



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
DEPARTMAN ZA BIOLOGIJU I EKOLOGIJU



Nataša Kočiš Tubić

Populaciono-genetička karakterizacija ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia* L.) južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana

-doktorska disertacija-

Novi Sad, 2014.

Lista skraćenica korišćenih u tekstu:

AgNO₃ - srebro-nitrat

CTAB - hexadecyl-trimethyl-ammonium-bromide

dNTPs - deoxynucleotide triphosphates (deoksinukleotid trifosfati ili smeša slobodnih dinukleotida: dATP, dGTP, dCTP i dTTP)

EDTA - ethylenediaminetetraacetic acid (etilen diamin tetra sirćetna kiselina)

ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay (enzimski imunoadsorpcioni test)

EST - expressed-sequence tags (kratke DNK sekvence, od 200-500bp, dobijene sekvenciranjem klonova cDNK biblioteke)

MgCl₂ - magnezijum-hlorid

Multi-lokus test - test za određivanje odstupanja populacija od Hardy-Weinberg (HW) ekvilibriumu na osnovu podataka svih analiziranih lokusa, implementiran u programskom paketu GENEPOP 4.0.1 (Rousset, 2008)

Na₂CO₃ - natrijum-karbonat

NaBH₄ - sodium borohydride

NaCl - natrijum-hlorid

NaOH - natrijum-hidroksid

PCR - Polymerase Chain Reaction (lančana reakcija polimeraze)

PVP - polyvinyl-pyrrolidone

TEMED - tetra-methyl-ethylene-diamine

Tris - Trizma base

Mojoj porodici...

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	3
2.1. Bio-invazije i evolutivni mehanizmi uključeni u ove procese.....	3
2.2. Karakteristike vrste <i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.....	7
2.2.1. Taksonomija i distribucija.....	7
2.2.2. Introdukcija i rana distribucija ambrozije u Evropi.....	8
2.2.3. Biologija i disperzija.....	10
2.2.4. Uticaj na ljudsko zdravlje.....	12
2.2.5. Uticaj na poljoprivredu.....	13
2.2.6. Mere suzbijanja ambrozije.....	13
2.3. Genetička istraživanja <i>Ambrosia artemisiifolia</i>	15
2.3.1. Mikrosatelitski lokusi kao molekularni markeri.....	17
2.3.2. Populaciono-genetička istraživanja diverziteta ambrozije.....	22
3. CILJ ISTRAŽIVANJA.....	26
4. RADNA HIPOTEZA.....	27
5. MATERIJAL I METODE.....	28
5.1. Materijal.....	28
5.2. Metode.....	30
5.2.1. Izolacija genomske DNK.....	30
5.2.2. Mikrosatelitski lokusi i uslovi PCR reakcija.....	31
5.2.3. Metode detekcije i analize varijabilnosti produkata amplifikacije mikrosatelitsih lokusa.....	32
5.2.3.1. Detekcija produkata amplifikacije mikrosatelitsih lokusa.....	32
5.2.3.2. Analiza varijabilnosti produkata amplifikacije mikrosatelitsih lokusa.....	33
5.2.4. Obrada podataka.....	34
5.2.4.1. Procena genetičke varijabilnosti populacija.....	34
5.2.4.2. Genetička diferencijacija i struktuiranost populacija.....	36
6. REZULTATI.....	39
6.1. Genetička varijabilnost populacija ambrozije.....	39
6.2. Genetička diferencijacija i struktura populacija ambrozije.....	46
6.2.1. AMOVA analiza.....	46

6.2.2.	Genetička diferencijacija populacija na osnovu F_{st} vrednosti.....	47
6.2.3.	Koordinatna analiza (Principal Coordinate Analysis – PCoA).....	53
6.2.4.	Procena genetičke strukture populacija upotrebom STRUCTURE programskog paketa.....	57
6.2.5.	Mantel test i kvantifikacija protoka gena između populacija.....	68
6.2.6.	Test pripadnosti individua populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana.....	69
7.	DISKUSIJA.....	70
7.1.	Genetička varijabilnost i diferencijacija populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije..	71
7.2.	Genetička varijabilnost i diferencijacija populacija ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana.....	79
7.3.	Poređenje genetičke varijabilnosti i diferencijacije populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije sa populacijama peripanonskog prostora centralnog Balkana.....	83
7.3.1.	Potencijalno poreklo populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana na osnovu rezultata testa pripadnosti.....	87
7.4.	Deficit heterozigota u populacijama južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana.....	90
8.	ZAKLJUČAK.....	93
9.	LITERATURA.....	95
	Prilog 1.....	109

1. UVOD

Biološke invazije se danas prepoznaju kao deo globalnih promena, predstavljajući jednu od glavnih pretnji biodiverzitetu, funkcionisanju ekosistema, poljoprivredi, ali i ljudskom zdravlju. Istorijski gledano, fokus istraživanja invazivnih vrsta je bio baziran na ekološkom aspektu, međutim, postalo je jasno da je za razumevanje bio-invazija neophodan multidisciplinarni pristup. Trend savremene ekologije daje poseban značaj evolutivnim mehanizmima koji su uključeni u bioinvazije. Naime, saznanja o obimu protoka gena, prolasku populacija kroz genetičko usko grlo, tipu introdukcije (pojedinačna ili multipla), izvornim populacijama, kao i putevima introdukcije su od velikog značaja za razumevanje uspeha invazivnih vrsta, a sa krajnjim ciljem razvoja mera kontrole njihovog širenja.

Vrsta *Ambrosia artemisiifolia* L. 1753 (fam. Asteraceae) je jedna od najagresivnijih invazivnih biljaka u Evropi. Kao korovska vrsta uzrokuje velike ekonomske gubitke redukujući prinos poljoprivrednih kultura (npr. suncokreta, soje, kukuruza), a njena masovna produkcija polena stvara ozbiljne alergijske probleme kod ljudi. Uspešan je pionir i obilno raste na ruderalnim i urbanim staništima, kao što su površine pored puteva i pruga, građevinsko zemljište, obale reka, i to na različitim tipovima podloga. Iako *Ambrosia artemisiifolia* nije primarno samooplodna biljna vrsta i ne razmnožava se vegetativno, tri osnovne karakteristike mogu objasniti njen uspeh u osvajanju novih područja: ogromna produkcija polena koji se prenosi vetrom, visok fekunditet i vijabilnost semena. Poreklom je sa američkog kontinenta, ali je danas masovno raštrčana i kosmopolitska. U Evropu je prvi put introdukovana sredinom 19. veka, da bi u 20. veku počela njena ekspanzija na ovom području, što je rezultiralo prisustvom ambrozije u skoro svim evropskim zemljama. Međutim, Panonska nizija, zajedno sa kotlinom reke Rone u Francuskoj i severnom Italijom, predstavlja područje sa najvećom incidencom ove jednogodišnje korovske biljke.

Uvid u ključne parametre invazivnih procesa omogućuju populaciono-genetičke studije. Naime, upotreba molekularnih markera, kojima se proučava varijabilnost populacija direktno na nivou DNK, i određivanje osnovnih mera genetičkog diverziteta, pruža saznanja o evolutivnim mehanizmima uključenim u proces bioinvazije. Jedni od najinformativnijih i

najpouzdanijih molekularnih markera u populaciono-genetičkim i srodnim oblastima istraživanjima su mikrosatelitski markeri. Osobine ovih kratkih tandemskih ponovaka, kao što su hipervarijabilnost, kodominantnost, prisutnost duž čitavog genoma, objašnjavaju široku upotrebu mikrosatelita i prednost u odnosu na druge molekularne markere u populacionoj genetici. Pored ovih osobina, mikrosatelitske markere odlikuje i visoka stopa mutacija, koja zajedno sa pravcem mutacija, čini osnovni faktor u proceni genetičke distance na osnovu mikrosatelitskih podataka.

Pored činjenice da je Panonska nizija deo teritorije sa najvećom rasprostranjenosti ambrozije u Evropi, pa i u svetu (sa izuzetkom delova Severne Amerike gde je ova vrsta nativna), položaj pomenutog područja je takođe značajan. Naime, Panonska nizija se nalazi između Zapadne Evrope, na čijem području ambrozija vodi poreklo od populacija sa istočne obale Severne Amerike, i Istočne Evrope, sa ambrozijom poreklom iz zapadnih delova Severne Amerike (Gaudeul i sar., 2011). Ovo navodi na indicije da je introdukcija ambrozije u područje Panonske nizije, tačnije njen južni deo, nešto kompleksnija od pojedinačne (eng. single) introdukcije prisutne kod mnogih invazivnih vrsta. U prilog ovome idu i rezultati predhodnih istraživanja porekla *Ambrosia artemisiifolia* na području Francuske (Genton i sar., 2005a), istočne Evrope (Gladieux i sar., 2011), Kine (Li i sar., 2012), koji ukazuju na multiplu introdukciju ambrozije u ispitivane regione.

Obzirom na masovnost, invazivni karakter i negativan uticaj *Ambrosia artemisiifolia* kao korovsko-alergijske biljke u našoj zemlji, sprovode se istraživanja u cilju utvrđivanja rasprostranjenja na teritoriji Vojvodine (Boža i sar., 2002; Boža i sar., 2003), određuju biološke odlike i mogućnosti njenog suzbijanja (Boža i sar., 2006; Vrbničanin i Janjić, 2011; Janjić i sar., 2011), kao i morfološke odlike u zavisnosti od tipa zemljišta i uticaj mehaničkog tretmana na iste (Anačkov i sar., 2012). Takođe postoje aerobiološke studije koje ispituju karakteristike i koncentracije polena ambrozije u vazduhu na teritoriji Srbije (Šikoparija i sar., 2006; Šikoparija i sar., 2009). U polju populacione genetike, do sada su sprovedena pilot istraživanja genetičkog diverziteta manjeg broja populacija ambrozije sa teritorije Vojvodine (Kočiš Tubić i sar., 2009), Srbije (Kočiš Tubić i sar., 2010; Kočiš Tubić i sar., 2011), kao i Dunavskog (Kočiš Tubić i sar., 2012a) i Banatskog područja (Kočiš Tubić i sar., 2012b), koje su dale uvid u osnovne parametre genetičke varijabilnosti ispitivanih populacija.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Bio-invazije i evolutivni mehanizmi uključeni u ove procese

Proces bioloških invazija podrazumeva unos određenih vrsta u nova, nenativna područja, koja su van prirodnog okvira potencijalne disperzije unešenih vrsta, u kojima se ona zatim nastanjuju, razmnožavaju i šire (Novak, 2007). Shodno ovome, invazivne vrste su introdukovane vrste u područjima u kojima nisu evoluirale i u kojima poseduju različit potencijal adaptacije, susrećući se sa novim selektivnim pritiscima (Prentis i sar., 2008). Međutim, da bi se neka introdukovana vrsta definisala kao invazivna, ona mora da ispoljava i negativne uticaje u novoj sredini koju nastanjuje (Lee, 2002). Negativne posledice invazija uključuju: smanjenje biološkog diverziteta i narušavanje strukture prirodnih zajednica (u krajnjem slučaju potiskivanje i izumiranje nativnih vrsta), modifikaciju procesa uključenih u funkcionisanje ekosistema, smanjenje poljoprivredne produktivnosti, zdravstvene probleme u ljudskoj populaciji i ogromne ekonomske gubitke. Stoga, invazivne vrste se danas smatraju jednim od osnovnih faktora koji doprinosi globalnim promenama, pa predstavljaju fokus brojnih istraživanja u polju ekologije i drugim srodnim naukama (Novak, 2007).

Osnovne faze uspešne invazije uključuju: a) introdukciju vrste u novo stanište, b) inicijalnu kolonizaciju i uspešno naseljavanje tog staništa, c) disperziju i širenje areala vrste u novom staništu. Većina introdukcija predstavlja direktni ili indirektni rezultat ljudskih aktivnosti, pa su stoga socijalni i ekonomski često izraženi kao i biološki faktori tokom ove prve faze procesa. Svestan, nameran unos biljnih vrsta u nova područja se ostvaruje najčešće kroz uvoz stočne hrane, lekovitog i ukrasnog bilja, kao i sadnica stabala, dok su izvori slučajnih, nenamernih introdukcija različiti tovari brodova sa kontaminiranim semenom poljoprivrednih kultura, kao i propagulumi pričvršćeni za dlaku domaćih životinja ili u zemlji na korenju sadnica (Sakai i sar., 2001).

U sledećoj fazi, fazi inicijalne kolonizacije, introdukovana vrsta mora da poseduje osobine koje generalno doprinose invazivnosti vrsta. Na primer, biljne vrste čije izolovane individue imaju sposobnost samooplodnje su uspešni kolonizatori. Takođe, tu spadaju i vrste

sa dvojnim sistemom reprodukcije (npr. vegetativna reprodukcija i razmnožavanje semenom), kao i biljke sa višesemenim plodovima. Obzirom da se introdukovane individue u nenativnim područjima susreću sa novim uslovima sredine i novim selektivnim pritiscima, važna osobina neophodna za naseljavanje novih prostora je i fenotipska plastičnost, kao i genetička varijabilnost.

Nakon uspešne inicijalne kolonizacije, sledeća faza se karakteriše formiranjem vijabilne i samoodržive populacije. Karakteristike introdukovane vrste neophodne za ovu fazu su povezane sa osobinama potrebnim u predhodnoj fazi. Postoji razlika u ovim osobinama između različitih taksona, ali generalno, kod biljnih vrsta, manja veličina semena je u pozitivnoj korelaciji sa većom produkcijom semena, bržom stopom rasta individua i odustvom potrebe za posebnim uslovima klijanja, što olakšava uspešno naseljavanje novog područja. Još jedna osobina koja doprinosi ovoj fazi invazije je kompetitivnost. Naime, mnoge studije su pokazale superiornost invazivnih vrsta u eksploataciji lokalnih resursa u poređenju sa nativnim i neinvazivnim introdukovanim vrstama novonaseljanog područja.

Nakon pomenutih faza, invazivne vrste se dalje mogu širiti ponovnom introdukcijom sa udaljenih područja (eng. long-distance dispersal) ili širenjem predhodno nastanjenih introdukovanih populacija (eng. short-distance dispersal). Faktori koji utiču na broj propaguluma, način disperzije i stopu nataliteta i mortaliteta su ključni u regulaciji faze širenja invazivnih vrsta. Kontinuirano širenje predhodno nastanjenih introdukovanih populacija je najčešće posledica izražene disperzije te vrste, pri čemu se seme uglavnom prenosi vetrom (anemohorija), vodom (hidrohorija) i/ili životinjama (zoohorija) (Sakai i sar., 2001).

I pored brojnih istraživanja, proces bioinvazija nije u potpunosti objašnjen. Iako postoji veliki broj studija koje porede uspešne i neuspešne introdukcije, kao i invazivne i neinvazivne vrste, konačna lista karakteristika koje uslovljavaju uspešnu invaziju neke vrste, kao i osobina staništa koje bi ukazale da će ono biti nastanjeno introdukovanim organizmima, nije utvrđena. Tome doprinosi i činjenica da studije odvojeno proučavaju, sa jedne strane predispozicije vrsta da postanu invazivne, a sa druge strane predispozicije staništa, odnosno ekosistema, da budu naseljeni invazivnim vrstama. Međutim, proces invazija podrazumeva spoj introdukovane vrste i nastanjenog ekosistema. Stoga, vrste koje naseljavaju nova staništa moraju da poseduju određene adaptacije na ta staništa. Nije retko da introdukovani organizmi čak zamene native

vrste koje bi trebalo da budu *a priori* bolje adaptirane na lokalne uslove sredine. Suprotno, često, u manjoj ili većoj meri, ne postoji poklapanje vrste i ekosistema, pa su neophodne promene ili staništa ili vrste koja ga naseljava. U tim slučajevima, invazije uključuju ekološke i/ili evolutivne promene (Facon i sar., 2006). Ukoliko su evolutivne promene važan deo procesa kolonizacije, invazivna vrsta prolazi kroz tzv. latentni period (eng. lag time). Tačnije, to je period između inicijalne kolonizacije i početka rapidnog rasta introdukovanih populacija. Ovaj period, tokom kojeg introdukovane populacije rastu sporo, uključuje prevazilaženje genetičkih ograničenja za ostvarenje uspešne invazije kroz adaptivnu evoluciju, odnosno razvoj adaptacija na nove uslove sredine, kao i razvoj karakteristika koje doprinose invazivnosti introdukovane vrste (Sakai i sar., 2001).

Evolutivne promene su prvi put prepoznate kao važni mehanizmi bioloških invazija pre oko 30 godina (Prentis i sar., 2008). Uprkos tome, većina istraživanja u toj oblasti su sprovedena u protekloj deceniji. Postalo je jasno da poznavanje genetičkih i evolutivnih procesa može predstavljati ključni korak u predviđanju invazije određene vrste. Stoga, evolutivne i genetičke analize bi trebalo da budu glavni fokus istraživanja biologa u proučavanju invazivnih vrsta (Sakai i sar., 2001).

Proces bioinvazija uključuje prolazak invazivnih vrsta kroz genetičko usko grlo, obzirom da je broj inicijalnih, početnih kolonista (individua) često mali. Posledično, genetički drift, odnosno efekat osnivača dovodi do smanjenja genetičkog diverziteta u novoformiranim populacijama. Ove populacije su često manje genetički varijabilne u odnosu na populacije od kojih potiču (Tsutsui i sar., 2000), obzirom da se tokom ovih procesa prenosi samo deo, frakcija genetičkih varijacija prisutnih u izvornim populacijama (Nei i sar., 1975; Barrett i Husband, 1990). Gubitak genetičkog diverziteta u mnogim studijama se procenjuje na osnovu smanjenja vrednosti parametra koji je u populacionoj genetici poznat pod pojmom "allelic richness" (r), a predstavlja prosečan broj alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka (bazira se na zajedničkom minimalnom broju individua po populaciji). Ovaj genetički parameter je osetljiviji na dejstvo efekta osnivača od drugih mera genetičke varijabilnosti, kao što je npr. heterozigotnost. Ovo je očekivano, obzirom da "allelic richness" reflektuje gubitak retkih alela (eng. rare alleles), što veoma malo utiče na vrednosti heterozigotnosti. Stoga,

markeri koji sadrže veći broj retkih alela (kao što su mikrosateliti) su posebno osetljivi u detekciji efekta osnivača, u odnosu na npr. proteinske markere (Dlugosch i Parker, 2008).

Uspeh invazivnih vrsta je često povezan sa multiplim introdukcijama. Multiple introdukcije se mogu javiti na nivou populacije (kada je jedna populacija rezultat introdukcije individua iz nekoliko različitih nativnih populacija) ili na regionalnom nivou (svaka introdukovana populacija potiče od jedne različite nativne populacije) (Gaudeul i sar., 2011). Stoga, proces multiple introdukcije može da rezultuje nastankom introdukovane populacije istog ili većeg genetičkog diverziteta (i evolutivnog potencijala) u odnosu na izvorne populacije (Novak i sar., 2007; Gaudeul i sar., 2011). Prema Novaku i sar. (2007) multipla introdukcija predstavlja pravilo, a ne izuzetak u procesu invazija. Takođe, ova grupa autora ističe da ovaj evolutivni proces umanjuje dejstvo genetičkog uskog grla i efekata osnivača u skoro formiranim, odnosno mlađim populacijama. S druge strane Dlugosch i Parker (2008), ne umanjujući značaj multiple introdukcije u povećanju genetičkog diverziteta populacija, definišu ovaj evolutivni proces kao skup zasebnih introdukcija koje podrazumevaju i određeni vremenski period. Naime, ističu da starije populacije imaju najviše koristi od većeg broja upliva genetičkog materijala tokom ponovljenih introdukcija, što može biti jedno od objašnjenja razlike u stepenu diverziteta među populacijama kako iste, tako i različitih vrsta. Pored povećanog ukupnog genetičkog diverziteta, na proces multiple introdukcije ukazuje i veći broj jedinstvenih alela (eng. private alleles) u introdukovanim populacijama u odnosu na izvorne (Suarez i Tsutsui, 2008).

Protok gena (eng. gene flow) je takođe prepoznat kao faktor koji utiče na evolutivni potencijal invazivnih vrsta (Dlugosch i Parker, 2008). Ovaj evolutivni mehanizam može da stimuliše invazivnost biljnih vrsta (Ellstrand i Schierenbeck, 2000) širenjem alela, koji determinišu osobine koje doprinose invazivnom potencijalu vrste (Lavergne i Molofsky, 2007). Naime, često, introdukovane populacije iste vrste mogu da budu genetički udaljene i sa različitim stepenom genetičke varijabilnosti i, stoga, sa različitim potencijalom za dalje širenje. U tom slučaju, visok stepen protoka gena ima efekat homogenizacije frekvencije alela, a time i smanjenja genetičke diferencijacije među populacijama (Ward, 2006).

Pored uticaja na genetičku varijabilnost introdukovanih populacija, pomenuti evolutivni procesi imaju uticaj i na genetičku diferencijaciju (strukturnost) među populacijama (Ward,

2006). Odvojene introdukcije mogu da prenesu različite rezervoare gena (eng. gene pools) u različite regione, što dovodi do povećanja genetičke diferencijacije među populacijama. Ovo povećanje inter-populacione diferencijacije se ostvaruje kroz procese kao što su efekat osnivača i genetički drift, ali može biti i rezultat uticaja selekcije (Dlugosch i Parker, 2008; Rosenthal, 2008). Suprotno, ponovljene introdukcije u isti region iz različitih izvora mogu da konvertuju inter-populacione varijacije nativnog okruženja u intra-populacione varijacije u introdukovanom području, smanjujući diferencijaciju između populacija (Gaudeul i sar., 2011). Takođe, visok stepen protoka gena, kao što je već napomenuto, može da ima efekat homogenizacije, čime se smanjuje inter-populaciona genetička struktuiranost. Sa druge strane, smanjen ili nejednak protok gena između populacija predstavlja jedan od faktora koji doprinosi struktuiranosti invazivne vrste na nekom prostoru (Ward, 2006) i najčešće je posledica postojanja prirodnih barijera. Kod biljaka cvetnica protok gena se ostvaruje najvećim delom prenosom polena (Petit, 2004), ali i semena i drugih propaguluma. Visok nivo protoka gena, koji može da prati i protok na velikim geografskim udaljenostima, se javlja kod stranooplodnih vrsta, pogotovo kod onih koje poseduju seriju multiplih alela autosterilnosti. Ovo rezultuje signifikantnim genetičkim diverzitetom unutar populacija i slabom diferenciranošću između populacija (Ward, 2006).

2.2. Karakteristike vrste *Ambrosia artemisiifolia* L.

2.2.1. Taksonomija i distribucija

Vrste roda *Ambrosia* su jednogodišnje ili višegodišnje biljke kratkog životnog veka, koje pripadaju porodici Asteraceae, tribusu Heliantheae, subtribusu Ambrosiinae. Rod *Ambrosia* obuhvata oko 40 vrsta (Makra i sar., 2005) rasprostranjenih širom sveta. Samo jedna vrsta roda, *Ambrosia maritima* L., je nativna u Evropi (sa ograničenim arealom na mediteranski region) (Greuter, 2006-2009), dok sve ostale vrste ovog roda vode poreklo iz Severne i/ili Južne Amerike (Bremer, 1994).

Vrsta *Ambrosia artemisiifolia* L. je najznačajnija introdukovana vrsta roda *Ambrosia* u Evropi. Prema svetskoj bazi podataka invazivnih vrsta (eng. Global Invasive Species Database), nativno područje ambrozije je Meksiko, Sjedinjene Američke Države i Kanada (GISD, 2009). Danas je *A. artemisiifolia*, kosmopolitska vrsta, prisutna na svim kontinentima, osim na Antartiku. Sa različitom incidencom se javlja u skoro svim evropskim zemljama (DAISIE, 2009). Područja sa najvećom rasprostranjenošću ambrozije na ovom kontinentu su Centralna Evropa (Mađarska, Austrija, Slovačka), Istočna Evropa (Ukrajina, evropski deo Rusije), Jugoistočna Evropa (Rumunija, Hrvatska, Srbija), kao i Italija u Južnoj Evropi i Francuska u Zapadnoj Evropi. Nasuprot tome, u Severnoj Evropi (u zemljama kao što su Norveška i Švedska) ambrozija je trenutno relativno retka, ali se očekuje da će u bliskoj budućnosti klimatske promene olakšati širenje i povećanje brojnosti ambrozije u ovom području (Hyvönen i sar., 2011). Naime, produžena sezona vegetacije pod uticajem globalnog zagrevanja dovodi do pojave kasnog cvetanja ovih jednogodišnjih biljaka, što može da rezultuje širenjem areala ambrozije ka severnim hladnijim krajevima (Cunze i sar., 2013).

2.2.2. Introdukcija i rana distribucija ambrozije u Evropi

Kao što je već napomenuto, *Ambrosia artemisiifolia* je endemska vrsta Severno-Američkog kontinenta. Njen polen je pronađen na području Kanade u stenama starim više od 60 000 godina (iz perioda između dve glacijacije). Kao korovska biljka, ambrozija je registrovana u Sjedinjenim Američkim Državama pre 1838. godine, a u Kanadi 1860. godine (Kazinczi i sar., 2008).

U Evropi, ambrozija je prvi put konstantovana 1763. godine na području Zapadne Evrope i to u botaničkim baštama Francuske, da bi se vek kasnije pojavila u poljima na teritoriji Francuske. Dodatno, postoje podaci o postojanju ambrozije na području Nemačke, Švajcarske i Austrije iz tog perioda, ali se ove populacije nisu odomaćile u 19. veku zbog klimatskih uslova i nemogućnosti sazrevanja plodova (Kazinczi i sar., 2008, Csontos i sar., 2010).

Dostupni podaci za Centralnu i Istočnu Evropu ukazuju da se introdukcija ambrozije na ovo područje desila kasnije u odnosu na Zapadnu Evropu (Makra i sar., 2005; Kazinczi i sar., 2008; Csontos i sar., 2010). U Jugoistočnoj Evropi, ambrozija je prvi put je konstatovana 1908. godine u okolini Oršave (luka na Dunavu u blizini Đerdapa) i Baile Herculane, u Rumuniji (Jávorka, 1910); na dva lokaliteta udaljena oko 40 km i povezana važnom železničkom trasom (Kazinczi i sar., 2008; Csontos i sar., 2010). Rani podaci o postojanju ambrozije, iz 1918. godine, potiču i sa teritorije Rusije, u blizini luka na Crnom moru, da bi kasnije najzahvaćeniji deo ove države ambrozijom upravo postao južni evropski deo Rusije (Makra i sar., 2005; Csontos i sar., 2010).

Intenzivna i brza propagacija areala ambrozije u Evropi počela je nakon Prvog svetskog rata, da bi se nastavila i nakon Drugog svetskog rata. Semena vrsta roda *Ambrosia* su prenošena iz Amerike u Evropu brodovima u tovarima sa semenima i plodovima različitih poljoprivrednih kultura. Intenzivan transport i međunarodna trgovina, usloveli su unos ambrozije preko evropskih luka: od Rijeke prema kontinentalnoj Hrvatskoj i Zapadnoj Mađarskoj, od Trsta i Ženeve prema Severnoj Italiji i od Marselja ka dolini reke Rone u Francuskoj (Makra i sar., 2005; Kazinczi i sar., 2008).

Danas, tri područja u Evropi sa najvećom rasprostranjenošću ambrozije su dolina reke Rone u Francuskoj, Severna Italija i Karpatska dolina, odnosno Panonska nizija (Rybnicek i Jäger, 2001). Visoku incidencu ambrozije u regionu Panonske nizije potvrdila su i istraživanja Makra i sar. (2005), koji su detektovali nekoliko puta veću količinu polena u ovom području u odnosu na druge ispitivane delove Evrope.

Širenje ambrozije nakon ranih 1920-tih godina potvrđena su i novijim podacima dobijenim na osnovu herbarskih uzoraka (Csontos i sar., 2010). Pronađen je veliki broj uzoraka ambrozije koji datiraju iz perioda od 1922-1927 sa teritorije Mađarske, pa i Hrvatske, što je u saglasnosti sa predhodnim objavljenim navodima o intenzivnom transportu poljoprivrednih proizvoda kroz Mađarsku nakon Prvog svetskog rata (Makra i sar., 2005; Kazinczi i sar., 2008). Ono što je novo otkriveno analizom herbarskih uzoraka jeste prisustvo ambrozije u dolini reka Dunav-Tisa, kao i u severoistočnom delu Mađarske već od 1926. godine (Csontos i sar., 2010), za razliku od predhodno objavljenih podataka Kazinczi i sar. (2008), koji postojanje ambrozije u ovom delu Mađarske vezuju za 1960. godinu.

U Srbiji, ambrozija je prvi put detektovana 1953. godine na potezu Novi Sad-Sremski Karlovci-Petrovaradin (Slavnić, 1953). Veruje se da je u ovo područje dospela iz okoline Oršave vodenim putem, Dunavom. Iz severnih krajeva Srbije (Vojvodine), gde je ambrozija potpuno odomaćena i masovna (Boža i sar., 2006), ova invazivna biljka se danas širi i ka centralnim i južnim delovima zemlje (Vrbničanin i Janjić, 2011). U Hrvatskoj, botaničar Kovačević je prvi put registrovao ambroziju 1940. godine, dok se na teritoriji Bosne pojavila 1935. godine u selu Osojci, u blizini Dervente (Galzina i sar., 2010).

Masovno širenje ambrozije u Istočnoj Evropi je povezano i sa različitim socio-ekonomskim uslovima, koji su doprineli povećanju površina nekultivisanog zemljišta u ovom delu Evrope, pogodnog za naseljavanje ambrozije. Naime, tokom perioda komunizma i socijalizma (1948-1989), široke pogranične i vojne zone su ostale zapuštene, dok se su površine neobrađenog zemljišta povećale nakon raspada mnogih poljoprivrednih kooperativa tokom političke tranzicije. Takođe, ovome je doprineo i rat na teritoriji bivše Jugoslavije, kao i poljoprivredna politika koja je nalagala napuštanje zemljišta niske produktivnosti, stvarajući time nova pogodna staništa za ekspanziju ambrozije (Makra i sar., 2005; Taramarcaz i sar., 2005; Kiss i Beres, 2006).

2.2.3. Biologija i disperzija

Ambrozija je jednogodišnja pionirska vrsta prisutna na nekultivisanim staništima, pored puteva, pruga, na građevinskim zemljištima, uz vodene tokove, kao i u poljoprivrednim kulturama (Fumanal i sar., 2008). Ambrozija je diploidna vrsta, $2n=36$ hromozoma (Soó, 1970; Stace, 2010). Za ovu jednodomu, anemofilnu biljku se smatralo da je samooplodna (Bassett i Crompton, 1975; Genton i sar., 2005 a, b), međutim, novija istraživanja ukazuju na visoku stopu stranooplodnje i prisustvo mehanizama autosterilnosti kod ove korovske vrste (Friedman i Barrett, 2008; Li i sar., 2012).

Veoma je prilagodljiva i ima široku ekološku valencu. Ekološki bi je mogli okarakterisati kao biljku umereno vlažnih, neutrofilnih, azotom bogatih, organskim materijama siromašnih,

rastresitih, osvetljenih i veoma toplih staništa, a podnosi i zaslanjenost podloge. Međutim, veoma često odstupa od navedenih ekoloških indeksa, naročito u odnosu na vlažnost, sadržaj azota i temperaturu biotopa. Javlja se i na suvljim i na vlažnijim staništima (čak podnosi privremeno plavljenje), kao i na siromašnijim, odnosno bogatijim podlogama, a i na delimično zasenčenim mestima (Boža i sar., 2006).

Klijanje i rast ambrozije počinje u rano proleće i nastavlja se tokom leta, dok je period cvetanja i oslobađanja polena od jula-avgusta do sredine jeseni ili do pojave prvog mraza (Sheppard i sar., 2006; Brandes i Nietzsche, 2007). Ova biljna vrsta može dostići visinu od 20 do 150cm, a ponekad i do 2m. Odlikuje se neravnim stablom prekrivenim dlačicama i perasto deljenim listovima. Cvetovi ambrozije su zeleni i neupadljivi, grupisani u sitne jednopolne glavičaste cvasti. Muške cvasti su terminalno postavljene i savijene su ka dole, dok se ženske cvasti nalaze ispod muških, u pazuhu gornjih listova. Kod ambrozije, kao i kod ostalih pripadnika fam. Asteraceae, je moguće botanički izjednačiti status semena sa plodom, jer se radi o jednosemenom plodu tipa ahenije. Ahenija je plod jajastog oblika, kod kojeg plodov omotač (involukrum) ne srasta sa semenjačom i formira 5-7 bodljastih izraštaja, kukica (Makra i sar., 2005; Vrbničanin i Janjić, 2011).

Ambrozija se razmnožava semenom, čija je produkcija izuzetno visoka i kreće se od 350 do čak preko 6000 semena po biljci (Fumanal i sar., 2007a). Ova vrsta poseduje perzistentnu banku semena (rezervoar vijabilnih semena prisutnih u zemlji), pri čemu semena ambrozije mogu biti vijabilna i preko 40 godina (Bassett i Crompton, 1975). Disperzija semena ambrozije je najvećim delom posredstvom čoveka (Bassett i Crompton, 1975), ali, dodatno, semena ove invazivne vrste mogu da plutaju, pa je hidrohorijski značajan mehanizam širenja ambrozije duž reka. Ovo objašnjava brzu kolonizaciju ambrozije na novoformiranim peščanim i šljunkovitim nasipima (Fumanal i sar., 2007b). Takođe, rasejavanju semena doprinosi i epizoohorija (Boža i sar., 2006).

U polju fitohemije dostupni podaci o *Ambrosia artemisiifolia* su ograničeni, uprkos činjenici da specifični hemijski agensi biljke utiču na pojavu snažnih alergijskih reakcija kod ljudi. Ambrozija sadrži flavonoide, laktonske seskviterpene, monoterpene i izoprenoide (Tagliabate-Scafati i sar., 2012). Za kontakalergijske reakcije odgovorni su seskviterpenski laktoni (Möller i sar., 2002).

2.2.4. Uticaj na ljudsko zdravlje

Ambrozija je alergijska biljna vrsta čiji polen može da uzrokuje bolesti, kao što su rinitis, konjuktivitis i astma, ali i kontaktni dermatitis i urtikariju (Tamarcaz i sar., 2005; Kazinczi i sar., 2008). Polen ove biljke sadrži proteine (antigene) koji spadaju u grupu naj snažnijih do sada otkrivenih alergena (Bagarozzi i Travis, 1998). Nastaje u muškim cvastima i shodno tome oslobađa se u periodu cvetanja. Maksimalna koncentracija polena se beleži u avgustu i septembru. Vreme i način oslobađanja polena u velikoj meri zavisi od klimatskih faktora: temperature, vlažnosti vazduha i količine svetlosti. Povećanje temperature i smanjenje vlažnosti vazduha olakšavaju proces oslobađanja polena. Dnevna produkcija polena ambrozije počinje rano ujutro, a maksimalna je u podne (Makra i sar., 2005). Godišnja produkcija polena (količina polena koju stvara jedna biljka u toku godine) ambrozije je izuzetno visoka i iznosi prosečno 10^9 zrna polena po odrasloj biljci (Fumanal i sar., 2007a). Utvrđena je pozitivna korelacija između količine polena ambrozije u vazduhu i pojave alergijskih reakcija u ljudskoj populaciji (Jäger, 2000). Finansijski gubici usled visokih medicinskih troškova antialergenih tretmana su značajni u zemljama sa visokom učestalošću pojave ambrozije (npr. u Mađarskoj 110 miliona evra godišnje). Jedan od razloga ovako visokih troškova je i produžen period cvetanja ove alergijsko-korovske vrste, tako da *Ambrosia artemisiifolia* prolongira ovaj “sezonski problem” kod dela populacije koji pati od simptoma uzrokovanih polenom.

Ogromna produkcija polenovih zrna i prenošenje polena vetrom, omogućavaju da se polenova zrna ambrozije prenesu na udaljenost od 10 do 100km. Na taj način osetljive osobe dobijaju onu dnevnu dozu polena koja kod njih izaziva alergijsku reakciju. Prag alergijske reakcije kod ljudi iznosi oko 30 polenovih zrna u 1m^3 vazduha.

Takođe, globalne klimatske promene, tačnije povećanje količine CO_2 u vazduhu, uzrokuju kako povećanje produkcije polena, tako i alergeni svojstava polena ambrozije (Wayne i sar. 2002). Ova pozitivna korelacija utvrđena je i poređenjem urbanih i ruralnih oblasti. Naime, komparacijom koncentracije CO_2 i temperaturnog gradijenta između urbanih i ruralnih sredina utvrđeno je da povećana količina CO_2 i viša temperatura vazduha u urbanim zonama rezultuju u znatno većoj produkciji polena ambrozije u odnosu na ruralne zone. Polen biljaka ambrozije iz urbanih oblasti pokazuje i veći alergeni potencijal od polena biljaka ambrozije iz ruralnih

oblasti. Takođe je utvrđeno da se celokupna nadzemna biomasa ambrozije povećava sa povećanjem CO₂ i temperature (Ziska i sar., 2003).

2.2.5. Uticaj na poljoprivredu

U Evropi, *Ambrosia artemisiifolia* u najvećoj meri predstavlja korovsku vrstu jarih poljoprivrednih kultura, uzrokujući značajne gubitke u prinosu, kao i kvalitetu, pre svega suncokreta, kukuruza, šećerne repe, soje i žitarica (Kazinczi i sar., 2008). Štetan uticaj ambrozije i moguće smanjenje prinosa do čak 70% je posebno izraženo u poljima kultura niskog rasta, kao što je šećerna repa (Buttenschon i sar., 2009). Takođe, *A. artemisiifolia* može da formira guste populacije na strnjištima poljoprivrednih kultura (između dve sezone), kao i na neobrađenom zemljištu (Kazinczi i sar., 2008). Ova korovska vrsta je izuzetno problematična u zemljama gde je suncokret jedna od glavnih poljoprivrednih kultura. Razlog tome je ograničena upotreba herbicida u poljima suncokreta zbog botaničke sličnosti, odnosno pripadnosti istoj podfamiliji i intrafamilijarnim grupama (isti tribus Heliantheae), ove dve biljne vrste. Dodatno, zabrana upotrebe ili redukcija doze efikasnih herbicida u mnogim zemljama ograničava uspešnu borbu protiv ambrozije u poljima poljoprivrednih kultura, kao i na neobradivim površinama.

2.2.6. Mere suzbijanja ambrozije

Prevenција invazije je najisplativija i najefikasnija mera u borbi protiv invazivnih biljnih vrsta. Problemi koje stvara ambrozija, naveli su nadležne organe mnogih evropskih zemalja da reaguju stvaranjem programa i uputstava za prevenciju širenja, ranu detekciju i brzo reagovanje na pojavu ambrozije u nekom području (Buttenschon i sar., 2009). Ovo uključuje kampanje za podizanje svesti o ambroziji i nenamernom širenju semena ove invazivne vrste, kao i monitoring površina sklonih invazijama.

Međutim, sposobnost ambrozije da raste i nakon određenih mera kontrole i njena visoka stopa razmnožavanja, čine borbu protiv ove invazivne biljne vrste izuzetno zahtevnom. Za suzbijanje ambrozije koriste se: agrotehničke, mehaničke, hemijske i biološke mere. Agrotehničke mere se primenjuju na poljoprivrednim površinama, a podrazumevaju osnovnu obradu zemljišta, setvu čistog semenskog materijala, pravilno đubrenje, negu useva. Mehanički, ova korovska vrsta se suzbija čupanjem biljaka zajedno sa korenjem, niskim košenjem i drugim vidovima mehaničkog uništavanja (paljenje, okopavanje, tanjiranje) (Janjić i sar., 2011; Gerber i sar., 2011). Međutim, nakon košenja, ambrozija se regeneriše i sposobna je da uđe u fazu cvetanja i stvaranja semena. Stoga, da bi suzbijanje ambrozije ovom metodom bilo efikasno, mora biti u saglasnosti sa različitim fenofazama biljke. Pozitivni rezultati u redukciji produkcije polena i semena su primećeni ukoliko se prvo košenje obavi pre perioda cvetanja, a zatim i pre pojave novih bočnih izdanaka i muških cvasti. Znači, da bi se redukovala biomasa, kao i cvetanje i plodonošenje ambrozije, potrebno je kontinuirano, dobro isplanirano košenje, bar 2 ili češće 3 puta tokom sezone (Milakovic i sar., 2014).

Hemijski način suzbijanja ambrozije podrazumeva upotrebu herbicida. Ovaj vid suzbijanja ambrozije je često dovoljan u sprečavanju gubitka prinosa poljoprivrednih kultura, redukujući biomasu ambrozije, ali ostaje problem cvetanja, a time i stvaranja alergena polena i plodonošenja, odnosno stvaranja semena kojima se vrši propagacija ove korovske vrste. Na neobradivim površinama je, takođe, primenjivo suzbijanje ambrozije upotrebom herbicida (Gauvrit i Chauvel, 2010), ali finansijska ograničenja, zatim potreba da se zaštiti prirodna vegetacija nekog područja, kao i opasnost delovanja herbicida na ljudsko zdravlje, ne dozvoljavaju upotrebu hemijskih tretmana u velikoj meri. Povrh toga, i hemijske i mehaničke mere kontrole su kratkoročne mere, najpogodnije u suzbijanju lokalnih, inicijalnih i malih populacija, kao i u redukciji daljeg širenja populacija ambrozije (Janjić i sar., 2011; Gerber i sar., 2011).

Jedna od alternativnih mera kontrole invazivnih vrsta je biološka kontrola, koja je uspešno implementirana u nekim zemljama (Gerber i sar., 2011). Klasična biološka kontrola predstavlja introdukciju visoko specifičnih prirodnih neprijatelja (bioagena), koji su poreklom sa istog područja kao i ciljna korovska vrsta. Za razliku od hemijskih i mehaničkih mera kontrole invazivnih vrsta, koje su kratkoročne, introdukcija prirodnih neprijatelja koji su

koevoluirali sa vrstom koja želi da se suzbije, predstavlja trajnu meru kontrole (Shaw i sar., 2011). Iako je ovaj način suzbijanja invazivnih vrsta poznat više od jednog veka i ekonomski vrlo isplativ (De Lang i Van Wilgen, 2010), u Evropi postoji nedovoljno razvijena svest o biološkoj meri kontrole, što je posledica siromašnog iskustva, nedostatka finansija, kao i nepostojanje jasnih zakona koji regulišu unos stranih vrsta (Bale, 2011). Međutim, rešenju ovog problema doprinose istraživanja prirodnih neprijatelja (herbivora i patogeni) koji mogu biti implementirani u biološkoj kontroli invazivnih biljnih vrsta (Sheppard i sar., 2006; Shaw i sar., 2011), uključujući i *Ambrosia artemisiifolia* (Gerber i sar., 2011).

Obzirom na činjenicu da je veliki deo Evrope zahvaćen ambrozijom, neophodno je u što kraćem vremenskom periodu razviti održive mere kontrole koje će redukovati širenje ambrozije u Evropi, kao i smanjiti brojnost u oblastima sa visokom incidencom ove agresivne korovske biljke (Gerber i sar., 2011).

