalnih ili južno od interglacijalnih pribežišta, gde se klimatski uslovi značajno razlikuju u poređenju sa okolnim regionom. Kriptična pribežišta su se protezala od Karpata (za vrste *Microtus agrestis*, *Vipera berus*, *Triturus* spp.) do Belgije (*Apodemus sylvaticus* i za vrste iz roda *Quercus*) i obala Norveške (*Sciurus vulgaris*) (Provan i Bennett 2008; Stewart i Lister 2001).

Jedan od osnovnih podataka koji se koristi u filogeografskim studijama u identifikaciji pribežišta jeste stepen genetičkog diverziteta. Populacije koje rekolonizuju područja u interglacijalnim fazama nose samo deo genofonda izvorne refugijalne populacije. Na taj način usled efekta osnivača i efekta „uskog grla“, takve populacije se odlikuju smanjenim genetičkim diverzitetom u odnosu na populacije u pribežištima, kod kojih se očekuje veći genetički diverzitet (Comes i Kadereit 1998; Taberlet i sar 1998). Takođe, dugoročna izolacija populacija u geografski izolovanim pribežištima vodi



genetičkoj diferencijaciji između njih usled genetičkog drifta (Hewit 1996). Dakle, na postojanje pribežišta jasno može ukazati prostorno struktuiranje genetičke varijabilnosti, kako između potencijalnih pribežišta tako i duž moguće rute rekolonizacije.

Međutim, visok stepen genetičkog diverziteta ne podrazumeva da se uvek radi o području koje predstavlja pribežište. Mešanje populacija koje potiču iz različitih pribežišta u kontaktnim (hibridnim) zonama rekolonizacije takođe može rezultovati visokim stepenom genetičkog diverziteta (Petit i sar. 2003). Ono po čemu su pribežišta posebna je prisustvo velikog broja *privatnih* (eng. *private*) haplotipova, alela itd. koji nisu prisutni nigde drugde jer nisu učestvovali u procesu rekolonizacije. Takođe, haplotipovi u okviru refugijuma su genealoški srodniji u okviru pribežišta u odnosu na haplotipove u kontaktnim zonama.

Većina filogeografskih studija određuje populacionu istoriju na osnovu analize varijabilnosti pojedinačnih genetičkih markera, najčešće haploidnih markera, kakvi su mitohondrijalni geni, ali u manjoj meri i nukleusnih markera kakvi su mikrosateliti (Avisé 2000; Flanders i sar. 2009). Različiti markeri se karakterišu različitim genealogijama, dajući rezultate koji mogu da odstupaju od stvarne istorije populacija. Homoplazija, nezavisna evolucija, tip nasleđivanja, razlike u efektivnim veličinama, kao i polno specifična disperzija mogu značajno da utiču na rezultate i da vode pogrešnim zaključcima (Clutton-Brock 1989; Colbert i sar. 2001). Takođe, markeri sa različitim stopama evolucije daju rezultate koji različitom rezolucijom mogu da opišu događaje različite starosti. Markeri koje odlikuje veća mutaciona stopa, kakvi su mikrosateliti ili kontrolni region mtDNK, sa većom preciznošću opisuju skorije događaje populacione istorije, dok oni sa manjom mutacionom stopom bolje opisuju one koji su se odigrali davnije (Avisé 2000; Rokas i sar. 2003). Simultana primena dva ili više markera sa različitim stopama mutacija i načinom nasleđivanja danas daje bolji uvid u procese koji su oblikovali postojeću genetičku strukturu populacija kod velikog broja vrsta (Jadwiszczak i sar. 2006; Brito 2007; Flanders i sar. 2009). Pored upotrebe pojedinačnih genetičkih markera u filogeografskim studijama dominira upotreba neutralnih markera. Mali je broj studija koji pored neutralnih koristi i markere koji su pod delovanjem prirodne selekcije (Aguilar i sar. 2004; Campos i sar. 2006; Bos i sar. 2008). Navedene studije analiziraju varijabilnost gena glavnog kompleksa

histokompatibilnosti, čiji su produkti važni u imunskom odgovoru, pa im je i varijabilnost adaptivna. Pristup koji podrazumeva simultanu primenu selektivno neutralnih i adaptivnih markera daje bolji uvid u populacionu istoriju populacija jer razgraničava slične obrasce varijabilnosti koji mogu nastati usled efekata specifičnih za pojedine lokuse, kakvo je selektivno čišćenje (engl. *selective sweep*), od faktora koji utiču na čitav genom, kakvi su usko grlo, ili efekat osnivača (Bos i sar. 2008).

Precizno utvrđivanje istorije populacija i pribežišnih regiona, kakvo se postiže primenom genetičkih markera različitih svojstava, predstavlja prioritet u konzervacionoj biologiji. Oblasti u kojima su populacije opstajale u nepovoljnim uslovima će najverovatnije biti oblasti koje će i u budućnosti predstavljati pribežišta (Leroy i Arpe 2007), te bi trebalo da budu u fokusu konzervacionih strategija (Médail i Diadema 2009).

## Klisure i kanjonske doline Srbije kao refugijalna staništa retke i reliktno flore i vegetacije

Klisure i kanjoni južnog i centralnog dela Balkana se odlikuju velikim florističkim diverzitetom (Mišić 1981). U njima je prisutan veliki broj vrsta različitog porekla i distribucije, kao i veliki broj mikrostaništa pogodnih za razvoj biljaka sa različitim ekološkim potrebama. Stoga, razmatrajući refugijalnost Balkanskog poluostrva, posebnu pažnju treba posvetiti klisurama i kanjonskim dolinama koje predstavljaju jedan od najtipičnijih pribežišta tercijerne flore i reliktno mešovite vegetacije. Za razliku od okolnih područja, gde su uglavnom zastupljene zajednice savremenog tipa predstavljene degradovanim monodominantnim ili dvodominantnim šumskim zajednicama, u klisurama i kanjonskim dolinama prisutni su čitavi razvojni vegetacijski nizovi koji obuhvataju:

- 1) polidominantne zajednice sa tercijernim reliktima-edifikatorima, od mezofilnih (*Fagetum submontanum mixtum juglandetosum*; *Fago-colurnetum mixtum*), preko termomezofilnih (*Quercu-colurnetum mixtum* i *Fraxino-colurnetum mixtum*) i termofilnih (*Carpino orientalis-Quercetum mixtum* i *Celto-Juglandetum*) do kserotermnih (*Syringo-colurnetum mixtum*)
- 2) osiromašene reliktno zajednice sa malim brojem edifikatora ili subedifikatora u sastojini i prisustvom tercijernih relikata i ređih florinih elemenata u spratu drveća i žbunova, pre svega sa vrstama: *Corylus colurna*, *Juglans regia*, *Tilia tomentosa*, *Quercus pubescens*, *Celtis australis*, *Ilex aquifolium*, *Taxus baccata*, *Prunus mahleb*, *Fraxinus ornus*, *Carpinus orientalis*, *Pinus nigra*, *Cotinus coggygria*, *Syringa vulgaris* i dr.
- 3) Reliktne zajednice monodominantnog tipa sa osnovnim edifikatorom – tercijernim reliktom, na primer: *Juglans regia*, *Pinus nigra*, *Syringa vulgaris*, *Prunus mahleb*, *Carpinus orientalis*, *Quercus cerris*, *Quercus pubescens* i dr.
- 4) Zajednice savremenog tipa sa ili bez tercijernih relikata, u refugijumu, nastale osiromašivanjem jedne od polidominantnih zajednica, odnosno njoj slične zajednice u prošlosti (Mišić 1979)

Klisure i kanjoni se nalaze pretežno u hrastovom pojasu u većem delu Srbije, pre svega u istočnoj Srbiji, gde su one pretežno u zoni klimatogenih šuma *Quercetum frainetto-cerris* ili *Quercetum frainetto*. U ovom području leta su vrlo topla i suva, a zime hladne i oštre sa velikim snežnim nanosima. Ovakva topla i suva klima za vreme vegetacionog perioda je izrazito važna za uspešan rast i razvitak vegetacije, i proces mineralizacije i humifikacije zemljišta. Međutim, u uslovima povećane temperature intenzivnija je i transpiracija, te toplotni faktor može pored koristi doneti i znatnu štetu vegetaciji.

Nasuprot klime okolnog područja, u klisurama i kanjonskim dolinama vladaju specifični mikroklimatski uslovi koji omogućuju opstanak i bujanje reliktnih vrsta i zajednica.

Prema Lakušiću (1972), klisure i kanjonske doline nisu samo geomorfološki fenomeni, već „veoma specifični ekosistemi u kojima su na veoma specifičan način integrisani abiotički i biotički faktori kroz dugu evoluciju biosa...“ Naime, razlike između klime klisura i otvorenih terena izvan nje mogu biti znatne (Srejović 1969). Ove razlike proističu iz okomitih litica koje pružaju zaštitu od visokih letnjih temperatura, prodora hladnih vetrova, kao i duže zadržavanje magle koja u letnjim mesecima može biti presudna za opstanak vrsta. Samo prisustvo vodenog toka puferiše promene temperature i veoma je bitno za održavanje zajednica polidominantnog karaktera (Treppe 1947). Pokazano je da je temperatura vazduha u klisurama znatno umerenija nego izvan klisura i u zimskom i u letnjem periodu (Billings i Anderson 1974). Klisure i kanjonske doline u Srbiji najčešće prosecaju krečnjačke masive brdsko-planinskog regiona. Krečnjačke stene duže zadržavaju toplotu što je bitno u toku jesenjih meseci. Takođe, krečnjačke stene su znatno otpornije na procese fizičke erozije nego silikatne stene.

Većina klisura i kanjona Srbije je nastala krajem pliocena ili znatno ranije (Mišić 1981). Zahvaljući velikoj starosti klisura i kanjona i malim promenama klime u ovim pribežištim za vreme ledenog doba, mogli su se očuvati ne samo pojedini tercijerni relikti i endemorelikti, već i brojne vrste submediteranskog flornog elementa. Stoga submediteranske vrste daju još jedan dokaz o kontinuitetu povoljne klime u ovim refugijumima.

Od posebnog su značaja klisure i kanjonske doline koje se pružaju u pravcu istok-zapad. Kod njih se jasno izdvajaju severna i južna strana. Stoga je u njima izraženija diferencijacija flore i vegetacije. Što su litice klisura strmije, još je veća razlika u osunčanosti između dve strane. Pojedine vrste su u klisurama našle прибежиšte na stenama, izvan šuma, ili u žbunastoj vegetaciji, dok su druge vrste našle povoljne uslove u šumama na zaklonjenoj strani klisure. Ovako različiti mikroklimatski uslovi doveli su do toga da su se u klisurama razvijali i mezofilni, sklopljeni ekosistemi i termofilni otvoreni ekosistemi, kao i vrste sa različitom ekologijom.

Klisure i kanjonske doline su imale višestruku ulogu u posttercijernom razvoju flore i vegetacije: 1) bile su neprekidni zbeg retke i ugrožene flore; 2) u nepovoljnim klimatskim uslovima su predstavljale „usputne stanice“ pomoću kojih su mnoge vrste sa juga proširivale svoj areal u pravcu severa; 3) bili su „rezervoari“ iz kojih su u boljim klimatskim uslovima vrste širile areal iz refugijuma (Mišić 1981).

Klisure i kanjonske doline nisu u dovoljnoj meri istražene zoološki (Mišić 1981). Matvejev (1950) prvi u Srbije opisuje mešovite populacije ptica i drugih vrsta u klisurama Srbije. Postoje i podaci da su mnoge vrste ptica na svom putu od juga ka severu našle utočište u klisurama (Vasić i sar. 1980). Na lokalni diverzitet faune bitno utiče prisustvo očuvanih reliktnih biotopa (Radović i sar. 1995). Uočljivo je da se areali mnogih endemita često mogu povezati sa prisustvom nekih kategorija reliktnih/refugijalnih ekosistema i staništa, među kojima su i polidominantne zajednice klisura i kanjona. Polidominantne šumske zajednice pored reliktnih biljnih vrsta predstavljaju i staništa reliktnih vrsta životinja, kakve su na primer endemične vrste skakavaca iz rodova *Metrioptera*, *Pholidoptera*, *Isophia*, neke vrste žaba, kao i podvrste ptica pevačica. Tomanović i Starý (2001) i Tomanović i sar. (2003) opisuju nove vrste Hymenoptera u kanjonu reke Dervente, i kanjonu Đetinje u Crnoj Gori.

## ***Drosophila subobscura***

*Drosophila subobscura* Collin pripada grupi *obscura* u okviru podroda *Sophophora*. Zajedno sa srodnim vrstama *D. madeirensis* i *D. guanche* čine *subobscura* klaster vrsta. *D. subobscura* ima široko palearktičko rasprostranjenje. Naseljava ceo evropski kontinent sa izuzetkom centralne i severne Skandinavije i Islanda. Prisutna je i u severnoj Africi i Maloj Aziji, kao i na atlanskim ostrvima Madeira, Kanarskim i Azorskim ostrvima. Granice rasprostranjenja vrste u istočnom delu areala ka evropskom delu Rusije i ka Aziji nisu u potpunosti određene (Krimbas i Powell 1992). U centralnim delovima areala predstavlja dominantnu vrstu među uzorcima *Drosophila*. Kolonizovala je Severnu i Južnu Ameriku tokom 70-ih i 80-ih godina XX veka, gde se veoma brzo proširila. Danas je poznato da je prvo introdukovana u Južnu Ameriku, a nakon toga iz južne u severnu (Pascual i sar. 2007).

## **Varijabilnost inverzionog polimorfizma *Drosophila subobscura***

Termin inverzioni polimorfizam u populacionoj genetici podrazumeva raznovrsnost paracentričnih inverzija. Tradicionalni pogled na nastanak inverzija podrazumeva dva nezavisna, ali simultana hromozomska prekida, a zatim povezivanje prekinutih krajeva na takav način da se promeni orijentacija redosleda gena. Međutim, novije studije ukazuju na značaj homologe rekombinacije između repetitivnih elemenata kao što su transpozoni prilikom nastanka inverzija (Cáceres i sar. 1999; Delprat i sar. 2009).

Većina tipova hromozomskih aranžmana, uključujući i paracentrične inverzije smanjuje fertilitnost svojim nosiocima kada su u heterozigotnom stanju. Ukoliko se u okviru invertovanog regiona odigra jednostruka rekombinacija, nastaju gameti sa nebalansiranim genomom (dicentrične i akrocentrične hromatide), pa se smanjenje fertilitnosti ogleda u smanjenom broju vijabilnih polnih ćelija. Međutim, u slučaju paracentričnih inverzija kod *Drosophila* ovakav ishod je u velikoj meri izbegnut. Tako

se rekombinacije ne odigravaju u spermatogenezi kod mužjaka, pa im se usled heterozigotnosti inverzija ne smanjuje fertilitet. Takođe, kod ženki samo jedna četvrtina produkata oogeneze postaje zrela jajna ćelija. Produkti oogeneze koji nose aberantne hromatide odlaze u polarno telo, dok ćelije koje sadrže balansiran genom, nastao ili kao rezultat neodigravanja rekombinacija ili parnih rekombinacija, postaju jajne ćelije (Mettler i Gregg 1969).

Međutim, navedeni specifični procesi koji se odigravaju u gametogenezi mogu objasniti samo odsustvo smanjenja fertiliteta kod heterozigotnih nosilaca inverzija, ali ne i ulogu i mehanizme održavanja široko zastupljene varijabilnosti inverzionog polimorfizma, koji je prisutan kod velikog broja vrsta roda *Drosophila* ali i srodnih taksona.

Tri teorije balansne selekcije daju objašnjenje značaja i održavanja inverzionog polimorfizma u prirodnim populacijama: 1) teorija koadaptacija, 2) selekcija supergena i 3) teorija lokalnih adaptacija. Teorije uključuju veliki broj zajedničkih postulata i međusobno se ne isključuju. One daju različit značaj alelskim i nealelskim interakcijama kao i nekim evolutivnim mehanizmima.

Na osnovu istraživanja sprovedenih na vrsti *D. pseudoobscura* Dobzhansky (1948) je razvio teoriju koadaptacija. Osnovni koncepti koadaptacione hipoteze su epistatičke interakcije, heterozis, odnosno superiornost heterokariotipova, ali i evolucija alelskog sastava inverzije nakon njenog nastanka. Kako su rekombinacije supresovane kod heterokariotipova, geni zahvaćeni inverzijama prenose se na potomstvo u haploidnim kombinacijama. Prema Dobžanskom selektivna vrednost inverzija u lokalnoj populaciji zavisi od njenog sastava, tj. kombinacije alela koji deluju epistatički, ali i od koadaptiranosti alela u okviru inverzije sa alelima koji se nalaze na drugim hromozomskim aranžmanima u istoj populaciji. Teorija koadaptacija podrazumeva i heterozis između alela istih genskih lokusa kod heterokariotipova. Superiornost heterozigota može biti rezultat dominanse, koja maskira efekte štetnih recesivnih alela (Levontin 1974) ili overdominanse (Dobzhansky 1952). Prema Haldane (1957) postoji kumulativni heterozis koji zahteva bar dva lokusa vezana inverzijom. Svaki lokus nosi alternativne alele, a fitnes heterokariotipova je veći od očekivanog doprinosa pojedinačnih lokusa.

Teorija koadaptacija predviđa različite alelske kombinacije u različitim inverzijama, ali i različiti alelski sastav iste hromozomske inverzije u populacijama pod različitim selektivnim pritiscima. Može se reći da je Dobzhansky inverzije aranžmane posmatrao kao supresore rekombinacija koji održavaju pozitivne epistatičke interakcije u lokalnim populacijama.

Podstaknut teorijom koadaptiranih genskih kompleksa, koji segregiraju kao supergeni, Wasserman (1968) je predložio teoriju „selekcije supergena“. Wasserman predviđa postojanje različitih kombinacija koadaptiranih alela u okviru istog genskog aranžmana u populaciji. Ova pretpostavka predviđa smanjenu adaptivnu vrednost homokariotipova usled rekombinacija i narušavanja uspostavljenih epistatičkih interakcija. Selektivna vrednost inverzionih aranžmana je negativno korelisana sa učestalošću inverzionih aranžmana. Što je veća učestalost nekog genskog aranžmana, to će biti više potomaka sa narušenim epistatičkim kombinacijama alela.

Kirkpatrick i Barton (2006) su predložili još jedan način na koji bi se inverzije održavale u prirodnim populacijama. Model „lokalne adaptacije“ pridaje mali značaj epistatičkim interakcijama, tj. koadaptiranosti alela unutar inverzija. Aleli mogu pojedinačno uticati na adaptivnu vrednost, ili u koadaptiranim kombinacijama. Po njima, inverzije čuvaju pojedinačno ili grupno adaptirane setove alele od rekombinacija sa alelima koji migracijama dolaze iz drugih populacija i manje su adaptivni. Tako inverzije štite genofond lokalne populacije od migracionih genetičkih opterećenja.

Genom vrste *D. subobscura* sastoji se od pet pari štapićastih i jednog para tačkastih hromozoma. Svi hromozomi u setu su akrocentrični. Polni hromozom se obeležava slovom A, dok se autozomi obeležavaju slovima J, U, E i O. Ova vrsta *Drosophila* se odlikuje izuzetno bogatim inverzionim polimorfizmom prisutnim na svih pet štapićastih hromozoma. Većina inverzija je prisutna u kombinaciji sa drugim inverzijama sa kojima se mogu preklapati. Do sada je otkriveno 67 inverzija koje formiraju 93 genska aranžmana. Inverzije se označavaju velikim slovom hromozoma na kom se nalaze i brojem u indeksu koji ih identifikuje. Manji brojevi su pripisivani inverzijama koje su ranije pronalazene. U slučaju inverzionih aranžmana ukoliko se inverzije preklapaju, brojevi koji ih imenuju se podvlače (npr.  $E_{1+2}$ ). Ukoliko hromozom nosi genski aranžman koji ima i preklapajuće i nepreklapajuće inverzije, podvučenom



crtom se vezuju samo one koje su preklapljene (npr.  $O_{3+4+7}$ ). Standardni hromozomski aranžmani u indeksu imaju skraćenicu  $ST$ . Kao referentne aranžmane naučnici su izabrali one čije su učestalosti bile najčešće u regionu u kojem je varijabilnost inverzionog polimorfizma najranije izučavana (Austrija i Britanija). Mapu koja se koristi za identifikaciju hromozomskih aranžmana su dali Kunze-Mühl i Müller (1958) na kojoj su označene tačke prekida inverzija na shemi standardnih hromozomskih aranžmana. Stoga standardni (referentni) hromozomski aranžmani uglavnom poseduju samo naučno-istorijsku konotaciju s obzirom da danas znamo da nisu svi najprimitivniji (Krimbas i Powel 1992).

U početnim fazama istraživanja hromozomske varijabilnosti različitih vrsta *Drosophila*, inverzioni polimorfizam vrste *D. subobscura* je okarakterisan kao *rigidan*, nasuprot nekim vrstama istog roda čiji su inverzioni polimorfizmi označeni kao *fleksibilni*. Samu poddelu na *rigidni* i *fleksibilni* tip polimorfizma predložio je Dobzhansky (1962). *Fleksibilni* tip polimorfizma podrazumeva da su različiti genski aranžmani različito adaptirani na sredinske uslove, pa će se učestalosti inverzionih aranžmana menjati prostorno i vremenski sa promenom sredinskih uslova. Najbolji primer je *D. pseudoobscura* koja pokazuje značajno variranje inverzionog polimorfizma sa nadmorskom visinom, zatim između sezona, ali i dugoročno - višegodišnje (Sperlich i Pfiemm 1986). U slučaju *D. subobscura* značajne razlike u inverzionom polimorfizmu uočavane su samo između geografski jako udaljenih populacija. Treba napomenuti da *rigidni* tip polimorfizma ne podrazumeva nužno selektivnu neutralnost inverzionih aranžmana. Stabilnost učestalosti aranžmana može biti, u ovom slučaju, objašnjena i „zatvorenošću“ sistema inverzionog polimorfizma tj. evolucijom genotipa na način da pufериšu ili kanališu sredinske promene. Kasnije studije su ipak pokazale da, iako se visok stepen polimorfizma kod *D. subobscura* održava kao relativno zatvoren sistem, postoje godišnje pa i dnevne promene učestalosti aranžmana (Burla i Gotz 1965; Savković i sar. 2004; Anđelković i sar. 2007; Živanović 2007; Stamenković-Radak i sar. 2008). U nekim slučajevima ove promene su usmerene u pravcu promene sredinskih faktora, dok su u nekim slučajevima one složene prirode (Rodriguez-Trelles i sar. 1996; Anđelković i sar. 2003; Balanyá i sar. 2006; Stamenković-Radak i sar. 2008). Zbog toga se za ovu vrstu može reći da pripada tipu polimorfizma koji se označava kao „semirigidan“ ili „semifleksibilan“ (Sperlich i Pinsker 1980).

Jedna od važnih karakteristika inverzionog polimorfizma *D. subobscura* je klinalna varijabilnost genskih aranžmana (Prevosti 1974; Menozzi i Krimbas 1992; Krimbas 1993). Iako je obrazac klinalne distribucije donekle varijabilan za različite hromozomske aranžmane, može se reći da uglavnom prati pravac severoistok-jugozapad. Većina standardnih aranžmana pokazuje jasnu klinalnu distribuciju u pravcu sever-jug. Izuzetak je  $O_{ST}$  čija klina prati pravac severozapad-jugoistok. Neki aranžmani, kao što je  $A_1$ , pokazuju jasnu klinu u pravcu istok-zapad. Sa druge strane neki aranžmani pokazuju klimaks učestalosti u nekom području, odakle se klina rasprostire u manje-više koncentričnim krugovima. Takav je primer sa aranžmanima  $E_{1+2+9}$ , čiji je fokus na Balkanu ili  $E_8$ , čiji je fokus u Maloj Aziji. Primetna je i nagla promena učestalosti hromozomskih aranžmana koja se poklapa sa prisustvom geografskih barijera (Prevosti i sar. 1975): Engleski kanal, Gibraltarski moreuz, Dardaneli, Egejsko more, sicilijanski moreuz, Alpi i Pirineji. Takav je slučaj sa aranžmanom  $A_1$  koji „dolazi“ sa istoka i kome su Pirineji predstavljali barijeru da se raširi na Iberijsko poluostrvo. Slična je situacija i sa kompleksnim aranžmanima koji uključuju  $A_2$  inverziju u severozapadnoj Africi, kojima je Sredozemno more predstavljalo barijeru. Takođe je primetna sličnost izolovanih, ostrvskih i nekih marginalnih populacija bez obzira na geografsku udaljenost. Tako varijabilnost inverzionih aranžmana atlanskih ostva liči na varijabilnost nekih mediteranskih ostrva, a Iberijskog poluostrva donekle sa onom na britanskim ostrvima.

Obrazac varijabilnosti inverzionog polimorfizma upućuje na značaj istorijskih procesa u njenom oblikovanju. Istorijski procesi najbolje objašnjavaju razlike između geografski bliskih područja između kojih postoji barijera, ili specifičnu varijabilnost ostrvskih populacija. Međutim, da bi se objasnilo jasno klinalno raslojavanje populacija potrebno je pored istorijskih procesa uzeti u obzir i delovanje prirodne selekcije. Najbolji dokaz za delovanje prirodne selekcije u formiranju klina inverzionih aranžmana pružila je slučajna introdukcija vrste u Južnu i Severnu Ameriku, koja je uočena 70-tih i 80-tih godina XX veka. Ubrzo nakon introdukcije uspostavljene su inverzione kline koje i u Južnoj i u Severnoj Americi odgovaraju postojećim klinama u Evropi (Prevosti i sar 1988).

Analiza geografske distribucije principijelnih komponenti varijabilnosti inverzionog polimorfizma velikog broja populacija Palearktika dala je jasniji uvid u ulogu selektivnih i istorijskih procesa (Krimbas i Powell 1992). Prva principijelna komponenta pokazuje jasnu klinu u pravcu sever-jug i paralelna je sa temperaturnom klinom evropskog kontinenta. Ovakva distribucija ukazuje da je selektivni agens koji utiče na varijabilnost inverzija najverovatnije povezan sa temperaturom. Rego i sar. (2010) su pokazali da jedinke *D. subobscura* koje nose hromozomske varijante češće u hladnijim regionima, u laboratorijskim uslovima biraju nižu temperaturu u temperaturnom gradijentu, i imaju niže „cold knock down“ temperature. Druga principijelna komponenta ukazuje na klinu u pravcu jugoistok-severozapad, sa maksimalnim vrednostima u regionu Male Azije, Balkana i Kavkaza, i manjim maksimumom na Iberijskom poluostrvu. Treća principijelna komponenta pored maksimuma u regionu Balkan-Mala Azija-Kavkaz ukazuje i na maksimalne vrednosti na severu Afrike. Ovakvi obrasci najverovatnije oslikavaju procese rekolonizacije Evrope nakon završetka poslednje glacijacije iz primarnog pribežišta lociranog u regionu koji obuhvata Balkan, Malu Aziju i Kavkaz, ali i sekundarnog u regionu Pirinejskog poluostrva. I zaista, indikativno za glacijalna pribežišta je prisustvo nekih hromozomskih aranžmana u visokim učestalostima u južnom delu areala vrste. Region severne Afrike karakteriše se prisustvom visoke učestalosti endemičnih hromozomskih aranžmana A hromozoma koji se nisu proširili usled geografskih barijera. Pretpostavlja se da su i Alpi bili barijera za širenje populacija iz apeninskog pribežišta. Moguće je da su i mediteranska ostrva bila izolovani refugijumi koji nisu učestvovali u poslednjoj rekolonizaciji Evrope.

