



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



Milomir Stefanović

**Molekularni diverzitet i genetički signali lokalnih adaptacija vrste
Lepus europaeus Pallas, 1778 u heterogenim uslovima sredine**

**Molecular diversity and genetic signatures of local adaptations in
brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from heterogeneous
landscapes**

- Doktorska disertacija / PhD Thesis -

Novi Sad, 2020.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET

**MOLEKULARNI DIVERZITET I GENETIČKI
SIGNALI LOKALNIH ADAPTACIJA VRSTE *Lepus
europaeus* Pallas, 1778 U HETEROGENIM USLOVIMA
SREDINE**

- doktorska disertacija -

Mentori: Dr Mihajla Đan
Dr Franz Suchentrunk

Kandidat: Milomir Stefanović

Novi Sad, 2020.



UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES

**MOLECULAR DIVERSITY AND GENETIC
SIGNATURES OF LOCAL ADAPTATIONS IN BROWN
HARES (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) FROM
HETEROGENEOUS LANDSCAPES**

PhD Thesis

Supervisors: Mihajla Đan, PhD
Franz Suchentrunk, PhD

Candidate: Milomir Stefanović

Novi Sad, 2020

*“Ničega se u životu ne treba bojati, samo treba shvatiti.
Što više razumemo, to se manje bojimo.”*

*“Nothing in life is to be feared, it is only to be understood.
Now is the time to understand more, so that we may fear less.”*

Marija Kiri / Marie Curie

Zahvala / Acknowledgments

Istraživanje predstavljeno u ovoj doktorskoj disertaciji je u najvećoj meri urađeno u Laboratoriji za genetiku Departmana za integrativnu biologiju i evoluciju Univerziteta veterinarske medicine u Beču, dok je deo laboratorijskih analiza urađen u Laboratoriji za genetiku Departmana za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu, pod mentorstvom dr Franca Zuhentrunka i dr Mihajle Đan.

Veliku zahvalnost dugujem svojoj “domaćoj” mentorki, redovnoj profesorici dr Mihajli Đan na ukazanom poverenju i želji da me prihvati kao deo svog tima i da mi prepusti nastavak istraživanja u oblasti u kojoj je i sama odbranila svoju doktorsku disertaciju. Hvala na svim savetima i sugestijama koji su značajno doprineli kvalitetu ove doktorske disertacije, a posebno hvala na pruženoj prilici, prijateljskoj atmosferi i lepoj saradnji u realizaciji nastavnih aktivnosti.

My greatest gratitude goes to my “foreign” supervisor dr Franz Suchentrunk. The opportunity to be guided by a person with such a devotion to science, curiosity and extremely wide knowledge is and always will be a never-ending inspiration to me. I truly appreciate everything you have done for me, the hours and hours of discussions, which truly helped me to further develop myself as a young scientist, and for all of your support and involvement in other projects. Thank you very much for everything.

Zahvalnost dugujem i dr Neveni Veličković, dr Mihailu Jeliću i dr Dejanu Beukoviću na korisnim sugestijama i komentarima. Posebnu zahvalnost dugujem dr Mihailu Jeliću na sugestijama oko prevoda termina na srpski jezik.

Zahvalnost dugujem i svim članovima Laboratorije za genetiku Departmana za biologiju i ekologiju na prijatnoj atmosferi i lepom druženju tokom obavljanja naših svakodnevnih istraživačkih aktivnosti.

Since the majority of the laboratory work for this thesis was performed in the Laboratory of Genetics at the Department of Integrative Biology and Evolution (now Department of Interdisciplinary Life Sciences) at the University of Veterinary Medicine in Vienna, I must express my gratitude to a bunch of people who crossed my path during my coming back and forth to this small, but very vivid scientific community. Thank you for the warm welcome, interesting conversations, and a lot of barbeque gatherings. Among all of you, I must personally express a big gratitude to Anita Haiden for helping me in successful maneuvering in finding the chemicals and expendables in the lab, and for interesting talks while waiting for PCRs to finish. Big gratitude goes also to my roommates, and now, dear friends - Elisa Ligorio and Eva Wagner. Even though I was never really a KLIVV guy, you integrated me there and, therefore I owe you a big thank you for such an amazing time we had. You were an important part of a lot of memorable moments of my Vienna experience. I really enjoyed our glasshouse dinners, and all those funny chats. Grazie and Danke.

Teško je nabrojati i imenom pomenuti i zahvaliti se svim ljudima koji su doprineli i pomogli mom istraživačkom razvoju tokom svih ovih godina, svim profesorima, predavačima na letnjim školama i kursevima, članovima laboratorija u kojima sam radio, naučnicima iz zemlje i iz inostranstva. Ipak, u ovom dugom nizu imena, posebno želim da izdvojim dr Biljanu Jekić, profesoricu Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, sa kojom sam "pustio" svoj prvi PCR, i napravio svoj prvi gel. Hvala na svemu što ste me naučili, bilo je zadovoljstvo napraviti prve "molekularne korake" sa mentorkom kao što ste Vi.

Iako na kraju, nikako ne najmanje bitnu zahvalnost dugujem svima koji su me osnaživali i ispunjavali tamo gde je nauka prestajala, a svakodnevnica života započinjala. Onima koji su znali kada je bilo potrebno samo da ćutimo zajedno, a kada da svojim razgovorima smire, onima koji su imali razumevanje i nesebično pomagali ne samo onda kada je trebalo, već i onda kada moja tvrdoglavost nije mislila da treba. Onima koji su oslikali sve one najlepše trenutke koje nosim iz perioda pisanja i rada na ovoj disertaciji, ali i perioda studentskih dana. Ne postoji veće bogatsvo od osmeha koji imam na licu dok se prisećam svih lepih momenata, jer su i oni manje lepi momenti danas postali samo "ono čemu ćemo se nekad slatko nasmejati". Neko duže, neko kraće, ali je svako od vas ostavio neizbrisiv trag u mom životu... Neizmerno hvala Viktoru, Jovani, Jeleni, Marku, Dragani, Nemanji.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj porodici na pruženoj ljubavi i požrtvovanosti. Ovu disertaciju posvećujem svojim roditeljima. Njihova borba i istrajnost u životnim preprekama bila je i ostaće moj najjači zamajac ka uspehu.

SADRŽAJ

Lista skraćenica.....	viii
Lista ilustracija.....	ix
Lista tabela.....	xiii
Lista priloga.....	xvii
1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE.....	4
2.1. Opšte karakteristike vrste <i>Lepus europaeus</i>	4
2.2. Molekularni diverzitet prirodnih populacija životinja.....	6
2.3. Mitohondrijska DNK kao molekularni marker u analizama prirodnih populacija.....	8
2.4. Geni imunskog sistema kao molekularni markeri u analizama prirodnih populacija.....	10
2.5. Primena molekularnih markera u analizama diverziteta vrste <i>Lepus europaeus</i>	12
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	20
4. MATERIJAL I METODE.....	22
4.1. Materijal.....	22
4.2. Metode.....	23
4.2.1. Izolacija DNK.....	23
4.2.1.1. Postupak fenol-hloroform-izoamilalkohol ekstrakcije ukupne genomske DNK.....	23
4.2.1.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK.....	23
4.2.2. Umnožavanje ispitivanih molekularnih markera.....	24
4.2.2.1. Umnožavanje nukleotidnih sekvenci D-petlje mitohondrijske DNK.....	24
4.2.2.2. Umnožavanje gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK.....	24
4.2.2.3. Umnožavanje gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK.....	25
4.2.2.4. Umnožavanje <i>DQA</i> gena MHC kompleksa klase II.....	25
4.2.2.5. Umnožavanje <i>DQB</i> gena MHC kompleksa klase II.....	26
4.2.2.6. Umnožavanje <i>TLR2</i> gena.....	26
4.2.3. Vizuelizacija produkata lančane reakcije polimeraze.....	27
4.2.4. Sekvenciranje ispitivanih molekularnih markera.....	27
4.2.4.1. Prečišćavanje PCR produkata.....	27
4.2.4.2. Reakcija sekvenciranja.....	28
4.2.4.3. Precipitacija i priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu.....	28
4.3. Statistička obrada rezultata.....	29
4.3.1. Obrada nukleotidnih sekvenci i genotipizacija jedarnih molekularnih markera.....	29
4.3.2. Određivanje osnovnih parametara molekularnog diverziteta.....	30
4.3.3. Analiza filogenetskih odnosa i demografske istorije.....	31
4.3.4. Analiza prostornih obrazaca distribucije molekularnog diverziteta.....	33
4.3.5. Detekcija signala selekcije na molekularnom nivou.....	34
4.3.6. Detekcija signala lokalnih adaptacija na molekularnom nivou.....	38

5. REZULTATI.....	40
5.1. Molekularni diverzitet mitohondrijske DNK.....	40
5.1.1. Filogenetski odnosi i filogeografska struktura na osnovu varijabilnosti nukleotidnih sekvenci mtDNK	42
5.1.1.1. Analiza sekvenci D petlje mitohondrijske DNK.....	43
5.1.1.2. Analiza sekvenci gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze mtDNK	46
5.1.1.3. Analiza sekvenci gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze mtDNK	49
5.1.2. Karakteristike demografske istorije.....	51
5.1.3. Prostorni obrasci distribucije molekularnog diverziteta.....	53
5.1.4. Detekcija signala dejstva prirodne selekcije na mtDNK gene	60
5.1.5. Detekcija signala molekularnih adaptacija mtDNK	62
5.2. Molekularni diverzitet gena imunskog sistema	65
5.2.1. Filogenetski odnosi i filogeografska struktura na osnovu gena imunskog sistema.....	67
5.2.2. Prostorni obrasci distribucije molekularnog diverziteta gena imunskog sistema.....	71
5.2.3. Detekcija signala dejstva prirodne selekcije na gene imunskog sistema.....	73
5.2.4. Detekcija signala lokalnih adaptacija u genima imunskog sistema.....	77
6. DISKUSIJA	85
6.1. Molekularni diverzitet vrste <i>Lepus europaeus</i> sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka.....	85
6.2. Filogeografska struktura i karakteristike demografske istorije vrste <i>Lepus europaeus</i>	89
6.3. Prostorna distribucija genetičke varijabilnosti vrste <i>Lepus europaeus</i>	94
6.4. Selekcija na jedarne i mtDNK gene kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	98
6.5. Genetički signali lokalnih/regionalnih adaptacija kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	102
7. ZAKLJUČAK	107
8. LITERATURA	109
9. PRILOZI	130
Prilog I	130
Prilog II.....	135
Prilog III	140
Prilog IV	141
Prilog V.....	142
Prilog VI	143
Prilog VII.....	145
Prilog VIII	146
10. EXTENDED ABSTRACT	147

LISTA SKRAĆENICA

AICc	Akaiki informacijski kriterijum sa korekcijom za veličinu uzorka
AMOVA	Analiza molekularne varijanse
BSP	Bajesov <i>skyline</i> grafik
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
dNTP	Smeša slobodnih dezoksinukleotidnih trifosfata
EDTA	Etilen-diamin-tetra sirćetna kiselina
IUCN	Svetska organizacija za zaštitu prirode i prirodnih resursa (engl. <i>International Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i>)
IUPAC	Međunarodna zajednica za čistu i primenjenu hemiju (engl. <i>International Union for Pure and Applied Chemistry</i>)
MHC	Molekul glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (engl. <i>Major Histocompatibility Complex</i>)
MJ	<i>Median-joining</i>
mtDNK	Mitohondrijska DNK
MT-ND2	Gen za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK
MT-ND6	Gen za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK
NADH	Redukovana forma nikotinamid adenin dinukleotida
NCBI	Američki nacionalni centar za biotehnoške informacije (engl. <i>National Centre for Biotechnological Information</i>)
OXPHOS	Oksidativna fosforilacija
PCR	Lančana reakcija polimeraze (engl. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PBR	Udubljenje za vezivanje peptida na MHC (engl. <i>Peptide Binding Region</i>)
RFLP	Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata (engl. <i>Restriction Fragment Length Polymorphisms</i>)
RNK	Ribonukleinska kiselina
RVI	Relativni doprinos varijabli (engl. <i>Relative Variable Importance</i>)
SDS	Natrijum-dodecil-sulfat
SNP	Polimorfizam pojedinačnih nukleotida (engl. <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
SSD	Suma kvadratnih odstupanja (engl. <i>Sum Squared Deviations</i>)
sPCA	Prostorna analiza glavnih komponenti
TAE	Tris-acetat-EDTA pufer
TBE	Tris-borat-EDTA pufer
TE	Tris-EDTA pufer
TIR	Toll/Interleukin-1 receptorski domen (engl. <i>Toll/Interleukin-1 Receptor Domain</i>)
TLR	Receptor sličan Toll-u (engl. <i>Toll-like Receptor</i>)
Tris	2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol

LISTA ILUSTRACIJA

- Slika 1.** Vrsta *Lepus europaeus* Pallas, 1778 4
Figure 1. *Lepus europaeus* Pallas, 1778
- Slika 2.** Mapa sa prikazom lokaliteta sakupljenih uzoraka jedinki vrste *Lepus europaeus* 22
Figure 2. Map showing the sampling localities of *Lepus europaeus* individuals
- Slika 3.** Poravnanje aminokiselinskih sekvenci gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze mtDNK kod vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Različite proteinske varijante su obeležene slovima abecede od A do H..... 42
Figure 3. Amino-acid sequence alignment of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 gene in brown hares from Europe and Asia Minor. Different protein variants detected are labeled as A to H.
- Slika 4.** Poravnanje aminokiselinskih sekvenci gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze mtDNK kod vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Različite proteinske varijante su obeležene slovima abecede od A do Q..... 42
Figure 4. Amino-acid sequence alignment of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 6 gene in brown hares from Europe and Asia Minor. Different protein variants detected are labeled as ND6A to ND6Q.
- Slika 5.** Bajesovo filogenetsko stablo evolucionih odnosa između haplotipova D petlje mitohondrijske DNK jedinki vrste *L. europaeus*. Oznake haplotipova su date u Prilogu I. Na čvorovima su prikazane vrednosti posteriornih verovatnoće..... 44
Figure 5. Rooted Bayesian phylogenetic tree reconstructed using brown hares D loop mtDNA haplotype sequences. Posterior probabilities are shown at the nodes. Haplotype designations in the network correspond to those given in Appendix I.
- Slika 6.** Median-joining mreža haplotipova D petlje mitohondrijske DNK vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji haplotipova, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnošću odgovarajućim haplogrupama. Ukoliko je bilo više od jednog mutacionog koraka između susednih haplotipova, njihov broj je prikazivan vertikalnim crtama. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Oznake haplotipova su prikazane samo brojevima, pri čemu je oznaka LeDL* podrazumevana, a objašnjenja oznaka su data u Prilogu I. 45
Figure 6. Median-joining network of the mtDNA D loop haplotypes of *Lepus europaeus* from Europe and Asia Minor. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to haplogroup membership as shown in the legend. Numbers of mutational steps between haplotypes are indicated by dashes, if more than one step is present. Red circles represent median vectors. Haplotype names correspond to those given in Appendix I.

Slika 7. Bajesovo filogenetsko stablo evolucionih odnosa između haplotipova *MT-ND2* gena vrste *L. europaeus*. Oznake haplotipova su date u Prilogu I. Na čvorovima su prikazane vrednosti posterior verovatnoće..... 47

Figure 7. Rooted Bayesian phylogenetic tree reconstructed using brown hare MT-ND2 haplotype sequences. Posterior probabilities are shown at the nodes. Haplotype designations in the tree correspond to those given in Appendix I.

Slika 8. Median-joining mreža haplotipova gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Veličina krugova odgovara uočenoj učestalosti haplotipova, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnošću odgovarajućim haplogrupama. Ukoliko je bilo više od jednog mutacionog koraka između susednih haplotipova, njihov broj je prikazivan vertikalnim crtama. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Isprekidanim linija su zaokruženi haplotipovi koji odgovaraju proteinskim varijantama ND2A-H. Oznake haplotipova su prikazane samo brojevima, pri čemu je oznaka LeND2* podrazumevana, a objašnjenja oznaka su data u Prilogu I. 48

Figure 8. Median-joining network of the mitochondrial NADH Dehydrogenase subunit 2 gene sequences of Lepus europaeus from Europe and Asia Minor. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies and circles are coloured according to haplogroup membership as shown in the legend. Numbers of mutational steps between haplotypes are indicated by dashes, if more than one step is present. Red circles represent median vectors. Dashed lines encircle different protein variants coded as ND2A to ND2H. Haplotype names correspond to those given in Appendix I.

Slika 9. Bajesovo filogenetsko stablo evolucionih odnosa između haplotipova *MT-ND6* gena vrste *L. europaeus*. Oznake haplotipova su date u Prilogu I. Na čvorovima su prikazane vrednosti posterior verovatnoće..... 50

Figure 9. Rooted Bayesian phylogenetic tree reconstructed using brown hares MT-ND6 haplotype sequences. Posterior probabilities are shown at the nodes. Haplotype designations in the tree correspond to those given in Appendix I.

Slika 10. Median-joining mreža haplotipova gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji haplotipova, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnošću odgovarajućim haplogrupama. Ukoliko je bilo više od jednog mutacionog koraka između susednih haplotipova, njihov broj je prikazivan vertikalnim crtama. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Isprekidanim linija su zaokruženi haplotipovi koji odgovaraju proteinskim varijantama ND6A-Q. Oznake haplotipova su prikazane samo brojevima, pri čemu je oznaka LeND6* podrazumevana, a objašnjenja oznaka su data u Prilogu I. 51

Figure 10. Median-joining network of the mitochondrial NADH Dehydrogenase subunit 6 gene sequences of Lepus europaeus from Europe and Asia Minor. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to haplogroup membership as shown in the legend. Numbers of mutational steps between haplotypes are indicated by dashes, if more than one step is present. Red circles represent median vectors. Dashed lines encircle different protein variants coded as ND6A to ND6Q. Haplotype names correspond to those given in Appendix I.