2.3. Genetička istraživanja *Ambrosia artemisiifolia*

Ambrozija, kao invazivna vrsta, predstavlja dobar model za ispitivanje procesa adaptacija i razvoj osobina koje doprinose invazivnosti vrsta. Jedno od ovakvih istraživanja predstavlja analiza Hodgins i Rieseberg (2011) koji su proučavali genetičku diferencijaciju nativnih severno-američkih i introdukovanih evropskih populacija ambrozije kao odgovor na različite eksperimentalne uslove (herbivore, sušu, nedostatak nutritijenata, kao i nedostatak svetlosti). Uočili su da introdukovane populacije ambrozije bolje podnose većinu uslova, osim suše, pri kojoj je uočena veća stopa mortaliteta introdukovanih biljaka u odnosu na nativne. Takođe, istraživana je i molekularna osnova invazivnosti analizirajući razlike u ekspresiji gena u nativnim i introdukovanim populacijama ambrozije, izlažući individue kako normalnim (kontrolnim), tako i različitim stresnim uslovima sredine (Hodgins i sar., 2012).

Obzirom da je ambrozija jedna od najjačih alergijskih biljaka, sprovedena su istraživanja molekularne i imunološke karakterizacije polena ambrozije. Imajući u vidu da klimatske promene i zagađenje vazduha utiču na produkciju polena, kao i na povećanje koncentracije određenih alergena u polenu ambrozije, Kanter i sar. (2013) su analizirali molekularne i

imunološke osobine polena ambrozije nakon izlaganja biljaka povećanoj koncentraciji ozona. Upotrebom ELISA testa (eng. enzyme-linked immunosorbent assay) i EST (eng. expressed-sequence tags) molekularnih markera utvrđen je direktan uticaj ozona na komponentne spoljašnje opne polena (egzine), kao i na nivo transkripcije alergena. Međutim, obzirom da nije detektovana promena ukupne količine glavnog alergena Amb1, nije potvrđeno povećanje negativnog uticaja na ljudsko zdravlje.

Sprovedena su i genetička istraživanja u cilju rasvetljavanja načina reprodukcije *Ambrosia artemisiifolia*. Friedman i Barrett (2008) su analizirali reproduktivni sistem ambrozije primenom alozimskih proteinskih markera i utvrdili visoku stopu stranooplodnje kod ove biljne vrste, kao i postojanje serije multiplih alela autosterilnosti u ispitivanim individuama ambrozije. Ove navode su potvrdili i Li i sar. (2012) upotrebom mikrosatelitskih molekularnih markera. Navedena grupa autora, analizirajući nativne američke i introdukovane populacije ambrozije sa područja Kine, nije detektovala prelaz sa stranooplodnog načina reprodukcije na samooplodni u introdukovanim populacijama, što je čest slučaj kod invazivnih vrsta.

Zanimljivu studiju su sproveli Cseh i sar. (2009), koji su analizirali mutantne tipove ambrozije rezistentne na herbicid atracin. Utvrdili su da se ova osobina nasleđuje materinskim putem i da je uzrokovana tačkastom mutacijom u jednom od gena lociranih u hloroplastima (genu psbA).

U odnosu na brojna istraživanja korovskih i invazivnih biljnih vrsta u polju ekologije, genomska karakterizacija ovih vrsta je ipak oskudna. Stoga su novija istraživanja usmerena na razvoj molekularnih markera, koji će služiti kako za populaciona, tako i komparativna genomska istraživanja invazivnih vrsta. Jedna od ovakvih studija je istraživanje Lai i sar. (2012), koji su radili na razvoju EST markera korovskih vrsta, između ostalih i *Ambrosia artemisiifolia*. Međutim, jedni od najpopularnijih markera u osnovnim i primenjenim genetičkim istraživanjima, a posebno u populaciono-genetičkim studijama predstavljaju mikrosatelitski molekularni markeri.

2.3.1. Mikrosatelitski lokusi kao molekularni markeri

Mikrosateliti (eng. simple sequence repeats-SSRs, short tandem repeats-STRs ili variable number of tandem repeats-VNTRs) su kratki delovi DNK, sačinjeni od uzastopno, prosto ponovljive sekvence koja se sastoji od 1 do 6 baznih parova (Ellegren, 2004; Selkoe i Toonen, 2006; Guichoux i sar., 2011). Široko su zastupljeni duž celog genoma eukariota. Međutim, njihova distribucija unutar hromozoma nije uniformna, odnosno manje su raspoređeni u regionima u blizini telomera. Većina mikrosatelitskih lokusa se nalazi u nekodirajućim regionima, dok je samo oko 8% prisutno u kodirajućim regionima. Takođe, njihova gustina blago varira među parovima hromozoma (Fan i Chu, 2007). U genomu biljaka, frekvencija mikrosatelita je u negativnoj korelaciji sa veličinom genoma, za razliku od drugih grupa eukariota. Ovo se može objasniti time što su mikrosateliti biljaka slabo prisutni u delovima genoma koji su odgovorni za njegovu ekspanziju, kao što su LTR retrotranspozoni (Ellegren, 2004).

Prema dužini ponovljive sekvence, STRs se dele na mono-, di-, tri-, tetra-, penta- i heksanukleotidne mikrosatelite. Ukupna zastupljenost određenog tipa mikrosatelitskog motiva se smanjuje povećanjem dužine njegove ponovljive sekvence. Najzastupljeniji su dinukleotidni mikrosatelitski ponovci kod većine vrsta, praćeni sa tetra- i mononukleotidnim mikrosatelitima (Ellegren, 2004; Fan i Chu, 2007). Kod većine biljnih genoma najčešći je dinukleotidni ponovak motiva (AT)_n. Mononukleotidni ponovci su česti, ali zbog problema u amplifikaciji tokom lančane reakcije polimeraze PCR su manje pouzdani i stoga slabije korišćeni kao molekularni markeri. Trinukleotidni ponovci, zajedno sa heksanukleotidnim, predstavljaju najzastupljenije klase ponovljivih sekvenci u kodirajućim regionima. Dinukleotidni, trinukleotidni i tetranukleotidni mikrosatelitski lokusi su najčešći izbor za dizajniranje markera u molekularnim i populaciono-genetičkim istraživanjima (Ellegren, 2004; Selkoe i Toonen, 2006).

Prema tipu ponovljive sekvence mikrosateliti se dele na potpune (eng. perfect), nepotpune (eng. imperfect), neprekidne (eng. uninterrupted) i kompozitne (eng. composite). Potpuni mikrosateliti ne sadrže ni jednu bazu koja ne pripada ponavljajućem motivu; kod nepotpunih

mikrosatelita, par baza koja se ne podudara sa ponavljajućim motivom se nalazi između ponovaka; neprekidni mikrosateliti sadrže kratke sekvence unutar ponovaka, koje se ne podudaraju sa repetitivnim motivom, dok se sekvenca kompozitnih mikrosatelita sastoji od dve vrste ponovaka (Bhargava i Fuentes, 2010).

Mikrosateliti spadaju u jedne od najvarijabilnijih DNK sekvenci u genomu (Ellegren, 2004). Za razliku od baznih nukleotidnih substitucija u kodirajućim regionima (sa malom stopom mutacije, približno 10^{-9} po generaciji), stopa mutacije mikrosatelitskih sekvenci je znatno viša i iznosi od 10^{-6} do 10^{-2} po generaciji. Ove mutacije dovode do promene u broju ponovaka, a time i dužine DNK segmenta koji sadrži ponavljajuće motive. Dužina mikrosatelitskih lokusa uglavnom varira između 5 i 40 ponovaka, ali su takođe mogući i duži segmenti DNK sa ovim tipom sekvence. Mikrosatelitski lokusi pokazuje multialelnost u smislu razlika u broju ponovka (npr. $(CAA)_3$, $(CAA)_5$, $(CAA)_7$, itd). Ova razlika alela u dužini, kao i postojanje velikog broja alela, čini mikrosatelite pogodnim za proučavanje različitim tehnikama za utvrđivanje razlika u dužini fragmenata DNK visoke rezolucije (poliakrilamidnim gelovima, kapilarnim sekvencionerima), što omogućava brzu genotipizaciju velikog broja individua i velikog broja lokusa. Takođe, visoka varijabilnost mikrosatelitskih lokusa čini ih dovoljno informativnim u proučavanju vrsta čije su populacije manjih razmera, kao i populacija koje su skoro pretrpele prolazak kroz genetičko usko grlo. Ovakva ispitivanja nisu moguća upotrebom molekularnih markera sa manjom stopom mutacija, koja ne rezultuje dovoljno visokim alelnim diverzitetom (npr. alozomi), i stoga ovakav tip markera nije dovoljno informativan u pomenutim istraživanjima (Selkoe i Toonen, 2006).

Za razliku od ponavljajućih motiva, granične sekvence mikrosatelitskih lokusa su visoko konzervativne između individua iste vrste, a često i između srodnih vrsta. Sintetisane komplementarne oligonukleotidne DNK sekvence ovim graničnim regionima mikrosatelita predstavljaju DNK prajmere, koji su direktni produkti procesa izolacije mikrosatelitskih lokusa. Komercijalna sinteza parova prajmera čine ove molekularne markere jednostavnim u procesu lančane reakcije polimeraze (PCR), a time i pogodnim za upotrebu u različitim genetičkim istraživanjima (Selkoe i Toonen, 2006).

Od poslednje decenije 20. veka raste interes naučnika u polju proučavanja direktne funkcije mikrosatelita u genomima različitih organizama. Iako su STRs široko zastupljeni,

većina mikrosatelitskih lokusa nema nikakvu biološku ulogu i spada u grupu “junk DNA”. Međutim, postoje pretpostavke koje ukazuju na značajnu ulogu STRs u genomima različitih organizama. U mnogim bakterijama, uzročnicima bolesti, neki “nepredviđeni geni” se nalaze u skopu STRs sekvenci. STRs u ovim genima mogu da dovedu do vanfaznih mutacija (eng. frameshift mutation), odnosno promene okvira čitanja, što uzrokuje promene u ekspresiji gena i dovodi do sinteze proteina rezistentnih na imuni sistem organizma. Zatim, mikrosateliti mogu uticati na proces regulacije transkripcije pojedinih gena, kao i na ceo proces genske ekspresije. Takođe, STRs lokusi ispoljavaju svoj uticaj u procesu rekombinacija, pozicioniranju nukleozoma i održavanju prostorne organizacije hromatina. Iako je u poslednje vreme otkriven znatan broj bioloških funkcija mikrosatelita, mnoge od njih su još uvek neistražene (Fan i Chu, 2007).

Navedene biološke uloge tandemskih sekvenci ukazuju na pretpostavku da i sami mikrosatelitski lokusi mogu biti pod uticajem selekcije, odnosno da nisu u potpunosti selektivno neutralni, što je dugo bilo generalno uverenje vezano za ove molekularne markere. Čak i neke nasledne humane bolesti, kao što je Huntingtonova bolest, su direktno posledica mutacija mikrosatelitskih sekvenci. Takođe, mikrosateliti se mogu nalaziti pored gena koji su pod pritiskom selekcije i zbog tzv. fenomena “hitchhiking” ispoljavati osobinu selektivne ne-neutralnosti. Upotreba mikrosatelita u konstrukciji genetičkih mapa gena koji determinišu različite bolesti, ukazuje na činjenicu da su mnogi mikrosatelitski lokusi blisko vezani sa genima koji su pod pritiskom selekcije (Selkoe i Toonen, 2006).

Iako su mikrosatelitski lokusi u eukariotskom genomu prvi put otkriveni krajem 70-tih godina prošlog veka, mehanizmi STRs mutacija nisu u potpunosti razjašnjeni. Postoje tri moguća mehanizma mutacija mikrosatelitskih lokusa: a) nejednak crossing-over tokom mejoze, b) mehanizam retrotraspozona, c) replikativno proklizavanje (eng. replication slippage) DNK polimeraze. Ovaj poslednji model se smatra osnovnim mehanizmom STRs mutacija. Naime, replikativno proklizavanje predstavlja proklizavanje polimeraze koje se dešava tokom procesa replikacije DNK i pri čemu dolazi do privremenog razdvajanja DNK lanaca. Nakon toga, jedan od lanaca formira tzv. lupu što onemogućava pravilno ponovno sparivanje novosintetisanog i starog lanca (matrice) DNK u dužini od jednog ili više ponovaka mikrosatelitskog lokusa. Ako se nakon ponovnog pogrešnog sparivanja lanaca nastavi sinteza

ovog molekula DNK dolazi do promene broja ponovaka mikrosatelitskog lokusa. Odnosno broj ponovaka se povećava ili smanjuje u zavisnosti od toga na kom od dva lanca DNK je došlo do formiranja lupe. Ako lupu formira novosintetisani lanac, dolazi do povećanja broja ponovaka, i obrnuto, ako se lupa formira na matrici, broj ponovaka se smanjuje (Ellegren, 2004; Fan i Chu, 2007; Bhargava i Fuentes, 2010).

Međutim, stopa mutacije mikrosatelitskog lokusa nije jednaka stopi proklizavanja. Eksperimenti u *in vitro* uslovima su pokazali da je stopa replikativnog proklizavanja prilično visoka, dok u *in vivo* uslovima, većina DNK lupi se prepoznaje i popravljaju od strane „mismatch” sistema reparacije. Stoga, stopa uočenih STR mutacija zavisi od stope replikativnog proklizavanja i efikasnosti sistema reparacije koji ispravlja greške prilikom sparivanja DNK lanaca (Fan i Chu, 2007; Bhargava i Fuentes, 2010).

Nekoliko faktora, kao što su broj, lokacija i sekvenca ponovaka utiču na stopu replikativnog proklizavanja, ali najbitniji među njima je dužina ponovka u mikrosatelitskom lokusu. Naime, utvrđena je negativna korelacija između dužine ponovka i stope proklizavanja. Stoga je stopa proklizavanja najviša u dinukleotidnim mikrosatelitskim lokusima. Takođe, mutaciona stopa se povećava sa povećanjem broja repetitivnih jedinica. Odnosno, sa povećanjem broja ponovaka, povećava se mogućnost proklizavanja polimaraze, kao i pogrešnog ponovnog sparivanja DNK lanaca nakon njihovog kratkotrajnog razdvajanja (Ellegren, 2004; Fan i Chu, 2007; Bhargava i Fuentes, 2010). Najbolji izbor prilikom primene mikrosatelitskih markera su lokusi sa intermedijernim brojem ponovaka, čime se obezbeđuje dovoljan nivo polimorfnosti i multialelizam, a istovremeno se izbegavaju nedostaci uzrokovani prevelikom mutacionom stopom (Guichoux i sar., 2011).

Replikativno proklizavanje se takođe javlja i tokom PCR amplifikacije mikrosatelitskih sekvenci. To za posledicu ima pojavu „pratećih bendova“ ili „manjih pikova“, koji predstavljaju kratke DNK produkte, različite veličine u odnosu na amplifikovane alele ispitivanog mikrosatelitskog lokusa (Ellegren, 2004).

Nastanak sekvenci mikrosatelita u genomu se objašnjava na više načina. Prema jednom stanovištu, mikrosateliti nastaju *de novo*, odnosno nastaju spontano iz/unutar jedinstvenih sekvenci. Naime, nukleotidne supstitucije ili insercije kopija susednih baza, dovode do

nastanka „proto-mikrosatelita“, kratkih sekvenci DNK, koje se sastoje od svega 3-4 ponovka, koje zatim procesom replikativnog proklizavanja bivaju produžene. Drugi način nastanka se izvodi iz asocijacija mikrosatelita sa mobilnim elementima. Transpozabilni elementi sadrže jedno ili više mesta koja su sklona formiranju mikrosatelitskih sekvenci. Oni se ugrađuju na određena receptorska mesta u nuklearnom genomu i formiraju tzv. usvojene mikrosatelite. Međutim, veliki broj transpozabilnih elemenata u genomu, nije uvek u saglasnosti sa frekvencijom mikrosatelita, tako da je njihova uloga u nastanku mikrosatelita još uvek upitna. Neki autori čak i negiraju bilo kakvu vezu između nastanka mikrosatelita i prisustva transpozabilnih elemenata, a ističu povezanost mikrosatelita sa jedinstvenim i umereno ponovljivim sekvencama (Bhargava i Fuentes, 2010).

Razvijeno je nekoliko pristupa za proučavanje stope mutacije mikrosatelita: a) familijarni, b) biološki, c) populacioni i d) embrionalni pristup. Familijarni pristup je najdirektniji pristup u kome se stopa i tip mutacije ispituju direktno tokom prenosa STRs-a sa roditelja na potomstvo. U biološkom pristupu, mikrosatelitski lokusi se ubacuju u vektor, pomoću koga se umnožavaju u ćelijama domaćina, pri čemu se može pratiti stopa spontananih mutacija STRs-a, kao i uticaj različitih faktora na proces mutacija mikrosatelitskih lokusa. Upotrebom populacionog pristupa, može se proučavati zajedničko evolutivno poreklo mikrosatelita, dok se stopa mutacije može pratiti nekoliko generacija unazad. Stopa STR mutacija se može, takođe, direktno analizirati u embrionalnim ćelijama, posebno u muškim gametima (Fan i Chu, 2007).

Postoji nekoliko modela evolucione dinamike mikrosatelitskih lokusa. Model neograničenog broja alela (eng. infinite alleles model-IAM) se bazira na pretpostavci da svaka nova mutacija stvara novi alel. Odnosno, ovaj model uključuje bilo koji broj tandemskih ponovaka, koji uvek rezultuje novim alelnim stanjem koje predhodno nije postojalo u populaciji. Međutim, mnoga istraživanja STRs mutacija su pokazala da ovaj model nije u saglasnosti sa realnim mutacionim procesima (Fan i Chu, 2007; Bhargava i Fuentes, 2010).

Model postepenih mutacija (eng. stepwise mutation model – SMM) se pokazao kao pogodan da opiše mutacije koje se dešavaju u okviru mikrosatelitskih lokusa. Iz ovog modela je proizišla većina drugih modela. Bazira na pretpostavci da mutacija menja dužinu segmenta DNK koji sadrži repetitivne motive dodavanjem ili oduzimanjem jednog ili manjeg broja

ponovaka. Ostale pretpostavke ovog modela su: podjednaka mogućnost smanjenja i povećanja broja ponovaka, neograničena veličina alela, nezavisnost stope i veličine mutacija od broja ponovaka. Ubrzo je pokazano da mikrosateliti pokazuju postojanje gornje granice dužine, što dovodi do promene u osnovnim postulatima ovog mutacionog modela. Stoga, u model se uvodi postojanje gornje granice za veličinu alela, što znači da će veliki aleli prvenstveno mutirati u alele manje veličine (Ellegren, 2004; Fan i Chu, 2007; Bhargava i Fuentes, 2010).

Postoji i model evolucione dinamike mikrosatelitskih lokusa koji ukazuje na to da je ravnoteža u distribuciji dužine mikrosatelita rezultat balansa između promene dužine mikrosatelita i tačkastih mutacija. Mutacije u dužini mikrosatelitskih lokusa mogu dovesti do njenog značajnog uvećanja (ili smanjenja), dok tačkaste mutacije prekidaju dugačke ponovke na kraće jedinice. Ovaj model je široko prihvaćen jer može da objasni razlike mikrosatelitske distribucije između vrsta i daje adekvatno objašnjenje ograničenosti dužine mikrosatelitskih lokusa (Ellegren, 2004; Bhargava i Fuentes, 2010).

Stoga, osobine mikrosatelita kao što su nivo prisustva u genomima, kodominantno nasleđivanje prema Mendelovim principima, visoka polimorfnost, kao i laka upotreba, visoka reproducibilnost, mali troškovi nakon izolacije, čine ovaj tip molekularnih markera poželjnim u mnogim osnovnim i primenjenim istraživanjima. Pokazali su se korisni u konstrukciji genetičkih mapa, pozicioniranju pojedinih gena, utvrđivanju očinstva, identifikaciji individua, forenzici, ispitivanju demografskih procesa, konzervacionoj biologiji, molekularnoj antropologiji i studijama evolucije čoveka, kao i dijagnostici različitih bolesti. U populacionoj genetici predstavljaju jedne od najpopularnijih i najinformativnijih molekularnih markera (Ellegren, 2004; Fan i Chu, 2007; Bhargava i Fuentes, 2010; Guichoux i sar., 2011).

2.3.2. Populaciono-genetička istraživanja diverziteta ambrozije

Populaciono-genetička istraživanja diverziteta vrste *Ambrosia artemisiifolia* su relativno novijeg datuma. Prve mikrosatelitske markere na ovoj vrsti izolovali su Genton i sar. (2005b).

Od prvobitnog seta (41 prajmer par), autori su kroz proces validacije stabilnosti, specifičnosti i varijabilnosti uspjeli da definišu svega 5 mikrosatelitskih lokusa koji su bili pogodni za populaciona istraživanja. Koristeći ovih pet markera (*Amb12*, *Amb15*, *Amb16*, *Amb30*, *Amb82*) Genton i sar. (2005b) su poredili genetički diverzitet 6 introdukovanih francuskih populacija sa 10 nativnih severno-američkih populacija vrste *Ambrosia artemisiifolia*. Najveći broj alela je pronađen u lokusu *Amb82* (čak 38 u francuskim populacijama), dok je najmanji broj detektovan u lokusu *Amb12* (4 u severno-američkim populacijama). Utvrđene su generalno visoke vrednosti očekivane heterozigotnosti (u opsegu od 0,51 do 0,94 u severno-američkim populacijama i od 0,49 do 0,93 u francuskim populacijama), ukazujući na visok genetički diverzitet kako u nativnim severno-američkim, tako i u introdukovanim francuskim populacijama. Ovo ukazuje ili na nepostojanje jakog uskog grla tokom introdukcije u Francusku ili na multiplo poreklo francuskih populacija. S obzirom na visok nivo polimorfizma u testiranim severno-američkim i francuskim populacijama, izolovani mikrosatelitski markeri se predlažu kao korisni u ispitivanju dinamike invazije vrste *Ambrosia artemisiifolia*.

U svojim narednim analizama, upotrebom istog seta mikrosatelitskih markera, Genton i sar. (2005a) su testirali nešto veći uzorak (ukupno 12 severno-američkih i 10 francuskih populacija, od kojih je 5 populacija iz Ron-Alpskog regiona, gde je ambrozija prisutna više od 30 godina). Ukupna genetička varijabilnost američkog i francuskog Ron-Alpskog regiona je bila slična, dok je intra-populaciona varijabilnost bila iznenađujuće niža u nativnim nego u invazivnim francuskim populacijama. Takođe su francuske populacije pokazale nižu inter-populacionu diferencijaciju. Jedinstveni aleli iz različitih severno-američkih populacija su pronađeni u pojedinačnim francuskim populacijama, dok je prosečan broj alela po lokusu u Ron-Alpskom francuskom regionu bio znatno viši u odnosu na bilo koju severno-američku populaciju. Ovo, zajedno sa rezultatima testa pripadnosti, ukazuje da su francuske invazivne populacije poreklom od više različitih izvornih američkih populacija. Takođe je utvrđen redukovani diverzitet (kroz signifikantno smanjenje ukupnog broja alela, razlike u veličini alela, broja jedinstvenih alela) populacija udaljenih od primarnog mesta introdukcije što sugeriše postojanje serije uskih grla tokom širenja ambrozije na teritoriji Francuske.

Gladieux i sar. (2011) proširuju predhodno istraživanje invazivnih populacija ambrozije u Francuskoj, poredeći ih sa 6 istočno-evropskih populacija ambrozije. Primenom istog seta markera otkrili su sličnu genetičku varijabilnost u istočno-evropskim u odnosu na francuske i severno-američke populacije. Obzirom da nema dokaza o gubitku genetičke varijabilnosti u istočno-evropskim populacijama, pretpostavlja se da one nisu poreklom od ranije naseljenih francuskih populacija, niti da su nastale introdukcijom individua ambrozije iz jedne native populacije. Naime, analiza strukture populacija jasno odvaja dve evropske grupe, ukazujući na nezavisne, odvojene introdukcije ambrozije u Istočnu i Zapadnu Evropu, kao i na različite izvore ovih invazija.

Ističući važnost identifikacije molekularnih markera u ispitivanju populaciono-genetičkih procesa uključenih u invazije, Chun i sar. (2009) su razvili novih 8 mikrosatelitskih lokusa na vrsti *Ambrosia artemisiifolia*. Lokusi označeni kao: *Ambart04*, *Ambart06*, *Ambart09*, *Ambart17*, *Ambart18*, *Ambart21*, *Ambart24*, *Ambart27*, su otkrili visok nivo genetičke varijabilnosti u tri analizirane populacije, sa brojem alela po lokusu od 5 (u lokusu *Ambart17*) do 19 (u lokusu *Ambart18*) i vrednostima očekivane heterozigotnosti u rangu od 0,48-0,92. Takođe su se ovi markeri pokazali kao uspešni u amplifikaciji DNK herbarskih uzoraka. Shodno ovome, Chun i sar. (2010) su, koristeći novo izolovane mikrosatelitske lokuse, poredili genetički diverzitet i strukturu herbarskih i savremenih populacija. Naime, analizirali su devet parova populacija, pri čemu je par činila jedna istorijska, odnosno herbarska populacija sa uzorcima koji datiraju iz perioda od kraja 19. do ranog 20. veka i jedna novija, savremena populacija uzorkovana u proteklih 5 godina, sa istih lokaliteta na teritoriji Francuske. Obzirom na signifikantni porast vrednosti alelnog diverziteta i očekivane heterozigotnosti (H_e) u savremenim populacijama, utvrđen je veći genetički diverzitet u savremenim u odnosu na istorijske populacije, dok su F_{st} vrednosti i analiza molekularne varijanse (AMOVA) pokazali nižu interpopulacionu genetičku diferencijaciju u savremenim populacijama u poređenju sa istorijskim. Ovo navodi na zaključak da su jak protok gena i ukrštanje populacija osnovni post-invazioni procesi, odnosno procesi koji su uticali na formiranje savremenih populacija u Francuskoj.

Takođe, nuklearni mikrosatelitski lokusi su, u kombinaciji sa hloroplasnom DNK, upotrebljeni u ispitivanju istorije globalne invazije *Ambrosia artemisiifolia* (Gaudeul i sar.,

2011). Ova grupa autora potvrđuje značaj multiplih introdukcija u oblikovanju genetičkog diverziteta i struktuiranosti populacija ambrozije. Međutim, za razliku od predhodnih istraživanja (Genton i sar., 2005b; Gladieux i sar., 2011; Chun i sar., 2009) gde se deficit heterozigota i pozitivne Fis vrednosti objašnjavaju prisustvom nultih alela, Gaudeul i sar. (2009) kao moguće razloge deficita navode prisustvo određenog procenta samooplodnje ambrozije, biparentalnog inbridinga i/ili Valund efekta.

Do danas, rasvetljavanju genetičkog profila ambrozije najviše su doprinela istraživanja populacija sa teritorije Francuske (Genton i sar., 2005a; Genton i sar., 2005b; Chun i sar., 2009, Chun i sar., 2010; Gaudeul i sar., 2011). Pored ovih, u Zapadnoj i Srednjoj Evropi ispitan je i manji broj populacija sa teritorije Belgije, Nemačke, Slovenije i Poljske, zatim na jugu sa teritorije Italije, dok je Istočna Evropa obuhvaćena populacijama iz Rusije (Gaudeul i sar., 2011) i Ukrajine (Gladieux i sar., 2011; Gaudeul i sar., 2011). Region južnog dela Panonske nizije u analizama mogućih puteva invazije ambrozije na evropskom kontinentu bio je zastupljen sa po jednom populacijom iz Srbije i Rumunije, kao i sa tri populacije Mađarske (Gladieux i sar., 2011; Gaudeul i sar., 2011). Obzirom na kosmopolitsku rasprostranjenost ambrozije, sprovedena su i istraživanja populacija ove biljne vrste sa područja Australije, Argentine, Japana, Koreje (Gaudeul i sar., 2011) i Kine (Gaudeul i sar., 2011; Li i sar., 2012), kao i nativnih populacija ambrozije Severne Amerike (Genton i sar., 2005a; Genton i sar., 2005b; Gaudeul i sar., 2011).

U našoj zemlji sprovedena su pilot istraživanja populaciono-genetičke varijabilnosti ambrozije upotrebom mikrosatelitskih lokusa. Ispitivan je manji broj populacija ove invazivne vrste sa područja Vojvodine (Kočiš Tubić i sar., 2009), Srbije (Kočiš Tubić i sar., 2010; Kočiš Tubić i sar., 2011), Dunavskog (Kočiš Tubić i sar., 2012a) i Banatskog regiona (Kočiš Tubić i sar., 2012b). Ova istraživanja su dala preliminaran uvid u inter- i intra-populacionu varijabilnost ispitivanih populacija, kao i podatke o bliskosti, odnosno udaljenosti populacija *Ambrosia artemisiifolia* na istraživanom području.

3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Iako je *Ambrosia artemisiifolia*, više nego bilo koja druga biljna vrsta, podigla svest ljudi o invazivnim biljkama na području Evrope, populaciono-genetička karakterizacija ambrozije sa područja Panonske nizije nije urađena. Pored pomenutih preliminarnih istraživanja u našoj zemlji, u dosadašnjim analizama ambrozije u Evropi (Gladieux i sar., 2011; Gaudeul i sar., 2011), ova invazivna biljka sa područja Panonske nizije je bila zastupljena samo pojedinačnim populacijama.

Ovo istraživanje obuhvata genetičku karakterizaciju populacija vrste *Ambrosia artemisiifolia* južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog dela Balkanskog poluostrva, upotrebom molekularnih markera, mikrosatelita, a sa osnovnim ciljevima:

1. ispitivanje inter- i intrapopulacione varijabilnosti ambrozije pomenutog područja
2. određivanje genetičke diferencijacije i struktuiranosti, kao i genetičke bliskosti, odnosno udaljenosti među uzorkovanim populacijama
3. sagledavanje evolutivnih mehanizama tokom invazije ispitivanog područja ovom biljnom vrstom
4. određivanje puteva introdukcije i pravca/pravaca širenja ambrozije na istraživanom području.

Dobijanje ovih podataka doprinosi predviđanju potencijalne ekspanzije *Ambrosia artemisiifolia* na ispitivanom području i šire. Zatim, ova saznanja mogu unaprediti mere kontrole i strategiju za suzbijanje širenja ambrozije, sa krajnjim ciljem redukovanja negativnog uticaja na biodiverzitet, ekonomiju i ljudsko zdravlje. Takođe, genetička karakterizacija ispitivanih populacija doprinosi širenju saznanja o genetičkom profilu ambrozije u ovom delu Evrope, što dalje može poslužiti boljem razumevanju uzroka i procesa uključenih u globalnu invaziju ove opasne alergijske biljke.

4. RADNA HIPOTEZA

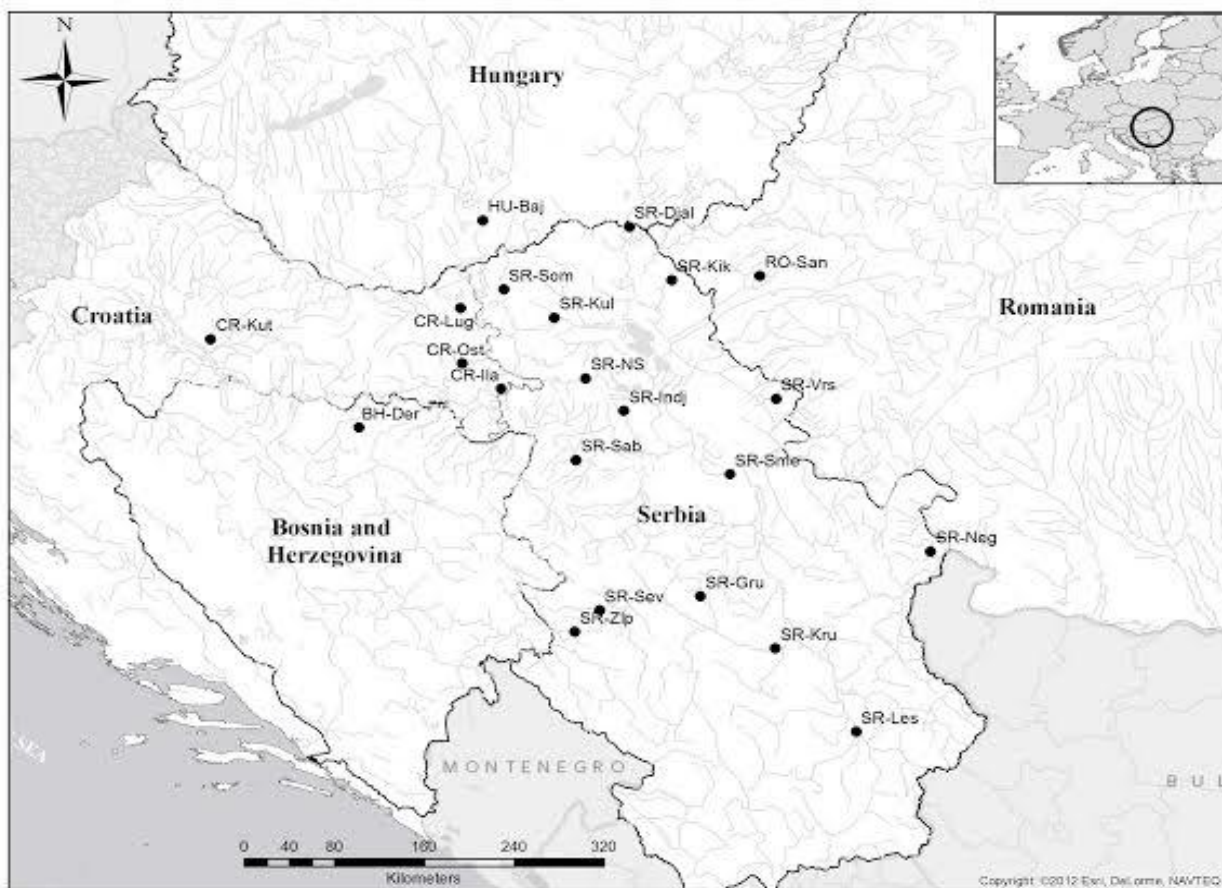
Na osnovu literaturnih podataka i predhodnih saznanja o vrsti *Ambrosia artemisiifolia*, području sa koga su uzorkovane populacije ove alergijske biljke, kao i o evolutivnim procesima tokom bioloških invazija, radne hipoteze ovog istraživanja su bile sledeće:

- odabrani mikrosatelitski lokusi ispoljavaju dovoljan nivo polimorfnosti u populaciono-genetičkim studijama ambrozije ispitivanog područja
- populacije ambrozije sa područja južnog dela Panonske nizije ispoljavaju visok nivo genetičke varijabilnosti i nizak stepen inter-populacione diferencijacije i struktuiranosti
- među populacijama južnog dela Panonske nizije ostvaruje se visok stepen protoka gena
- populacije ambrozije u području južnog dela Panonske nizije su nastale pod uticajem većeg broja introdukcija kako iz različitih pravaca Evrope, tako i iz nativnog područja ove invazivne vrste
- populacije ambrozije sa područja peripanonskog prostora ispoljavaju niži diverzitet i viši nivo diferencijacije u odnosu na populacije sa područja Panonske nizije
- populacije ambrozije sa područja peripanonskog prostora su poreklom od populacija ambrozije panonskog regiona

5. MATERIJAL I METODE

5.1. Materijal

Tokom vegetacijskog perioda (od maja do novembra meseca 2010., 2012. godine) sakupljane su individue vrste *Ambrosia artemisiifolia* sa različitih lokaliteta južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana. Populacije su uzorkovane sa teritorije Republike Srbije, Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Mađarske i Rumunije (Slika 1.). U zavisnosti od perioda sakupljanja i stadijuma razvoja biljaka, uzorkovane su mlade biljke veličine od 10-20cm, adultne individue ili semena ambrozije. Sakupljano je prosečno 20 individua po populaciji, vodeći računa o razmaku između uzorkovanih biljaka (koji nije iznosio manje od 1m). Ukupno je analizirano 455 individua iz 22 populacije ambrozije čiji su podaci prikazani u Tabeli 1.



Slika 1. Mapa južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana sa uzorkovanim populacijama ambrozije

Tabela 1. Podaci analiziranih populacija *Ambrosia artemisiifolia*

Područje	Država	Populacija	Oznaka populacije	Stanište	N	Geografska širina	Geografska dužina	Vreme sakupljanja i vrsta uzorkovanog materijala
Južni deo Panonske nizije	Hrvatska	Kutina	CR-Kut	Pored puta	20	45° 28' 45.43"N	16° 46' 34.79"E	avgust 2010, adultne individue
		Lug	CR-Lug	Pored puta	20	45° 39' 47.57"N	18° 46' 26.28"E	avgust 2010, adultne individue
		Ostrovo	CR-Ost	Pored puta	22	45° 20' 1.31"N	18° 47' 25.56"E	jun 2010, adultne individue
		Ilača	CR-Ila	Kanal pored puta	21	45° 10' 52.67"N	19° 5' 56.19"E	maj 2010, mlade biljke
	BiH	Derventa	BH-Der	Pored puta	20	44° 56' 57.61"N	17° 57' 47.72"E	oktobar 2010, adultne individue
	Mađarska	Baja	HU-Baj	Između voćnjaka i puta	23	46° 10' 54.46"N	18° 57' 15.50"E	novembar 2010, semena
	Rumunija	Sanandrei	RO-San	Uz željezničku prugu	19	45° 51' 12.22"N	21° 10' 5.27"E	novembar 2010, semena
	Srbija	Sombor	SR-Som	Na rubu njive	20	45° 46' 28.05"N	19° 7' 26.04"E	jun 2010, adultne individue
		Kula	SR-Kul	Između voćnjaka i njive	20	45° 36' 22.95"N	19° 31' 34.18"E	maj 2010, mlade biljke
		Novi Sad	SR-NS	Na rubu njive	20	45° 14' 39.05"N	19° 46' 31.10"E	maj 2010, mlade biljke
		Indija	SR-Indj	Na rubu njive	20	45° 3' 0.01"N	20° 4' 59.99"E	maj 2010, mlade biljke
		Šabac	SR-Sab	Poplavljen kanal	16	44° 45' 15.23"N	19° 41' 59.1"E	maj 2010, mlade biljke
		Đala	SR-Djal	Na rubu njive	22	46° 8' 39.25"N	20° 7' 34.05"E	jun 2010, adultne individue
		Kikinda	SR-Kik	Na rubu njive	22	45° 49' 42.00"N	20° 27' 55.01"E	jun 2012, adultne individue
Vršac		SR-Vrs	Između puta i njive	17	45° 7' 21.83"N	21° 18' 0.79"E	jun 2012, adultne individue	
Peripanonski prostor centralnog Balkana		Smederevo	SR-Sme	Između puta i pristaništa	21	44°40'05.78'' N	20°55'50.93'' E	jun 2012, adultne individue
		Sevojno	SR-Sev	Uz željezničku prugu	22	43°50'24.88'' N	19°53'23.18'' E	avgust 2010, adultne individue
		Gruža	SR-Gru	Između šume i puta	22	43°55'31.35'' N	20°41'41.06'' E	jun 2012, adultne individue
		Negotin	SR-Neg	Pored puta	22	44°12'02.26'' N	22°32'00.34'' E	jun 2012, adultne individue
		Zlatibor	SR-Zlt	Pored puta	22	43°42'34.81'' N	19°41'17.49'' E	avgust 2010, adultne individue
		Kruševac	SR-Kru	Pored puta	22	43°36'23.68'' N	21°17'33.32'' E	jun 2010, adultne individue
Leskovac	SR-Les	Pored puta	22	43°05'32.54'' N	21°56'17.50'' E	jun 2012, adultne individue		

BiH – Bosna i Hercegovina, N-broj analiziranih individua po populaciji

5.2. Metode

5.2.1. Izolacija genomske DNK

Ukupna genomska DNK je izolovana iz svežeg biljnog materijala ambrozije upotrebom modifikovane CTAB metode (Padmalatha i Prasad, 2006). U zavisnosti od uzorkovanog materijala, za ekstrakciju DNK su korišćeni listovi ili semena ispitivane biljne vrste.

U prvom koraku primenjene metode 50-100mg lista ili po jedno seme svake uzorkovane individue ambrozije je izmacerirano uz pomoć avana i tučka, uz dodavanje 10mg PVP-40. U narednom koraku dodato je 700 μ l 2xCTAB pufera (sadrži 1M Tris pH 8,0; 1,5M NaCl; 0,5M EDTA; 0,05M CTAB; 2% β -mercaptoethanol), ugrijanog u inkubatoru na 65°C. Nakon mešanja, sadržaj iz avana je preliven u kivete, i uzorci su inkubirani na 65°C tokom 60-90min uz inverziju na svakih 30min. Nakon inkubacije, u svaku kivetu je dodato 750 μ l hloroform-izoamilalkohola (24:1), a zatim su kivete invertovane 30min. Uzorci su potom centrifugirani na 22°C, 12000rpm, 15min, nakon čega je supernatant (gornja vodena faza) pažljivo prebačen u novi set kiveta upotrebom zasečenih nastavaka za pipete. Dodata je približno ista količina (oko 300 μ l) hladnog izopropanola i uzorci su blago invertovani dok se faze nisu pomešale. DNK je precipitirana na -20°C najmanje 30min. Po isteku ovog vremena uzorci su ponovo centrifugirani na 22°C, 12000rpm, 15min. Supernatant je odliven, a pelet je ispran sa 500 μ l 70% etanola. Nakon isparavanja etanola na 37°C u termobloku, pelet je rastvoren u 200 μ l 0,1xTE pufera. Uzorci su ostavljeni u frižideru tokom noći. Narednog dana uzorci su zagrejani 5-10min na 65°C u inkubatoru. U svaki uzorak je dodata jednaka količina (100 μ l+100 μ l) smeše fenol-hloroform-izoamilalkohola (25:24:1). Nakon inverzije, uzorci su centrifugirani na 22°C, 8000rpm, 15min, nakon čega je supernatant prebačen u novi set kiveta. Dodata je ista količina etanola (oko 100 μ l) i 1/10 količine 3M natrijum-acetata (oko 10 μ l). Nakon inkubacije na -20°C najmanje 30min, uzorci su ponovo centrifugirani na 22°C, 12000rpm, 15 min. Supernatant je odliven, a pelet osušen u termobloku na 37°C i rastvoren u 100 μ l 0,1xTE pufera.

Koncentracija i čistoća izolovane genomske DNK je određena Bio-Spec spektrofotometrom (Shimadzu). Za uzorke sa izmerenom većom koncentracijom DNK od 50 ng/μl, pravljeni su radna razblaženja koncentracije 50 ng/μl.

5.2.2. Mikrosatelitski lokusi i uslovi PCR reakcija

Iz dva seta predhodno izolovanih mikrosatelitskih lokusa na ispitivanoj biljnoj vrsti, amplifikovano je deset odabranih mikrosatelita (Tabela 2.): *Amb12*, *Amb16*, *Amb30*, *Amb82* (Genton i sar., 2005b), *Ambart04*, *Ambart06*, *Ambart09*, *Ambart21*, *Ambart24*, *Ambart27* (Chun i sar., 2009, GenBank accession no: FJ595149–FJ595156; Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium 2009). Amplifikacija je izvedena optimalnim PCR protokolima u skladu sa metodama publikovanim u odgovarajućoj literaturi u zavisnosti od lokusa.