## **Mikrosatelitska varijabilnost vrste *Drosophila subobscura***

Mikrosateliti su visokopolimorfni genetički markeri čije su osnovne jedinice jednostavni tandemski ponovci od jednog do šest nukleotida (Bachtrog i sar. 1999). Veoma su česti kod eukariota, a veliki broj ovih markera je opisan kod značajnog broja taksona (Wilder i sar. 2002). U literaturi je opšte prihvaćeno da mikrosateliti predstavljaju neutralne genetičke varijante (Goldstein i Schlötterer 1999), osim u slučaju kada su poziciono blizu nekog lokusa na koji deluje prirodna selekcija. Ovakva pojava naziva se *genetičko autostopiranje* (engl. *genetic hitchhiking*) (Kojima i Schaffer 1967; Thompson 1977; Hedrick 1980). Povećanje učestalosti alela koji donosi veću adaptivnu vrednost nosiocima, dovešće do smanjenja genetičke varijabilosti blisko vezanih lokusa, vodeći pojavi *selekcionog čišćenja* (engl. *selective sweep*) (Schlötterer 2002). Međutim sve je više podataka koji ukazuju da mikrosateliti sami po sebi mogu imati adaptivni značaj. Kashi i Soller (1999) sugerišu da mikrosateliti mogu imati ulogu regulatornih elemenata transkripcije. Tako mikrosatelit i druge tandemski ponovljene sekvence koji se nalaze u okviru introna utiču na transkripciju gena, splajsovanje iRNK, i eksport iRNK u citoplazmu (Li i sar. 2004). Bogatstvo genoma repetitivnim elementima, ali i njihov neslučajni raspored duž i između hromozoma (Santos i sar. 2010) sugeriše na značajnu ulogu koju bi repetitivni elementi mogli imati u strukturnoj organizaciji i pakovanju hromozoma.

Mikrosateliti su se kao genetički markeri koristili u studijama sprovedenim na nekoliko vrsta iz roda *Drosophila*: *D. melanogaster*, *D. simulans*, *D. pseudoobscura*, *D. persimilis*, *D. buzzatii* (Bachtrog i sar. 1999; Irvin i sar. 1998; Noor i sar. 2000; Barker i sar. 2010)

Kod vrste *D. subobscura* mikrosatelitski lokusi prvi put su opisani od strane Pascual i sar. (2000). Identifikovano je čak 96 lokusa sa dinukleotidnim motivima, devet lokusa sa trinukleotidnim motivima i četiri lokusa sa tetranukleotidnim motivima. Konstatovan je veći prosečan broj ponovaka u odnosu na druge vrste roda *Drosophila*. Parametri genetičke varijabilnosti mereni kao varijansa broja ponovaka i heterozigotnost pokazali su se sličnim kao kod vrste *D. pseudoobscura*, ali višim u odnosu na *D. melanogaster* i *D. simulans*. Ovakvi rezultati ukazuju na veću efektivnu

veličinu populacija *D. subobscura* i veću mutacionu stopu. U daljim studijama mikrosatelitske varijabilnosti prirodnih populacija *D. subobscura* korišćen je set od 10-ak visokopolimorfnih lokusa. Pascual i sar. (2001) pokazuju da su populacije *D. subobscura* slabo struktuirane po mikrosatelitskoj varijabilnosti. Navedena studija takođe pokazuje veću varijabilnost populacija u južnom arealu vrste (Iberijsko poluostrvo), ali i značajno smanjenje varijabilnosti populacija Južne i Severne Amerike. Set od 10-ak lokusa pokazao se kao dovoljno informativan u analizi međupopulacione varijabilnosti, rekonstrukcije scenarija kolonizacije američkih kontinenata (Pascual i sar. 2007), ali i adaptacije na laboratorijske uslove (Simoës i sar. 2008). *D. subobscura* je prva vrsta kod koje je određena tačna hromozomska pozicija mikrosatelitskih lokusa FISH tehnikom (Santos i sar. 2010).

I pored naizgled dobro izučene mikrosatelitske varijabilnosti prirodnih populacija, veliki deo areala vrste ostaje neispitan. Tako do danas nije analizirana ni jedna populacija Apeninskog poluostrva, samo tri populacije Balkanskog poluostrva, a takođe ni područje Kavkaza. Ovi geografski regioni su važni sa istorijske tačke gledišta jer predstavljaju pribežišta evropskih vrsta umerenog područja (Hewit 2000). Tako bi analiza mikrosatelitske varijabilnosti ovih regiona dala potpuniju sliku istorijskih procesa koji su oblikovali današnju varijabilnost prirodnih populacija *D. subobscura*. Takođe nisu istraživani specifični lokaliteti u okviru ovih regiona koji predstavljaju potvrđena pribežišta velikog broja vrsta u periodima glacijacije.

## **Mitohondrijalna DNK varijabilnost vrste *Drosophila subobscura* i povezanost varijabilnosti mitohondrijalne DNK sa inverzionim polimorfizmom**

Analiza varijabilnosti mtDNK je često primenjivan alat u filogeografskim studijama. Jednostavna i evoluciono konzervirana organizacija genoma mitohondrija, uniparentalno nasleđivanje, odsustvo rekombinacija, kao i relativno visoka mutaciona stopa, čine ovaj marker idealnim u praćenju genealogije sekvenci koje se materinski nasleđuju (Moritz i sar. 1987; Harrison 1989). Visoka stopa mutacija, takođe omogućava praćenje skorašnjeg razdvajanja evoluciono bliskih linija. Stoga analiza varijabilnosti mtDNK markera daje dobar uvid u populacionu strukturu, geografsko variranje, filogeniju i demografsku istoriju populacija (Avice 2000).

Analize mtDNK varijabilnosti prirodnih populacija vrste *D. subobscura* pokazuju uniformnu distribuciju mtDNK haplotipova. Rezultati analize prisustva/odsustva restrikcionih mesta celokupne mtDNK (RSA) pokazuju prisustvo dva dominantna mtDNK haplotipa (nazvanih I i II), kao i prisustvo nekoliko retkih ili endemičnih haplotipova, koji vode poreklo od dominantnih haplotipova, a čija ukupna učestalost retko kada prelazi 10% (Latorre i sar. 1986; Alfonso i sar. 1990; García-Martínez i sar. 1998; Castro i sar. 1999). Jedini izuzetak predstavljaju populacije nekih Kanarskih ostrva gde je dominantan haplotip VIII (Pinto i sar. 1997) i donekle populacije američkih kontinenata gde dominiraju haplotipovi I i II, ali odsustvuju retki haplotipovi usled efekta osnivača (Rozas i sar. 1990).

Pored RSA kod prirodnih populacija *D. subobscura*, određivana je i nukleotidna varijabilnost *ND5* gena (Castro i sar. 2010). Rezultati navedene studije daju obrazac varijabilnosti izuzetne sličnosti kao i RSA: postoji jasno razdvajanje haplotipova na dve klade. Obe klade imaju dominantni haplotip i nekoliko retkih varijanti izvedenih iz njega. Svi haplotipovi prve klade odgovaraju haplogrupi I (haplotip I i haplotipovi nastali od njega), dok svi haplotipovi druge klade odgovaraju haplogrupi II (haplotip II i haplotipovi nastali od njega).

Nekoliko faktora oblikuje varijabilnost mtDNK vrste *D. subobscura*. Među njima najznačajniji su istorijski procesi, genetički drift i prirodna selekcija koja najverovatnije deluje preko cito-nukleusne koadaptacije.

Pokazano je da je genetički drift značajan faktor odgovoran za uočenu distribuciju mtDNK haplotipova kod analizirane vrste (Castro i sar. 1999). Analiza nukleotidne varijabilnosti *ND5* gena (Castro i sar. 2010) sugerise značajno povećanje veličine populacije *D. subobscura* nakon smanjenja u periodu glacijacije, ali uzima u obzir i sezonsko smanjenje veličine populacija, a zatim naglo povećanje brojnosti. Christie i sar. (2010) su sprovedli mesečno uzorkovanje populacija ispitivane vrste na ostrvu Majorka u intervalima od po mesec dana. Rezultati jasno ukazuju na smanjivanje veličine populacija usled nepovoljnih sredinskih uslova u toku hladnih zima i sušnih leta. Međutim, rezultati navedenih studija ne isključuju delovanje prirodne selekcije na obrazac varijabilnosti haplotipova. Uzimajući u obzir manju efektivnu veličinu populacija za mtDNK markere u odnosu na jedarne markere, genetički drift je možda dovoljan da spreči širenje retkih haplotipova koji nastaju mutacijama od dva dominantna haplotipa, ili dolaze iz susednih populacija. Međutim, postoji jasan sezonski obrazac promene učestalosti dva dominantna haplotipa: haplotip I dostiže maksimalnu učestalost u junu mesecu, dok u toku jesenjih meseci učestalost haplotipa II raste (Gonzalez i sar. 1994; Christie i sar. 2010). Ovakav obrazac ukazuje na diferencijalno delovanje prirodne selekcije na dva dominantna haplotipa. Takođe, činjenica da su dva dominantna haplotipa uvek prisutna u visokim učestalostima ukazuje da i jedan i drugi haplotip verovatno imaju neke selektivne prednosti kojima se održavaju u prirodnim populacijama u približno jednakim učestalostima.

Sproveden je niz istraživanja koja su imala za cilj detekciju delovanja prirodne selekcije na mtDNK haplotipove *D. subobscura*. Korišćene su dve strategije: 1) kompeticija haplotipova u laboratorijskim uslovima i 2) merenje komponenti adaptivne vrednosti nosilaca različitih haplotipova.

García-Martínez i sar. (1998) su sprovedli eksperiment kompeticije haplotipova I i II. Bez obzira na replike sa različitim početnim učestalostima haplotip II se uvek fiksirao i pokazao selektivnu superiornost u odnosu na haplotip I. Nasuprot tome, kada su primenjeni manje kompetitivni uslovi u studiji Oliver i sar. (2005) oba haplotipa su

se održala u eksperimentalnim populacijama, ukazujući samo na uslovnu prednost haplotipa II.

Kvantifikovane su i komponente adaptivne vrednosti dva široko rasprostranjena haplotipa. Christie i sar. (2004) pokazuju selektivnu superiornost haplotipa II u eksperimentalnim uslovima u nekim osobinama životne istorije (dužina razvića od larve do adulta, dugovečnost, i otpornost na isušivanje). Sa druge strane Castro i sar. (2003) pokazuju superiornost haplotipa I u obrascima reproduktivnog ponašanja. Važno je napomenuti da su komponente adaptivne vrednosti mtDNK haplotipova u navedenim studijama merene na sopstvenim jedarnim pozadinama, na kojima su i izlovljene u prirodi. Ukoliko se jedarne pozadine uniformišu (Christie i sar. 2011), adaptivne razlike dva dominantna haplotipa se gube. Ovo jasno sugeriše da prirodna selekcija ne deluje direktno na mtDNK haplotipove, već verovatno preko cito-nukleusne koadaptacije.

Castro i sar. (1999) pokazuju prisustvo neravnoteže vezanosti (LD) između mtDNK haplotipova i alozimskih lokusa, dok su Oliver i sar. (2002) pokazali neravnotežu vezanosti mtDNK haplotipova i inverzionih aranžmana J hromozoma. Međutim, autori obe studije sugerišu da je uočeni LD verovatno prolazan. Takođe, LD uočen u prirodnim populacijama nestaje u laboratorijskim uslovima nakon 23 generacije.

*D. subobscura* je pogodan model u istraživanjima uloge cito-nukleusnih koadaptacija u oblikovanju mtDNK varijabilnosti jer se odlikuje bogatstvom inverzionog polimorfizma (Krimbas 1993) koji predstavlja adaptivni genetički marker (Prevosti i sar. 1988; Orenge i Prevost 1996). Pored toga, različiti hromozomski aranžmani sa preklapajućim hromozomskim regionima u okviru inverzija razlikuju se u alelskom sastavu (Hoffman i sar 2004). Nameće se zaključak da ukoliko postoji koadaptacija između različitih mtDNK haplotipova i različitih alela koji se nalaze u okviru različitih inverzija, očekuje se LD između pomenutih markera.

I pored naizgled temeljno istražene varijabilnosti mtDNK kod *D. subobscura*, u velikom delu areala ove vrste ona ostaje neistražena. To je slučaj i sa Balkanskim poluostrvom čiji je pribežišni značaj već istaknut. Takođe, Balkansko poluostrvo je veoma specifično po varijabilnosti inverzionog polimorfizma, i poseduje neke endemične hromozomske aranžmane ( $A_1$ ,  $U_{1+2+6}$ ,  $E_8$ ,  $E_{1+2+9}$  itd.) u visokim



učestalostima (Krimbas 1993). Shodno tome pruža se izuzetna prilika za testiranje citonukleusnog LD na osobitom sistemu jedarnih pozadina.

## Ciljevi istraživanja

Fokus ove disertacije je utvrđivanje genetičke varijabilnosti prirodnih populacija *D. subobscura* iz nekih klisura i kanjonskih dolina sa teritorije Republike Srbije. Zbog specifičnog spleta abiotičkih i biotičkih faktora, klisure i kanjonske doline su bile od presudnog značaja za preživljavanje tercijernih populacija u periodima glacijacije. Osnovna hipoteza koja je testirana je da se populacije u klisurama i kanjanskim dolinama u poređenju sa populacijama okolnih područja odlikuju genetičkim osobenostima, koje su rezultat kako istorijskih procesa, tako i uticaja ekološki veoma raznovrsnih staništa.

Proširili smo fokus interesa i na šire područje Balkanskog poluostrva. Naime, podaci dobijeni analizom hromozomske varijabilnosti nedvosmisleno ukazuju na značaj Balkanskog poluostrva kao glacijalnog pribežišta odakle je *D. subobscura* rekolonizovala evropski kontinent. Međutim, varijabilnost ove vrste na Balkanskom poluostrvu do sada nije u većoj meri određivana upotrebom molekularnih markera. Ključno pitanje je da li se i na nivou DNK varijabilnosti mogu uočiti genetičke osobenosti balkanskih populacija *D. subobscura*.

Takođe, cilj disertacije je i utvrđivanje povezanosti mitohondrijalne DNK varijabilnosti i varijabilnosti inverzionog polimorfizma u prirodnim populacijama *D. subobscura*. Uspostavljena je hipoteza da je specifična varijabilnost mtDNK haplotipova oblikovana cito-nukleusnim koadaptacijama, odnosno da postoji funkcionalna povezanost variranja mtDNK i genskih alela u okviru inverzionih aranžmana.

## Materijal i metode

## Opis lokaliteta

U ovom istraživanju korišćene su prirodne populacije vrste *Drosophila subobscura* uzorkovane na tri refugijalna lokaliteta: Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L). Takođe su korišćene i populacije uzorkovane na lokalitetima koji nemaju refugijalne osobenosti: bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB) i hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP).

Reka Derventa, desna pritoka reke Drine, pravi kanjon u dužini oko 2 km sa pravcem pružanja jugozapad-severoistok. Kanjon ima izuzetno usko dno (3-10 m) i visoke strme krečnjačke strane sa raznovrsnim mikrostaništima koja se smenjuju na malim rastojanjima. U području gde njen tok skreće u pravcu severozapad-jugoistok pravi prirodnu granicu između planina Tare i Zvijezde. Kanjon reke Dervente je u botaničkoj literaturi poznat kao *locus classicus* tipične hazmofitske, stenoendemične vrste *Centaurea derventana* (Jovanović i Jovanović-Dunjić 1986). U ovom kanjonu jednike su izlovljavane na desnoj obali reke (zapadna ekspozicija) na nadmorskoj visini od 439 m i koordinatama: 43°56'58,10"N, 19°21'27,21"E, u osiromašenoj polidominantnoj zajednici *Quercus-Ostryetum mixtum* koja se u izvornom sastavu odlikuje značajnim učešćem većeg broja vrsta drveća kao što su: *Quercus pubescens*, *Q. cerris*, *Q. petraea*, *Ostrya carpinifolia*, *Acer monspessulanum*, *A. campestre*, *A. pseudoplatanus*, *A. platanoides*, *Fagus sylvatica*, *Fraxinus excelsior*, *Tilia cordata*, *T. tomentosa*, *Sorbus torminalis*. Na okolnim stenama nalazi se zajednica *Ostryo-Pinetum nigrae*.

Reka Nišava u jugoistočnoj Srbiji pravi Sićevačku klusuru, koja spada u red velikih krečnjačkih klisura u Srbiji, kako po dužini (16 km), tako i po dubini i razuđenosti, spajajući nišku i belopalanačku kotlinu. Opoljena je sa svih strana visokim grebenima. Na severu se uzdiže dugački greben Svrlijskih planina, koji, zajedno sa Višegradom i Ječavom, zaklanja klisuru sa severa. Sa južne strane zaklonjena je uzvišenjima: Duboka padina, Straža, Konjarnik, Mandaš, Kukavički vrh i Oblik. Pravac pružanja Sićevačke klisure je istok-zapad pa se jasno izdvajaju severna i južna strana. Sićevačka klisura je u celini toplija od ostalih klisura u Srbiji, međutim zbog zaklonjenosti, vlažnost vazduha i smanjeno kolebanje temperature su očuvani.

Klisura se odlikuje izuzetnim bogatstvom endemoreliktnih i reliktnih vrsta: *Ramondia serbica* i *Ramondia nathaliae*, *Juglans regia*, *Corylus colurna*, *Acer monspessulanum* itd. Ova klisura se smatra jednim od najtipičnijih i najbogatijih refugijuma submediteranskih vrsta kao što su *Salvia officinalis*, *Paliurus spina-christi* i *Coronilla emerus*. Izlovljavanje jedinki je vršeno na levoj obali reke Nišave (severna ekspozicija) na 279 m nadmorske visine, i koordinatama 43°19'55,58"N, 22°08'37,98"E u polidominantnoj šumskoj zajednici tipa *Carpino orientalis-Quercetum mixtum (calcicolum)*, u čijoj sastojini su zastupljeni i *Juglans regia*, *Acer intermedium*, *Ruscus aculeatus*, *R. hypoglossum*, *Daphne laureola*, *Corylus colurna*. Stotinu metara više na stenama rastu u simpatriji *Ramonda serbica* i *R. nathaliae* obrazujući zajednicu *Cetereto-Ramondaetum serbicae subass. ramondetosum nathaliae*.

Kanjonska dolina Lazareve reke je usečena u istočnom obodu planine Kučaj i pripada slivu Zlotske reke. Zaklonjena je sa svih strana visokim grebenima: sa juga i jugoistoka Malinik, sa severa Strnjak i Kornjet, a sa zapada Pogare i Mikulj. Kanjon Lazareve reke pored tipičnog kanjanskog dela ima i klisurasti deo (pa se često naziva i Zlotska klisura). Tipičan kanjanski deo je sa najvišim okomitim stenama od svih kanjona u istočnoj Srbiji. Jedinke su izlovljavane na desnoj obali Lazareve reke (severna ekspozicija) na 312 m nadmorske visine, i koordinatama 44°1'42,17"N, 21°57'28,80"E u varijanti polidominantne zajednice tipa *Fago-Colurnetum mixtum juglandetosum*, u kojoj dominiraju *Corylus colurna* i *Juglans regia*, dok je *Fagus sylvatica* manje zastupljena. Na ostenjacima pored vode obilno je zastupljena vrsta *Syringa vulgaris*, a na severno eksponiranim stenama i *Ramonda serbica*. Pored navedene dve reliktnne vrste, od kojih je *Ramonda* i endemo-reliktna, zastupljen je i *Ruscus hypoglossum*.

Na planini Goč jedinke su izlovljavane na dva lokaliteta: Lokalitet bukovo-jelova šuma, karakteriše šumska zajednica tipa *Abieto-fagetum*, sa dominantnim vrstama *Fagus sylvatica* i *Abies alba*. Nalazi se na nadmorskoj visini od 875 m i koordinatama 43°33'28,43"N, 20°45'10,96"E. Lokalitet hrastovo-jasenova šuma karakteriše šumska zajednica tipa *Fraxineto-quercetum*, sa dominantnim vrstama *Quercus petraea* i *Fraxinus ornus*. Nalazi se na nadmorskoj visini 787 m, i koordinatama 43°32'57,38"N, 20°40'02,32"E.

Lokalitet Botanička bašta se nalazi u urbanom delu Beograda na nadmorskoj visini od 97 m, i koordinatama 44°49'00,01''N, 20°28'24,88''E. Jedinke su izlovljavane u biljnoj zajednici *Arboretum* u kojoj preovlađuju vrste *Corylus colurna* i *Celtis australis*. Ovaj lokalitet poseduje specifične mikroklimatske uslove zbog intenzivnog antropogenog uticaja.

Lokalitet hrastova šuma u Deliblatskoj peščari nalazi se u jugoistočnom Banatu. Jedinke su izlovljavane u šumskoj zajednici tipa *Orno-Quercetum cerris-virgiliane* u kojoj dominiraju vrste *Tilia cordata* i *Quercus pubescens*. Nalazi se na nadmorskoj visini 105 m i koordinatama 44°49'88,90''N i 21°07'25,80''E.

## Uzorkovanje i uspostavljanje IF linija

Uzorkovanje je vršeno korišćenjem fermentisanih voćnih trapova pomoću entomoloških mrežica u popodnevnom periodu od 18-20h. Nakon donošenja u laboratoriju odvojeni su polovi. Uspostavljene su *iso-female* (IF) linije raspoređivanjem ženki u pojedinačne flakone sa standardnom hranljivom podlogom. Narednih desetak dana ženke su ostavljene da polažu jaja, nakon čega su uklonjene iz flakona. Uzorkovani mužjaci su raspoređeni u grupama od po 5-10 jedinki po flakonu. Uspostavljanje i održavanje IF linija vršeno je na standardnom *Drosophila* supstratu i optimalnim laboratorijskim uslovima za *D. subobscura* koji podrazumevaju temperaturu od 19°C, ~60% relativne vlažnosti vazduha, osvetljenje od 300 lx i fotoperiod od 12 časova svetla i 12 časova mraka. Standardna hranljiva podloga se sastoji od kukuruznog griza (7,88%), šećera (7,12%) i agara (0,52%), obogaćena suvim kvascem (0,76%) i fungicidom (alkoholni rastvor metil-4-hidroksibenzoata (Nipagin®)).

Mušjaci uhvaćeni u prirodi, kao i mužjaci prve generacije (F1) IF linija su korišćeni u analizi inverzionog polimorfizma. F1 potomstvo IF linija korišćeno je u analizi mitohondrijalne DNK (mtDNK) varijabilnosti. Mikrosatelitska (MS) varijabilnost određivana je na ženkama i mužjacima uhvaćenim u prirodi koji su zamrznuti do analize.

U ovoj studiji analizirana je varijabilnost inverzionog polimorfizma, mtDNK i mikrosatelita u T, S i L populacijama. U populaciji DP analizirana je mtDNK i MS varijabilnost dok je varijabilnost inverzionog polimorfizma ranije utvrđena (Kenig i sar. 2010). U populacijama B, H i BB analizirana je samo mtDNK varijabilnost, dok je varijabilnost inverzionog polimorfizma i mikrosatelita utvrđena u ranijim studijama (Jelić i sar. 2009; Kenig i sar. 2010; Kurbalija Novičić i sar. 2011). Tabela U1 prikazuje veličinu uzorka i vreme uzorkovanja, po lokalitetima.



Tabela U1 Veličina uzorka i vreme uzorkovanja po lokalitetima

marker	populacije	B	H	BB	DP	T	S	L
inverzioni polimofizam	n	30	30	31	33	88	85	47
	h	Jun 2007.	Jun 2007.	Jun 2008.	Jun 2007.	Sept. 2008.	Jun 2010.	Jun 2011.
mikrosateliti	n	38	51	47	56	43	48	57
	h	Jun 2009.	Jun 2009.	Jun 2009.	Jun 2011.	Sept. 2008.	Jun 2010.	Jun 2011.
mtDNK	n	59	59	55	69	62	74	38
	h	Jun 2010.	Jun 2010.	Jun 2010.	Jun 2011.	Sept. 2008.	Jun 2010.	Jun 2011.

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L), broj analiziranih jedinki (n) i vreme uzorkovanja (h).

## **Utvrđivanje genetičke strukture prirodnih populacija iz klisura i kanjona analizom inverzionog polimorfizma**

U cilju utvrđivanja hromozomske varijabilnosti prirodnih populacija vrši se kariotipizacija mužjaka uhvaćenih u prirodi ili mužjaka F1 generacije IF linija.

Mužjak čiji kariotip želimo da utvrdimo ukršta se sa tri do četiri nevine ženke laboratorijske linije Künsnacht. Nakon nedelju dana roditelji se uklanjaju, a flakoni se redovno prehranjuju gustim rastvorom pekarskog kvasca. Na taj način se dobijaju veće larve sa krupnijim pljuvačnim žlezdama koje su pogodnije za analizu.

Disekcija pljuvačnih žlezdi se vrši pod binokularnom lupom na larvama u trećem larvalnom stadijumu neposredno pred ulutkavanje. Disekcija se vrši u Ringerovom rastvoru (2% NaCl, 0,02% KCl i 0,01% CaCl<sub>2</sub>). Žlezda očišćena od masnog tkiva se prebacuje na mikroskopsku pločicu na koju je nakapana kap boje (2% rastvor orceina u glacijalnoj sirćetnoj kiselini). Nakon nekoliko minuta žlezda se prekriva pokrovnom ljupticom i preparira „squash“ tehnikom. Orcein se vezuje za euhromatinske regione politenih hromozoma dajući obrazac traka gde su euhromatinski regioni tamniji. Trajni preparati politenih hromozoma se dobijaju nakon 24h ispiranja svežih preparata u 70% etanolu, sušenja i fiksiranja euparalom.

Analiza preparata vršena je pod svetlosnim mikroskopom. Za određivanje genskih aranžmana korišćena je hromozomska mapa Kunze-Mühl i Müller (1958).

Künsnacht laboratorijska linija je homokariotipna za svih pet akrocentričnih hromozoma u genomu (A<sub>ST</sub>, J<sub>ST</sub>, U<sub>ST</sub>, E<sub>ST</sub> i O<sub>ST</sub>). Stoga se kod heterokariotipnih potomaka (larvi) ovakvog ukrštanja uočavaju inverzione petlje, dok su kod homokariotipnih one odsutne. Na taj način posmatranjem jednog preparata moguće je odrediti jednu kombinaciju haploidnog seta hromozoma ukrštenog mužjaka. Da bi se odredio kariotip, odnosno diploidni set inverzionih aranžmana, potrebno je analizirati haploidni set hromozoma na više larvi. U slučaju hromozoma A koji je kod mužjaka prisutan u jednoj kopiji, analiza većeg broja larvi smanjuje mogućnost da se inverzioni aranžman na A hromozomu odredi kao A<sub>ST</sub> koji potiče od Künsnacht ženke. U ovoj

studiji analizirano je po osam preparata politenih hromozoma iz svakog ukrštanja. Tako je verovatnoća pogrešne procene inverzione strukture veoma mala i iznosi  $(1/2)^8$  za svaki hromozom.