Slika 11. Grafici *mismatch* distribucije za definisane haplogrupe vrste *Lepus europaeus* na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mitohondrijske DNK (a), *MT-ND2* gena (b) i *MT-ND6* gena (c). Na ordinati su prikazani brojevi parova nukleotidnih razlika, a njihove relativne frekvencije na apscisi. Uočene vrednosti su prikazane linijom crvene boje, a očekivane vrednosti linijom zelene boje..... 52

Figure 11. Mismatch distributions of the defined haplogroups of brown hares based on the mitochondrial D loop sequences (a), MT-ND2 sequences and MT-ND6 sequences (c). The X-axis represents the number of pairwise differences, and the Y-axis represents the relative frequencies of pairwise comparisons.

Slika 12. Bajesov *skyline* grafik promena u efektivnoj veličini populacije za tri haplogrupe definisane na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mitohondrijske DNK kod vrste *Lepus europaeus*. 53

Figure 12. Bayesian skyline plots showing the change in effective female population size for each haplogroup defined based on the variability of mitochondrial D loop sequences in brown hares from Europe and Asia Minor. Solid lines show the median estimate, while light lines show the 95% highest posterior density interval.

Slika 13. Grafički prikaz protoka gena na osnovu *M* vrednosti između definisanih haplogrupa vrste *Lepus europaeus*. Crvenom bojom prikazane su vrednosti za D petlju mitohondrijske DNK, zelenom bojom za *MT-ND2*, a plavom bojom za *MT-ND6* gen. 53

*Figure 13. Graphical summary showing the results of gene flow analyses based on the pairwise gene flow estimates *M* between brown hare haplogroups. Arrows indicates direction of gene flow. The red color corresponds to the mitochondrial D loop sequences, the green to the *MT-ND2* and the blue to the *MT-ND6* gene.*

Slika 14. Mapa distribucije posteriornih verovatnoća za pripadnost jedinki vrste *Lepus europaeus* odgovarajućim klasterima označenim različitim bojama na osnovu prostorne analize sekvenci D petlje mitohondrijske DNK. Najtamniji regioni odgovaraju najvećim verovatnoćama za pripadnost grupama. Geografske lokacije jedinki su predstavljene crnim tačkama. 55

Figure 14. Map of posterior probabilities of cluster membership based on spatial clustering of mitochondrial D loop sequences in brown hares from Europe and Asia Minor. Darker areas correspond to higher probability to belong to the demersal cluster, while sampling locations are indicated by black dots.

Slika 15. Mapa distribucije posteriornih verovatnoća za pripadnost jedinki vrste *Lepus europaeus* odgovarajućim klasterima označenim različitim bojama na osnovu prostorne analize sekvenci *MT-ND2* gena mitohondrijske DNK. Najtamniji regioni odgovaraju najvećim verovatnoćama za pripadnost grupama. Geografske lokacije jedinki su predstavljene crnim tačkama. 57

Figure 15. Map of posterior probabilities of cluster membership based on spatial clustering of mitochondrial NADH Dehydrogenase subunit 2 gene sequences in brown hares from Europe and Asia Minor. Darker areas correspond to higher probability to belong to the demersal cluster, while sampling locations are indicated with black dots.

Slika 16. Mapa distribucije posteriornih verovatnoća za pripadnost jedinki vrste *Lepus europaeus* odgovarajućim klasterima označenim različitim bojama na osnovu prostorne analize sekvenci MT-ND6 gena mihondrijske DNK. Najtamniji regioni odgovaraju najvećim verovatnoćama za pripadnost grupama. Geografske lokacije jedinki su predstavljene crnim tačkama. 59

Figure 16. Map of posterior probabilities of cluster membership based on spatial clustering of mitochondrial NADH Dehydrogenase subunit 6 gene sequences in brown hares from Europe and Asia Minor. Darker areas correspond to higher probability to belong to the demersal cluster, while sampling locations are indicated with black dots.

Slika 17. Median-joining mreža alela MHC-DQA gena vrste *Lepus europaeus*. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnosti različitim vrstama roda *Lepus*. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Isprekidanim linija su zaokruženi aleli koji odgovaraju identičnim proteinskim varijantama. 69

Figure 17. Median-joining network of MHC-DQA alleles of Lepus europaeus. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to Lepus species membership. Red circles represent median vectors. Each allele code for a different amino-acid variants. Only if two or more alleles code for one and the same protein variant, the respective alleles are encircled by dashed lines.

Slika 18. Median-joining mreža alela MHC-DQB gena vrste *Lepus europaeus*. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnosti različitim vrstama roda *Lepus*. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Isprekidanim linija su zaokruženi aleli koji odgovaraju identičnim proteinskim varijantama. 70

Figure 18. Median-joining network of MHC-DQB alleles of Lepus europaeus. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to Lepus species membership. Red circles represent median vectors. Each allele code for a different amino-acid variants. Only if two or more alleles code for one and the same protein variant, the respective alleles are encircled by dashed lines.

Slika 19. Median-joining mreža alela TLR2 gena vrste *Lepus europaeus*. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnosti različitim vrstama roda *Lepus*. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Isprekidanim linija su zaokruženi aleli koji odgovaraju identičnim proteinskim varijantama TLR2A-TLR2F. 71

Figure 19. Median-joining network of TLR2 alleles of Lepus europaeus. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to Lepus species membership. Red circles represent median vectors. Dashed lines encircle different protein variants TLR2A-TLR2F.

Slika 20. Prikaz prostorne distribucije diverziteta gena imunskog sistema kod vrste *Lepus europaeus* na osnovu vrednosti prve sPCA komponente interpoliranih na geografsku mapu. 72

Figure 20. Plot showing lagged spatial principal components analysis (sPCA) scores for the spatial principle component showing the spatial distribution of immune genes diversity in brown hares.

LISTA TABELA

Tabela 1. Osnovni parametri molekularnog diverziteta D petlje (DL) i gena za subjedinicu 2 i 6 NADH dehidrogenaze (*MT-ND2* i *MT-ND6*) mitohondrijske DNK kod jedinki vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. 41

Table 1. Molecular diversity parameters for the mitochondrial D loop (DL) and NADH Dehydrogenase subunit 2 and 6 genes (ND2 and ND6) in Lepus europaeus individuals from Europe and Asia Minor.

Tabela 2. Osnovni parametri molekularnog diverziteta za prostorne grupe vrste *Lepus europaeus* određene na osnovu analize sekvenci D petlje mitohondrijske DNK..... 55

Table 2. Molecular diversity indices of the brown hare spatial groups as determined by the spatial clustering of D loop mitochondrial sequence.

Tabela 3. Vrednosti genetičke diferencijacije na osnovu Φ_{ST} parametra između prostornih grupa definisanih analizom sekvenci D petlje mitohondrijske DNK vrste *L. europaeus* ispod dijagonale, kao i broj migranata po generaciji prikazan sa gornje strane dijagonale. 56

Table 3. Pairwise Φ_{ST} values between brown hare spatial groups revealed by the analysis of D loop mitochondrial sequences below diagonal, and their respective average number of migrants per generation above diagonal.

Tabela 4. Osnovni parametri molekularnog diverziteta za prostorne grupe vrste *Lepus europaeus* određene na osnovu analize sekvenci *MT-ND2* gena. 57

Table 4. Molecular diversity indices of the brown hare spatial groups as determined by the spatial clustering of MT-ND2 gene sequences.

Tabela 5. Vrednosti genetičke diferencijacije na osnovu Φ_{ST} parametra između prostornih grupa definisanih analizom sekvenci *MT-ND2* gena vrste *L. europaeus* ispod dijagonale, kao i broj migranata po generaciji prikazan sa gornje strane dijagonale. 58

Table 5. Pairwise Φ_{ST} values between brown hare spatial groups revealed by the analysis of MT-ND2 gene sequences below diagonal, and their respective average number of migrants per generation above diagonal.

Tabela 6. Osnovni parametri molekularnog diverziteta za prostorne grupe vrste *Lepus europaeus* određene na osnovu analize sekvenci *MT-ND6* gena. 59

Table 6. Molecular diversity indices of the brown hare spatial groups as determined by the spatial clustering of MT-ND6 gene sequences.

Tabela 7. Vrednosti genetičke diferencijacije na osnovu Φ_{ST} parametra između prostornih grupa definisanih analizom sekvenci *MT-ND6* gena vrste *L. europaeus* ispod dijagonale, kao i broj migranata po generaciji prikazan sa gornje strane dijagonale. 60

Table 7. Pairwise Φ_{ST} values between brown hare spatial groups revealed by the analysis of MT-ND6 gene sequences below diagonal, and their respective average number of migrants per generation above diagonal.

Tabela 8. Rezultati testova neutralnosti za sekvence gena za subjedinice 2 i 6 mitohondrijske NADH dehidrogenaze kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	60
<i>Table 8. Results of the neutrality tests for the mitochondrial NADH subunit 2 and 6 genes in brown hares.</i>	
Tabela 9. Rezultati PAML analize za mitohondrijske gene za subjedinicu 2 i 6 NADH dehidrogenaze kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	61
<i>Table 9. Results of the PAML analysis for the mitochondrial NADH subunit 2 and 6 genes in brown hares.</i>	
Tabela 10. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja binomijalnog regresionog modela distribucije ND2 proteinskih varijanti kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	63
<i>Table 10. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the binary logistic model of the occurrence of ND2 protein variants in brown hares after model averaging.</i>	
Tabela 11. Sumarni prikaz rezultata binomijalnog regresionog modela distribucije ND2 proteinskih varijanti kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	63
<i>Table 11. Summary results of the binomial logistic regression model of occurrence of ND2 protein variants in brown hares.</i>	
Tabela 12. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnih regresionih modela distribucije ND6 proteinskih varijanti kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	64
<i>Table 12. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of ND6 protein variants in brown hares after model averaging.</i>	
Tabela 13. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije ND6 proteinskih varijanti kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	65
<i>Table 13. Summary results of the parameters of the multinomial regression model of occurrence of ND6 protein variants in brown hares.</i>	
Tabela 14. Parametri molekularnog diverziteta kod ispitivanih gena imunskog sistema vrste <i>Lepus europaeus</i>	66
<i>Table 14. Molecular diversity indices of immune genes of Lepus europaeus.</i>	
Tabela 15. Parametri molekularng diverziteta gena imunog sistema u prostornim grupama vrste <i>Lepus europaeus</i>	72
<i>Table 15. Molecular diversity indices of immune genes in brown hare spatial groups.</i>	
Tabela 16. Rezultati testova neutralnosti za gene imunog sistema kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	73
<i>Table 16. Results of the neutrality test for immune genes in brown hares.</i>	
Tabela 17. Rezultati kodon-zasnovanih analiza za detekciju prirodne selekcije na Datamonkey serveru kod jedinki vrste <i>Lepus europaeus</i>	74
<i>Table 17. Results of the codon-based selection screening methods as implemented on the Datamonkey web server for brown hares.</i>	
Tabela 18. Rezultati PAML analize za ispitivane gene imunskog sistema kod vrste <i>Lepus europaeus</i>	75
<i>Table 18. Results of the PAML analysis for immune genes in brown hares.</i>	

Tabela 19. Testovi intralokusnih rekombinacija (r^2 , D' and $G4$), stopa mutacija ($\theta = 4 N\mu$) i rekombinacija ($\rho = 4 Nr$) kod jedinki vrste *Lepus europaeus*. 76

Table 19. Tests of presence of intralocus recombination (r^2 , D' and $G4$) and population mutation (Wattersons $\theta = 4 N\mu$) and the recombination rate ($\rho = 4 Nr$) in brown hares.

Tabela 20. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA6 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus*. 78

Table 20. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA6 protein variants in brown hares after model averaging.

Tabela 21. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA6 proteinsku varijanti kod vrste *Lepus europaeus*. 78

Table 21. Summary results of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA6 protein variants in brown hares.

Tabela 22. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA1 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus*. 79

Table 22. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA1 protein variants in brown hares after model averaging.

Tabela 23. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA1 proteinsku varijanti kod vrste *Lepus europaeus*. 79

Table 23. Summary results of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA1 protein variants in brown hares.

Tabela 24. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA10 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus*. 80

Table 24. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA10 protein variants in brown hares after model averaging.

Tabela 25. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA10 proteinsku varijanti kod vrste *Lepus europaeus*. 80

Table 25. Summary results of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA10 protein variants in brown hares.

Tabela 26. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA11 proteinsku varijanti kod vrste *Lepus europaeus*. 80

Table 26. Summary results of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA11 protein variants in brown hares.

Tabela 27. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQB1 proteinsku varijanti kod vrste *Lepus europaeus*. 81

Table 27. Summary results of the multinomial regression model of occurrence of genotypes containing the DQB1 protein variants in brown hares.

Tabela 28. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže MHC-DQB3 proteinsku varijanti kod vrste *Lepus europaeus*. 82

Table 28. Summary results of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQB3 protein variants in brown hares.

Tabela 29. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže najzastupljenije proteinske varijante *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena kod vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Anadolije i Izraela. 83

Table 29. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression models of occurrence of genotypes containing the respective most frequent protein variants of MHC-DQA and MHC-DQB genes in brown hares from Anatolia and Israel after model averaging.

Tabela 30. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnog regresionog modela distribucije heterozigotnosti kod vrste *Lepus europaeus*. 84

Table 30. Relative variable importance (RVI) of the multinomial regression models of heterozygosity in brown hares after model averaging.

LISTA PRILOGA

Prilog I Lista uzoraka sa državama uzorkovanja i oznakama uočenih haplotipova za D petlju mitohondrijske DNK (DL), gen za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze (*MT-ND2*) i gen za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze (*MT-ND6*). 130

Appendix I List of samples with country locations and mitochondrial DNA haplotype designations for D-loop (DL), NADH Dehydrogenase subunit 2 (MT-ND2) and NADH dehydrogenase subunit 6 (MT-ND6).

Prilog II Lista verovatnoća za odgovarajuće parove haplotipova/alela nakon određivanja gametske faze primenom PHASE algoritma za sva tri ispitivana jedarna markera (*MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gen). 135

Appendix II Confidence probabilities for most likely haplotype/allele pairs after gametic phase imputation with the PHASE algorithm for the examined nuclear molecular markers (MHC-DQA, MHC-DQB and TLR 2 gene).

Prilog III Geografska distribucija i zastupljenost proteinskih varijanti gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze kod jedinki vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije 140

Appendix III Geographic distribution and frequencies of NADH Dehydrogenase subunit 2 protein variants by countries in brown hares from Europe and Asia Minor.

Prilog IV Geografska distribucija i zastupljenost proteinskih varijanti gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze kod jedinki vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije 141

Appendix IV Geographic distribution and frequencies of NADH Dehydrogenase subunit 6 protein variants by countries in brown hares from Europe and Asia Minor.

Prilog V Zastupljenosti alela kod MHC klase II *DQA* gena po zemljama uzorkovanja vrste *Lepus europaeus* 142

Appendix V Allele frequencies of the MHC class II DQA gene in brown hares by countries.

Prilog VI Zastupljenosti alela kod MHC klase II *DQB* gena po zemljama uzorkovanja vrste *Lepus europaeus* 143

Appendix VI Allele frequencies of the MHC class II DQB gene in brown hares by countries

Prilog VII Zastupljenosti alela kod *TLR2* gena po zemljama uzorkovanja vrste *Lepus europaeus* 145

Appendix VII Allele frequencies of the TLR2 gene in brown hares by countries.

Prilog VIII Bajesova filogenetska stabla evolucionih odnosa između alela *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena jedinki vrste *L. europaeus*. Na čvorovima su prikazane vrednosti *posterior* verovatnoće. 146

Appendix VIII Rooted Bayesian phylogenetic tree reconstructed using brown hares MHC-DQA, MHC-DQB and TLR2 gene sequences. Posterior probabilities are shown at the nodes.

1. UVOD

Evropski zec (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) predstavlja jednu od najvažnijih vrsta lovne divljači u Evropi koja naseljava različite tipove staništa od Mediterana do subarktičkog regiona, a koja je zahvaljujući svojoj velikoj ekološkoj plastičnosti uspešno introdukovana i na teritoriju Argentine, Severne Amerike, Australije, Novog Zelanda, tropskih i subantartičkih ostrva (Flux i Angermann, 1990). Počev od šezdesetih godina prošlog veka, uočen je drastičan pad brojnosti ove vrste širom evropskog kontinenta. Uočeni pad brojnosti incirao je brojna ekološka i genetička istraživanja sa ciljem određivanja mogućih uzroka, među kojima se navode: intenzivni razvoj poljoprivrede, praćen redukcijom heterogenosti staništa, povećanje površine useva i smanjenje raznovrsnosti gajenih kultura (Smith i sar., 2005), povećani broj predatora (Panek, 2013), prekomerni lov i klimatske promene (Smith i sar., 2005), kao i pojava patogena (Wibbelt i Frölich, 2005). Najveći broj do sada sprovedenih genetičkih istraživanja koristio je adaptivno neutralne molekularne markere (mitohondrijska DNK (mtDNK) i mikrosateliti) ili proteinske markere niske rezolucije (alozimi) sa ciljem utvrđivanja stepena genetičke diferencijacije i varijabilnosti prirodnih populacija ove vrste, određivanja evolucione istorije, kao i razumevanja uticaja čoveka i promena sredine na demografske parametre i protok gena. Istraživanja bazirana na adaptivno neutralnim molekularnim markerima ne mogu da ukažu na mehanizme koji su odgovorni za oblikovanje adaptivne varijabilnosti, kao ni na relativni doprinos različitih mikroevolucionih procesa i udeo prirodne selekcije u održavanju adaptivne varijabilnosti. U tom smislu razumevanje funkcionalnog genetičkog diverziteta ima ogromnu ulogu u otkrivanju uzroka varijacija u fitnessu, kao i u razumevanju procesa koji mogu da utiču na populacionu adaptabilnost. Jedni od najboljih genetičkih markera, kandidata za razumevanje adaptivnog potencijala prirodnih populacija jesu geni imunskog sistema usled njihove direktne veze sa odgovorom na patogene kao selektivne pritiske iz okoline. Naime, ukoliko selekcija varira vremenski i/ili prostorno i ako različiti aleli gena imunskog sistema poseduju prednost u različitim sredinskim uslovima, onda je moguće uočiti signale lokalnih adaptacija (Froeschke i Sommer, 2014). Selekcija teži da održi viši nivo genetičkog diverziteta u funkcionalno važnim lokusima, uprkos redukciji u varijabilnosti drugih delova genoma. Samim tim, upotreba genetičkih markera povezanih sa adaptivnim osobinama, uključujući i gene odgovorne za imunski odgovor, predstavlja neophondan korak u razvoju pravilnih mera i strategija održivog razvoja i programa upravljanja prirodnim populacijama divljih životinja.