Tabela 2. Podaci o amplifikovanim mikrosatelitskim lokusima (Genton i sar., 2005b; Chun i sar., 2009, GenBank accession no: FJ595149–FJ595156, Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium 2009)

Mikrosatelitski lokus	Motiv ponovka	Broj u Gen Banci	Prajmer sekvence (5'-3')	Veličina produkta (bp)
<i>Amb12</i>	(AC) ₁₀	AY849308	F: 5'GACGAAAGCAACCAAACACA3' R: 5'GGAAAAATGCATGCACAAA3'	194
<i>Amb16</i>	(CA) ₆	AY849310	F: 5'ATCATTCGACCGAACCCTT3' R: 5'GGAGCAGGAACGTCAAGAAA3'	210
<i>Amb30</i>	(AC) ₉	AY849311	F: 5'AGAGATGAAATAACGAGCAACAAA3' R: 5'AATGAGGATGCATTGGGTTT3'	120
<i>Amb82</i>	(AG) ₂₂	AY849312	F: 5'AAACAACACTAGTGTGTGTTTCAGTGTG3' R: 5'GTCTTCGGCCGTAATAATGAC3'	120
<i>Ambart04</i>	(ATAC) ₂₂	FJ595149	F: 5'AGGGGTTAGTTCTCTTAGCATCC3' R: 5'TCCGCGTGATTGAGTTTATG3'	220
<i>Ambart06</i>	(TC) ₁₆ (AC) ₉	FJ595150	F: 5'AAAGTGCCACAAACACCTTG3' R: 5'CTGCCAAAACAACCTGGAAGG3'	110
<i>Ambart09</i>	(AC) ₁₃	FJ595151	F: 5'TGCTGCATAAATTGCTCCAC' R: 5'GTATTTCGAGCCGAGCATACC3'	199
<i>Ambart21</i>	(CT) ₁₅	FJ595154	F: 5'TCACAGGCATAATTCACCTTG3' R: 5'TCTATGTGGTTCTCATAATTCTTCAC3'	141
<i>Ambart24</i>	(GA) ₁₄	FJ595155	F: 5'GATCATTGCTGCAGTTTCAAC3' R: 5'CATCATTCAAATTTCCATATTGC3'	90
<i>Ambart27</i>	(TC) ₂₁	FJ595156	F: 5'CCCTTCCCTTCTGCTTCC3' R: 5'GCCATCAAACAACCTATGAACC3'	183

PCR reakcije su izvedene u Applied Biosystems Verity thermal cycler-u u finalnom volumenu od 20 μ l. Svaka reakcija je sadržala 0,2 μ l Dream *Taq* DNK polimeraze (5U/ μ l) (Fermentas) i 2 μ l 10x*Taq* pufera (koji sadrži 20mM MgCl₂), 2 μ l 2mM dNTPs, 1 μ l 0,1 μ M oba prajmera, 11,8 μ l PCR H₂O i 2 μ l genomske DNK (koncentracije 50 ng/ μ l). Ukoliko je koncentracija genomske DNK bila manja od 50 ng/ μ l, povećana je količina tog uzorka u reakciji na račun smanjenja količine PCR H₂O.

Temperaturni uslovi PCR reakcije za parove prajmera izolovane od strane Genton i sar. (2005b) (*Amb12*, *Amb16*, *Amb30*, *Amb82*) su bili sledeći: uvodna denaturacija na 94°C u trajanju od 4 min, zatim 35 ciklusa, koji su se sastojali od denaturacije ciklusa na 94°C 30 s, zatim vezivanja prajmera na temperaturama specifičnim za svaki par prajmera u trajanju od 30 s, elongacije na 72°C 45 s, i na kraju finalne ekstenzije na 72°C u trajanju od 5 min.

Profil amplifikacije za mikrosatelitske lokuse *Ambart04*, *Ambart06*, *Ambart09*, *Ambart21*, *Ambart24*, *Ambart27* (Chun i sar., 2009, GenBank accession no: FJ595149–FJ595156; Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium 2009) se sastojao od: uvodne denaturacije na 95°C u trajanju od 15 min, praćene sa 30 ciklusa denaturacije ciklusa na 95°C 30 s, vezivanja prajmera na 54°C u trajanju od 45 s, elongacije na 72°C 45 s, i na kraju finalne ekstenzije na 72°C u trajanju od 5 min.

5.2.3. Metode detekcije i analize varijabilnosti produkata amplifikacije mikrosatelitsih lokusa

5.2.3.1. Detekcija produkata amplifikacije mikrosatelitsih lokusa

Za detekciju PCR produkata i u cilju utvrđivanja približne veličine alela korišćena je elektroforeza na 2% agaroznim gelovima.

Pri pripremi gelova odgovarajuća količina agaroze (u zavisnosti od veličine gelova) je rastvarana u 1xTAE puferu (2M trizma baza, 1M glacijalna sirćetna kiselina, 0,5M EDTA pH8,0). U ovaj rastvor je direktno dodavan etidijum-bromid (EtBr) u koncentraciji od 0,02%,

koja je omogućila vizualizaciju fragmenata DNK uz pomoć UV transiluminatora. Za određivanje približne veličine alela, u gel je, pored uzoraka, lodiran i marker Fermentas SM0243 od 100bp. Elektroforeza je tekla na konstantnom naponu od 100V.

5.2.3.2. Analiza varijabilnosti produkata amplifikacije mikrosatelitsih lokusa

Analiza alelne varijabilnosti mikrosatelita i genotipizacija individua vršena je standardnom denaturišućom 6% poliakrilamidnom elektroforezom (PAA) (Sambrook i Russel, 2001).

Prvi korak ove metode je detaljna obrada stakala, nakon čega se pristupalo izlivanju gela. Za pravljenje gela korišćena je gel mix smeša (10xTBE (Trisma baza, borna kiselina, 0,05M EDTA pH8,0), 4M urea, A+B smeša 40% (0,65M akrilamid, 0,01M bisakrilamid)). U svhu polimerizacije gela u ovu smešu dodavan je 10% amonijum-persulfat i TEMED. Priprema uzoraka za elektroforezu je podrazumevala mešanje 5 μ l PCR produkta sa 2 μ l formamidske boje (0,05M EDTA pH8,0, dejonizovan formamid, boja ksilen cijanol i bromfenol blu) i denaturaciju na 95°C pet minuta u Applied Biosystems Verity thermal cycler-u.

Za elektroforezu je korišćen standardni 1xTBE pufer (0,1M Tris; 0,1M borna kiselina; 0,05M EDTA). Elektroforeza je prvo tekla na konstantnih 50W, a zatim nakon unošenja uzoraka u gel na 80W, ukupno 2 i po časa. Nakon završene elektroforeze, poliakrilamidni gelovi su bojeni modifikovanom metodom srebrnog bojenja. Gelovi su 30 minuta fiksirani u smeši za fiksiranje (10% etanol i 5% glacijalna sirćetna kiselina). Nakon toga isprani su dva puta po 2 minuta destilovanom vodom. Zatim su gelovi bojeni 20 minuta u 0,12M rastvoru AgNO₃ i isprani dva puta po 10 sekundi u destilovanoj vodi. Naredni korak je bio potapanje gelova u razvijlač (0,375M NaOH; 0,4% formalin; 0,22mM NaBH₄) do pojavljivanja traka na gelu, a najduže u trajanju od 20 minuta. Nakon toga gelovi su isprani u stop rastvoru (0,141M Na₂CO₃) i destilovanoj vodi, posle čega su osušeni na vazduhu na sobnoj temperaturi.

Gelovi su skenirani CanoScan4200F aparatom i analizirani u softverskom paketu GelAnalyzer 2010 (<http://www.gelanalyzer.com/download.html>). Referentne vrednosti su

predstavljali fragmenti poznate veličine markera Sigma D3812-VL od 50 bp. Uzorci sa punim (potpunim, kompletnim) opsegom veličine alela za ispitivani lokus su činili pozitivne kontrole, koje su se pored uzoraka lodirali u gelove, radi održavanja konzistentnosti u određivanju veličine alela između gelova u okviru jednog lokusa. Sa svakim novim otrivanjem alela, broj pozitivnih kontrola se povećavao.

5.2.4. Obrada podataka

Statistička obrada podataka dobijenih analizom deset mikrosatelitskih lokusa na uzorcima vrste *Ambrosia artemisiifolia* sa 22 lokaliteta ispitivanog područja, vršena je upotrebom različitih programskih paketa. Većina analiza je urađena kako na čitavom setu podataka, uključujući individue svih uzorkovanih populacija (ukupno 22 populacije južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana), tako i na podacima grupe populacija južnog dela Panonske nizije (16 populacija) i grupe populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana (šest populacija).

5.2.4.1. Procena genetičke varijabilnosti populacija

U svrhu testiranja postojanja disekvilibruma usled genotipske vezanosti (eng. genotypic linkage disequilibrium) i odstupanja od Hardy-Weinberg (HW) ekvilibriuma upotrebljen je programski paket GENEPOP 4.0.1 (Rousset, 2008). Za određivanje nivoa signifikantnosti, p vrednosti su korigovane primenom Boniferonijeve metode (Rice, 1989).

Za određivanje parametara genetičke varijabilnosti korišćen je programski paket GenALEX 6.5 (Peakall i Smouse, 2012). Izračunat je prosečan broj alela po lokusu (N_A), broj jedinstvenih alela (N_P), uočena (H_o) i očekivana heterozigotnost (H_e). Softver FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) upotrebljen je za dobijanje "allelic richness" (r)-parametra koji predstavlja prosečan broj alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka (baziran na minimalnoj veličini

uzorka), prosečan broj retkih alela po lokusu (sa frekvencijom manjom od 0,1) (N_R), kao i za određivanje Weir i Cockerham (1984) koeficijenta inbridinga (F_{IS}).

Za utvrđivanje signifikantnosti razlika srednjih vrednosti parametara genetičke varijabilnosti (r , H_o , F_{IS}) između analiziranih grupa populacija upotrebljen je test permutacija implementiran u programskom paketu FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001). Broj permutacija je podešen na 10 000, a nivo signifikantnosti je određen nakon Boniferonijeve korekcije (Rice, 1989).

Za proveru prisustva nultih alela u dobijenom setu mikrosatelitskih podataka, korišćen je program Micro-Checker 2.2.3. (Van Oosterhout i sar., 2004), dok je za izračunavanje frekvencije nultih alela upotrebljen maximum-likelihood (ML) pristup inkorporiran u programskom paketu ML-NullFreq (Kalinowski i Taper, 2006). Za razliku od ostalih ML pristupa, ML-NullFreq programski paket pri izračunavanju verovatnoće prisustva nultih alela, uzima u obzir oba uzroka pojave individua bez vidljivih bendova: mutacije u prajmer-vezujućem regionu mikrosatelita, kao i neuspešnost PCR reakcija, uslovljene ljudskom greškom. Obzirom na ovo, opisani pristup se smatra informativnijim u odnosu na druge metode izračunavanju verovatnoće prisustva nultih alela (Chakraborty i sar., 1992; Brookfield, 1996; Marshall i sar., 1998; Rousset, 2007).

U cilju detekcije skorašnjeg prolaska populacija kroz genetičko usko grlo upotrebljen je BOTTLENECK 1.2.02. (Piry i sar., 1999) programski paket, baziran na testiranju razlike u uočenoj heterozigotnosti i heterozigotnosti koja se očekuje na osnovu detektovanog broja alela. Signifikantano povećanje heterozigotnosti (eng. heterozygosity excess), ukazuje na prolazak populacije kroz genetičko usko grlo. Upotrebljen je T.P.M. (two-phase mutation) model i Wilcoxon test, koji se smatra najpreciznijim među testovima implementiranim u Bottleneck softverskom paketu. Vrednosti p manje od 0,05 su smatrane signifikantnim (nakon Boniferonijeve korekcije vrednosti (Rice, 1989)).

5.2.4.2. Genetička diferencijacija i struktuiranost populacija

U proceni distribucije genetičke varijabilnosti između i unutar populacija, kao i grupa populacija, upotrebljena je analiza molekularne varijanse AMOVA u softverskom paketu ARLEQUIN 3.0 (Exoffier i sar., 2005). Da bi se odredila signifikantnost komponenti varijanse i F-statistike, analiza je uključivala 10 000 permutacija.

Upotrebom ARLEQUIN 3.0 (Exoffier i sar., 2005) programskog paketa dobijene su vrednosti Weir i Cockerham (1984) estimatora genetičke diferencijacije između populacija (F_{st}), kao i nivo njihove signifikantnosti nakon 10 000 permutacija. Signifikantnost F_{st} vrednosti je utvrđena nakon Boniferonijeve korekcije (Rice, 1989). Genetička diferencijacija između parova populacija je definisana kao niska ukoliko su F_{st} vrednosti bile manje od 0,05; F_{st} vrednosti u opsegu od 0,05 do 0,15 su ukazivale na srednji nivo diferencijacije između populacija; visok nivo diferencijacije populacija je bio određen F_{st} vrednostima u opsegu od 0,15 do 0,25; dok su na veoma visoku diferencijaciju ukazivale F_{st} vrednosti veće od 0,25 (Wright, 1978). Ukupan (eng. global) Weir i Cockerham (1984) estimator genetičke diferencijacije (F_{st}) za sve ispitivane populacije, kao i grupe populacija dobijen je upotrebom FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) softvera. Isti softverski paket je korišćen i za utvrđivanje signifikantnosti razlike F_{st} vrednosti između analiziranih grupa populacija upotrebom testa permutacija, pri čemu je broj permutacija podešen na 10 000, dok je nivo signifikantnosti određen nakon Boniferonijeve korekcije (Rice, 1989).

Upotrebom GENETIX 4.05 softverskog paketa (Belkhir i sar., 1996-2004) izračunate su Cavalli-Sforza i Edwards (1967) genetičke udaljenosti (distance) između populacija. Dobijena matrica genetičkih udaljenosti je implementirana u koordinatnu analizu (Principal Coordinate Analysis – PcoA) programskog paketa GenAlEx 6.5 (Peakall i Smouse, 2012). PCo analiza je metoda vizualizacije genetičkih odnosa između ispitivanih populacija i omogućava pregledan prikaz i laku interpretaciju velikog broja obrađenih podataka. Algoritam ove metode je kompleksan, ali u osnovi PCoA predstavlja prikaz podataka u koordinatnom sistemu u čijem centru se nalaze glavne ose varijacije. Prve dve ili tri koordinatne ose otkrivaju većinu varijacija, kao i moguće grupisanje populacija, pri čemu svaka naredna osa (koordinata) objašnjava proporcionalno manje varijacija u ukupnoj količini varijacija.

STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard i sar., 2000) softverski paket baziran na Bajesovom klaster metodu je upotrebljen u analizi genetičke strukture populacija. Dužina “burn-in” perioda je podešena na 10^5 iteracija, dok je broj Markov chain Monte Carlo (MCMC) ponavljanja nakon burn-in perioda iznosio 10^6 . Upotrebljen je “admixture ancestry” model u kombinaciji sa “correlated allele frequency” modelom. Obzirom da upotrebljeni Bajesov algoritam podrazumeva *a priori* određivanje broja klastera (K), K vrednost je podešena na 1-10, a za svaku K vrednost broj nezavisnih replikacija je bio 5. Analiza je uključivala i informacije o pripadnosti individua određenoj populaciji, dok su ostali parametri podešeni po *default* vrednostima.

Za određivanje najverovatnijeg broja klastera (K) u ispitivanom setu podataka, upotrebljen je softver STRUCTURE HARVESTER (Earl i vonHoldt, 2012). Primenjena su dva *ad hoc* metoda: ΔK metod (Evano i sar., 2005), baziran na veličini (stopi) promene između dve K vrednosti i metod po Pritchardu i sar. (2000), baziran na određivanju K vrednosti prema $\ln P(D)$ vrednostima (log probability of data).

Obradom STRUCTURE podataka u STRUCTURE HARVESTER programskom paketu dobijeni su input fajlovi za CLUMPP 1.1.2. (Jakobsson i Rosenberg, 2007) programski paket. Ovaj softverski paket je upotrebljen za izračunavanje srednjih vrednosti nezavisnih replikacija (5 replikacija) za određeni najverovatniji broj klastera (K) u analiziranom setu podataka. Dobijene vrednosti su implementirane u programskom paketu DISTRUCT (Rosenberg, 2004) u cilju grafičkog predstavljanja strukture analiziranih populacija. Primenjena su dva grafička prikaza: prikaz pripadnosti pojedinačnih individua određenom klasteru (plot of the individual Q-matrix; Q-koeficijent pripadnosti) i prikaz pripadnosti populacija određenom klasteru (plot of the population Q-matrix).

Da bi se ispitalo prisustvo genetičke udaljenosti uslovljene geografskom udaljenošću između populacija, urađen je Mantel test upotrebom IBD (Isolation By Distance) programa (Bohonak, 2002). Mantel test je urađen za matrice korelacija genetičke udaljenosti $F_{st}/(1-F_{st})$ i logaritma geografske udaljenosti izražene u kilometrima između ispitivanih populacija (Rousset, 1997). Geografske udaljenosti izražene u kilometrima su dobijene upotrebom Geographic DistanceMatrixGenerator 1.2.3. softvera (http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg/comments.php), na osnovu podataka o geografskoj širini i geografskoj

dužini lokaliteta ispitivanih populacija. Signifikantnost Mantel testa je utvrđena nakon 10 000 randomizacija i Boniferonijeve korekcije p vrednosti (Rice, 1989).

U cilju kvantifikacije protoka gena između ispitivanih populacija upotrebljen je softverski paket GENEPOP 4.0.1 (Rousset, 2008). Metodom jedinstvenih alela (Slatkin, 1985a; Barton i Slatkin, 1986) utvrđen je broj migranata (N_m) na osnovu koga je određen nivo protoka gena. Prema Slatkinu (1985a), logaritam broja migranata N_m je u negativnoj korelaciji sa logaritmom prosečne frekvencije jedinstvenih alela $p(1)$. Vrednost $N_m > 1$ ukazuje na visok nivo protoka gena između ispitivanih populacija.

Da bi se identifikovale potencijalne izvorne populacije individua sa područja peripanonskog prostora centralnog Balkana sproveden je test pripadnosti (assignment test) upotrebom GeneClass 2.0 (Piry i sar., 2004) programskog paketa. Primenjen je Bajesov metod (Rannala i Mountain, 1997), a verovatnoća pripadnosti (eng. probability of assignment) individua referentnim populacijama (odnosno potencijalnim izvornim populacijama) je računata upotrebom "Monte-Carlo resampling" metode prema Petkau i sar. (2004). Minimalan broj simuliranih individua je podešen na 10 000.

6. REZULTATI

6.1. Genetička varijabilnost populacija ambrozije

Genetička karakterizacija 22 populacije *Ambrosia artemisiifolia* sa područja južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana je obuhvatala analizu 10 mikrosatelitskih lokusa. Procenat uspešnosti amplifikacije ispitivanih mikrosatelita se kretao od 94,73% za lokus *Ambart21* do 99,56% za lokus *Amb30*. Individue koje nisu dale PCR produkte u jednom ili nekoliko lokusa nakon ponovljenih PCR reakcija (dva puta), su smatrane homozigotima za nulte alele u tim lokusima. Individue sa nedostatkom PCR produkata u svim lokusima, su izostavljene iz daljih analiza. Svi analizirani lokusi su bili polimorfni, sa brojem alela po lokusu koji se kretao od 5 u lokusu *Amb12* do 32 u lokusu *Ambart24*. U lokusu *Amb16* je detektovano 11 alela, u lokusima *Amb30* i *Ambart09* po 13 alela, zatim u lokusu *Ambart21* 16 alela, u lokusu *Ambart04* 18 alela. Lokusi *Ambart27* i *Ambart06* su sadržali po 22 i 24 alela, dok je u lokusu *Amb82* detektovan 31 alel. Obzirom na visok nivo uspešnosti amplifikacije ispitivanih mikrosatelita, polimorfnost lokusa, kao i na utvrđeno odsustvo disekvilibruma genotipske vezanosti između svih parova ispitivanih lokusa, ni jedan lokus nije isključen iz dalje analize.

Vrednosti parametara genetičke varijabilnosti analiziranih populacija ambrozije Panonskog regiona su date u Tabeli 3. U području južnog dela Panonske nizije vrednosti prosečnog broja alela po lokusu (N_A) su imale sledeću distribuciju: najmanja vrednost ovog parametra je zabeležena u populacijama Novi Sad (8,8), Vršac i Šabac (9,3), praćene populacijama Smederevo (9,6) i Sanandrei (9,9). Populacije Indija, Derventa, Ostrovo, Ilača, Đala i Lug (poređane po rastućem redosledu) su imale prosečan broj alela u opsegu od 10,1 do 10,8; dok su populacije sa najvećim vrednostima ovog parametra bile populacije Sombor, Kutina, Baja, Kula i Kikinda, sa opsegom vrednosti od 11,2 do 11,7. Vrednosti prosečnog broja alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka (r) (čime se populacije svode na zajednički, minimalan broj individua) su imale sličnu distribuciju vrednosti kao vrednosti parametra N_A . Najmanja vrednost parametra r je zabeležena u populaciji Novi Sad (7,90), zatim u populacijama Vršac i Smederevo (8,42), praćene populacijama Šabac (8,89) i

Sanandrei (9,00). Nešto više vrednosti su zabeležene u populacijama Inđija, Derventa, Đala, Ostrovo, Ilača i Lug (poređane po rastućem redosledu) sa opsegom vrednosti od 9,04 do 9,31, dok su populacije Baja, Sombor, Kutina, Kula i Kikinda (poređane po rastućem redosledu) imale prosečan broj alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka (r) u vrednosti od 9,48 do 9,87. Slična tendencija distribucije vrednosti je zapažena i kod prosečnog broja retkih alela po lokusu (N_R) čije su se vrednosti kretale u opsegu od 4,8 do 8,9.

Broj jedinstvenih alela prisutnih u području južnog dela Panonske nizije je relativno mali. U populacijama Sombor i Vršac je detektovano po 2 jedinstvena alela, dok je u populacijama Ostrovo, Baja i Smederevo otkriven po 1 jedinstveni alel (Tabela 3). Analizirajući broj jedinstvenih alela samo na nivou populacija Panonskog regiona (nije predstavljeno u tabeli) po 2 jedinstvena alela su detektovana u populacijama Kula, Sombor, Vršac, Baja i Smederevo, dok je po 1 jedinstveni alel uočen u populacijama Kikinda i Ostrovo.

Tabela 3. Parametri genetičke varijabilnosti populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije

Region	Populacija	Oznaka populacije	N _A	r	N _R	N _P	H _o	H _e	F _{is}	HW test	N _n	f _n	T.P.M.
Južni deo Panonske nizije	Kutina	CR-Kut	11,4	9,81	7,5	0	0,522	0,826	0,391	**	9	0,196	0,042
	Lug	CR-Lug	10,8	9,31	7,3	0	0,527	0,818	0,379	**	8	0,173	0,042
	Ostrovo	CR-Ost	10,6	9,18	7,8	1	0,559	0,787	0,313	**	8	0,157	0,080
	Ilaca	CR-Ila	10,7	9,19	7,7	0	0,468	0,772	0,414	**	9	0,188	0,216
	Derventa	BH-Der	10,3	9,10	7,0	0	0,526	0,792	0,360	**	8	0,175	0,097
	Baja	HU-Baj	11,6	9,48	8,9	1	0,570	0,781	0,292	**	6	0,128	0,312
	Sanandrei	RO-San	9,9	9,00	6,0	0	0,456	0,800	0,455	**	9	0,243	0,009
	Sombor	SR-Som	11,2	9,64	8,2	2	0,572	0,779	0,292	**	6	0,123	0,500
	Kula	SR-Kul	11,6	9,85	8,1	0	0,557	0,811	0,337	**	6	0,149	0,385
	Novi Sad	SR-NS	8,8	7,90	4,8	0	0,461	0,773	0,426	**	9	0,203	0,007
	Indija	SR-Indj	10,1	9,04	6,5	0	0,529	0,800	0,363	**	8	0,172	0,042
	Šabac	SR-Sab	9,3	8,89	6,1	0	0,557	0,791	0,327	**	6	0,161	0,097
	Đala	SR-Djal	10,7	9,15	7,9	0	0,506	0,806	0,393	**	7	0,175	0,001
	Kikinda	SR-Kik	11,7	9,87	8,6	0	0,540	0,824	0,365	**	8	0,172	0,042
	Vršac	SR-Vrs	9,3	8,42	6,2	2	0,506	0,781	0,378	**	6	0,165	0,312
Smederevo	SR-Sme	9,6	8,42	6,2	1	0,550	0,803	0,338	**	6	0,146	0,010	
Srednja vrednost+SD			10,5±0,9	9,14±0,55	7,2±1,1	0,4±0,7	0,525±0,0375	0,796±0,017	0,364±0,046	**	7,437±1,263	0,170±0,029	

N_A-prosečan broj alela po lokusu, r- prosečan broja alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka (baziran na minimalnoj veličini uzorka od 13 diploidnih individua), N_R – prosečan broj retkih alela po lokusu (sa frekvencijom manjom od 0,1), N_P - broj jedinstvenih alela, H_o-uočena heterozigotnost, H_e-očekivana heterozigotnost, F_{is}-Weir i Cockerham (1984) koeficijent inbridinga, HW test- Hardy-Weinberg test (**p<0.01), N_n-broj lokusa koji sadrže nulte alele, f_n-frekvencija nultih alela, T.P.M.- p vrednosti povećanja heterozigota baziranog na T.P.M. modelu mutacije mikrosatelitskih lokusa (p<0,05, nakon Boniferonijeve korekcije, su smatrane signifikantnim), SD-standardna devijacija

Poredeći vrednosti parametara genetičkog diverziteta u populacijama ambrozije peripanonskom prostora centralnog Balkana, zapaža se sukcesivan gubitak genetičke varijabilnosti populacija ispitivanog regiona (Tabela 4). Naime, uočena je veća genetička varijabilnost u populacijama iz severnog dela ispitivanog regiona u odnosu na južnije populacije. Parametri N_A , r i N_R su imali sličnu distribuciju vrednosti po populacijama. Najveće vrednosti ovih parametara su detektovane u populacijama Sevojno i Gruža, praćene populacijom Negotin (koje se nalaze na severnom delu ispitivanog peripanonskog područja). Nešto niže vrednosti su uočene u populacijama Zlatibor i Kruševac, dok je najmanji genetički diverzitet detektovan u populaciji Leskovac, koja se nalazi na južnoj granici analiziranog regiona. Opseg vrednosti prosečnog broja alela po lokusu (N_A) u populacijama peripanonskog prostora centralnog Balkana je iznosio od 6,2 do 11,2; vrednosti prosečnog broja alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka (r) su se kretale u opsegu od 5,34 do 9,53, dok je opseg vrednosti prosečnog broja retkih alela po lokusu (N_R) bio 3,3-8,7.

U populacijama Negotin i Kruševac detektovan je po 1 jedinstveni alel, dok je u populaciji Zlatibor otkriven najveći broj jedinstvenih alela u odnosu na sve ispitivane populacije (3 jedinstvena alela) (Tabela 4). Analizirajući broj jedinstvenih alela samo na nivou populacija peripanonskog prostora (nije predstavljeno u tabeli) detektovano je prisustvo jedinstvenih alela u svim ispitivanim populacijama. Najveći broj jedinstvenih alela je primećen u populaciji Zlatibor (čak 9 jedinstvenih alela), praćen populacijom Gruža sa 5 jedinstvenih alela, 4 jedinstvena alela su detektovana u populacijama Negotin, Sevojno i Kruševac, dok je najmanji broj jedinstvenih alela uočen u populaciji Leskovac (2 jedinstvena alela).

Tabela 4. Parametri genetičke varijabilnosti populacija ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana

Region	Populacija	Oznaka populacije	N _A	r	N _R	N _P	H _o	H _e	F _{is}	HW test	N _n	f _n	T.P.M.
Peripanonski prostor centralnog Balkana	Gruža	SR-Gru	11,2	9.53	8,7	0	0,541	0,793	0,339	**	9	0,157	0,053
	Sevojno	SR-Sev	10,8	9.20	7,8	0	0,532	0,808	0,363	**	9	0,176	0,003
	Negotin	SR-Neg	8,9	7.86	5,5	1	0,513	0,783	0,366	**	7	0,167	0,161
	Zlatibor	SR-Zit	8,2	7.24	5,1	3	0,556	0,758	0,288	**	5	0,132	0,016
	Kruševac	SR-Kru	8,2	7.00	5,6	1	0,556	0,713	0,243	**	5	0,101	0,903
	Leskovac	SR-Les	6,2	5.34	3,3	0	0,416	0,677	0,406	**	8	0,195	0,385
Srednja vrednost±SD			8,9±1,8	7,69±1,54	6,0±1,95	0,8±1,2	0,519±0,053	0,755±0,051	0,334±0,059	**	7,167±1,835	0,155±0,034	

N_A-prosečan broj alela po lokusu, r- prosečan broja alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka (baziran na minimalnoj veličini uzorka od 13 diploidnih individua), N_R – prosečan broj retkih alela po lokusu (sa frekvencijom manjom od 0,1), N_P - broj jedinstvenih alela, H_o-uočena heterozigotnost, H_e-očekivana heterozigotnost, Fis-Weir i Cockerham (1984) koeficijent inbridinga, HW test- Hardy-Weinberg test (**p<0.01), N_n-broj lokusa koji sadrže nulte alele, f_n-frekvencija nultih alela, T.P.M.- p vrednosti povećanja heterozigota baziranog na T.P.M. modelu mutacije mikrosatelitskih lokusa (p<0,05, nakon Boniferonijeve korekcije, su smatrane signifikantnim), SD-standardna devijacija

U svim analiziranim populacijama vrednosti očekivane heterozigotnosti po populaciji su se kretale u opsegu od 0,677 do 0,826, i bile su veće u odnosu na vrednosti uočene heterozigotnosti (0,416-0,572) (Tabele 3, 4). Nakon Boniferonijeve korekcije, signifikantno odstupanje od Hardy-Weinberg (HW) ekvilibriuma je detektovano u 130 od 220 analiza (22 populacije x 10 lokusa). Multi-lokus test (rezultati po populacijama) je pokazao visoko signifikantnu devijaciju u svim analiziranim populacijama, što je potvrđeno i testom za sve populacije i sve lokuse istovremeno. Sve vrednosti Weir i Cockerham (1984) koeficijenta inbridinga (F_{is}) su bile pozitivne i kretale su se u opsegu od 0,243 do 0,455. Zajedno sa rezultatima Hardy-Weinberg (HW) ekvilibriuma, ove vrednosti ukazuju na prisustvo deficita heterozigota u ispitivanim populacijama.

Obzirom da je jedan od uzroka deficita heterozigota prisustvo nultih alela, proučavan set podataka analiziran je upotrebom Micro-Checker 2.2.3. (Van Oosterhout i sar., 2004) programskog paketa. Pomenuti softver se upotrebljava u inicijalnoj detekciji nultih alela u proučavanom uzorku. Bazira se na upoređivanju očekivane i uočene homozigotnosti, pri čemu detektovano povećanje broja homozigota objašnjava prisustvom nultih alela. U analiziranom setu podataka, nulti aleli su detektovani u 162 od ukupno 220 analiza (22 populacije x 10 lokusa). U svim proučavanim populacijama je zabeleženo prisustvo nultih alela. U populacijama Kruševac (SR-Kru) i Zlatibor (SR-Zla) nulti aleli su detektovani u 5 analiziranih lokusa (N_n), dok je najveći broj lokusa koji sadrže nulte alele (9 lokusa) zabeležen u populacijama Sanandrei (RO-San), Kutina (CR-Kut), Ilača (CR-Ila), Novi Sad (SR-NS) i Sevojno (SR-Sev) (Tabele 3, 4).

Nakon detekcije nultih alela u proučavanim populacijama, izračunate su frekvencije nultih alela po populacijama (f_n) (upotrebom ML-NullFreq softvera), koje su se kretala u opsegu od 0,101 u populaciji Kruševac (SR-Kru) do 0,243 u populaciji Sanandrei (RO-San) (Tabele 3, 4). U svim lokusima je detektovano prisustvo nultih alela, a frekvencija se kretala od 0,012 u lokusu *Amb16* do 0,284 u lokusu *Amb12*.

Poredeći srednje vrednosti parametara genetičke varijabilnosti južnog dela Panonske nizije u odnosu na peripanonski prostor centralnog Balkana, uočeno je da su vrednosti većine parametara (N_A , r , N_R , H_o , H_e i F_{is}) veće u regionu Panonske nizije u odnosu na peripanonski prostor. Prosečan broj alela po lokusu (N_A), prosečan broj alela po lokusu nakon metode

refrakcije uzorka (r) i prosečan broj retkih alela po lokusu (N_R) su se isticali relativno visokim srednjim vrednostima detektovanim u populacijama Panonske nizije (Tabela 3) i bili su viši od vrednosti detektovanih u populacijama peripanonskog prostora (Tabela 4). Srednje vrednosti uočene (H_o), očekivane heterozigotnosti (H_e) i koeficijenta inbridinga (F_{is}) u regionu južnog dela Panonske nizije (Tabela 3) su bile neznatno više u odnosu na peripanonski prostor (Tabela 4). Slično, srednja vrednost broja lokusa koji sadrže nulte alele (N_n) i srednja vrednost frekvencije nultih alela (f_n) je bila malo veća u populacijama južnog dela Panonske nizije ($N_n=7,437$; $F_n=0,170$) u odnosu na populacije peripanonskog regiona ($N_n=7,167$; $F_n=0,155$). Za razliku od pomenutih parametara, srednja vrednost broja jedinstvenih alela (N_p) je bila veća u peripanonskom prostoru centralnog Balkana u odnosu na južni deo Panonske nizije i iznosila je $0,8(\pm 1,2)$, odnosno $0,4(\pm 0,7)$ (Tabele 3, 4).

Da bi se utvrdilo da li postoje značajne razlike između detektovanih srednjih vrednosti parametara genetičke varijabilnosti (r , H_o , F_{is}) dva analizirana regiona (panonskog i peripanonskog) sproveden je test permutacija u FSTAT programskom paketu. Uočena je signifikantna razlika (nakon Boniferoni korekcije) između srednjih vrednosti parametra r ($p=0,002$) ispitivanih regiona, dok se razlika u parametrima H_o ($p=0,751$) i F_{is} ($p=0,235$) nije pokazala kao signifikantna.

Obzirom na uočenu redukciju genetičkog diverziteta populacija peripanonskog regiona u odnosu na panonski, upotrebljen je BOTTLENECK 1.2.02. (Piry i sar., 1999) programski paket u cilju detekcije dokaza o prolasku populacija kroz genetičko usko grlo. P vrednosti dobijene analizom signifikantnosti povećanja heterozigota baziranom na T.P.M. (two-phase mutation) modelu mutacije mikrosatelitskih lokusa su date u poslednjoj koloni Tabele 3 i Tabele 4. Nakon Boniferonijeve korekcije ovih p vrednosti, rezultati pokazuju signifikantano povećanje heterozigota u dve populacije, Đala (SR-Dja) i Sevojno (SR-Sev), što ukazuje na skorašnji prolazak ovih populacija kroz genetičko usko grlo.

6.2. Genetička diferencijacija i struktura populacija ambrozije

6.2.1. AMOVA analiza

Da bi se utvrdilo koji je procenat varijabilnosti prisutan unutar populacija, kao i između ispitivanih populacija, ali i grupa populacija (odnosno regiona), urađena je analiza molekularne varijanse. Rezultati AMOVA analize, su pokazali da su genetičke varijacije prisutne u većem procentu unutar populacija u odnosu na procenat genetičke varijabilnosti između populacija, kao i grupa populacija. Procenat genetičke varijabilnosti između svih ispitivanih populacija je iznosio 3,93%, dok je varijabilnost unutar populacija bila 96,07% (Tabela 5). Nešto niža inter-populaciona varijabilnost je detektovana na području južnog dela Panonske nizije (2,77%) (Tabela 6), dok je procenat varijabilnosti između populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana bio viši i iznosio je 7,19% (Tabela 7). Genetička varijabilnost između ispitivanih grupa populacija, odnosno regiona (populacije južnog dela Panonske nizije u odnosu na populacije peripanonskog prostora centralnog Balkana) je bio izrazito nizak sa vrednošću od 0,54% (Tabela 8). Nesignifikantna varijabilnost između grupa populacija je potvrđena i nakon Boniferonijeve korekcije p vrednosti, dok je u ostalim analizama, p vrednost ukazala na signifikantne inter- i intra-populacione varijacije.

Tabela 5. AMOVA svih ispitivanih populacija ambrozije (populacije južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana)

Izvor varijabilnosti	Procenat varijabilnosti	P vrednost
Između populacija	3,93	$<10^{-5}$
Unutar populacija	96,07	
Fst 0,0393		$<10^{-5}$

Tabela 6. AMOVA populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije

Izvor varijabilnosti	Procenat varijabilnosti	P vrednost
Između populacija	2,77	$<10^{-5}$
Unutar populacija	97,23	
Fst 0,0277		$<10^{-5}$

Tabela 7. AMOVA populacija ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana

Izvor varijabilnosti	Procenat varijabilnosti	P vrednost
Između populacija	7,19	$<10^{-5}$
Unutar populacija	92,81	
Fst 0,0719		$<10^{-5}$

Tabela 8. Hijerarhijska AMOVA između grupa populacija (populacije južnog dela Panonske nizije u odnosu na populacije peripanonskog prostora centralnog Balkana)

Izvor varijabilnosti	Procenat varijabilnosti	P vrednost
Između grupa populacija	0,54	$>0,005^*$ ($p=0.01762$)
Između populacija unutar grupa	3,68	$<10^{-5}$
Unutar populacija	95,78	$<10^{-5}$
Fst 0,0422		$<10^{-5}$

*nakon Boniferonijeve korekcije

6.2.2. Genetička diferencijacija populacija na osnovu Fst vrednosti

U cilju utvrđivanja stepena genetičke diferencijacije između parova ispitivanih populacija računane su vrednosti Weir i Cockerham (1984) estimatora genetičke diferencijacije (Fst). Obzirom da ovaj estimator predstavlja meru genetičke udaljenosti između populacija, niže Fst vrednosti ukazuju na niži stepen diferencijacije između ispitivanih populacija, i obrnuto.

Detektovane Fst vrednosti između parova populacija južnog dela Panonske nizije su bile generalno niske i kretale su se u opsegu od -0,005 do 0,107 (Tabela 9). Čak sto šest poređenja populacija od ukupno 120 (88,33%) je imalo Fst vrednost manju od 0,05, što je, prema Wright (1978), ukazalo na nisku diferencijaciju između populacija. Svega 14 Fst vrednosti se kretalo u opsegu od 0,05-0,15, ukazujući na srednji nivo diferencijacije između populacija, dok Fst vrednosti veće od 0,15 nisu detektovane. Sve Fst vrednosti koje su ukazale na srednji nivo diferencijacije populacija su detektovane između populacije Novi Sad (SR-NS) i ostalih ispitivanih populacija. Prema Fst vrednostima najmanja diferencijacija u regionu južnog dela

Panonske nizije je primećena između populacija Lug (CR-Lug) i Sombor (SR-Som), dok su najudaljenije populacije bile Novi Sad (SR-NS) i Derventa (BH-Der). P vrednosti nakon Boniferonijeve korekcije su pokazale visoku signifikantnost Fst vrednosti u 15 od ukupno 120 poređenja. Ukupan (eng. global) Weir i Cockerham (1984) estimator genetičke diferencijacije (Fst) dobijen upotrebom FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) softvera za sve populacije južnog dela Panonske nizije je iznosio 0,021, potvrđujući malu diferencijaciju između analiziranih populacija.

Tabela 9. Fst vrednosti parova populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije

	SR-Kul	CR-Kut	SR-Som	SR-Indj	RO-San	BH-Der	SR-Djal	SR-Kik	SR-Vrs	CR-Lug	CR-Ila	CR-Ost	HU-Baj	SR-Sab	SR-NS
SR-Kul															
CR-Kut	0,014														
SR-Som	-0,004	0,001													
SR-Indj	0,011	0,017	0,014												
RO-San	0,007	0,010	0,013	0,021											
BH-Der	0,009	0,011	0,006	0,026	0,017										
SR-Djal	0,016	0,014	0,002	0,017	0,026	0,011									
SR-Kik	0,014	0,024	0,011	0,020	0,023	0,029	0,024								
SR-Vrs	0,025	0,038	0,019	0,038	0,040	0,044*	0,036	0,025							
CR-Lug	0,004	0,009	-0,005	0	0,014	0,011	0,007	0,012	0,019						
CR-Ila	0,028	0,029	0,015	0,034	0,016	0,007	0,029	0,034*	0,045*	0,021					
CR-Ost	0,030	0,028	0,014	0,035	0,019	0,027	0,031	0,020	0,023	0,016	0,016				
HU-Baj	0,030	0,032	0,017	0,033	0,049**	0,042*	0,034	0,028	0,034	0,024	0,043**	0,010			
SR-Sab	0,018	0,029	0,017	0,026	0,016	0,028	0,032	0,012	0,030	0,013	0,033	0,010	0,027		
SR-NS	0,062**	0,068**	0,066**	0,075**	0,065**	0,107**	0,098**	0,052**	0,059**	0,053**	0,091**	0,057**	0,065**	0,047*	
SR-Sme	0,027	0,027	0,014	0,015	0,039*	0,030	0,028	0,021	0,030	0,006	0,033	0,010	0,024	0,020	0,070

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; nivo signifikantnosti korigovan po Boniferonijevom metodu (Rice, 1989)

U odnosu na populacije regiona Panonske nizije, Fst vrednosti dobijene između parova populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana su bile više i kretale su se u opsegu od 0,029 do 0,153 (Tabela 10). U deset od ukupno 15 poređenja (66,66%) je detektovana Fst vrednost veća od 0,05 (a manja od 0,15) što ukazuje na srednji nivo diferencijacije ispitivanih populacija. Fst vrednost između populacija Leskovac (Sr-Les) i Kruševac (SR-Kru) je bila veća od 0,15, ukazujući na visok nivo diferencijacije između ove dve populacije. Niska genetička diferencijacija je detektovana u 4 od ukupno 15 poređenja, sa najmanjom Fst vrednošću zabeleženom između populacija Sevojno (SR-Sev) i Zlatibor (SR-Zlt). P vrednosti nakon Boniferonijeve korekcije su pokazale visoku signifikantnost Fst vrednosti u 14 od 15 poređenja. Ukupan (eng. global) Weir i Cockerham (1984) estimator genetičke diferencijacije (Fst) (test u FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) softverskom paketu) za sve populacije peripanonskog prostora centralnog Balkana je iznosio 0,066, potvrđujući srednji nivo diferencijacije između analiziranih populacija.

Tabela 10. Fst vrednosti parova populacija ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana

	SR-Neg	SR-Les	SR-Gru	SR-Zla	SR-Sev
SR-Neg					
SR-Les	0,081**				
SR-Gru	0,053**	0,092**			
SR-Zla	0,051**	0,079**	0,048**		
SR-Sev	0,041**	0,077**	0,033**	0,029	
SR-Kru	0,092**	0,153**	0,089**	0,105**	0,058**

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; nivo signifikantnosti korigovan po Boniferonijevom metodu (Rice, 1989)

Test permutacija, kojim se utvrđuje da li postoji značajna razlika između vrednosti ispitivanog parametra, nije pokazao signifikantnu razliku između detektovane vrednosti ukupnog (eng. global) Weir i Cockerham (1984) estimatora genetičke diferencijacije (Fst) populacija južnog dela Panonske nizije u odnosu na ukupnu Fst vrednost populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana ($p = 0,012$, za nivo signifikantnosti $p < 0,05$ nakon Boniferonijeve korekcije).