U populaciji T utvrđen je kariotip 88 mužjaka od kojih je 26 uhvaćeno u prirodi, dok 62 predstavljaju potomke prve generacije iz IF linija. U populaciji S određen je kariotip 85 mužjaka od kojih je 11 uhvaćeno u prirodi dok 74 predstavljaju potomke prve generacije IF linija. U populaciji L utvrđen je kariotip 47 mužjaka od kojih je 9 uhvaćeno u prirodi, dok 38 predstavlja potomke prve generacije IF linija.

Izračunati su i parametri inverzionog polimorfizma: heterozigotnost (HZ) i indeks slobodne rekombinacije (*eng.* Index of free recombination - IFR). Heterozigotnost predstavlja prosečan procenat genoma u heterokariotipnoj kombinaciji po jedinki. IFR predstavlja pretpostavljeni procenat dužine hromozoma koji je podložan rekombinacijama, odnosno koji je izvan inverzija. Vrednost IFR predstavlja prosečnu vrednost za sve hromozome i sve jedinke u populaciji. U računu za HZ i IFR uključeni su samo autozomi, s obzirom da je analiziran kariotip mužjaka. IFR parametar daje bolju sliku varijabilnosti inverzionog polimorfizma jer za razliku od HZ, uzima u obzir i dužinu regiona hromozoma koji se nalazi pod inverzijama.

Da bi se utvrdilo da li postoje značajne razlike u učestalosti hromozomskih aranžmana između populacija korišćen je Z-test (Zar 1999). Odstupanja od homogenosti distribucije učestalosti hromozomskih aranžmana između svih populacija i između parova populacija testirana je primenom G-testa (Sokal i Rohlf 1995), kako za pojedinačne hromozome tako i za sve hromozome ukupno. Sekvencijalni Bonferroni test (Rice 1989) je korišćen u ciju korekcije lažno pozitivnih značajnih vrednosti usled simultanog višestrukog testiranja.

## Utvrđivanje mikrosatelitske varijabilnosti prirodnih populacija

Za utvrđivanje DNK varijabilnosti jedarnog genoma korišćeno je 11 polimorfnih mikrosatelitskih lokusa.

Celokupna genomska DNK je izolovana po protokolu Martinez i sar. (1992), ali nije primenjen finalni tretman alkalne lize. Pre PCR amplifikacije određivana je koncentracija i čistoća izolata na Eppendorf-ovom spektrofotometru. Korišćena metoda ekstrakcije genomske DNK se pokazala kao izuzetno dobra jer daje dobar prinos DNK koji je odgovarajuće čistoće. Nakon određivanja koncentracije sledilo je izjednačavanje koncentracije svih izolovanih rastvora DNK. Ova procedura je obezbedila ujednačen intenzitet pikova amplifikata između uzoraka, čime je broj ponovljenih fragmentnih analiza sveden na minimum.

Kao kriterijumi u izboru mikrosatelitskih lokusa korišćeni su položaj u genomu i polimorfnost. Izabrani su mikrosatelitski lokusi tako da su raspoređeni na svih pet hromozoma *D. subobscura*. Lokusi *dsub05* i *dsub19* se nalaze na hromozomu A; *dsub03* i *dsub15* na hromozomu U; *dsub13* i *dsub20* na hromozomu E; *dsub18* i *dsub27* na hromozomu E; i *dsub01*, *dsub02* i *dsub04* na hromozomu O (Santos i sar. 2010). Za amplifikaciju lokusa korišćeni su prajmeri razvijeni od strane Pascual i sar. (2001). Jedan od dva prajmera svakog mikrosatelitskog lokusa obeležen je fluoroforom na 5' kraju po shemi:

*dsub01*

**FAM** - CCA GAG CAC TCG TGT AAG CA  
ACG TTT TGT CTT TCG CTG GT

*dsub02*

**NED** - CCA GGT ACG TGT CAC ACA GG  
TGA CAA AAA GGA CAA CCT TCG

*dsub03*

**VIC** - ATC CAC TCC AAA CTG CTG CT  
TTC CAA TGT TTT TGC TGC TG

*dsub04*

**FAM** - GCA CTT GAA GTC TTG TGG CA  
TTG ACG ACT TCA TGC TCA GG

*dsub05*

**PET** - ACT GCA AAT GCA GCA AAC AG  
AAA CGC GTA CAG CAT GAG TG

*dsub13*

**NED** - CAC TCG AAA CTG ACA GAC GC  
GAG GTT TGG TAA GGG AAG CC

*dsub15*

**PET** - AAA GAC TTT GAC GCG ACG AT  
CCA TGT CTG GCC AAC TAT CA

*dsub18*

**NED** - ATA AAA CGT TTC TGC GGC AT  
AGT CAA GCG GTA GTC AGG GA

*dsub19*

**FAM** - AGG AAC ACC ATA GCC ACA GC  
TTG CGA TGA CAG TAA GGC AG

*dsub20*

**PET** - CCA CCC TAA GTT TTG CCT CA  
CAG CCG CAG AAC AGA AAA AT

*dsub27*

**VIC** - TAT GGC TGT TTG TCT TGG CA  
TTG TTG CCC CTG TAT CTT CC

Mikrosatelitski lokusi su amplifikovani u četiri multipleks reakcije 1) *dsub27*, *dsub20* i *dsub04*; 2) *dsub01*, *dsub18* i *dsub05*; 3) *dsub02*, *dsub13* i *dsub19*; i 4) *dsub03* i *dsub15*. Korišćen je i metod spajanja amplifikata (*multipuling*) reakcije 1) sa reakcijom 2), a reakcije 3) sa reakcijom 4). Ovo je bilo moguće jer se u reakcijama čiji su produkti spajani amplifikati mikrosatelitskih lokusa obeleženi istom fluoroforom davali amplifikate opsega koji se ne preklapaju. PCR amplifikacija je obuhvatala inicijalnu denaturaciju na 95°C a zatim 30 ciklusa koji su uključivali: denaturaciju na 95°C u

trajanju od jednog min., vezivanje prajmera na 57°C u trajanju od 30s i elongaciju na 72°C u trajanju od 30s. Nakon 30 ciklusa primenjena je finalna elongacija na 60°C u trajanju od 30 min. PCR smeša u finalnom volumenu od 20 $\mu$ l je sadržala:

- 2  $\mu$ L 10X pufera
- 2  $\mu$ L smeše dNTP-a (smeša je sadržala 2mM svakog nukleotida)
- 1,2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>
- 1.5-2  $\mu$ L smeše prajmera (ukupna koncentracija svih prajmera u smeši je iznosila 10 $\mu$ M)
- 0,16  $\mu$ L Taq polimeraze (koncentracije 5 jedinica/ $\mu$ L)
- 2-3  $\mu$ L DNK (koncentracije 50  $\mu$ g/ $\mu$ L)

Amplifikovani produkti su mešani sa Hi-Di formamidom (Applied Biosystems) i standardom za dužinu GeneScan LIZ-500 (Applied Biosystems) i analizirani na automatskom sekvenatoru ABI Prism 3130. Dužina amplifikovanih fragmenata određivana je u softveru Gene Mapper (Applied Biosystems). Alelima čija dužina nije odgovarala celom broju ponovaka, dodeljena je vrednost bliža celom broja ponovaka.

Genetička varijabilnost je kvantifikovana kao prosečan broj alela po lokusu po populaciji, zatim prosečan broj alela po lokusa ponderisan sa veličinom uzorka, te uočena i očekivana heterozigotnost i opseg alelskog variranja. Statistička značajnost razlika u parametrima varijabilnosti je određivana primenom neparametarskog testa Mann-Whitney u programu PAST (Hammer i sar. 2001). Odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže testirano je za svaki lokus u svim populacijama koristeći metod Markovljevog lanca pri proceni verovatnoća u programu Arlequin (v 3.5.1.2) (Excoffier i Lischer 2010).

Kako bismo razložili izvore genetičkog variranja između i u okviru populacija, primenili smo analizu molekularne varijanse (AMOVA). Stepem međupopulacione diferencijacije kvantifikovan je Rajtovom F statistikom upotrebom F<sub>ST</sub> indeksa (Weir i Cockerham 1984; Weir 1996). Testiranje značajnosti odstupanja F<sub>ST</sub> indeksa od nule određeno je pomoću 1000 permutacija. Sve pomenute analize urađene su u programu Arlequin (v 3.5.1.2) (Excoffier i Lischer 2010).

Međupopulaciona diferencijacija je kvantifikovana i pomoću  $Rho_{ST}$  indeksa, koji predstavlja nepristrasnu verziju  $R_{ST}$  indeksa (Slatkin 1995). Pri kvantifikovanju razlika između populacija po mikrosatelitskim lokusima, ovaj parametar uzima u obzir da mikrosateliti evoluiraju po modelima koji podrazumevaju dobitak ili gubitak broja ponovaka, pa u računu pretpostavlja da su aleli slične dužine međusobno i srodniji. Statistička značajnost indeksa  $Rho_{ST}$  određivana je putem 1000 permutacija u programu FSTAT (verzija 2.9.3.2) (Goudet 2002).

Kako bi se utvrdilo da li su populacije prošle kroz skorašnje smanjenje brojnosti, korišćen je program Bottleneck (verzija 1.2.02) (Cornuet i Luikart i sar. 1997). U populacijama koje su prošle kroz skorašnje smanjenje efektivne veličine, dolazi do smanjenja broja alela i heterozigotnosti. Međutim, gubitak alela je brži nego gubitak heterozigotnosti, pa će u takvim populacijama heterozigotnost biti veća nego što bi se očekivalo za preostali broj alela u ravnoteži genetičkog drifta i mutacija. Kako bi se odredilo da li populacije pokazuju značajnu prekomernu heterozigotnost, koristili smo Wilcoxon *signed-rank* test. Prilikom analize pretpostavili smo da mikrosatelitski lokusi mutiraju po dvofaznom mutacionom modelu (engl. *two phase mutation model* - TPM). Pascual i sar. (2001) su na sličnom setu mikrosatelitskih lokusa pokazali da pretpostavka evolucije po TPM modelu daje najbolju mogućnost detekcije skorašnjeg smanjenja veličine populacije.

Sa ciljem testiranja selektivne neutralnosti mikrosatelitskih lokusa, upotrebljen je  $F_{ST}$  metod u programu LOSITAN (Beaumont i Nichols 1996; Antao i sar. 2008). Ovaj metod opisan je od strane Cavalli-Sforza (1966) i Beaumont (2005).  $F_{ST}$  pristup uzima u obzir odnos između  $F_{ST}$  vrednosti i očekivane heterozigotnosti. Celokupan uzorak je analiziran u dva koraka i 15000 simulacija, po modelu mutacija u koracima (engl. *stepwise mutation model* - SMM). Prvi korak kalibriše nultu-referentnu distribuciju  $F_{ST}$  vrednosti, dok drugi procenjuje vanmarginalne lokuse koji imaju prekomerno visoke ili niske  $F_{ST}$  vrednosti u poređenju sa procenjenim nultim-referentnim  $F_{ST}$  vrednostima.

## Utvrđivanje varijabilnosti mitohondrijalne DNK prirodnih populacija

U cilju utvrđivanja genetičke varijabilnosti mtDNK prirodnih populacija analizirano je prisustvo/odsustvo restrikcionih mesta pet enzima (RSA analiza).

mtDNK je izolovana po protokolu Martinez i sar. (1992). Princip ove metode je sličan metodi za izolaciju plazmida i zasniva se na razdvajanju malih od velikih molekula DNK, ali i od proteina. Uzorci se prečišćavaju od proteina primenom SDS-a kao deterdženta, a zatim zamenom natrijuma sa kalijumom u SDS-u čime se nakon centrifugiranja postiže taloženje proteina i drugih nečistoća. Razdvajanje malih od velikih molekula DNK se postiže alkalnom lizom koja podrazumeva denaturišuće uslove (visoka temperatura i visoka pH) koji dovode do raskidanja vodoničnih veza između komplementarnih lanaca; nakon čega sledi primena rastvora niske pH vrednosti i niske temperature. Ovakva brza promena temperature i pH vrednosti dovodi do pravilnije renaturacije malih molekula DNK kakva je mtDNK, dok se genomska DNK nepravilno renaturiše formirajući nerastvornu mrežu - agregat koji se centrifugiranjem taloži. Proces denaturacije i renaturacije se ponavlja dva puta čime se dobija rastvor DNK izuzetno bogat mtDNK molekulima. Pored mtDNK kao mali molekuli razdvajaju se i RNK molekuli koji se u daljoj analizi lako uklanjaju primenom enzima RNAza.

Kako bi se dobila dovoljna količina mtDNK za dalju digestiju restrikcionim enzimima, DNK je izolovana iz prve generacije potomaka ženki koje su osnovale IF linije. Pošto se mtDNK materinski nasleđuje, sve jedinke koje potiču od iste majke imaju istu sekvencu mtDNK (sa izuzetkom mutacija koje mogu nastati sa malom verovatnoćom). Izolacija mtDNK iz 15-20 mušica se pokazala dovoljnom za digestiju sa pet restrikcionih enzima.

Pet restrikcionih enzima je korišćeno za digestiju izolovane mtDNK (*EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *HaeIII* i *HpaII*). Alfonso i sar. (1990) i Castro i sar. (1999) su pokazali da su populacije *D. subobscura* varijabilne u prisustvu/odsustvu restrikcionih mesta za ovih pet enzima. Dodatni restrikcioni enzimi (*HpaI* i *XbaI*) su korišćeni za karakterizaciju velike insercije u mtDNK koja je nađena kod jedne individue poreklom iz populacije S.



Restrikciona smeša od 20 $\mu$ L je sadržala sledeće komponente:

- 2 $\mu$ L 10X FastDigest Green Buffer®
- 0,5  $\mu$ L 1mg/ml RNase A (finalna koncentracija 25  $\mu$ g/mL)
- 0,5-1  $\mu$ L FastDigest® restrikcionog enzima
- 4-5  $\mu$ L izolovane mtDNK

Digestija je vršena par časova na 37°C.

mtDNK izolovana iz svake IF linije je digestovana pojedinačno svakim od pet restrikcionih enzima. U slučaju pojave retkih i novootkrivenih obrazaca restrikcije, korišćene su digestije sa parovima enzima istovremeno, kako bi se odredila tačna pozicija restrikcionog mesta. Fragmenti dobijeni restrikcijom razdvajani su na horizontalnom 0,8%-1,2% agaroznom gelu. Etidijum bromid, agens koji se koristi za vizuelizaciju DNK pod UV svetlom, dodavan je u gelove pre izlivanja u finalnoj koncentraciji od 0.1 $\mu$ g/ml. Kao marker za određivanje dužine restrikcionih fragmenata korišćena je smeša dva markera: 1)  $\lambda$  DNK digestovana sa *Hind*III enzimom i 2)  $\lambda$  DNK duplo digestovana sa *Hind*III i *Eco*RI enzimima. Dva markera su pomešana u odnosu 1:3 i tako nanošena na gelove. Nakon elektroforeze gelovi su fotografisani u aparatu Bio-Rad Gel Doc 1000 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Calif, USA).

Haplotipovi su imenovani prema kombinaciji prisustva/odsustva restrikcionih mesta za svaki enzim prema shemi u publikacijama Latorre i sar. (1986, 1992) i Castro i sar. (1999).

Stepen mitohondrijalne DNK varijabilnosti određen je kao haplotipski diverzitet. U cilju testiranja selektivne neutralnosti distribucije mtDNK haplotipova u populacijama, korišćen je Tadžimin D-test (Tajjima 1989). Princip testa je provera neutralnog modela nukleotidne varijabilnosti koji predviđa jednakost između prosečnog broja nukleotidnih razlika između haplotipova (tj. nukleotidne heterozigotnosti) i broja varijabilnih mesta podeljenih sa  $\sum_{i=1}^{i=n-1} \frac{1}{n}$  gde je  $i$  i-ta sekvenca, ili kombinacija restrikcionih mesta, a  $n$  veličina uzorka. Pored Tadžiminog D testa korišćen je i Fuov Fs test (Fu 1997). Dok se Tadžimin D test bazira na učestalosti pojedinačnih mutacija (odnosno segregacionih varijabilnih mesta), Fuov test se bazira na distribuciji alela, tj. haplotipova. Ovaj test poredi uočeni broj haplotipova sa brojem haplotipova koji bi se

očekivao u stanju ravnoteže za uočeni prosečni broj nukleotidnih razlika. Preciznije, izračunava se verovatnoća ( $S'$ ) da uzorak u stanju ravnoteže ima manji ili jednak broj alela od uočenog broja uzimajući u obzir prosečan broj nukleotidnih razlika između haplotipova.  $F_s$  vrednost je funkcija navedene verovatnoće,  $F_s = \ln\left(\frac{S'}{1-S'}\right)$ . Negativne vrednosti testova ukazuju na direkcionu selekciju, dok pozitivne vrednosti ukazuju na balansnu selekciju (Halliburton 2004). Testovi koji su izvorno razvijeni za testiranje selektivne neutralnosti mutacija u novije vreme nalaze svoju primenu i u detekciji promene cenzusa populacija (Ramos-Onsins i Rozas 2002). Osnovni princip primene je da će nagla ekspanzija populacije koja je povezana sa adaptivnim procesima uzrokovati promenu alelskih učestalosti koja odstupa od Rajt-Fišerovog (engl. *Wright-Fisher*) selektivno neutralnog modela ekspanzije populacija. Pozitivne  $D$  i  $F_s$  vrednosti ukazuju na odstupanje ka povećanju brojnosti alela koji imaju srednje učestalosti, i koji su nastali ranije u evolucionoj istoriji populacije. Sa druge strane, skorašnje mutacije će mahom biti prisutne kod malog broja jedinki vodeći ka odstupanju u smeru povećanja broja ređih alelskih varijanti i negativnim vrednostima. Tako će u slučaju negativnih vrednosti visok haplotipski diverzitet u kombinaciji sa malim nukleotidnim diverzitetom (relativno veliki broj haplotipova među kojima postoje male nukleotidne razlike jer su skoro nastali jedni od drugih) biti rezultat brze demografske ekspanzije populacija koje su posedovale malu efektivnu veličinu. Diverzitet haplotipova i testiranje selektivne neutralnosti je izvršeno u programu DnaSp 5.10 (Librado i Rozas 2009) i programu Arlequin (Excoffier i Lischer 2010).

Primenjena je analiza molekularne varijanse (AMOVA) kako bi se odredio udeo variranja u mtDNK između individua i između populacija u ukupnom variranju. Za poredenje diferencijacije između parova populacija prema mtDNK haplotipovima korišćen je  $F_{ST}$  parametar modifikovan za haploidne podatke. Iako heterozigotnost ne postoji u slučaju haploidnih podataka, moguće je definisati  $F_{ST}$  vrednosti ukoliko se umesto heterozigotnosti računa haplotipski diverzitet, koji predstavlja vrednosti heterozigotnosti koja bi se dobila u slučaju da su učestalosti haplotipova učestalosti alela, a posmatrani lokus diploidan. AMOVA analiza i diferencijacija parova populacija je sprovedena u programu Arlequin, verzija 3.5.1.2 (Excoffier i Lischer 2010).

U slučaju velike duplikacije kod mtDNK haplotipa nađenog u populaciji S, umnožen je i sekvenciran nepoznati fragment između dva duplirana regiona (videti u rezultatima) kome pomoću restrikcione analize nije moglo da se odredimo poreklo. Prajmeri korišćeni za amplifikaciju, a potom i za sekvenciranje su bili:

1. Nd2-2: AAGCT ACTGG GTTCA TACC ( iz publikacije Gao i sar. (2007))
2. 12SBI<sub>inver</sub>: ACACA TCGCC CGTCG CTCTT (reverzni komplement 12SBI prajmera iz rada García-Martínez i sar. (1998))

## Testiranje neravnoteže vezanosti između hromozomskih aranžmana i mitohondrijalnih DNK haplotipova

U ovoj studiji analizirana je neravnoteža vezanosti između hromozomskih aranžmana i mtDNK haplotipova korišćenjem parametara  $D$  i  $D'$  (Lewontin 1964):

$$D_{ij} = p_{ij} - p_i p_j,$$

gde  $D_{ij}$  predstavlja vrednost neravnoteže vezanosti između  $i$ -tog aranžmana i  $j$ -tog haplotipa.  $p_{ij}$  je učestalost kombinacije „ $i$ -ti aranžman -  $j$ -ti haplotip“ u uzorku,  $p_i$  je učestalost  $i$ -tog aranžmana, a  $p_j$  učestalost  $j$ -tog haplotipa.

$$D' = D/D_{max}, \text{ gde je}$$

$$D_{max} = \min [(1 - p_i) p_j, p_i (1 - p_j)] \text{ ako je } D > 0$$

$$D_{max} = \max [-p_i p_j, - (1 - p_i) (1 - p_j)] \text{ ako je } D < 0$$

Tako  $D'$  vrednost predstavlja relativnu vrednost neravnoteže vezanosti prema maksimalnoj  $D$  vrednosti koja je moguća za uočene učestalosti  $i$ -tog hromozomskog aranžmana i  $j$ -tog haplotipa.

Statistička značajnost neravnoteže vezanosti određivana je Fišerovim testom nezavisnosti u tablicama kontigencije 2 X 2 (Sokal i Rohlf, 1995) korišćenjem programa DnaSP 5.10 (Librado i Rozas 2009). Da bi se uklonili lažno pozitivni rezultati kod velikog broja simultanih testova, upotrebljena je sekvencijalna Bonferroni korekcija (Rice 1989). U analizu su uključene samo kombinacije koje su imale vrednosti veće od 5 u svim ćelijama. Takođe, najređi aranžman svakog hromozoma je isključen iz testiranja kako bi se omogućila nezavisnost između testiranja za aranžmane u okviru pojedinačnih hromozoma. Analiziran je samo haplotip I, jer su rezultati za haplotip II isti kao i za haplotip I, samo suprotnog znaka.

Zbog manjeg broja ženki uhvaćenih u populaciji L, i već određenom kariotipu hromozomskih aranžmana kod 9 mužjaka, analizirana je i njihova mtDNA. Usled nemogućnosti dobijanja dovoljne količine mtDNK za digestiju sa pet enzima, PCR-om je umnožen fragment *ND5* gena prema protokolu García-Martínez i sar. (1998), a potom

je umnoženi fragment digestovan sa *HaeIII* restrikcijom da bi se utvrdilo da li pripada haplotipu I i haplotipovima proisteklim iz njega, ili haplotipu II i haplotipovima proisteklim iz njega. Stoga su u populaciji L retki haplotipovi određeni kod ženki i nepotpuno određeni haplotipovi kod mužjaka grupisani sa haplotipovima I ili II i tako analizirana neravnoteža vezanosti.

### **Isključivanje citoplazmatske inkompatibilnosti čiji je uzročnik *Wolbachia***

*Wolbachia* je gram negativna  $\alpha$ -proteobakterija. Procenjeno je da je preko 20% vrsta insekata zaraženo ovom bakterijom (Kozek i Rao 2007). Nasleđuje se infektivno preko citoplazme jajne ćelije, i u manjoj meri horizontalnim prenosom preko zajedničkih parazita ili istih trofičkih resursa. Efekti infekcije na domaćina su raznovrsni i kreću se od mutualizma do parazitizma. *Wolbachia* izaziva promene u reproduktivnoj biologiji domaćina (Stouthamer i sar. 1999): partenogenezu, feminizaciju i/ili smrt mužjaka i citoplazmatsku inkompatibilnost (CI). CI predstavlja smanjenu fertilitet ženki u ukrštanjima između inficiranog mužjaka i neinficirane ženke (Harumi Yen i Ralph Barr 1971). Usled zajedničkog (citoplazmatskog) načina prenošenja na potomstvo, očekuje se povećanje učestalosti mtDNK haplotipova inficiranih ženki. Literaturni podaci ukazuju da je kod nekih vrsta *Drosophila* infekcija ovom  $\alpha$ -proteobakterijom u značajnoj meri oblikovala varijabilnost mtDNK (Dean i sar. 2003; Nunes i sar. 2008).

U ovoj studiji prisustvo *Wolbachia* je testirano PCR metodom prajmerima specifičnim za 16S rDNK gen (O'Neill i sar. 1992). Ovi prajmeri umnožavaju fragment dužine 869 bp. Kao pozitivne kontrole korišćene su dve IF linije, za koje je potvrđen infektivni status: 1) *Drosophila melanogaster* stock. br. 5 (Bloomington Stock Center, SAD) i 2) *Drosophila simulans* „Riverside strain“ (ustupljena od prof. dr Kostas Bourtzis, Univerzitet u Janjini, Grčka). Genomska DNK je izolovana istom metodom kao i mtDNK, ali nije primenjen drugi tretman alkalne lize. Kao pozitivna kontrola kvaliteta DNK izolacije korišćeni su prajmeri prema García-Martínez i sar. (1998), specifični za dva genomska regiona: 1) V4-18S rDNA (fragment dugačak 427bp V4

varijabilnog regiona 18S rDNA) i 2) i *ND5* gen mtDNK (fragment subjedinice 5 NADH dehidrogenaze dugačak 984bp). PCR amplifikacija je uključivala: inicijalnu denaturaciju u trajanju od pet minuta na 94°C i 30 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od jednog minuta, anilinga prajmera na 55°C u trajanju od jednog minuta i ekstenzije na 72°C u trajanju od dva minuta.

Sekvence prajmera korišćene u testiranju su navedene od 5' do 3' kraja:

1. 16S rDNKup TTGTA GCCTG CTATG GTATA ACT
2. 16S rDNKdown GAATA GGTAT GATTT TCATG T
3. 18SV4up ACCTG CAGCA GCCGC GGTAATTC CA GC
4. 18SV4down GCTCT AGACG TACTT GGCAA ATGCT TTCGC
5. ND5up TGACC AGCTA GCTAT TCTGA TC
6. ND5down GCTAT AGCTA GCCCC TACAC

Utvrđen je infekcioni status svih populacija analizom jedinki F1 generacije poreklom iz IF linija.

## Rezultati

## Varijabilnost inverzionog polimorfizma u populacijama iz klisura i kanjona

U cilju utvrđivanja genetičke strukture populacija *D. subobscura* iz staništa sa približnim karakteristikama, izvršena je analiza inverzionog polimorfizma. Učestalost genskih aranžmana u tri analizirane populacije date su u Tabeli IP-1. Pored učestalosti genskih aranžmana u populacijama T, S i L u Tabeli IP-1 su prikazane i ranije utvrđene učestalosti u ostale četiri populacije (Jelić i sar. 2009; Kenig i sar. 2010).

Analizom inverzionog polimorfizma jedinki sa lokaliteta T, utvrđeno je prisustvo 19 strukturnih tipova hromozomskih aranžmana i 17 inverzija, dok je u populacijama S i L zabeleženo po 20 strukturnih tipova i 18 inverzija.