Lokalne imunogenetičke adaptacije domaćina koji naseljavaju različita staništa, uslovljene su pritiscima od strane različitih patogena, čiji je diverzitet u direktnoj vezi sa sredinskim komponentama (npr. gustina i pokrivenost vegetacije, klimatske karakteristike, fragmentacija staništa). Naime, sredinski uslovi imaju važnu ulogu u regulaciji distribucije, transmisije kao i razvojnog uspeha parazita i patogena, budući da su meteorološki uslovi, pre svega temperatura, godišnja precipitacija, vlažnost vazduha, kao i količina padavina važni faktori koji utiču na raznovrsnost i prostornu distribuciju mnogih patogena (Guernier i sar., 2004; Dunn i sar., 2010). Kao posledica ovoga očekuje se da je imunogenetički diverzitet specifičan za određene tipove staništa kao rezultat adaptacija na lokalne/regionalne grupe patogena, radije nego da je distribucija imunovarijabilnosti prostorno slučajna. Sa druge strane, iako je mtDNK u širokoj upotrebi kao marker izbora za rekonstrukciju filogenetskih odnosa, sve češće se dovodi u pitanje njena selektivna neutralnost (Ballard i Whitlock, 2004). Iako se mtDNK može posmatrati kao jedinstven nerekombinantni blok, kodirajući i nekodirajući delovi ovog molekula pokazuju različite mutacione stope, usled većeg selektivnog pritiska koji deluje na gene uključene u sintezu funkcionalnih proteina. Nekoliko studija je već ukazalo da geografska distribucija mtDNK varijanti može biti posledica klimatskih adaptacija (Balloux i sar., 2009; Morales i sar., 2015; Harrisson i sar., 2016). Zapravo geni uključeni u proces oksidativne fosforilacije (OXPHOS) zajedno sa jedarnim genima kodiraju komponentne elektron transportnog lanca koji daje energiju neophodnu za metaboličke procese, samim tim klimatski parametri (pre svega temperatura i precipitacija) mogu da utiču na favorizovanje onih proteinskih varijanti kojima se postiže najveća moguća efikasnost procesa ćelijskog disanja pri različitim uslovima spoljašnje sredine (Lowell i Spiegelman, 2000; Tieleman i sar., 2003).

U svetlu globalnih promena uslova spoljašnje sredine, planiranje programa genetičkog monitoringa, kao i razvijanje strategija za održivo upravljanje prirodnim populacijama trebalo bi da se zasniva na sveobuhvatnom sagledavanju molekularnog diverziteta primenom kako adaptivno neutralnih, tako i molekularnih markera koji su pod dejstvom selekcionih signala. Sagledavanjem funkcionalnog molekularnog diverziteta omogućava se uočavanje signala lokalnih adaptacija, što je posebno važno kod vrsta sa širokim arealom koje naseljavaju heterogena staništa. Geni imunskog sistema predstavljaju dobre kandidate za uočavanje lokalnih imunogenetičkih adaptacija kod domaćina koji naseljavaju različita staništa, usled razlika u diverzitetu i brojnosti patogena koja je u direktnoj vezi sa sredinskim karakteristikama. Prethodna istraživanja prostorne distribucije genetičke varijabilnosti *MHC*-

DQA i *MHC-DQB* gena kod vrste *Lepus capensis* ukazala su na uticaj temperature i precipitacije na distribuciju proteinskih varijanti ispitivanih gena kao adaptivni odgovor na pretpostavljene lokalne razlike u distribuciji patogena (Awadi i sar., 2018b). Sa druge strane, selekcija na mitohondrijske gene uključene u važne metaboličke puteve kao što je proces ćelijskog disanja može dovesti do populacione divergencije i uočavanja lokalnih adaptacija usled različitih energetske zahteva pri različitim sredinskim – klimatskim uslovima. Nekoliko studija do sada ukazalo je na prisustvo pozitivne selekcije u genima OXPHOS kompleksa kod različitih vrsta roda *Lepus* (Melo-Ferreira i sar., 2014a; Ben Slimen i sar., 2018), kao i uticaj klimatskih karakteristika na distribuciju proteinskih varijanti gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze, kao i gena za subjedinicu 6 ATP sintetaze kod vrste *Lepus capensis* (Ben Slimen i sar., 2017).

Imajući u vidu sve navedeno, sagledavanje funkcionalnog diverziteta, kao i uočavanje signala lokalnih/regionalnih adaptacija kod vrste *Lepus europaeus* je posebno važno budući da ova vrsta poseduje širok areal, koji obuhvata različite tipove staništa. Pored toga, pripadnici vrste *Lepus europaeus* odgajaju svoje mlade iznad zemlje od prvog dana rođenja, bez zaštite od uslova spoljašnje sredine, a sam razvoj u prvih nekoliko nedelja je veoma intenzivan, pri čemu mladunci uvećavaju svoju telesnu težinu i do osam puta (Göritz i sar., 2001). Činjenica da su mladunci izloženi direktnom uticaju sredinskih karakteristika od samog rođenja, kao i veoma brz razvoj u prvim nedeljama života ukazuje na potrebu za efikasnim imunskim sistemom kako bi se osigurala dovoljna količina energije potrebna za sve fiziološke procese. Samim tim, imajući u vidu drastičan pad brojnosti populacija ove vrste širom Evrope, heterogenost uslova sredine koje naseljavaju, kao i brojne infektivne i parazitske bolesti za koje je pokazano da utiču na regionalno preživljavanje, molekularni markeri bazirani na genima imunskog sistema, kao i genima koji kodiraju komponentne OXPHOS sistema čine se kao odlični kandidati za sagledavanje varijabilnosti funkcionalnog molekularnog diverziteta vrste *L. europaeus*, kao i uočavanje regionalnih adaptacija kod ove vrste. Kombinovanim pristupom, odnosno integracijom rezultata dobijenih analizama neutralnih molekularnih markera, kao i rezultata dobijenih primenom molekularnih markera koji su pod dejstvom selekcije omogućio bi se razvoj pravilnih mera i strategija za održivo upravljanje prirodnim populacijama ove vrste.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Opšte karakteristike vrste *Lepus europaeus*

Rod *Lepus* je politipski rod u okviru porodice Leporidae sisarskog reda Lagomorpha, koji karakteriše eksplozivna diverzifikacija u toku poslednjih dva do dva i po miliona godina (Robinson i Matthee, 2005). Vrsta *Lepus europaeus* Pallas, 1778 (Sl. 1) pripada najbrojnijem rodu porodice Leporidae, sa sledećom sistematskom pozicijom:

Regnum	Animalia
Phylum	Chordata
Classis	Mammalia
Ordo	Lagomorpha
Familia	Leporidae
Genus	<i>Lepus</i>
Species	<i>Lepus europaeus</i>

Usled odsustva jasnih fenotipskih razlika, kao i simpatričkih odnosa između različitih predstavnika roda *Lepus*, taksonomski status unutar ovog roda još uvek nije potpuno razjašnjen. Vrsta *L. europaeus* je bila smatrana konspecijском formom vrste *Lepus capensis*, ali su rezultati morfoloških i genetičkih analiza ukazali na značajan nivo divergencije koji jasno odvaja *L. europaeus* kao zasebnu vrstu. Unutar same vrste *L. europaeus* opisano je 16 podvrsta na osnovu morfoloških karakteristika, ali je njihova taksonomska legitimnost upitna, budući da njihovo opisivanje nije podržano analizom molekularnih podataka.



Slika 1. Vrsta *Lepus europaeus* Pallas, 1778 / Figure 1. *Lepus europaeus* Pallas, 1778

(izvor/source: https://animaldiversity.org/accounts/Lepus_europaeus/)

Vrsta *L. europaeus* pokazuje evroazijsku distribuciju, a areal obuhvata gotovo čitav evropski kontinent od mediteranskog do subarktičkog regiona, kao i Malu Aziju, sve do severnih delova Bliskog Istoka, odakle je prirodnom disperzijom naselila i region zapadnog i

istočnog Sibira, kao krajnji istok Rusije (Flux i Angerman, 1990). *Lepus europaeus* je uspešno introdukovan i na teritoriju Irske, severne i južne Amerike, kao i Australije i Novog Zelanda.

Lepus europaeus je visoko prilagodljiva vrsta koja naseljava različite tipove staništa umerenih, tropskih i subarktičkih klimatskih regiona, i do 2400 metara nadmorske visine (Hackländer i Schai-Braun, 2018). Jedinke ove vrste najzastupljenije su na otvorenim, ravničarskim staništima, sa razbacanim grmovima, kao i na oranicama na kojima se uzgajaju pšenica i ječam (Mitchell-Jones i sar., 1999). Pripadnici vrste *L. europaeus* su herbivore koje pokazuju sklonost ka biljnoj hrani bogatoj masnim kiselinama, dok tokom zimskih meseci u ishrani koriste i kore stabala, kao i terminalne izdanke žbunastog drveća. U proseku, dužina tela iznosi oko 680 mm, sa krznom koje je sivkasto-braon obojenosti, i bez izraženog polnog dimorfizma. Sedentarne su životinje, koje su uglavnom aktivne tokom noći, kao i pred sumrak i u zoru. Sezona parenja počinje krajem zime, i traje do početka jeseni, iako se u pogodnim uslovima spoljašnje sredine sezona parenja može odigravati tokom čitave godine. Vreme gestacije traje oko 42 dana, a ženka rađa u proseku tri mladunčeta. Fiziološka starost je procenjena na osam do 12 godina, dok je generacijsko vreme procenjeno na jednu godinu (Macdonald i Barrett, 2002; Hackländer i Schai-Braun, 2018).

Gustina populacije ove vrste veoma varira u okviru areala sa prosečnom vrednošću od dve jedinke na 100 ha (Schai-Braun i Hackländer, 2016). Ipak, i pored izrazitih prirodnih fluktuacija, počev od 1960.-ih godina, uočava se drastičan pad brojnosti populacija vrste *L. europaeus* širom Evrope. Degradacija staništa, praćena razvojem moderne poljoprivrede, kao i prekomerna upotreba pesticida i đubriva se navode kao najvažniji uzroci uočenog pada brojnosti populacija ove vrste (Smith i sar., 2005). Naime, povećanjem obradivih površina, uklanjanjem neobradivih margina sa žbunastim biljem između oranica, kao i smanjenjem raznovrsnosti gajenih kultura, direktno se uništavaju preferirana staništa ove vrste, a ujedno smanjuje i dostupnost kvalitetne ishrane, budući da jedinke ove vrste pokazuju visoku selektivnost ka određenim biljnim kulturama (Butler i sar., 2007; Schai-Braun i sar., 2015). Pored toga, kao dodatni uzroci navode se i povećan broj predatora, pre svega vrste *Vulpes vulpes* (Goszczyński i Wasilewski, 1992), nepovoljni klimatski uslovi (van Wieren i sar., 2006), prekomerni lov, kao i lokalne epidemije bolesti, kao što su npr. EBHS, pastereloza, pseudotuberkuloza, kokcidoza i druge (Rattenborg, 1994; Frandölich i sar., 2003; Wibbelt i Fröhlich, 2005). Iako je prema klasifikaciji IUCN vrsta *L. europaeus* označena kao vrsta niske verovatnoće od opasnosti iščezavanja, kategorije LC, odnosno kao vrsta od poslednje

brige (eng. *LC – Least Concern*), uočeni pad brojnosti uslovio je njeno uvrštavanje u Dodatak III Bernske konvencije, dok je na regionalnom nivou pad brojnosti rezultovao uvođenjem ove vrste u nacionalne Crvene knjige u Austriji, Nemačkoj, Norveškoj i Švajcarskoj (Reichlin i sar., 2006).

Pripadnici vrste *L. europaeus* imaju značajnu ulogu u ekosistemima, čineći jednu od najvažnijih vrsta plena u agroekosistemima, ali i u sveukupnom protoku materije i energije. Naime, pokazano je da gustina populacije ove vrste od 50 jedinki po hektaru, u toku jedne godine može stvoriti i više od jedne tone đubriva (Vapa i sar., 2007). Pored toga, *L. europaeus* se smatra važnom vrstom i u lovnoj ekonomiji, dok se meso ove vrste koristi i u ishrani, i to posebno u regionima južne Amerike gde je ova vrsta introdukovana (Bonino i sar., 2010). Nasuprot regionima u kojima im je brojnost u opadanju, u regionima u kojima su introdukovane, posebno u delovima južne Amerike, Australije i Novog Zelanda, jedinke vrste *L. europaeus* su okarakterisane kao štetočine koje ugrožavaju poljoprivredna dobra i šumske ekosisteme, stupaju u interspecijsku kompeticiju i utiču na promene u lancima ishrane (Bonino i sar., 2010). U regionima u kojima je introdukovana, zabeleženi su i slučajevi interspecijske hibridizacije sa vrstom *Lepus timidus* (Fredsted i sar., 2006; Thulin i sar., 2006).

2.2 Molekularni diverzitet prirodnih populacija životinja

Sagledavanje i očuvanje biodiverziteta, kao sveobuhvatne raznovrsnosti živog sveta na genetičkom, specijskom i ekosistemskom nivou, predstavlja jedno od centralnih bioloških pitanja. Klimatske promene, kao i degradacija staništa uslovljena čovekovom aktivnošću prepoznate su kao najvažniji faktori koji negativno utiču na biodiverzitet (Hoffmann i sar., 2010). Sposobnost populacija različitih vrsta da odgovore na stalno promenljive uslove sredine uslovljena je adaptivnim potencijalom svake individue koji karakteriše fiziološka fleksibilnost, fenotipska plastičnost, kao i genetička varijabilnost (Razgour i sar., 2018). U tom smislu sagledavanje genetičke varijabilnosti zauzima centralno mesto u razumevanju raznovrsnosti živog sveta, imajući u vidu da upravo genetička varijabilnost ukazuje na evolucionu potencijal vrsta da odgovore na stalno promenljive uslove sredine u dugoročnom vremenskom period (Frankham i sar., 2002). Genetička varijabilnost u prirodnim populacijama životinja može se definisati kao distribucija alela i genotipova u vremenu i prostoru, nastala kao rezultat uzajamnog delovanja stohastičkih i determinističkih faktora –

mutacija, genetičkog drifta, protoka gena i prirodne selekcije, kako u prošlosti, tako i u sadašnjosti (Nei, 1987; Lynch i Walsh, 2007). Geološki događaji, kao i izražene klimatske promene tokom Pleistocena predstavljaju najizraženije istorijske faktore koji su uticali na demografsku istoriju i oblikovanje savremenih obrazaca molekularnog diverziteta kod mnogih vrsta Paleoarktika (Hewitt, 1999). Sa druge strane, čovek je svojom neposrednom aktivnošću takođe uticao na oblikovanje intraspecijske genetičke varijabilnosti, i to u najvećoj meri kroz njenu redukciju usled fragmentacije staništa. Naime, fragmentacija staništa vodi u stvaranje izolovanih grupa jedinki, čime se smanjuje protok gena i pojačava genetička divergencija između populacija, a usled smanjenja veličine populacije dolazi i do snažnijeg iskazivanja efekta ukrštanja u srodstvu (Frankham i sar., 2002). U tom smislu, delovanje i složeni odnosi svih, kako istorijskih, tako i savremenih evolucionih procesa rezultovali su obrascima intraspecijske varijabilnosti vrsta, čije je sagledavanje neophodan korak u definisanju evolucionog potencijala prirodnih populacija životinja. Sagledavanje molekularne varijabilnosti primenom različitih genetičkih markera pokazuje tradiciju dugu već nekoliko decenija (Avice, 2004). Naime, počev od 60.-ih godina prošlog veka i razvoja metode proteinske elektrofereze, preko otkrića lančane reakcije polimeraze, automatizacije Sangerovog metoda sekvencioniranja, pa do razvoja metoda nove generacije za sekvenciranje čitavih genoma, došlo je do prave revolucije i razvoja najrazličitijih pristupa i metoda za analizu genetičkog diverziteta u prirodnim populacijama.