Fst vrednosti između parova populacija čitavog ispitivanog regiona (južni deo Panonske nizije i peripanonski prostor centralnog Balkana) su se kretale u opsegu -0,005 do 0,148 (Tabela 11). Sto sedamdeset pet Fst vrednosti od ukupno 231 (75,75%) su bile manje od 0,05, ukazujući na nisku diferencijaciju među populacijama. Manji procenat poređenja 24,25% je pokazao srednji nivo inter-populacione diferencijacije ($0,05 < F_{st} < 0,15$), dok Fst vrednosti iznad 0,15 nisu detektovane. Najmanja diferencijacija je uočena između populacija Lug (CR-Lug) i Sombor (SR-Som), dok su populacije sa najvišim nivoom diferencijacije bile Leskovac (SR-Les) i Kruševac (SR-Kru). P vrednosti nakon Boniferonijeve korekcije su pokazale visoku signifikantnost Fst vrednosti u 67 od ukupno 231 poređenja. Ukupna (eng. global) Fst vrednost dobijena upotrebom FSTAT 2.9.3 (Goudet, 2001) softvera za sve analizirane populacije južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana je iznosio 0,035, ukazujući na nizak nivo diferencijacije među populacijama čitavog ispitivanog regiona.

Tabela 11. Fst vrednosti parova populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana

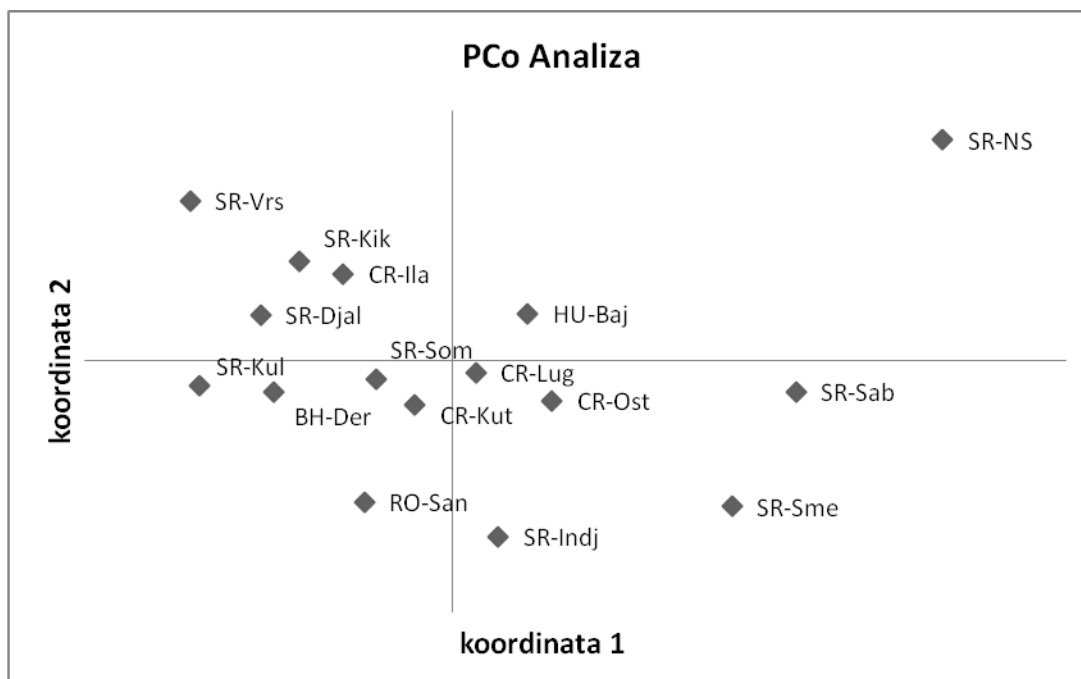
	SR-Kul	CR-Kut	SR-Som	SR-Indj	RO-San	BH-Der	SR-Djal	SR-Kik	SR-Vrs	CR-Lug	CR-Ila	CR-Ost	HU-Baj	SR-Sab	SR-NS	SR-Neg	SR-Les	SR-Sme	SR-Gru	SR-Zla	SR-Sev
SR-Kul																					
CR-Kut	0,014																				
SR-Som	-0,004	0,001																			
SR-Indj	0,011	0,017	0,014																		
RO-San	0,007	0,010	0,013	0,021																	
BH-Der	0,009	0,011	0,006	0,026	0,017																
SR-Djal	0,016	0,014	0,002	0,017	0,026	0,012															
SR-Kik	0,014	0,024	0,011	0,020	0,023	0,029	0,025														
SR-Vrs	0,025	0,038	0,019	0,038	0,040	0,044*	0,036	0,025													
CR-Lug	0,004	0,009	-0,005	0	0,014	0,011	0,007	0,012	0,019												
CR-Ila	0,028	0,029	0,015	0,034	0,016	0,007	0,029	0,034*	0,045*	0,021											
CR-Ost	0,030	0,028	0,014	0,035	0,019	0,027	0,031	0,020	0,023	0,016	0,016										
HU-Baj	0,030	0,032	0,017	0,033	0,049**	0,042**	0,034	0,028	0,034	0,024	0,043**	0,010									
SR-Sab	0,018	0,030	0,018	0,026	0,016	0,028	0,032	0,012	0,030	0,013	0,033	0,010	0,027								
SR-NS	0,062**	0,068**	0,066**	0,075**	0,065**	0,107**	0,098**	0,052**	0,059**	0,053**	0,091**	0,057**	0,065**	0,047*							
SR-Neg	0,031	0,046**	0,026	0,030	0,039	0,066**	0,050**	0,040*	0,028	0,034	0,074**	0,051**	0,054**	0,049*	0,055**						
SR-Les	0,071**	0,072**	0,069**	0,078**	0,101**	0,096**	0,074**	0,078**	0,096**	0,077**	0,102**	0,089**	0,087**	0,103**	0,123**	0,077**					
SR-Sme	0,027	0,027	0,014	0,015	0,040	0,030	0,028	0,021	0,030	0,006	0,033	0,010	0,024	0,020	0,070**	0,047*	0,080**				
SR-Gru	0,013	0,009	-0,002	0,024	0,022	0,015	0,016	0,032*	0,017	0,001	0,029	0,022	0,035*	0,028	0,072**	0,037*	0,077**	0,022			
SR-Zla	0,022	0,034	0,010	0,028	0,040*	0,043*	0,032	0,038*	0,037	0,018	0,050**	0,039*	0,051**	0,048*	0,063**	0,027	0,060**	0,028	0,029		
SR-Sev	0,013	0,017	0,001	0,003	0,018	0,011	0,015	0,016	0,040	0,004	0,028	0,031	0,040*	0,028	0,090**	0,037	0,082**	0,011	0,023	0,027	
SR-Kru	0,066**	0,075**	0,070**	0,054**	0,090**	0,104**	0,086**	0,056**	0,092**	0,059**	0,097**	0,079**	0,084**	0,063**	0,113**	0,075**	0,148**	0,050**	0,090**	0,092**	0,047*

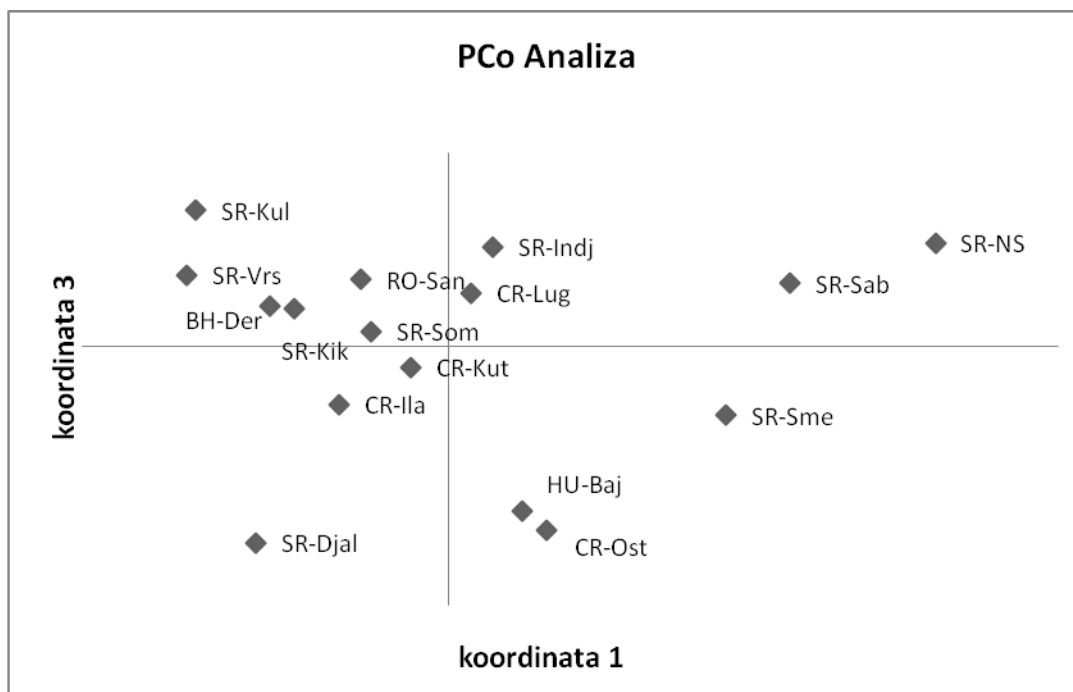
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; nivo signifikantnosti korigovan po Boniferonijevom metodu (Rice, 1989)

6.2.3. Koordinatna analiza (Principal Coordinate Analysis – PCoA)

Da bi se sagledala genetička udaljenost, odnosno bliskost među populacijama analiziranih područja, izračunate su Cavalli-Sforza i Edwards (1967) genetičke distance između parova populacija. U cilju vizualizacije ovih odnosa primenjena je PCo analiza, koja pruža pregledan prikaz genetičke udaljenosti analiziranih populacija, ali omogućava i da se uoči potencijalno grupisanje ovih populacija.

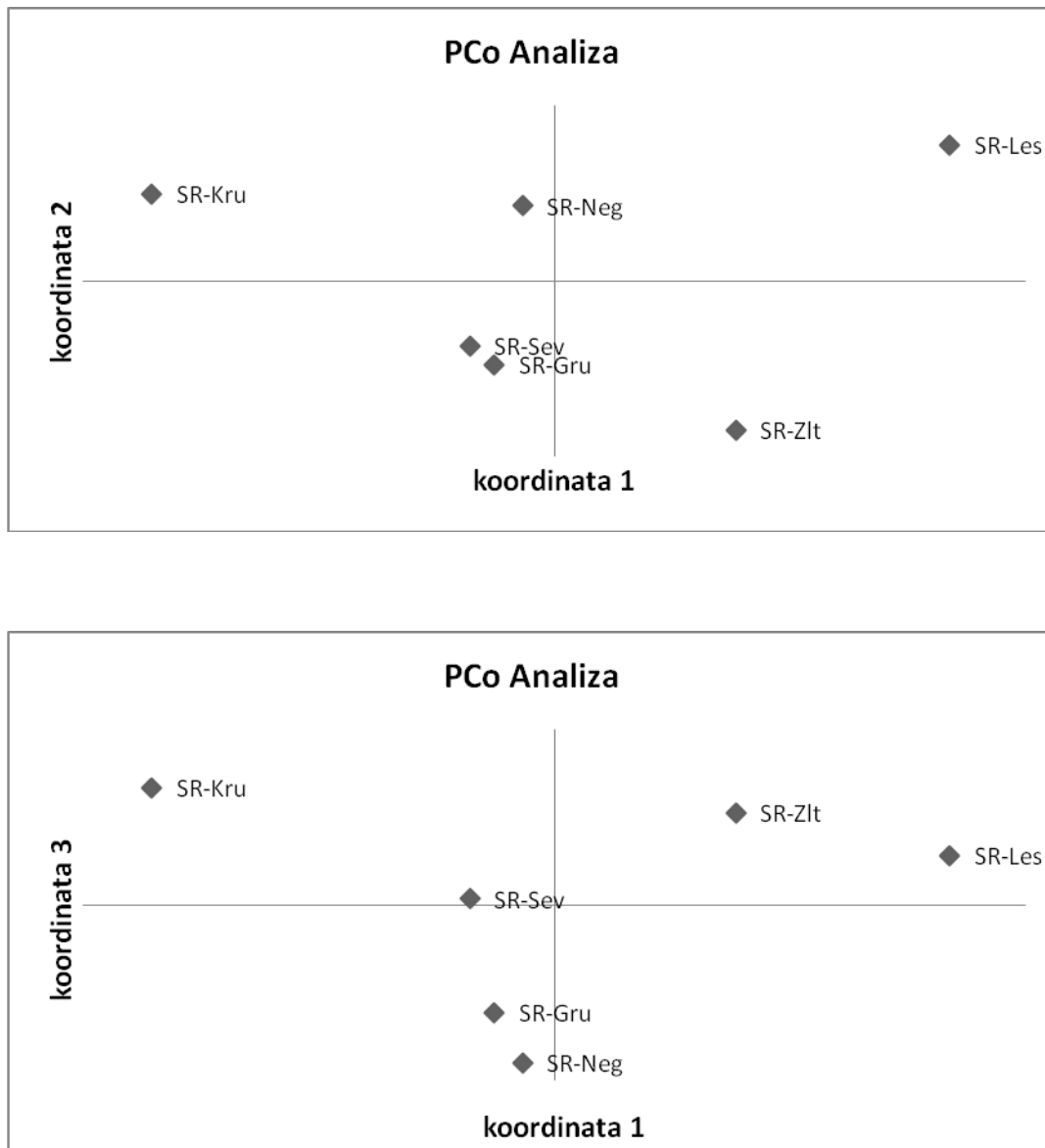
Na grafičkom prikazu genetičke udaljenosti populacija južnog dela Panonske nizije (Slika 2.), nije uočeno grupisanje analiziranih populacija u odvojene klastere. Posmatrajući prve dve koordinatne ose, koje su zajedno opisale 40,28% varijacija od ukupne količine varijacija, ispitivane populacije su najvećim delom bile postavljene oko centra koordinatnog sistema, sa izuzetkom populacije Novi Sad (SR-NS) koja je ispoljila veću genetičku udaljenost u odnosu na druge ispitivane populacije. Treća koordinata (koja je opisala 17,56% varijacija od ukupne količine varijacija) je približila populaciju Novog Sada (SR-NS) populacijama Šabac (SR-Sab) i Smederevo (SR-Sme).





Slika 2. Koordinatna analiza (PCoA) bazirana na Cavalli-Sforza i Edwards (1967) distancama među populacijama južnog dela Panonske nizije. Prva, druga i treća koordinatna osa opisuju 20,70%, 19,58% i 17,56% varijacija od ukupne količine varijacija.

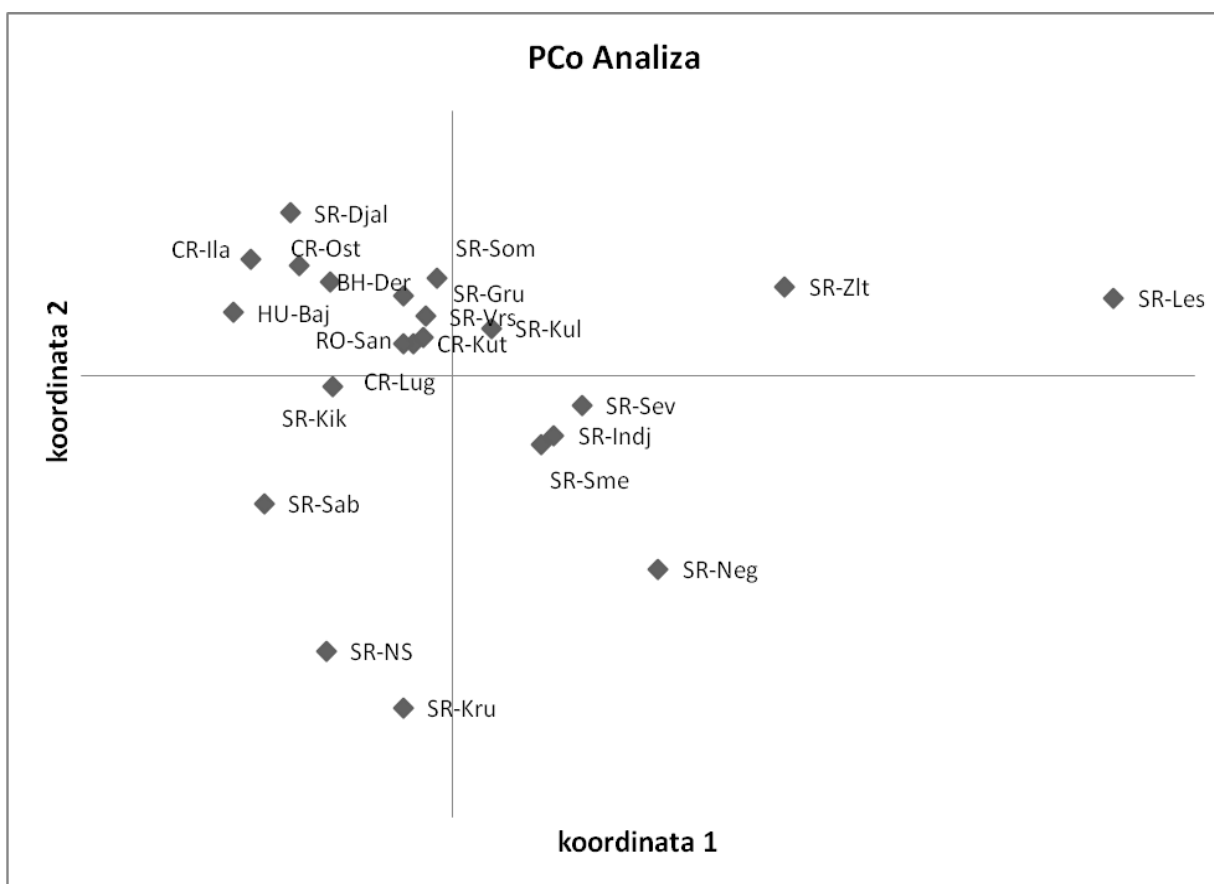
PCo analiza populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana (Slika 3.) je jasno međusobno odvojila analizirane populacije, ukazujući na postojanje genetičke udaljenosti među populacijama ispitivanog regiona. Između populacija Lekovac (SR-Les) i Kruševac (SR-Kru) je primećena najveća genetička distanca, dok su populacije Sevojno (SR-Sev) i Gruža (SR-Gru), postavljene u centru koordinatnog sistema, ispoljile najmanju genetičku udaljenost. Treća koordinatna osa, koja je opisala 20,24% varijacija od ukupne količine genetičkih varijacija, je približila populaciju Negotin (SR-Neg) predhodno opisanim dvema populacijama (SR-Sev i SR-Gru).

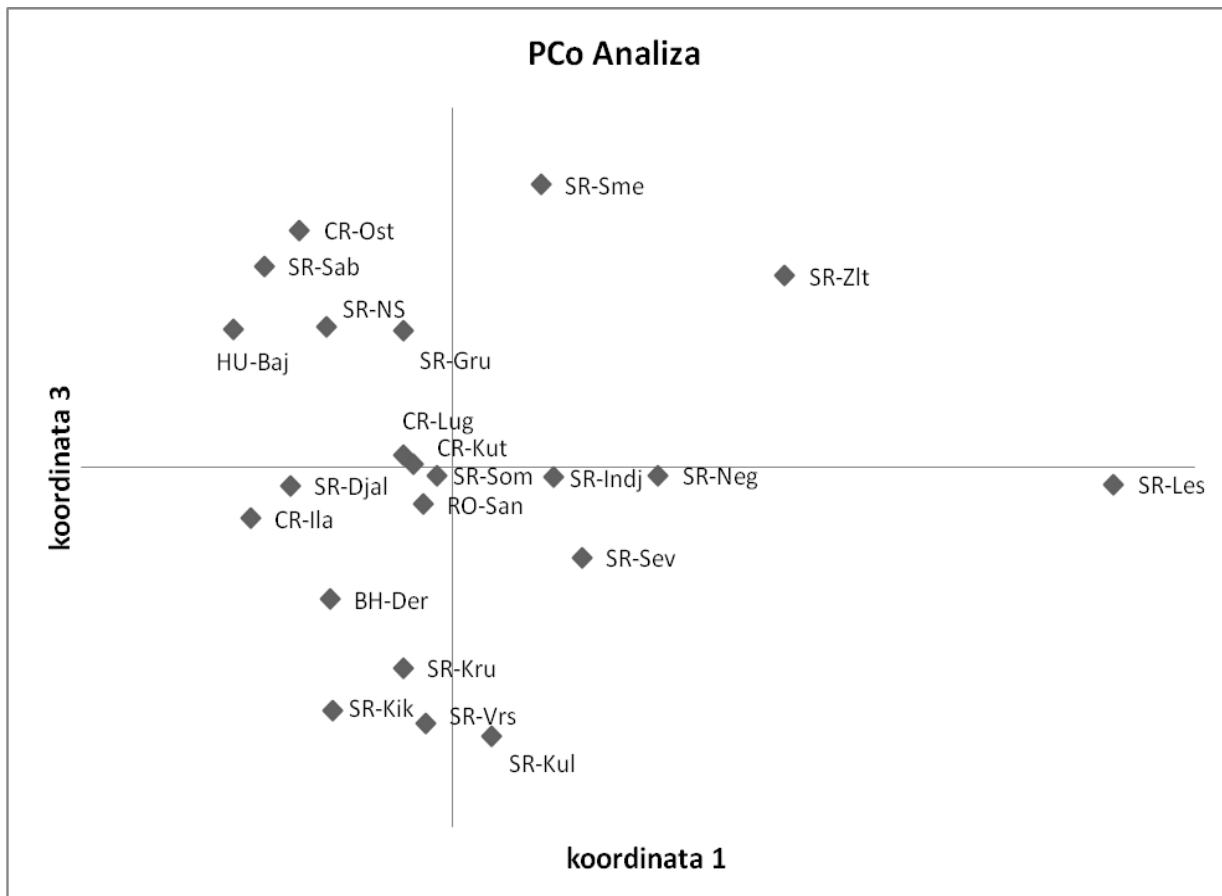


Slika 3. Koordinatna analiza (PCoA) bazirana na Cavalli-Sforza i Edwards (1967) distancama među populacijama peripanonskog prostora centralnog Balkana. Prva, druga i treća koordinatna osa opisuju 29,65%, 21,52% i 20,24% varijacija od ukupne količine varijacija.

Uključivanjem svih populacija u PCo analizu (populacije južnog dela Panonske nizije i populacije peripanonskog prostora centralnog Balkana) (Slika 4.), uočeno je grupisanje populacija južnog dela Panonske nizije i dve populacije peripanonskog prostora centralnog

Balkana, Gruža (SR-Gru) i Sevojno (SR-Sev), oko centra koordinatnog sistema. Populacije peripanonskog regiona su ispoljile veću genetičku udaljenost, kako međusobno, tako i u odnosu na populacije panonskog regiona (sa izuzetkom SR-Gru i SR-Sev). Slično predhodnim PCo analizama, populacija Novi Sad (SR-NS) je ispoljila najveću genetičku udaljenost u odnosu na populacije južnog dela Panonske nizije, dok su populacije Leskovac (SR-Les) i Kruševac (SR-Les) bile genetički najudaljenije u odnosu na populacije peripanonskog prostora, ali i u odnosu na sve ispitivane populacije. Treća koordinatna osa, koja je opisala 15,72% varijacija od ukupne količine varijacija, nije uticala na stvaranje novih grupa analiziranih populacija, osim što je populaciju Leskovac (SR-Les) jasnije izdvojila od ostalih ispitivanih populacija.





Slika 4. Koordinatna analiza (PCoA) bazirana na Cavalli-Sforza i Edwards (1967) distancama među svim analiziranim populacijama (populacije južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana). Prva, druga i treća koordinatna osa opisuju 23,46%, 19,02% i 15,72% varijacija od ukupne količine varijacija.

6.2.4. Procena genetičke strukture populacija upotrebom STRUCTURE programskog paketa

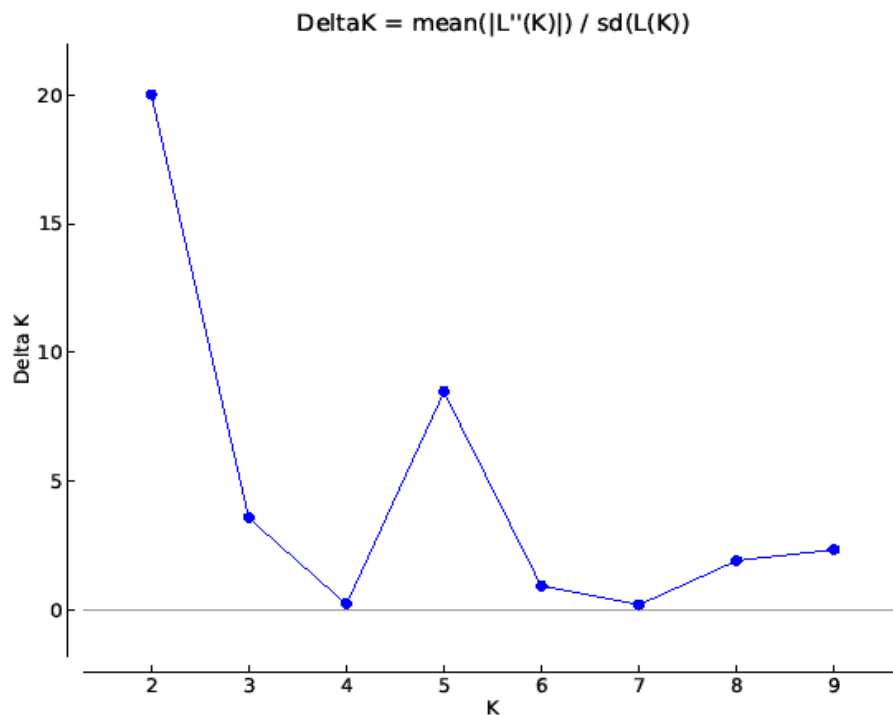
Analiza seta podataka STRUCTURE programskim paketom, omogućila je definisanje struktuiranosti analiziranih populacija i pripadnost individua određenom klasteru, a na osnovu frekvencije alela svakog ispitivanog lokusa u analiziranim populacijama.

Prilikom određivanja najverovatnijeg broja klastera (K) u analiziranom setu podataka, uočeno je neprestano povećanje $\ln D(P)$ vrednosti sa povećanjem vrednosti K (Slike 5,b; 6,b;

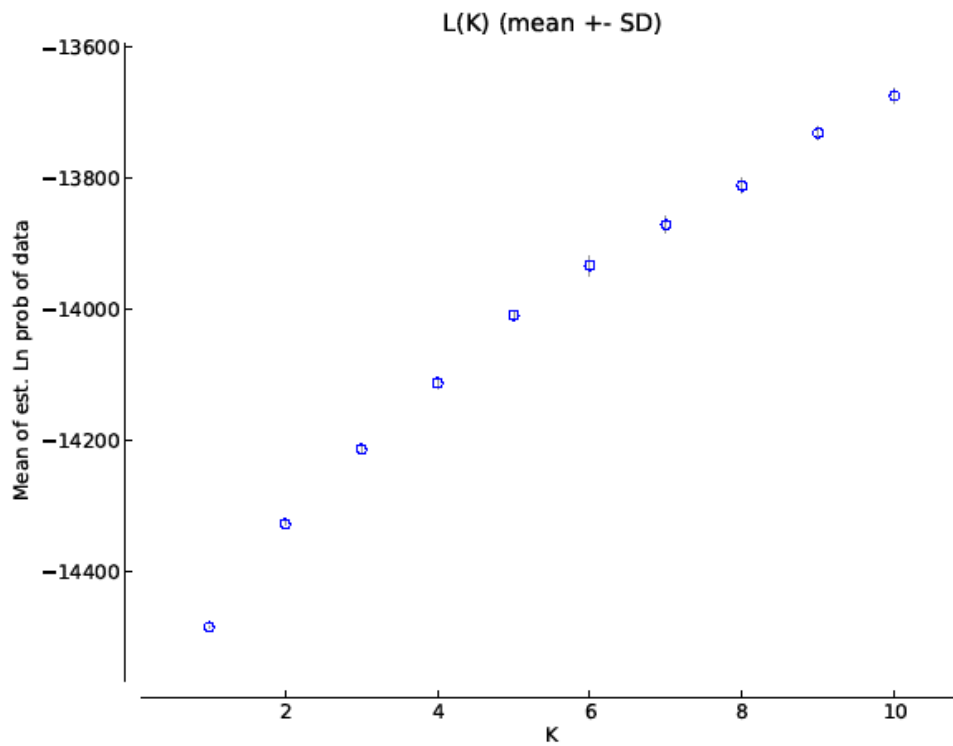
7,b). Međutim, na K vrednostima iznad vrednosti sekundarnih pikova ΔK (Slike 5,a; 6,a; 7,a), nije uočena dodatna struktuiranost populacija, tako da dalje analize nisu uključivale broj klastera veći od 5.

U analizi populacija južnog dela Panonske nizije, prema ΔK metodu (Evanno i sar., 2005), utvrđeno je da je najverovatniji broj klastera prisutan u populacijama ispitivanog regiona 2, sa sekundarnim pikom na $K=5$ (Slika 5,a). Većina individua nije pokazala jasnu pripadnost pojedinačnim klasterima, ukazujući na nedostatak genetičke struktuiranosti u ispitivanom setu podataka (Slika 6,a,c). U prilog ovome ide i grafički prikaz prema koeficijentu pripadnosti populacija, gde se jasno vidi da je udeo klastera u analiziranim populacijam podjednak, kako na $K=2$, tako i na $K=5$ (Slika 6,b,d). Izuzetak predstavlja populacija Smederevo (SR-Sme) sa nešto većim udelom jednog od klastera (na $K=2$) (Slika 6,b).

a)

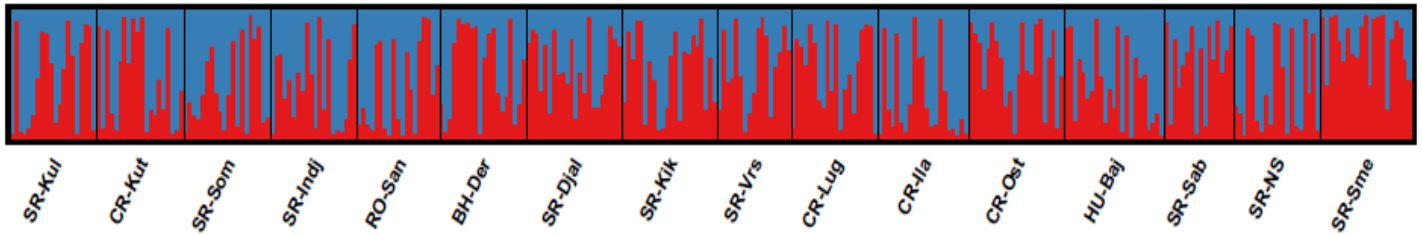


b)

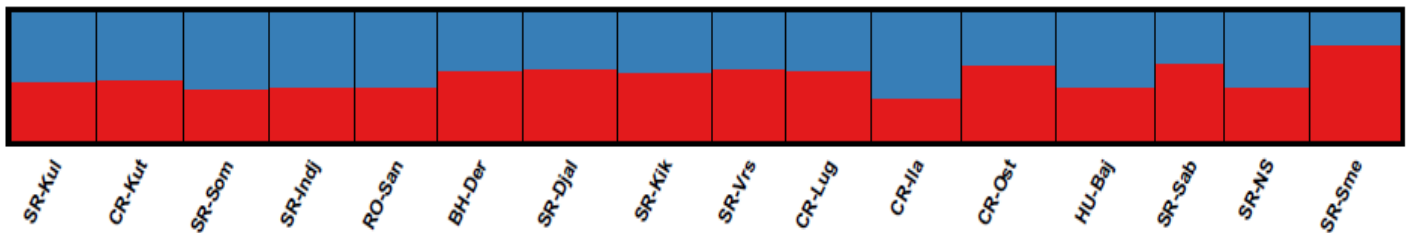


Slika 5. a) ΔK metod (Evano i sar., 2005), baziran na veličini (stopi) promene između dve K vrednosti i b) metod po Pritchardu i sar. (2000), baziran na određivanju K vrednosti prema $\ln P(D)$ vrednostima (log probability of data), primenjeni na populacijama ambrozije južnog dela Panonske nizije

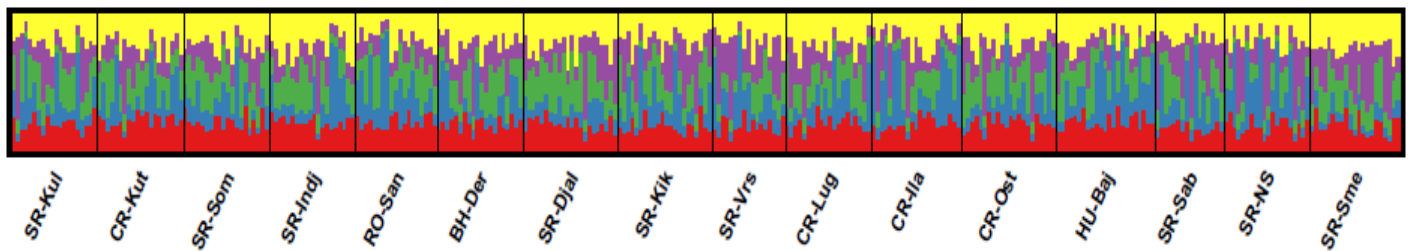
a)



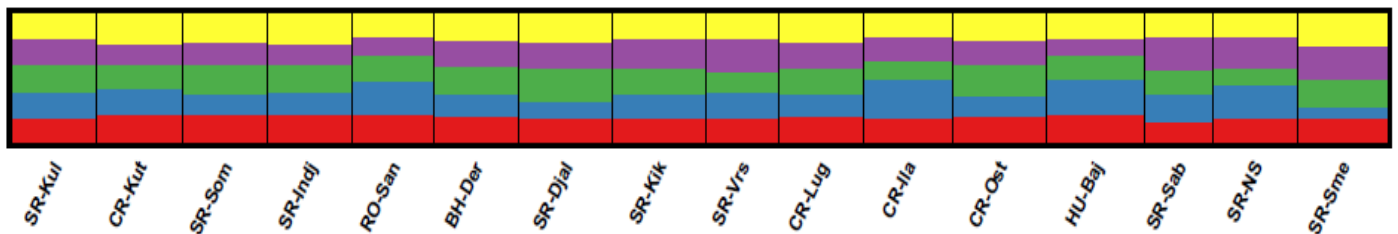
b)



c)



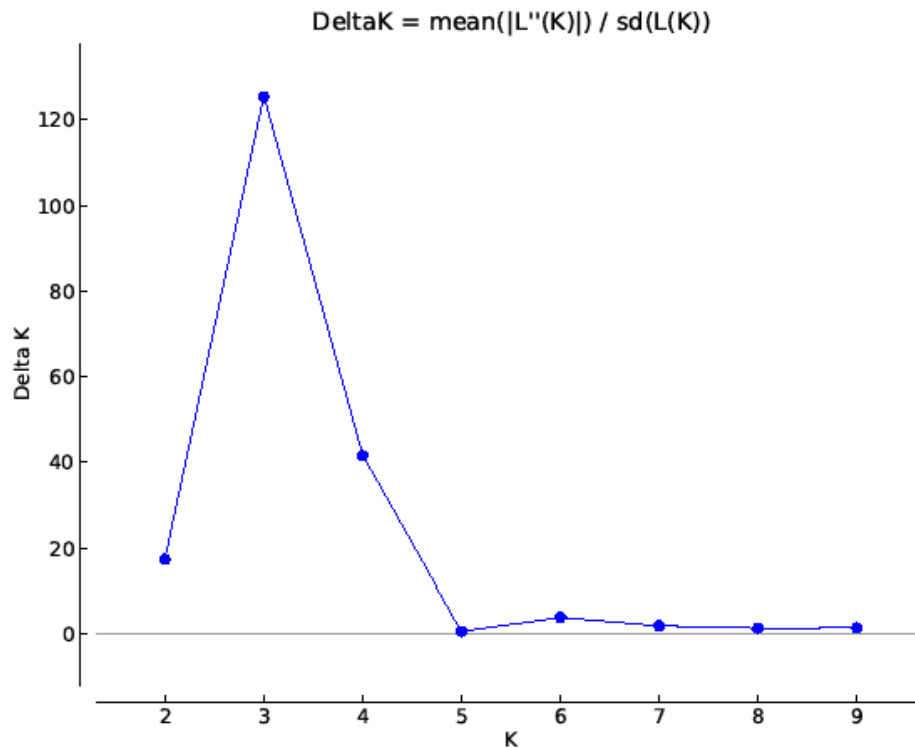
d)



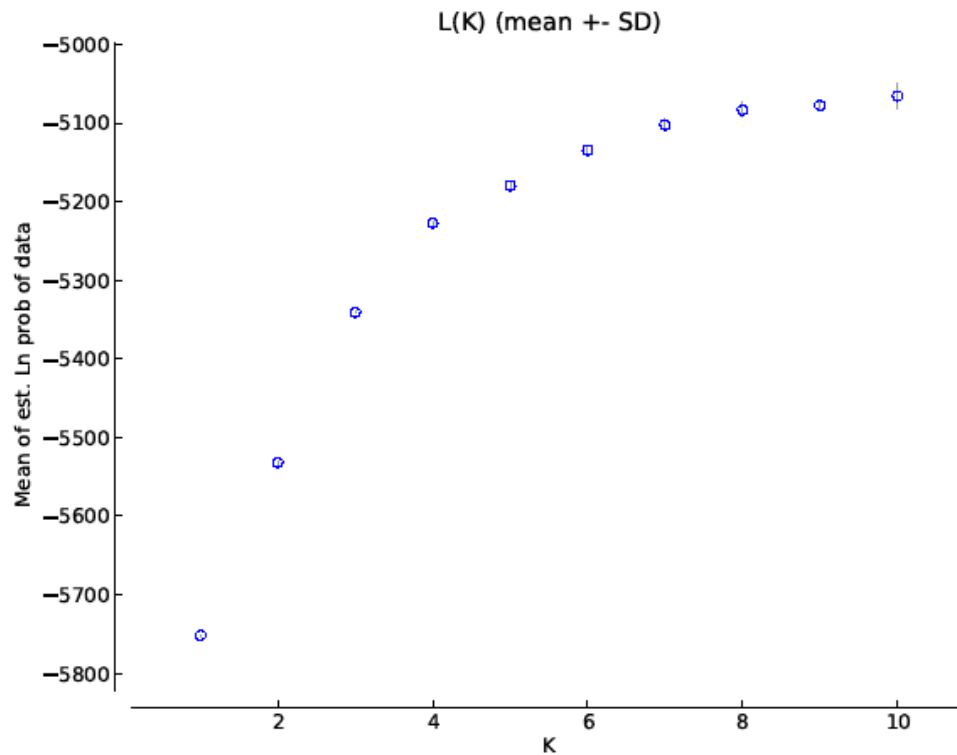
Slika 6. Bajesova klaster analiza izvedena u STRUCTURE programskom paketu za populacije ambrozije južnog dela Panonske nizije; udeo različitih boja predstavlja pripadnost individua (a,c) ili populacija (b,d) različitim klasterima (K); K=2 (a,b) K=5 (c,d)

Analiza ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana, pokazala je jasnu struktuiranost populacija ispitivanog regiona. Prema ΔK metodu utvrđeno je da 3 klastera najbolje objašnjavaju struktuiranost analiziranih populacija (Slika 7,a), pri čemu populacija Leskovac (SR-Les) pripada jednom klasteru, populacija Kruševac (SR-Kru) drugom, dok je u ostalim populacijama (SR-Neg, SR-Gru, SR-Zlt, SR-Sev) ispitivanog regiona uočen najveći udeo trećeg klastera (Slika 8,a,b). Obzirom na neprestan rast $\ln P(D)$ vrednosti (Slika 7,b), analizirana je struktuiranost seta podataka i na $K=4$, pri čemu je detektovana dodatna struktuiranost analiziranih populacija. Pored populacija Leskovac (SR-Les) i Kruševac (SR-Kru), populacije Negotin (SR-Neg) i Zlatibor (SR-Zlt) su se izdvojile u posebne klasterne, dok je u populacijama Gruža (SR-Gru) i Sevojno (SR-Sev) uočen udeo najmanje tri klastera (Slika 8,c, d).

a)

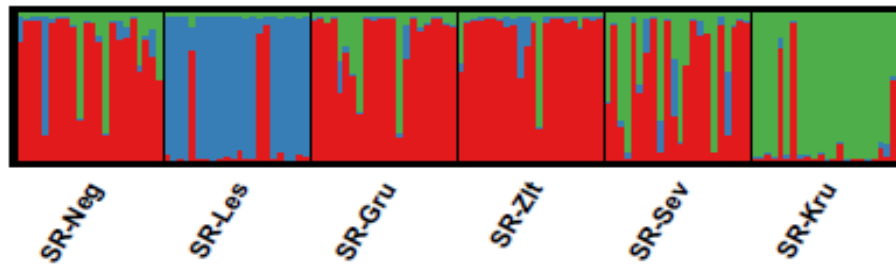


b)

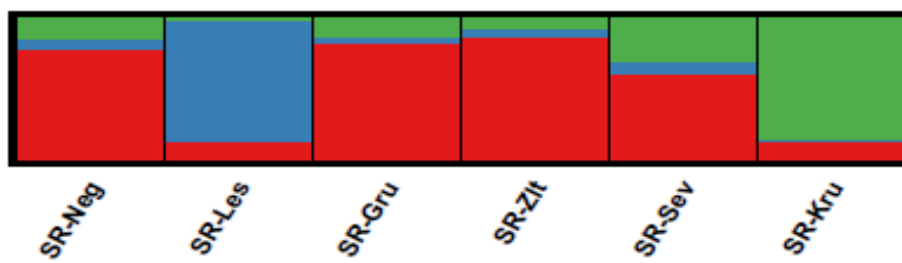


Slika 7. a) ΔK metod (Evano i sar., 2005), baziran na veličini (stopi) promene između dve K vrednosti i b) metod po Pritchardu i sar. (2000), baziran na određivanju K vrednosti prema $\ln P(D)$ vrednostima (log probability of data), primenjeni na populacijama ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana

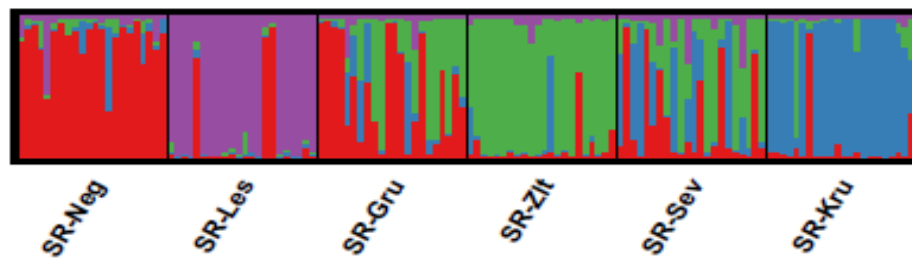
a)



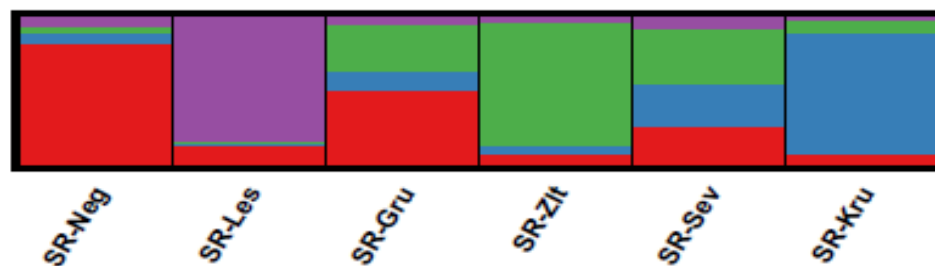
b)



c)