U slučaju hromozoma A prisutna su tri strukturna tipa:  $A_{ST}$ ,  $A_1$  i  $A_2$ . U sve tri analizirane populacije najveću učestalost pokazuje  $A_{ST}$  strukturni tip, dok najnižu učestalost pokazuje  $A_2$ . U populacijama T i L hromozom J se javlja u dva strukturna tipa:  $J_{ST}$  i  $J_1$ , dok je u populaciji S zabeležen i strukturni tip  $J_{3+4}$  niske učestalosti. Kod sve tri populacije  $J_1$  je više od dvostruko učestaliji od  $J_{ST}$ . Uočeno je prisustvo po četiri strukturna tipa hromozoma U. Sve tri populacije poseduju strukturne tipove:  $U_{ST}$ ,  $U_{1+2}$  i  $U_{1+2+6}$ , pri čemu je najučestaliji  $U_{1+2}$ , dok je najmanje učestao aranžman  $U_{ST}$ . Takođe su prisutni i strukturni tip  $U_{1+2+8}$  u populaciji T, zatim strukturni tip  $U_1$  u populaciji S, kao i  $U_{1+2+7}$  u populaciji L. Posmatranjem hromozoma E uočavaju se četiri hromozomska aranžmana:  $E_{ST}$ ,  $E_8$ ,  $E_{1+2}$  i  $E_{1+2+9}$ . U populaciji T najučestaliji su strukturni tipovi  $E_{1+2+9}$  i  $E_{ST}$ , u populaciji S aranžmani  $E_8$  i  $E_{1+2+9}$ , dok u populaciji L najveću učestalost pokazuju aranžmani  $E_{1+2+9}$  i  $E_8$ . Strukturni tip  $E_{1+2}$  je najređi u sve tri populacije. U slučaju hromozoma O zabeleženo je prisustvo šest strukturnih tipova u populacijama T ( $O_{ST}$ ,  $O_6$ ,  $O_{3+4}$ ,  $O_{3+4+1}$ ,  $O_{3+4+2}$  i  $O_{3+4+22}$ ) i S ( $O_{ST}$ ,  $O_{3+4}$ ,  $O_{3+4+1}$ ,  $O_{3+4+2}$ ,  $O_{3+4+7}$  i  $O_{3+4+22}$ ), dok je u populaciji L prisutno sedam strukturnih tipova ( $O_{ST}$ ,  $O_6$ ,  $O_{3+4}$ ,  $O_{3+4+1}$ ,  $O_{3+4+2}$ ,  $O_{3+4+7}$  i  $O_{3+4+22}$ ). U sve tri populacije najučestaliji je hromozomski aranžman  $O_{3+4}$ . Pored njega, u nižim i približno jednakim učestalostima prisutni su i aranžmani  $O_{3+4+1}$ , i  $O_{ST}$ . U populaciji S strukturni tip  $O_{3+4+22}$  pokazuje sličnu učestalost kao i  $O_{3+4+1}$  i  $O_{ST}$ , dok je u populacijama T i L njegova učestalost slična ređem  $O_{3+4+2}$ . Od ređih hromozomskih varijanti prisutni su i  $O_{3+4+7}$  u populacijama S i L, pri čemu je njegova učestalost viša u populaciji L, dok je u populacijama T i L prisutan i strukturni tip  $O_6$ .



U sve tri populacije zabeležene su slične vrednosti heterozigotnosti (H) kao i indeksa slobodne rekombinacije (IFR) (Tabela IP-1). Takođe, uočene vrednosti heterozigotnosti su nešto više u odnosu na populacije B, H i DP, i niže u odnosu na populaciju BB. Indeks slobodne rekombinacije takođe pokazuje slične vrednosti, kako sa populacijama B, H, BB i DP, tako i sa drugim populacijama centralnog dela Balkanskog poluostrva (Anđelković i sar. 2003; Stamenković-Radak i sar. 2008; Kalajdžić i sar. 2006; Živanović i sar. 2002; Živanović 2007).

Rezultati neparametarskog G testa za međupopulacione razlike u učestalosti genskih aranžmana po pojedinačnim hromozomima, ali i za sve hromozome su predstavljeni u Tabeli IP-2.

Odstupanja od homogenosti distribucije hromozomskih aranžmana zabeležena su između svih populacija za hromozome U ( $G=63,548$ ;  $df=30$ ;  $p<0,05$ ), E ( $G=100,643$ ;  $df=24$ ;  $p<0,001$ ), O ( $G=131,829$ ;  $df=36$ ;  $p<0,001$ ), kao i za sve hromozome ukupno ( $G=333,978$ ;  $df=138$ ;  $p<0,001$ ).

Populacija B se karakteriše značajnim razlikama u distribuciji učestalosti hromozomskih aranžmana u odnosu na populacije BB ( $p<0,001$ ), DP ( $p<0,001$ ), T ( $p<0,05$ ), S ( $p<0,001$ ) i L ( $p<0,001$ ). U slučaju populacije H, zabeležene su značajne razlike u odnosu na populacije BB ( $p<0,001$ ), DP ( $p<0,001$ ), T ( $p<0,05$ ) i S ( $p<0,001$ ). Poređenjem distribucije učestalosti hromozomskih aranžmana populacije BB sa ostalim populacijama, uočavaju se značajne razlike u odnosu na populacije B ( $p<0,001$ ), H ( $p<0,001$ ), T ( $p<0,001$ ), S ( $p<0,001$ ) i L ( $p<0,001$ ). Populacija DP se značajno razlikuje od populacija B ( $p<0,001$ ), H ( $p<0,001$ ), T ( $p<0,001$ ), S ( $p<0,001$ ) i L ( $p<0,001$ ). Populacija T se karakteriše značajnim razlikama u distribuciji učestalosti hromozomskih aranžmana u odnosu na populacije B ( $p<0,05$ ), H ( $p<0,05$ ), BB ( $p<0,001$ ), DP ( $p<0,001$ ), S ( $p<0,001$ ) i L ( $p<0,01$ ). U slučaju populacije S, zabeležene su značajne razlike u odnosu na populacije B ( $p<0,001$ ), H ( $p<0,001$ ), BB ( $p<0,001$ ), DP ( $p<0,001$ ) i T ( $p<0,001$ ). Na kraju, populacija L se po distribuciji učestalosti hromozomskih aranžmana značajno razlikuje od populacija B ( $p<0,01$ ), BB ( $p<0,001$ ), DP ( $p<0,001$ ) i T ( $p<0,01$ ).

Na uočeni obrazac razlika između parova populacija najviše su uticale razlike u distribuciji genskih aranžmana na hromozomima E i O, dok je u slučaju hromozoma U i J zabeležen manji broj značajnih razlika u poređenjima između populacija. Genski aranžmani na hromozomu A pokazuju homogenu distribuciju između populacija. Ni u jednom poređenju nisu zabeležene razlike po ovom hromozomu.

Razlike u učestalosti pojedinačnih strukturnih tipova između parova populacija, čija je statistička značajnost utvrđivana Z-testom, prikazane su u Tabeli IP-3. U slučaju hromozoma U na razlike između populacija najviše je uticala učestalost aranžmana  $U_{1+2+6}$ , dok su razlike u učestalosti aranžmana  $E_8$  i  $E_{1+2+9}$  najviše uticale na diferencijaciju populacija po hromozomu E. U slučaju ostalih hromozoma ne može se uočiti koji od aranžmana znatnih učestalosti više utiče na odgovarajuće razlike između populacija.

Tabela IP-1 Učestalost (%) genskih aranžmana u prirodnim populacijama

hromozomski aranžman	populacije						
	B (n=30)	H (n=30)	BB (n=31)	DP (n=33)	T (n=88)	S (n=85)	L (n=47)
A <sub>ST</sub>	43,33	70,00	51,61	54,55	59,09	57,65	48,94
A <sub>1</sub>	50,00	23,33	41,94	45,45	30,68	32,94	40,43
A <sub>2</sub>	6,67	6,67	6,45	0,00	10,23	9,41	10,64
J <sub>ST</sub>	18,33	20,00	41,94	24,24	32,39	23,81	18,09
J <sub>1</sub>	81,67	80,00	58,06	75,76	67,61	75,00	81,91
J <sub>3+4</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,19	0,00
U <sub>ST</sub>	3,33	11,67	14,52	12,12	10,80	1,19	4,26
U <sub>1</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	0,00
U <sub>1+2</sub>	66,67	43,33	67,74	71,21	56,25	63,10	56,38
U <sub>1+2+6</sub>	30,00	45,00	17,74	16,67	32,39	35,12	36,17
U <sub>1+2+7</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	3,19
U <sub>1+2+8</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,57	0,00	0,00
E <sub>ST</sub>	35,00	16,67	35,48	28,79	39,77	26,79	15,96
E <sub>8</sub>	16,67	31,67	37,10	53,03	15,34	38,10	25,53
E <sub>1+2</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	3,41	4,76	7,45
E <sub>1+2+9</sub>	48,33	51,67	25,81	18,18	41,48	30,36	51,06
E <sub>1+2+9+12</sub>	0,00	0,00	1,61	0,00	0,00	0,00	0,00
O <sub>ST</sub>	10,00	15,00	46,77	36,36	18,75	11,90	17,02
O <sub>6</sub>	0,00	1,67	0,00	0,00	0,57	0,00	1,06
O <sub>3+4</sub>	43,33	50,00	40,32	37,88	53,98	61,90	55,32
O <sub>3+4+1</sub>	40,00	26,67	11,29	19,70	14,77	11,31	12,77
O <sub>3+4+2</sub>	6,67	6,67	1,61	6,06	5,68	1,19	3,19
O <sub>3+4+7</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,60	3,19
O <sub>3+4+22</sub>	0,00	0,00	0,00	0,00	6,25	13,10	7,45
H	46,67	51,67	58,87	48,40	53,19	53,27	53,19
IFR	85,13	83,13	81,58	85,11	83,25	83,65	82,65

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L), broj analiziranih mužjaka (n), heterozigotnost (H), indeks slobodne rekombinacije (IFR).

Tabela IP-2 Odstupanje od homogenosti distribucije genskih aranžmana između populacija.

pop.	B				H				BB				DP				T				S				
	h	G	df	p	h	G	df	p	h	G	df	p	h	G	df	p	h	G	df	p	h	G	df	p	
H	A	4,877	2		H																				
	J	0,054	1																						
	U	7,747	2																						
	E	6,896	2																						
	O	3,887	4																						
	uk,	23,460	15																						
BB	A	0,437	2		A	2,489	2		BB																
	J	8,223	1	*	J	6,969	1	*																	
	U	6,541	2		U	10,970	2	*																	
	E	10,449	3	*	E	11,219	3	*																	
	O	28,222	3	***	O	18,430	4	**																	
	uk,	53,872	15	***	uk,	50,076	16	***																	
DP	A	3,440	2		A	5,838	2		A	2,971	2		DP												
	J	0,656	1		J	0,328	1		J	4,568	1														
	U	5,839	2		U	12,860	2	**	U	0,215	2														
	E	21,790	2	***	E	16,059	2	**	E	4,555	3														
	O	14,619	3	**	O	8,941	4		O	4,103	3														
	uk,	46,343	14	***	uk,	44,026	15	***	uk,	16,412	15														
T	A	3,568	2		A	1,185	2		A	1,434	2		A	7,246	2		T								
	J	4,583	1		J	3,493	1		J	1,810	1		J	1,553	1										
	U	4,887	3		U	3,989	3		U	5,917	3		U	7,129	3										
	E	4,314	3		E	18,224	3	**	E	18,970	4	**	E	37,181	3	***									
	O	22,200	5	**	O	10,838	5		O	23,708	5	**	O	16,792	5	*									
	uk,	39,552	18	*	uk,	37,728	18	*	uk,	51,840	19	***	uk,	69,900	18	***									
S	A	2,708	2		A	1,455	2		A	0,897	2		A	6,266	2		A	0,114	2		S				
	J	2,093	2		J	1,654	2		J	7,972	2		J	1,333	2		J	5,781	2						
	U	2,066	3		U	15,261	3		U	20,221	3	***	U	18,759	3	**	U	18,764	4	**					
	E	16,856	3	**	E	12,603	3	*	E	9,119	4		E	10,582	3	*	E	24,992	3	***					
	O	37,947	5	***	O	28,468	6	***	O	40,871	5	***	O	40,049	5	***	O	16,868	6	*					
	uk,	61,672	19	***	uk,	59,443	20	***	uk,	79,082	20	***	uk,	76,991	19	***	uk,	66,524	21	***					
L	A	0,830	2		A	3,389	2		A	0,418	2		A	5,552	2		A	1,418	2		A	0,941	2		
	J	0,002	1		J	0,087	1		J	10,508	1	**	J	0,889	1		J	6,590	1	*	J	3,080	2		
	U	4,097	3		U	7,640	3		U	13,128	3	**	U	13,283	3	*	U	10,893	4		U	9,850	4		
	E	13,817	3	*	E	7,412	3		E	22,577	4	**	E	30,443	3	***	E	18,770	3	**	E	13,533	3	*	
	O	25,453	6	**	O	14,973	6		O	24,498	6	**	O	21,790	6	**	O	7,798	6		O	9,303	6		
	uk,	44,198	19	**	uk,	33,501	19		uk,	71,128	20	***	uk,	71,956	19	***	uk,	45,469	20	**	uk,	36,712	21		

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L), hromozom (h), vrednost G testa (G), br. stepeni slobode (df), vrednosti za sve hromozome (uk.). Statistička značajnost je predstavljena sa \* za p<0,05, \*\* za p<0,01 i \*\*\* za p<0,001.

Tabela IP-3 Razlike u učestalosti genskih aranžmana između prirodnih populacija. Prikazane su Z vrednosti.

hromozomski aranžman	B/H	B/BB	B/DP	B/T	B/S	B/L	H/BB	H/DP	H/T	H/S	H/L
A <sub>ST</sub>	-2,95 *										
A <sub>1</sub>	3,03 *			3,10 *							
A <sub>2</sub>											
J <sub>ST</sub>		-4,01 **		-3,37 *			-3,70 **		-2,96 *		
J <sub>1</sub>		4,01 **		3,37 *			3,70 **		2,96 *		
J <sub>3+4</sub>											
U <sub>ST</sub>		-3,05 *								5,74 ***	
U <sub>1</sub>											
U <sub>1+2</sub>	3,63 **						-3,84 **	-4,48 ***		-4,27 ***	
U <sub>1+2+6</sub>							4,60 ***	4,90 ***			
U <sub>1+2+7</sub>											
U <sub>1+2+8</sub>											
E <sub>ST</sub>	3,24 *					3,95 *	-3,34 **		-5,30 ***		
E <sub>8</sub>		-3,59 **	-6,02 ***		-4,89 ***				4,48 ***		
E <sub>1+2</sub>						-3,14 *					-3,14 *
E <sub>1+2+9</sub>		3,65 **	5,11 ***		4,02 **		4,15 ***	5,61 ***		4,74 ***	
E <sub>1+2+9+12</sub>											
O <sub>ST</sub>		-6,35 ***	-4,91 ***				-5,36 ***	-3,86 **			
O <sub>6</sub>											
O <sub>3+4</sub>					-4,01 **				-0,87 *		
O <sub>3+4+1</sub>		5,15 ***	3,54 **	6,71 ***	7,83 ***	5,65 ***	3,07 *			4,55 ***	3,16 *
O <sub>3+4+2</sub>					3,65 **					3,65 **	
O <sub>3+4+7</sub>											
O <sub>3+4+22</sub>				-3,22 *	-4,74 ***	-3,14 *			-3,22 *	-4,74 ***	-3,14 *

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L). Statistička značajnost je predstavljena sa \* za p<0,05, \*\* za p<0,01 i \*\*\* za p<0,001

Tabela IP-3 nastavak

hromozomski aranžman	BB/DP	BB/T	BB/S	BB/L	DP/T	DP/S	DP/L	T/S	T/L	S/L					
A <sub>ST</sub>															
A <sub>1</sub>															
A <sub>2</sub>					-3,03	*									
J <sub>ST</sub>	3,01	*	4,30	***	4,71	***			3,73	**					
J <sub>1</sub>	-3,01	*	-3,98	**	-4,71	***			-3,73	**					
J <sub>3+4</sub>															
U <sub>ST</sub>			6,70	***	3,28	*	5,85	***	5,26	***					
U <sub>1</sub>															
U <sub>1+2</sub>					3,36	*									
U <sub>1+2+6</sub>		-3,54	**	-4,05	**	-3,59	**	-3,85	**	-4,36	***	-3,88	**		
U <sub>1+2+7</sub>									-3,54	**	-3,43	*			
U <sub>1+2+8</sub>															
E <sub>ST</sub>				4,05	**				3,61	**	5,96	***			
E <sub>8</sub>		5,83	***			9,50	***	3,27	***	5,10	***	-3,03	*	3,04	*
E <sub>1+2</sub>				-3,18	*					-3,26	*				
E <sub>1+2+9</sub>		-3,53	**	-4,53	***	-5,37	***	-2,97	*	-6,08	***	3,04	*	-4,89	***
E <sub>1+2+9+12</sub>															
O <sub>ST</sub>		6,97	***	9,13	***	5,80	***	4,57	***	6,77	***	4,00	**		
O <sub>6</sub>															
O <sub>3+4</sub>		-2,98	*	-4,66	***			-3,54	**	-5,23	***	-3,12	*		
O <sub>3+4+1</sub>															
O <sub>3+4+2</sub>								3,33	*			3,21	*		
O <sub>3+4+7</sub>												-3,54	**		
O <sub>3+4+22</sub>		-3,25	*	-4,77	***	-3,18	*	-3,30	*	-4,85	***	-3,26	*	-3,05	*

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Goč ukupno (G), Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L). Statistička značajnost je predstavljena sa \* za p<0,05, \*\* za p<0,01 i \*\*\* za p<0,001

## Mikrosatelitska varijabilnost prirodnih populacija

U cilju utvrđivanja genetičke strukture populacija *D. subobscura* Balkanskog poluostrva, a posebno iz staništa sa pribežišnim karakteristikama, izvršena je analiza varijabilosti 11 mikrosatelitskih lokusa.

Tabela MS-1 prikazuje broj alela (*bogatstvo u alelima*) po lokusima i po populacijama. Zabeležene su prosečne vrednosti u opsegu od 12,18 do 16,36. Najviša vrednost je zabeležena u populaciji DP, dok je najniža zabeležena u populaciji T. Zabeležene su značajne razlike između populacija B i H ( $Z = -2,327$ ;  $p = 0,017$ ); između populacija B i T ( $Z = -2,709$ ;  $p = 0,004$ ); između populacija H i BB ( $Z = -2,054$ ;  $p = 0,035$ ); između H i DP ( $Z = -2,184$ ;  $p = 0,026$ ); između H i L ( $Z = -2,319$ ;  $p = 0,017$ ); između populacija BB i T ( $Z = -2,352$ ;  $p = 0,015$ ); između DP i T ( $Z = -2,68$ ;  $p = 0,005$ ) i između populacija T i L ( $Z = -2,707$ ;  $p = 0,005$ ).

U Tabeli MS-2 bogatstvo u alelima je korigovano za veličinu uzorka. Najviša vrednost je zabeležena u populaciji B (13,28), dok je najniža zabeležena u populaciji H (10,44). Ukoliko se bogatstvo u alelima koriguje za veličinu uzorka, značajne razlike se uočavaju samo u poređenjima između populacija B i H ( $Z = -3,152$ ;  $p < 0,001$ ) i između populacija H i BB ( $Z = -2,233$ ;  $p = 0,023$ ).

Tabela MS-3 prikazuje veličinu opsega alelskog variranja. Najviša vrednost zabeležena je u slučaju populacije BB (25,55), a najniža u slučaju populacije H (17,00). Značajne razlike u opsegu alelskog variranja su zabeležene između populacija B i H ( $Z = -2,079$ ;  $p = 0,034$ ); između populacija B i S ( $Z = 2,48$ ;  $p = 0,011$ ); između H i BB ( $Z = -2,072$ ;  $p = 0,034$ ); između H i DP ( $Z = -2,105$ ;  $p = 0,032$ ), kao i između DP i S ( $Z = -2,076$ ;  $p = 0,034$ ).

U Tabeli MS-4 prikazana je varijansa u broju ponovaka. Vrednosti su se kretale od 10,34 u populaciji H, do 20,70 u populaciji B. Značajne razlike uočene su u poređenjima između populacija B i H ( $Z = -2,627$ ;  $p = 0,006$ ) i između populacija H i BB ( $Z = -2,43$ ;  $p = 0,013$ ).

Vrednosti uočene i očekivane heterozigotnosti su date u Tabeli MS-5. Najviša uočena heterozigotnost je zabeležena u populaciji BB (0,819), dok je najniža zabeležena u populaciji S (0,724). Najviša očekivana heterozigotnost zabeležena je u populaciji B (0,881), dok je ona najniža u populaciji H (0,831). Poređenjem parova populacija po očekivanoj heterozigotnosti, zabeležene su značajne razlike između populacija B i H ( $Z=-2,101$ ;  $p=0,034$ ), kao i između populacija H i BB ( $Z=-2,201$ ;  $p=0,033$ ). Nisu zabeležene značajne razlike u uočenim heterozigotnostima ni u jednom poređenju.

Rezultati odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže, testirani u prirodnim populacijama, dati su u Tabeli MS-6. Lokus *dsub05* pokazuje odstupanje od ravnoteže u slučaju populacija B ( $p<0,001$ ), H ( $p<0,05$ ), BB ( $p<0,01$ ) i L ( $p<0,05$ ). U slučaju lokusa *dsub04* zabeleženo je odstupanje samo u slučaju populacije S ( $p<0,001$ ). Lokus *dsub18* pokazuje odstupanje u populacijama B ( $p<0,05$ ) i T ( $p<0,05$ ). Na lokusu *dsub27* uočeno je odstupanje u slučaju populacija H ( $p<0,01$ ) i T ( $p<0,05$ ). U populaciji S je zabeleženo odstupanje od ravnoteže za lokus *dsub01* ( $p<0,05$ ), dok je u populaciji H zabeleženo odstupanje za lokus *dsub03* ( $p<0,01$ ). Lokus *dsub19* pokazuje odstupanje u populacijama H ( $p<0,05$ ), BB ( $p<0,001$ ) i DP ( $p<0,05$ ), dok je na lokusu *dsub02* zabeleženo odstupanje u populacijama T ( $p<0,05$ ) i S ( $p<0,01$ ). Lokus *dsub15* pokazuje odstupanje od ravnoteže samo u populaciji B ( $p<0,01$ ). Na kraju, zabeleženo je odstupanje od ravnoteže za lokus *dsub20* za sve populacije: B ( $p<0,05$ ), H ( $p<0,001$ ), BB ( $p<0,05$ ), DP ( $p<0,001$ ), T ( $p<0,001$ ), S ( $p<0,001$ ) i L ( $p<0,001$ ).

Rezultati AMOVA su prikazani u Tabeli MS-7. Od ukupnog genetičkog variranja na mikrosatelitskim lokusima najveći deo (96,81%) potiče od unutarindividualnog variranja ( $F_{IT}=0,0319$ ;  $p=0,0009$ ). 2,54% variranja uzrokovano je variranjem individua u okviru populacija ( $F_{IS}=0,0256$ ;  $p=0,0039$ ), dok samo 0,65% potiče od variranja između populacija ( $F_{ST}=0,0065$ ;  $p=0,2004$ ).

Ukoliko se posmatra sveukupna diferencijacija po mikrosatelitskim lokusima, zabeleženo je odsustvo diferencijacije po  $F_{ST}$  indeksu ( $F_{ST}=0,0065$ ;  $p=0,2004$ ). U slučaju  $Rho_{ST}$  indeksa, zabeležena je veoma niska vrednost koja je značajno različita od nule ( $Rho_{ST}=0,0163$ ;  $p < 0,001$ ).



Rezultati diferencijacije pojedinačnih populacija po  $F_{ST}$  i  $Rho_{ST}$  indeksima su dati u Tabeli MS-8. Oba parametra su dala veoma slične obrasce diferencijacije. Između nekih parova populacija zabeležene su značajna odstupanja indeksa od nule, međutim zabeležene vrednosti su male i praktično ukazuju na odsustvo genetičke diferencijacije između parova populacija. Populacija B pokazuje značajno odstupanje od nule u odnosu na većinu populacija, sa izuzetkom populacije H po  $F_{ST}$  indeksu. U slučaju populacije H značajna odstupanja od nule su zabeležena u poređenjima sa populacijama B, BB i S, ali samo po  $Rho_{ST}$  indeksu. Populacija BB se značajno razlikuje od svih populacija, sem od populacije H po  $F_{ST}$  indeksu. Populacija DP pokazuje  $F_{ST}$  indeks koji se značajno razlikuje od nule u poređenju sa populacijama B i S, odnosno  $Rho_{ST}$  samo u poređenju sa populacijom B. Populacija T pokazuje značajno odstupanje od nule za oba indeksa u poređenju sa populacijama B i BB. Populacija S je diferencirana u odnosu na većinu populacija, sem u odnosu na druge dve populacije iz klisura i kanjona (T i L). U odnosu na populacije B i BB se diferencira po oba parametra, a takođe po  $F_{ST}$  u odnosu na populaciju DP i po  $Rho_{ST}$  u odnosu na populaciju H. U slučaju populacije L, značajna odstupanja od nule kako  $F_{ST}$ , tako i  $Rho_{ST}$  indeksa zabeležena su u poređenjima sa populacijama B i BB.

Tri populacije izlovljene u klisurama i kanjonima (T, S i L) pokazuju slične obrasce diferencijacije u odnosu na ostale populacije, dok između njih nije zabeleženo odstupanje indeksa diferencijacije od nule.

Rezultati Wilcoxon *signed-rank* testa pokazuju odsustvo skorašnjeg smanjenja veličine populacija (p vrednost za prekomernu učestalost heterozigota ni u jednoj od populacija nije imala vrednost manju od 0,1).

Primenom programa LOSITAN nije identifikovan ni jedan vanmarginalni lokus. Ovakav rezultat ukazuje na selektivnu neutralnost analiziranih mikrosatelitskih lokusa (Tabela MS-9). Na grafičkom prikazu rezultata na Slici MS-1 može se uočiti da su svi markeri pozicionirani u sivom, selektivno neutralnom regionu. Pozicija lokusa ispod sivog regiona ukazivala bi na delovanje balansne selekcije, dok bi pozicija iznad selektivno neutralnog regiona ukazivala na delovanje direkcione selekcije.

Tabela MS-1 Bogatstvo u alelima po mikrosatelitskim lokusima

lokusi	populacije							prosek	S.D.
	<b>B</b>	<b>H</b>	<b>BB</b>	<b>DP</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>L</b>		
<i>dsub05</i>	15	13	16	20	14	16	17	15,86	2,27
<i>dsub04</i>	17	16	20	19	17	20	21	18,57	1,90
<i>dsub18</i>	17	13	16	16	13	16	16	15,29	1,60
<i>dsub27</i>	20	17	19	19	12	16	16	17,00	2,71
<i>dsub20</i>	17	15	21	23	16	14	18	17,71	3,25
<i>dsub01</i>	15	13	13	12	11	14	14	13,14	1,35
<i>dsub03</i>	13	11	10	14	9	10	13	11,43	1,90
<i>dsub13</i>	15	13	10	14	10	12	15	12,71	2,14
<i>dsub19</i>	11	9	17	17	10	12	14	12,86	3,24
<i>dsub02</i>	18	12	19	12	10	11	12	13,43	3,55
<i>dsub15</i>	16	12	17	14	12	11	18	14,29	2,75
<b>prosek</b>	<b>15,82</b>	<b>13,09</b>	<b>16,18</b>	<b>16,36</b>	<b>12,18</b>	<b>13,82</b>	<b>15,82</b>	<b>14,75</b>	<b>1,69</b>
S.D.	2,44	2,26	3,76	3,56	2,60	2,99	2,60	2,89	0,58

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L), standardna devijacija (S.D.).