U analizi nivoa genetičke varijabilnosti u prirodnim populacijama divljih životinja najčešće se koriste adaptivno neutralni molekularni markeri, kao što je mitohondrijska DNK, mikrosateliti ili polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (SNP) (Grover i Sharma, 2016). Iako primena adaptivno neutralnih molekularnih markera omogućava sagledavanje filogenetskih odnosa, populacione istorije (efekat *bottleneck-a*), vremena divergencije, stepena genetičke diferencijacije i stope protoka gena između populacija, kao i rodbinske odnose i stepen srodnosti između jedinki, varijabilnost u adaptivno neutralnim lokusima ne može da ukaže na direktne informacije o selektivnim procesima koji oblikuju interakciju individua sa sredinom, kao ni na potencijal populacije za adaptivni odgovor. Često se evolucioni procesi mogu odvijati u kratkom vremenskom periodu, svega nekoliko decenija, čime vremenski period od divergencije populacija može biti prekratak da bi se taj signal uočio posmatranjem adaptivno neutralnih lokusa, te se populaciona diferencijacija može uočiti samo posmatranjem lokusa pod dejstvom selekcije (Stockwell i sar., 2003). Drugim rečima, u analizama molekularnog diverziteta prirodnih populacija pored upotrebe adaptivno neutralnih molekularnih markera

neophodno je koristiti i visoko polimorfne funkcionalne markere koji su pod direktnim selekcionim pritiskom (Kirk i Freeland, 2011). Kao adaptivni molekularni markeri najčešće se koriste geni uključeni u imunski odgovor, kao i geni odgovorni za reproduktivni uspeh i neke fiziološke funkcije (Ujvari i Belov, 2011). U poslednje dve decenije najčešće korišćeni markeri ovog tipa su geni glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC), čija je varijabilnost u direktnoj vezi sa mogućnošću jedinki da odgovore na različite patogene iz spoljašnje sredine kao permanentni selekциони pritisak.

2.3. Mitohondrijska DNK kao molekularni marker u analizama prirodnih populacija

Mitohondrije eukariota, organele sa ključnom ulogom u procesu oksidativne fosforilacije (OXPHOS) i proizvodnji energije u formi ATP-a, u svom matriksu sadrže vanjedarni genom prisutan u velikom broju kopija. Mitohondrijski genom sisara predstavlja dvolančana kružna DNK molekula veličine oko 17000 bp, u čijem sastavu je 13 protein-kodirajućih gena, 22 gena za transportne RNK, dva gena za ribozomske RNK (12S i 16S rRNK), kao i kontrolni region ili D petlja (engl. *displacement loop*) koja sadrži mesta za kontrolu procesa replikacije i transkripcije (Gissi i sar., 2008). Najveći deo mtDNK molekula čine jedinstvene sekvence, sa gotovo potpunim odsustvom intergenskih regiona, kao i odsustvom introna. Zahvaljujući haploidnoj strukturi genoma, visokoj stopi supstitucija, uniparentalnom načinu nasleđivanja, kao i pretpostavljenoj selektivnoj neutralnosti i odsustvu rekombinacija, mtDNK ima višedecenijsku primenu kao najčešći marker izbora u filogenetskim, filogeografskim, populaciono-genetičkim, kao i taksonomskim studijama (Arif i sar., 2011). Naime, visoka stopa supstitucija i njena heterogenost unutar samog mtDNK molekula, nastala kao rezultat ograničenih mehanizama popravke, nepostojanje histona, te direktna izloženost visoko reaktivnim kiseoničnim radikalima u mitohondrijskom matriksu, rezultuje u visokoj nukleotidnoj varijabilnosti i omogućava uočavanje multiplih genetičkih linija u istorijski kratkim vremenskim periodima na nivou različitih taksonomskih kategorija (Lynch, 2010). Haploidna struktura mtDNK, odsustvo rekombinacija i uniparentalno nasleđivanje ukazuje da se čitav mtDNK molekul ponaša kao jedan lokus – haplotip u kome sva mesta dele zajedničku genealogiju. Pored toga, usled svoje haploidne strukture, mtDNK čini $\frac{1}{4}$ efektivne veličine populacije jedarne DNK, što je čini veoma pogodnom za praćenje demografskih karakteristika. Selektivna neutralnost mtDNK molekula, kao i pretpostavka teorije molekularnog sata, omogućava da se nivo genetičke divergencije između različitih

mtDNK linija usled konstantne evolucione stope može direktno interpretirati samim vremenom divergencije. Ipak i pored široke upotrebe, varijabilnost mtDNK molekula usled gore navedenih prednosti, u poslednje vreme se sve češće dovodi u pitanje njihova osnovanost. Naime, sve više studija ukazuju na postojanje direkcione selekcije kako na sam molekul mtDNK, tako i indirektno selekcije nastale kao rezultat gametske neravnoteže vezanosti sa drugim maternalnim genima, kao i na prisustvo rekombinacija (Ballard i Whitlock, 2004; Ballard i Rand, 2005; Galtier i sar., 2009).

Pretpostavka selektivne neutralnosti mtDNK molekula nije podrazumevala i njegovu funkcionalnu neutralnost, već su inicijalne studije podrazumevale da je varijabilnost u okviru mtDNK molekula posledica neutralnih, kao i mutacija sa blagim štetnim efektima. Štetne mutacije su usled dejstva purifikujuće selekcije bile vrlo brzo uklanjane bez mogućnosti da utiču na uočenu varijabilnost, koja je samim tim direktno oslikavala neutralne procese, kako i nalaže neutralistička teorija molekularne evolucije (Kimura, 1983). Činjenica da mtDNK sadrži gene uključene u vitalne procese ćelijskog disanja, postojanje visokog nivoa pozicione homologije mitohondrijskih proteina (da Fonseca i sar., 2008), kao i eksperimentalni dokazi o brzom eliminaciji nesinonimnih promena (Stewart i sar., 2008), svi zajedno doprinose hipotezi o udelu negativne selekcije u oblikovanju mtDNK varijabilnosti. Ipak, u poslednje vreme sve više se ukazuje da adaptivni procesi u mtDNK molekulu nisu tako retki, kao i na veoma prisutan uticaj pozitivne selekcije u oblikovanju mtDNK varijabilnosti kod velikog broja različitih životinjskih grupa od *Drosophila* do čoveka (npr. Ballard i Melvin, 2010; Finch i sar., 2014; Silva i sar. 2014; Morales i sar., 2015; Ghiselli i Milani, 2019). Najvažniji evolucionarni mehanizam kroz koji se objašnjava uočavanje adaptivnih obrazaca u mtDNK molekulu leži u osnovi OXPHOS procesa, imajući u vidu da metabolički zahtevi organizama u različitim sredinskim uslovima favorizuju različite varijante koje rezultuju u efikasnijoj i fleksibilnijoj optimizaciji energetske metabolizma (Ballard i Rand, 2005).

Prilikom primene mtDNK kao molekularnog markera, važno je imati na umu i pojavu heteroplazmije, kao i mogućnost umnožavanja tzv. numts regiona (eng. *nuclear mitochondrial DNA sequences*), tj. delova mtDNK koji su transpozicijom postali integralna komponenta jedarnog genoma (Bensasson i sar., 2001).

2.4. Geni imunskog sistema kao molekularni markeri u analizama prirodnih populacija

Prirodne populacije životinja su neprestano izložene različitim patogenima protiv kojih se organizmi bore mehanizmima urođene i stečene imunosti. Imajući u vidu kompleksnost odnosa između patogena i domaćina, razumevanje mehanizama otpornosti prema patogenima zahteva i sagledavanje funkcionalne varijabilnosti u okviru gena uključenih u imunski odgovor (Trowsdale i Parham, 2004). Najoučljivija prednost gena imunskog sistema kao molekularnih markera leži u njihovoj direktnoj povezanosti sa mnogim osobinama fitnesa, te u odnosu na neutralne molekularne markere mogu da ukažu na adaptivni potencijal prirodnih populacija, kao i da objasne uticaj prirodne selekcije u oblikovanju genetičke varijabilnosti u prostoru i vremenu (Acevedo-Whitehouse i Cunningham, 2006; Piertney i Oliver, 2006; Ujvari i Belov, 2011). U poslednje dve decenije u literaturi se kao najčešće korišćeni markeri ovog tipa navode geni koji kodiraju molekule glavnog kompleksa tkivne podudarnosti (MHC; eng. *Major Histocompatibility Complex*), kao i geni koji kodiraju receptore slične Tollu (TLR, eng. *Toll-like receptors*).

MHC geni predstavljaju multigensku familiju koja kodira ključne receptorne molekule koje prepoznaju i vezuju strane peptide, a potom ih prezentuju specijalizovanim ćelijama čime se inicira imunski odgovor (Klein, 1986). MHC geni se odlikuju izrazito visokom varijabilnošću i predstavljaju najpolimorfnije lokuse unutar genoma kičmenjaka (Piertney i Oliver, 2006). U odnosu na strukturu i funkciju, MHC molekuli se mogu podeliti u dve velike grupe, molekule klase I i molekule klase II. Osnovna funkcija MHC molekula klase I jeste prezentacija stranih citosolnih peptida CD8⁺ citotoksičnim T limfocitima i odbrana organizma od intracelularnih antigena - virusa, dok MHC molekuli klase II egozene antigene prezentuju CD4⁺ T pomoćnim limfocitima, i učestvuju u odbrani organizama od bakterija i parazita (Abbas i Lichtman, 2010). MHC molekuli su heterodimeri, koje kod molekula klase I izgrađuje transmembranski protein sa tri ekstracelularna domena ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$), kodiranih različitim egzonima istog gena, nekovalentno vezan za molekul β_2 -mikroglobulina. MHC molekuli klase II su takođe heterodimeri izgrađeni od dva transmembranska proteina, α i β lanca, kodiranih od strane egzona dva različita gena (Abbas i Lichtman, 2010). Najpolimorfniji regioni u okviru MHC molekula su regioni koji izgrađuju udubljenje za vezivanje peptida (PBR, eng. *Peptide Binding Region*), čime se omogućava prepoznavanje širokog spektra različitih antigena. Usled velike polimorfnosti, kao i direktne veze sa sposobnošću prepoznavanja patogena, egzoni gena koji kodiraju PBR domene

(domeni $\alpha 1$ i $\alpha 2$ kod klase I, odnosno domeni $\alpha 1$ i $\beta 1$ kod klase II) su najčešće korišćeni molekularni markeri imunskog sistema (Sommer, 2005; Piertney i Oliver, 2006; Ujvari i Belov, 2011). Visok nivo varijabilnosti unutar MHC gena u najvećem delu posledica je dejstva balansne selekcije, ali je svakako oblikovan i pod uticajem genskih duplikacija i varijacija u broju ponovaka (Bernatchez i Landry, 2003). Balansna selekcija MHC gena proizilazi iz koevolucije domaćina sa patogenima i parazitima, bilo kroz prednost heterozigotnih genotipova ili kroz negativnu selekciju zavisnu od učestalosti alela (Spurgin i Richardson, 2010). Prednost heterozigota podrazumeva bolji fitness kod jedinki heterozigotnih genotipova budući da one iskazuju veći repertoar antigena, te time mogu i da odgovore na veći broj različitih patogena prisutnih u sredini (Doherty i Zinkernagel, 1975). U slučaju selekcije zavisne od učestalosti alela genotipovi koji sadrže retke alele imaju najveći fitness, usled čega se selekcijom povećava njihova učestalost, što je praćeno opadanjem fitnessa usled bolje adaptabilnosti patogena na uobičajene genotipove (Clarke i Kirby, 1966). Pored balansne selekcije, održavanju visoke varijabilnosti MHC gena doprinosi i disasortativno parenje, kao i interkacije MHC alela prisutnih kod majke i fetusa (Sommer, 2005).

Receptori slični Tollu predstavljaju ključnu komponentu urođene imunosti, a kodirani su multigenskom familijom koja kod sisara sadrži od 10 do 12 homologih gena (Takeda i Akira, 2004). TLR molekuli izgrađeni su od tri domena: ekstracelularnog, transmembranskog i intracelularnog TIR domena. Ekstracelularni domen oblika konjske potkovice prepoznaje i vezuje sa patogenima povezane molekularne obrasce (PAMP, *eng. pathogen-associated molecular patterns*), dok intracelularni Toll/Interleukin-1 receptorski domen (TIR, *eng. Toll/Interleukin-1 Receptor Domain*) učestvuje u angažovanju adapterskih molekula i aktivaciji signalne kaskade koja vodi aktiviranju imunskog odgovora (Akira i sar., 2001; Kawai i Akira, 2006). TLR molekuli se na osnovu svoje funkcionalne uloge mogu podeliti na virusne i nevirusne. Virusni TLR molekuli prepoznaju molekularne obrasce poreklom od dvolančanih RNK virusa i DNK virusa (TLR3), jedolančanih RNK virusa (TLR7-8), kao i nemetilovana CpG ostrva tipična za genome DNK virusa (TLR9). Nevirusni TLR molekuli prepoznaju lipoproteine bakterija i parazita (TLR1, TLR2, TLR6 i TLR10), lipopolisaharide Gram negativnih bakterija (TLR4), flageline (TLR5), kao i bakterijsku 23S ribozomsku RNK (TLR13) (Takeda i Akira, 2004). Većina *TLR* gena funkcionalno je ograničena sporom mutacionom stopom, iako ekstracelularni deo molekula pokazuje nešto veću mutacionu stopu (Roach i sar., 2005; Mikami i sar., 2012). Doprinos različitih evolucionih mehanizama u oblikovanju varijabilnosti *TLR* gena još uvek nije potpuno opisan, a dosadašnja istraživanja

su pokazala da je ekstracelularni deo uključen u prepoznavanje PAMP obrazaca pod dejstvom balansne selekcije, dok je intracelularni deo usled konzerviranosti signalnih puteva pod dejstvom purifikujuće selekcije (Chapman i sar., 2016). Najčešće korišćeni TLR geni kao molekularni markeri su *TLR2* i *TLR4* geni usled njihove mogućnosti da prepoznaju najširi opseg patogenih liganada (Mukherjee i sar., 2016).

Kako je imunogenetička varijabilnost povezana ne samo sa otpornošću organizama na patogene, već i sa drugim osobinama fitnesa, kao što je populaciona vijabilnost i reproduktivni uspeh (Hedrick, 2003), geni imunskog sistema kao molekularni markeri omogućavaju ne samo sagledavanje nivoa funkcionalne varijabilnosti u ovim lokusima, već i utvrđivanje molekularnih adaptacija, a korišćeni su i za unapređenje programa uzgoja vrsta u zatočeništvu, kao i prilikom translokacija jedinki ugroženih vrsta u akcijama genetičkog spasavanja (Ujvari i Belov, 2011).

2.5. Primena molekularnih markera u analizama diverziteta vrste *Lepus europaeus*

Sagledavanje genetičke varijabilnosti prirodnih populacija vrste *L. europaeus* započinje još početkom 1990.-ih godina prošlog veka upotrebom proteinskih markera (alozimi), a potom i upotrebom molekularnih markera, najpre markera smeštenih u mitohondrijskom genomu, a zatim i razvojem molekularnih markera jedarnog genoma.

Jedna od prvih primena molekularni markera u analizama vrste *L. europaeus* bila je sa ciljem rasvetljavanja taksonomskog statusa vrsta unutar roda *Lepus*. Naime, taksonomski status mnogih vrsta u okviru roda *Lepus* je bio problematičan, usled odsustva jasnih morfoloških karaktera i pouzdanih citogenetičkih metoda, kao i usled kratke evolucione istorije, nepotpunog linijskog soritranja, mrežaste evolucije, prisustva deljenih ancestralnih polimorfizama, pojave interspecijskih hibridizacija, kao i sekundarnog kontakta hibrida. U tom smislu analize zasnovane na molekularnim podacima omogućile su lakše sagledavanje taksonomskih odnosa i pomogle u rasvetljavanju nekih od taksonomskih nedoumica uslovljenih nedovoljnom rezolucijom morfoloških karakteristika. Naime, taksonomski status vrste *L. europaeus* prolazio je kroz revizije, budući da je ova vrsta smatrana konspecijskom populacijom vrste *Lepus capensis*. Iako su analize jedarnih molekularnih markera ukazale na nizak nivo genetičke diferencijacije između centralnoevropskih i anadolijskih populacija vrste *L. europaeus* u odnosu na severnoafričke populacije vrste *L. capensis*, izrazita

diferencijacija na osnovu markera lociranih u mtDNK ukazala je na dve taksonomski odvojene jedinice (Suchentrunk i sar., 2008). Uočena diskordantnost između jedarnih i mtDNK markera može biti posledica veće stope protoka gena kod mužjaka, kao i izraženije filopatričnosti ženki, ali i usled mogućnosti prisustva introgresije delova mtDNK drugih vrsta roda *Lepus*. Naime, signali davnih introgresija delova genoma mtDNK vrste *Lepus timidus* u mtDNK genom vrste *L. europaeus* zabeleženi su na teritoriji Pirinejskog poluostrva (Alves i sar., 2003; Alves i sar., 2008; Melo-Ferreira i sar., 2005), dok signali introgresije između ove dve vrste nisu uočeni na osnovu analize autozomalnih i markera lociranih na polnim hromozomima (Melo-Ferreira i sar., 2009). Savremeni signali introgresije mtDNK genoma vrste *L. timidus* u mtDNK genom vrste *L. europaeus* uočeni su i u zoni simpatrije ove dve vrste na teritoriji Skandinavije (Thulin i sar., 1997), dok je analizom mtDNK kao i autozomalnih mikrosatelitskih markera uočena i recipročna introgresija genoma vrste *L. europeaus* u genom vrste *L. timidus* na teritoriji Rusije (Thulin i sar., 2006). Iako i na teritoriji Apeninskog, kao i Pirinejskog poluostrva vrsta *L. europaeus* živi u simpatriji sa vrstama roda *Lepus*, savremeni signali interspecijskih hibridizacija nisu uočeni analizom mtDNK i jedarnih molekularnih markera (Estonba i sar., 2006; Mengoni i sar., 2015). Sa druge strane, analiza mtDNK nakon programa intenzivnog puštanja jedinki vrsta *Lepus europaeus* i *Lepus granatensis* na ostrvo Korziku koje nastanjuje vrsta *Lepus corsicanus*, ukazala je na prisustvo interspecijskih hibridizacija između sve tri pomenute vrste, i ukazala na važnost očuvanja genskog fonda vrste *Lepus corsicanus* (Pietri i sar., 2011). Taksonomski status vrste *Lepus corsicanus*, endema karakterističnog za centralnu i južnu Italiju, takođe je prolazio kroz taksonomske revizije, budući da je jedno vreme ova vrsta smatrana podvrstom vrste *L. europaeus*. I u ovom slučaju analiza molekularnih markera, tačnije analiza nukleotidnih sekvenci mtDNK kontrolnog regiona i gena za citohrom b je ukazala na jasno postojanje dve filogenetski odvojene evolucione linije koje su naselile zapadnu Evropu u različitim periodima tokom ranog Pleistocena (Pierpaoli i sar., 1999).