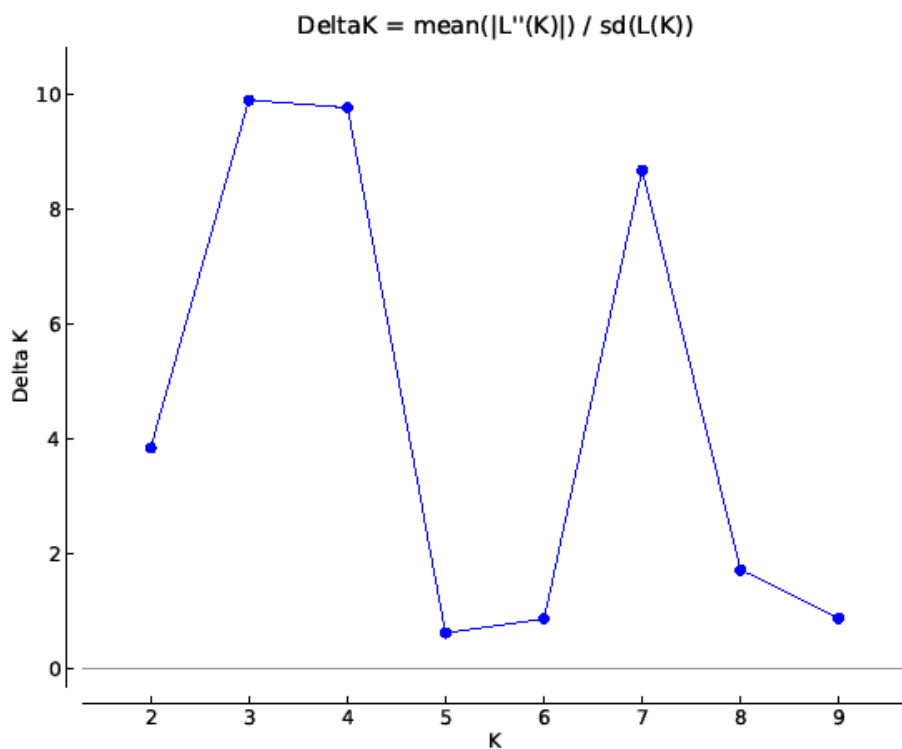
d)



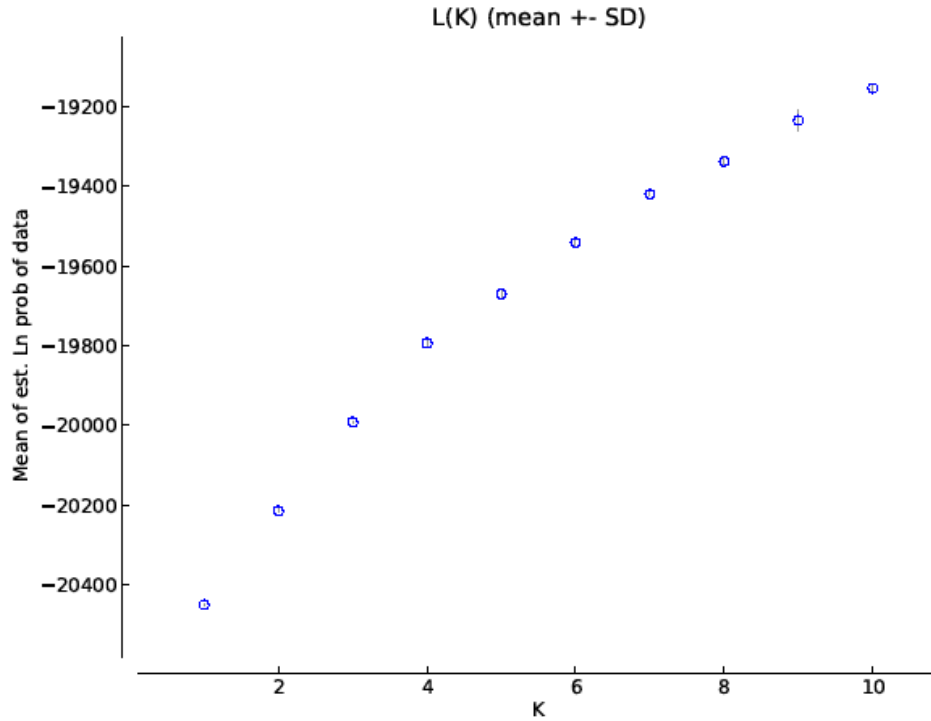
Slika 8. Bajesova klaster analiza izvedena u STRUCTURE programskom paketu za populacije ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana; udeo različitih boja predstavlja pripadnost individua (a,c) ili populacija (b,d) različitim klasterima (K); K=3 (a,b) K=4 (c,d)

Uključivanjem svih populacija u Bajesovu klaster analizu, uočena je slaba strukturiranost populacija. Većina analiziranih populacija je pokazala podjednaku pripadnost klasterima, kako na $K=3$ (primaran pik) (Slika 10 a, b), tako i na $K=4$ (sekundaran pik) (Slika 10 c, d). Populacije Negotin (SR-Neg) i Zlatibor (SR-Zla) su se istakle nešto većim udelom jednog od klastera, dok su se populacije Kruševac (SR-Kru) i Leskovac (SR-Les) izdvojile u potpuno zasebne klasterne (Slika 10).

a)

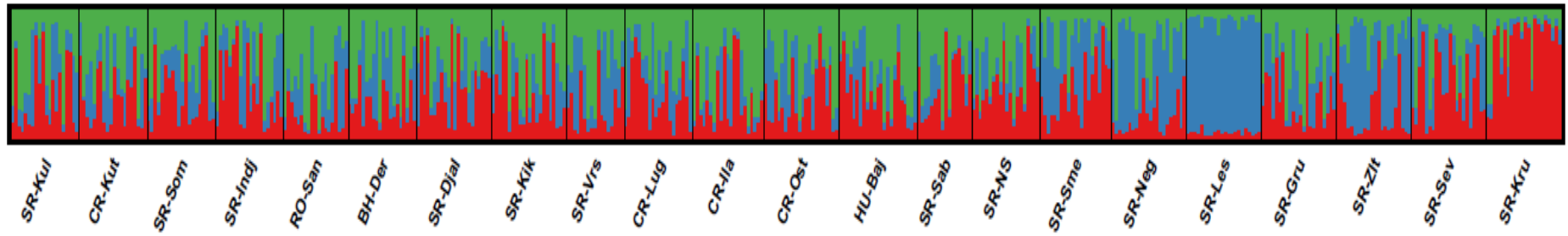


b)

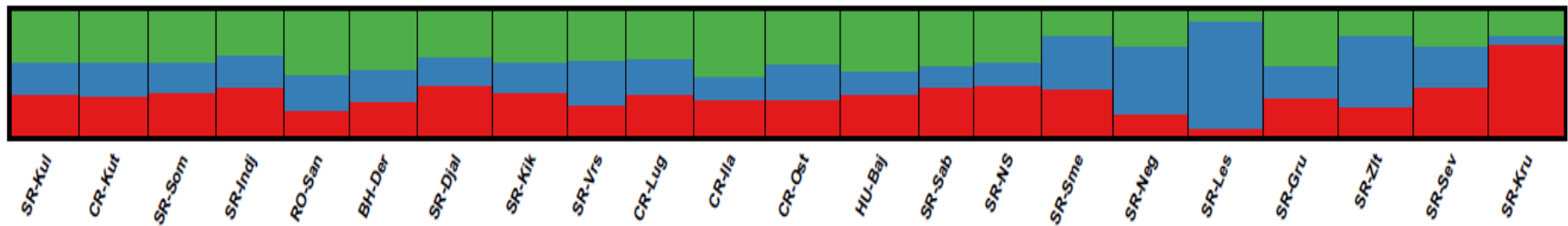


Slika 9. a) ΔK metod (Evano i sar., 2005), baziran na veličini (stopi) promene između dve K vrednosti i b) metod po Pritchardu i sar. (2000), baziran na određivanju K vrednosti prema $\ln P(D)$ vrednostima (log probability of data), primenjeni na populacijama ambrozije južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana

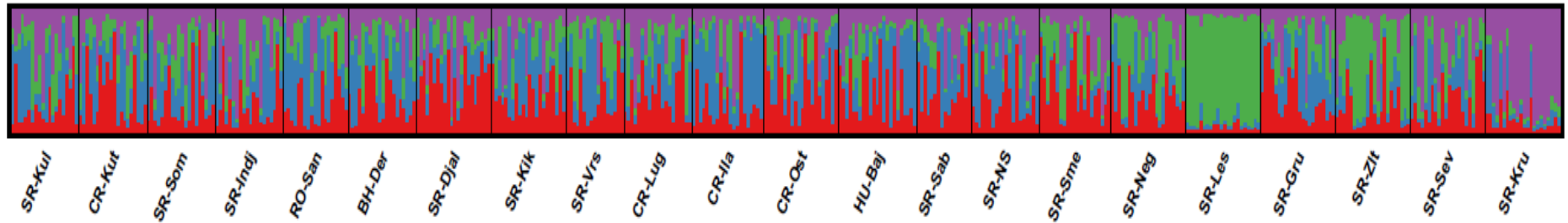
a)



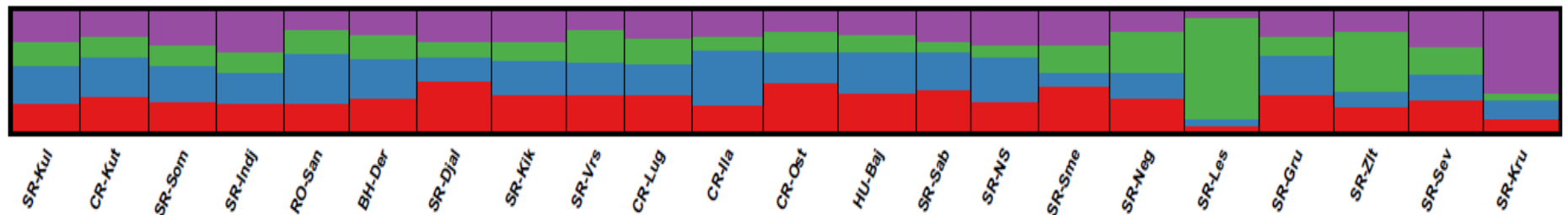
b)



c)



d)



Slika 10. Bajesova klaster analiza izvedena u STRUCTURE programskom paketu za populacije ambrozije južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana; udeo različitih boja predstavlja pripadnost individua (a, c) ili populacija (b, d) različitim klasterima (K); K=3 (a, b) K=4 (c, d)

6.2.5. Mantel test i kvantifikacija protoka gena između populacija

Obzirom na uočena odvajanja pojedinačnih populacija u predhodno primenjenim metodama, urađen je Mantel test u okviru IBD analize (Isolation by distance), koji je omogućio da se utvrdi da li su detektovane genetičke distance posledica geografske udaljenosti između ispitivanih populacija.

Analizom populacija kako panonskog, tako i peripanonskog regiona, ali i svih proučavanih populacija zajedno, detektovana je nesignifikantna korelacija između genetičke i geografske udaljenosti. Za populacije južnog dela Panonske nizije vrednost p je iznosila 0,842 ($p > 0,05$), dok je vrednost koeficijenta korelacije bio $r = -0,1534$, što ukazuje na nepostojanje veze između genetičke i geografske udaljenosti populacija ispitivanog regiona. Slično, p vrednost dobijena analizom populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana je iznosila 0,468, sa vrednošću $r = 0,0258$. Iako nešto niža, p vrednost ($p = 0,0609$, $r = 0,2254$) dobijena ispitivanjem svih populacija (populacije panonskog i peripanonskog regiona), je takođe ukazala na nepostojanje genetičke udaljenosti kao posledice geografske udaljenosti između ispitivanih populacija.

U saglasnosti sa predhodnim rezultatima, detektovan je visok nivo protoka gena na nivou svih ispitivanih regiona. Najveći broj migranata N_m (nakon korekcije veličine uzorka, koja je neophodna obzirom da je proučavan parametar osetljiv na broj uzorkovanih individua po populaciji) detektovan je na nivou populacija čitavog analiziranog regiona i iznosio je $N_m = 4,36475$, sa prosečnom frekvencijom jedinstvenih alela $p(1) = 0,0377058$, ukazujući na veoma visok nivo protoka gena između populacija južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana. N_m vrednost (nakon korekcije veličine uzorka) dobijena analizom populacija južnog dela Panonske nizije je iznosila $N_m = 4,30314$, dok je prosečna frekvencija jedinstvenih alela bila $p(1) = 0,0387022$, što, opet, ukazuje na visok nivo protoka gena među populacijama ispitivanog regiona. Nešto niži protok gena, u odnosu na predhodne vrednosti, je detektovan između populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana, utvrđen na osnovu N_m vrednosti (nakon korekcije veličine uzorka) koja je iznosila $N_m = 2,17155$ i vrednosti prosečne frekvencije jedinstvenih alela $p(1) = 0,0538806$.

6.2.6. Test pripadnosti individua populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana

Upotrebom testa pripadnosti, koji omogućava određivanje pripadnosti individua određenoj referentnoj populaciji, ali i isključivanje referentnih populacija kao mogući izvor individua, analizirana je pripadnost individua populacija peripanonskog prostora, populacijama južnog dela Panonske nizije. Ukoliko je vrednost detektovane verovatnoće pripadnosti individua bila manja od 0,05, ta referentna populacija nije razmatrana kao mogući izvor ispitivanih individua.

Uočeno je da su individue populacija peripanonskog prostora poreklom od većeg broja populacija južnog dela Panonske nizije. Od ukupno 16 referentnih populacija, srednje vrednosti verovatnoće pripadnosti individua manje od 0,05 su detektovane u najviše 3 referentne populacije, po ispitivanoj populaciji peripanonskog područja. Najmanje srednje vrednosti verovatnoće pripadnosti ($<0,05$) su detektovane u populacijama Đala (SR-Djal), Smederevo (SR-Sme), Novi Sad (SR-NS), Šabac (SR-Sab) i Vršac (SR-Vrs). Najviše srednje vrednosti verovatnoće pripadnosti su uočene u populacijama Sanandrei (RO-San) (za individue populacije Negotin (SR-Neg)), Kutina (CR-Kut) (za individue populacija Leskovac (SR-Les), Gruža (SR-Gru), Sevojno (SR-Sev) i Kruševac (SR-Kru)) i Sombor (SR-Som) (za individue populacije Zlatibor (SR-Zlt)) i kretale su se u rang od 0,236 do 0,315 (Prilog, Tabela 12).

Obzirom na predhodno dobijene podatke o diverzitetu i struktuiranosti populacija peripanonskog prostora, sproveden je i test pripadnosti pojedinačnih populacija ovog prostora svim ostalim analiziranim populacijama (prilog, Tabela 13). Tačnije, kao referentne populacije u ovom testu korišćene su sve populacije Panonske nizije zajedno sa populacijama peripanonskog regiona. Rezultati ovog testa pripadnosti u odnosu na predhodni nisu pokazali velike razlike. Najviše srednje vrednosti verovatnoće pripadnosti, u saglasnosti sa predhodnim testom, su uočene u populacijama Sanandrei (RO-San), Kutina (CR-Kut) i Sombor (SR-Som), sa dodatkom populacije Kikinda (SR-Kik) za individue populacije Kruševac (SR-Kru). Opseg ovih vrednosti iznosio je od 0,222 do 0,337.

U odnosu na referentne populacije sa peripanonskog područja, najviše srednje vrednosti verovatnoće pripadnosti su uočene u populacijama Sevojno (SR-Sev) (za individue populacija Kruševac (SR-Kru), Zlatibor (SR-Zla), Leskovac (SR-Les) i Gruža (SR-Gru)) i Gruža (SR-Gru) (za populacije Negotin (SR-Neg) i Sevojno (SR-Sev)). Ove vrednosti su se kretale u opsegu od 0,102 do 0,232 i bile su niže od najviših srednjih vrednosti verovatnoće pripadnosti u referentnim populacijama sa područja Panonske nizije. Vrednosti razmatranog parametra u ostalim referentnim populacijama sa područja peripanonskog regiona su bile znatno niže u odnosu na populacije SR-Sev i SR-Gru, i to najčešće ispod vrednosti 0,05, što ih isključuje kao mogući izvor individua ispitivanih populacija.

Na osnovu svih iznetih rezultata opšti trend ovog istraživanja je: genetička varijabilnost detektovana u populacijama ambrozije južnog dela Panonske nizije je viša u odnosu na genetičku varijabilnost populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana. Suprotno, na osnovu AMOVA rezultata, F_{st} vrednosti, kao i položaja populacija u koordinatnom sistemu PCo analize uočen je viši nivo genetičke diferencijacije populacija peripanonskog prostora u odnosu na panonski region. Slično, STRUCTURE analiza je pokazala izraženu struktuiranost populacija peripanonskog prostora i odvajanja populacija ovog regiona u posebne klustere, dok individue populacija panonskog područja nisu pokazale jasnu pripadnost pojedinačnim klasterima, ukazujući na nedostatak struktuiranosti populacija u ovom regionu. U saglasnosti sa ovim rezultatima je i detektovan nivo protoka gena, koji je bio nešto viši među populacijama Panonskog prostora u odnosu na populacije peripanonskog regiona. Test pripadnosti je pokazao da su individue svake analizirane populacije ambrozije peripanonskog prostora poreklom od većeg broja populacija panonskog regiona, kao i da je u formiranju ovih populacija uticaj imao upliv genetičkog materijala iz različitih pravaca.

7. DISKUSIJA

7.1. Genetička varijabilnost i diferencijacija populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije

Predhodna istraživanja populacija *Ambrosia artemisiifolia* sa teritorije Severne-Amerike i Francuske (Genton i sar., 2005a), kao i populacija Istočne Evrope (Gladieux i sar., 2011), su pokazala postojanje visokog nivoa genetičkog diverziteta ispitivanih populacija. Naime, poredeći vrednosti genetičkih parametara introdukovanih populacija Francuske, a zatim i Istočne Evrope sa nativnim populacijama ambrozije sa teritorije Severne-Amerike (kontinenta porekla ove invazivne vrste), nije uočena redukcija genetičkog diverziteta introdukovanih populacija. Obzirom da komparativne studije ovog tipa mogu da ukažu na potencijalne izvorne populacije, tip introdukcije i evolutivne mehanizme tokom procesa ekspanzije invazivne vrste (Kolbe i sar., 2004; Maron i sar., 2004), pomenute grupe autora su kao moguće objašnjenje visokog diverziteta ispitivanih introdukovanih populacija naveli efekat multiplih introdukcija na teritoriji Francuske i Istočne Evrope. Dodatno, uočeno je da ove dve grupe populacija potiču iz najmanje dva genetički i geografski udaljena izvora. Ovaj interesantan i ne tako čest primer introdukcije detektovan u evropskim populacijama ambrozije, potvrđen je istraživanjem ambrozije na globalnom nivou (Gaudeul i sar., 2011). Povećanjem broja uzorkovanih nativnih populacija ambrozije (sa teritorije Severne Amerike), u odnosu na predhodno istraživanje Gladieux i sar. (2011), utvrđeno je da su populacije Francuske, odnosno Zapadne Evrope, poreklom od populacija ambrozije sa istočne obale severno-američkog kontinenta, dok su izvorne populacije koje su naselile prostore Istočne Evrope sa teritorije zapadne obale Severne-Amerike. Obzirom na zaključke ove grupe autora o prisustvu nezavisnih introdukcija u geografski relativno bliskim invazivnim populacijama, potvrđen je značaj kontinuiranog uzorkovanja što većeg broja populacija na istraživanom području u cilju smanjenja potencijalnih grešaka u interpretaciji rezultata (Muirhead i sar., 2008). Shodno ovome, kao i činjenici da je južni deo Panonske nizije u dosadašnjim istraživanjima bio prisutan samo pojedinačnim populacijama (Gladieux i sar., 2011; Gaudeul i sar., 2011), u ovom istraživanju obuhvaćeno je 16 populacija sa pomenutog područja (između predhodno analiziranih područja Istočne i Zapadne Evrope), čija je genetička varijabilnost analizirana

upotrebom 10 mikrosatelitskih lokusa. Obzirom na sposobnost disperzije polena ambrozije na velike udaljenosti (do 100km), procenjeno je da se, u ovom istraživanju, uzorkovanje vrši na lokalitetima koji međusobno nisu na mnogo većoj ili manjoj udaljenosti od pomenute razdaljine. U skladu sa ovim kriterijumom, na ispitivanoj površini uzorkovano je ukupno 16 populacija, što je u saglasnosti i sa predhodnim analizama. Naime, u predhodnim istraživanjima koja su obuhvatala nešto veće geografsko područje od analiziranog područja u ovom istraživanju, ispitivano je 10 populacija sa područja Francuske i 6 populacija sa područja Istočne Evrope (Gladieux i sar., 2011), kao i ukupno 19 evropskih populacija u globalnom istraživanju (Gaudeul i sar., 2011). Sa druge strane, za sagledavanje ekspanzije ambrozije u peripanonskom prostoru sakupljane su populacije, koje su se nalazile uz postojeće kako putne, tako i rečne pravce, a na osnovu istraživanja širenja ambrozije i puteva polena na pomenutom području (Vrbničanin i Janjić, 2011; Šikoparija i sar., 2009).

Poredeći parametre genetičkog diverziteta ambrozije južnog dela Panonske nizije, jednog od regiona sa najvećom incidencom ove invazivne vrste u Evropi, sa predhodnim istraživanjima ambrozije na području Francuske, odnosno Zapadne Evrope (Genton i sar., 2005a; Chun i sar., 2010), Istočne Evrope (Gladieux i sar., 2011), kao i na globalnom nivou (Gaudeul i sar., 2011), uočen je visok nivo varijabilnosti populacija južnog dela Panonske nizije (Tabela 14).

Tabela 14. Komparativni prikaz vrednosti parametara genetičke varijabilnosti populacija ambrozije sa područja Severne-Amerike, Zapadne Evrope, Istočne Evrope i južnog dela Panonske nizije

	r	N _A	N _R	He	Fis
Globalno istraživanje, Evropa (Gaudeul i sar., 2011)	6,17(±0,87)	/	/	0,759(±0,048)	0,293(±0,093)
Globalno istraživanje, Severna-Amerika (Gaudeul i sar., 2011)	6,70(±0,69)	/	/	0,770(±0,045)	0,296(±0,060)
Istočna Evropa (Gladieux i sar., 2011)	8,1(±1,5)	8,8(±1,7)	5,5(±2,1)	/	/
Severna-Amerika (Genton i sar., 2005b)	5,85(±0,15)	9,0(±0,36)	5,9(±0,38)	/	/
Francuska (Ron-Alpski region) (Genton i sar., 2005b)	6,47(±0,17)	10,8(±0,23)	7,8(±0,32)	/	/
Francuska (Borgogn-PACA region) (Genton i sar., 2005b)	4,91(±0,24)	6,2(±0,32)	3,1(±0,43)	/	/
Južni deo Panonske nizije (srednje vrednosti±SD) (ovo istraživanje)	9,14(±0,55)	10,5(±0,9)	7,2(±1,1)	0,796(±0,017)	0,364(±0,046)
Herbarski uzorci, Francuska (Chun i sar., 2010)	3,65-4,42	/	0,00-4,19	/	0,022-0,203
Savremeni uzorci, Francuska (Chun i sar., 2010)	4,23-4,70	/	0,00-6,38	/	-0,004-0,230
Južni deo Panonske nizije (opseg vrednosti) (ovo istraživanje)	7,90-9,87	/	4,8-8,9	/	0,292-0,455

r-prosečan broj alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka, N_A-prosečan broj alela po lokusu, N_R-prosečan broj retkih alela po lokusu, He-očekivana heterozigotnost, Fis-koeficijent inbridinga

Vrednosti genetičkih parametara varijabilnosti populacija južnog dela Panonske nizije nisu pokazale velika odstupanja od vrednosti detektovanih za mikrosatelitske lokuse u globalnom istraživanju Evropskih populacija (Gaudeul i sar., 2011). Prosečna vrednost parametra r (prosečan broj alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka) u populacijama južnog dela Panonske nizije je bila nešto viša u odnosu na vrednost dobijenu u analizi Gaudeul i sar. (2011). Primećena razlika može biti posledica razlike minimalne veličine uzoraka na kojoj se bazira izračunavanje ovog parametra (13 individua u populacijama Panonske nizije u odnosu na 8 individua u Evropskim populacijama). Srednje vrednosti očekivane heterozigotnosti (H_e) i koeficijenta inbridinga (F_{is}) populacija južnog dela Panonske nizije su bile u saglasnosti sa vrednostima Gaudeul i sar. (2011).

U poređenju sa populacijama Istočne Evrope (Gladieux i sar., 2011), kao i nativnim populacijama Severne-Amerike i populacijama Zapadne Evrope, odnosno Francuske (Genton i sar., 2005a; Gaudeul i sar., 2011, Chun i sar., 2010), koje su po poreklu starije u odnosu na populacije južnog dela Panonske nizije, nije uočen gubitak genetičkog diverziteta populacija analiziranih u ovom istraživanju. Naprotiv, srednje vrednosti prosečnog broja alela po lokusu (N_A), prosečnog broja retkih alela (N_R) i parametra r su bile nešto više u populacijama južnog dela Panonske nizije u odnosu na populacije Istočne Evrope (Gladieux i sar., 2011) i Severne-Amerike (Genton i sar., 2005a). Slično, prosečan broj alela nakon metode refrakcije uzorka (r) detektovan u populacijama Severne-Amerike u globalnom istraživanju Gaudeul i sar. (2011) je bio nešto niži u odnosu na vrednost ovog parametra u populacija južnog dela Panonske nizije. Međutim, ova razlika može biti posledica razlike minimalne veličine uzoraka na kojoj se bazira izračunavanje parametra r (13 individua u populacijama Panonske nizije u odnosu na 8 individua u severno-američkim populacijama).

Poredeći populacije južnog dela Panonske nizije sa francuskim populacija Ron-Alpskog regiona, gde je ambrozija prisutna više od 40 godina, (Genton i sar., 2005a) nisu uočena velika odstupanja u vrednostima parametara genetičke varijabilnosti, dok je u odnosu na skoro naseljene populacije Burgogn-PACA regiona Francuske (Genton i sar., 2005a), u populacijama analiziranim u ovom istraživanju otkriven viši nivo genetičke varijabilnosti. Takođe, vrednosti parametra r , N_R i F_{is} (u Tabeli 14 date u vidu opsega vrednosti) su bile više u populacijama južnog dela Panonske nizije, poredeći ih kako sa istorijskim (herbarskim), tako

i sa savremenim uzorcima populacija Francuske analiziranim u istraživanjima Chun i sar. (2010).

Iako u ovom istraživanju nije vršena direktna komparacija uzorkovanih populacija južnog dela Panonske nizije sa nativnim, istočno-evropskim i zapadno-evropskim populacijama, na osnovu predhodnih navoda (poredeći rezultate ovog istraživanja sa rezultatima predhodno objavljenih istraživanja), kao jedan od uzroka visokog diverziteta proučavanih populacija, možemo navesti uticaj većeg broja introdukcija (multiplu introdukciju). Naime, tokom kolonizacije i ekspanzije invazivnih vrsta, se očekuje da introdukovane populacije ispolje smanjen genetički diverzitet u odnosu na izvorne populacije kao rezultat genetičkog drifta, odnosno efekta osnivača (Tsutsui i sar., 2000). Međutim, evolutivni mehanizam kao što je multipla introdukcija može da obogati rezervoar gena introdukovane vrste i time je "spasi" od gubitka genetičkog diverziteta (Novak i sar., 2007; Dlugosch i Parker, 2008; Gaudeul i sar., 2011). Na indicije o kompleksnom tipu introdukcije u ispitivano područje navodi i činjenica da se južni deo Panonske nizije nalazi između Zapadne i Istočne Evrope, regiona gde je visok nivo diverziteta populacija ambrozije posledica multiplih, ali nezavisnih introdukcija u pomenutim regionima (odnosno, nalazi se između regiona sa uočenim različitim poreklom ambrozije). Detektovan visok nivo diverziteta populacija južnog dela Panonske nizije, bez redukcije varijabilnosti u odnosu na severno-američke, zapadno-evropske i istočno-evropske populacije ambrozije, može biti posledica, kako uticaja introdukcije iz različitih genetičkih izvora nativnog područja, tako i upliva ambrozije iz različitih pravaca Evrope. Štaviše, detektovan je nešto viši nivo genetičkog diverziteta u populacijama ovog istraživanja u odnosu na pomenute populacije, što jasnije ukazuje na indicije da su populacije ambrozije južnog dela Panonske nizije nastale mešanjem genotipova dospelih kako iz pravca zapada, tako i iz pravca istoka, ali i iz severno-američkih nativnih populacija. U prilog ovome idu i publikovani podaci o introdukciji i prisustvu ambrozije u području Panonske nizije. Naime, početak intenzivne propagacije i brzog širenja ambrozije u južnom delu Dunavskog regiona se poklapa sa periodom nakon Prvog svetskog rata, tačnije nakon ranih 1920-tih godina (Makra i sar., 2005; Kazinczi i sar., 2008; Csontos i sar., 2010), kada se intenzivirao transport različitih poljoprivrednih kultura i međunarodna trgovina brodovima između Amerike i Evrope. Prema Makra i sar. (2005), prvi talas unosa ambrozije u područje Panonske nizije je bio preko luke Rijeka u pravcu kontinentalne Hrvatske i doline reke Dunav. Sledeći mogući talas unosa

ambrozije sa područja Sjedinjenih Američkih Država u ispitivani region je iz perioda nakon Drugog svetskog rata (oko 1950. godine), kada je dolazila pomoć brodovima iz USA finansirana od strane Sistema organizacije ujedinjenih nacija (eng. UNRRA-United Nations Relief and Rehabilitation Administration) (Lampe i sar., 1990). Zatim, u ovom periodu, tačnije 1950-tih i 1960-tih godina, poljoprivredna politika jugoslovenske vlade je favorizovala intenzivnu proizvodnju i upotrebu modernih biljnih sorti. Obnova trgovinskih odnosa Jugoslavije i Sovjetskog Saveza, rezultovala je u uvozu semena poljoprivrenih kultura iz pravca Istočne Evrope. Sa druge strane, upotrebom italijanskih sorti pšenice visokog prinosa, vršen je uvozu semena iz pravca Zapadne Evrope (Borojević i Borojević, 2005).

Poređenjem genetičkog diverziteta između ispitivanih populacija južnog dela Panonske nizije, uočene su izvesne inter-populacione razlike. Populacije koje se ističu najnižim genetičkim diverzitetom su populacije Vršac (SR-Vrs), Novi Sad (SR-NS), Smederevo (SR-Sme) i Šabac (SR-Sab). Potencijalni faktor koji uslovljava niži genetički diverzitet populacije Vršac je specifičan geografski položaj ovog grada i njegove okoline, kao i lokaliteta gde je populacija ambrozije uzorkovana. Ispitivano područje se nalazi u podnožju Vrščkih planina, koje predstavljaju fizičku barijeru intenzivnom protoku gena, odnosno razmeni genetičkog materijala između ispitivane populacije i populacija ambrozije koje se nalaze severo-istočno u odnosu na populaciju Vršac. Južni Banat, a posebno područje grada Vršca se karakteriše stalnom izloženošću učestalim i jakim južnim i jugo-istočnim vetrovima (Lazić i Pavić, 2003), što doprinosi uplivu polena ambrozije iz pravca istoka (npr. Rumunije). Bio-geografske odlike zapadnih i severo-zapadnih delova okoline grada Vršca, sa vlažnim močvarnim staništima i prostranim područjem kontinentalnih halobioma, čine zemljište nepodobnim za naseljavanje ambrozije. Dodatno, publikovani podaci ukazuju na relativno kasnu identifikaciju ambrozije u regionu Banata, kao i na njenu manju zastupljenost, u odnosu na druge delove severne Srbije (Šikoparija i sar., 2012). Manji prosečan broj retkih alela po lokusu (N_R), a time i manji prosečan broj alela po lokusu nakon refrakcije uzorka (r), kao i manji prosečan broj alela po lokusu (N_A), može biti posledica upliva polena, odnosno genetičkog materijala, iz jednog pravca (pravca istoka), kao i relativno skorog naseljavanja ambrozije u ovo područje. Slično, ove indicije bi mogle biti i objašnjenje smanjenog genetičkog diverziteta populacije Novi Sad (SR-NS), čija je diferencijacija u odnosu na druge ispitivane populacije potvrđena i PCo analizama, kao i F_{st} vrednostima. Naime, ova populacija se nalazi na napuštenom polju crvene

dateline, a uzorkovane individue predstavljaju tek treću generaciju ambrozije te populacije (Boža, 2011). Najverovatnije je ova populacija nastala širenjem malog broja individua (eng. low propagule pressure), koje su se nalazile po obodu ove, sada napuštene poljoprivredne parcele. Poreklo izvornih individua ambrozije ove populacije je nepoznat, ali je vrlo verovatno da su semena ovih biljaka ambrozije dospеле zajedno sa semenom crvene deteline.

Manji diverzitet populacije Smederevo (SR-Sme) zajedno sa uočenom većom genetičkom distancom u odnosu na većinu analiziranih populacija (PCoA), kao i izdvajanjem u poseban klaster u STRUCTURE analizi populacija južnog dela Panonske nizije, bi moglo ukazati na odvojeno poreklo ove populacije u odnosu na ostale ispitivane populacije ovog regiona. Položaj ispitivane populacije, na obali Dunava, kao i bio-geografske odlike ovog dela Banata, navode na indicije da je smedervska populacija ambrozije rezultat, opet istočne struje upliva ambrozije, i to iz pravca Oršave (Dunavske luke gde je *A. artemisiifolia* prvi put konstantovana u jugoistočnom delu Evrope, a odakle je brodovima dospela u dunavsko područje Srbije). Genetička bliskost populacije Smederevo (SR-Sme) i populacije Šabac (SR-Sab), koja se nalazi na obali Save, bi mogla biti posledica širenja ambrozije rečnim tokovima Dunava i Save.

Analiza genetičke diferencijacije i struktuiranosti populacija, pruža dodatan uvid u evolutivne procese bioloških invazija. U predhodnim analizama populacija *A. artemisiifolia* uočena je značajna inter-populaciona diferencijacija među introdukovanim istočno-evropskim (Gladieux i sar., 2011) i kineskim populacijama ambrozije (Li i sar., 2012). Suprotno, slaba struktuiranost je detektovana u populacijama Francuske u istraživanjima Genton i sar. (2005a) i Chun i sar. (2010), koji pored uticaja multiple introdukcije, ističu ulogu protoka gena i mešanja populacija (ukrštanja individua različitih populacija) u formiranju savremenih francuskih populacija. Interesantno zapažanje u istraživanju globalne invazije ambrozije (Gaudeul i sar., 2011), predstavlja uočen veći diverzitet i slabija diferencijacija populacija uzorkovanih u regionima Evrope sa većom incidencom ambrozije (kao što su Mađarska, Rusija i Francuska) u odnosu na druge ispitivane evropske populacije. Slično ovim publikovanim podacima, analiza molekularne varijanse, zajedno sa F_{st} vrednostima je pokazala nisku genetičku diferencijaciju među ispitivanim populacijama južnog dela Panonske nizije. Srednji nivo diferencijacije je primećen jedino između populacije Novi Sad (SR-NS) i

ostalnih analiziranih populacija ispitivanog regiona, dok je najveća distanca uočena između pomenute populacije i populacije Derventa (BH-Der). Udaljenost ove dve populacije je u saglasnosti sa različitim periodom njihovog formiranja, što se ogleda i u različitom nivou diverziteta ovih populacija. Naime, populacija SR-NS je najmlađa ispitivana populacija u regionu južnog dela Panonske nizije (što je predhodno objašnjeno u tekstu), dok populacija BH-Der, prema literaturnim podacima, uzorkovana na području gde je ambrozija prvi put detektovana na teritoriji Bosne (već 1935. godine) (Galzina i sar., 2010). Za razliku od pomenutih populacija, populacije Sombor (SR-Som) i Lug (CR-Lug) su se pokazale kao genetički najbliže, što bi moglo ukazati na njihovo zajedničko poreklo. Ova indicija je u skladu sa geografskim položajem pomenutih populacija (na granici Mađarske, Srbije i Hrvatske), pri čemu upliv ambrozije u ovo područje bi mogao biti kako iz pravca zapadne Hrvatske, tako i iz pravca Mađarske. Dodatno, visoka koncentracija polena na teritoriji Baranje (gde je uzorkovana populacija CR-Lug) i severo-zapadne Bačke (sa populacijom SR-Som) (Stefanic i sar., 2005., Konstantinović, 2013), idu u prilog visokom nivou protoka gena između ispitivanih populacija. Ukoliko postoji kontinuirani protok gena između populacija, genetička distanca između parova populacija se smanjuje sa povećanjem nivoa protoka gena (Slatkin, 1985b). Položaj populacija SR-NS i SR-Der, kao i SR-Som i CR-Lug u koordinatnom sistemu PCo analize je u skladu sa predhodnim zapažanjima. Takođe, grafički prikaz PCo analize nije pokazao jasno grupisanje ispitivanih populacija (osim pojedinačnih odvajanja populacija Novi Sad (SR-NS), Šabac (SR-Sab) i Smederevo (SR-Sme), predhodno objašnjeno u tekstu), što ukazuje na konzistentnost dobijenih rezultata primenjenih analiza. Bajesov klaster metod je pokazao da postojanje dva (sekundarno pet) klastera najbolje objašnjavaju struktuiranost analiziranih populacija, ali ni u jednoj od populacija, individue nisu pokazale jasnu pripadnost pojedinačnim klasterima, sa izuzetkom populacije Smederevo (SR-Sme) u kojoj je uočen nešto veći udeo jednog od klastera. U skladu sa predhodnim rezultatima, ova analiza potvrđuje nedostatak genetičke struktuiranosti u populacijama južnog dela Panonske nizije.

Uočena odvajanja pojedinačnih populacija analiziranog regiona nisu posledica geografske udaljenosti tih populacija, što je potvrđeno Mantel testom IBD (Isolation by distance) analize. Nesignifikantnost Mantel testa je bila i očekivana, obzirom na nedostatak struktuiranosti među populacijama ispitivanog regiona. Prema Slatkin i sar. (1993) postoji pozitivna korelacija

između IBD i genetičke diferencijacije populacija, dok je sa druge strane uočena negativna korelacija između ovih genetičkih mera (IBD i diferencijacije populacija) i nivoa protoka gena.

Stoga, detektovana niska diferencijacija između populacija južnog dela Panonske nizije, ukazuje na postojanje visokog nivoa protoka gena između populacija ispitivanog regiona, što je i u skladu sa nepostojanjem IBD. Visok nivo protoka gena među ispitivanim populacijama je potvrđen i rezultatima kvantifikacije protoka gena, sa brojem migranata $N_m=4,30314$ ($N_m>1$). Naime, prema Slatkin (1985a) indirektna procena nivoa protoka gena je moguća preko frekvencije jedinstvenih alela. Ovaj pristup se bazira na pretpostavci da pri postojanju intenzivnog protoka gena, postoji velika verovatnoća da migranti prenose retke alele između populacija, čime se frekvencije jedinstvenih alela u tim populacijama smanjuje. Naime, većina jedinstvenih alela su retki aleli, odnosno aleli malih frekvencija. Obzirom da se očekuje da su retki aleli po poreklu mladi, skoro nastali aleli, metoda procene nivoa protoka gena na osnovu frekvencije jedinstvenih alela posebno odražava skorašnje migracije (Slatkin i Takahata, 1985; Yamamichi i Innan, 2012). Za razliku od ovog pristupa, pristup procene nivoa protoka gena na osnovu F_{st} vrednosti (Wright, 1951) odražava postojanje migracija tokom dužeg vremenskog perioda, obzirom da se F_{st} vrednosti baziraju na heterozigotnosti, koja je u najvećoj meri determinisana frekvencijom zajedničkih alela, koji su po poreklu stariji (Yamamichi i Innan, 2012). Prema Wright (1951) F_{st} je jednak $1/(1+4N_m)$, iz čega proizilazi jednostavna korelacija da kada je broj migranata (N_m) mali, F_{st} vrednost je velika, i obrnuto. Neki autori (Whitlock i McCauley, 1999; Yamamichi i Innan, 2012) smatraju da je procena nivoa protoka gena na osnovu F_{st} vrednosti rizična i nedovoljno informativna, stoga, u ovom istraživanju je primenjen pristup po Slatkin (1985a). Međutim, ukoliko svesno zanemarimo pomenuti rizik i preko F_{st} vrednosti sagledamo nivo protoka gena, primećuje se da su F_{st} vrednosti bile niske, što ukazuje na nizak nivo diferencijacije između populacija ispitivanog regiona, što opet ukazuje na visok nivo protoka gena među ispitivanim populacijama.

Analizom populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije uočen je visok nivo varijabilnosti, kao i nizak nivo genetičke diferencijacije i struktuiranosti u populacijama ispitivanog regiona. Kao najprihvatljivije objašnjenje nameće se uticaj multiplih introdukcija iz nativnog područja, kao i iz različitih pravaca Evrope, kao i visok nivo protoka gena među

populacijama ispitivanog regiona. Ovakvi rezultati nisu neočekivani, obzirom na predhodno opisane invazivne karakteristike ispitivane vrste, poziciju južnog dela Panonske nizije, socio-ekonomske uslove na ispitivanom području, visoku incidencu ambrozije u ovom području, ali na karakteristike samog ispitivanog područja. Naime, Panonska nizija, kao jedan od regiona sa najvećom incidencom *A. artemisiifolia* u Evropi, predstavlja prostran aluvijalan basen, pogodan za introdukciju i širenje stranih vrsta. Ono što čini Panonsku niziju pogodnom sredinom za naseljavanje i širenje ambrozije jeste sličnost staništa pomenutog regiona, sa nativnim staništem ambrozije u prerijama Severne-Amerike (Takhtajan, 1986). Ova sličnost se ogleda pre svega u plodnosti zemljišta i stepskoj flori, kao i umereno kontinentalnoj klimi sa stalnom tendencijom porasta srednje godišnje temperature (Stevanović i sar., 1999). Pored toga, kroz Panonski basen protiču velike reke, kao što su Dunav, Tisa, Sava, Drava, koje zajedno sa vetrovima doprinose širenju semena i polena ambrozije na velike udaljenosti (Fumanal i sar., 2007a; Fumanal i sar., 2007b). Značajnu ulogu u širenju *A. artemisiifolia* Panonskom nizijom ima i razvijena poljoprivreda, kao i razgranata mreža puteva i kanala.

Sve ove karakteristike, zajedno sa visokim genetičkim diverzitetom i intenzivnom razmenom genetičkog materijala među populacijama ambrozije južnog dela Panonske nizije, ukazuje na postojanje predispozicija i potencijala ambrozije za rapidnu ekspanziju u analiziranom području i šire.

7.2. Genetička varijabilnost i diferencijacija populacija ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana

Obzirom da se *Ambrosia artemisiifolia* u poslednjih 20-tak godina prošlog veka širila ka peripanonskom prostoru centralnog Balkana, tačnije ka centralnim i južnim delovima Srbije (Vrbničanin i Janjić, 2011), drugi deo ovog istraživanja je bio usmeren na analizu genetičke varijabilnosti šest populacija pomenutog područja, upotrebom deset mikrosatelitskih lokusa.