Tabela MS-2 Bogatstvo u alelima po mikrosatelitiskim lokusima korigovano veličinom uzorka, bazirano je na minimalnom uzorku od 21 diploidne individue.

lokusi	populacije							Sve populacije
	B	H	BB	DP	T	S	L	
<i>dsub05</i>	15,00	11,80	13,75	14,91	13,19	15,05	13,09	14,62
<i>dsub04</i>	14,02	11,30	14,68	13,86	14,41	15,77	15,73	14,93
<i>dsub18</i>	13,63	10,08	11,76	11,52	13,39	13,25	12,49	12,50
<i>dsub27</i>	16,07	12,39	13,28	13,91	11,74	12,91	12,33	13,60
<i>dsub20</i>	14,22	11,10	14,97	16,00	15,27	11,12	13,49	14,54
<i>dsub01</i>	11,71	10,63	10,71	9,64	9,73	11,61	11,25	10,80
<i>dsub03</i>	10,14	9,22	9,01	10,09	8,21	7,98	8,42	9,38
<i>dsub13</i>	12,48	8,65	8,67	8,81	9,79	8,83	8,57	10,02
<i>dsub19</i>	11,00	8,88	14,88	11,82	9,75	11,73	12,42	12,33
<i>dsub02</i>	14,44	9,91	14,42	8,94	9,67	9,43	9,83	11,59
<i>dsub15</i>	13,34	10,91	13,26	11,33	11,46	10,45	13,04	12,09
<b>prosek</b>	<b>13,28</b>	<b>10,44</b>	<b>12,67</b>	<b>11,89</b>	<b>11,51</b>	<b>11,65</b>	<b>11,88</b>	<b>12,40</b>
S.D.	1,78	1,21	2,31	2,47	2,29	2,47	2,20	1,88

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L), standardna devijacija (S.D.).

Tabela MS-3 Veličina opsega alelskog variranja mikrosatelitskih lokusa

lokusi	populacije						prosek	S.D.	
	<b>B</b>	<b>H</b>	<b>BB</b>	<b>DP</b>	<b>T</b>	<b>S</b>			<b>L</b>
<i>dsub05</i>	29	13	17	25	23	18	31	22,29	6,60
<i>dsub04</i>	22	31	35	28	30	23	25	27,71	4,68
<i>dsub18</i>	22	12	58	25	15	15	17	23,43	15,88
<i>dsub27</i>	27	23	25	24	22	21	26	24,00	2,16
<i>dsub20</i>	23	23	24	27	29	18	21	23,57	3,65
<i>dsub01</i>	16	13	21	12	10	15	23	15,71	4,75
<i>dsub03</i>	23	12	10	16	9	16	16	14,57	4,76
<i>dsub13</i>	22	20	14	32	21	27	32	24,00	6,66
<i>dsub19</i>	18	8	25	26	11	16	16	17,14	6,64
<i>dsub02</i>	27	14	24	21	12	12	12	17,43	6,43
<i>dsub15</i>	21	18	28	17	16	15	24	19,86	4,74
<b>prosek</b>	<b>22,73</b>	<b>17,00</b>	<b>25,55</b>	<b>23,00</b>	<b>18,00</b>	<b>17,82</b>	<b>22,09</b>	<b>20,88</b>	<b>3,26</b>
S.D.	3,85	6,71	12,74	5,92	7,47	4,31	6,40	6,77	2,93

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L), standardna devijacija (S.D.).

Table MS-4 Varijansa u broju ponovaka mikrosatelitskih lokusa

lokusi	populacije							prosek	S.D.
	B	H	BB	DP	T	S	L		
<i>dsub05</i>	31,40	8,91	18,02	20,18	22,77	17,12	22,75	20,16	6,83
<i>dsub04</i>	18,13	15,53	29,05	21,22	20,11	25,30	24,22	21,94	4,59
<i>dsub18</i>	12,99	5,09	36,16	11,35	10,63	10,66	9,25	13,73	10,19
<i>dsub27</i>	35,28	12,01	27,44	15,55	10,46	12,64	10,30	17,67	9,78
<i>dsub20</i>	29,33	11,02	19,07	27,08	35,01	10,84	16,39	21,25	9,40
<i>dsub01</i>	9,61	9,12	9,18	6,76	6,95	10,31	10,76	8,96	1,55
<i>dsub03</i>	13,28	4,19	4,83	5,58	2,23	3,71	4,26	5,44	3,61
<i>dsub13</i>	19,89	21,72	9,60	36,08	21,98	32,80	33,59	25,09	9,49
<i>dsub19</i>	8,94	5,16	18,16	12,40	6,61	14,85	10,71	10,98	4,58
<i>dsub02</i>	32,83	6,89	22,15	6,11	7,97	7,18	6,02	12,73	10,56
<i>dsub15</i>	16,03	14,07	22,27	14,51	14,52	14,58	16,51	16,07	2,88
<b>prosek</b>	<b>20,70</b>	<b>10,34</b>	<b>19,63</b>	<b>16,08</b>	<b>14,47</b>	<b>14,55</b>	<b>14,98</b>	<b>15,82</b>	<b>3,48</b>
S.D.	9,77	5,30	9,33	9,48	9,59	8,23	8,85	8,65	1,57

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L), standardna devijacija (S.D.).

Tabela MS-5 Uočene i očekivane heterozigotnosti mikrosatelitskih lokusa

populacije	B		H		BB		DP			
	uoč.	oč.	uoč.	oč.	uoč.	oč.	uoč.	oč.		
lokusi										
<i>dsub05</i>	0,857	0,925	0,759	0,902	0,706	0,910	0,893	0,917		
<i>dsub04</i>	0,789	0,901	0,771	0,828	0,936	0,885	0,836	0,886		
<i>dsub18</i>	0,868	0,878	0,787	0,836	0,872	0,888	0,821	0,859		
<i>dsub27</i>	0,895	0,913	0,673	0,867	0,766	0,859	0,818	0,893		
<i>dsub20</i>	0,579	0,841	0,326	0,784	0,787	0,911	0,529	0,896		
<i>dsub01</i>	0,763	0,881	0,891	0,886	0,872	0,865	0,891	0,876		
<i>dsub03</i>	0,868	0,821	0,955	0,829	0,872	0,854	0,839	0,818		
<i>dsub13</i>	0,947	0,835	0,622	0,635	0,809	0,730	0,593	0,632		
<i>dsub19</i>	0,714	0,887	0,750	0,873	0,618	0,897	0,778	0,890		
<i>dsub02</i>	0,763	0,920	0,884	0,858	0,851	0,917	0,759	0,829		
<i>dsub15</i>	0,763	0,889	0,818	0,838	0,915	0,891	0,839	0,879		
<b>prosek</b>	<b>0,801</b>	<b>0,881</b>	<b>0,749</b>	<b>0,831</b>	<b>0,819</b>	<b>0,873</b>	<b>0,782</b>	<b>0,852</b>		
S.D.	0,102	0,035	0,170	0,073	0,095	0,052	0,117	0,079		

populacije	T		S		L		prosek		S.D.	
	uoč.	oč.	uoč.	oč.	uoč.	oč.	uoč.	oč.	uoč.	oč.
lokusi										
<i>dsub05</i>	0,962	0,915	0,808	0,921	0,800	0,894	0,826	0,912	0,085	0,011
<i>dsub04</i>	0,846	0,860	0,708	0,934	0,774	0,907	0,809	0,886	0,072	0,034
<i>dsub18</i>	0,769	0,900	0,915	0,908	0,855	0,893	0,841	0,880	0,051	0,025
<i>dsub27</i>	0,654	0,869	0,771	0,894	0,855	0,885	0,776	0,883	0,089	0,019
<i>dsub20</i>	0,462	0,912	0,317	0,801	0,400	0,807	0,486	0,850	0,165	0,055
<i>dsub01</i>	0,923	0,883	0,783	0,886	0,855	0,890	0,854	0,881	0,059	0,008
<i>dsub03</i>	0,760	0,709	0,729	0,783	0,772	0,750	0,828	0,795	0,079	0,051
<i>dsub13</i>	0,750	0,710	0,604	0,628	0,571	0,593	0,699	0,680	0,141	0,084
<i>dsub19</i>	0,750	0,885	0,893	0,901	0,850	0,909	0,765	0,892	0,090	0,012
<i>dsub02</i>	0,720	0,870	0,660	0,837	0,754	0,837	0,770	0,867	0,076	0,038
<i>dsub15</i>	0,875	0,813	0,775	0,854	0,877	0,881	0,838	0,864	0,056	0,030
<b>prosek</b>	<b>0,770</b>	<b>0,848</b>	<b>0,724</b>	<b>0,850</b>	<b>0,760</b>	<b>0,840</b>	<b>0,772</b>	<b>0,854</b>	<b>0,088</b>	<b>0,033</b>
S.D.	0,137	0,074	0,163	0,088	0,147	0,096	0,105	0,065	0,035	0,023

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L). Uočena (uoč.) i očekivana (oč.) heterozigotnost, standardna devijacija (S.D.).

Tabela MS-6 Rezultati testa odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže kod prirodnih populacija *D. subobscura*.

lokusi/populacije	B	H	BB	DP	T	S	L
<i>dsub05</i>	***	*	**				*
<i>dsub04</i>						***	
<i>dsub18</i>	*				*		
<i>dsub27</i>		**			*		
<i>dsub20</i>	*	***	*	***	***	***	***
<i>dsub01</i>						*	
<i>dsub03</i>		**					
<i>dsub13</i>							
<i>dsub19</i>		*	***	*			
<i>dsub02</i>					*	**	
<i>dsub15</i>	**						

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L).

Statistička značajnost, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . Broj koraka u Markovljevom lancu je bio 1 000 000, a broj dememorizacionih koraka je bio 100 000.

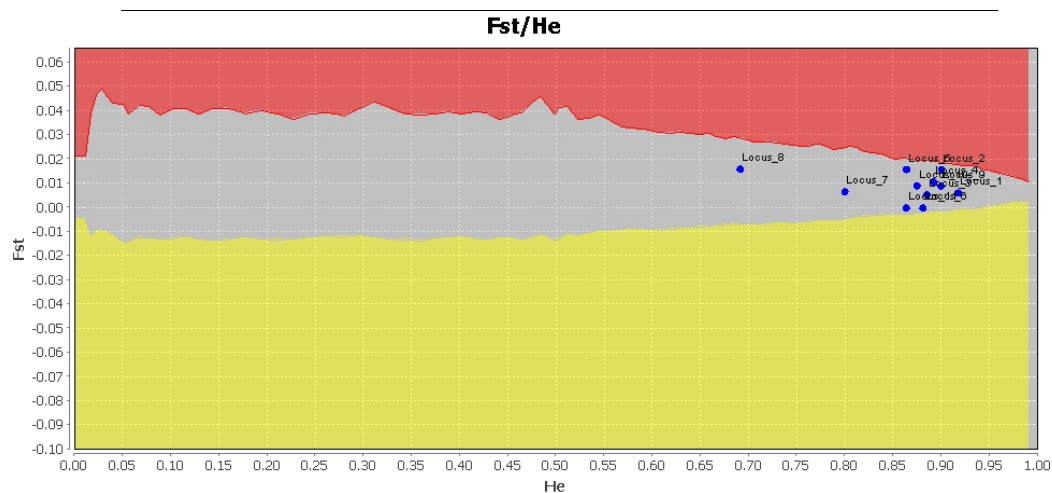
Tabela MS-7 Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA)

izvor variranja	d.f.	suma kvadrata	komponente varijanse	procenat varijanse	indeksi fiksacije	p-vrednost
između populacija	6	27,10	0,0182 Va	0,65	$F_{ST}$ : 0,0065	0,2004
između individua u okviru populacija	316	901,52	0,0712 Vb	2,54	$F_{IS}$ : 0,0256	0,0039 **
u okviru individua	323	875,50	2,7105 Vc	96,81	$F_{IT}$ : 0,0319	0,0009 ***
ukupno	645	1804,13	2,7999			

Značajnost odstupanja od nule, na osnovu 1023 permutacija, \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ . d.f. = broj stepeni slobode.

Tabela MS-9 Rezultati testa selektivne neutralnosti mikrosatelitskih lokusa. Očekivana heterozigotnost (He)

lokusi	He	F <sub>ST</sub>	p
<i>dsub05</i>	0,9174	0,0059	0,484
<i>dsub04</i>	0,9001	0,0157	0,9349
<i>dsub18</i>	0,8850	0,0053	0,4339
<i>dsub27</i>	0,8921	0,0105	0,758
<i>dsub20</i>	0,8638	0,0156	0,9003
<i>dsub01</i>	0,8808	-0,0001	0,1038
<i>dsub03</i>	0,7998	0,0065	0,5131
<i>dsub13</i>	0,6912	0,0158	0,8076
<i>dsub19</i>	0,8996	0,0089	0,6579
<i>dsub02</i>	0,8747	0,0089	0,6499
<i>dsub15</i>	0,8634	-0,0001	0,1121



Slika MS-1. Shematski prikaz testa na selektivnu neutralnost mikrosatelitskih lokusa u programu LOSITAN. Svaka tačka predstavlja određeni lokus. Lokusi pozicionirani u središnjem sivom delu su neutralni. Pozicija lokusa ispod neutralnog regiona ukazuje na delovanje balansne selekcije, dok pozicija lokusa iznad neutralnog regiona ukazuje na delovanje direkcione selekcije.



Tabela MS-8 Vrednosti  $F_{ST}$  i  $Rho_{ST}$  indeksa između pojedinačnih populacija

	populacije	B		H		BB		DP		T		S	
		$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p
$F_{ST}$	B												
	H	0,0045											
	BB	0,0094	***	0,0040									
	DP	0,0091	***	-0,0046		0,0089	***						
	T	0,0089	*	0,0067		0,0134	***	0,0064					
	S	0,0105	***	0,0038		0,0197	***	0,0056	**	0,0056			
	L	0,0127	***	0,0023		0,0170	***	-0,0008		0,0033		0,0020	
	populacije	B		H		BB		DP		T		S	
		$Rho_{ST}$	p	$Rho_{ST}$	p	$Rho_{ST}$	p	$Rho_{ST}$	p	$Rho_{ST}$	p	$Rho_{ST}$	p
$Rho_{ST}$	B												
	H	0,0270	***										
	BB	0,0103	**	0,0107	***								
	DP	0,0251	**	0,0096		0,0234	***						
	T	0,0192	**	0,0088		0,0194	***	-0,0068					
	S	0,0414	**	0,0136	**	0,0430	***	-0,0007		-0,0016			
	L	0,0367	**	0,0217		0,0399	***	0,0001		-0,0026		-0,0047	

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u

Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L).

Statistička značajnost: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$

## Varijabilnost mitohondrijalnih DNK haplotipova

U cilju utvrđivanja genetičke strukture populacija *D. subobscura* Balkanskog poluostrva, a posebno iz staništa sa pribežišnim karakteristikama, izvršena je analiza varijabilnosti mtDNK haplotipova.

Rezultati PCR testa isključuju prisustvo *Wolbachia* u svim ispitivanim populacijama. Na taj način je odbačena citoplazmatska inkompatibilnost i uticaj koji bi ona mogla da ima na oblikovanje mtDNK varijabilnosti.

Učestalosti mtDNK haplotipova i restrikcioni obrasci haplotipova su dati u Tabeli MT-1. U svim analiziranim populacijama uočeno je dominantno prisustvo haplotipa I i II, kao i prisustvo retkih haplotipova čija je ukupna učestalost iznosila 5,08% u populacijama B i H, 10,91% u populaciji BB, 8,70% u populaciji DP, 3,23% u populaciji T, 9,45% u populaciji S i 5,26% u populaciji L. U slučaju većine populacija haplotip II je češći u odnosu na haplotip I, dok je haplotip I češći u populacijama L i DP. Zabeležene vrednosti haplotipskog diverziteta iznosile su od 0,487 u populaciji B do 0,585 u populaciji DP (Tabela MT-1). Na Slici MT-1 su prikazani različiti restrikcioni obrasci dobijeni digestijom sa pet restrikcionih enzima. Broj dobijenih obrazaca se kretao od dva (u slučaju enzima *EcoRI*) do osam (u slučaju enzima *HpaII*). Jedan od haplotipova u populaciji S je pokazivao obrazac restrikcije haplotipa I, ali je celokupna mtDNK ovog haplotipa duža za 2,7 kb. Pojedinačnim restrikcijama inserciju je locirana u široj oblasti A+T bogatog, kontrolnog regiona. Razlika između fragmenata digestovane mtDNK standardne dužine (15,8 kb) i mtDNK sa insercijom (18,5 kb) je prikazana na Slici MT-2. Kako bi se preciznije mapirao insertovani fragment, upotrebljena su dva dodatna restrikciona enzima *HpaI* i *XbaI*, za koje je poznato prisustvo restrikcionih mesta u ovom regionu (Latorre i sar. 1992). Primenom jednostrukih i dvostrukih digestija zaključeno je da insercija obuhvata duplirani fragment od 2,1 kb ograničen mestima *HindIII* enzima, kao i dodatni fragment od oko 0,6 kb između dve kopije. Oba duplirana *HindIII* fragmenta poseduju na identičnim pozicijama pet restrikcionih mesta (dva *HindIII* mesta koji ograničavaju fragmente, kao i dva *XbaI*, i jedno *HpaI* mesto unutar fragmenata). Insertovani region između dupliranih fragmenata je sekvenciran i pokazano je da sadrži veći deo *ND2* gena, kao i

parče lrRNA gena (gen za veliku ribozomalnu rRNK). Mapa insercije je prikazana na Slici MT-3.

Analizom molekularne varijanse utvrđeno je da se 96,78% ukupnog variranja mtDNK može objasniti unutarpopulacionim variranjem, dok se 3,22 % može objasniti međupopulacionim variranjem. Iako malo, međupopulaciono variranje je odgovorno za značajnu diferencijaciju između populacija ( $F_{ST} = 0,0322$ ;  $p=0,00098$ )

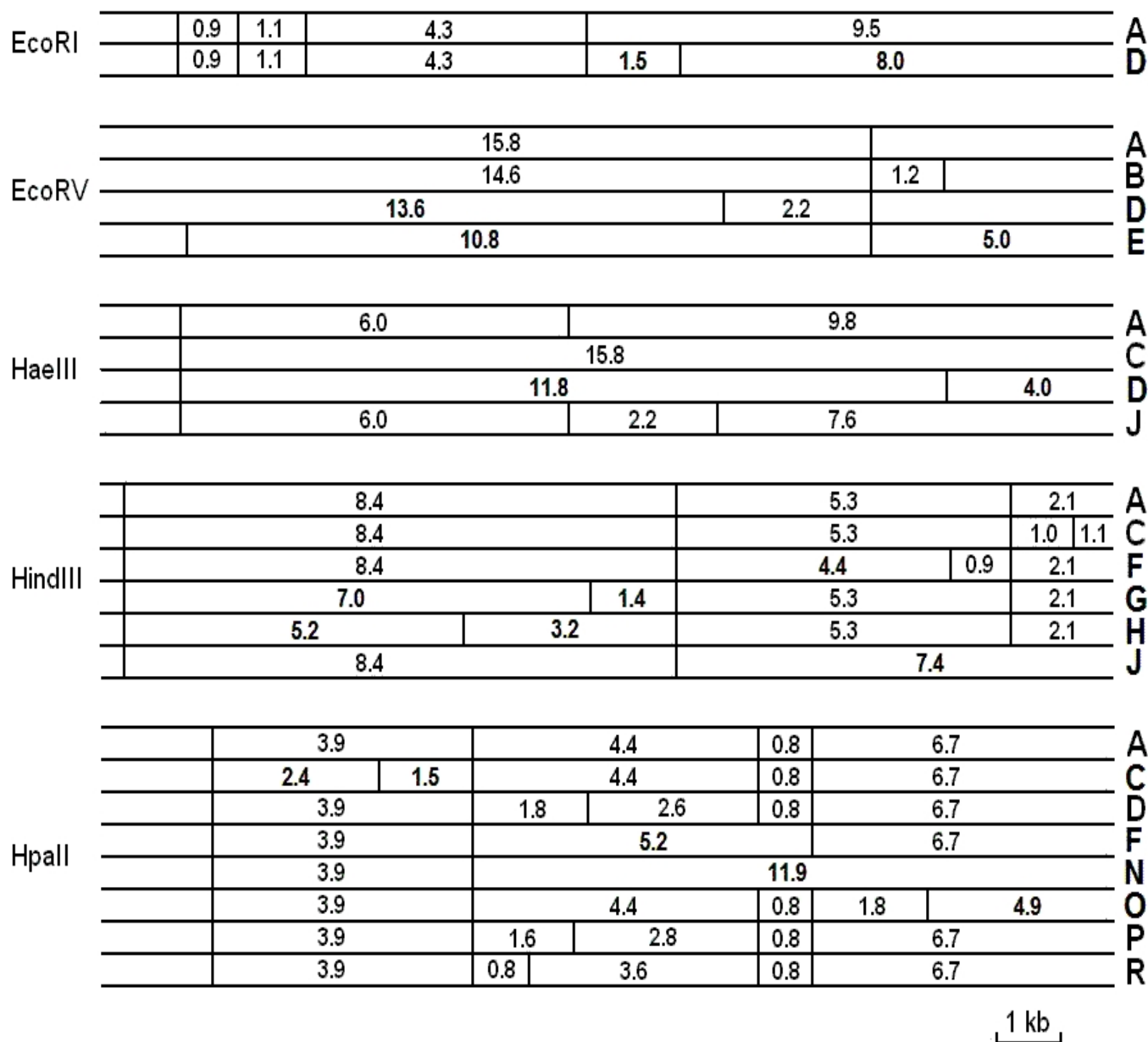
F-statistika, prilagođena za haploidne podatke, pokazala je značajnu diferencijaciju između populacije DP i svih ostalih populacija, sem od populacije L, kao i populacije L i svih populacija osim DP i S (Tabela MT-2).

Rezultati Tadžiminog D testa i Fuovog  $F_s$  testa su prikazani u Tabeli MT-3. Tadžimin D test je dao negativne vrednosti u svim slučajevima. Međutim, vrednosti nisu bile značajno različite od nule ni u jednoj populaciji. Grupisanjem populacija na one koje su izlovljene u klisurama i kanjonima, takođe se ne dobija vrednost značajno različita od nule. Ukoliko se grupišu samo populacije koje nisu izlovljavane u klisurama i kanjonima, dobijena D vrednost od -1,791 pokazuje značajno odstupanje od nule ( $p=0,008$ ). Ukoliko se sve populacije analiziraju zajedno, dobijena D vrednost od -1,952 je značajno različita od nule ( $p=0,001$ ).  $F_s$  vrednosti Fuovog testa su takođe pokazale negativne vrednosti. Međutim, Fuov test je pokazao značajno odstupanje od nule za  $F_s$  vrednosti u populacijama BB ( $F_s=-3,326$ ;  $p=0,02$ ) i DP ( $F_s=-4,225$ ;  $p=0,009$ ), zatim ako se za populacije BB i DP udruže podaci ( $F_s=-10,1$ ;  $p<0,001$ ), kao i ako se udruže podaci populacija klisura i kanjona ( $F_s=-6,261$ ;  $p=0,009$ ), te populacije koje nisu izlovljavane u klisurama i kanjonima (B, H, BB i DP,  $F_s=-14,559$ ;  $p<0,001$ ), kao i ako se sve populacije analiziraju zajedno ( $F_s=-24,840$ ;  $p<0,001$ ).

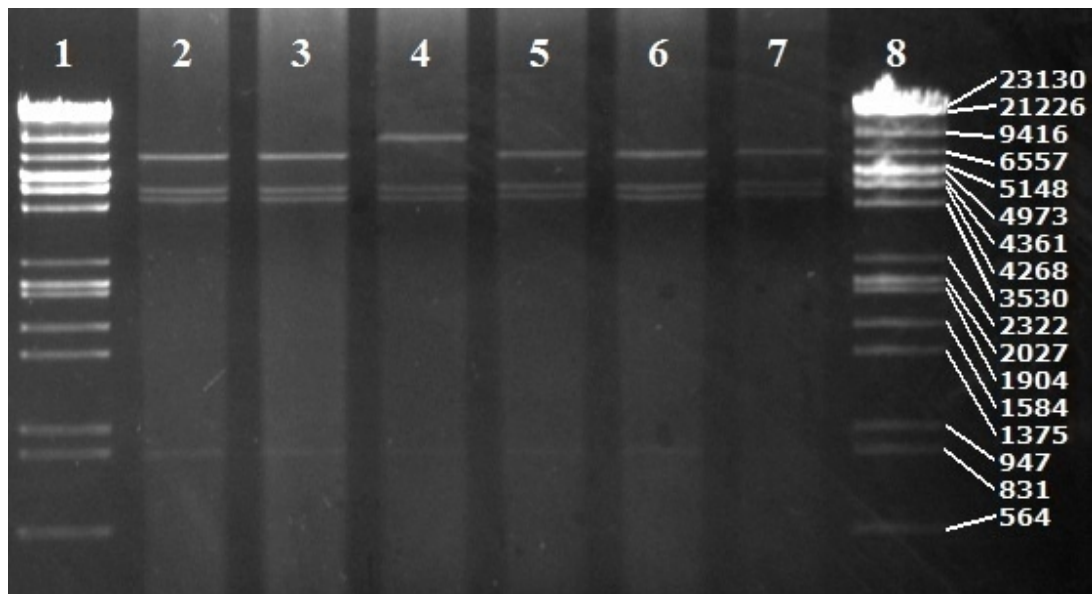
## Povezanost hromozomske i mitohondrijalne DNK varijabilnosti

Tabela MT-4 prikazuje vrednosti  $D$  i  $D'$  koje kvantifikuju vrednosti neravnoteže vezanosti između hromozomskih aranžmana i mtDNK haplotipova, kao i odgovarajuće  $p$  vrednosti Fišerovog testa nezavisnosti. Uočava se odsustvo neravnoteže vezanosti između mtDNK haplotipova i hromozomskih aranžmana (Tabela MT-4) u sve tri populacije.

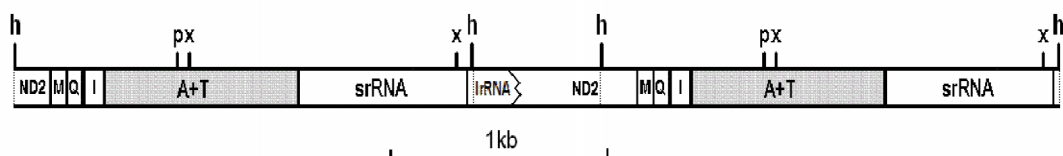
Ipak, pažljivim pregledom učestalosti hromozomskih aranžmana u okviru haplotipova u Tabeli MT-5, uočeno je nekoliko slučajeva koji bi mogli da ukažu na prisustvo slabe neravnoteže vezanosti. Najviše se ističu razlike između haplotipova u učestalostima hromozomskih aranžmana  $A_1$  (0,1250 nasuprot 0,2955),  $A_2$  (0,2500 nasuprot 0,0455),  $U_{1+2}$  (0,6875 nasuprot 0,5000),  $E_8$  (0,0625 nasuprot 0,1932) i  $O_{3+4+1}$  (0,0000 nasuprot 0,2045) u populaciji T, kao i između haplotipova u učestalosti hromozomskih aranžmana  $A_{ST}$  (0,5652 nasuprot 0,4167) i  $A_2$  (0,0435 nasuprot 0,1667) u populaciji L. Međutim, u slučaju aranžmana  $A_1$ ,  $A_2$  i  $O_{3+4+1}$  u populaciji T i aranžmana  $A_2$  u populaciji L, nisu ispunjeni uslovi za testiranje jer su neka od polja u tablicama kontigencije 2 x 2 imala vrednosti manje od 5.