Pored primene u rešavanju taksonomskih pitanja, mtDNK korišćena je i za sagledavanje genetičke varijabilnosti prirodnih populacija vrste *L. europaeus*. Najpre, sagledavanje genetičke varijabilnosti i strukturiranosti populacija vrste *L. europaeus* vršeno je analizom polimorfности dužine restrikcionih fragmenata (RFLP, *engl. Restriction Fragment Length Polymorphism*) sečenjem mtDNK molekula primenom različitih setova restrikcionih endonukelaza. Na ovaj način analizirane su populacije ove vrste sa teritorije centralne Evrope primenom serije od 16 restrikcionih endonukelaza (Hartl i sar., 1993), kao i teritorije Grčke

(Mammuris i sar., 2001) i Srbije (Đan i sar., 2006) gde su najpre umnoženi regioni 12S/16S rDNK, D-petlja i gen za subjedinicu I citohrom c oksidaze (COI) mtDNK molekula, a potom sečeni setom od 20, odnosno osam restrikcionih endonukelaza. Rezultati ovih studija ukazali su na nizak nivo parametara molekularnog diverziteta kako na teritoriji Srbije, gde je otkriveno svega 8 haplotipova kod 77 ispitivanih jedinki sa prosečnom vrednošću diverziteta od 0,349, tako i na teritoriji centralne Evrope gde je prosečan diverzitet haplotipova iznosio 0,158. Nasuprot tome, na teritoriji Grčke uočen je visok nivo genetičkog diverziteta, gde je kod 210 jedinki otkriveno 56 haplotipova sa prosečnom vrednošću diverziteta od 0,853. Pored toga, na teritoriji Grčke, distribucija uočenih haplotipova mtDNK omogućila je i jasnu diferencijaciju između autohtonih jedinki ove vrste, kao i jedinki koje su posledica introgresije alohtonih genofondova prilikom intenzivnih programa translokacija na teritoriju Grčke. Naime rezultati ove studije su dodatno ukazali na neophodnost kontrolisanog vršenja programa translokacija jedinki, i naglasili važnost primene molekularnih markera u asistiranju ovih procesa, kako bi se osiguralo očuvanje lokalno adaptiranih genetičkih varijanti. mtDNK RFLP pristup primenjen je i u analizi populacija vrste *L. europaeus* sa teritorije Poljske gde su umnoženi segmenti gena za citohrom b i D petlju, COI i 16S rDNK gena sečeni serijom od pet restrikcionih endonukleaza, pri čemu je uočeno 17 haplotipova kod 136 ispitivanih jedinki (Strzała i sar., 2008). U odnosu na centralnoevropske populacije ove vrste, rezultati ove studije ukazuju na visok genetički diverzitet na teritoriji Poljske, koji je najveći u jugoistočnim delovima, čime se ukazuje na drugačiju demografsku istoriju ovih populacija i značajan uticaj protoka gena sa teritorije istočne Evrope.

Primena mtDNK u analizi molekularnog diverziteta vrste *L. europaeus*, pre svega varijabilnost D petlje ovog molekula, pronašla je nesumnjivo najveću primenu u rasvetljavanju filogeografske strukture ove vrste. Prvi rezultati filogeografske strukturiranosti zasnovani na analizi sekvenci D petlje mtDNK kod 98 jedinki sa teritorije Evrope i Male Azije, ukazali su na postojanje dve jasno odvojene klade: anadolijske klade (A) i evropske klade (B), sa prosečnom nukleotidnom divergencijom od 6,6%, i procenjenim vremenom razdvajanja između 105.000 i 490.000 godina (Kasapidis i sar., 2005). Pored toga, analize ove studije su ukazale i na postojanje zone preklapanja klada A i B na teritoriji severnoistočne Grčke i Bugarske, kao i na predominantan značaj Balkanskog poloustrva kao glacijalnog refugijuma ove vrste. Predložena filogeografska strukturiranost, tj. postojanje evropske i anadolijske klade podržana je i u analizi D petlje mtDNK kod 926 jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije (Stamatis i sar., 2009), gde je bolja geografska

pokrivenost uzorcima sa teritorije Evrope ukazala na dodatnu strukturiranost i izdvajanje nekoliko grupa: jugoistočnoevropske, evropske A, evropske B grupe, kao i postojanje regiona preklapanja u okviru pretpostavljene zone sekundarnog kontakta. Iako obe pomenute studije (Kasapidis i sar., 2005; Stamatis i sar., 2009) nedvosmisleno ukazuju na značaj Balkanskog poluostrva kao refugijuma ove vrste, rezultati istraživanja Fickel i saradnika (2008) ukazali su na mogućnost postojanja dodatnih glacijalnih refugijuma ove vrste na teritoriji Apeninskog poluostrva. Detaljniji prikaz i razumevanje filogeografske strukture vrste *Lepus europaeus* omogućila je i studija Đan i saradnika (2017), u kojoj je na osnovu uzorka široke geografske distribucije ukazano na postojanje tri velike filogeografske haplogrupe, jedne koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Anadolije i Bliskog Istoka, druge koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Balkana, i treće koja je obuhvatala jedinke sa teritorije centralne i zapadne Evrope. Određivanje vremena ekspanzije, kao i analiza geografske distribucije haplotipova unutar uočenih haplogrupa, ukazala je na sledeći filogeografski scenario: postojao je predački protok gena jedinki iz Anadolije na teritoriju jugoistočnog Balkana, koji je dalje delovao kao izvorni region za naseljavanje ostatka Balkanskog poluostrva, dok su u postglacijalnoj kolonizaciji prostora centralne i zapadne Evrope učestvovala jedinke sa severnih delova Balkanskog poluostrva. Predloženi filogeografski obrazac podržan je i uočenim gradijentom opadanja parametara molekularnog diverziteta počev od Anadolije ka Balkanskom poluostrvu, a potom severno ka centralnoj i zapadnoj Evropi (Fickel i sar., 2005; Fickel i sar., 2008; Sert i sar. 2009; Stamatis i sar., 2009; Đjan i sar., 2017).

Opisana filogeografska struktura vrste *L. europaeus* definisana na osnovu varijabilnosti nukleotidnih sekvenci D petlje mtDNK, potvrđena je i analizom drugih regiona ovog molekula. Naime, uočeni filogeografski obrazac potvrdila je i studija koja je pored sekvenci D petlje mtDNK, koristila i sekvence gena za citohrom b, kao i sekvence gena za transportnu RNK za prolin i treonin (Ashrafzadeh i sar., 2018), a najveći nivo konkordantnost uočenog filogeografskog signala podržan je i analizom kompletnih nukleotidnih sekvenci čitavih mitohondrijskih genoma kod 14 jedinki ove vrste sa teritorije Evrope i Anadolije (Giannoulis i sar., 2018). Zajednička karakteristika svih pomenutih filogeografskih studija jeste potpuno odsustvo uočavanja haplotipova jedinki sa teritorije Anadolije i Bliskog Istoka kako u balkanskoj, tako i u evropskoj haplogrupi, uprkos pretpostavljenoj zoni preklapanja na teritoriji jugoistočnog Balkana. Ovaj nedostatak recipročne introgresije Amoutzias i saradnici (2016) su na osnovu analize transkriptoma vrste *L. europaeus*, a koristeći izdvojeni set polimorfizama pojedinačnih nukleotida u okviru gena uključenih u procese vezane za

energetski metabolizam, objasnili postojanjem koadaptiranih kompleksa između jedarnih i mtDNK gena koji su uključeni u OXPHOS procese. Naime, diferencijacija gena uključenih u OXPHOS procese između anadolijske i evropske klade ukazana je i na osnovu analize sekvenci kompletnih genoma mtDNK, a na osnovu koje je odsustvo haplotipova u zoni kontakta takođe objašnjeno hipotezom diferencijacije u alopatriji, koja je rezultovala u razvijanju lokalnih adaptacija i nastanku genetičke inkompatibilnosti prilikom ponovnog sekundarnog kontakta ove dve klade (Giannoulis i sar., 2018).

Kako filogeografske studije zasnovane isključivo na analizi mtDNK usled uniparentalnog načina nasleđivanja ovog molekula ukazuju na matrilinearnu distribuciju geneaoloških linija, u cilju potpunog sagledavanja filogeografskog modela neophodna je i analiza gena smeštenih na polnim hromozomima mužjaka. Međutim, analiza molekularnih markera smeštenih na Y hromozomu kod ove vrste ukazala je na nizak nivo interspecijske varijabilnosti kod različitih vrsta roda *Lepus* u odnosu na mtDNK markere, kao i na malu moć rezolucije ovih markera u razumevanju filogenetskih odnosa. Naime, na osnovu analize fragmenta SRY gena, kao i introna 8 DBY gena kod jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije uočeno je postojanje dve velike klade: evropske i anadolijske, ali sa izrazito slabom genetičkom diferencijacijom, zasnovanom na razlici u samo jednoj nukleotidnoj poziciji (Mamuris i sar., 2010). Sa druge strane, analize zasnovane na Y markerima ukazale su na odsustvo pretpostavljene recipročne monofilije, budući da rezultati ove studije ukazuju na prisustvo haplotipskih varijanti karakterističnih za anadolijsku kladu kod nekoliko jedinki geografski uzorkovanih na teritoriji centralne Grčke, nasuprot rezultatima analiza zasnovanih na mtDNK markerima. Nasuprot analizama zasnovanim na mtDNK i Y molekularnim markerima, rezultati istraživanja varijabilnosti gena za melanokortinski receptor 1 (*MCR1*) kod 550 jedinki sa teritorije Evrope i Male Azije ukazali su na gotovo potpuno odsustvo filogeografskog signala (Koutsogiannouli i sar., 2012). Naime, kod svih ispitivanih jedinki u ovom istraživanju, uočena su samo dva alela, od kojih je jedan bio zastupljen kroz čitav ispitivani region, dok je drugi alel otkriven samo kod jedinki sa teritorije Izraela. Iako rezultati ovog istraživanja ukazuju na veoma nizak nivo intraspecijske varijabilnosti kod vrste *L. europaeus*, naglašava se važnost teritorije Izraela kao moguće kontaktne zone gde se susreću vrste *L. capensis* i/ili *L. mediteraneus* na jugu, odnosno *L. europaeus* na severu.

Ipak kada govorimo o sagledavanju genetičke varijabilnosti, kao i analizi populaciono-genetičke strukturiranosti prirodnih populacija divljih životinja, najčešće

primenjivani molekularni markeri za rešavanje ovih pitanja u poslednjih dve decenije su mikrosateliti. Iako ne postoji panel mikrosatelitskih lokusa razvijen direktno za vrstu *L. europaeus*, zahvaljujući mogućnosti umnožavanja mikrosatelitskih lokusa razvijenih kod srodnih vrsta, nekoliko lokusa razvijenih za vrstu *Oryctolagus cuniculus* pokazalo je dovoljan nivo informativnosti i za sagledavanje genetičke varijabilnosti kod vrste *L. europaeus*. Generalno govoreći, u poređenju sa rezultatima dobijenim upotrebom mtDNK markera, najveći broj dosadašnjih istraživanja kod vrste *L. europaeus*, a koja su se zasnivala na analizi mikrosatelitskih lokusa su ukazala na manji nivo genetičke diferencijacije, kao i odsustvo izraženog signala genetičke strukturiranosti širom areala ove vrste. Naime, na osnovu analize 11 mikrosatelitskih lokusa kod jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije uočen je nizak nivo genetičke diferencijacije sa prosečnom F_{ST} vrednošću od 0,114, kao i trend opadanja bogatstva alela od Anadolije preko Balkana, ka centralnoj Evropi (Ben Slimen i sar., 2008). Slični rezultati dobijeni su u ostalim istraživanjima koja su sprovedena na regionalno ograničenom uzorku. Recimo, analizom pet mikrosatelitskih lokusa kod vrste *L. europaeus* sa teritorije Nemačke uočen je nizak nivo genetičke diferencijacije sa svega 6,8-7,4% varijabilnosti usled razlika između populacija i prosečnim brojem alela od 4,02 (Fickel i sar. 2005), dok je analizom osam mikrosatelitskih lokusa kod jedinki sa teritorije severne Italije ukazano na odsustvo genetičke strukturiranosti i nizak nivo genetičke diferencijacije sa prosečnom F_{ST} vrednošću od 0,018 (Canu i sar. 2013). Nešto veći nivo genetičke diferencijacije uočen je analizom šest mikrosatelitskih lokusa kod jedinki sa teritorije Srbije gde je otkriveno postojanje dve genetički diferencirane grupe, jedne koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Vojvodine, i druge koja je obuhvatala jedinke sa teritorije severozapadne Srbije (Đan, 2008; Djan i sar., 2015). Uočena genetička strukturiranost bila je podržana i analizom molekularne varijanse koja je ukazala da je 18,88% varijabilnosti posledica razlika između grupa sa prosečnom F_{ST} vrednošću od 0,168. Sa druge strane, visok nivo genetičke varijabilnosti, kao i izražen signal populacione strukturiranosti uočen je na osnovu analize 10 mikrosatelitskih lokusa kod 268 jedinki sa teritorije severnoistočne Grčke (Antonioni i sar. 2013), ukazujući da ovaj region predstavlja mesto kontaktne zone između dve evoluciono odvojene klade A i B vrste *L. europaeus*. Međutim, uprkos uočljivoj diferencijaciji između evropske i anadolijske klade na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mtDNK, nizak nivo genetičke diferencijacije uočen je na osnovu analize 11 mikrosatelitskih lokusa kod 149 jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije evropskog dela Turske i Anadolije, gde je svega 3,03% bila posledica razlika u varijabilnosti između pomenutih regionalnih grupa, dok je 4,06% varijabilnosti bilo usled razlika između geografski definisanih populacija

(Demirbař i sar. 2019). Važno je napomenuti da u većini navednih studija nije postojala konzistentnost, kako u broju ispitivanih mikrosatelitskih lokusa, tako ni u pogledu odabira korišćenih lokusa. Imajući to u vidu, Beugin i saradnici (2017) su razvili multipleks panel za analizu 12 autozomalnih mikrosatelitskih lokusa koji poseduju dovoljnu genetičku rezoluciju da omoguće kako detektovanje odgovarajućeg nivoa varijabilnosti, tako i mogućnost razlikovanja vrsta u okviru roda *Lepus*, što ovaj panel čini pogodnim za primenu u budućim programima genetičkog monitoringa ove vrste.

Iako se najveći broj dosadašnjih genetičkih istraživanja kod vrste *L. europaeus* zasnivao na upotrebi markera mtDNK, ili upotrebi selektivno neutralnih molekularnih markera jedarnog genoma, u poslednjih desetak godina kao molekularni markeri korišteni su i geni imunskog sistema. Naime, u analizi varijabilnosti *MHC-DQA* gena kod 674 jedinke vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije otkriveno je 37 različitih alela bez jasnog filogeografskog signala (Koutsogiannouli i sar., 2009), dok je u analizi varijabilnosti *MHC-DRB* gena kod 801 jedinke takođe sa teritorije Evrope i Male Azije otkriven 61 različit alel (Koutsogiannouli i sar., 2014). Veliki broj retkih alela koji su bili zastupljeni sa niskim učestalostima, autori su objasnili kao predominantni uticaj selekcije zavisne od učestalosti alela u oblikovanju genetičke varijabilnosti ovih lokusa. Međutim, iako su geni imunskog sistema visoko polimorfni, postoji izražena heterogenost u stopi varijabilnosti između različitih gena imunskog sistema. Naime, signal diversifikujuće selekcije ne deluje na uniforman način na sve *MHC* gene, što je pokazano u analizi *DPB*, *DQB* i *DRB* gena *MHC* klase II kod vrste *L. europaeus*, pri čemu je visok nivo varijabilnosti uočen samo kod *DQB* i *DRB* gena, ali ne i kod *DPB* gena, ukazujući da je *DPB* gen nedovoljno informativan marker za analize imunogenetičke varijabilnosti kod ove vrste (Smith i sar., 2011). Dosadašnja istraživanja varijabilnosti *MHC* gena kod vrste *L. europaeus* ukazala su na značajan uticaj selekcionih mehanizama u oblikovanju varijabilnosti ovih gena. U analizi varijabilnosti na osnovu *MHC-DQA* gena kod jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Austrije grupisanih u različite vremenske kohorte na osnovu godine uzorkovanja ukazano je na postojanje heterogenosti selekcionog signala u prostoru (Campos i sar., 2011), što je takođe potvrđeno i poređenjem razlika u učestalosti *MHC-DQA* alela između populacija ove vrste sa teritorije Austrije i Belgije (de Bellocq i sar., 2009). Iako u nijednoj od dosadašnjih studija nije praćen uticaj sredinskih karakteristika, niti ukazano na postojanje lokalnih adaptacija kod ove vrste, pokazano je da heterozigotnost u *MHC* lokusima može biti povezana sa nekim od parametara fitnesa. Naime, heterozigotnost u *MHC-DQA* lokusu kod jedinki sa teritorije Belgije uticala je

na uspešnost reprodukcije kod ženki, iako takav uticaj nije zabeležen kod jedinki sa teritorije Austrije (Smith i sar., 2010a). Sa druge strane, uticaj heterozigotnosti nije zabeležen u drugom ispitivanom lokusu *MHC-DRB*. Uočene razlike u prostornom uticaju heterozigotnosti *MHC-DQA* gena autori su objasnili postojanjem selekcije zasnovane na odabiru partnera, kao i usled gametske vezanosti određenog MHC alela sa nekim od letalno recesivnih lokusa.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Sagledavanje molekularnog diverziteta vrste *Lepus europaeus* primenom proteinskih i DNK markera ima višedecenijsku tradiciju. Međutim, dosadašnje studije su načelno bile zasnovane na upotrebi adaptivno neutralnih molekularnih markera (D petlja mitohondrijske DNK i mikrosateliti) sa ciljem određivanja filogeografske strukture, demografske istorije, kao i postojanja genetičke strukturiranosti i određivanja stope protoka gena. Imajući u vidu da su dosadašnja istraživanja kod različitih vrsta u okviru roda *Lepus* ukazala na uticaj klimatskih/sredinskih faktora na distribuciju proteinskih varijanti mtDNK gena, kao i proteinskih varijanti gena imunskog sistema, nameće se zaključak da razumevanje prostorne distribucije genetičke varijabilnosti, kao i uočavanje evolucionih mehanizama koji su odgovorni za njeno oblikovanje treba da bude zasnovano ne samo na analizi neutralnih, već i adaptivnih molekularnih markera. Ovo je posebno važno kod vrste *Lepus europaeus* imajući u vidu nedavni drastičan pad brojnosti populacija ove vrste širom evropskog koninenta, ali imajući u vidu i da ima širok areal, da naseljava najrazličitija staništa u više klimatskih tipova, kao i usled postojanja različitih parazitskih i infektivnih bolesti za koje je pokazano da imaju uticaj na regionalno preživljavanje. U tom smislu, analize molekularnog diverziteta zasnovane na upotrebi markera smeštenih u genomima sa različitim karakteristikama, kao i upotrebom molekularnih markera različitog selektivnog statusa, omogućava se bolji uvid u evolucioni potencijal ove vrste i postavljanje odgovarajućih mera i strategija za održivo upravljanje prirodnim populacijama.