Poredeći parametre genetičke varijabilnosti, uočeno je da populacije Sevojno (SR-Sev) i Gruža (SR-Gru), zajedno sa populacijom Negotin (SR-Neg), smeštene u severnom delu ispitivanog područja, predstavljaju region sa najvećim populaciono-genetičkim diverzitetom u

odnosu na druge ispitivane populacije peripanonskog prostora. Nešto niža genetička varijabilnost u odnosu na predhodne tri populacije je detektovana u populacijama Zlatibor (SR-Zla) i Kruševac (SR-Kru). Najmanje vrednosti intra-populacionih parametara genetičkog diverziteta su dobijene u populaciji Leskovac (SR-Les), koja se nalazi na južnoj granici ispitivanog područja. Prema navedenim podacima, može se zaključiti da je tokom ekspanzije ambrozije u peripanonskom prostoru došlo do sukcesivnog gubitka genetičkog diverziteta ispitivanih populacija. Prema pravcu redukcije diverziteta ispitivanih populacija, potvrđuje se i pravac širenja ambrozije peripanonskim prostorom, koje je teklo u pravcu sever-jug. Dobijeni podaci su u saglasnosti sa rezultatima Genton i sar. (2005a), koji su proučavali ekspanziju ambrozije na teritoriji Francuske. Ova grupa autora je detektovala redukciju genetičkog diverziteta u populacijama udaljenim od mesta primarne introdukcije, kao posledicu prolaska populacija kroz seriju genetičkih uskih grla. Slična zapažanja su publikovana i u istraživanjima drugih invazivnih vrsta (Ciosi i sar., 2008; Watts i sar., 2010; Men i sar., 2013). Prema Dlugosch i Parker (2008) ovakav model promene alelnog diverziteta je očekivan tokom ekspanzije i kolonizacije novih područja, kao posledica genetičkog drifta, odnosno efekta osnivača.

Poređenje nivoa genetičke varijabilnosti ispitivanih populacija, pored uvida u pravce i puteve širenja invazivne vrste, može da pruži i podatke o potencijalnom poreklu tek nastanjenih populacija ispitivane vrste (Dlugosch i Parker, 2008). Naime, populacije sa detektovanim visokim genetičkim diverzitetom i povoljnim strateškim položajem, se mogu smatrati izvornim u ekspanziji ispitivane vrste na određenom području (Men i sar., 2013). Saglasno sa navedenim, u ovom istraživanju populacije ambrozije smeštene na severu ispitivanog peripanonskog područja (Gruža (SR-Gru) i Sevojno (SR-Sev)), sa uočenim najvećim genetičkim diverzitetom, bi se mogle smatrati izvorom ekspanzije ostalih ispitivanih populacija peripanonskog područja.

Predhodne indicije podržava i analiza genetičke struktuiranosti i diferencijacije populacija ambrozije ispitivanog regiona. Iako je u ovom delu istraživanja, analizirana relativno mala geografska površina u području peripanonskog prostora centralnog Balkana, STRUCTURE analizom je detektovana izražena struktuiranost ispitivanih populacija. Na $K=4$, populacije Leskovac (SR-Les), Kruševac (SR-Kru), Negotin (SR-Neg) i Zlatibor (SR-Zlt) su se izdvojile

u posebne klastere, dok je u populacijama Gruža (SR-Gru) i Sevojno (SR-Sev) uočen udeo većeg broja klastera. Izdvajanje navedenih populacija u posebne klastere, kao i detektovana manja genetička varijabilnost, se može objasniti time da populacije Leskovac (SR-Les), Kruševac (SR-Kru), Negotin (SR-Neg) i Zlatibor (SR-Zlt) predstavljaju samo deo, frakciju genetičkih varijacija prisutnih u izvornim populacijama (Nei i sar., 1975; Barrett i Husband, 1990). Prema tome, populacija Negotin (SR-Neg), bi se mogla smatrati frakcijom populacije Gruža (SR-Gru), u kojoj je udeo klastera (označenog crvenom bojom (Slika 8)) veći u odnosu na druga dva prisutna klastera. Po istom principu, populacija Kruševac (SR-Kru) bi mogla biti frakcija populacije Sevojno (SR-Sev), dok je klaster populacije Zlatibor (SR-Zla) podjednako prisutan u obe potencijalno izvorne populacije (SR-Gru i SR-Sev). Za razliku od predhodno opisanih populacija, populacija Leskovac (SR-Les) se odvaja u potpuno novi klaster, čiji udeo nije detektovan u ostalim ispitivanim populacijama peripanonskog prostora. Diferencijacija ove populacije, zajedno sa uočenim najmanjim diverzitetom među populacijama ispitivanog područja, ukazuje na odvojeno poreklo ove populacije, kao i na kasniji period njenog nastanjivanja peripanonskog regiona u odnosu na ostale ispitivane populacije.

Izdvajanje populacije Leskovac (SR-Les) u poseban klaster je uočeno i u Bajesovoj analizi na $K=2$, potvrđujući njeno odvojeno poreklo. Populacija Kruševac (SR-Kru) je takođe odvojena u poseban klaster, ali sa udelom tog klastera i u populaciji Sevojno (SR-Sev), ukazujući na uticaj populacije Sevojno u formiranju populacije Kruševac.

Diferencijacija populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana je potvrđena i drugim primenjenim analizama. Ovo je očekivano obzirom na uticaj evolutivnih procesa prisutnih tokom ekspanzije i kolonizacije novih područja, kao što su prolazak populacije kroz genetičko usko grlo ili efekat osnivača (Bohonak, 1999). Naime, u skoro nastanjenim populacijama, ovi procesi dovode kako do smanjenja genetičkog diverziteta, tako i do povećanja inter-populacione diferencijacije (Dlugosch i Parker, 2008). Na osnovu AMOVA analize, Fst vrednosti i PCo analize uočen je srednji nivo diferencijacije među populacijama peripanonskog prostora. Populacije sa najvišim genetičkim diverzitetom, Sevojno (SR-Sev) i Gruža (SR-Gru) su ispoljile najmanju genetičku udaljenost u koordinatnom sistemu PCo analize, dok je Fst vrednost dobijena poređenjem ove dve populacije ukazala na nizak nivo njihove diferencijacije. Ovo zapažanje je u skladu sa razvijenim putnim pravcem koji

povezuje ove dve populacije, ali navodi i na indicije o zajedničkom poreklu pomenutih populacija. Približavanje populacije Negotin (SR-Neg), uvođenjem treće koordinate u PCo analizu, predhodno pomenutim populacijama (SR-Sev i SR-Gru) je u skladu sa njihovom pripadnošću istom klasteru (na $K=2$), kao i potencijalnom poreklu populacije Negotin od populacije Gruža. Ostale populacije su pokazale veću genetičku udaljenost u koordinatnom sistemu, što je uočeno i analizom F_{st} vrednosti, potvrđujući prisustvo diferencijacije među ispitivanim populacijama. Najveća diferencijacija i genetička udaljenost je detektovana između populacija Leskovac (SR-Les) i Kruševac (SR-Kru), ukazujući na odvojeno poreklo ovih populacija.

Sumarno, analizom populacija ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana uočen je sukcesivan gubitak genetičkog diverziteta ispitivanih populacija, ukazujući na pravac širenja ambrozije u analiziranom području (sever-jug), kao i izražena struktuiranost i srednji nivo diferencijacije među ispitivanim populacijama. Širenje ambrozije u ispitivanom regionu bi se delimično moglo objasniti sukcesivnim širenjem ambrozije od potencijalnih izvornih populacija (Sevojno i Gruža) praćenim efektom osnivača i genetičkim driftom. Pored smanjenog genetičkog diverziteta u ostalim ispitivanim populacijama u odnosu na predhodno pomenute populacije, ovim indicijama ide u prilog i Bajesova klaster analiza na $K=4$. U ovoj analizi uočen je udeo potencijalnih izvornih populacija u formiranju populacija Negotin, Kruševac i Zlatibor. Međutim, jasno odvajanje populacije Leskovac (kako na $K=4$, tako i na $K=2$ u STRUCTURE analizi), ukazuje na mogućnost prisustva nezavisnih, odvojenih introdukcija na području peripanonskog prostora. U prilog ovome, ide i prisustvo jedinstvenih alela u svim ispitivanim populacijama peripanonskog prostora, koji su prema Genton i sar. (2005b) veoma informativni u identifikaciji izvornih populacija tokom procesa invazija.

Pravci invazija u skoro nastanjenim regionima ispitivanom vrstom, mogu biti veoma nepredvidljivi (period i pravac introdukcije je uglavnom nepoznat), što direktna istraživanja ovih procesa čini veoma zahtevnim (Grevstad, 1999). Stoga, postoji manji broj detaljnih istraživanja populacione dinamike tokom ranih faza invazije, pa je i uticaj efekta osnivača u velikoj meri neispitan. Komparativne analize skoro introdukovanih populacija sa potencijalnim izvornim populacijama mogu biti veoma korisne u proučavanju ne samo evolutivnih mehanizama na nivou ispitivanog područja, nego i procesa invazija uopšte (Ciosi i

sar., 2008). Da bi se odredilo moguće geografsko poreklo populacija ambrozije peripanonskog prostora centralnog Balkana, kao i mehanizmi širenja ove invazivne vrste na pomenutom području, neophodna je analiza populacija pomenutog područja sa potencijalnim izvornim populacijama.

7.3. Poređenje genetičke varijabilnosti i diferencijacije populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije sa populacijama peripanonskog prostora centralnog Balkana

U skladu sa predhodnim rezultatima, kao i pretpostavkom da se ambrozija u peripanonskom prostoru centralnog Balkana širi sa područja Panonske nizije, vršena je komparacija parametara genetičkog diverziteta i struktuiranosti pomenutih područja, kao i test pripadnosti populacija peripanonskog prostora populacijama Panonske nizije, u cilju rasvetljavanja mehanizama i pravaca ove ekspanzije.

Poređenjem srednjih vrednosti inter-populacionih parametara genetičke varijabilnosti uočena je manja genetička varijabilnost u populacijama peripanonskog prostora centralnog Balkana u odnosu na populacije južnog dela Panonske nizije. Međutim, uprkos redukciji genetičkog diverziteta, dokazi o prolasku populacija peripanonskog regiona kroz usko genetičko grlo nisu detektovani, osim za populaciju Sevojno (SR-Sev). Signifikantna razlika srednjih vrednosti parametra r (prosečnog broja alela po lokusu nakon metode refrakcije uzorka) između ispitivanih regiona, je potvrdila uočene razlike. Ovaj genetički parametar je često korišćen u studijama za procenu gubitka genetičkog diverziteta u novoformiranim populacijama invazivnih vrsta (kakve su populacije peripanonskog prostora). Razlog tome je veća osetljivost ovog parametra na dejstvo evolutivnih procesa (genetički drift, efekat osnivača) prisutnih u početnim fazama invazija, od drugih mera genetičke varijabilnosti (Dlugosch i Parker, 2008). U ovom istraživanju, kao što je već napomenuto, pored smanjenja vrednosti parametra r , detektovane su niže vrednosti i ostalih parametara genetičke varijabilnosti (sa izuzetkom prosečnog broja jedinstvenih alela, o čemu će biti reči kasnije). Obzirom da su novoformirane populacije često manje genetički varijabilne u odnosu na populacije od kojih potiču (Tsutsui i sar., 2000), rezultati ovog istraživanja ukazuju da su

populacije peripanonskog prostora mlađe po poreklu u odnosu na populacije južnog dela Panonske nizije, pa i da su populacije Panonske nizije potencijalni izvor populacija peripanonskog prostora.

U cilju rasvetljavanja potencijalnog porekla populacija peripanonskog prostora, poređena je diferencijacija i struktuiranost grupa populacija ispitivanih područja, ali je vršena i analiza svih ispitivanih populacija zajedno (populacije južnog dela Panonske nizije zajedno sa populacijama peripanonskog prostora centralnog Balkana). Poredeći rezultate AMOVA analize, Fst vrednosti, položaj populacija u koordinatnom sistemu PCo analize, kao i rezultate STRUCTURE analize, uočena je veća diferencijacija i struktuiranost populacija peripanonskog prostora u odnosu na populacije Panonske nizije. Shodno ovome, najveći procenat genetičke varijabilnosti (AMOVA rezultati) je detektovan između populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana, niža vrednost je uočena između svih ispitivanih populacija, dok je najniža vrednost detektovana između populacija Panonske nizije. Uočena genetička varijabilnost između ispitivanih grupa populacija je bila izrazito niska (svega 0,54%), čija je nesignifikantnost potvrđena i nakon Boniferonijeve korekcije p vrednosti. Ovo može biti posledica intenzivne razmene genetičkog materijala između analiziranih grupa populacija, što je u skladu sa indicijama o zajedničkom poreklu ispitivanih populacija, odnosno o poreklu populacija peripanonskog prostora od populacija sa područja Panonske nizije.

Fst vrednosti su, takođe, pokazale veću diferencijaciju populacija peripanonskog prostora u odnosu na populacije regiona Panonske nizije. Niže Fst vrednosti su detektovane između parova populacija čitavog ispitivanog regiona, ukazujući na nisku diferencijaciju između populacija Panonske nizije i peripanonskog prostora. Analiza Fst vrednosti svih ispitivanih populacija je bila u saglasnosti sa analizama Fst vrednosti na regionalnim nivoima. Naime, ova analiza je pokazala najmanju diferencijaciju između populacija Sombor (SR-Som) i Lug (CR-Lug), što je u saglasnosti sa analizom Fst vrednosti populacija Panonskog regiona (opisano u odeljku 5.1), dok je najveća Fst vrednost detektovana između populacija Leskovac (SR-Les) i Kruševac (SR-Kru), što je u saglasnosti sa analizom Fst vrednosti populacija peripanonskog regiona (opisano u odeljku 5.2). Manja udaljenost između populacija Panonske nizije u odnosu na populacije peripanonskog prostora je potvrđena i PCo analizom. U

koordinatnom sistemu PCo analize svih ispitivanih populacija je izražena bliskost dve populacije peripanonskog regiona (populacije Sevojno i Gruža) populacijama Panonske nizije. Zajedno sa rezultatima STRUCTURE analize, u kojoj ove dve populacije imaju isti profil kao i populacije Panonskog regiona (udeo većeg broja klastera), ukazuje na zajedničko poreklo ovih populacija. Genetička udaljenost populacija Leskovac (SR-Les) i Kruševac (SR-Kru), kako međusobno, tako i u odnosu na sve ispitivane populacije je potvrđena PCo analizom i Bajesovom klaster analizom, koja je izdvojila ove dve populacije u posebne klastere. Nešto veći udeo jednog od klastera je primećen i u populacijama Zlatibor (SR-Zla) i Negotin (SR-Neg). Obzirom da je udeo klastera, u koje se izdvajaju ove 4 populacije peripanonskog prostora, u većoj ili manjoj meri, prisutan u svim populacijama Panonske nizije, potvrđuje se poreklo ovih populacija od populacija sa područja južnog dela Panonske nizije.

Predhodno navedenim podacima, idu u prilog i rezultati kvantifikacije protoka gena, pri čemu je najveći broj migranata (N_m) detektovan upravo na nivou populacija čitavog analiziranog regiona, potvrđujući veoma visok nivo protoka gena između populacija južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana. Poredeći N_m vrednosti između ova dva analizirana regiona, uočen je veći nivo protoka gena na području Panonske nizije u odnosu na peripanonski prostor, što je u skladu sa detektovanom populaciono-genetičkom diferencijacijom unutar ispitivanih regiona, kao i intra-populacionom varijabilnošću ova dva regiona. O uticaju protoka gena, odnosno razmeni genetičkog materijala između populacija koje duže vreme naseljavaju određeni region, govore i Wright (1951) i Ellstrand i Schierenbeck (2000). Autori ističu da tokom vremena, introdukovane populacije mogu da dostignu genetički ekvilibrium, ukoliko se gubitak alela, kao posledice uticaja genetičkog drifta, umanjuje inrodukcijom novih alela u toku procesa protoka gena. Suprotno, genetička struktura i varijabilnost mlađih, odnosno skoro naseljenih populacija, je pod većim uticajem evolutivnih procesa, kao što su genetički drift i efekat osnivača, nego pod uticajem protoka gena (Bohonak, 1999). Stoga je protok gena (zajedno sa uticajem multiple introdukcije, objašnjeno u odeljku 5.1) uzrok detektovanog visokog nivo varijabilnosti i slabe struktuiranosti populacija južnog dela Panonske nizije; dok je manja varijabilnost i viši nivo struktuiranosti populacija peripanonskog regiona posledica delovanja genetičkog drifta i efekta osnivača.

U skladu sa nivoom protoka gena su bile i srednje vrednosti broja jedinstvenih alela (N_P). Obzirom na obrnutu proporcionalnu korelaciju ove dve genetičke mere (Slatkin, 1985a), broj jedinstvenih alela u peripanonskom prostoru centralnog Balkana ($N_P=0,8\pm 1,2$) je bio veći u odnosu na južni deo Panonske nizije ($N_P=0,4\pm 0,7$).

Svi navedeni podaci ukazuju na postojanje razmene genetičkog materijala između populacija Panonske nizije i peripanonskog prostora, ukazujući i na njihovo zajedničko poreklo. Međutim, prisustvo jedinstvenih alela u populacijama peripanonskog prostora (Negotin i Kruševac sa po 1 jedinstvenim alelom, Zlatibor sa 3 detektovana jedinstvena alela), ukazuje i na mogući uticaj neidentifikovanih izvora ambrozije u formiranju populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana. Naime, obzirom da su u populacijama peripanonskog prostora detektovani aleli koji nisu prisutni u analiziranim populacijama panonskog regiona, pomenuti aleli bi mogli biti poreklom, kako od neuzorkovanih populacija Panonske nizije, tako i sa područja van okvira Panonskog regiona. Stoga, pored upliva genetičkog materijala iz pravca severa (sa područja Panonske nizije) u formiranju populacija peripanonskog regiona, ne može se isključiti i uticaj upliva propaguluma ambrozije iz drugih pravaca (zapada i istoka).

Jedno od objašnjenja za pojavu jedinstvenih alela u introdukovanim populacijama je *in situ* nastanak novih alela (Gaudeul i sar., 2011). Međutim, u ovom istraživanju, ovaj scenario nije moguć, obzirom na period naseljavanja ambrozije u peripanonskom prostoru, koji je bio pre oko najviše 3-4 decenije. Obzirom da je *A. artemisiifolia* jednogodišnja biljka, to je ukupno 30-40 generacija. Stopa mutacije ponovaka mikrosatelitskih lokusa kod većine mikrosatelita iznosi 10^{-4} po lokusu po generaciji, što je daleko od dovoljnog da bi u pomenutom periodu nastao novi alel (Thuillet i sar., 2002).

Osim u identifikaciji izvornih populacija tokom procesa invazija (Genton i sar., 2005a), jedinstveni aleli ukazuju i na proces multiple introdukcije. Tačnije, veći broj jedinstvenih alela u introdukovanim populacijama u odnosu na izvorne, govori o uticaju većeg broja introdukcija u novoformiranim populacijama (Suarez i Tsutsui, 2008). Stoga, detektovan veći broj jedinstvenih alela u peripanonskom prostoru u odnosu na Panonski region, potvrđuje predhodne indicije o udelu većeg broja upliva ambrozije u peripanonski prostor centralnog Balkana.

7.3.1. Potencijalno poreklo populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana na osnovu rezultata testa pripadnosti

Test pripadnosti je pružio dodatan uvid u potencijalno poreklo populacija peripanonskog prostora. Sprovedena su dva testa pripadnosti. Obzirom na pretpostavke o poreklu peripanonskih populacija ambrozije od populacija panonskog regiona, prvo je analizirana pripadnost individua svih populacija peripanonskog prostora populacijama Panonske nizije. U drugom testu, rađena je analiza pripadnosti individua svake pojedinačne populacije peripanonskog prostora u odnosu sve ostale uzorkovane populacije. Opravdanost ovog drugog testa, pružaju podaci dobijeni analizom varijabilnosti i struktuiranosti peripanonskog prostora. Naime, peripanonske populacije su pokazale sukcesivan gubitak genetičkog diverziteta u pomenutom području (u pravcu sever-jug), što ukazuje na moguće postepeno širenje ambrozije u pomenutom pravcu, odnosno da južnije populacije mogu biti rezultat širenja susednih severnijih populacija. Međutim, nešto složeniji podaci dobijeni analizom struktuiranosti i diferencijacije populacija peripanonskog prostora, su ukazali da mogući model širenja ambrozije u ovom regionu nije bio jednostavan sukcesivan niz događaja, nego potencijalno predstavlja rezultat nezavisnih, odvojenih introdukcija.

Oba testa pripadnosti su pokazala da je, u formiranju populacija peripanonskog prostora, udeo imao veći broj referentnih populacija. Ovo je u skladu sa detektovanom slabom diferencijacijom populacija Panonske nizije. Naime, prema Genton i sar. (2005a), signifikantna diferencijacija i postojanje modela IBD-a (Isolation by distance) u potencijalnim izvornim populacijama predstavlja idealne uslove za sprovođenje testa pripadnosti. Ovi uslovi bi trebalo da obezbede pravilno pripajanje individua određenoj referentnoj populaciji, odnosno regionu. Međutim, Pascual i sar. (2007) ističu da srednje vrednosti verovatnoće pripadnosti efikasno određuju najverovatnije izvorne populacije skoro naseljenih introdukovanih populacija, i u slučajevima kada je diferencijacija potencijalnih izvornih populacija niska, a novoformirane introdukovane populacije pretrpele snažan uticaj efekta osnivača.

Test pripadnosti populacija peripanonskog prostora svim analiziranim populacijama je pokazao veće srednje vrednosti verovatnoće pripadnosti u populacijama Panonske nizije u odnosu na populacije samog analiziranog regiona, potvrđujući poreklo peripanonske

ambrozije od populacija ambrozije sa područja Panonske nizije. U populacijama Gruža (SR-Gru) i Sevojno (SR-Sev) uočen je najveći udeo upliva propaguluma ambrozije iz istog pravca, pravca teritorije Hrvatske (obzirom na vrednosti verovatnoće pripadnosti populaciji Kutina (CR-Kut)), ukazujući na zajedničko poreklo ove dve populacije. Ovo zapažanje je u skladu sa predhodnim analizama i uočenom genetičkom bliskošću ove dve populacije, kako međusobno tako i sa populacijama Panonskog regiona. Posmatrano samo na nivou peripanskog regiona, najveći udeo u formiranju populacija su imale upravo ove dve populacije, što potvrđuje predhodne indicije o populacijama Gruža (SR-Gru) i Sevojno (SR-Sev), kao potencijalnim izvornim populacijama u području peripanonskog regiona (predhodno objašnjeno u odeljku 5.2). Za razliku od ovih, vrednosti posmatranog parametra u ostalim referentnim populacijama sa peripanonskog područja su bile znatno niže, najčešće i zanemarljive (manje od 0,05), što te ostale populacije isključuje kao mogući izvor individua peripanonskog regiona.

Međutim, pored populacija Gruža (SR-Gru) i Sevojno (SR-Sev) u formiranju populacija peripanonskog područja, detektovan je i upliv genetičkog materijala iz drugih regiona (pravaca) Panonske nizije. Ovo ide u prilog scenariju o postojanju nezavisnih, odvojenih introdukcija na područja peripanonskog prostora. Tačnije, u formiranju populacije Negotin (SR-Neg), pored uticaja populacije Gruža (SR-Gru) (što je prikazano i STRUCTURE analizom), uočen je upliv genetičkog materijala iz pravca Rumunije (populacije Sanandrei (RO-San)). U prilog ovome ide i geografski položaj ove dve populacije, odnosno populacije SR-Neg i RO-San se nalaze na istočnoj granici ispitivanog regiona.

Slično, u populaciji Zlatibor (SR-Zlt) detektovan je uticaj dve populacije peripanonskog regiona, Gruža (SR-Gru) i Sevojno (SR-Sev), što je opet u skladu sa Bajesovom klaster analizom. Međutim, uočen upliv ambrozije iz pravca Sombora (SR-Som) opravdava genetičku distancu ove populacije u odnosu na ispitivane populacije peripanonskog područja. U prilog ovome, ide i detektovan najveći broj jedinstvenih alela u ovoj populaciji u odnosu na ostale proučavane populacije peripanonskog regiona.

Populacija Kruševac (SR-Kru), obzirom na ranije detektovan manji genetički diverzitet, i STRUCTURE analizu, bi mogla predstavljati frakciju genetičkog materijala populacije Sevojno (SR-Sev), pa i Gruža (SR-Gru). Veliki udeo populacije Kutina (SR-Kut) u sve tri populacije, ukazuje na njihovo zajedničko poreklo, dok upliv ambrozije iz pravca Severne

Srbije (sa područja populacije Kikinda (SR-Kik)), ide u prilog odvajanju ove populacije u poseban klaster.

Slično, u populaciji Leskovac (SR-Les) detektovane su visoke vrednosti verovatnoće pripadnosti individua populaciji Kutina (SR-Kut) sa područja Panonske nizije i u populaciji Sevojno (SR-sev) sa peripanonskog područja, ukazujući na zajedničko poreklo sa pomenutim populacijama, kao i sa populacijom Kruševac (SR-Kru). Međutim, izdvajanje populacije Leskovac (SR-Les) u potpuno odvojeni klaster u odnosu na populaciju Kruševac (SR-Kru) (Bajesova klaster analiza), ukazuje na to da je u formiranju populacije Leskovac (SR-Les) udeo imala jedna frakcija genetičkog materijala prisutna u izvornim populacijama (Kutina (SR-Kut), odnosno Sevojno (SR-Sev)), dok je u formiranju populacije Kruševac učestvovala druga frakcija pomenutih izvornih populacija.

Obzirom na veoma nisku diferencijaciju i struktuiranost detektovanu među populacijama Panonskog regiona, u kojima individue ne pokazuju jasnu pripadnost pojedinačnim klasterima, analizom srednjih vrednosti verovatnoće pripadnosti se ne može sa sigurnošću tvrditi da je neka populacija peripanonskog prostora poreklom od određene populacije sa područja Panonskog regiona. Međutim, rezultati testa pripadnosti mogu jasno da ukažu da je u formiranju populacija peripanonskog prostora učestvovalo više različitih struja u uplivu genetičkog materijala iz regiona Panonskog basena.

Prema dobijenim podacima, scenario širenja ambrozije na području peripanonskog prostora bi mogao biti sledeći: najranije naseljene populacije u analiziranom području su populacije (SR-Gru) i Sevojno (SR-Sev), koje su dalje učestvovala u formiranju drugih analiziranih populacija peripanonskog prostora. Međutim, ekspanzija ambrozije u ovo prostoru nije bila po jednostavnom modelu da od severnije populacije sa većim genetičkim diverzitetom nastaje susedna južnija populacija manje genetičke varijabilnosti. Iako je širenje ambrozije najverovatnije išlo u tom pravcu (sever-jug), detektovan je udeo više različitih struja, što ukazuje na nešto složeniji model širenja i uticaj nezavisnih, odvojenih introdukcija u području peripanonskog regiona. Takođe, ne može se zanemariti potencijalan uticaj neuzorkovanih populacija sa područja analiziranog regiona (južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana), kao i sa područja koje nisu deo ovog istraživanja.

Stoga, iako je uzorkovan relativno velik broj populacija ambrozije sa područja Panonske nizije, kao i ambrozija duž glavnih trasa širenja na peripanonskom području, dobijeni podaci u ovom istraživanju otvaraju nova pitanja o pravcima upliva ambrozije u peripanonsko područje i daju prostor daljim istraživanjima koja bi zahtevala proširivanje uzorka populacijama kako sa istraživanog područja, tako i sa prostora koji se nalaze istočno i zapadno u odnosu na peripanonski region.

7.4. Deficit heterozigota u populacijama južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana

U svim analiziranim populacijama detektovano je signifikantno odstupanje od Hardy-Weinberg (HW) ekvilibriumu, kao i pozitivne vrednosti koeficijenta inbridinga (F_{is}), ukazujući na deficit heterozigota u svim populacijama ispitivanog područja. Uzrok deficita heterozigota može biti: uticaj Valund efekta (eng. Wahlund effect), koji predstavlja mešanje (ukrštanje) populacija različitih frekvencija alela, zatim uticaj prirodne selekcije, kao i inbriding i/ili prisustvo nultih alela (Karlsson i Mork, 2005).

U najranijem populaciono-genetičkom istraživanju ambrozije (Genton i sar., 2005b) inbriding je, u kombinaciji sa nekim od ostalih faktora, razmatran kao uzrok deficita heterozigota, obzirom da se za ovu invazivnu vrstu dugo smatralo da je samooplodna (Bassett i Crompton, 1975). Iako, novija istraživanja ukazuju na visoku stopu stranooplodnje i prisustvo mehanizama autosterilnosti kod ove korovske vrste (Friedman i Barrett, 2008; Li i sar., 2012), neki autori još uvek inbriding navode kao jedan od uzroka ekscesa homozigota u populacijama ambrozije, ali sa naglaskom na potrebe daljih istraživanja reproduktivnog sistema ove vrste (Gaudeul i sar., 2011). Ova grupa autora ističe i mogući uticaj Valund efekta, obzirom na veličinu većine uzorkovanih populacija, od kojih su neke sadržale i više od 10 000 individua.

Srednja vrednost koeficijenta inbridinga (F_{is}) detektovana u ovom istraživanju je bila u saglasnosti, čak i niža u odnosu na F_{is} vrednosti detektovane u predhodnim istraživanjima Genton i sar. (2005a) i Gladieux i sar. (2011), koji su odbacili mogućnost inbridinga kao

uzroka deficita heterozigota. Srednja Fis vrednost uočena u ovom istraživanju je iznosila $0,356 \pm 0,051$, dok su vrednosti detektovane u severno-američkom i francuskim populacijama bile $0,45 \pm 0,028$, odnosno $0,49 \pm 0,046$ (Genton i sar., 2005b). U istočno-evropskim populacijama je utvrđena nešto viša vrednost parametra Fis, koja je iznosila $0,69 \pm 0,12$ (Gladieux i sar. (2011)). Takođe, u navedenim istraživanjima, nisu pronađeni dokazi koji ukazuju na promenu sistema reprodukcije (od stranooplodnje ka samooplodnji) u introdukovanim populacijama, što se smatralo opštim modelom ponašanja invazivnih biljnih vrsta (Barrett i Richardson, 1986). U saglasnosti sa ovim, kao i istraživanjima Friedman i Barrett (2008), Chun i sar. (2010) i Li i sar. (2012), u analizi populacija panonskog i peripanonskog regiona, inbriding je najmanje verovatan uzrok deficita heterozigota. U prilog ovome, ide i velika brojnost i gustina individua ambrozije u populacijama peripanonskog, a pogotovo panonskog regiona, obzirom da se porast nivoa samooplodnje očekuje ukoliko je gustina biljaka u području introdukcije mala (odnosno razmak između biljaka velik) (Genton i sar., 2005a).

Iako Li i sar. (2012) smatraju da je glavni uzrok deficita heterozigota u populacijama ambrozije Valund efekat, predhodna istraživanja (Genton i sar., 2005a, Chun i sar., 2010; Gladieux i sar., 2011) su odbacila ovu mogućnost. U saglasnosti sa navedenim, u ovom istraživanju Valund efekat verovatno nije uzrok detektovanog deficita heterozigota. Ovo je posebno izraženo za populacije Panonske nizije, obzirom da u tom području, populacije ambrozije perzistiraju kao odvojene duži vremenski period. Dodatno, u ovom regionu nije detektovana struktuiranost populacija, kao jedan od pokazatelja Valund efekta (Li i sar., 2012). Međutim, to nije slučaj u populacijama peripanonskog regiona, tako da u ovom području se ne može u potpunosti odbaciti uticaj pomenutog faktora.

U većini dosadašnjih istraživanja kao najrelevantnije objašnjenje deficita heterozigota u populacijama *A. artemisiifolia* se navodi prisustvo nultih alela (Genton i sar., 2005a; Chun i sar., 2010; Gladieux i sar., 2011). U saglasnosti sa ovim istraživanjima, u analizi populacija ambrozije južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana, najverovatnije objašnjenje deficita heterozigota bi moglo biti prisustvo nultih alela. Naime, u svim analiziranim populacijama detektovano je prisustvo nultih alela čija se frekvencija kretala u opsegu od 0,101 do 0,243, sa srednjom vrednošću $0,166 \pm 0,030$. U istraživanjima

Genton i sar. (2005a) i Gladieux i sar. (2011) frekvencije nultih alela su iznosile 15,2+2,0% u istočno-evropskim populacijama, 8,5+1,5% u francuskim populacijama i 10,2+1,4% u severno-američkim populacijama. Obzirom na razlike u načinu predstavljanja frekvencije nultih alela u ovom istraživanju, u odnosu na istraživanje Chun i sar., (2010), poređenje nije bilo moguće.

Posmatrano po regionima, srednja vrednost broja lokusa koji sadrže nulte alele (N_n) i srednja vrednost frekvencije nultih alela (f_n) je bila malo veća u populacijama južnog dela Panonske nizije u odnosu na populacije peripanonskog regiona. Ova razlika je razumna, obzirom na utvrđeni raniji period formiranja populacija ambrozije u panonskom regionu u odnosu na peripanonski. Naime, nulti aleli kao posledica mutacija u prajmer-vezujućem mestu mikrosatelitskog lokusa, čija je stopa relativno niska, ukazuju na duži period evolucije (Gladieux i sar., 2011). Stoga, nije neočekivano da ranije formirane populacije, imaju veći broj nultih alela. U saglasnosti sa ovim, su i nešto više srednje vrednosti uočene heterozigotnosti (H_o), očekivane heterozigotnosti (H_e) i koeficijenta inbridinga (F_{is}) u populacijama Panonskog regiona u odnosu na peripanonski. Međutim, ove razlike nisu bile značajne, što je potvrđeno i testom permutacija (test u FSTAT programskom paketu). Iako je uočena redukcija genetičkog diverziteta u populacijama peripanonskog prostora u odnosu na panonski region, nesignifikantnost ovih razlika je očekivana, obzirom da je heterozigotnost parameter, koji je manje osetljiv na uticaj evolutivnih procesa tokom ekspanzije od drugih parametara genetičke varijabilnosti (Dlugosch i Parker, 2008).

8. ZAKLJUČAK

Analiza populacija *Ambrosia artemisiifolia* sa područja Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana upotrebom mikrosatelitskih lokusa potvrdile su postavljene hipoteze.

Odabrani mikrosatelitski lokusi su ispoljili dovoljan nivo polimorfности u populaciono-genetičkim analizama ambrozije ispitivanog područja. Broj detektovanih alela po lokusu se kretao od 5 u lokusu *Amb12* do 32 u lokusu *Ambart24*.

Populacije ambrozije južnog dela Panonske nizije, ispoljile su visok nivo genetičke varijabilnosti, kao i nizak nivo genetičke struktuiranosti i diferencijacije među populacijama ispitivanog regiona. Najrelevantnije objašnjenje dobijenih rezultata predstavlja uticaj većeg broja introdukcija u ispitivano područje, u kombinaciji sa visokom stopom protoka gena između analiziranih populacija.

Nije detektovana redukcija genetičkog diverziteta populacija ispitivanog područja u odnosu na populacije Severne-Amerike, nativnog područja ove vrste, kao ni u odnosu na populacije Zapadne Evrope, koje su po poreklu starije od populacija ispitivanog regiona. Slična situacija je uočena i poređenjem sa populacijama Istočne Evrope.

Dobijeni podaci, zajedno sa strateškim položajem južnog dela Panonske nizije (između Zapadne i Istočne Evrope), kao i socio-ekonomskim uslovima ispitivanog područja, ukazuju da je introdukcija ambrozije u analiziranom području rezultat ne samo većeg broja introdukcija, nego i upliva genetičkog materijala iz različitih izvora, kako iz različitih pravaca Evrope, tako i iz nativnog područja.

Karakteristike samog područja Panonske nizije, koje ga čine pogodnim za introdukciju i naseljavanje ambrozije, kao i karakteristike ispitivane vrste, u kombinaciji sa detektovanim visokim genetičkim diverzitetom i intenzivnom razmenom genetičkog materijala među populacijama ambrozije analiziranog područja, ukazuje na postojanje predispozicija i potencijala ambrozije za rapidno širenje u području južnog dela Panonske nizije i šire.

Za razliku od populacija Panonske nizije, populacije peripanonskog prostora centralnog Balkana su pokazale niži nivo genetičkog diverziteta sa uočenom inter-populacionom diferencijacijom i struktuiranošću. Uočena je sukcesivna redukcija diverziteta u pravcu sever-jug ispitivanog područja. Ovi podaci ukazuju i na pravac širenja ambrozije na peripanonskom području, kao i na mogući model ekspanzije, u smislu da su južnije populacije nižeg genetičkog diverziteta posledica širenja propaguluma severnijih populacija ambrozije višeg genetičkog diverziteta. Međutim, detektovane F_{st} vrednosti, koje ukazuju na srednji nivo diferencijacije među analiziranim populacijama, genetičke distance uočene PCo analizom, kao i odvajanje populacija u posebne klastere, navode na indicije da je introdukcija u analizirano područje nešto kompleksnija, odnosno moguća posledica nezavisnih, odvojenih introdukcija.

Na osnovu poređenja genetičke varijabilnosti i diferencijacije populacija peripanonskog regiona sa potencijalnim izvornim populacijama sa područja Panonske nizije, utvrđena je redukcija diverziteta populacija peripanonskog područja u odnosu na panonski, dok su populacije peripanonskog područja pokazale veću struktuiranost u odnosu na detektovanu inter-populacionu diferencijaciju Panonskog regiona. Dobijeni podaci su potvrdili ranije nastanjivanje ambrozije u panonskom regionu u odnosu na peripanonski. Analiza strukture svih ispitivanih populacija je ukazala na njihovo zajedničko poreklo, obzirom da se individue analiziranih populacija nisu grupisale u odvojene klastere, osim populacija Kruševac i Leskovac koje su pokazale veću genetičku udaljenost u odnosu na ostale.

Testom pripadnosti, detektovane su potencijalne izvorne populacije individuama ambrozije sa područja peripanonskog prostora. Utvrđeno je da su individue u okviru jedne populacije peripanonskog prostora poreklom iz više populacija iz panonskog regiona, što je u skladu sa detektovanom slabom diferencijacijom izvornih populacija. Na nivou peripanonskog prostora, uočeno je da najveći udeo u formiranju analiziranih populacija imaju populacije Sevojno i Gruža. U kombinaciji sa geografskim položajem, utvrđeno je da su ove populacije najverovatniji izvor ostalih analiziranih populacija peripanonskog područja. Međutim, u pojedinim populacijama detektovan je i nešto veći uticaj ambrozije iz drugih pravaca Panonskog područja (iz pravca Severne Srbije i Rumunije), što potvrđuje uticaj nezavisnih, odvojenih introdukcija u formiranju populacija ambrozije na području peripanonskog prostora. Takođe, obzirom na prisustvo jedinstvenih alela u populacijama peripanonskog prostora, ne

može se isključiti ni uticaj neuzorkovanih populacija sa područja analiziranog regiona, kao ni populacija sa područja koji nije obuhvaćen u ovom istraživanju.

U svim analiziranim populacijama uočen je deficit heterozigota. Najverovatniji uzrok ovog deficita je prisustvo nultih alela u svim proučavanim populacijama. Obzirom na interpopulacionu diferencijaciju peripanonskog regiona, pored prisustva nultih alela, kao jedan od uzroka nastanka deficita heterozigota može se uzeti obzir i uticaj Valund efekta.

Ovo istraživanje predstavlja prvu detaljnu analizu genetičkog diverziteta i diferencijacije populacija *Ambrosia tremisiifolia* južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana. Ova saznanja doprinose rasvetljavanju procesa introdukcije i ekspanzije ispitivane invazivne vrste na ovom području Evrope. Dobijeni podaci mogu poslužiti boljem razumevanju uzroka i procesa uključenih u globalnu invaziju ove opasne alergijske biljke. Utvrđen visok potencijal u ekspanziji ambrozije i potencijalni pravci širenja u ispitivanom području, mogu da doprinesu predviđanju dalje potencijalne ekspanzije ove vrste, što bi moglo unaprediti mere kontrole i strategiju za suzbijanje širenja ambrozije.

9. LITERATURA

- Anačkov G., Bojčić S., Ječmenica V., Rat M., Igić R., Boža P. (2012) Morphological variability of invasive species *Ambrosia artemisiifolia* L. (Asterales, Asteraceae) on the important transit areas. Proceedings of International Symposium on Current Trends in Plant Protection. Belgrade, 27-37.
- Bagarozzi Jr. D.A., Travis J. (1998) Ragweed pollen proteolytic enzymes: possible roles in allergies in asthma. *Phytochemistry*, 47: 593-598.
- Bale J. (2011) Harmonization of regulations for invertebrate biocontrol agents in Europe: progress, problems and solutions. *Journal of Applied Entomology*, 135(7): 503-513.
- Barrett SCH, Richardson B.J. (1986) Genetic attributes of invading species. In: Groves R.H., Burdon J.J., (ed) *Ecology of Biological Invasions* Cambridge University Press, 21-33.
- Barrett SCH., Husband B.C. (1990) The genetics of plant migration and colonization. In: Brown A.H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. (ed) *Plant population genetics, breeding, and genetic resources*. SunderlandMassachusetts: Sinauer and Associates, 254-277.
- Barton N.H., Slatkin M. (1986) A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. *Heredity*, 56: 409-415.
- Bassett I.J., Crompton C.W. (1975) The biology of Canadian weeds. 11. *Ambrosia artemisiifolia* L. and *A. psilostachya* DC. *Canadian Journal of Plant Science*, 55: 463-476.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N., Bonhomme F. (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier, France. <http://kimura.univ-montp2.fr/genetix/>
- Bhargava A., Fuentes F.F. (2010) Mutational Dynamics of Microsatellites. *Molecular Biotechnology*, 44(3): 250-266.
- Bohonak A.J. (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *The Quarterly Review of Biology*, 74: 21-45.