Slika MT-1 Restrikcioni obrasci pet endonukleaza. Dužina fragmenata je prikazana u kilobazama.



Slika MT-2 Restrikcioni obrazac A enzima *HpaII*. U bunariće označene brojevima 1 i 8 apliciran je marker za dužinu. U bunarićima označenim brojevima 2, 3, 5, 6 i 7 nalaze se DNK fragmenti mtDNK standardne dužine. U bunarić br. 4 aplicirani su fragmenti mtDNK sa insercijom. Fragment koji je kod standardnih haplotipova dužine 6,7 kb, i u kom se nalazi A+T bogati region, je duži u slučaju haplotipa sa insercijom. Veličina fragmenata markera za dužinu (u baznim parovima) je prikazana sa desne strane gela.



Slika MT-3 Mapa insercije dugačkog haplotipa. Prikazani fragment je izgrađen od dve kopije dužine 2,1 kb koje sadrže deo *ND2* gena, tri gena za tRNA (M, Q i I), A+T bogati - kontrolni region, i srRNA gen. Restrikciona mesta su obeležena slovom *h* za enzim *HindIII*, slovom *p*, za enzim *HpaI* i slovom *x* za enzim *XbaI*. Insert između duplikacije je nastao spajanjem malog fragmenta lrRNA gena i većeg dela *ND2* gena. Shema je nacrtana po radovima Clary i Wolstenholme (1987) i Monforte i sar. (1993).

Tabela MT-1 Učestalost haplotipova i odgovarajući restrikcioni obrasci kod sedam populacija *D. subobscura*.

haplotipovi	učestalost haplotipova (%)							restrikcioni obrasci				
	B	H	BB	DP	T	S	L	<i>EcoRI</i>	<i>EcoRV</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HindIII</i>	<i>HpaII</i>
I	28,81	30,51	27,27	50,72	25,81	32,43	52,63	A	A	A	A	A
II	66,10	64,41	61,81	40,58	70,97	58,11	42,11	A	A	C	A	A
III	/	1,69	/	1,45	/	/	2,63	A	A	A	A	F
IV	/	/	3,64	/	1,61	/	/	A	A	C	A	D
V	1,69	1,69	1,82	/	/	/	/	A	A	C	A	P
VI	/	/	/	/	/	2,70	/	A	B	C	A	A
VII	/	/	/	/	/	2,70	/	A	A	C	A	R
VIII	/	1,69	/	/	/	/	/	D	A	C	A	A
IX	/	/	/	1,45	/	/	/	A	D	C	A	A
X	/	/	/	1,45	/	/	/	A	E	A	A	A
XI	/	/	/	1,45	/	/	/	A	A	A	F	A
XII	1,69	/	/	/	/	/	/	A	A	A	H	A
XIII	/	/	/	/	/	1,35	/	A	A	C	C	A
XIV	/	/	/	1,45	/	/	/	A	A	C	G	A
XV	1,69	/	/	/	/	/	/	A	A	C	J	A
XVI	/	/	/	1,45	/	/	/	A	A	D	A	A
XVII	/	/	/	/	1,61	/	/	A	A	J	A	A
XVIII	/	/	/	/	/	/	2,63	A	A	C	A	C
XIX	/	/	1,82	/	/	/	/	A	A	C	A	N
XX	/	/	1,82	/	/	/	/	A	A	C	A	O
XXI	/	/	1,82	/	/	/	/	A	A	A	A	O
XXII	/	/	/	/	/	1,35	/	A	A	A	A	P
D*	/	/	/	/	/	1,35	/	A	A	A	A	A
ukupno IF	59	59	55	69	62	74	38					
haplotipski diverzitet	0,487	0,5	0,551	0,585	0,436	0,554	0,559					
	±0,054	±0,051	±0,059	±0,034	±0,057	±0,040	±0,041					

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP),

Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L). \* haplotip D poseduje ista restrikciona mesta kao haplotip I ali

ima dužu mtDNK.

Tabela MT-2 Uporedne vrednosti  $F_{ST}$  indeksa između populacija po mtDNK. Korišćena je konvencionalna F-statistika prilagođena za haploidne podatke.

populacije	B		H		BB		DP		T		S	
	$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p	$F_{ST}$	p
B												
H	-0,015	0,999										
BB	-0,013	0,814	-0,013	0,811								
DP	0,083	0,001 **	0,070	0,013 *	0,070	0,009 **						
T	-0,012	0,720	-0,008	0,547	-0,006	0,500	0,120	0,001 **				
S	-0,004	0,443	-0,008	0,553	-0,007	0,506	0,039	0,033 *	0,010	0,156		
L	0,084	0,022 *	0,069	0,026 *	0,069	0,016 *	-0,019	0,999	0,124	0,005 **	0,037	0,075

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T), Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L). Statistička značajnost je predstavljena sa \* za  $p < 0,05$  i \*\* za  $p < 0,01$ .



Tabela MT-3 Rezultati D i Fs testa

Testovi populacije	Tadžima		Fu			
	D	p	Fs	p		
B	-0,834	0,2210	-1,684	0,1510		
H	-0,802	0,2520	-1,618	0,1760		
BB	-1,218	0,1060	-3,326	0,0200	*	
DP	-1,336	0,0780	-4,225	0,0090	**	
T	-0,524	0,3480	-0,837	0,2430		
S	-0,882	0,2290	-2,119	0,1140		
L	-0,312	0,4140	-0,558	0,3330		
B i H	-1,145	0,1260	-3,326	0,0510		
BB i DP	-1,658	0,0180	*	-10,100	0,0000	***
T, S i Z	-1,455	0,0590		-6,261	0,0090	**
B, H, BB, DP	-1,791	0,0080	**	-14,559	0,0000	***
sve zajedno	-1,952	0,0010	**	-24,840	0,0000	***

Bukovo-jelova (B) i hrastovo-jasenova (H) šuma na planini

Goč, Botanička bašta u Beogradu (BB), hrastova šuma u

Deliblatskoj peščari (DP), Kanjon reke Dervente (T),

Sićevačka klisura (S) i Kanjon Lazareve reke (L). Statistička

značajnost je predstavljena sa \* za  $p < 0,05$ , \*\* za  $p < 0,01$  i \*\*\*

za  $p < 0,001$

Tabela MT-4 Vrednosti D i D' između hromozomskih aranžmana i haplotipa I kod tri analizirane populacije.

hromozomski aranžmani	populacija T				populacija S				populacija L			
	D	D'	p	p <sub>kor</sub>	D	D'	p	p <sub>kor</sub>	D	D'	p	p <sub>kor</sub>
A <sub>ST</sub>	/	/	/	/	-0,0143	-0,0695	0,5975	1,0000	0,0371	0,1486	0,7569	1,0000
A <sub>1</sub>	/	/	/	/	0,0173	0,0775	0,5975	1,0000	-0,0063	-0,0320	0,7569	1,0000
J <sub>ST</sub>	-0,0017	-0,0179	1,0000	1,0000	-0,0211	-0,2386	0,2966	1,0000	-0,0034	-0,0384	1,0000	1,0000
J <sub>1</sub>	0,0017	0,0179	1,0000	1,0000	0,0237	0,2610	0,2966	1,0000	0,0034	0,0384	1,0000	1,0000
U <sub>1+2</sub>	0,0367	0,3056	0,0971	0,7765	0,0026	0,0177	1,0000	1,0000	-0,0100	-0,0447	0,8338	1,0000
U <sub>1+2+6</sub>	-0,0206	-0,2151	0,2918	1,0000	0,0055	0,0246	1,0000	1,0000	-0,0174	-0,0985	0,6650	1,0000
E <sub>ST</sub>	0,0067	0,0385	0,8279	1,0000	0,0035	0,0206	0,8350	1,0000	0,0070	0,0861	0,7771	1,0000
E <sub>8</sub>	/	/	/	/	-0,0121	-0,0873	1,0000	1,0000	-0,0186	-0,1486	0,6330	1,0000
E <sub>1+2+9</sub>	0,0194	0,1346	0,4024	1,0000	-0,0025	-0,0229	0,7100	1,0000	-0,0052	-0,0208	1,0000	1,0000
O <sub>ST</sub>	0,0028	0,0182	1,0000	1,0000	0,0190	0,2209	0,1978	1,0000	0,0231	0,2656	0,2753	1,0000
O <sub>3+4</sub>	0,0144	0,1102	0,5235	1,0000	0,0004	0,0030	1,0000	1,0000	-0,0260	-0,1141	0,8466	1,0000
O <sub>3+4+1</sub>	/	/	/	/	-0,0007	-0,0147	1,0000	1,0000	0,0014	0,0208	1,0000	1,0000
O <sub>3+4+22</sub>	/	/	/	/	-0,0108	-0,2245	0,5989	1,0000	/	/	/	/

Napomena: Rezultati za haplotip II su identični kao za haplotip I, ali suprotnog znaka. Populacija T, Kanjon reke Dervente, populacija S, Sićevačka klisura i populacija L, Kanjon Lazareve reke. p<sub>kor</sub>, verovatnoće nakon sekvencijalne Bonferroni korekcije, /, slučajevi gde nisu ispunjeni uslovi za testiranje jer su neke kombinacije hromozomskih aranžmana i haplotipova u tablicama kontigencije 2 x 2 imale

vrednosti <5.

Tabela MT-5 Učestalosti hromozomskih aranžmana u okviru haplotipova I i II u tri analizirane populacije

hromozomski aranžmani	populacija T			populacija S			populacija L		
	haplotip	haplotip	razl.	haplotip	haplotip	razl.	haplotip	haplotip	razl.
	I	II		I	II		I	II	
A <sub>ST</sub>	0,6250	0,6591	0,0341	0,5200	0,5814	0,0614	0,5652	0,4167	0,1486
A <sub>1</sub>	0,1250	0,2955	0,1705	0,4000	0,3256	0,0744	0,3913	0,4167	0,0254
A <sub>2</sub>	0,2500	0,0455	0,2045	0,0800	0,0930	0,0130	0,0435	0,1667	0,1232
J <sub>ST</sub>	0,3438	0,3523	0,0085	0,1875	0,2791	0,0916	0,1739	0,1875	0,0136
J <sub>1</sub>	0,6563	0,6477	0,0086	0,8125	0,7093	0,1032	0,8261	0,8125	0,0136
J <sub>3+4</sub>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0116	0,0116	0,0000	0,0000	0,0000
U <sub>ST</sub>	0,0313	0,1023	0,0710	0,0000	0,0233	0,0233	0,0870	0,0000	0,0870
U <sub>1</sub>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0116	0,0116	0,0000	0,0000	0,0000
U <sub>1+2</sub>	0,6875	0,5000	0,1875	0,6042	0,5930	0,0112	0,5435	0,5833	0,0399
U <sub>1+2+6</sub>	0,2813	0,3864	0,1051	0,3958	0,3721	0,0237	0,3261	0,3958	0,0697
U <sub>1+2+7</sub>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0435	0,0208	0,0226
U <sub>1+2+8</sub>	0,0000	0,0114	0,0114	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000
E <sub>ST</sub>	0,3750	0,3409	0,0341	0,2708	0,2558	0,0150	0,1739	0,1458	0,0281
E <sub>8</sub>	0,0625	0,1932	0,1307	0,3542	0,4070	0,0528	0,2174	0,2917	0,0743
E <sub>1+2</sub>	0,0313	0,0341	0,0028	0,0833	0,0349	0,0484	0,1087	0,0417	0,0670
E <sub>1+2+9</sub>	0,5313	0,4318	0,0995	0,2917	0,3023	0,0106	0,5000	0,5208	0,0208
O <sub>ST</sub>	0,2188	0,2045	0,0143	0,1875	0,1047	0,0828	0,2174	0,1250	0,0924
O <sub>6</sub>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0217	0,0000	0,0217
O <sub>3+4</sub>	0,5625	0,4886	0,0739	0,5833	0,5814	0,0019	0,5000	0,6042	0,1042
O <sub>3+4+1</sub>	0,0000	0,2045	0,2045	0,1250	0,1279	0,0029	0,1304	0,1250	0,0054
O <sub>3+4+2</sub>	0,1563	0,0455	0,1108	0,0000	0,0233	0,0233	0,0435	0,0208	0,0226
O <sub>3+4+7</sub>	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0116	0,0116	0,0435	0,0208	0,0226
O <sub>3+4+22</sub>	0,0625	0,0568	0,0057	0,1042	0,1512	0,0470	0,0435	0,1042	0,0607

Napomena: Populacija T, Kanjon reke Dervente, populacija S, Sićevačka klisura i populacija L, Kanjon Lazareve reke, razl., apsolutna razlika između haplotipova. Veće vrednosti sugerišu jaču povezanost sa odgovarajućim hromozomskim aranžmanom.

# Diskusija

## Varijabilnost inverzionog polimorfizma u populacijama iz klisura i kanjona

Opšta slika inverzionog polimorfizma u populacijama koje naseljavaju klisure i kanjone je slična u poređenju sa drugim populacijama centralnog dela Balkanskog poluostrva. Vrednosti parametara inverzionog polimorfizma, heterozigotnosti i indeks slobodne rekombinacije su slični između tri analizirane populacije. Međutim, uočavaju se nešto više vrednosti heterozigotnosti u odnosu na populacije B, H i DP, kao i niže vrednosti u odnosu na populaciju BB. Indeks slobodne rekombinacije takođe pokazuje slične vrednosti, kako sa populacijama B, H, BB i DP, tako i sa drugim populacijama centralnog dela Balkanskog poluostrva (Anđelković i sar. 2003; Živanović i sar. 2002; Kalajdžić i sar. 2006; Stamenković-Radak i sar. 2008; Živanović 2007).

U populacijama klisura i kanjona primetno je prisustvo određenih hromozomskih aranžmana u niskim učestalostima koji nisu prisutni u ostalim populacijama, predstavljenim u Tabeli IP-1. Takav je slučaj sa aranžmanima:  $J_{3+4}$  u populaciji S,  $U_1$  u populaciji S,  $U_{1+2+8}$  u populaciji T,  $U_{1+2+7}$  u populaciji L,  $E_{1+2}$  u sve tri populacije, zatim  $O_{3+4+7}$  u populacijama S i L, kao i  $O_{3+4+22}$  u sve tri populacije.

Hromozomski aranžman  $J_{3+4}$ , zabeležen u populaciji S sa učestalošću od oko 1%, do sada nije uočavan u populacijama centralnog dela Balkanskog poluostrva. Karakterističan je za istočni deo Mediterana, Malu Aziju, i južnu Grčku. Takođe ga ima i na Sardiniji i Balearskim ostrvima (Krimbas i Powell 1992).

Aranžman  $U_1$ , pronađen u populaciji S sa učestalošću manjom od 1%, je i ranije uočavan u većini populacija centralnog dela Balkana (Živanović i sar. 2002; Anđelković i sar. 2003; Kalajdžić i sar. 2006; Živanović 2007; Stamenković-Radak i sar. 2008; Živanović i Mestres 2011).

Aranžman  $U_{1+2+8}$ , pronađen u populaciji T sa učestalošću manjom od 1%, je ranije uočavan u pojedinačnim populacijama centralnog dela Balkana sa učestalostima od 1,6% u Boki Kotorskoj (Živanović i sar. 2002) do učestalosti od oko 10% u populacijama iz Đerdapske klisure (Živanović 2007) i Apatina (Živanović i Mestres 2011). Ovaj hromozomski aranžman je karakterističan za zapadni deo Mediterana, sa

najvećom učestalošću na Siciliji, Sardiniji, u Tunisu, ali i na Kritu. (Krimbas i Powell 1992).

Hromozomski aranžman  $U_{1+2+7}$  zabeležen u populaciji L do sada nije uočavan u populacijama centralnog dela Balkanskog poluostrva. U populaciji L je čak nekoliko mužjaka nosilo ovaj aranžman, a njegova učestalost je bila 3,19%. Navedeni strukturni tip je visoko učestao u Izraelu, ali se javlja u manjim učestalostima i u Grčkoj i Italiji (Krimbas i Powell 1992).

Hromozomski aranžman  $E_{1+2}$  zabeležen je u sve tri analizirane populacije sa učestalostima od 3-7%. Ovaj strukturni tip, iako odsutan u populacijama B, H, BB i DP javlja se u većini populacija centralnog Balkana sa učestalošću do 3% (Živanović i sar. 2002; Kalajdžić i sar. 2006; Živanović i Mestres 2011). Prisutan je i u populacijama sa planine Goč izlovljavanim ranije (Anđelković i sar. 2003; Stamenković-Radak i sar. 2008). Izuzetak je populacija Žanjice uzorkovana u Boki Kotorskoj (Živanović i sar. 2002), gde mu je učestalost iznosila 14,52% i populacija Đerdapske klisure gde je u jednoj sezoni uzorkovan u učestalosti od 5,8% (Živanović 2007). Navedena dva lokaliteta se smatraju područjima koja su bila pribežišta mnogih vrsta. Iako je ovaj strukturni tip prisutan u većini populacija centralnog Balkana, primetna je njegova nešto veća učestalost u klisurama i kanjonima. Prema Krimbas i Powell (1992) ovaj hromozomski aranžman je najčešći u Tunisu, ima ga u nižim učestalostima na Apeninskom poluostrvu i zapadnoj Evropi, dok je u istočnom delu areala redak sa nešto većim učestalostima na Kritu i južnoj Grčkoj gde ne prelazi 10%.

Hromozomski aranžman  $O_{3+4+7}$  zabeležen je u populaciji S (0,6%) i u nešto višoj učestalosti u populaciji L (3,19%). Inače, ovaj strukturni tip se retko i mestimično javlja u populacijama centralnog dela Balkanskog poluostrva, sa učestalostima manjim od 1% (Živanović i sar. 2002; Živanović 2007). Nešto veća učestalost zabeležena je u uzorcima populacija izlovljenih u Đerdapskoj klisuri (2 – 6,5%). U arelu *D. subobscura* postoje dve regiona sa visokim učestalostima ovog strukturnog tipa: Iberijsko poluostrvo i Mala Azija (Krimbas i Powell 1992).

U sve tri populacije zabeleženo je prisustvo strukturnog tipa  $O_{3+4+22}$ . Ovaj hromozomski aranžman se mestimično javlja u populacijama centralnog dela

Balkanskog poluostrva sa učestalostima do 12% (Živanović i sar. 2002; Živanović 2007; Živanović i Mestres 2011). Od analiziranih populacija, najveću učestalost dostiže u populaciji S (13,10%). Navedeni strukturni tip ima žižu učestalosti baš na Balkanskom poluostrvu, odakle mu učestalost opada u koncentričnim krugovima (Krimbas i Powel 1992).

Pored navedenih strukturnih tipova, zabeleženih u populacijama klisura i kanjona, u populacijama centralnog Balkana zabeleženi su i drugi hromozomski aranžmani koji nisu zabeleženi u populacijama klisura i kanjona u ovoj studiji. Takav je slučaj sa aranžmanima  $A_{2+8+9}$ ,  $U_{1+2+3}$ ,  $E_{1+2+9+12}$ ,  $O_1$ ,  $O_5$ ,  $O_{22}$ ,  $O_{3+4+6}$ ,  $O_{3+4+8}$ . Navedeni hromozomski aranžmani se javljaju mestimično i učestalost im retko prelazi 1% (Živanović i sar. 2002; Kalajdžić i sar. 2006; Stamenković-Radak i sar. 2008; Živanović i Mestres 2011).

Hromozomski aranžmani prisutni u pojedinačnim populacijama klisura i kanjona, a odsutni u svim ostalim populacijama centralnog dela Balkanskog poluostrva (kao što je slučaj sa  $J_{3+4}$  u populaciji S,  $U_{1+2+7}$  populaciji L) su karakteristični za južnije delove areala vrste, Grčku, Malu Aziju. Takođe, neki genski aranžmani, kao što je slučaj sa aranžmanima  $E_{1+2}$  i  $O_{3+4+22}$ , pokazuju konzistentnije prisustvo u klisurama i kanjonima u poređenju sa drugim populacijama gde se javljaju mestimično. Može se uočiti da im je i učestalost nešto viša u poređenju sa drugim populacijama, te više odgovara južnijem delu areala vrste. Takav je slučaj i sa aranžmanom  $O_{3+4+7}$ , koji je prisutan u dve od tri populacije analizirane u ovoj studiji, ali i u populaciji Đerdapske klisure. Zajedno sa istorijskim procesima, povoljniji i blaži klimatski uslovi u poređenju sa okolnim područjem (pa samim tim i moguće manje fluktuacije u brojnosti populacija tokom vremena) mogu biti odgovorni za očuvanje ređih hromozomskih varijanti. Takođe, s obzirom da je inverzioni polimorfizam kod *D. subobscura* adaptivni genetički marker (Prevosti i sar. 1988; Orengo i Prevost 1996), veća diferencijacija staništa u ovim geološkim formacijama pružila je mogućnost očuvanja hromozomskih aranžmana koji nisu zabeleženi u populacijama okolnih područja.

Iako je opšta slika varijabilnosti inverzionog polimorfizma u populacijama klisura i kanjona u velikoj meri slična u poređenju sa varijabilnošću u okolnim populacijama, uočeni obrasci prisustva i učestalosti pojedinih hromozomskih varijanti

ukazuju na značaj koji su klisure i kanjonske doline ovog dela Balkanskog poluostrva mogle imati kao pribežišta za vrstu *D. subobscura*. Analiza inverzionog polimorfizma takođe ukazuje i na ulogu koje su klisure i kanjonske doline ovog dela Balkanskog poluostrva mogle imati kao usputne stanice u rekolonizaciji evropskog kontinenta od strane *D. subobscura*. Važno je uzeti u obzir da populacije u klisurama i kanjanskim dolinama, i pored toga što naseljavaju područja zaštićene topografije, u velikoj meri nisu izolovane od okolnih populacija. Takođe, disperzioni kapacitet *D. subobscura* je veliki (Ayala i sar. 1989), te je protok gena, verovatno, u velikoj meri maskirao efekte istorijskih i adaptivnih procesa vodeći sličnosti populacija klisura/kanjona i okolnih područja.

Rezultati neparametarskog G testa ukazuju na struktuiranost populacija *D. subobscura* po inverzionom polimorfizmu. U većini slučajeva su zabeležene visoko značajne razlike u distribuciji hromozomskih aranžmana kako po pojedinačnim hromozomima, tako i za sve hromozome zajedno. Izuzetak su poređenja B i H, BB i DP, L i H, i S i L gde nisu zabeležene značajne razlike.

Ukoliko se posmatraju populacije izlovljene u klisurama i kanjanskim dolinama primetna je veća sličnost između populacija S i L, dok se populacija T razlikuje od ostale dve populacije. Najverovatniji uzrok ovakvog obrasca variranja je velika sličnost lokaliteta S i L. I Sićevačka klisura i Kanjon Lazareve reke se pružaju u pravcu istok-zapad, i u oba slučaja su jedinke izlovljavane na južnoj strani. Pravac pružanja reke Derventa je jugozapad-severoistok. Takođe u populaciji T, jedinke su izlovljavane u drugačijem periodu godine. Dok su populacije S i L (ali i sve ostale prikazane u ovoj studiji) uzorkovane u toku juna meseca, populacija T je uzorkovana u septembru.



## Mikrosatelitska varijabilnost prirodnih populacija

Opšta slika varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa je slična kao i u populacijama uzorkovanim u zapadnom delu Evrope (Pascual i sar. 2000; Pascual i sar. 2001). Prosečna vrednost broja alela se kretala od 12,18 do 16,36. Ove vrednosti su slične vrednostima drugih evropskih populacija gde su vrednosti bile u opsegu od 13,3 do 17,9. Ipak, one su nešto niže u odnosu na dve najjužnije populacije Pirinejskog poluostrva (16,3 i 17,9). Populacije klisura i kanjona se ne odlikuju većim prosečnim brojem alela u odnosu na druge populacije. Štaviše, populacija T ima najnižu vrednost, te se po prosečnom broju razlika značajno razlikuje od populacija B, BB i DP. Ukoliko se vrednosti koriguju za veličinu uzorka, uočavaju se veoma slične vrednosti između svih populacija.

Populacije T i S, zajedno sa populacijom H imaju najniže vrednosti opsega alelskog variranja. Značajne razlike u poređenju sa drugim populacijama zabeležene su samo za populacije S i H.

Varijansa u broju ponovaka je takođe veoma slična sa drugim evropskim populacijama gde su se ove vrednosti kretale između 9,698 i 15,175. Ipak vrednosti zabeležene u ovoj studiji više odgovaraju vrednostima na jugu zapadnog dela areala, tj. Pirinejskom poluostrvu. Populacije klisura i kanjona pokazuju slične vrednosti među sobom, i nešto niže vrednosti u poređenju sa drugim populacijama, koje nisu značajne.

Uočene i očekivane vrednosti heterozigotnosti su veoma slične u poređenju sa drugim evropskim populacijama. Vrednosti uočene heterozigotnosti u drugim populacijama su iznosile od 0,751 do 0,801, dok su se vrednosti očekivane heterozigotnosti kretale od 0,843 do 0,891. Populacija S ima nešto nižu vrednost uočene heterozigotnosti u poređenju sa drugim populacijama, međutim ove razlike nisu značajne.

Većina lokusa je pokazala odstupanje od Hardi–Vajnbergove ravnoteže u barem jednoj od populacija. Izuzetak je lokus *dsub13* gde odstupanje nije uočeno ni u jednom slučaju. Za lokus *dsub20* pokazano je odstupanje od ravnoteže u svim populacijama, a

značajnosti su većinom bile znatne. Pascual i sar. (2001) su za isti ovaj lokus takođe uočili odstupanje od ravnoteže u evropskim populacijama. Na ovom lokusu uočena je veća učestalost homozigota nego što bi se očekivalo u stanju ravnoteže, najverovatnije usled prisustva nultih alela, koji nastaju mutacijama u mestima za vezivanje prajmera (Pemberton i sar. 1995). Na ovom lokusu primećena je i slabiju amplifikaciju, tj. češće potpuno odsustvo pikova, koje se najverovatnije javlja kod individua homozigotnih za nulte alele.

Rezultati AMOVA su pokazali da se zanemarljiv procenat genetičkog variranja može pripisati međupopulacionim razlikama (0,65%). Zabeležene vrednosti  $F_{ST}$  i  $Rho_{ST}$  indeksa se mogu smatrati veoma slabim odrazom diferencijacije (Wright 1978), koja je u slučaju  $Rho_{ST}$  indeksa značajno različita od nule. I u poređenju parova populacija vrednosti su bile niske u svim poređenjima. Može se uočiti da se populacije B i BB izdvajaju jer indeksi pokazuju značajno odstupanje od nule. Podaci dobijeni analizom genetičke diferencijacije populacija su u skladu sa studijom diferencijacije populacija iz zapadnog areala vrste, gde su zabeležene slične vrednosti indeksa diferencijacije (Pascual i sar. 2001).  $Rho_{ST}$  indeks je dao nešto više vrednosti od  $F_{ST}$  indeksa, što je takođe u skladu sa studijom Pascual i sar. (2001).

Studija je pokazala odsustvo selektivnog značaja mikrosatelitskih lokusa. Takođe, ni jedna od populacija nije prošla kroz skorašnje smanjenje brojnosti, a visoke vrednosti heterozigotnosti i varijanse broja ponovaka ukazuju na velike efektivne veličine svih populacija po mikrosatelitskim lokusima.