U ovom istraživanju sagledana je varijabilnost D petlje mitohondrijske DNK, gena za subjedinicu 2 i 6 NADH dehidrogenaze (*MT-ND2* i *MT-ND6*), *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena, kao i gena za receptor 2 sličan Tollu (*TLR2*) imunskog sistema kod vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka, sa sledećim ciljevima:

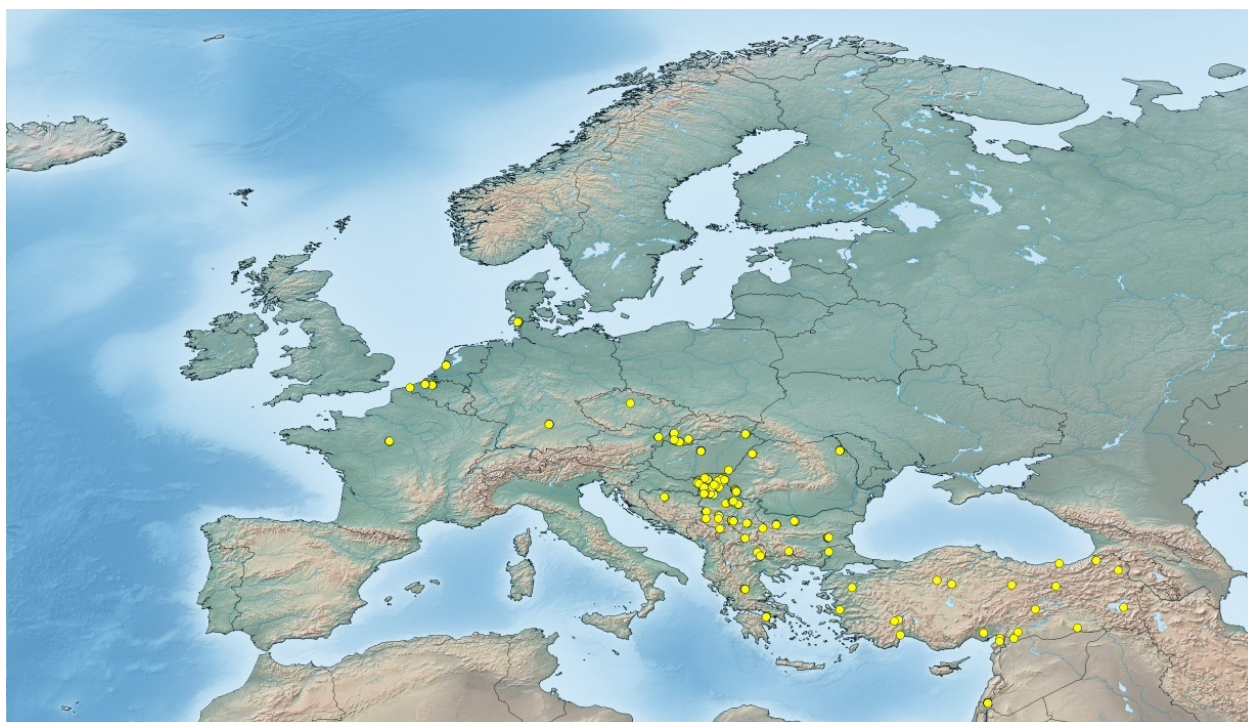
- određivanje osnovnih parametara molekularnog diverziteta vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka na osnovu analize varijabilnosti DNK sekvenci D petlje, *MT-ND2*, *MT-ND6*, *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena
- određivanje filogeografske strukture, demografske istorije i prostorne distribucije genetičke varijabilnosti vrste *L. europaeus* na osnovu varijabilnosti nukleotidnih sekvenci D petlje mitohondrijske DNK

- određivanje filogeografske strukture i prostorne distribucije molekularnog diverziteta vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka na osnovu analize *MT-ND2* i *MT-ND6* gena mitohondrijske DNK
- određivanje filogeografske strukture, kao i prostorne distribucije genetičke varijabilnosti na osnovu analize *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena kod vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka
- uočavanje molekularnih signala delovanja prirodne selekcije u oblikovanju varijabilnosti *MT-ND2*, *MT-ND6*, *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena kod vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka, kao i prisustva genetičkih signala lokalnih adaptacija ispitivanih gena u korelaciji sa sredinskim – klimatskim varijablama

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

Sagledavanje molekularnog diverziteta vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka izvršeno je analizom varijabilnosti odabranih regiona mitohondrijske DNK, i gena imunskog sistema na uzorku od 251 jedinke. Jedinke su izlovljene tokom regularnih lovnih sezona na 74 lokaliteta sa teritorije Austrije, Belgije, Bugarske, Češke, Francuske, Grčke, Holandije, Izraela, Mađarske, Republike Severne Makedonije, Nemačke, Rumunije, Srbije, Slovačke i Turske (Sl. 2, Prilog I). Nijedna jedinka nije žrtvovana za potrebe ovog istraživanja, a izlov jedinki je bio u skladu sa lovnim regulativama u svakoj od zemalja izlova. Sakupljeni su uzorci skeletnog mišićnog tkiva za svaku ispitanu jedinku koji su do daljih analiza čuvani zaleđeni na temperaturi od -20°C .



Slika 2. Mapa sa prikazom lokaliteta sakupljenih uzoraka jedinki vrste *Lepus europaeus* /
Figure 2. Map showing the sampling localities of *Lepus europaeus* individuals

4.2. Metode

4.2.1. Izolacija DNK

Početni korak u analizi molekularnog diverziteta odabranih molekularnih markera podrazumevao je izolaciju ukupne genomske DNK iz skeletnog mišićnog tkiva sakupljenih uzoraka. Ukupna genomska DNK izolovana je primenom modifikovane metode fenol-hloroform-izoamilalkohol ekstrakcije prema protokolu Sambrook i Russell (2001), ili upotrebom komercijalnog kompleta *GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD) prateći uputstva proizvođača.

4.2.1.1. Postupak fenol-hloroform-izoamilalkohol ekstrakcije ukupne genomske DNK

Oko 25 mg mišićnog tkiva je usitnjeno na sterilnim staklenim podlogama, a macerat je prebacivan u sterilne kivete zapremine 1,5 ml. U svaku kivetu dodato je 380 µl pufera za digestiju, 10 µl rastvora proteinaze K (40 mg/ml) i 10 µl β-merkaptoetanol. Pufer za digestiju je sadržao 0,1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA i 100 mM Tris-HCl; pH 8,0. Sadržaj svake kivete je blago promešan, a potom je vršena inkubacija na temperaturi od 65°C u trajanju od 30 minuta. Nakon inkubacije, uzorci su centrifugirani 4 minuta na 12000 rpm. Supernatant je prebacivan u novu sterilnu kivetu zapremine 1,5 ml, u koju je potom dodata jednaka zapremina fenola. Sadržaj kiveta je blago promešan, a zatim centrifugiran 4 minuta na 12000 rpm. Pažljivo je prebacivana gornja vodena faza u novu sterilnu kivetu zapremine 1,5 ml, u koju je potom dodata jednaka zapremina smeše hloroform:izoamilalkohol (24:1), sadržaj je promešan na vorteksu i centrifugiran 4 minuta na 12000 rpm. Gornja vodena faza je pažljivo prebačena u novu sterilnu kivetu zapremine 1,5 ml, a nakon toga je dodata 0,1 zapremina 3M Na-acetata i 2 zapremine apsolutnog etanola rashlađenog na -20°C. Precipitacija DNK je vršena na temperaturi od -70°C u vremenskom trajanju od 20 minuta, nakon čega je precipitat centrifugiran na 12000 rpm u vremenskom trajanju od 20 minuta. Etanol je odlivan, a talog ispiran sa 1 ml 70% rashlađenog etanola. Precipitat je centrifugiran 5 minuta na 12000 rpm, nakon čega je etanol ponovo odliven, a talog sušen na 37°C do potpunog isparavanja etanola. Talog je resuspendovan u 50 µl TE pufera, koji je sadržao 1 M Tris-HCl i 0,5 M EDTA pH 7,6.

4.2.1.2. Određivanje koncentracije i čistoće izolovane DNK

Nakon izolovanja genomske DNK, određivanje koncentracije je vršeno merenjem apsorbanse rastvora izolovane DNK na 260 nm pomoću BioSpec-nano spektrofotometra (Shimadzu, Kyoto, Japan). Aparat je kalibrisan upotrebom istog rastvora TE pufera koji je

koršćen za rastvaranje izolovane DNK. Kvalitet izolovane DNK određivan je merenjem optičkih gustina na 230 nm i 280 nm, kao i izračunavanjem odnosa apsorbanci na 260 i 280 nm, kao i odnosa na 260 i 230 nm. Na osnovu određenih koncentracija izolovane DNK, pravljena su radna razblaženja u koncentraciji od 50 ng/μl koja su korišćena u daljim analizima.

4.2.2. Umnožavanje ispitivanih molekularnih markera

Umnožavanje odabranih molekularnih markera vršeno je lančanom reakcijom polimeraze (PCR - eng. *Polymerase Chain Reaction*) prema protokolima razvijenim za svaki ispitivani molekularni marker.

4.2.2.1. Umnožavanje sekvenci D petlje mitohondrijske DNK

Umnožavanje fragmenta D petlje mtDNK u dužini od 467 bp izvršeno je po modifikovanoj metodi Kasapidis i saradnika (2005), koristeći *forward* i *reverse* početnice (eng. *forward and reverse primers*) koje se vezuju za nukleotidne pozicije 15440 i 15907 u odnosu na kompletnu referentnu sekvencu mitohondrijskog genoma vrste *L. europaeus* (NCBI pristupni broj: AJ421471). Korišćena *forward* početnica je imala sledeću nukleotidnu sekvencu: 5'AAGAACCAGATGCCAGTTATAG3', dok je nukleotidna sekvencu *reverse* početnice bila: 5'AATTCTCTTTAAACTATTCTCTGC3'.

Lančana reakcija polimeraze je izvršena upotrebom Mastercycler personal thermocycler aparata (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) i Biometra T-Gradient thermocycler aparata (Biometra GmbH, Göttingen, Nemačka). Oko 100 ng genomske DNK korišćeno je kao matrica za umnožavanje sa 0,5 μM svake od početnica, 0,2 mM dNTP, 1,5 mM Mg(OAc₂), 1x Taq PCR pufera (sa 15mM Mg(OAc₂)) i 0,5U Taq DNK polimeraze (Fermentas, Vilnius, Litvanija) u ukupnoj zapremini od 25 μL. Inicijalna denaturacija bila je podešena na 95°C u toku 5 minuta, a sledilo je 35 ciklusa sa fazama denaturacije (94°C u toku 1 minuta), vezivanja početnica (45 sekundi na 50°C) i sinteze DNK lanca (45 sekundi na 72°C). Nakon poslednjeg ciklusa PCR reakcije, sledila je finalna elongacija na 72°C u toku 5 minuta.

4.2.2.2. Umnožavanje gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK

Umnožavanje segmenta *MT-ND2* gena izvršeno je po modifikovanoj metodi Smith i saradnika (2010b). Umnožavan je segment dužine 408 bp, od nukleotidne pozicije 4065 do 4473 u odnosu na kompletnu referentnu sekvencu mitohondrijskog genoma vrste *L.*

europaeus (NCBI pristupni broj: AJ421471). Nukleotidna sekvenca korišćene *forward* početnice bila je: 5'ACGATCAACAGAAGCTGCAA3', dok je sekvenca *reverse* početnice bila sledeća: 5'ATGGGCAATTGAGGAATACG3'.

Lančana reakcija polimeraze je izvršena pomoću Biometra T-Gradient thermocycler aparata (Biometra GmbH, Göttingen, Nemačka). Oko 50 ng genomske DNK korišćeno je kao matrica za umnožavanje sa 0,8 µM svake od početnica, 0,2 mM dNTP, 3 mM MgCl₂, 1x PCR pufera i 0,5U FIREPol DNK polimeraze (Solis BioDyne, Tartu, Estonija) u ukupnoj zapremini od 12,5 µL. Inicijalna denaturacija bila je podešena na 94°C u toku 4 minuta, a sledilo je 35 ciklusa sa fazama denaturacije (94°C na 55 sekundi), vezivanja početnica (45 sekundi na 53°C) i sinteze DNK lanca (45 sekundi na 72°C). Nakon poslednjeg ciklusa PCR reakcije, sledila je finalna elongacija na 72°C u toku 5 minuta.

4.2.2.3. Umnožavanje gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK

Umnožavanje kompletne sekvence *MT-ND6* gena u dužini od 525 bp izvršeno je upotrebom početnica dizajniranih u ovom istraživanju prema matrici sekvence mitohondrijskog genoma vrste *L. europaeus* (NCBI pristupni broj: AJ421471). Nukleotidna sekvenca *forward* početnice je: 5'CAATACACCGCCTCTTACCT3', dok je nukleotidna sekvenca *reverse* početnice bila: 5'GGTGCGTTTTACGAATGTTG3'.

Lančana reakcija polimeraze je izvršena pomoću Mastercycler personal thermocycler aparata (Eppendorf, Hamburg, Nemačka). Oko 50 ng genomske DNK korišćeno je kao matrica za umnožavanje sa 0,2 µM svake od početnica, 0,2 mM dNTP, 1x Dream Taq PCR pufera (sadrži 20 mM MgCl₂) i 1U Dream Taq DNA polymerase (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) u ukupnoj zapremini od 25 µL. Inicijalna denaturacija bila je podešena na 95°C u toku 4 minuta, a sledilo je 30 ciklusa sa fazama denaturacije (95°C na 60 sekundi), vezivanja početnica (45 sekundi na 54°C) i sinteze DNK lanca (45 sekundi na 72°C). Nakon poslednjeg ciklusa PCR reakcije, sledila je finalna elongacija na 72°C u toku 5 minuta.

4.2.2.4. Umnožavanje *DQA* gena MHC kompleksa klase II

Umnožavanje egzona 2 *DQA* gena MHC kompleksa klase II izvršeno je po modifikovanoj metodi De Bellocq i saradnika (2010). Umnožavan je fragment egzona 2 dužine 219 bp. Nukleotidne sekvence korišćenih početnica su sledeće:

- sekvenca *forward* početnice: 5'CTTTCATCTATCAGCTGACC3'
- sekvenca *reverse* početnice: 5'ACAGCAGCAGTAGAGTTGGA3'.

Lančana reakcija polimeraze je izvršena pomoću Biometra T-Gradient thermocycler aparata (Biometra GmbH, Getingen, Nemačka). Oko 50 ng genomske DNK korišćeno je kao matrica za umnožavanje sa 1,6 µM svake od početnica, 0,2 mM dNTP, 0,5x Phusion High Fidelity PCR pufera (sadrži 7,5 mM MgCl₂) i 0,5U Phusion High-Fidelity DNK polimeraze (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) u ukupnoj zapremini od 12,5 µL. Inicijalna denaturacija bila je podešena na 98°C u toku 5 minuta, a sledilo je 30 ciklusa sa fazama denaturacije (98°C na 10 sekundi), vezivanja početnica (20 sekundi na 58°C) i sinteze DNK lanca (15 sekundi na 72°C). Nakon poslednjeg ciklusa PCR reakcije, sledila je finalna elongacija na 72°C u toku 5 minuta.

4.2.2.5. Umnožavanje *DQB* gena MHC kompleksa klase II

Umnožavanje dela egzona 2 *DQB* gena MHC kompleksa klase II izvršeno je po modifikovanoj metodi Smith i saradnika (2011). Umnožen je fragment egzona 2 dužine 210 bp, pomoću sledećih početnica:

- sekvenca *forward* početnice: 5'CCGTCCGCAGAGGATTTTCGT3'
- sekvenca *reverse* početnice: 5'GCCTGGTAGTTGTGTCTGCA3'.