- Bohonak, A. J. (2002) IBD (Isolation By Distance): a program for analyses of isolation by distance. *Journal of Heredity*, 93: 153-154.
- Borojevic K., Borojevic K. (2005) The transfer and history of “Reduced height genes” (Rhg) in wheat from Japan to Europe. *Journal of Heredity*, 96: 455-459.
- Boža P. (2011) Taxon: *Ambrosia artemisiifolia* L. 1753. [cited 2013 July 12]. In: Version 0.2beta. Anačkov G., Bjelić-Čabrilo O., Karaman I., Karaman M., Radenković S., Radulović S., Vukov D., Boža P. (ed) Lista invazivnih vrsta na području AP Vojvodine = List of invasive species in AP Vojvodina [Internet]. Department of Biology and Ecology, Novi Sad, Serbia [about 3 screens]. Available from: URL English.
- Boža P., Igić R., Anačkov G., Vukov D. (2006) Kompleksna istraživanja invazivne vrste *Ambrosia artemisiifolia* L. 1753. Zaštita vazduha i zdravlja, Zbornik radova, Institut zaštite, ekologije i informatike, Banja Luka, 39-45.
- Boža P., Mimica-Dukić N., Poljački M., Jovanović M., Stojanović S., Polić D., Borišev M. (2003) Pregled mogućih kontaktalergijskih biljaka u flori Vojvodine. Zbornik radova Prirodno-matematičkog fakulteta, serija za biologiju, 31-32: 5-25.
- Boža P., Radić J., Igić R., Vukov D., Anačkov G. (2002) Rod *Ambrosia* L. 1754 u Vojvodini. Biljni lekar, vanredni broj, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 92-100.
- Brandes D., Nitzsche J. (2007) Ecology, distribution and phytosociology of *Ambrosia artemisiifolia* L. in Central Europe. *Tuexenia*, 27: 167-194.
- Bremer K. (1994) *Asteraceae: Cladistics and Classification*. Timber Press, Portland, OR, USA.
- Brookfield J.F.Y. (1996) A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. *Molecular Ecology*, 5: 453-455.
- Buttenschon R.M., Waldispü H.L.S., Bohren C. (2009) Guidelines for management of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*. Available at: <http://www.EUPHRESCO.org> (last accessed 18 October 2010).
- Cavalli-Sforza L., Edwards A.W.F. (1967) Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Evolution*, 32: 550-570.
- Chakraborty R., De Andrade M., Daiger S.P., Budowle B. (1992) Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. *Annals of Human Genetics*, 56: 45-57.

- Chun Y.J., Fumanal B., Laitung B., Bretagnolle F. (2010) Gene flow and population admixture as the primary post-invasion processes in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) populations in France. *New Phytologist*, 185: 1100-1107.
- Chun Y.J., Fumanal B., Laitung B., Caullet C., Bretagnolle F. (2009) Eight microsatellite markers isolated from common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) and cross-amplification with herbarium specimens. *Molecular Ecology Resources*, 9(5): 1375-1379.
- Ciosi M., Miller N.J., Kim K.S., Giordano R., Estoup A., Guillemaud T. (2008) Invasion of Europe by the western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera*: multiple transatlantic introductions with various reductions of genetic diversity. *Molecular Ecology*, 17: 3614-3627.
- Csontos P., Vitalos M., Barina Z., Kiss L. (2010) Early distribution and spread of *Ambrosia artemisiifolia* in Central and Eastern Europe. *Botanica Helvetica*, 120: 75-78.
- Cunze S., Leiblein M.C., Tackenberg O. (2013) Range Expansion of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe Is Promoted by Climate Change. *Hindawi Publishing Corporation ISRN Ecology*, 1-9, doi.org/10.1155/2013/610126.
- DAISIE (2009) *Handbook of Alien Species in Europe*. Springer, Dordrecht, the Netherlands.
- De Lang W.J., Van Wilgen B.W. (2010) An economic assessment of the contribution of biological control to the management of invasive alien plants and to the protection of ecosystem services in South Africa. *Biological Invasions*, 12: 4113-4114.
- Dlugosch K.M., Parker I.M. (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, 17: 431-449.
- Earl D., von Holdt B. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361.
- Ellegren H. (2004) Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Reviews Genetics*, 5(6): 435-45.
- Ellstrand N.C., Schierenbeck K.A. (2000) Hybridization as a stimulus for the evolution of invasiveness in plants? *Proceedings of the national Academy of Sciences USA*, 97: 7043-7050.

- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) Arlequin (version 3.0): integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.
- Facon B., Genton B.J., Shykoff J., Jarne P., Estoup A., David P. (2006) A general eco-evolutionary framework for understanding bioinvasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 21: 130-135.
- Fan H., Chu J.Y. (2007) A brief review of short tandem repeat mutation. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 5: 7-14.
- Friedman J., Barrett S.C.H. (2008) High outcrossing in the annual colonizing species *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae). *Annals of Botany*, 101: 1303-1309.
- Fumal B., Chauvel B., Bretagnolle F. (2007a) Estimation of the pollen and seed production of common ragweed in Europe. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 14: 233-236.
- Fumal B., Chauvel B., Sabatier A., Bretagnolle F. (2007b) Variability and cryptic heteromorphism of *Ambrosia artemisiifolia* seeds: what consequences of its invasion in France? *Annals of Botany*, 100: 305-313.
- Fumal B., Girod C., Fried G., Bretagnolle F., Chauvel B. (2008) Can the large ecological amplitude of *Ambrosia artemisiifolia* explain its invasive success in France? *Weed Research*, 48: 349-359.
- Galzina N., Barić K., Šćepanović M., Goršić M., Ostojić Z. (2010) Distribution of Invasive Weed *Ambrosia artemisiifolia* L. in Croatia. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, 75(2): 75-81.
- Gaudeul M., Giraud T., Kiss L., Shykoff J.A. (2011) Nuclear and chloroplast microsatellites show multiple introductions in the worldwide invasion history of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*. *PLOS ONE open access*, 6(3): e17658.
- Gauvrit C., Chauvel B. (2010) Sensitivity of *Ambrosia artemisiifolia* to glufosinate and glyphosate at various developmental stages. *Weed Research*, 50: 503-510.

- Genton B.J., Shykoff A., Giraud T. (2005a) High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology*, 14: 4275-4285.
- Genton B.J., Joton O., Thévenet D., Fournier E., Blatrix R., Vautrin D., Soligna M., Giraud T. (2005b) Isolation of five polymorphic microsatellite loci in the invasive weed *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae) using an enrichment protocol. *Molecular Ecology Notes*, 5: 381-383.
- Gerber E., Schaffner U., Gassmann A., Hinz H.L., Seier M., Müller-Schärer H. (2011) Prospects for biological control of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe: learning from the past. *Weed Research*, 51(6): 559-573.
- GISD (2009) Global Invasive Species Database: *Ambrosia artemisiifolia*. Available at: <http://www.issg.org/database/species/distribution.asp?si=1125&fr=1&sts=sss&lang=EN> (last accessed 10 November 2009).
- Gladieux P., Giraud T., Kiss L., Genton B.J., Jonot O., Shykoff J.A. (2011) Distinct invasion sources of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) in Eastern and Western Europe. *Biological Invasions*, 13: 933-944.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (Version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995). Updated in 1 July 2010.
- Greuter W. (2006–2009) Compositae (pro parte majore). In: Compositae. Euro+Med Plantbase – The Information Resource for Euro-Mediterranean Plant Diversity (ed) Greuter W., Von Raab-Straube E. Available at: <http://www.emplantbase.org/home.html> (last accessed 19 May 2011).
- Grevstad F.S. (1999) Experimental invasions using biological control introductions: the influence of release size on the chance of population establishment. *Biological Invasions*, 1: 313-323.
- Guichoux E., Lagache L., Wagner S., Chaumeil P., Léger P., Lepais O., Lepoittevin C., Malausa T., Revardel E., Salin F., Petit R.J. (2011) Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, 11: 591-611.
- Hodgins K.A., Lai Z., Nurkowski K., Huang J., Rieseberg L.H. (2012) The molecular basis of invasiveness: differences in gene expression of native and introduced common

- ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) in stressful and benign environments. *Molecular Ecology*, 22: 2496-2510.
- Hodgins K.A., Rieseberg L.H. (2011) Genetic differentiation in life-history traits of introduced and native common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) populations. *Journal of evolutionary biology*, 1-19.
- Hyvonen T., Glemnitz M., Radics L., Hoffmann J. (2011) Impact of climate and land use type on the distribution of Finnish casual arable weeds in Europe. *Weed Research*, 51: 201-208.
- Jäger S. (2000) Ragweed (*Ambrosia*) sensitisation rates correlate with the amount of inhaled airborne pollen. A 14-year study in Vienna, Austria. *Aerobiologia*, 16: 149-153.
- Jakobsson M., Rosenberg N.A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801-1806.
- Janjić V., Vrbničanin S., Malidža G. (2011) Mogućnost suzbijanja ambrozije (*Ambrosia artemisiifolia* L.). *Biljni lekar/Plant Doctor XXXIX*, broj 1, YU ISSN 0354-6160, 44-54.
- Jávorka S. (1910): *Ambrosia artemisiifolia* L. Magyarországon. *BK*, 9: 303.
- Kalinowski S.T., Taper M.L. (2006) Maximum likelihood estimation of the frequency of null alleles at microsatellite loci. *Conservation Genetics*, 7: 991-995.
- Kanter U., Heller W., Durner J., Winkler J. B., Engel M., Behrendt H., Holzinger A., Braun P., Hauser M., Ferreira F., Mayer K., Pfeifer M., Ernst D. (2013) Molecular and Immunological Characterization of Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) Pollen after Exposure of the Plants to Elevated Ozone over a Whole Growing Season. *PLOS ONE* open access, 8(4): e61518.
- Karlsson S., Mork J. (2005) Deviation from HardyWeinberg equilibrium, and temporal instability in allele frequencies at microsatellite loci in a local population of Atlantic cod. *ICES Journal of Marine Science*, 62: 1588-1596.
- Kazinczi G., Béres I., Novák R., Bíró K., Pathy Z. (2008) Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*): A review with special regards to the results in Hungary. I Taxonomy, origin and distribution, morphology, life cycle and reproduction strategy. *Herbologia*, 9: 55-91.

- Kiss L., Beres I. (2006) Anthropogenic factors behind the recent population expansion of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in Eastern Europe: is there a correlation with political transitions? *Journal of Biogeography*, 33: 2154-2157.
- Kočiš Tubić N., Obreht D., Boža P., Vapa Lj. (2009) Microsatellite allelic variability in *Ambrosia artemisiifolia* L. populations in Vojvodina. Abstracts of the IV Congress of the Serbian Genetic Society, Tara, 1-5 June 2009, 137.
- Kočiš Tubić N., Obreht D., Djan M., Boža P. (2010) Genetic diversity of *Ambrosia artemisiifolia* (L.) in Serbia. Abstracts of the 11th International Symposium Interdisciplinary Regional Research, Szeged: Association for Multidisciplinary Research of the Hungary, Romania and Serbia, 13-15 October 2010.
- Kočiš Tubić N., Obreht D., Djan M., Boža P. (2011) Microsatellite variability of *Ambrosia artemisiifolia* L. in populations of Serbia and Croatia. Extended abstracts of the 3rd International Symposium on Environmental Weeds and Invasive Plants. Monte Verita, Ascona, Switzerland. Available from Internet <http://www.wsl.ch/epub/ewrs> Birmensdorf, Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research WSL. 2-7 October 2011.
- Kočiš Tubić N., Obreht D., Djan M., Boža P. (2012a) Genetic characterization of invading populations of *Ambrosia artemisiifolia* (common ragweed) in the Danube region. Abstracts of the II Symposium of Population and Evolutionary Genetics PEG2012. Belgrade, Serbia, 09-12 May 2012, 47.
- Kočiš Tubić N., Obreht D., Djan M., Veličković N., Boža P. (2012b) Inter- and intrapopulation genetic diversity of *Ambrosia artemisiifolia* L. in Banat area. Proceedings of the XIVth International Symposium "Young People and Multidisciplinary Research", Timișoara: Association for Multidisciplinary Research of the West Zone of Romania. 15-16 November 2012, 59-62.
- Kolbe J.J., Glor R.E., Rodriguez-Schettino L., Chamizo-Lara A., Larson A., Losos J.B. (2004) Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*, 431: 177-181.
- Konstantinović B. (2013) *Ambrosia artemisiifolia* L. - rezerve semena u zemljištu, klijavost, rasprostranjenost i suzbijanje. Doktorska disertacija, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

- Lai Z., Kane N.C., Kozik A., Hodgins K.A., Dlugosch K.M., Barker M.S., Matvienko M., Yu Q., Turner K.G., Pearl S.A., Bell G.D. M., Zou Y., Grassa C., Guggisberg A., Adams K.L., Anderson J.V., Horvath D.P., Kesseli R.V., Burke J.M., Michelmore R.W., Rieseberg L.H. (2012) Genomics of compositae weeds: EST libraries, microarrays, and evidence of introgression. *American Journal of Botany*, 99(2): 209-218.
- Lampe J.R., Russell O., Prickett R.O., Adamovic Lj.S. (1990) *Yugoslav-American Economic Relations Since World War II*. Duke University Press, USA.
- Lavergne S., Molofsky J. (2007) Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104: 3883-3888.
- Lazić L., Pavić D. (2003) *Klima Banata*. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za geografiju, turizam i hotelijerstvo, Novi Sad.
- Lee C.E. (2002) Evolutionary genetics of invasive species. *Trends in Ecology & Evolution*, 17: 386-391.
- Li X.-M., Liao W.-J., Wolfe L.M., Zhang D.-Y. (2012) No evolutionary shift in the mating system of North American *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae) following its introduction to China. *PLOS ONE open access*, 7(2): e31935.
- Makra L., Juhász M., Béczi R., Borsos E. (2005) The history and impacts of airborne *Ambrosia* (Asteraceae) pollen in Hungary. *Grana*, 44: 57-64.
- Maron J.L., Vilf M., Bommarco R., Elmendorf S., Beardsley P. (2004) Rapid evolution of an invasive plant. *Ecological Monographs*, 74: 261-280.
- Marshall T.C., Slate J., Kruuk L.E.B., Pemberton J.M. (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology*, 7: 639-655.
- Men Q.-L., Chen M.-H., Zhang Y.-L., Feng J.-N. (2013) Genetic structure and diversity of a newly invasive species, the codling moth, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae) in China. *Biological Invasions*, 15: 447-458.
- Milakovic I., Fiedler K., Karrer G. (2014) Management of roadside populations of invasive *Ambrosia artemisiifolia* by mowing. *Weed Research*, 54(3): 256-264.

- Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium (2009) Permanent genetic resources added to Molecular Ecology Resources database 1 January 2009-30 April 2009. *Molecular Ecology Resources*, 9: 1375-1429.
- Möller H., Spiren A., Svensson A., Gruvberger B., Hind-sen M., Bruze M. (2002) Contact Allergy to the Asteraceae Plant *Ambrosia artemisiifolia* L. (Ragweed) in Sesquiterpene Lactone Sensitive Patients in Southern Sweden. *Contact Dermatitis*, 47(3): 157-160.
- Muirhead J.R., Gray D.K., Kelly D.W., Ellis S.M., Heath D.D., et al. (2008) Identifying the source of species invasions: sampling intensity vs. genetic diversity. *Molecular Ecology*, 17: 1020-1035.
- Nei M., Maruyama T., Chakraborty R. (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, 29: 1-10.
- Novak S.J. (2007) The role of evolution in the invasion process. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 104: 3671-36.
- Padmalatha K., Prasad M.N.V. (2006) Optimization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of selected medicinal and aromatic plants of conservation concern from Peninsular India. *African Journal of Biotechnology*, 5(3): 230-234.
- Paetkau D., Slade R., Burden M., Estoup A. (2004) Genetic assignment methods for direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology*, 13: 55-65.
- Pascual M., Chapuis M.P., Mestres F. et al. (2007) Introduction history of *Drosophila subobscura* in the New World: a microsatellite based survey using ABC methods. *Molecular Ecology*, 16: 3069-3083.
- Peakall R., Smouse P. E. (2012) GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research – an update. *Bioinformatics*, 28: 2537-2539. Freely available as an open access article from: <http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/28/19/2537>.
- Petit R.J. (2004) Biological invasions at the gene level. *Diversity and Distributions*, 10: 159–165.
- Piry S., Alapetite A., Cornuet J.M., Paetkau D., Baudouin L. et al. (2004) GeneClass2: a software for genetic assignment and first generation migrants detection. *Journal of Heredity*, 95: 536-539.

- Piry S., Luikart G., Cornuet J.M. (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90: 502-503.
- Prentis P.J., Sigg D.P., Raghu S., Dhileepan K., Pavasovic A. et al. (2009) Understanding invasion history: genetic structure and diversity of two globally invasive plants and implications for their management. *Diversity and Distributions*, 15: 822-830.
- Pritchard J.K., Stephens M., Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Rannala B., Mountain J.L. (1997) Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94: 9197-9201.
- Rice W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Rosenberg N.A. (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4: 137-138.
- Rosenthal D.M., Ramakrishnan A.P., Cruzan M. B. (2008) Evidence for multiple sources of invasion and intraspecific hybridization in *Brachypodium sylvaticum* (Hudson) Beauv. in North America. *Molecular Ecology*, 17: 4657-4669.
- Rousset F. (1997) Genetic differentiation and estimation of gene flow from F-statistics under isolation by distance. *Genetics*, 145: 1219-1228.
- Rousset F. (2008) GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8: 103-106.
- Rybníček O., Jäger S. (2001) *Ambrosia* (Ragweed) in Europe. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 13: 60-66.
- Sakai A.K., Allendorf F.W., Holt J.S., Lodge D.M., Molofsky J. et al. (2001) The population biology of invasive species. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 32: 305-332.
- Sambrook J.F., Russel D.W. (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd Edition. Cold Laboratory Press, USA.
- Selkoe K.A., Toonen R.J. (2006): Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615-629.
- Shaw R.H., Tanner R., Djeddour D., Cortat G. (2011) Classical biological control of *Fallopia japonica* – lessons for Europe. *Weed Research*, 51(6): 552-558.

- Sheppard A.W., Shaw R.H., Sforza R. (2006) Top 20 environmental weeds for classical biological control in Europe: a review of opportunities, regulations and other barriers to adoption. *Weed Research*, 46: 93-117.
- Šikoparija B, Skjøth C.A., Radišić P., Stjepanović B, Hrga I. et al. (2012) Aerobiology data used for producing inventories of invasive plants. *Proceedings of International Symposium: Current Trends in Plant Protection*, 7-14, UDK:574(497.113)632.51:582.998.1(497.113).
- Šikoparija B., Radišić P., Pejak T., Šimić S. (2006) Airborne grass and ragweed pollen in the southern Pannonian Valley – consideration of rural and urban environment. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 13: 263-266.
- Šikoparija B., Smith M., Skjøth C.A., Radišić P., Milkovska S., Šimić S., Brandt J. (2009) The Pannonian plain as a source of *Ambrosia* pollen in the Balkans. *International Journal of Biometeorology*, 53: 263-272.
- Slatkin M. (1985a) Rare alleles as indicator of gene flow. *Evolution*, 39: 53-65.
- Slatkin M. (1985b) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 16: 393-430.
- Slatkin M. (1993) Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations. *Evolution*, 47: 264-279.
- Slatkin M., Takahata N. (1985) The average frequency of private alleles in a partially isolated population. *Theoretical Population Biology*, 28: 314-331.
- Slavnić Ž. (1953) Contribution to the flora of our Danube region. *Bulletin of the biological section, Croatian Society of Natural Sciences, Zagreb*.
- Soó R. (1970) *A magyar flóra és vegetáció Rendszertani növényföldrajzi kézikönyve, IV.* Akadémia Kiadó. Budapest.
- Stace (2010) *Botanical Society of the British Isles, Species Accounts* <http://sppaccounts.bsbi.org.uk/content/ambrosia-artemisiifolia>.
- Stefanic E., Kovacevic V., Lazanin Z. (2005) Airborne ragweed pollen concentration in North-Eastern Croatia and its relationship with meteorological parameters. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 12: 75-79.
- Stevanović V., Jovanović S., Lakušić D., Niketić M. (1999) Characteristics of the flora of Serbia and its Phytogeographical Division. In: Stevanović V. (ed) *The Red Data Book*

- of Flora of Serbia 1 (Extinct and critically endangered taxa). Ministry of Environment of the Republic of Serbia, University of Belgrade, Faculty of Biology, Institution for Protection of Nature of the Republic of Serbia, Belgrade, 393-399.
- Suarez A.V., Tsutsui N.D. (2008) The evolutionary consequences of biological invasions. *Molecular Ecology*, 17: 351-360.
- Tagliatalata-Scafati O., Pollastro F., Minassi A., Chianese G., De Petrocellis L., Di Marzo V., and Appendino G. (2012) Sesquiterpenoids from Common Ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.), an Invasive Biological Polluter. *European Journal of Organic Chemistry*, 27: 5162-5170.
- Takhtajan A. (1986) *Floristic Regions of the World*. University of California Press, Berkeley and Los Angeles-London.
- Taramarcz P., Lambelet C., Clot B., Keimer C., Hauser C. (2005) Ragweed (*Ambrosia*) progression and its health risks: will Switzerland resist this invasion? *Swiss Medical Weekly*, 135: 538-548.
- Thuillet A.C., Bru D., David J., Roumet P., Santoni S., et al. (2002) Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in Durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp. durum Desf. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 122-125.
- Tsutsui N.D., Suarez A.V., Holway D.A., Case T.J. (2000) Reduced genetic variation and the success of an invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 97: 5948-5953.
- Van Oosterhout C., Hutchinson W.F., Wills D.P.M., Shipley P. (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4: 535-538.
- Vrbničanin S., Janjić V. (2011) Ambrozija (*Ambrosia artemisiifolia* L.): poreklo, biologija, ekologija i genetička varijabilnost. *Biljni lekar/Plant Doctor XXXIX*, 1: 36-44.
- Ward S. (2006) Genetic analysis of invasive plant populations at different spatial scales. *Biological Invasions*, 8: 541-552.
- Watts P.C., Keat S., Thompson D.J. (2010) Patterns of spatial genetic structure and diversity at the onset of a rapid range expansion: colonization of the UK by the small red-eyed damselfly *Erythromma viridulum*. *Biological Invasions*, 12: 3887-3903.

- Wayne P., Foster S., Connolly J., Bazzaz F., Epstein P. (2002) Production of allergenic pollen by ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is increased in CO₂-enriched atmospheres. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 8: 279-282.
- Weir B.S., Cockerham C.C. (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.
- Whitlock M.C., McCauley D.E. (1999) Indirect measures of gene flow and migration: $F_{ST} \neq 1/(4Nm + 1)$. *Heredity*, 82: 117-125.
- Wright S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323-354.
- Wright S. (1978) *Evolution and genetics of populations*. University of Chicago, Chicago.
- Yamamichi M., Innan H. (2012) Estimating the migration rate from genetic variation data. *Heredity*, 108: 362-363.
- Ziska L.H., Gebhard D.E., Frenz D.A., Faulkner S., Singer B.D., Straka J.G. (2003) Cities as harbingers of climate change: common ragweed, urbanization, and public health. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2): 290-295.

Prilog 1

Tabela 12. Vrednosti verovatnoće pripadnosti individua populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana u populacijama južnog dela Panonske nizije

	SR-Kul	CR-Kut	SR-Som	SR-Indj	RO-San	BH-Der	SR-Djal	SR-Kik	SR-Vrs	CR-Lug	CR-Ila	CR-Ost	HU-Baj	SR-Sab	SR-NS	SR-Sme
SR-Neg																
Individua 1	0,017	0,162	0,103	0,082	0,079	0,057	0,054	0,186	0,05	0,063	0,1	0,006	0,02	0,037	0	0,006
Individua 2	0,015	0,112	0,08	0,026	0,153	0,029	0	0,387	0,008	0,109	0,098	0,076	0,065	0,27	0,133	0
Individua 3	0,001	0,012	0	0,017	0,031	0,007	0,015	0,004	0	0,111	0,026	0	0,051	0,001	0	0,002
Individua 4	0,048	0,101	0,056	0,039	0,354	0,312	0,002	0,042	0,03	0,118	0,012	0,009	0,087	0,001	0,011	0,002
Individua 5	0,484	0,252	0,27	0,155	0,464	0,137	0,027	0,208	0,179	0,357	0,204	0,1	0,222	0,002	0,002	0,008
Individua 6	0,11	0,114	0,009	0,021	0,076	0,046	0,061	0,047	0,014	0,033	0,023	0,007	0,102	0,001	0,004	0
Individua 7	0,042	0,634	0,231	0,047	0,537	0,184	0,201	0,101	0,036	0,012	0,013	0,019	0,195	0,016	0,003	0,016
Individua 8	0,131	0,413	0,127	0,202	0,88	0,53	0,029	0,256	0,415	0,547	0,239	0,114	0,44	0,083	0,009	0
Individua 9	0,462	0,895	0,147	0,823	0,053	0,201	0,171	0,04	0,035	0,043	0,072	0,172	0,037	0,095	0,037	0,047
Individua 10	0,443	0,595	0,591	0,721	0,378	0,401	0,041	0,319	0,033	0,504	0,051	0,31	0,209	0,465	0,541	0,268
Individua 11	0,189	0,076	0,072	0,086	0,328	0	0,019	0,065	0,001	0,02	0,008	0,037	0,02	0,16	0	0,004
Individua 12	0,14	0,203	0,21	0,029	0,354	0,424	0,038	0,346	0,024	0,428	0,085	0,112	0,41	0,333	0,006	0,158
Individua 13	0,03	0,175	0,08	0,154	0,36	0,027	0,008	0,255	0,005	0,165	0,009	0,02	0,116	0,01	0,011	0
Individua 14	0,079	0,176	0,077	0,137	0,122	0,016	0,015	0,054	0	0,007	0,005	0,01	0,059	0,022	0,012	0,011
Individua 15	0,261	0,086	0,048	0,039	0,261	0,015	0,007	0,03	0,124	0,021	0,11	0,07	0,037	0,01	0	0,038
Individua 16	0,22	0,406	0,1	0,082	0,138	0,038	0,015	0,229	0,042	0,098	0,072	0,083	0,126	0,082	0,032	0
Individua 17	0,007	0,008	0,001	0,047	0,012	0,008	0	0,004	0,059	0,015	0,005	0,011	0,007	0,01	0	0,026
Individua 18	0,008	0,075	0,049	0,004	0,012	0,04	0,003	0,006	0,011	0,098	0,004	0,007	0,037	0,033	0,006	0,006
Individua 19	0,052	0,181	0,042	0,229	0,346	0,028	0,115	0,134	0,07	0,097	0,046	0,009	0,035	0,01	0	0
Individua 20	0,13	0,088	0,149	0,381	0,099	0,049	0,016	0,049	0,005	0,015	0,004	0,043	0,055	0,033	0,017	0,011
Individua 21	0,111	0,027	0,112	0,144	0,089	0,008	0,003	0,282	0,004	0,011	0,008	0	0,014	0,01	0,007	0
Individua 22	0,171	0,423	0,305	0,156	0,196	0,372	0,054	0,161	0,003	0,087	0,023	0,046	0,219	0,318	0,057	0,139
Srednja vrednost	0,143	0,237	0,130	0,165	0,242	0,133	0,041	0,146	0,052	0,134	0,055	0,057	0,116	0,091	0,0403	0,034
SR-Les																
Individua 1	0,153	0,302	0,184	0,279	0,343	0,029	0,053	0,035	0	0,025	0,013	0,01	0,102	0,001	0	0,005
Individua 2	0,497	0,467	0,631	0,595	0,103	0,095	0,397	0,528	0,095	0,538	0,246	0,052	0,077	0,032	0,024	0,06
Individua 3	0,544	0,197	0,456	0,183	0,074	0,058	0,014	0,063	0,197	0,504	0,109	0,049	0,28	0,032	0,012	0,163
Individua 4	0,531	0,555	0,273	0,148	0,186	0,07	0,078	0,09	0,118	0,652	0,109	0,058	0,022	0,036	0	0,078
Individua 5	0,117	0,165	0,067	0,088	0,027	0,01	0,007	0,013	0,025	0,332	0,048	0,131	0,117	0,104	0,019	0,017
Individua 6	0,573	0,221	0,395	0,378	0,186	0,048	0,157	0,173	0,095	0,483	0,147	0,114	0,072	0,016	0	0,076
Individua 7	0,158	0,019	0,148	0,125	0,036	0,03	0,006	0,008	0,026	0,25	0,051	0,033	0,045	0,001	0	0,025

Individua 8	0,052	0,523	0,075	0,361	0,356	0,122	0,084	0,553	0,031	0,092	0,042	0,077	0,316	0,008	0	0,037
Individua 9	0,088	0,142	0,445	0,437	0,398	0,302	0,343	0,755	0,068	0,153	0,129	0,021	0,073	0,014	0,006	0,071
Individua 10	0,461	0,302	0,36	0,402	0,331	0,043	0,345	0,631	0,023	0,073	0,129	0,013	0,027	0,003	0	0,002
Individua 11	0,287	0,406	0,063	0,589	0,065	0,406	0,068	0,038	0,015	0,282	0,045	0,01	0,024	0,022	0	0,074
Individua 12	0,165	0,4	0,019	0,156	0,013	0,043	0,075	0,003	0,005	0,105	0,008	0,007	0,001	0,032	0	0,002
Individua 13	0,402	0,359	0,149	0,212	0,137	0,059	0,116	0,063	0,062	0,531	0,097	0,208	0,043	0,03	0,023	0,137
Individua 14	0,49	0,505	0,689	0,38	0,191	0,074	0,608	0,433	0,188	0,47	0,317	0,294	0,212	0,043	0,021	0,134
Individua 15	0,237	0,612	0,1	0,502	0,302	0,241	0,042	0,101	0,007	0,011	0,057	0,131	0,057	0,036	0,004	0,331
Individua 16	0,113	0,471	0,111	0,328	0,324	0,269	0,081	0,021	0,024	0,033	0,086	0,162	0,148	0,083	0	0,147
Individua 17	0,066	0,247	0,324	0,176	0,597	0,44	0,094	0,43	0,039	0,138	0,072	0,061	0,244	0,001	0	0,084
Individua 18	0,058	0,084	0,02	0,028	0,005	0,041	0,007	0,03	0,009	0,016	0,004	0,038	0,083	0,008	0	0,011
Individua 19	0,478	0,539	0,214	0,098	0,155	0,034	0,106	0,087	0,137	0,513	0,059	0,187	0,048	0,071	0,008	0,087
Individua 20	0,18	0,421	0,264	0,232	0,416	0,08	0,042	0,37	0,126	0,202	0,053	0,261	0,539	0,026	0,007	0,193
Individua 21	0,082	0,338	0,082	0,211	0,246	0,297	0,104	0,185	0,011	0,1	0,15	0,174	0,192	0,011	0	0,162
Individua 22	0,184	0,448	0,873	0,18	0,176	0,057	0,176	0,172	0,031	0,14	0,313	0,176	0,209	0,03	0	0,108
Srednja vrednost	0,269	0,351	0,270	0,277	0,212	0,129	0,136	0,217	0,060	0,256	0,104	0,103	0,133	0,029	0,006	0,091
SR-Gru																
Individua 1	0,138	0,137	0,08	0,009	0,019	0,077	0,009	0,112	0,064	0,385	0,206	0,026	0,305	0,03	0	0,011
Individua 2	0,009	0,038	0,002	0,002	0,013	0	0,001	0	0	0,021	0	0,01	0,13	0,01	0,003	0,07
Individua 3	0,05	0,377	0,112	0,023	0,257	0,165	0,036	0,128	0,051	0,26	0,182	0,011	0,127	0,234	0,078	0,287
Individua 4	0,002	0,197	0,037	0,064	0,01	0,005	0,053	0,082	0,038	0,028	0,034	0,191	0,02	0,104	0	0,002
Individua 5	0,227	0,717	0,312	0,064	0,304	0,343	0,343	0,474	0,118	0,117	0,277	0,078	0,65	0,008	0,008	0,188
Individua 6	0,079	0,451	0,16	0,055	0,047	0,064	0,169	0,297	0,124	0,427	0,217	0,174	0,099	0,259	0	0,079
Individua 7	0,013	0,148	0,193	0,203	0,094	0,164	0,007	0,001	0	0,16	0,186	0,208	0,305	0,054	0,012	0,048
Individua 8	0,089	0,034	0,005	0	0,082	0,192	0,01	0,06	0,024	0,075	0,112	0,005	0,206	0,036	0	0
Individua 9	0,002	0,053	0,004	0,096	0,001	0	0,015	0,001	0	0,047	0,011	0,01	0,031	0,001	0	0
Individua 10	0,011	0,143	0,007	0	0,001	0,014	0,002	0,124	0,005	0,042	0,009	0,007	0,001	0	0	0,001
Individua 11	0,009	0,063	0,157	0,037	0,019	0,037	0,003	0,016	0,043	0,235	0,041	0,009	0,019	0,044	0	0,003
Individua 12	0,088	0,293	0,373	0,121	0,624	0,136	0,007	0,048	0,008	0,515	0,072	0,211	0,208	0,054	0	0,042
Individua 13	0,015	0,035	0,009	0,004	0,082	0,049	0,018	0,016	0,029	0,051	0,033	0	0,039	0,001	0	0
Individua 14	0,115	0,155	0,417	0,118	0,211	0,098	0,014	0,044	0,059	0,068	0,147	0,162	0,568	0,024	0,207	0,021
Individua 15	0,329	0,128	0,46	0,052	0,081	0,063	0,084	0,014	0,13	0,104	0,066	0,042	0,302	0,076	0	0,006
Individua 16	0,276	0,729	0,367	0,093	0,329	0,251	0,279	0,255	0,194	0,109	0,046	0,322	0,209	0,388	0,028	0,04
Individua 17	0,013	0,302	0,19	0,287	0,564	0,184	0,013	0,021	0,014	0,121	0,139	0,022	0,217	0,052	0	0,058
Individua 18	0,081	0,423	0,103	0,266	0,069	0,428	0,15	0,065	0,055	0,251	0,01	0,356	0,19	0,025	0	0,003
Individua 19	0,002	0,027	0,015	0	0	0,006	0	0,001	0,005	0,001	0,023	0	0,015	0,001	0	0

Individua 20	0,165	0,259	0,334	0,144	0,094	0,053	0,169	0,151	0,167	0,56	0,187	0,491	0,206	0,176	0,023	0,072
Individua 21	0,33	0,379	0,642	0,334	0,482	0,447	0,409	0,068	0,096	0,216	0,042	0,181	0,648	0,2	0,02	0,085
Individua 22	0,197	0,329	0,08	0,142	0,094	0,217	0,058	0,024	0,003	0,274	0,109	0,01	0,042	0,31	0,025	0,017
Srednja vrednost	0,102	0,246	0,184	0,096	0,158	0,136	0,084	0,091	0,056	0,185	0,098	0,115	0,206	0,095	0,018	0,047
SR-Zlt																
Individua 1	0,191	0,363	0,601	0,431	0,622	0,059	0,148	0,062	0,047	0,382	0,151	0,077	0,057	0,528	0,012	0,052
Individua 2	0,075	0,363	0,292	0,037	0,082	0,057	0,042	0,011	0,001	0,004	0,025	0,048	0,146	0,009	0,005	0
Individua 3	0,027	0,097	0,112	0,026	0,018	0,171	0,016	0,003	0,009	0,066	0,038	0,084	0,192	0,004	0,009	0,003
Individua 4	0,263	0,053	0,053	0,005	0,159	0,102	0,018	0,016	0,046	0,015	0,039	0,022	0,062	0,024	0,006	0,023
Individua 5	0,69	0,181	0,688	0,055	0,448	0,433	0,015	0,325	0,139	0,577	0,276	0,123	0,048	0,11	0,081	0,086
Individua 6	0,181	0,137	0,584	0,015	0,508	0,156	0,054	0,163	0,137	0,064	0,048	0,038	0,042	0,032	0,003	0,039
Individua 7	0,343	0,829	0,355	0,427	0,619	0,631	0,32	0,571	0,168	0,112	0,114	0,862	0,035	0,153	0,006	0,548
Individua 8	0,442	0,287	0,494	0,262	0,311	0,134	0,12	0,37	0,12	0,204	0,202	0,038	0,117	0,176	0,006	0,095
Individua 9	0,43	0,217	0,164	0,125	0,214	0,038	0,068	0,038	0,011	0,011	0,03	0,019	0,042	0,059	0	0,063
Individua 10	0,009	0,144	0,27	0,005	0,042	0,195	0,145	0,003	0,003	0,029	0,386	0,342	0,033	0,047	0	0
Individua 11	0,497	0,349	0,38	0,113	0,345	0,464	0,245	0,127	0,033	0,047	0,179	0,077	0,156	0,043	0,092	0,017
Individua 12	0,091	0,011	0,011	0,039	0,004	0	0	0,003	0	0,003	0,004	0,005	0,143	0,022	0	0
Individua 13	0,075	0,034	0,305	0,112	0,131	0,025	0,053	0,151	0,007	0,335	0,041	0,026	0,065	0,01	0,028	0,017
Individua 14	0,007	0,254	0,081	0,051	0,024	0,154	0,039	0,006	0,024	0,42	0,164	0,445	0,191	0,176	0,074	0
Individua 15	0,062	0,754	0,225	0,323	0,034	0,102	0,29	0,205	0,136	0,143	0,081	0,459	0,055	0,099	0	0,058
Individua 16	0,145	0,119	0,083	0,055	0,082	0,06	0,091	0,016	0,131	0,157	0,064	0,08	0,022	0,001	0	0,039
Individua 17	0,133	0,259	0,042	0,116	0,357	0,073	0,015	0,003	0,016	0,054	0,008	0,012	0,086	0,083	0	0,004
Individua 18	0,015	0,119	0,112	0,059	0,092	0,059	0,062	0,016	0	0,012	0,039	0,113	0,015	0,137	0,049	0,011
Individua 19	0,76	0,097	0,224	0,088	0,161	0,492	0,116	0,439	0,291	0,231	0,044	0,006	0,62	0,095	0,021	0,003
Individua 20	0,189	0,046	0,44	0,081	0,084	0,044	0,02	0,079	0,054	0,03	0,004	0	0,015	0,006	0,013	0,06
Individua 21	0,234	0,467	0,601	0,176	0,675	0,155	0,252	0,197	0,085	0,053	0,028	0,033	0,048	0,004	0	0
Individua 22	0,203	0,416	0,209	0,496	0,454	0,157	0,183	0,31	0,378	0,11	0,034	0,578	0,001	0,099	0,006	0,54
Srednja vrednost	0,230	0,254	0,287	0,141	0,248	0,171	0,105	0,141	0,083	0,139	0,091	0,158	0,099	0,087	0,0187	0,075
SR-Sev																
Individua 1	0,525	0,268	0,173	0,112	0,105	0,18	0,082	0,293	0,023	0,553	0,21	0,014	0,055	0,054	0,101	0,084
Individua 2	0,225	0,26	0,039	0,165	0,385	0,031	0,149	0,117	0,033	0,021	0,03	0,241	0,022	0,009	0	0
Individua 3	0,171	0,198	0,111	0,165	0,093	0,355	0,029	0,315	0,024	0,409	0,197	0,011	0,031	0,101	0,028	0,043
Individua 4	0,013	0,251	0,124	0,193	0,038	0,117	0	0,127	0,001	0,039	0,009	0	0,02	0,03	0	0,037
Individua 5	0,307	0,1	0,042	0,043	0,358	0,345	0,003	0,044	0,071	0,375	0,054	0,216	0,05	0,016	0	0,042
Individua 6	0,375	0,365	0,373	0,31	0,208	0,328	0,016	0,206	0,007	0,287	0,112	0,182	0,177	0,153	0,006	0,002
Individua 7	0,07	0,091	0,002	0,039	0,038	0,013	0,03	0,005	0,034	0,044	0,013	0,01	0,027	0,001	0	0,004

Individua 8	0,072	0,034	0,078	0,134	0,001	0,087	0,004	0,01	0,021	0,128	0,024	0,006	0,063	0,007	0	0,008
Individua 9	0,559	0,498	0,29	0,36	0,264	0,314	0,214	0,279	0,037	0,154	0,569	0,018	0,02	0,03	0	0,087
Individua 10	0,196	0,059	0,141	0,124	0,038	0,031	0,035	0,405	0,003	0,124	0,032	0,002	0,007	0,045	0,035	0
Individua 11	0,082	0,187	0,139	0,088	0,246	0,016	0,09	0,375	0,059	0,129	0,096	0,077	0,057	0,008	0,034	0
Individua 12	0,042	0,229	0,007	0,06	0,17	0,01	0,299	0,03	0,005	0,034	0,071	0,062	0,138	0,019	0	0,057
Individua 13	0,088	0,411	0,085	0,1	0,079	0,318	0,141	0,26	0,052	0,216	0,082	0,096	0,143	0,052	0,225	0,051
Individua 14	0,015	0,078	0,048	0,144	0,119	0,433	0,018	0,051	0,024	0,245	0,052	0,381	0,292	0,291	0	0
Individua 15	0,302	0,77	0,063	0,106	0,203	0,08	0,198	0,375	0,024	0,118	0,094	0	0,02	0,043	0,086	0,006
Individua 16	0,529	0,358	0,118	0,859	0,546	0,108	0,007	0,163	0,212	0,56	0,028	0,458	0,113	0,235	0	0,038
Individua 17	0,663	0,42	0,702	0,263	0,387	0,197	0,164	0,831	0,1	0,183	0,21	0,02	0,208	0,282	0,006	0,017
Individua 18	0,307	0,226	0,709	0,143	0,275	0,582	0,425	0,476	0,138	0,509	0,194	0,333	0,281	0,015	0	0,016
Individua 19	0,008	0,086	0,173	0,226	0,11	0,01	0,009	0,065	0,008	0,408	0,071	0,201	0,263	0,016	0,109	0,011
Individua 20	0,002	0,056	0,08	0,039	0,002	0,02	0,002	0	0	0,005	0	0	0,01	0,001	0	0
Individua 21	0,078	0,174	0,064	0,037	0,027	0,016	0,001	0,029	0,005	0,118	0,013	0,186	0,014	0,003	0	0,274
Individua 22	0,043	0,085	0,008	0,001	0,142	0,024	0	0,011	0,003	0,005	0,001	0,008	0,012	0	0	0,001
Srednja vrednost	0,212	0,236	0,162	0,169	0,174	0,164	0,087	0,203	0,040	0,212	0,098	0,115	0,092	0,064	0,029	0,035
SR-Kru																
Individua 1	0,205	0,696	0,08	0,209	0,21	0,48	0,008	0,182	0,216	0,229	0,043	0,021	0,007	0,286	0	0,102
Individua 2	0,21	0,64	0,058	0,204	0,21	0,494	0,009	0,183	0,223	0,241	0,049	0,021	0,006	0,315	0,004	0,112
Individua 3	0,2	0,343	0,286	0,259	0,079	0,028	0,098	0,453	0,02	0,453	0,267	0,048	0,09	0,212	0,245	0,031
Individua 4	0,714	0,886	0,81	0,395	0,334	0,376	0,508	0,382	0,248	0,685	0,158	0,137	0,417	0,498	0,515	0,631
Individua 5	0,122	0,218	0,103	0,034	0,07	0,055	0,406	0,221	0,007	0,005	0,402	0,078	0,093	0,001	0,028	0
Individua 6	0,217	0,294	0,332	0,154	0,322	0,105	0,042	0,078	0,014	0,015	0,071	0,02	0,255	0,036	0,006	0,003
Individua 7	0,016	0,056	0,002	0,004	0,008	0,01	0,003	0,001	0,006	0,001	0	0	0,019	0,088	0	0
Individua 8	0,16	0,33	0,108	0,175	0,028	0,101	0,195	0,197	0,256	0,228	0,038	0,15	0,14	0,085	0,067	0,092
Individua 9	0,302	0,18	0,181	0,039	0,252	0,129	0,089	0,047	0,069	0,025	0,017	0,172	0,56	0,089	0,362	0,068
Individua 10	0,066	0,053	0,099	0,085	0,065	0,02	0,023	0,249	0,043	0,068	0,119	0,235	0,099	0,036	0,028	0,136
Individua 11	0,183	0,061	0,048	0,056	0,041	0,059	0,053	0,068	0,016	0,33	0,009	0,065	0,356	0,304	0,017	0,063
Individua 12	0,234	0,205	0,13	0,127	0,28	0,111	0,122	0,226	0,12	0,216	0,209	0,011	0,194	0,16	0,27	0,059
Individua 13	0,322	0,137	0,299	0,104	0,082	0,064	0,178	0,232	0,145	0,146	0,224	0,01	0,325	0,04	0,012	0,095
Individua 14	0,058	0,167	0,026	0,18	0,156	0,131	0,057	0,113	0,185	0,043	0,034	0,089	0,188	0,043	0	0,026
Individua 15	0,14	0,339	0,305	0,349	0,155	0,04	0,022	0,375	0,024	0,15	0,211	0,01	0,264	0,199	0,076	0,301
Individua 16	0,228	0,253	0,305	0,416	0,257	0,163	0,007	0,608	0,009	0,534	0,091	0,028	0,108	0,176	0,098	0,004
Individua 17	0,053	0,14	0,04	0,204	0,1	0,102	0	0,115	0,01	0,063	0,033	0,007	0,427	0,022	0,012	0,011
Individua 18	0,022	0,119	0,063	0,211	0,025	0,045	0,007	0,596	0,008	0,202	0,023	0,01	0,194	0,109	0,181	0,042
Individua 19	0,192	0,236	0,37	0,265	0,137	0,168	0,082	0,355	0,064	0,405	0,35	0,216	0,402	0,195	0,021	0,136