Razmatranjem mikrosatelitske varijabilnosti može se izvesti zaključak da se Balkansko poluostrvo ne odlikuje genetičkim specifičnostima u poređenju sa drugim delovima areala *D. subobscura*. Takođe, populacije izlovljene u klisurama i kanjonima ne poseduju genetičke odlike koje bi ukazale na dužu kontinualnu istoriju, ili koje bi oslikale veću raznovrsnost staništa u odnosu na ostale populacije.

## Varijabilnost mitohondrijalnih DNK haplotipova

Varijabilnost mtDNK haplotipova u analiziranim populacijama je slična sa varijabilnošću u ostalim delovima areala vrste (Alfonso i sar. 1990; Rozas i sar. 1990; Latorre i sar. 1992; Moya i sar. 1993; Castro i sar. 1999). U svim analiziranim populacijama je zabeleženo prisustvo dva dominantna haplotipa, kao i prisustvo retkih haplotipova niske učestalosti. Najveća učestalost retkih haplotipova zabeležena je u populaciji BB (10,91%) i u populaciji S (9,45%). Haplotipski diverzitet je najveći u populaciji DP ( $0,585 \pm 0,034$ ). U slučaju mtDNK varijabilnosti, ne može se govoriti o posebnosti Balkanskog poluostva kao pribežišta za ispitivanu vrstu. Međutim, zabeleženo je prisustvo restrikcionih obrazaca koji ranije nisu uočeni (obrazac D enzima *EcoRI*; obrazac J enzima *HaeIII*; obrasci P i R enzima *HpaII*). Ovakav podatak treba uzimati sa rezervom s obzirom da ovi restrikcioni obrasci mogu postojati i u drugim delovima areala vrste, i da nisu detektovani zbog inače male učestalosti endemičnih haplotipova. Naime, za haplotipove niskih učestalosti kod *D. subobscura* u celom arealu vrste i važi obrazac da su često prisutni samo u pojedinačnim populacijama, ili sezonama u okviru iste populacije. Objašnjenje ovakve distribucije je da retki haplotipovi nestaju nakon smanjenja veličine populacija koja se odigravaju u nepovoljnim uslovima, kakvi su hladnoća zimi i letnje suše. Oni zatim ponovo nastaju od dva dominantna haplotipa mutacijama. Tako retki haplotipovi koji nastaju u toku sezone, i za koje je pokazano da mogu imati selektivnu prednost (Christie i sar. 2011), nestaju usled male efektivne veličine populacije za mtDNK markere.

Na osnovu analize mtDNK varijabilnosti *D. subobscura* Balkanskog poluostrva, i sličnosti sa ostalim populacijama u arealu, nameće se zaključak da su ove populacije svojom mtDNK varijabilnošću sigurno doprinele rekolonizaciji Evropskog kontinenta. Međutim, ne može se izvesti zaključak koji bi dao prednost Balkanskom poluostrvu u odnosu na druga pribežišta, kao u slučaju inverzionog polimorfizma. Takođe, može se zaključiti da je postojanje ovakvog obrasca varijabilnosti mtDNK, sa prisustvom dva dominantna haplotipa stabilno i verovatno starije od poslednjeg perioda glacijacije. Ovakav obrazac varijabilnosti zabeležen je u celom arealu vrste, čak i na Mediteranskim ostrvima za koja se pretpostavlja da nisu značajno doprinela rekolonizaciji Evropskog

kontinenta u interglacijalnom periodu (Krimbas i Powell 1992). Izuzetak od ovakve distribucije predstavlja slučaj Kanarskih ostrva, gde je na nekim ostrvima dominantan haplotip VIII. Takođe, mtDNK varijabilnost nije ispitivana u regionu severne Afrike. Poznavanje varijabilnosti u navedenom regionu bi mogla da pruži bolji uvid u ulogu istorijskih i adaptivnih procesa u oblikovanju varijabilnosti mtDNK, s obzirom da podaci dobijeni analizom inverzionog polimorfizma ukazuju da ovaj region nije u značajnoj meri doprineo rekolonizaciji Evrope usled postojanja geografskih barijera.

S obzirom na umereniju mikroklimu, tj. ublažene efekte sredinskih promena koji bi mogli da uzrokuju smanjenje veličine populacija u klisurama i kanjonskim dolinama pored dva dominantna haplotipa, očekivano je prisustvo veće učestalosti nekih drugih mtDNK varijanti pa time i veći haplotipski diverzitet. Klimatski uslovi u ovim specifičnim staništima bi mogli da obezbede veću kontinuiranost veličine populacija, pa samim tim i mogućnost novonastalim mtDNK varijantama da se zadrže u populacijama. U prilog očekivanju veće genetičke raznovrsnosti, pored pretpostavki drugačije populacione istorije, ide i veća diferencijacija staništa u okviru klisura i kanjona, u odnosu na ostala analizirana staništa, pa samim tim i raznovrsniji trofički resursi.

Razmatrajući varijabilnost u populacijama izlovljenim u klisurama i kanjonskim dolinama, ne možemo govoriti o većem stepenu genetičkog diverziteta u poređenju sa ostalim populacijama. Visok haplotipski diverzitet zabeležen je samo u populaciji S, dok je on u populaciji T najniži. Sa druge strane u populaciji DP, poreklom iz staništa koje nema pribežišne osobenosti, zabeležen je najveći haplotipski diverzitet, dok populacija BB ima najveći broj različitih haplotipova. Populacija BB se nalazi u urbanom delu Beograda, izloženom stalnim antropogenim uticajima. Nešto viši stepen diverziteta u ovoj populaciji može se objasniti novim ekološkim nišama koje su nastale pod dejstvom urbanizacije (Valiati i Valente 1997). Moguće je da istorijski i adaptivni procesi deluju *in situ* u smeru povećanja diverziteta u staništima sa pribežišnim svojstvima, ali da visok protok gena kod ove vrste (Ayala i sar. 1989) maskira njihov rezultat.

Osim haplotipova niske učestalosti koji se razlikuju u restrikcionim obrascima, u populaciji S je uočen haplotip koji pokazuje restrikcioni obrazac haplotipa I, ali mu je celokupna mtDNK duža za 2,7 kb u odnosu na ostale haplotipove. Na osnovu

restriktione analize i delimičnog sekvenciranja, zaključeno je da se insertovani segment sastoji od A+T bogatog – kontrolnog regiona, gena za malu ribozomalnu RNK (srRNK), tri gena za tRNK, kao i sekvence koja je nastala spajanjem dela velike ribozomalne RNK (lrRNK) i dela *ND2* gena. Poznato je da se različite vrste roda *Drosophila* razlikuju u dužini mtDNK (Solignac i sar. 1986; Monforte i sar. 1993), a uočene razlike u dužini su po pravilu uzrokovane varijabilnošću A+T bogatog, kontrolnog regiona. Manje razlike u dužini mtDNK uzrokovane razlikama u A+T regionu su uočene i u okviru vrste *D. subobscura* (Brehm i sar. 2004). Gonzalez i sar. (1994) su pronašli veću inserciju, dužine oko 600 bp, u kontrolnom regionu IF linije koja je poticala iz Valensije (Španija). Međutim, IF linija koja potiče od ženke izlovljene u populaciji S, prema našem saznanju nosi najdužu mtDNK kod ove vrste. Ovakva velika insercija sa dupliranim celokupnim kontrolnim regionom može predstavljati dobar model sistem u molekularno-biološkim i evolucionim studijama koje se odnose na mtDNK.

Rezultati AMOVA pokazali su da su populacije slabo, ali značajno genetički diferencirane po mtDNK. U parovnim poređenjima rezultati F-statistike pokazuju da se populacije DP i L značajno diferenciraju u odnosu na ostale populacije, dok između njih  $F_{ST}$  vrednost ne pokazuje značajno odstupanje od nule ( $F_{ST} = -0,01859$ ;  $p = 0,999$ ). Odnos učestalosti dva dominantna haplotipa najviše utiče na uočeni obrazac razlika. Jedino je u populacijama DP i L zabeležena veća učestalost haplotipa I u odnosu na haplotip II. Navedene dve populacije su uzorkovane u približno isto vreme (juni 2011. godine), a učestalosti haplotipa I u njima iznose nešto iznad 50% (Tabela MT-1). Populacije B, H, BB i S su takođe simultano uzorkovane (juni 2010. godine), a između njih je zabeležena slična učestalost haplotipa I od oko 30%. Najniža učestalost haplotipa I je uočena u populaciji T (25,81%), a ova populacija je jedina uzorkovana u septembru 2008. godine. Moguće je da su opšti klimatski uslovi šireg geografskog područja, koji se razlikuju iz godine u godinu, ali i između sezona, oblikovali učestalosti dva haplotipa. Ranije studije su takođe ukazale na značaj sredinskih promena na oblikovanje varijabilnosti mtDNK kod *D. subobscura*. Analizirajući dinamiku promene učestalosti haplotipova u toku godine Christie i sar. (2010) su pokazali da haplotip I dostiže maksimum učestalosti u junu mesecu, kada vladaju najoptimalniji uslovi za *D. subobscura*. Praćeno je i preživljavanje nosilaca dva haplotipa u laboratorijskim uslovima pri različitim

gustinama larvi (Christie i sar. 2004). Pokazano je da haplotip II ima bolje iskorišćenje laboratorijskog medijuma i pokazuje bolje preživljavanje pri optimalnoj gustini larvi. Autori su pretpostavili da i u prirodnim populacijama u nepovoljnim uslovima haplotip II pokazuje prednost nad haplotipom I.

U svim ispitivanim populacijama zabeležene su negativne vrednosti Tadžiminog D testa, kao i Fuovog testa. Na negativne vrednosti je uticala brojnost haplotipova sa niskim učestalostima, pa se ovakav rezultat najbolje objašnjava pretpostavkom da su populacije prošle kroz usko grlo, a zatim je došlo do naglog povećanja cenzusa, tj. ekspanzije. Ovakav podatak je u skladu sa svim ranijim studijama varijabilnosti mtDNK kod ispitivane vrste, gde su u većini slučajeva dobijene negativne D vrednosti. Iako je analiza mikrosatelitske varijabilnosti pokazala da populacije nisu u skorije vreme doživele značajno smanjenje brojnosti, mora se uzeti u obzir da su zbog materinskog tipa nasleđivanja mtDNK markeri četiri puta osetljiviji na smanjenje veličine populacije. Ni u jednoj populaciji se D vrednosti nisu značajno razlikovale od nule, dok su vrednosti Fuovog testa bile značajne u populacijama BB i DP. Značajno odstupanje D i Fs vrednosti od nule zabeleženo je kada su grupisani haplotipovi iz svih populacija. Uočeno je da kada se populacije podele na dve grupe prema tipu staništa (klisure i kanjoni u jednoj nasuprot ostalima), za one koje su izlovljavane u klisurama i kanjonima nije zabeleženo značajno odstupanje D vrednosti od nule, dok grupa populacija koje nisu izlovljavane iz refugijalnih staništa pokazuju značajno odstupanje D vrednosti od nule. Sa druge strane rezultati Fuovog testa su pokazali značajno odstupanje kako u grupi populacija iz klisura i kanjona, tako i u svim preostalim populacijama ukupno, međutim zabeležena apsolutna Fs vrednost i značajnost je bila veća u slučaju populacija izvan klisura i kanjona. Ovakav rezultat Tadžiminog i Fuovog testa ukazuju na izraženije smanjenje brojnosti, a zatim i izraženiju ekspanziju veličine populacija koje naseljavaju nepribežišna staništa, u poređenju sa onim iz klisura i kanjona. Naime, umereniji, stabilniji, ali i raznovrsniji uslovi sredine u klisurama i kanjonima su verovatno uzrokovali manje fluktuacije u brojnosti kako tokom dužeg istorijskog razdoblja, tako i na manjim razmerama, tj. promenama sezona u toku godine. Sa druge strane na visoke apsolutne D i Fs vrednosti populacija van klisura i kanjona su najviše uticale populacije DP i BB, koje su zajedno pokazale značajnost u oba testa, kao i pojedinačno u Fuovom testu. Moguće je da planinske populacije B i H, za razliku od

nizijskih BB i DP, prolaze kroz manje izrazite fluktuacije u brojnosti zbog odsustva, ili slabije izraženog smanjenja brojnosti u toku letnje sušne sezone. Analizirajući demografsku istoriju populacija afričkih tropskih leptira *Bicyclus anynana* analizom mtDNK, a primenom D i Fs testa, de Jong i sar. (2011) takođe pokazuju intenzivniju ekspanziju populacija sa udaljavanjem od refugijalnog centra.

## Povezanost hromozomske i mitohondrijalne DNK varijabilnosti

U poređenju sa studijom Oliver i sar. (2002), koji su utvrdili prisustvo neravnoteže vezanosti aranžmana hromozoma J i mtDNK haplotipova u populaciji sa ostrva Majorke (Španija), varijabilnost mtDNK haplotipova u ovoj studiji je analizirana na drugačijem sistemu jedarnih pozadina. U svim analiziranim populacijama, može se uočiti veća učestalost standardnih hromozomskih aranžmana u poređenju sa populacijom sa Majorke. Takođe, u slučaju A, U, E i O hromozoma postoje velike razlike u najučestalijim hromozomskim aranžmanima ( $A_{ST}$  i  $A_1$  nasuprot  $A_{ST}$  i  $A_2$ ;  $U_{1+2}$  i  $U_{1+2+6}$  nasuprot  $U_{1+2}$  i  $U_{1+2+8}$ ;  $E_{ST}$ ,  $E_8$ , i  $E_{1+2+9}$  nasuprot  $E_{1+2}$  i  $E_{1+2+9+4}$ ;  $O_{ST}$  i  $O_{3+4}$  nasuprot  $O_{3+4}$ ,  $O_{3+4+8}$ , i  $O_{3+4+23+6}$ ). Uočene razlike u inverzionom polimorfizmu između balkanskih populacija i populacije sa ostrva Majorka pružaju priliku za testiranje neravnoteže vezanosti na različitim jedarnim pozadinama za pomenute hromozome, za koje je ranije pokazano njeno odsustvo.

Kod analizirane tri balkanske populacije nije uočena značajna neravnoteža vezanosti između hromozomskih aranžmana i mtDNK haplotipova. U slučaju određenih hromozomskih aranžmana uočene su manje razlike u učestalosti haplotipova koje mogu da ukažu na slabu neravnotežu vezanosti. Moguće je da su cito-nukleusne interakcije uključene u oblikovanje i održavanje mtDNK varijabilnosti, ali da su u analiziranim populacijama jedarni aleli uključeni u interakcije, na drugačiji način i/ili slučajno raspoređeni u različitim hromozomskim aranžmanima. Naime, koadaptaciona hipoteza predviđa međupopulacione razlike za alelske kombinacije istog genskog aranžmana (Hoffmann i sar 2004). Tako parametri neravnoteže vezanosti mogu imati suprotne znakove u različitim populacijama. Na primer, u populaciji sa Majorke zabeležena je pozitivna D vrednost u slučaju asocijacije haplotipa I i  $J_{ST}$  hromozomskog aranžmana (Oliver i sar. 2002, 2005), dok je u sve tri populacije u ovoj studiji odgovarajuća D vrednost negativna.

Moguće je da je neravnoteža vezanosti prolaznog tipa, te da njeno prisustvo zavisi od vremena uzorkovanja. Ovakva pretpostavka podrazumeva da kombinacija određenih haplotipova i hromozomskih aranžmana daje selektivnu prednost u određenim dobima godine, i kasnije nestaje. Tri činjenice idu u prilog hipotezi



prolaznosti neravnoteže vezanosti između navedenih markera: 1) Christie i sar. (2010) su pokazali da se učestalosti haplotipova menjaju tokom godine. Haplotip I je najčešći u periodu sa optimalnom temperaturom i vlažnošću vazduha. Sa druge strane haplotip II pokazuje maksimalnu učestalost pri lošijim sredinskim uslovima; 2) Učestalosti hromozomskih aranžmana se menjaju tokom godine (Burla i Gotz 1965; Rodríguez-Trelles i sar. 1996; Živanović 2007); 3) Pokazano je i da su razlike u komponentama adaptivne vrednosti nosilaca dva haplotipa uzrokovane cito-nukleusnim interakcijama (Christie i sar. 2011).

Konačno, treba istaći i geografske osobenosti analiziranih lokaliteta i uticaj koji bi protok gena mogao da ima na maskiranje cito-nukleusne neravnoteže vezanosti u ispitivanim populacijama u poređenju sa populacijom sa Majorke. Naime, usled izolovanosti u ostrvskim populacijama mogu biti zaštićene lokalno adaptirane kombinacije inverzionih aranžmana i haplotipova, od kombinacija koje dolaze iz drugih područja. Ova hipoteza može biti ispravna uzimajući u obzir visok protok gena kod *D. subobscura* (Ayala i sar. 1989), kao i trajnost i bogatstvo ekološkog diverziteta na Balkanskom poluostrvu. Studija autbridginga kod ove vrste je pokazala da su i geografski bliske populacije, koje naseljavaju ekološki različita staništa, genetički različite (Kurbalija i sar. 2010). U prilog ovoj hipotezi idu podaci dobijeni analizom neravnoteže vezanosti između alozima i mtDNK haplotipova. Analizirajući nekoliko kontinentalnih populacija *D. subobscura* Moya i sar. (1993) nisu detektovali neravnotežu vezanosti između navedenih markera. Ipak, Castro i sar. (1999) detektuju značajnu neravnotežu vezanosti za jedan alozimski lokus u populaciji koja takođe potiče sa Balearskih ostrva. Dakle, migranti mogu unositi različito adaptirane jedarno-mitohondrijalne kombinacije alela i tako maskirati lokalno uspostavljenu neravnotežu vezanosti. Lokalno specifična selekcija cito-nukleusnih varijanti u sadejstvu sa visokom stopom protoka gena može biti i jedno od objašnjenja prisustva dva vodeća haplotipa kod *D. subobscura*.

Uprkos odsustvu statistički značajne cito-nukleusne neravnoteže vezanosti u tri ispitivane populacije, uočava se trend zajedničke promene učestalosti mtDNK haplotipova i pojedinih hromozomskih aranžmana. Najniža učestalost haplotipa I je uočena u populaciji T (25,8%). Nešto višu učestalost poseduje populacija S (32,4%), dok je najviša učestalost zabeležena u populaciji L (52,6%). Istim redom raste učestalost standardnih hromozomskih aranžmana, za koje je pokazano da su adaptirani na hladnije

uslove (Menozzi i Krimbas 1992). Uočava se i izuzetak za učestalosti standardnih aranžmana za hromosome U i O, jer u populaciji L one nisu najniže (Tabela IP-1). Dakle, haplotip I je češći u populacijama u kojima su češći hromozomi sa inverzionim aranžmanima koji su adaptirani na toplije sredinske uslove. Ovakav obrazac je u skladu sa većom učestalošću haplotipa I u najtoplijem periodu godine (Christie i sar. 2010). Ovakva povezanost dva genetička markera može biti ishod nezavisnog uticaja variranja sredinskih činilaca na hromozomske inverzije i mtDNK haplotipove. Sa druge strane, moguće je da postoje složene, sredinski zavisne, epistatičke interakcije između mtDNK i više lokusa na nekoliko hromozoma. Ovakve interakcije nemoguće je uočiti ako posmatramo vezanost sa pojedinačnim hromozomskim aranžmanima. I zaista, sredinski zavisna epistaza između mtDNK i jedarnih gena je potvrđena kod insekata (Arnquist i sar. 2010).

## Zaključci

Opšta slika raznovrsnosti populacija *D. subobscura* klisura i kanjonskih dolina po sva tri analizirana genetička markera u velikoj meri odgovara varijabilnosti šireg područja centralnog dela Balkanskog poluostrva.

Analizom inverzionog polimorfizma uočili smo, u nekim populacijama iz klisura i kanjona prisustvo genskih aranžmana niske učestalosti, koji nisu prisutni u ostalim populacijama. Takođe, neki genski aranžmani su u nešto višim učestalostima i konzistentnije prisutni u populacijama klisura i kanjona, u poređenju sa ostalim populacijama, kako onim iz ove studije, tako i iz drugih radova.

Molekularni markeri nisu pokazali specifične obrasce varijabilnosti, kakvi se mogu uočiti u slučaju hromozomske varijabilnosti na području Balkanskog poluostrva, gde su prisutni endemični hromozomski aranžmani visokih učestalosti.

Studija mikrosatelitske varijabilnosti nije pokazala drugačiju populacionu istoriju populacija iz klisura i kanjona i ostalih populacija. Populacije centralnog dela Balkanskog poluostrva nisu međusobno diferencirane po mikrosatelitima. Niske, ali značajne vrednosti diferencijacije dobijene u nekim poređenjima su verovatnije uzrokovane slučajnim procesima, s obzirom na pokazanu selektivnu neutralnost mikrosatelitskih lokusa. Visoka efektivna veličina populacija po ovom markeru ograničila je uticaj slučajnih procesa na populacionu diferencijaciju.

Testovi koji uočavaju promene populacione demografije, na osnovu mtDNK markera ukazuju na stabilniju populacionu istoriju u klisurama i kanjonskim dolinama u poređenju sa ostalim populacijama. Ovakvi rezultati mogu biti rezultat ekspanzije populacija nakon ledenog doba, ali i nakon sezonskih ekspanzija na manjoj vremenskoj skali. Stoga se sa većom težinom može izvesti zaključak o uticaju umerenosti klimatskih činilaca, kao i raznovrsnosti staništa u klisurama i kanjonskim dolinama, ali i dalje ostaje otvoreno pitanje koje bi se ticalo dužih vremenskih razdoblja, imajući u vidu visok disperzioni kapacitet ove vrste. Analizirane populacije centralnog dela

Balkanskog poluostrva su slabo, ali značajno diferencirane po mtDNK, a na uočene obrasce diferencijacije između pojedinačnih populacija je uticao odnos dva najčešća haplotipa, koji je verovatno pod uticajem selektivnih činilaca u prirodnim populacijama.

Neravnoteža vezanosti između hromozomskih aranžmana i mtDNK haplotipova nije široko zastupljena pojava u prirodnim populacijama *D. subobscura*. Njeno prisustvo zavisi od evolutivnih činilaca koji različito deluju u prostoru i vremenu u zavisnosti od ekoloških, geografskih, ali moguće, i od istorijskih procesa. Uočeni su trendovi zajedničkog variranja mtDNK haplotipova i hromozomskih aranžmana koji najverovatnije ukazuju na adaptivni značaj cito-nukleusnih interakcija.

Sveobuhvatno, genetički podaci ukazuju da su klisure i kanjonske doline i njihova specifična staništa mogle biti pribežišta za *D. subobscura*, i/ili usputne stanice u nepovoljnim uslovima sredine u rekolonizaciji evropskog kontinenta.

# Literatura

- Aguilar A., Roemer G., Debenham S., Binns M., Garcelon D., Wayne R.K. (2004) High MHC diversity maintained by balancing selection in an otherwise genetically monomorphic mammal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**: 3490-3494.
- Alfonso J.M., Volz A., Hernandez M., Ruttkay H., Gonzalez M., Larruga J.M., Cabrera V.M., Sperlich D. (1990) Mitochondrial DNA variation and genetic structure in Old-World populations of *Drosophila subobscura*. *Mol. Biol. Evol.*, **7**(2): 123–142.
- Anderson L.L., Sheng Hu.F., Nelson D.M., Petit R.J., Paige K.N. (2006) Ice-age endurance: DNA evidence of a white spruce refugium in Alaska. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **13**: 12447-12450.
- Andjelković M., Savković V., Kalajdžić P. (2003) Inversion polymorphism in *Drosophila subobscura* from two different habitats from the mountain of Goč. *Hereditas*, **138**: 241-243.
- Andjelković M., Stamenković-Radak M., Kurbalija Z., Kenig B., Rašić G., Savković V., Kalajdžić P., Savić T. (2007) The study of chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura* over years in two different habitats from the mountain Goč. *Genetika*, **39**: 155-167.
- Antao T., Lopes A., Lopes R.J., Beja-Pereira A., Luikart G (2008) LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a  $F_{ST}$ -outlier method. *BMC Bioinformatics*, **9**: 323.
- Arnquist G., Dowling D.K., Eady P., Gay L., Tragenza T., Tuda M., Hosken D.J. (2010) Genetic architecture of metabolic rate: Environmental specific epistasis between mitochondrial and nuclear genes in an insect. *Evolution*, **64**(12): 3354-3363.

- Avice J. C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.
- Ayala F.J., Serra L., Prevosti A. (1989) A grand experiment in evolution: the *Drosophila subobscura* colonization of the Americas. *Genome*, **31**(1): 246-255.
- Bachtrog D., Weiss S., Zagerl B., Brem G., Schlöterer C. (1999) Distribution of dinucleotide microsatellites in the *Drosophilla melanogaster* genome. *Mol. Biol. Evol.*, **16**: 602-610.
- Barker J.S.F., Frydenberg J., Sarup P., Loeschcke V. (2010) Altitudinal and seasonal variation in microsatellite allele frequencies of *Drosophila buzzatii*. *J. Evol. Biol.* **24**: 430-439.
- Balanyá J., Oller J.M., Huey R.B. Gilchrist G.W., Serra L. (2006) Global genetic change tracks global climate warming in *Drosophila subobscura*. *Science*, **313**(5794): 1773-1775.
- Benett K.J. (1997) *Evolution and Ecology: The Pace of Life*. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Bennett K.B., Provan J. (2008) What do we mean by 'refugia'? *Quat. Sci. Rev.*, **27**: 2449-2455.
- Beaumont M.A. (2005) Adaptation and speciation: what can  $F_{ST}$  tell us? *Trends Ecol. Evol.* **20**(8): 435-440.
- Beaumont M.A., Nichols R.A. (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*, **263**: 1619– 1626.



- Billings W.D., Anderson L.E. (1974) Some microclimate characteristics of habitats of endemic and disjunct bryophytes in the Southern Blue Ridge. *The bryologist*, **69**: 76-95.
- Bos D.H., Gopurenko D., Williams R.N., DeWoody J.A. (2008) Inferring population history and demography using microsatellites, mitochondrial DNA, and major histocompatibility complex (MHC) genes. *Evolution*, **62**(6): 1458-1468.
- Brehm A., Harris D.J., Hernández M., Perey J.A., Larruga J.M., Pinto F.M., González A.M. (2004) Phylogeography of *Drosophila subobscura* from north Atlantic islands inferred from mtDNA A+T rich region sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.*, **30**(3): 829-834.
- Brito P. (2005) The influence of Pleistocene glacial refugia on tawny owl genetic diversity and phylogeography in western Europe. *Mol. Ecol.*, **14**: 3077-3094.
- Brito P.H. (2007) Contrasting patterns of mitochondrial and microsatellite genetic structure among Western European populations of tawny owls (*Stix aluco*). *Mol. Ecol.*, **16**: 3423-3437.
- Burla H., Gotz W. (1965) Veränderlichkeit des chromosomalen Polymorphismus bei *Drosophila subobscura*. *Genetica*, **36**(1): 83-104.
- Cáceres M., Ranz J.M., Barbadilla A., Long M., Ruiz A., (1999) Generation of a widespread *Drosophila* inversion by a transposable element. *Science*, **285**(5426): 415-418.
- Campos J.L., Posada D., Moran P. (2006) Genetic variation at MHC, mitochondrial and microsatellite loci in isolated populations of Brown trout (*Salmo trutta*). *Conserv. Genet.*, **7**: 515-530.