Lančana reakcija polimeraze je izvršena pomoću termociklera Biometra T-Gradient thermocycler aparata (Biometra GmbH, Getingen, Nemačka). Oko 50 ng genomske DNK korišćeno je kao matrica za umnožavanje sa 1,6 µM svake od početnica, 0,2 mM dNTP, 0,5x Phusion High Fidelity PCR pufera (sadrži 7,5 mM MgCl₂) i 0,5U Phusion High-Fidelity DNK polimeraze (ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD) u ukupnoj zapremini od 12,5 µL. Inicijalna denaturacija bila je podešena na 98°C u toku 5 minuta, a sledilo je 30 ciklusa sa fazama denaturacije (98°C na 10 sekundi), vezivanja početnica (20 sekundi na 61°C) i sinteze DNK lanca (15 sekundi na 72°C). Nakon poslednjeg ciklusa PCR reakcije, sledila je finalna elongacija na 72°C u toku 5 minuta.

4.2.2.6. Umnožavanje *TLR2* gena

Umnožavanje segmenta gena za Toll-like receptor 2 dužine 372 bp koji odgovara delu intracelularnog TIR domena izvršeno je po modifikovanoj metodi Awadi i saradnika (2018a). Nukleotidne sekvence korišćenih začetnica su sledeće:

- sekvenca *forward* začetnice: 5'ATGCGTTCGTGTCCTACAGC3'
- sekvenca *reverse* začetnice: 5'CTCAAGTTCCTCCAGAACCC3'.

Lančana reakcija polimeraze je izvršena pomoću termociklera Biometra T-Gradient thermocycler aparata (Biometra GmbH, Getingen, Nemačka). Oko 50 ng genomske DNK

korišćeno je kao matrica za umnožavanje sa 1,6 μ M svake od početnica, 0,2 mM dNTP, 1 mM MgCl₂, 1x PCR pufera i 0,5U FIREPol DNK polimeraze (Solis BioDyne, Tartu, Estonija) u ukupnoj zapremini od 12.5 μ L. Inicijalna denaturacija bila je podešena na 95°C u toku 5 minuta, a sledilo je 30 ciklusa sa fazama denaturacije (95°C na 30 sekundi), vezivanja početnica (30 sekundi na 58°C) i sinteze DNK lanca (30 sekundi na 72°C). Nakon poslednjeg ciklusa PCR reakcije, sledila je finalna elongacija na 72°C u toku 10 minuta.

4.2.3. Vizuelizacija produkata lančane reakcije polimeraze

Uspešnost umnožavanja ispitivanih molekularnih markera proveravana je 1,5% agaroznom gel elektroforezom. Za određivanje dužine umnoženih produkata PCR reakcije korišćen je 100bp GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Elektroforeza je vršena upotrebom 1xTAE pufera (40 mM Tris base; 20 mM sirćetna kiselina; 1 mM EDTA; pH=7,6), ili upotrebom 1XTBE pufera (0,09 M Tris base; 0,09 M borna kiselina; 0,002 M EDTA; pH=8,3)), a razdvajanje fragmenata je teklo pri naponu od 120V. Nakon elektroforetskog razdvajanja, gelovi su bojani etidijum-bromidom ili Roti-GelStain bojom (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemačka) i dobijeni fragmenti očitavani na UV transluminatoru.

4.2.4. Sekvenciranje ispitivanih molekularnih markera

Uspešno umnoženi produkti PCR reakcija podvrgnuti su reakciji sekvenciranja upotrebom Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kompleta na kapilarnom sekvenceru ABI 3130XL DNA Analyzer ili ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Umnoženi fragmenti D petlje mtDNK sekvencionirani su uslužno na Institutu za molekularnu medicinu u Helsinkiju (Finska), dok su umnoženi PCR produkti *MT-ND6* gena uslužno sekvencirani u evropskom odeljenju kompanije Macrogen u Amsterdamu (Holandija). Preostali ispitivani molekularni markeri su sekvencirani u Laboratoriji za genetiku Departmana za integrativnu biologiju i evoluciju Univerziteta veterinarske medicine u Beču na ABI 3130XL DNA Analyzer prema protokolu koji je podrazumevao sledeće korake: prečišćavanje PCR produkata, reakcije sekvenciranja upotrebom *forward* i *reverse* početnica korišćenih u PCR reakciji, prečišćavanje produkata reakcije sekvenciranja etanolskom precipitacijom, kao i priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu.

4.2.4.1. Prečišćavanje PCR produkata

Uspešno amplifikovani ispitivani molekularni markeri (*MT-ND2*, *MT-ND6*, D petlja

mtDNK i *TLR2*) su pre reakcije sekvenciranja prečišćeni upotrebom komercijalnog kompleta EXOI-SAP (Fermentas, Vilnius, Litvanija) prema uputstvu proizvođa.

Prečišćavanje umnoženih fragmenata *DQA* i *DQB* gena vršeno je upotrebom rastvora magnetnih kuglica po modifikovanoj metodi Rohland i Reich (2012). Prečišćavanje je vršeno na ploči sa 96 bunarčića, pri čemu je u svaki bunarčić dodato 10 μ L PCR produkta i 20 μ L rastvora magnetnih kuglica, uz snažno mešanje. Nakon 5 minuta stajanja na sobnoj temperaturi, ploča je premeštana na magnetni nosač na kome je ostavljena u vremenskom trajanju od 10 minuta. Nakon toga, sadržaj svakog bunarčića je odlivan, a preostali talog magnetnih kuglica ispiran je dva puta sa 150 μ L 70% prohlađenog etanola. Nakon ispiranja etanolom, talog je inkubiran 10 minuta na 37°C, a potom je ispiran sa 10 μ L 0,1X TE pufera. Nakon ispiranja, ploča je vraćena na magnetni nosač, i nakon taloženja magnetnih kuglica, rastvor iz svakog bunarčića je prebačen u bunarčić u novoj ploči i kao takav se smatra prečišćenim za reakciju sekvencioniranja.

Korišćeni rastvor magnetnih kuglica sadržao je 0,1% Sera-Mag SpeedBead (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, SAD), 18% PEG-8000, 1M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8) i 1 mM EDTA (pH 8).

4.2.4.2. Reakcija sekvenciranja

Reakcija sekvenciranja izvršena je pomoću Biometra T-Gradient aparata (Biometra GmbH, Göttingen, Nemačka), upotrebom Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kompleta. Za svaki od ispitivanih molekularnih markera vršene su dve reakcije sekvenciranja, jedna sa početnicom vodećeg lanca, i druga sa početnicom zaostajućeg lanca. Reakcija sekvenciranja je vršena u ukupnoj zapremini od 10 μ L, a sadržala je 4 μ L prečišćenog PCR produkta, 1,5 μ L 5x Sequencing pufera, 0,5 μ L Reaction Mix v3.1 i 0,5 μ L odgovarajuće početnice.

4.2.4.3. Precipitacija i priprema uzoraka za kapilarnu elektroforezu

Nakon reakcije sekvenciranja, precipitacija etanolom je vršena u istoj ploči u kojoj je izvršena i reakcija sekvenciranja (koja sadrži 10 μ L produkta reakcije sekvenciranja), i to dodavanjem 6,25 μ L 100 mM Na-EDTA (pH 8) i 10 μ L destilovane H₂O. Sadržaj svakog bunarčića je dobro promešan, nakon čega je dodato 60 μ L hladnog 95% etanola uz snažno mešanje. Ploča je ostavljena 15 minuta na temperaturi od +4°C, nakon čega je centrifugirana 30 minuta na 3000 rpm. Nakon centrifugiranja, sadržaj ploče je uklonjen naglim invertovanjem, a talog ispran sa 200 μ L hladnog 70% etanola. Ploča je centrifugirana

dodatnih 30 minuta na 3000 rpm na temperaturi od +4°C, nakon čega je izvršeno naglo invertovanje ploče da bi se odstranio rastvor iz svakog bunarčića. Ploča je potom položena vrhom na dole, centrifugirana 10 sekundi na 300 rpm. Nakon centrifugiranja, talog je sušen 5 minuta na temperaturi od 37°C, a potom resuspendovan u 10 µL Hi-Di formamida, koji je potom denaturisan na 95°C u toku 5 minuta, nakon čega je naglo ohlađen i premešten u ABI 3130xl Genetic Analyzer aparat. Proces sekvenciranja vršen je pomoću sistema od 16 kapilara dužine 50 cm, uz upotrebu POP7 polimera (ThermoFisher Scientific, Waltham, SAD).

4.3. Statistička obrada rezultata

4.3.1. Obrada nukleotidnih sekvenci i genotipizacija jedarnih molekularnih markera

Sve nukleotidne sekvence dobijene u procesu sekvenciranja su unete u bazu sekvenci formiranu u okviru programskog paketa ABI Seq Scanner ver. 2 (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), nakon čega je vršena provera kvaliteta sekvenci analizom hromatogramskih zapisa. Provera kvaliteta sekvenci vršena je praćenjem vrednosti kvaliteta (QV, eng. *quality value*) koja označava desetostruku vrednost negativnog dekadnog logaritma verovatnoće za grešku. Sve nukleotidne pozicije sa QV vrednošću većom od 20 (koja odgovara verovatnoći za grešku do maksimalnih 1%) su verifikovane automatski, dok su pozicije sa vrednošću manjom od 20 prihvatane nakon manualnog pregleda i/ili su produkti resequencirani.

Nakon provere kvaliteta sekvenci, sve sekvence protein-kodirajućih regiona su poravnavane (eng. *alignment*) ručno u odnosu na dostupne matrice preuzete iz NCBI baze podataka. Nije uočeno prisustvo prevremenih stop kodona, praznina (eng. *gap*), pomeranja okvira čitanja, kao ni prisustvo više od dve moguće nukleotidne varijante na pojedinačnim nukleotidnim pozicijama, što ukazuje da nije došlo do mogućeg umnožavanja pseudogena. Poravnanje sekvenci D petlje mtDNK izvršeno je primenom Clustal W algoritma u okviru programskog paketa BioEdit (Hall, 1999).

Diploidni genotipovi ispitivanih jedarnih molekularnih markera za svaku jedinku određeni su primenom Bajesove metode za rekonstrukciju haplotipova. Hromatogrami nukleotidnih sekvenci vodećih i zaostajućih lanaca ispitivanih jedarnih markera su pregledani vizuelno, i svaka pozicija koja je sadržavala samo jedan jasan vrh (eng. *peak*) je posmatrana kao homozigotna pozicija, dok je prisustvo više od jedne nukleotidne varijante na istoj poziciji posmatrano kao heterozigotna pozicija, i kao takva je preinačivana u odgovarajuće dvosmisleno slovo (eng. *ambiguous code*) prema IUPAC nomenklaturi. Samo one

nukleotidne pozicije kod kojih je visina pratećeg vrha bila veća od 50% veličine glavnog vrha su tretirane kao prave heterozigotne pozicije. Sekvence koje su bile homozigotne, zajedno sa dostupnim alelima/haplotipovima preuzetim iz GenBanke, korišćene su kao matrica na osnovu koje je vršena rekonstrukcija haplotipova/alela. Za rekonstrukciju alela *DQA* gena pored homozigotnih sekvenci otkrivenih u ovoj studiji kao matrica korišćene su i sve dostupne sekvence sa NCBI baze kako bi se povećala preciznost rekonstrukcije, i to za *DQA* gen korišćene su sekvence sledećih pristupnih brojeva: EU686540-544, FJ225335-346, EU876909-945 i MH029632-637, dok su za rekonstrukciju *DQB* alela korišćene sekvence objavljene u radu Smith i saradnika (2011) koje nisu pohranjene u GenBank-u, ali su dobijene od autora na lični zahtev. Za rekonstrukciju alela *TLR2* gena korišćene su samo homozigotne sekvence otkrivene u ovoj studiji. Rekonstrukcija haplotipova izvršena je primenom PHASE algoritma (Stephens i sar., 2001) u okviru programskog paketa DnaSP ver.6 (Rozas i sar., 2017). Za svaki jedarni molekularni marker rađeno je 1000 ponavljanja, sa vrednošću stanjivanja od 10 (eng. *thinning interval*), i označavanjem 1000 iteracija kao *burn-in* vrednost. Budući da PHASE algoritam koristi Monte Karlo Markovljeve lance (eng. *Markov Chain Monte Carlo*) kako bi postavio posteriornu distribuciju potencijalnih parova haplotipova koji mogu da objasne uočenu dvosmislenu poziciju, analiza daje verovatnoću poverenja za svaki rekonstruisani par haplotipova. Samo parovi haplotipova sa posteriornom verovatnoćom većom od 0,9 su prihvatani kao “pravi” aleli, dok su aleli sa verovatnoćom ispod 0,9 tretirani kao nedostajući podaci u genotipovima (eng. *missing data*), i kao takvi nisu uključivani u dalje analize molekularnog diverziteta.

Važno je napomenuti da se u slučaju genotipizacije jedarnih gena primenom metode faziranja dobijaju haplotipovi nukleotidnih sekvenci vodećeg i zaostajućeg lanca kod svake ispitivane jedinice, koji se nakon toga shodno važećoj nomenklaturi za imenovanje alela kodiraju odgovarajućim brojem i tretiraju kao aleli jedarnih gena. U tom smislu, u slučaju jedarnih gena termin haplotip može se posmatrati izjednačeno kao i termin alel. Drugim rečima, parametri molekularnog diverziteta jedarnih gena se mogu opisivati na osnovu varijabilnosti nukleotidnih sekvenci, kada je termin haplotip preferiran, dok je termin alel preferiran kada su opisivani parametri genetičke varijabilnosti zasnovani na definisanim alelima.

4.3.2. Određivanje osnovnih parametara molekularnog diverziteta

Određivanje osnovnih parametara molekularnog diverziteta nukleotidnih sekvenci, koji

podrazumevaju broj varijabilnih mesta, broj i diverzitet haplotipova, diverzitet nukleotida, kao i prosečan broj nukleotidnih razlika vršeno je u programskim paketima DnaSP i Arlequin ver 3.5.2.2 (Excoffier i Lischer, 2010).

Određivanje parametara varijabilnosti aminokiselinskih sekvenci, koji su obuhvatali broj različitih amino-kiselinskih sekvenci (označavanih kao proteinskih varijanti), ukupan broj sinonimnih i nesinonimnih zamena, kao i prosečne evolucione udaljenosti između proteinskih varijanti na osnovu Poasonovih korigovanih distanci izvršeno je u programskom paketu MEGA X (Kumar i sar., 2018). Standardne greške su određivane na osnovu 10000 *bootstrap* ponavljanja.

Učestalosti alela/haplotipova jedarnih gena, alelsko bogatstvo, uočena i očekivana heterozigotnost, kao i testovi za odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže određivani su u programskim paketima GENETIX ver. 4.05.2 (Belkhir, 2004) i GENEPOP (Rousset, 2008).

4.3.3. Analiza filogenetskih odnosa i demografske istorije

Sagledavanje filogenetskih odnosa između otkrivenih haplotipova mtDNK izvršeno je konstrukcijom Bajesovih filogenetskih stabala u okviru programskog paketa MrBayes v3.2 (Ronquist i sar., 2012). Rađeno je po dva ponavljanja, svako od 50.000.000 iteracija, za dva hladna i dva topla Monte Karlo Markovljeva lanca, pri čemu su parametri modela zapisivani pri svakoj 100.-oj iteraciji. Za svaki od ispitivanih mtDNK markera korišćen je odgovarajući model nukleotidnih supstitucija određen u okviru programskog paketa jModelTest ver. 2 (Darriba i sar., 2012). Kao *out* grupa korišćena je sekvenca mitohondrijskog genoma vrste *Lepus timidus* (NCBI prisutni broj: NC_024040). Postizanje konvergencije parametara analize proveravano je u programskom paketu Tracer v1.7 (Rambaut i sar., 2018) inspekcijom zapisa sadržanih u log dokumentima, odbacivanjem 20% iteracija kao *burn in* vrednost, a za konačni prikaz rezultata analize korišćeno je 50% *majority-rule* konsenzus stablo, vizuelizovano u programskom paketu FigTree (dostupno na <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). U cilju sagledavanja filogenetskih odnosa između mtDNK haplotipova i definisanje haplogrupa formirana je i *median-joining* mreža (MJN; Bandelt i sar., 1999) u programskom paketu PopART (Leigh i Bryant, 2015), pri čemu su za određivanje ancestralnih haplotipova korišćene iste sekvence *out* grupa, kao i za konstrukciju Bajesovih filogenetskih stabala.

Analiza demografske istorije čitavih setova sekvenci za sve ispitivane mtDNK

markere, kao i u okviru svake definisane haplogrupe izvršena je poređenjem distribucije parova nukleotidnih razlika (engl. *mismatch distribution*) u okviru programa DnaSP. Multimodalna, odnosno nepravilna distribucija parova razlika karakteristična je za populacije koje odlikuje stabilna veličina populacije, dok populacije koje prolaze kroz naglu demografsku ekspanziju pokazuju unimodalnu distribuciju. Statistička značajnost odstupanja uočenih distribucija u odnosu na distribuciju očekivanu pod pretpostavkom modela populacione ekspanzije testirana je praćenjem značajnosti sume kvadratnih odstupanja (SSD - *sum squared deviations*) i indeksa rasturanja (R – *raggedness index*) u programu Arlequin. Dodatno, određivana je F_u -ova F_S vrednost, kao i R_2 statistika (Ramos-Onsins i Rozas, 2002) zasnovana na razlikama između broja *singleton* mutacija i prosečnog broja nukleotidnih razlika. Statistička značajnost F_u -ovog F_S i R_2 testa određena je ispitivanjem nulte distribucije 10000 koalescentnih simulacija u okviru DnaSP programa. Statistički značajno negativne F_S i pozitivne R_2 vrednosti su intepretirane kao pokazatelji populacione ekspanzije. Za sekvence D petlje mtDNK za koje je dostupna informacija o stopi supstitucija (12,4% na milion godina (Fickel i sar., 2008)) izvršena je dodatna analiza demografske istorije za svaku otkrivenu haplogrupu primenom Bajesove *skyline plot* metode (BSP – *Bayesian skyline plot*; Drummond i sar., 2005) u okviru programskog paketa BEAST (Drummond i sar., 2013). Kao *a priori* informacija za analizu korišćen je *strict clock* model sa 15 diskretnih intervala, a urađeno je 100 miliona iteracija, sa zapisivanjem parametara modela na svakih 1000 iteracija i odbacivanjem 25% sačuvanih iteracija kao *burn-in* vrednost. Dostizanje konvergencije parametara analize je proveravano u Tracer-u. Kako je stopa supstitucija mtDNK veoma varijabilna između različitih sisarskih vrsta, upotreba generalne stope za mtDNK sisara od 2% po mestu na milion godina se ne preporučuje za kalibraciju molekularnog seta (Nabholz i sar., 2009), pa analize Bajesove *skyline plot* metode za *MT-ND2* i *MT-ND6* gen nisu izvršene usled nepostojanja informacija o adekvatnoj mutacionoj stopi.