Individua 20	0,109	0,197	0,086	0,43	0,031	0,01	0,002	0,127	0,014	0,129	0,143	0,009	0,037	0,03	0,093	0,026
Individua 21	0,097	0,095	0,161	0,159	0,133	0,105	0,088	0,396	0,067	0,082	0,181	0,004	0,138	0,022	0,103	0,055
Individua 22	0,398	0,277	0,508	0,611	0,415	0,378	0,208	0,302	0,061	0,021	0,033	0,01	0,024	0,063	0	0,068
Srednja vrednost	0,193	0,269	0,2	0,212	0,154	0,144	0,100	0,250	0,083	0,194	0,123	0,061	0,197	0,137	0,097	0,094

Tabela 13. Vrednosti verovatnoće pripadnosti individua populacija peripanonskog prostora centralnog Balkana u svim analiziranim populacijama

	južni deo Panonske nizije																peripanonski prostor					
	SR-Kul	CR-Kut	SR-Som	SR-Indj	RO-San	BH-Der	SR-Djal	SR-Kik	SR-Vrs	CR-Lug	CR-Ila	CR-Ost	HU-Baj	SR-Sab	SR-NS	SR-Sme	SR-Les	SR-Gru	SR-Zla	SR-Sev	SR-Kru	
SR-Neg																						
Individua 1	0,032	0,139	0,102	0,064	0,082	0,067	0,061	0,197	0,053	0,063	0,095	0,006	0,011	0,044	0	0,009	0,001	0,200	0	0,005	0	
Individua 2	0,027	0,096	0,079	0,019	0,155	0,031	0,002	0,402	0,014	0,105	0,094	0,071	0,058	0,257	0,137	0	0	0,039	0	0,014	0	
Individua 3	0,002	0,008	0	0,012	0,030	0,005	0,017	0,007	0	0,109	0,020	0	0,044	0	0	0,006	0	0,014	0	0,016	0	
Individua 4	0,059	0,092	0,064	0,032	0,353	0,319	0,003	0,050	0,040	0,117	0,009	0,009	0,074	0,001	0,010	0,006	0	0,268	0,002	0,153	0	
Individua 5	0,486	0,258	0,269	0,139	0,485	0,144	0,030	0,216	0,174	0,338	0,202	0,093	0,214	0,001	0,002	0,005	0,013	0,093	0,001	0,520	0	
Individua 6	0,12	0,097	0,015	0,014	0,079	0,051	0,064	0,056	0,021	0,040	0,016	0,008	0,089	0	0,003	0,003	0	0,010	0,003	0,046	0,003	
Individua 7	0,055	0,633	0,236	0,036	0,532	0,192	0,204	0,105	0,042	0,012	0,012	0,022	0,183	0,013	0,002	0,016	0	0,293	0,001	0,005	0	
Individua 8	0,146	0,410	0,134	0,188	0,865	0,515	0,035	0,256	0,430	0,548	0,262	0,107	0,424	0,091	0,008	0,001	0	0,585	0,040	0,577	0,001	
Individua 9	0,443	0,888	0,150	0,842	0,055	0,210	0,180	0,047	0,042	0,045	0,066	0,172	0,031	0,10	0,037	0,038	0,002	0,218	0,014	0,285	0,022	
Individua 10	0,429	0,594	0,604	0,734	0,375	0,409	0,046	0,335	0,039	0,494	0,044	0,316	0,203	0,476	0,545	0,266	0,002	0,096	0,001	0,653	0,214	
Individua 11	0,192	0,075	0,081	0,089	0,306	0	0,023	0,065	0,003	0,021	0,009	0,032	0,026	0,168	0,001	0,001	0	0,008	0	0,011	0,001	
Individua 12	0,154	0,177	0,217	0,023	0,356	0,428	0,042	0,353	0,032	0,423	0,078	0,104	0,400	0,328	0,005	0,166	0	0,137	0	0,006	0,009	
Individua 13	0,042	0,150	0,082	0,135	0,364	0,027	0,009	0,253	0,009	0,168	0,007	0,023	0,104	0,009	0,009	0,001	0	0,065	0	0,040	0,003	
Individua 14	0,090	0,150	0,077	0,115	0,133	0,023	0,020	0,068	0,002	0,006	0,003	0,011	0,054	0,015	0,010	0,013	0	0,053	0,003	0,050	0,019	
Individua 15	0,267	0,074	0,055	0,031	0,256	0,020	0,005	0,035	0,132	0,027	0,107	0,067	0,029	0,009	0,001	0,031	0	0,129	0,019	0,251	0,008	
Individua 16	0,236	0,398	0,102	0,064	0,146	0,041	0,020	0,237	0,046	0,094	0,068	0,083	0,116	0,089	0,031	0,002	0	0,094	0	0,042	0,001	
Individua 17	0,013	0,005	0,003	0,036	0,010	0,007	0,002	0,007	0,060	0,018	0,003	0,014	0,003	0,009	0,001	0,024	0	0	0	0,015	0,001	
Individua 18	0,015	0,058	0,055	0,006	0,012	0,047	0,004	0,0105	0,016	0,094	0,002	0,006	0,029	0,034	0,005	0,009	0	0,232	0	0,012	0	
Individua 19	0,065	0,155	0,049	0,223	0,338	0,029	0,122	0,146	0,074	0,094	0,041	0,009	0,028	0,009	0	0,002	0	0,017	0,005	0,039	0,011	
Individua 20	0,145	0,074	0,155	0,391	0,109	0,055	0,021	0,061	0,008	0,018	0,003	0,049	0,047	0,034	0,015	0,011	0	0,035	0,003	0,182	0,002	
Individua 21	0,130	0,022	0,117	0,120	0,094	0,007	0,004	0,281	0,005	0,009	0,004	0	0,006	0,009	0,006	0,001	0	0,004	0	0,029	0,001	
Individua 22	0,188	0,420	0,327	0,138	0,199	0,383	0,061	0,173	0,003	0,087	0,017	0,052	0,215	0,304	0,052	0,138	0	0,443	0	0,046	0,054	
Srednja vrednost	0,152	0,226	0,135	0,157	0,242	0,137	0,044	0,153	0,056	0,133	0,053	0,057	0,109	0,091	0,040	0,034	0,001	0,138	0,004	0,136	0,016	

	južni deo Panonske nizije																peripanonski prostor					
	SR-Kul	CR-Kut	SR-Som	SR-Indj	RO-San	BH-Der	SR-Djal	SR-Kik	SR-Vrs	CR-Lug	CR-Ila	CR-Ost	HU-Baj	SR-Sab	SR-NS	SR-Sme	SR-Neg	SR-Gru	SR-Zla	SR-Sev	SR-Kru	
SR-Les																						
Individua 1	0,169	0,283	0,195	0,286	0,335	0,029	0,052	0,039	0,002	0,029	0,011	0,011	0,090	0	0,002	0,009	0,014	0,029	0,013	0,026	0,006	
Individua 2	0,517	0,456	0,639	0,584	0,115	0,097	0,391	0,527	0,089	0,572	0,228	0,062	0,072	0,022	0,014	0,064	0,305	0,309	0,137	0,781	0,058	
Individua 3	0,544	0,160	0,448	0,170	0,072	0,069	0,014	0,073	0,205	0,495	0,111	0,054	0,269	0,039	0,010	0,174	0,002	0,120	0,051	0,241	0,006	
Individua 4	0,527	0,561	0,284	0,131	0,184	0,077	0,077	0,095	0,130	0,652	0,111	0,058	0,013	0,046	0,001	0,084	0	0,229	0,015	0,356	0,001	
Individua 5	0,134	0,134	0,072	0,075	0,024	0,013	0,008	0,015	0,036	0,326	0,042	0,132	0,108	0,120	0,018	0,021	0,030	0,105	0,006	0,140	0,021	
Individua 6	0,581	0,188	0,405	0,388	0,183	0,052	0,158	0,184	0,105	0,482	0,144	0,112	0,060	0,016	0,001	0,082	0,047	0,177	0,015	0,845	0	
Individua 7	0,171	0,016	0,155	0,111	0,034	0,031	0,005	0,011	0,037	0,245	0,044	0,037	0,040	0,002	0	0,027	0,004	0,079	0,008	0,079	0	
Individua 8	0,063	0,523	0,079	0,367	0,355	0,121	0,085	0,550	0,040	0,086	0,038	0,076	0,315	0,009	0,001	0,034	0,183	0,264	0,002	0,034	0,005	
Individua 9	0,098	0,118	0,436	0,456	0,401	0,305	0,348	0,735	0,076	0,145	0,123	0,022	0,062	0,016	0,004	0,075	0,353	0,069	0,168	0,127	0,008	
Individua 10	0,441	0,283	0,374	0,419	0,322	0,048	0,352	0,615	0,032	0,074	0,123	0,017	0,020	0,007	0	0,005	0,122	0,058	0,019	0,200	0,060	
Individua 11	0,286	0,393	0,068	0,602	0,061	0,409	0,064	0,044	0,024	0,280	0,041	0,013	0,016	0,019	0,001	0,081	0,047	0,064	0,059	0,081	0,021	
Individua 12	0,179	0,385	0,023	0,142	0,010	0,047	0,068	0,002	0,011	0,097	0,003	0,007	0	0,038	0	0,005	0	0,066	0,005	0,167	0	
Individua 13	0,383	0,344	0,159	0,202	0,144	0,070	0,119	0,073	0,067	0,526	0,099	0,222	0,038	0,032	0,024	0,141	0,036	0,247	0,012	0,572	0,001	
Individua 14	0,523	0,507	0,695	0,379	0,208	0,081	0,603	0,415	0,158	0,489	0,316	0,314	0,206	0,049	0,028	0,121	0,162	0,421	0,271	0,651	0,04	
Individua 15	0,245	0,614	0,110	0,525	0,295	0,246	0,044	0,102	0,015	0,011	0,057	0,132	0,052	0,046	0,003	0,336	0,140	0,088	0,096	0,035	0,013	
Individua 16	0,129	0,474	0,120	0,339	0,318	0,269	0,080	0,025	0,033	0,038	0,085	0,168	0,141	0,096	0	0,151	0,101	0,415	0,019	0,042	0,001	
Individua 17	0,079	0,213	0,333	0,162	0,573	0,443	0,100	0,438	0,047	0,135	0,068	0,059	0,230	0,005	0,002	0,094	0,100	0,062	0,041	0,064	0,006	
Individua 18	0,070	0,066	0,024	0,024	0,004	0,046	0,005	0,036	0,018	0,019	0,002	0,042	0,070	0,009	0	0,014	0	0,060	0,001	0,023	0	
Individua 19	0,505	0,528	0,221	0,095	0,154	0,038	0,113	0,098	0,139	0,520	0,067	0,194	0,046	0,060	0,006	0,075	0	0,327	0,021	0,266	0,004	
Individua 20	0,190	0,413	0,267	0,229	0,420	0,086	0,043	0,384	0,136	0,197	0,049	0,278	0,518	0,029	0,005	0,203	0,052	0,300	0,081	0,086	0,002	
Individua 21	0,093	0,323	0,090	0,202	0,236	0,298	0,108	0,195	0,021	0,092	0,150	0,188	0,178	0,014	0	0,172	0,104	0,225	0,007	0,087	0,001	
Individua 22	0,196	0,444	0,875	0,167	0,174	0,067	0,186	0,183	0,040	0,136	0,327	0,189	0,202	0,030	0	0,113	0,006	0,344	0,017	0,119	0,004	
Srednja vrednost	0,278	0,338	0,276	0,275	0,210	0,134	0,137	0,220	0,066	0,256	0,102	0,108	0,125	0,032	0,005	0,095	0,082	0,184	0,048	0,228	0,0117	

	južni deo Panonske nizije																peripanonski prostor					
	SR-Kul	CR-Kut	SR-Som	SR-Indj	RO-San	BH-Der	SR-Djal	SR-Kik	SR-Vrs	CR-Lug	CR-Ila	CR-Ost	HU-Baj	SR-Sab	SR-NS	SR-Sme	SR-Neg	SR-Les	SR-Zla	SR-Sev	SR-Kru	
SR-Gru																						
Individua 1	0,153	0,113	0,081	0,010	0,018	0,082	0,009	0,117	0,071	0,384	0,230	0,035	0,303	0,024	0	0,013	0,006	0	0	0,018	0,001	
Individua 2	0,016	0,029	0,007	0,003	0,012	0,001	0,002	0,001	0	0,022	0	0,010	0,127	0,009	0,002	0,073	0,018	0	0	0,002	0,001	
Individua 3	0,064	0,370	0,115	0,015	0,253	0,167	0,035	0,143	0,059	0,262	0,190	0,017	0,123	0,229	0,074	0,291	0,012	0	0,002	0,021	0,005	
Individua 4	0,006	0,162	0,040	0,057	0,008	0,003	0,050	0,093	0,048	0,035	0,030	0,202	0,012	0,114	0	0,005	0,003	0	0,001	0,001	0,001	
Individua 5	0,245	0,720	0,319	0,055	0,299	0,340	0,351	0,482	0,126	0,112	0,300	0,081	0,650	0,007	0,008	0,200	0,003	0,002	0,001	0,090	0,024	
Individua 6	0,092	0,451	0,160	0,050	0,048	0,074	0,175	0,312	0,131	0,432	0,246	0,181	0,087	0,258	0	0,084	0,001	0	0	0,094	0,002	
Individua 7	0,023	0,126	0,195	0,194	0,105	0,166	0,005	0,003	0,001	0,156	0,201	0,220	0,302	0,063	0,013	0,045	0	0	0	0,315	0,015	
Individua 8	0,1002	0,027	0,011	0,002	0,084	0,197	0,010	0,072	0,034	0,074	0,111	0,005	0,190	0,042	0	0	0,001	0	0	0,015	0,009	
Individua 9	0,007	0,038	0,008	0,081	0,003	0,001	0,016	0,003	0,001	0,047	0,008	0,012	0,028	0,002	0	0	0	0	0	0,002	0	
Individua 10	0,004	0,145	0,014	0,001	0,002	0,011	0,006	0,130	0,009	0,038	0,006	0,004	0,003	0,001	0	0,002	0	0	0	0,179	0	
Individua 11	0,015	0,046	0,159	0,030	0,019	0,034	0,003	0,021	0,053	0,230	0,039	0,009	0,012	0,054	0	0,007	0,003	0	0	0,001	0	
Individua 12	0,099	0,266	0,386	0,105	0,618	0,139	0,008	0,062	0,017	0,519	0,067	0,224	0,197	0,063	0	0,040	0,114	0	0	0,239	0,001	
Individua 13	0,026	0,028	0,014	0,004	0,083	0,051	0,021	0,025	0,039	0,048	0,028	0,002	0,036	0,003	0	0	0	0	0	0,014	0	
Individua 14	0,1363	0,129	0,425	0,102	0,212	0,106	0,014	0,056	0,065	0,070	0,142	0,161	0,552	0,018	0,222	0,026	0	0	0,001	0,282	0,008	
Individua 15	0,324	0,119	0,474	0,053	0,080	0,079	0,080	0,012	0,130	0,113	0,062	0,041	0,288	0,085	0	0,003	0	0,005	0,020	0,132	0,002	
Individua 16	0,280	0,727	0,378	0,077	0,323	0,253	0,283	0,262	0,201	0,102	0,042	0,337	0,202	0,396	0,027	0,039	0,115	0	0,005	0,077	0,016	
Individua 17	0,0218	0,283	0,193	0,296	0,556	0,190	0,013	0,028	0,023	0,118	0,127	0,028	0,211	0,063	0	0,062	0	0	0,021	0,212	0,002	
Individua 18	0,0923	0,417	0,106	0,277	0,072	0,419	0,153	0,077	0,063	0,249	0,008	0,372	0,175	0,021	0	0,007	0,001	0	0	0,090	0,005	
Individua 19	0,008	0,025	0,019	0,001	0,001	0,003	0,001	0,003	0,006	0,004	0,016	0	0,009	0,003	0	0	0	0	0	0,003	0	
Individua 20	0,183	0,230	0,341	0,129	0,105	0,059	0,173	0,161	0,172	0,577	0,201	0,505	0,190	0,180	0,022	0,075	0,025	0	0,023	0,352	0,001	
Individua 21	0,328	0,372	0,637	0,337	0,479	0,437	0,426	0,081	0,103	0,213	0,039	0,189	0,646	0,198	0,020	0,094	0,026	0	0	0,148	0,010	
Individua 22	0,217	0,312	0,081	0,124	0,103	0,214	0,058	0,032	0,004	0,276	0,106	0,010	0,038	0,302	0,025	0,022	0,039	0	0,002	0,166	0,009	
Srednja vrednost	0,111	0,233	0,189	0,091	0,158	0,138	0,086	0,099	0,062	0,185	0,100	0,120	0,199	0,097	0,019	0,049	0,017	0	0,003	0,111	0,005	

	južni deo Panonske nizije																peripanonski prostor					
	SR-Kul	CR-Kut	SR-Som	SR-Indj	RO-San	BH-Der	SR-Djal	SR-Kik	SR-Vrs	CR-Lug	CR-Ila	CR-Ost	HU-Baj	SR-Sab	SR-NS	SR-Sme	SR-Neg	SR-Les	SR-Gru	SR-Sev	SR-Kru	
SR-Zla																						
Individua 1	0,205	0,346	0,598	0,446	0,612	0,072	0,151	0,075	0,047	0,380	0,152	0,079	0,051	0,541	0,009	0,054	0	0,001	0,136	0,264	0,005	
Individua 2	0,0855	0,347	0,302	0,030	0,078	0,066	0,041	0,016	0,002	0,005	0,020	0,053	0,143	0,008	0,003	0,001	0,007	0	0,294	0,125	0,016	
Individua 3	0,046	0,079	0,123	0,019	0,012	0,182	0,020	0,004	0,015	0,070	0,036	0,089	0,182	0,006	0,006	0,005	0	0	0,043	0,079	0,001	
Individua 4	0,265	0,036	0,062	0,006	0,161	0,108	0,021	0,020	0,047	0,020	0,038	0,027	0,056	0,019	0,004	0,026	0	0	0,013	0,076	0	
Individua 5	0,683	0,150	0,686	0,045	0,454	0,434	0,015	0,345	0,137	0,586	0,299	0,122	0,044	0,115	0,075	0,096	0,026	0	0,209	0,477	0,001	
Individua 6	0,193	0,113	0,581	0,012	0,501	0,154	0,050	0,181	0,133	0,064	0,046	0,045	0,037	0,034	0,002	0,040	0,020	0	0,091	0,128	0,001	
Individua 7	0,334	0,832	0,371	0,436	0,611	0,624	0,323	0,570	0,166	0,113	0,111	0,859	0,031	0,149	0,003	0,539	0,13	0,002	0,139	0,287	0,016	
Individua 8	0,422	0,267	0,487	0,260	0,297	0,136	0,122	0,387	0,119	0,207	0,218	0,044	0,112	0,170	0,004	0,101	0,010	0,006	0,122	0,248	0,007	
Individua 9	0,463	0,187	0,166	0,108	0,211	0,036	0,058	0,044	0,016	0,011	0,029	0,023	0,035	0,0645	0	0,066	0,004	0,001	0,025	0,267	0,007	
Individua 10	0,019	0,120	0,276	0,007	0,040	0,210	0,144	0,004	0,003	0,038	0,398	0,360	0,029	0,056	0	0,002	0	0,002	0,058	0,052	0	
Individua 11	0,4857	0,336	0,396	0,092	0,338	0,466	0,247	0,140	0,036	0,048	0,184	0,079	0,150	0,050	0,081	0,019	0,001	0,001	0,008	0,030	0,001	
Individua 12	0,101	0,008	0,017	0,033	0,004	0,001	0,001	0,004	0,002	0,004	0,003	0,006	0,142	0,018	0,001	0,001	0	0	0,027	0,177	0,005	
Individua 13	0,085	0,025	0,315	0,091	0,135	0,023	0,047	0,164	0,010	0,333	0,040	0,031	0,058	0,011	0,024	0,021	0,014	0	0,062	0,129	0,020	
Individua 14	0,012	0,225	0,086	0,041	0,017	0,152	0,039	0,012	0,028	0,423	0,169	0,459	0,180	0,169	0,066	0,003	0,004	0	0,050	0,088	0,001	
Individua 15	0,072	0,752	0,224	0,324	0,031	0,108	0,291	0,213	0,131	0,145	0,076	0,477	0,046	0,106	0,001	0,059	0,001	0	0,139	0,110	0,001	
Individua 16	0,154	0,096	0,088	0,047	0,077	0,073	0,092	0,022	0,127	0,156	0,061	0,084	0,016	0,001	0,001	0,040	0,006	0	0,033	0,314	0,001	
Individua 17	0,146	0,233	0,049	0,095	0,362	0,082	0,017	0,004	0,021	0,054	0,006	0,019	0,077	0,089	0	0,006	0,011	0,003	0,024	0,012	0,001	
Individua 18	0,028	0,096	0,122	0,051	0,088	0,072	0,055	0,020	0	0,013	0,037	0,111	0,009	0,137	0,045	0,013	0	0	0,092	0,153	0,003	
Individua 19	0,738	0,088	0,254	0,094	0,135	0,516	0,113	0,440	0,290	0,213	0,054	0,008	0,608	0,093	0,018	0,003	0,009	0	0,053	0,717	0,020	
Individua 20	0,171	0,040	0,446	0,100	0,083	0,043	0,028	0,086	0,058	0,027	0,002	0,002	0,024	0,008	0,010	0,059	0,011	0	0,041	0,105	0,012	
Individua 21	0,240	0,471	0,600	0,160	0,669	0,153	0,254	0,210	0,085	0,052	0,025	0,038	0,043	0,006	0	0,002	0,091	0	0,316	0,100	0,001	
Individua 22	0,216	0,409	0,215	0,516	0,460	0,154	0,185	0,325	0,397	0,107	0,034	0,588	0	0,106	0,004	0,530	0,054	0	0,090	0,176	0,005	
Srednja vrednost	0,232	0,239	0,294	0,137	0,244	0,176	0,105	0,149	0,085	0,139	0,093	0,164	0,094	0,089	0,016	0,077	0,018	0,001	0,094	0,187	0,006	

	južni deo Panonske nizije																peripanonski prostor					
	SR-Kul	CR-Kut	SR-Som	SR-Indj	RO-San	BH-Der	SR-Djal	SR-Kik	SR-Vrs	CR-Lug	CR-Ila	CR-Ost	HU-Baj	SR-Sab	SR-NS	SR-Sme	SR-Neg	SR-Les	SR-Gru	SR-Zla	SR-Kru	
SR-Sev																						
Individua 1	0,518	0,251	0,175	0,090	0,110	0,188	0,081	0,307	0,028	0,554	0,234	0,019	0,049	0,064	0,091	0,096	0,014	0	0,098	0,017	0,008	
Individua 2	0,241	0,237	0,041	0,147	0,383	0,030	0,156	0,126	0,039	0,028	0,027	0,257	0,012	0,010	0	0,004	0,008	0,001	0,026	0	0,012	
Individua 3	0,187	0,167	0,112	0,149	0,094	0,368	0,033	0,333	0,029	0,405	0,216	0,015	0,024	0,114	0,027	0,041	0,058	0	0,090	0,021	0,015	
Individua 4	0,023	0,220	0,131	0,176	0,039	0,119	0	0,139	0,002	0,041	0,006	0	0,011	0,026	0	0,036	0	0	0,010	0	0,046	
Individua 5	0,306	0,087	0,045	0,036	0,361	0,357	0,004	0,055	0,077	0,367	0,055	0,228	0,047	0,016	0	0,040	0,085	0	0,025	0,001	0	
Individua 6	0,358	0,355	0,393	0,313	0,202	0,334	0,023	0,212	0,013	0,286	0,111	0,184	0,168	0,158	0,005	0,006	0,005	0	0,134	0,005	0,032	
Individua 7	0,081	0,076	0,006	0,032	0,038	0,016	0,035	0,010	0,040	0,045	0,011	0,013	0,021	0,001	0	0,007	0	0,001	0,051	0	0	
Individua 8	0,083	0,034	0,075	0,138	0,003	0,101	0,004	0,011	0,018	0,122	0,023	0,004	0,061	0,013	0,002	0,008	0,001	0	0,200	0,001	0,004	
Individua 9	0,548	0,493	0,294	0,355	0,291	0,338	0,195	0,267	0,031	0,163	0,578	0,017	0,016	0,030	0,001	0,085	0,011	0	0,167	0,022	0,017	
Individua 10	0,211	0,044	0,146	0,105	0,039	0,031	0,038	0,417	0,003	0,124	0,028	0,004	0,003	0,057	0,035	0,001	0,002	0	0,020	0,098	0,001	
Individua 11	0,095	0,159	0,143	0,072	0,237	0,020	0,096	0,391	0,063	0,128	0,092	0,070	0,051	0,007	0,034	0,001	0,005	0,001	0,083	0,003	0,010	
Individua 12	0,054	0,199	0,011	0,051	0,168	0,013	0,300	0,040	0,009	0,039	0,067	0,058	0,134	0,017	0	0,058	0	0	0,022	0	0,005	
Individua 13	0,099	0,411	0,089	0,080	0,075	0,327	0,145	0,268	0,057	0,213	0,080	0,090	0,142	0,064	0,234	0,049	0,150	0	0,169	0,003	0,004	
Individua 14	0,026	0,060	0,054	0,123	0,122	0,433	0,024	0,066	0,029	0,241	0,048	0,382	0,286	0,283	0	0,001	0	0	0,190	0,012	0,002	
Individua 15	0,300	0,770	0,066	0,087	0,199	0,084	0,202	0,394	0,031	0,115	0,088	0,002	0,011	0,054	0,082	0,009	0	0	0,081	0	0,002	
Individua 16	0,523	0,349	0,129	0,872	0,536	0,112	0,005	0,179	0,222	0,566	0,025	0,465	0,107	0,230	0,001	0,037	0,043	0,001	0,225	0,019	0,034	
Individua 17	0,655	0,421	0,710	0,267	0,387	0,206	0,168	0,844	0,107	0,184	0,234	0,023	0,205	0,275	0,005	0,022	0,016	0	0,115	0,015	0,028	
Individua 18	0,306	0,196	0,719	0,121	0,268	0,559	0,437	0,479	0,148	0,500	0,213	0,337	0,274	0,015	0,001	0,018	0,087	0	0,406	0,233	0,001	
Individua 19	0,011	0,071	0,174	0,217	0,111	0,013	0,010	0,075	0,014	0,403	0,068	0,212	0,255	0,016	0,099	0,015	0,005	0	0,045	0,020	0,002	
Individua 20	0,007	0,041	0,080	0,031	0,003	0,021	0,003	0,001	0	0,006	0,001	0,002	0,006	0,005	0	0,003	0	0	0,012	0	0	
Individua 21	0,087	0,146	0,067	0,030	0,024	0,019	0,002	0,037	0,006	0,115	0,011	0,190	0,008	0,005	0	0,266	0,012	0	0,049	0	0	
Individua 22	0,045	0,092	0,007	0,001	0,158	0,023	0,001	0,011	0,004	0,008	0,004	0,009	0,010	0	0	0,002	0,001	0	0,018	0,002	0,001	
Srednja vrednost	0,217	0,222	0,167	0,159	0,175	0,169	0,089	0,212	0,044	0,211	0,101	0,117	0,086	0,066	0,028	0,037	0,023	0	0,102	0,022	0,010	

	južni deo Panonske nizije																peripanonski prostor					
	SR-Kul	CR-Kut	SR-Som	SR-Indj	RO-San	BH-Der	SR-Djal	SR-Kik	SR-Vrs	CR-Lug	CR-Ila	CR-Ost	HU-Baj	SR-Sab	SR-NS	SR-Sme	SR-Neg	SR-Les	SR-Gru	SR-Zla	SR-Sev	
SR-Kru																						
Individua 1	0,206	0,689	0,082	0,209	0,214	0,473	0,009	0,186	0,216	0,243	0,042	0,016	0,005	0,318	0,001	0,113	0,013	0	0,045	0	0,479	
Individua 2	0,204	0,691	0,075	0,207	0,209	0,469	0,010	0,185	0,218	0,237	0,041	0,017	0,006	0,312	0,001	0,102	0,013	0	0,044	0	0,486	
Individua 3	0,213	0,329	0,292	0,268	0,076	0,026	0,103	0,466	0,025	0,453	0,284	0,054	0,086	0,213	0,264	0,029	0	0	0,227	0	0,105	
Individua 4	0,722	0,872	0,816	0,407	0,340	0,361	0,532	0,411	0,228	0,685	0,169	0,136	0,440	0,473	0,521	0,643	0,009	0,001	0,535	0,007	0,403	
Individua 5	0,141	0,189	0,108	0,028	0,071	0,063	0,422	0,236	0,011	0,006	0,408	0,081	0,089	0,003	0,026	0	0	0	0,002	0,001	0,061	
Individua 6	0,232	0,273	0,339	0,137	0,308	0,115	0,045	0,087	0,019	0,021	0,066	0,025	0,248	0,044	0,005	0,006	0,002	0	0,069	0,002	0,141	
Individua 7	0,029	0,038	0,007	0,005	0,006	0,012	0,004	0,002	0,010	0,003	0	0,001	0,013	0,099	0	0,001	0,002	0	0,001	0	0,008	
Individua 8	0,164	0,318	0,111	0,179	0,035	0,087	0,193	0,188	0,274	0,239	0,035	0,156	0,135	0,089	0,066	0,091	0,007	0	0,018	0	0,361	
Individua 9	0,299	0,151	0,188	0,033	0,241	0,132	0,094	0,059	0,070	0,030	0,014	0,174	0,550	0,10	0,374	0,071	0,026	0	0,035	0	0,181	
Individua 10	0,075	0,037	0,106	0,077	0,066	0,021	0,029	0,258	0,047	0,073	0,112	0,252	0,092	0,044	0,026	0,142	0,019	0	0,066	0	0,096	
Individua 11	0,196	0,043	0,056	0,053	0,041	0,071	0,054	0,081	0,022	0,322	0,007	0,065	0,353	0,303	0,016	0,066	0	0	0,279	0	0,015	
Individua 12	0,243	0,174	0,136	0,116	0,274	0,119	0,125	0,240	0,120	0,218	0,229	0,018	0,185	0,167	0,289	0,062	0,128	0	0,090	0,001	0,210	
Individua 13	0,322	0,112	0,307	0,089	0,081	0,076	0,188	0,246	0,143	0,142	0,245	0,013	0,326	0,052	0,012	0,101	0	0	0,259	0	0,268	
Individua 14	0,059	0,178	0,031	0,197	0,143	0,124	0,065	0,116	0,182	0,037	0,037	0,091	0,199	0,037	0,001	0,017	0	0	0,011	0	0,080	
Individua 15	0,151	0,327	0,313	0,355	0,153	0,045	0,028	0,401	0,028	0,143	0,232	0,015	0,257	0,199	0,073	0,30	0,001	0	0,132	0	0,469	
Individua 16	0,240	0,229	0,313	0,432	0,245	0,170	0,009	0,603	0,014	0,524	0,085	0,037	0,101	0,181	0,088	0,008	0,093	0	0,123	0,002	0,568	
Individua 17	0,064	0,116	0,045	0,196	0,104	0,112	0,002	0,125	0,015	0,064	0,031	0,009	0,413	0,018	0,011	0,013	0,007	0	0,053	0	0,043	
Individua 18	0,034	0,098	0,068	0,204	0,021	0,050	0,005	0,592	0,013	0,200	0,017	0,015	0,185	0,120	0,184	0,039	0,001	0	0,072	0	0,273	
Individua 19	0,206	0,211	0,379	0,278	0,138	0,176	0,082	0,383	0,064	0,397	0,358	0,233	0,388	0,195	0,020	0,143	0,015	0	0,330	0	0,131	
Individua 20	0,115	0,167	0,092	0,447	0,025	0,009	0,003	0,141	0,019	0,130	0,129	0,010	0,036	0,030	0,085	0,027	0,004	0,001	0,025	0,008	0,488	
Individua 21	0,083	0,089	0,156	0,165	0,131	0,119	0,081	0,396	0,073	0,089	0,196	0,008	0,144	0,028	0,095	0,049	0,001	0	0,001	0,002	0,166	
Individua 22	0,384	0,263	0,511	0,627	0,416	0,398	0,212	0,324	0,060	0,028	0,031	0,014	0,020	0,073	0	0,071	0,017	0	0,104	0	0,062	
Srednja vrednost	0,200	0,254	0,206	0,214	0,152	0,147	0,104	0,260	0,085	0,195	0,126	0,065	0,194	0,141	0,098	0,095	0,016	0	0,115	0,001	0,231	

BIOGRAFIJA



Nataša Kočiš Tubić je rođena 22. februara 1982. u Somboru, gde je završila osnovnu i srednju školu. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer diplomirani biolog je upisala 2001. godine. Fakultet je završila 2006. godine sa prosečnom ocenom 9,31 i odbranjenim diplomskim radom ocenom 10. Tokom studija (u periodu od 2002-2006. godine) bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta, a školske 2002/2003. dobitnica nagrade Univerziteta u Novom Sadu za postignut uspeh na osnovnim studijama.

Nakon završenih redovnih studija, 2006. godine upisuje Master akademske studije, modul Funkcionalna biologija na Departmanu za biologiju i ekologiju, PMF-a, Univerziteta u Novom Sadu. Ovaj stepen studija završava 2007. godine prosečnom ocenom 9,75 i odbranjenim završnim radom ocenom 10. Februara 2006. godine postaje stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj. Doktorke studije, studijski program Doktor bioloških nauka, na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu upisuje 2007. godine. Naredne, 2008. godine stiče zvanje istraživač-pripravnik za užu naučnu oblast Genetika, na Prirodno-matematičkom fakultetu u Novom Sadu. Učestvuje u izvođenju vežbi iz grupe predmeta Genetika za studente PMF-a smera biolog, ekolog i biohemičar.

Godine 2011. zasniva radni odnos na određeno vreme radi realizacije projekta „Konzervaciona strategija za očuvanje zaštićenih i strogo zaštićenih vrsta u Srbiji-osolike muve (Diptera: Syrphidae) kao model organizmi“, finansiranog od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Iste godine stiče zvanje istraživač-saradnik za užu naučnu oblast Genetika, na PMF-u u Novom Sadu i angažovana je u izvođenju vežbi predmeta Molekularna genetika za studente smera molekularni biolog.

Oblast naučne delatnosti je Genetika – proučavanje genetičke varijabilnosti populacija biljnih i životinjskih vrsta upotrebom molekularnih markera. Koautor je 2 rada u međunarodnim časopisima, 5 saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini i 9 saopštenja u izvodu. Nataša je do sada bila učesnik na dva naučna projekta finansirana od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, dva naučna

projekta finansirana od strane Pokrajinskog Sekretarijata za poljoprivredu, vodoprivredu i šumarstvo AP Vojvodine i dve međunarodne COST akcije.

Član je Društva genetičara Srbije i Evropskog društva za proučavanje korova (European Weed Research Society-EWRS).

Služi se engleskim jezikom.

Novi Sad, 2014.

Nataša Kočiš Tubić

UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET
KLJUČNA INFORMACIJSKA DOKUMENTACIJA

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nataša Kočiš Tubić
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	dr Dragana Obreht, vanredni profesor
Naslov rada: NR	Populaciono-genetička karakterizacija ambrozije (<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.) južnog dela Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog Balkana
Jezik publikacije: JP	Srpski jezik
Jezik izvoda: JI	Srpski / Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	AP Vojvodina
Godina: GO	2014.
Izdavač: IZ	autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Departman za biologiju i ekologiju, PMF, Trg Dositeja Obradovića 2, 21 000 Novi Sad, Srbija
Fizički opis rada: FO	broj poglavlja 9; stranica 108; slika 10; tabela 13; literaturnih navoda 138; priloga 1
Naučna oblast: NO	Biologija
Naučna disciplina: ND	Genetika
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> , mikrosateliti, genetički diverzitet, genetička diferencijacija, biološke invazije
UDK	
Čuva se:	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju,

ČU	PMF, Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21 000 Novi Sad, Republika Srbija
Važna napomena: VN	nema
Izvod: IZ	<p>Vrsta <i>Ambrosia artemisiifolia</i> L. (fam. Asteraceae) je jedna od najagresivnijih invazivnih biljaka kako u Evropi, tako i na globalnom nivou. Kao korovska vrsta uzrokuje velike ekonomske gubitke redukujući prinos poljoprivrednih kultura, a njena masovna produkcija polena stvara ozbiljne alergijske probleme kod ljudi. Kao invazivna vrsta, predstavlja dobar model za proučavanje procesa uključenih u biološke invazije, koje se danas prepoznaju kao deo globalnih promena, predstavljajući jednu od glavnih pretnji biodiverzitetu, funkcionisanju ekosistema, poljoprivredi, ali i ljudskom zdravlju. U Evropi, ambrozija je široko rasprostranjena, ali jedno od područja sa najvećom incidencom ovog invazivnog korova je Panonska nizija. Po svom položaju, kao i karakteristikama samog područja, ovaj region predstavlja povoljno stanište kako za introdukciju ambrozije iz različitih pravaca, tako i za njenu brzu ekspanziju u pomenutom području i šire. U proteklih 30-40 godina ambrozija se širi na peripanonsko područje, tačnije ka centralnim i južnim delovima Srbije. Uzimajući u obzir sve činjenice, cilj ovog istraživanja je bio genetička karakterizacija populacija ambrozije sa područja Panonske nizije i peripanonskog prostora centralnog dela Balkanskog poluostrva. U svrhu ovoga, upotrebljeni su jedni od najpopularnijih i najinformativnijih molekularnih markera u polju populacione genetike, mikrosateliti. Na području Panonske nizije utvrđen je visok nivo genetičke varijabilnosti i nizak nivo genetičke diferencijacije i struktuiranosti među ispitivanim populacijama, a najverovatnije kao posledica multiplih introdukcija i intenzivnog protoka gena među populacijama ispitivanog regiona. Suprotno, populacije sa peripanonskog prostora centralnog Balkana su pokazale niži nivo genetičkog diverziteta u odnosu na panonske populacije, sa izraženom inter-populacionom diferencijacijom. Potvrđeno je širenje ambrozije u pravcu sever-jug na području peripanonskog prostora, kao i poreklo ovih populacija od populacija iz regiona Panonske nizije, ali bez isključivanja mogućeg upliva ambrozije iz drugih pravaca. Ova saznanja doprinose rasvetljavanju procesa introdukcije i ekspanzije ispitivane invazivne vrste na ovom području Evrope. Utvrđen visok potencijal u ekspanziji ambrozije i potencijalni pravci širenja u ispitivanom području, mogu da doprinesu predviđanju dalje potencijalne ekspanzije ove vrste, što bi moglo unaprediti mere kontrole i strategiju za suzbijanje širenja ambrozije.</p>
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	26. 02. 2013.
Datum odbrane: DO	
Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO	<p>-predsednik: dr Mihajla Đan, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu</p> <p>-član: dr Dragana Obreht, vanredni profesor, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, mentor</p> <p>-član: dr Goran Anačkov, docent, Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu</p>

	-član: dr Marija Kraljević-Balalić, profesor emeritus, Poljoprivredni fakultet u Novom Sadu
--	---

**UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES
KEY WORD DOCUMENTATION**

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Nataša Kočiš Tubić
Mentor: MN	dr Dragana Obreht, Associate Professor
Title: TI	Population-genetic characterization of common ragweed (<i>Ambrosia artemisiifolia</i> L.) from the southern part of the Pannonian Plain and the Peripannonian region of the Central Balkan
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Trg Dositeja Obradovića 2, 21 000 Novi Sad
Physical description: PD	chapters 9, pages 108, references 138, figures 10, tables 13, supplement 1
Scientific field SF	Biology
Scientific discipline SD	Genetics
Subject, Key words	<i>Ambrosia artemisiifolia</i> , microsatellites,

SKW	genetic diversity, genetic differentiation, biological invasion
UC	
Holding data: HD	The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovića 2, 21 000 Novi Sad, Republic of Serbia
Note:	No
Abstract: AB	<p><i>Ambrosia artemisiifolia</i> L. (fam. Asteraceae) is one of the most aggressive invasive plant species in Europe and globally. As weed species, common ragweed causes great economic losses by reducing the yield of agricultural crops, and its mass production of pollen produces severe allergic problems in humans. As an invasive species, <i>Ambrosia artemisiifolia</i> is a good model for studying the processes of biological invasions, which are today recognized as part of global changes, presenting a major threat to biodiversity, the functioning of ecosystems, agriculture and human health. In Europe, <i>Ambrosia artemisiifolia</i> is widespread, but one of the most infested area is the Pannonian Plain. According to location and characteristics of the area, this region represents a favorable habitat for introduction of common ragweed from different directions and rapid expansion in these areas as well as further. In the past 30-40 years, common ragweed was spreading across Peripannonian region, more precisely, to the Central and Southern parts of Serbia. According the facts, the aim of this study was the genetic characterization of populations of <i>Ambrosia artemisiifolia</i> from the Southern part of the Pannonian Plain and the Peripannonian region of the Central Balkan. One of the most popular and most informative molecular markers in population genetics, microsatellites were used. In the area of the Pannonian Plain, a high level of genetic variability and low level of genetic differentiation and structure among the study population have detected, probably as a result of multiple introduction and intensive gene flow between populations. In the other hand, the populations from the Peripannonian region have shown lower level of genetic diversity related to populations from Pannonin Plain, with moderate level of inter-population differentiation. Obtained results have confirmed that the spread of common ragweed across Peripannonian region was in the north-south direction, as well as that the populations from the considered area originated from the populations of Pannonian Plain. However, in this claim we can not exclude the possible influence of <i>Ambrosia artemisiifolia</i> from other directions. This study contributes to better understuding of the process of introduction and expansion of <i>Ambrosia artemisiifolia</i> in considered part of Europe. Detected high potential for expansion of common ragweed and possible directions of spreading in the study area, can contribute to the prediction of potential further expansion of <i>Ambrosia artemisiifolia</i>, which could improve control measures and strategies for preventing the spreading of this invasive species.</p>
Accepted on Scientific Board on: AS	26. 02. 2013.
Defended: DE	
Thesis Defend Board:	-president: dr Mihajla Đan, Associate

DB	Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad -member: dr Dragana Obreht, Associate Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad, mentor -member: dr Goran Anačkov, Assistant Professor, Faculty of Sciences, Novi Sad -member: dr Marija Kraljević-Balalić, Professor Emeritus, Faculty of Agriculture, Novi Sad
----	---