- Castro J.A., Ramon M., Picornell A., Moya A. (1999) The genetic structure of *Drosophila subobscura* populations from the islands of Majorca and Minorca (Balearic Islands, Spain) based on allozymes and mitochondrial DNA. *Heredity*, **83**(3): 271–279.
- Castro J.A., Oliver P., Christie J.S., Picornell A., Ramon M., Moya A. (2003) Assortative mating and fertility in two *Drosophila subobscura* strains with different mitochondrial DNA haplotypes. *Genetica*, **119**(3): 295–301.
- Castro J.A., Barrio E., González A., Picornell A., Ramon M.M., Moya A. (2010) Nucleotide diversity of a *ND5* fragment confirms that population expansion is the most suitable explanation for the mtDNA haplotype polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetica*, **138**(8): 819–829.
- Cavalli-Sforza L.L. (1966) Population Structure and Human Evolution. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*, **164**: 362–379.
- Christie J.S., Castro J.A., Oliver P., Picornell A., Ramon M.M., Moya A. (2004) Fitness and life-history traits of the two major mitochondrial DNA haplotypes of *Drosophila subobscura*. *Heredity*, **93**(4): 371–378.
- Christie J.S., Picornell A., Moya A., Ramon M.M., Castro J.A. (2010) Dynamics of the mtDNA haplotype variability in a *Drosophila subobscura* population over a two-year period. *Open Evol. J.*, **4**(1): 23–30.
- Christie J.S., Picornell A., Moya A., Ramon M.M., Castro J.A. (2011) Mitochondrial DNA effects on fitness in *Drosophila subobscura*. *Heredity*, **107** (3): 239–245.
- Clary D.O., Wolstenholme D.R. (1987) *Drosophila* mitochondrial DNA: conserved sequences in the A+T rich region and supporting evidence for a secondary structure model of the small ribosomal RNA. *J. Mol. Evol.*, **25**(2): 116–125.

- Clutton-Brock T.H. (1989) Female transfer and inbreeding avoidance in social mammals. *Nature*, **337**: 70-72.
- Colbert J., Danchin E., Dhondt A.A., Nichols J.D. (2001) *Dispersal*. Oxford University Press, New York.
- Comes H.P., Kadereit J.W. (1998) The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Plant Sci.*, **3**: 432-438.
- Cooper S.J.B., Ibrahim K.M., Hewit G.M. (1995) Postglacial expansion and genome subdivision in the european grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Mol. Ecol.*, **4**: 49-60.
- Coppe G.R. 1994. The response of insect faunas to glacial-interglacial climatic fluctuations. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, **344**: 19-26.
- Cornet J.M., Luikart G. (1997) Descriptions and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**: 2001-2014.
- Dean M.D., Ballard K.J., Glass A., Ballard J.W.O. (2003) Influence of two *Wolbachia* strains on population structure of East African *Drosophila simulans*. *Genetics*, **165**: 1959–1969.
- de Jong M.A., Wahlberg N., van Eijk Marleen, Brakefield P.M., Zwaan B.J. (2011) Mitochondrial DNA signature for range-wide populations of *Bicyclus anynana* suggests a rapid expansion from recent refugia. *PLoS ONE*, **6**(6): e21385. doi:10.1371/journal.pone.0021385.

- Delprat A., Negre B., Puig M., Ruiz A. (2009) The Transposon *Galileo* Generates Natural Chromosomal Inversions in *Drosophila* by Ectopic Recombination. *PLoS ONE*, **4**(11): e7883. doi:10.1371/journal.pone.0007883.
- Dobzhansky Th. (1948) Chromosomal variation in populations of *Drosophila pseudoobscura* which inhabit northern Mexico. *Am. Nat.* **82**(803): 97–106.
- Dobzhansky Th. (1952) Nature and origin of heterosis, in Heterosis, Gowen, JW Ed, Iowa State University Press, Ames, IA.
- Dobzhansky Th. (1962) Rigid vs. Flexible chromosome polymorphism in *Drosophila*. *Am. Nat.* **96**: 321.
- Excoffier L., Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Resour.*, **10**: 564-567.
- Fedorov V.B., Stenseth N. C. (2001) Glacial survival of the Norwegian lemming (*Lemmus lemmus*) in Scandinavia: inference from mitochondrial DNA variation. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*, **268**: 809-814.
- Flanders J., Jones G., Benda P., Dietz C., Zhang S., Li G., Sharifi M., Rossiter S.J. (2009) Phylogeography of the greater horseshoe bat, *Rhinolophus ferrumequinum*: contrasting results from mitochondrial and microsatellite data. *Mol. Ecol.*, **18**: 306-318.
- Fu Y-X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**: 915-925.

- Gao J.J., Watabe H.A., Aotsuka T., Pang J.F., Zhang Y.P. (2007) Molecular phylogeny of the *Drosophila obscura* species group, with emphasis on the Old World species. *BMC Evol. Biol.*, **7**:87.
- García-Martínez J., Castro J.A., Ramón M., Latorre A., Moya A. (1998) Mitochondrial DNA haplotype frequency in natural and experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genetics*, **149**(3): 1377–1382.
- Goldstein D.B., Schlötterer C. (Eds) (1999) *Microsatellites: evolution and applications* Oxford: Oxford University Press.
- Gonzalez A., Carrio R., Fernandez-Pedrosa V., Moya A. (1994) Lack of seasonal changes in mitochondrial DNA variability of a *Drosophila subobscura* population. *J. Evol. Biol.* **7**(1): 29–38.
- Goudet J. (2002) Fstat (version 2.9.3.2) Institute of Ecology, UNIL, Lausanne, Switzerland.
- Haldane J.B.S. (1957) The conditions for coadaptation in polymorphism for inversions. *J. Genet.* **55**: 218-225.
- Halliburton, R. (2004) *Introduction to population genetics*. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, N.J.
- Hammer Ø., Harper D., Rayan P.D. (2001) PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol. Electron.* **4**: 4-9.
- Harrison R.G. (1989) Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology. *Trends Ecol. Evol.*, **4**: 6-11.

- Harumi Yen J., Barr A.R. (1971) New Hypothesis of the Cause of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*, **232**: 657 – 658.
- Hedrick P.W. (1980) Hitchhiking: A comparison of linkage and partial selfing. *Genetics*, **94**: 791-808.
- Heusser C.J. (1955) Pollen profiles from the Queen Charlotte Islands, British Columbia. *Can. J. Bot.*, **33**: 429-449.
- Hewitt G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linnean Soc.* **58**: 247-276.
- Hewitt G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**: 907-913.
- Hewitt G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **359**: 183-195.
- Hoffmann A.A., Sgrò C.M., Weeks A. (2004) Chromosomal inversion polymorphism and adaptation. *Trends Ecol. Evol.* **19**(9): 482-488.
- Huntley B., Birks H.J.B. (1983) An Atlas of Past and Present Pollen Maps for Europe 0-13,000 Years Ago, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Irvin S.D., Wetterstand K.A., Hutter C.M., Aquadro C.F. (1998) Genetic variation and differentiation at microsatellite loci in *Drosophila simulans*: evidence for founder effects in New World populations. *Genetics*, **150**: 777-790.
- Jadwiszczak K.A., Ratkiewicz M., Banaszek A. (2006) Analysis of molecular differentiation on a hybrid zone between chromosomally distinct races of the

common shrew *Sorex araneus* (Insectivora: Soricidae) suggests their common ancestry. *Biol. J. Linnean Soc.*, **89**: 79-90.

Jelić M., Kenig B., Kurbalija Z., Stamenković-Radak M., Anđelković M. (2009) Intra-species differentiation among *Drosophila subobscura* from different habitats in Serbia. *Arch. Bio. Sci., Belgrade*, **61**(3): 513-521.

Jovanović S., Jovanović-Dunjić R. (1986) Prilog poznavanju hazmofitske vegetacije kanjona Dervente (Nacionalni park Tara). *Glasnik Instituta za botaniku i botaničke bašte Jevremovac Univerziteta u Beogradu*, **20**: 33-43.

Kalajdžić P., Stamenković-Radak M., Anđelković M. (2006) The effect of different concentrations of lead on inversion polymorphism in *Drosophila subobscura*. *Hereditas*, **143**: 41-46.

Kashi Y., Soller M., (1999) Functional roles of microsatellites and minisatellites. In: Goldstein DB, Schlotterer C (eds) *Microsatellites: evolution and application*. Oxford University Press, Oxford.

Kenig B., Jelić M., Kurbalija Z., Stamenković-Radak M., Anđelković M. (2010) Inversion polymorphism in population of *Drosophila subobscura* from urban and non-urban environments. *Arch. Biol. Sci., Belgrade*, **62**(3): 565-574.

Kirkpatrick M., Barton N. (2006) Chromosome inversions, local adaptation and speciation. *Genetics*, **173**: 419-434.

Kojima K., Schaffer H.E. (1967) Survival processes of linked mutant genes. *Evolution*, **21**: 518-531.

Kozek W.J., Rao R.U. (2007) The Discovery of *Wolbachia* in Arthropods and Nematodes – A Historical Perspective. *Issues in Infectious Diseases*, **5**: 1–14.

- Krimbas C.B., Powell J.R. (1992) *Drosophila* inversion polymorphism. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Krimbas C.B. (1993) *Drosophila subobscura*: biology, genetics, and inversion polymorphism. Verlag Dr. Kovac, Hamburg.
- Kunze-Mühl E., Müller E. (1958) Weitere Untersuchungen ueber die chromosomal, Struktur and die natuerlichen Strukturtypen von *Drosophila subobscura*. *Chromosoma (Berl.)*, **9**: 559-570.
- Kurbalija Z., Stamenković-Radak M., Pertoldi C., Andjelković M. (2010) Outbreeding causes developmental instability in *Drosophila subobscura*. *Evol. Ecol.*, **54**(4): 839-864.
- Kurbalija Novičić Z., Jelić M., Jovanović M., Dimitrijević D., Savić Veselinović M., Stamenković-Radak M., Andjelković M. (2011) Microsatellite variability of *Drosophila subobscura* populations from the central Balkans. *Evol. Ecol. Res.* **13**(5): 479-494.
- Lakušić R. (1972) Specifičnost flore i vegetacije crnogorskih kanjona. *Glasnik Rep. zavoda za zaštitu prirode - Prir. Muzej*, **4**: 157-169.
- Latorre A., Moya A., Ayala F.J. (1986) Evolution of mitochondrial DNA in *Drosophila subobscura*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **83**(22): 8649–8653.
- Latorre A., Hernandez C., Martinez D., Castro J.A., Ramon M.M., Moya A. (1992) Population structure and mitochondrial DNA gene flow in Old World populations of *Drosophila subobscura*. *Heredity*, **68**(1): 15–24.
- Leonard J.A., Wayne R.K., Cooper A. (2000) Population genetics of ice age brown bears. *Proc. Natl Acad Sci., USA*, **97**: 1651-1654.



- Leroy S.A.G., Arpe K. (2007) Glacial refugia for summer-green trees in Europe and south-west Asia as proposed by ECHAM3 time-slice atmospheric model simulations. *J. Biogeogr.*, **34**: 2115-2128.
- Lewontin R.C. (1964) The interaction of selection and linkage. I. General considerations; heterotic models. *Genetics*, **49**: 49-67.
- Lewontin R.C. (1974) *The Genetic Basis of Evolutionary Change*, Columbia University Press, New York.
- Li Y.C., Korol A.B., Fahima T., Beiles A., Nevo E., (2004) Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol. Biol. Evol.*, **21**: 991-1007.
- Librado P., Rozas J. (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**: 1451-1452.
- Martinez D., Moya A., Latorre A., Fereres, A. (1992) Mitochondrial DNA variation in *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) populations from four Spanish localities. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, **85**: 241-246.
- Matvejev S. (1950) Rasprostranjenje i život ptica u Srbiji. *Posebna izdanja SAN, 161, Institut za ekol. i biogeogr. SAN, 3*: 38-41.
- Médail F., Diadema K. (2009) Glacial refugia influence plant diversity patterns in the Mediterranean Basin. *J. Biogeogr.*, **36**: 1333-1345.
- Menzio P., Krimbas C. B. (1992) The inversion polymorphism of *D. subobscura* revised: Synthetic maps of gene arrangement frequencies and their interpretation. *J. Evol. Biol.*, **5**(4): 625-641.

- Mettler L.E., Gregg T.G. (1969) Population genetics and evolution. Prentice-Hall Inc. Englewoods Cliffs, New Jersey.
- Mišić V. (1979) Reliktne polidominantne šumske zajednice Srbije. Matica srpska, Zbornik za prirodne nauke, Posebna izdanja, Novi Sad.
- Mišić V. (1981) Šumska vegetacija klisura i kanjona istočne Srbije. Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd.
- Monforte A., Barrio E., Latorre A. (1993) Characterization of the length polymorphism in the A+T rich region of the *Drosophila obscura* group species. *J. Mol. Evol.*, **36**(3): 214-223.
- Moritz C., Dowling T.E., Brown W.M. (1987) Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematic. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **18**: 269-292.
- Moya A., Barrio E., Martinez D., Latorre A., González-Candelas F., Ramon M., Castro J.A. (1993) Molecular characterization and cytonuclear disequilibria of two *Drosophila subobscura* mitochondrial haplotypes. *Genome*, **36**(5): 890–898.
- Noor M.A.F., Schug M.D., Aquadro C.F. (2000) Microsatellite variation in populations of *D. pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genet. Res.* **75**: 25-36
- Nunes M.D.S., Nolte V., Schlötterer C. (2008) Nonrandom *Wolbachia infection* status of *Drosophila melanogaster* strains with different mtDNA haplotypes. *Mol. Biol. Evol.* , **25**: 2493-2498.
- Oliver P., Castro J.A., Picornell A., Ramon M.M., Solé E., Balanyà J., Serra L., Latorre A., Moya A. (2002) Linkage disequilibria between mtDNA haplotypes and

chromosomal arrangements in a natural population of *Drosophila subobscura*. *Heredity*, **89**(2): 133–138.

Oliver P., Balanyà J., Ramon M.M., Picornell A., Serra L., Moya A., Castro J.A. (2005) Population dynamics of the 2 major mitochondrial DNA haplotypes in experimental populations of *Drosophila subobscura*. *Genome*, **48**(6): 1010–1018.

Orengo D.J., Prevosti A. (1996) Temporal changes in chromosomal polymorphism of *Drosophila subobscura* related to climatic changes. *Evolution*, **50**(3): 1346–1350.

O'Neill S.L., Giordano R., Colbert A.M., Karr T.L., Robertson H.M. (1992) 16SrRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbiont associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **89**: 2699-2702.

Pascual M., Schug M.D., Aquadro C.F. (2000) High density of long dinucleotide microsatellites in *Drosophila subobscura*. *Mol. Biol. Evol.*, **17**: 1259–1267.

Pascual M., Aquadro C., Soto V., Serra L. (2001) Microsatellite variation in colonizing and Palearctic populations of *Drosophila subobscura*. *Mol. Biol. Evol.*, **18**: 731–740.

Pascual M., Chapuis M.P., Mestres F., Balanyà J., Huey R.B., Gilchrist G.W., Serra L., Estoup A. (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite-based survey using ABC methods. *Mol. Ecol.*, **16**: 3069-3083.

Pemberton J.M., Slate J., Bancroft D.R., Barrett J.A. (1995) Nonamplifying alleles at microsatellite loci - a caution for parentage and population studies. *Mol. Ecol.*, **4**: 249-252.

- Petit R., Aguinagalde I., de Beaulieu J.L., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Müller-Starck G., Demesure-Musch B., Palmé A., Martin J.P., Rendell S., Vendramin G.G. (2003) Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**(5625): 1563-1565.
- Pinto F.M., Brehm A., Hernandez M., Larruga J., González A.M., Cabrera V.M. (1997) Population genetic structure and colonization sequence of *Drosophila subobscura* in the Canaries and Madeira Atlantic islands as inferred by autosomal, sex-linked and mtDNA traits. *J. Hered.* **88**(2): 108–114.
- Prevosti A. (1974) Chromosomal inversion polymorphism in the southwestern range of *Drosophila subobscura* distribution area. *Genetica*, **45**: 111-124.
- Prevosti A., Ocaña J., Alfonso G. (1975) Distances between populations of *Drosophila subobscura* based on chromosomal arrangement frequencies. *Theor. Appl. Genet.* **45**(6): 231-241.
- Prevosti A., Ribo G., Serra L., Aguadé M., Balanyà J., Monclus M., Mestres F. (1988) Colonization of America by *Drosophila subobscura*: Experiments in natural populations that support the adaptive role of chromosomal-inversion polymorphism. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **85**(15): 5597-5600.
- Provan J., Bennett K.D. (2008) Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends Ecol. Evol.*, **23**: 564-571.
- Radović I., Mesaroš G., Pavićević D., Mihajlović Lj., Protić Lj., Četković A. (1995) Diverzitet entomofaune (*Insecta*) Jugoslavije, sa pregledom vrsta od međunarodnog značaja. Biodiverzitet Jugoslavije, urednici dr Vladimir Stevanović i dr Voislav Vasić, Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu i Ecolibri, Beograd.

- Ramos-Onsins S.E., Rozas J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.*, **19**: 2092-2100.
- Rego C., Balanyà J., Fragata I., Matos M., Rezende E.L., Santos M. (2010) Clinal patterns of chromosomal inversion polymorphisms in *Drosophila subobscura* are partly associated with thermal preferences and heat stress resistance. *Evolution*, **64**: 385-397.
- Rice W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**: 223-225.
- Rodríguez-Trelles F., Alvarez G., Zapata C. (1996) Time-series analysis of seasonal changes of the O inversion polymorphism of *Drosophila subobscura*. *Genetics*, **142**(1): 179-187.
- Rokas A., Atkinson R.J., Webster L., Csoka G., Stone G.N. (2003) Out of Anatolia: longitudinal gradients in genetic diversity support an eastern origin for a circum-Mediterranean oak gallwasp *Andricus quercustorzae*. *Mol. Ecology*, **12**: 2153-2174.
- Rozas J., Hernández M., Cabrera V.M., Prevosti A. (1990) Colonization of America by *Drosophila subobscura*: effect of the founder event on the mitochondrial DNA polymorphism. *Mol. Biol. Evol.*, **7**(1): 103–109.
- Santos J., Serra L., Solé E., Pascual M. (2010) Fish mapping of microsatellite loci from *Drosophila subobscura* and its comparison to related species. *Chromosome Res.*, **18**(2): 213-226.
- Savković V., Stamenković-Radak M., Andjelković M. (2004) Diurnal variability of gene arrangement frequencies in *Drosophila subobscura* populations from two habitats. *J. Zool. Syst. Evol. Res.*, **42**: 208-214.

- Seddon J. M., Santucci F., Reeve N.J., Hewitt G.M. (2001) DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Mol. Ecol.*, **10**: 2187-2198.
- Schlötterer C.A. (2002) Microsatellite-based multilocus screen for the identification of local selective sweeps. *Genetics*, **160**: 753-763.
- Simoës P., Pascual M., Santos J., Rose M.R., Matos M. (2008) Evolutionary dynamics of molecular markers during local adaptation: a case study in *Drosophila subobscura*. *BMC Evol. Biol.*, **8**: 66.
- Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**: 457-462.
- Sokal R.R., Rohlf F.J. (1995) Biometry. 3rd edn. W.H. *Freeman and Co: New York*.
- Solignac M., Monnerot M., Mounolou J.C. (1986) Concerted evolution of sequence repeats in *Drosophila* mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.*, **24**(1-2): 53-60.
- Sommer R., Benecke N. (2005) The recolonization of Europe by brown bears *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 after the Last Glacial Maximum. *Mammal. Review.*, **35**: 156-154.
- Sperlich D., Pinsker W. (1980) Distribution pattern of chromosomal polymorphism in natural populations of *Drosophila*. *Atti Associazione Genetica Italiana*, **25**: 47-60.
- Sperlich D., Pfriem P. (1986) Chromosomal polymorphism in natural and experimental populations, in *The Genetics and Biology of Drosophila*, Vol. 3e, Asburner M., Carson H.L., Thompson J.N., Jr., Eds., Academic Press, New York.

- Srejović D. (1969) Lepenski vir. Nova praistorijska kultura u Podunavlju. Srpska književna zadruga , Beograd.
- Stamenković-Radak M., Rašić G., Savić T., Kalajdžić P., Kurbalija Z., Kenig B., Andjelković M. (2008) Monitoring of the genetic structure of natural populations: change of the effective population size and inversion polymorphism in *Drosophila subobscura*. *Genetica*, **133**: 57-63.
- Stewart R., Lister A.M. (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *Trends Ecol. Evol.*, **16**(11): 608-613.
- Stewart J.R., Dalén L. (2008) Is the glacial refugium concept relevant for northern species? A comment on Pruett and Winker 2005. *Clim. Change* **86**: 1-2.
- Stewart R., Lister A.M., Barnes I., Dalén L. (2010) Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proc. R. Soc. London B Biol. Sci.*, **277**: 661-671.
- Stouthamer R., Breeuwer J.A.J., Hurst G.D.D. (1999) *WOLBACHIA PIPIENTIS*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annu. Rev. Microbiol.*, **53**: 71-102.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G., Cosson J.F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.*, **7**:453-464.
- Tajima F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**: 585-595.
- Trepp W. (1947) Der Lindenmischwald (Tilieto-Asperuletum taurinae) *Pflanzen. geogr. Komm. Der Schweiz. Naturfor. Gesel. Bern.* **27**: 3-128.

- Thompson G. (1977) The effect of a selected locus on linked neutral loci. *Genetics*, **85**: 753-788.
- Tomanović Ž., Starý P. (2001) *Aphidius linosiphonis* sp. n. (Hymenoptera; Braconidae; Aphidiinae), a new member of the aphid parasitoid guild associated with *Galium*. *Zootaxa*, **6**: 1-4.
- Tomanović Ž., Kavallieratos N. G., Christos G. A., Stanisavljević LJ.Ž. (2003) A review of the West Palaearctic aphidiines (Hymenoptera; Braconidae; Aphidiinae) parasitic on *Uroleucon* spp., with the description of a new species. *Ann. Soc. Entomol. Fr. (n.s.)*, **39** (4): 343-353.
- Vasić V., Matvejev S., Ham J. (1980) Savremeni areal daurske laste, *Hirundo daurica* Temming 1835, u Srbiji i susednim zemljama. *Zbornik za faunu Srbije, SANU*, **1**: 85-100.
- Valdiosera C.E., García N., Anderung C., Dalén L., Crégut-Bonnoure E., Kahlke R-D., Stiller M., Brandström M., Thomomas M.G., Arsuaga J.L., Götherström A., Barnes I. (2007) Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears. *Mol. Ecol.*, **16**: 5140-5148.
- Valiati V.H., Valente V.L.S. (1997) Chromosomal polymorphism in urban populations of *Drosophila paulistorum*. *Braz. J. Genet*, **20**(4): on line.
- Wasserman M. (1968) Recombination-induced chromosomal heterosis. *Genetics* **58**: 125-139.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984) Estimating *F*-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**: 1358–1370.



- Weir B.S. (1996) Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sunderland, MA: Sinauer Associates.
- Wilder J.A., Diaz T., O'Neill R.J.W., Kenney J., Hollocher H. (2002) Characterization and isolation of novel microsatellites from three *Drosophila dunnii* subgroup. *Genet. Res.*, **80**: 177-185.
- Williams D., Dunkerley D., DeDeckker P., Kershaw P., Chappell M. (1998) Quaternary Environments, Arnold, London.
- Wright S. (1978) Evolution and the genetics of populations. Vol.4. Variability within and among natural populations. Univ. Of Chicago Press, Chicago.
- Zar H. J. (1999) Biostatistical Analysis. Prentice-Hall International. Upper Saddle River, New Jersey.
- Živanović G., Andjelković M., Marinković D. (2002) Chromosomal inversion polymorphism of *Drosophila subobscura* from south-east part of Europe. *J. Zool. Syst. Evol. Research* **40**: 201-204.
- Živanović G. (2007) Seasonal changes in chromosomal inversion polymorphism in a *Drosophila subobscura* natural population from a southeastern European continental refugium of the last glaciations period. *Russ. J. Genet.*, **43(12)**: 1344-1349.
- Živanović G., Mestres F. (2011) Changes in chromosomal polymorphism and global warming: The case of *Drosophila subobscura* from Apatin (Serbia). *Genet. Mol. Biol.*, **34(3)**: 489-495.

## Biografija autora

Mihailo Jelić je rođen 5. jula 1982. godine u Beogradu, gde je završio osnovnu školu i gimnaziju. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisao školske 2001/2002. godine na studijskoj grupi Molekularna biologija i fiziologija. U toku studija bio je stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, kao i Republičke fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka. Diplomirao je 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,51. Doktorske studije na smeru Genetika na Biološkom fakultetu upisuje 2007. godine.

Od 2007. godine radi kao saradnik u nastavi na Katedri za genetiku i evoluciju, a od 2008. godine kao asistent na istoj katedri za užu naučnu oblast Genetika i evolucija. Mihailo Jelić je u toku istraživačkog rada učestvovao u realizaciji dva nacionalna projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj (br. 143014), odnosno Ministarstva prosvete i nauke (br. 173012).

Mihailo Jelić je član Društva genetičara Srbije i Srpskog biološkog društva. 2012. godine je bio član sekretarijata simpozijuma „II Symposium of Population and Evolutionary Genetics, 9-12 May 2012, Belgrade“.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Михаило Јелић \_\_\_\_\_

број индекса \_\_\_\_\_ GO 070008 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

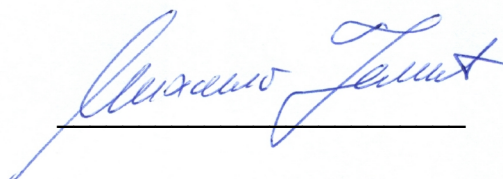
да је докторска дисертација под насловом

Хромозомска, микросателитска и митохондријална ДНК варијабилност популација  
*Drosophila subobscura* у клисурама и кањонима Србије

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

Потпис докторанда

У Београду, 21. X 2012. године \_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Михаило Јелић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ GO 070008 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ Генетика \_\_\_\_\_

Наслов рада

Хромозомска, микросателитска и митохондријална ДНК варијабилност популација  
*Drosophila subobscura* у клисурама и кањонима Србије

Ментор академик Марко Анђелковић, проф. др Марина Стаменковић-Радак

Потписани/а \_\_\_\_\_ Михаило Јелић \_\_\_\_\_

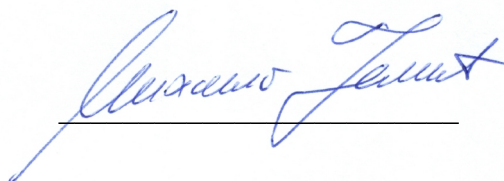
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 21. X 2012. године \_\_\_\_\_



\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Хромозомска, микросателитска и митохондријална ДНК варијабилност популација  
*Drosophila subobscura* у клисурама и кањонима Србије

која је моје ауторско дело.

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

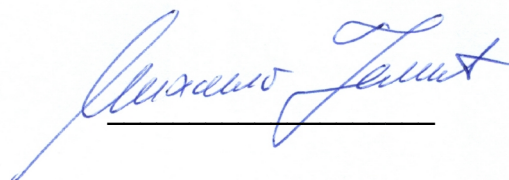
Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

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

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

Потпис докторанда

У Београду, 21. X 2012. године



\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

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

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

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

5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.