Haplogrupe mtDNK definisane na osnovu Bajesovog filogenetskog stabla i MJ mreža korišćene su kao populacije za određivanje stope protoka gena na osnovu teorije koalescencije u okviru MIGRATE-N 3.5.1 programa (Beerli, 2004). Rađeno je 5 ponavljanja primenom podrazumevanih podešavanja za tip podataka koji uključuje nukleotidne sekvence, sa izuzetkom odnosa tranzicija i transverzija koji je empirijski određivan za svaki ispitivani mtDNK marker. Analiza je obuhvatala 10 kratkih lanaca dužine 100.000 stabala i tri duga lanca dužine 1.000.000 stabala, sa *burn-in* vrednošću od 100.000 stabala. Određivan je kompletan model protoka gena koji podrazumeva asimetričan protok gena i pojedinačne vrednosti za svaku ispitivanu grupu, a prosečan broj migranata između grupa u oba smera,

iskazivan pod pretpostavkom jednakog odnosa polova, kao i odsustva varijanse u reproduktivnom uspehu između mužjaka i ženki.

U cilju sagledavanja filogenetskih odnosa između alela/haplotipova ispitivanih gena imunskog sistema takođe je formirano Bajesovo filogenetsko stablo i MJ mreža primenom programskih paketa MrBayes i PopART. Osnovni parametri analiza su podešavani na isti način kao i pri analizi mtDNK (videti u tekstu iznad), a kao sekvence *out* grupa korišćene su: za *DQA* gen sekvenca humanog *HLA-DQA1* gena (NM_002122), za *DQB* gen sekvenca humanog *HLA-DQB1* gena (NM_002123), a za *TLR2* gen sekvenca vrste *Oryctolagus cuniculus* (NM_001082781). Kako je *trans-species* polimorfizam opisan kao generalni obrazac prisutan u evoluciji gena imunskog sistema (Těšický i Vinkler, 2015), u cilju provere postojanja alela ispitivanih gena imunskog sistema deljenih između različitih vrsta roda *Lepus*, izvršena je dodatna MJ analiza u kojoj su *DQA*, *DQB* i *TLR2* sekvence dobijene u ovom istraživanju ispitivane zajedno sa dostupnim sekvencama drugih vrsta iz roda *Lepus*. Za *DQA* gen korišćene su sekvence vrsta *L. capensis* (MH346126-142), *L. timidus* (EU686547-550) i *L. granatensis* (EU686552-554), za *DQB* gen korišćene su sekvence vrste *L. capensis* (MH346143-168), i za *TLR2* gen takođe sekvence vrste *L. capensis*, NCBI pristupnih brojeva MH493864-888. Kao *out* grupe, korišćene su identične sekvence kao i za ukorenjavanje Bajesovog filogenetskog stabla.

4.3.4. Analiza prostornih obrazaca distribucije molekularnog diverziteta

Određivanje prostornih obrazaca distribucije molekularnog diverziteta markera mtDNK izvršeno je analizama prostornog grupisanja jedinki u geografski i genetički diferencirane klastere u okviru paketa Geneland 3.0 (Guillot i sar., 2005), inkorporiranog u R programski jezik (R Core Team). Geneland se zasniva na Bajesovom metodu otkrivanja geografskih diskontinuiteta grupišući jedinke u K broj grupa tako da se maksimalno smanji Hardy-Vajnbergov disekvilibrijum unutar svake grupe, uzimajući u obzir genetičke podatke zajedno sa informacijama o geografskoj lokaciji za svaku ispitivanu jedinku. Primenjen je model zasnovan na nezavisnim učestalostima alela (eng. *uncorrelated model*), pri čemu je rađeno 10 nezavisnih ponavljanja, a svako od ponavljanja podrazumevalo je 1.000.000 iteracija sa brojem potencijalnih klastera K od 1 do 8, zapisivanjem parametara pri svakoj 100.-oj iteraciji, i odbacivanjem 30% iteracija kao *burn-in* vrednost. Maksimalna stopa Poasonovih procesa podešena je na 251, maksimalni broj nukelusa na vrednost 753, a nesigurnost

preciznosti geografskih lokacija na vrednost ± 1 km. Rezultati analiza su prikazivani interpolacijom posteriornih verovatnoća za pripadnost jedinki svakom od određenih klastera na geografsku mapu, pomoću R skripte preuzete od Jay i saradnika (2012).

U cilju određivanja prostorne distribucije molekularnog diverziteta ispitivanih jedarnih makera primenjena je prostorna analiza glavnih komponenti (engl. *spatial Principal Component Analysis* (sPCA)) u okviru paketa *adegenet* (Jombart, 2008) u R programskom jeziku zasnovana na varijabilnim pozicijama. sPCA analiza predstavlja modifikovanu analizu glavnih komponenti pri čemu se pored varijanse između jedinki, u obzir uzima i njihova prostorna autokorelacija. Kako ovaj metod ne zahteva određeni genetički model (npr. Hardy-Vajnbergova ravnoteža) kao takav se može primeniti i za analizu adaptivnih jedarnih markera imunog sistema. Prostorna analiza glavnih komponenti može ukazati bilo prisustvo globalne strukture (koja proizilazi iz pozitivne autokorelacije), bilo lokalne strukture (koja proizilazi iz negativne autokorelacije), a statistička značajnost globalne i lokalne strukturiranosti ispitivana je Monte-Karlovim permutacionim testom na osnovu 10.000 ponavljanja.

Za svaku od prostorno i genetički definisanih grupa (klastera) određeni su osnovni parametri molekularnog diverziteta u okviru programskih paketa DnaSP i Arlequin, kao i u paketima GENETIX i GenePOP za jedarne molekularne markere, dok je genetička diferencijacija između definisanih grupa određivana analizom molekularne varijanse (AMOVA), kao i poređenjem Φ_{ST} vrednosti za mtDNK markere, odnosno F_{ST} vrednosti za jedarne markere na osnovu prosečnog broja razlika, a čija je statistička značajnost testirana na osnovu 10.000 permutacija.

4.3.5. Detekcija signala selekcije na molekularnom nivou

Iako selekcija prepoznaje fenotip, usled njene determinističke prirode, obrasci varijabilnosti na nivou DNK koji su uzrokovani selekcijom, mogu se razlikovati od obrazaca uslovljenih drugim evolucionim procesima. Kao nulta hipoteza u uočavanju selekcije na molekularnom nivou koristi se neutralistička teorija molekularne evolucije (Kimura, 1983), a svako odstupanje od obrazaca očekivanih pod pretpostavkom ove teorije može se interpretirati kao selekcion signal, budući da svaki od modela selekcije uslovljava specifične promene kako u lokusima koji su pod direktnim dejstvom selekcije, tako i u selektivno neutralnim lokusima koji su sa njima vezani (Kreitman, 2000). Metodi za detekciju selekcije na molekularnom nivou se mogu klasifikovati na različite načine, ali se najčešće grupišu u: 1. testove zasnovane na stopama sinonimnih i nesinonimnih zamena; 2. testove zasnovane na

spektru frekvencija; 3. testove zasnovane na gametskoj neravnoteži vezanosti, i 4. testove zasnovane na populacionoj diferencijaciji (Oleksyk i sar., 2010; Vitti i sar., 2013).

Testovi zasnovani na stopama sinonimnih i nesinonimnih supstitucija se koriste za određivanje vrednosti ω , koja predstavlja odnos d_N / d_S , tj. odnos stope nesinonimnih supstitucija po mestu u odnosu na stopu sinonimnih supstitucija po mestu. Pod pretpostavkom neutralističke teorije molekularne evolucije odnos d_N i d_S je jednak 1, dok u slučaju delovanja pozitivne selekcije odnos d_N / d_S postaje veći od 1, odnosno u slučaju delovanja negativne selekcije odnos d_N / d_S postaje manji od 1. U ovom istraživanju korišćena su tri pristupa za detekciju selekcije zasnovana na određivanju ω vrednosti. U programskom paketu MEGA, određivana je prosečna vrednost parametra ω za sva mesta u okviru svakog ispitivanog protein-kodirajućeg gena, koristeći Nei-Gojbori metoda (Nei i Gojbori, 1986), i primenom Jukes Cantor korekcije, pri čemu je značajnost odstupanja od hipoteze jednakosti d_N i d_S stope ispitivana Z-testom na osnovu 10000 *bootstrap* ponavljanja. Određivanje ω vrednosti i prisustvo pozitivne selekcije za svaki pojedinačni kodon izvršeno je primenom metode maksimalne sličnosti (Yang, 2000b) implementirane u *codeml* programu, u okviru PAML programskog paketa (Yang, 2007). *Codeml* testira prisustvo pozitivne selekcije primenom *likelihood ratio* testa koji poredi nultu hipotezu, tj. Neutralistički model kod koga nijedan kodon nema $d_N/d_S > 1$ sa verovatnoćom za alternativni model u kome određeni skup kodona može imati vrednost odnosa d_N/d_S veću od jedan (Yang i sar., 2000a; Yang i Swanson, 2002). Statistička značajnost je određivana izračunavanjem negativne vrednosti dvostruke razlike između verovatnoće za nulti model, i verovatnoće za alternativni model, koristeći distribuciju vrednosti χ^2 testa, sa brojem stepena slobode jednakom razlici u broju određivanih parametara (Nielsen i Yang, 1998). Poređenje *likelihood ratio* testa je izvršeno za tri *nested* modela i to za sledeće modele: M0 vs. M3; M1a vs. M2a i M7 vs M8. Model M0 podrazumeva jedno ω za sve kodone i predstavlja neutralni model. Model M1 određuje proporciju p_n od kodona koji se mogu svrstati u dve klase: p_0 , odnosno one koji su pod uticajem negativne selekcije gde je $0 < \omega_0 < 1$, i p_1 , odnosno one koji su selektivno neutralni. M2 je model pozitivne selekcije, koji dodaje treću klasu kodona dozvoljavajući vrednost $\omega > 1$. Diskretni model M3 podrazumeva tri klase kodona sa proporcijama p_0 , p_1 i p_2 , i tri ω vrednosti. Model M7 se zasniva na β distribuciji i dozvoljava vrednost ω od 0 do 1, ali ne veće od 1. M8 model se takođe zasniva na β distribuciji, ali u odnosu na M7 model omogućava dodatnu klasu kodona dozvoljavajući ω vrednost veću od 1, odnosno prisustvo pozitivne selekcije. Statistička značajnost M3 modela u odnosu na neutralistički model, korišćena je za

potvrdu prisustva dejstva selekcije u ispitivanim genima, dok su u slučajevima kada su modeli M2 i M8 statistički značajno podržani u odnosu na svoje *nested* modele sa kojima su poređeni, signali pozitivne selekcije prihvatani samo na kodonima sa *posterior* vrednošću Bajesovog faktora više od 95% (Yang i sar., 2005). Određivanje ω vrednosti za svaki pojedinačni kodon izvršena je i primenom MEME (eng. *Mixed Effects Model of Evolution*), FEL (eng. *Fixed Effects Likelihood*), SLAC (eng. *Single-Likelihood Ancestor Counting*), i FUBAR (eng. *Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation*) metoda dostupnih u okviru online platforme Datamonkey (dostupne na adresi: <https://www.datamonkey.org/>). Sve analize u okviru ovog portala izvršene su sa stabilima na kojima je izvršeno testiranje na prisustvo rekombinacija pomoću GARD algoritma (eng. *Genetic Algorithm for Recombination Detection*). Za prihvatanje dejstva selekcionog signala na određeni kodon, primenjivani su sledeći pragovi statističkih značajnosti: $p < 0,1$ za MEME, SLAC, FEL, i FUBAR (Kosakovsky i Frost, 2005).

Testovi zasnovani na distribuciji učestalosti alela podrazumevaju testove neutralnosti, Tajima's D test (Tajima, 1989) i Fu i Li's F (Fu i Li, 1993) koji su određivani u okviru programskog paketa DnaSP. Pozitivna ili negativna direkciona selekcija deluju ka smanjenju heterozigotnosti, rezultujući u pojavi viška retkih varijanti i negativnim D vrednostima, dok u slučaju dugoročnog dejstva balansne selekcije vrednost D postaje pozitivna.

Za određivanje kodona pod dejstvom pozitivne selekcije kod ispitivanih jedarnih gena primenjen je i omegaMap program (Wilson i McVean, 2006) koji omogućava detekciju signala prirodne selekcije, kontrolišući analizu na moguće prisustvo rekombinacionih događaja. Rađena su dva Monte Karlo Markovljeva lanca svaki sa 250000 iteracija, pri čemu je 25000 iteracija odbačeno kao *brun in* vrednost. Kao *a priori* informacija stopa mutacije (μ) i stopa tranzicija/transverzija (κ) su postavljene da slede inverznu distribuciju, sa početnim vrednostima 0,1 i 0,3, dok je selekциони parametar (ω), kao i stopa rekombinacija (ρ) postavljena takođe da prati inverznu distribuciju u opsegu vrednosti 0,01 i 20, odnosno 0,01 do 100 za ρ . Rezultati analize su vizuelizovani pomoću R skripte dostupne od autora programa.

Budući da su rekombinacije prepoznate kao važan mehanizam u evoluciji MHC gena, a kako aproksimacije i pretpostavke metoda za detekciju selekcionih signala mogu biti narušene u njihovom prisustvu, primenjeno je nekoliko testova za otkrivanje rekombinacija kod ispitivanih gena imunskog sistema. Program PERMUTE, u okviru omegaMap paketa (Wilson i McVean, 2006) korišćen je za određivanje vrednosti r^2 , D, i G4, na osnovu povezanosti fizičke distance svake nukleotidne pozicije i njene gametske neravnoteže

vezanosti. Kako su testovi rekombinacija osetljivi na primenjene metode, dodatno, prisustvo rekombinacija je izvršeno i primenom nekoliko metoda: RDP (Martin i Rybicki, 2000), GENECONV (Padidam i sar., 1999), MAXCHI (Smith, 1992), CHIMAERA (Posada i Crandall, 2001) i 3SEQ (Lam i sar., 2017) implementiranih u okviru RDP4 programskog paketa (Martin i sar., 2015). Sve analize su izvršene primenom podrazumevanih podešavanja, a statistička značajnost je posmatrana na nivou poverenja od 95%, primenom standardne Boniferonijeve korekcije za višestruke testove. U okviru RDP4 paketa izvršeno je i određivanje stope rekombinacija ($\rho = 4Nr$) i stope mutacija ($\theta = 4N\mu$), kao i odnosa ρ/θ , kao pokazatelja relativnog doprinosa rekombinacija u poređenju sa tačkastim mutacijama (Fearnhead i Donnelly, 2001), pri čemu odnos $\rho/\theta < 1$ ukazuje na veći doprinos mutacija u evoluciji ispitivanih gena, dok odnos $\rho/\theta > 1$ ukazuje na veći doprinos rekombinacija.

Promene u fizikohemijskim karakteristikama proteinskih varijanti ispitivanih proteinkodirajućih gena nastale kao posledica nesinonimnih aminokiselinskih zamena testirane su u okviru programa TreeSAAP (Woolley et al., 2003), koji koristi pomerajući prozor (eng. *sliding-window*) za poređenje uočenih aminokiselinskih zamena u odnosu na zamene očekivane pod uslovom selektivne neutralnosti. Svaka aminokiselinska zamena se klasifikuje u osam kategorija u zavisnosti od uticaja na lokalne fizičko-hemijske karakteristike: kategorije 1-3 imaju mali efekat na AK karakteristike (konzervativne promene); kategorije 4 i 5 srednji efekat, dok se kategorije od 6 do 8 označavaju radikalnim promenama. Z-test je korišćen da ukaže na značajnost radikalnih promena za 20 ispitivanih fizičko-hemijskih karakteristika, pri čemu se pozitivne vrednosti interpretiraju signalom pozitivne selekcije, dok se negativne vrednosti interpretiraju signalom negativne selekcije. Analize su izvršene na prozoru veličine 10 kodona, a sa ciljem izbegavanja lažno pozitivnih rezultata, samo vrednosti Z-testa iznad ili ispod 3,09 ($p < 0,001$) su smatrane kao promene radikalnog tipa (McClellan i Ellison, 2010). Da bi se utvrdio funkcionalni efekat svake fiksne aminokiselinske promene, izvršena je i analiza efekta proteinskih varijacija – PROVEAN (Choi i sar., 2015), koja sagledava varijacije u proteinskim sekvencama sa aspekta proteinske funkcije. Prag značajnosti testa je postavljen na vrednost -4,1, kako bi se izbegli lažno pozitivni rezultati. Ancestralna proteinska sekvenca određena na osnovu MJ mreže, korišćena je kao matrica, u odnosu na koju je poređena svaka fiksna aminokiselinska zamena.

4.3.6. Detekcija signala lokalnih adaptacija na molekularnom nivou

U cilju ispitivanja uticaja sredinskih karakteristika – klimatskih varijabli na distribuciju proteinskih varijanti za ispitivane protein-kodirajuće gene *MT-ND2*, *MT-ND6*, *MHC-DQA* i *MHC-DQB* korišćen su modeli regresione analize. Klimatske promenljive su preuzete iz globalne baze klimatskih podataka (WorldClim – Global Climate Data *ver.* 2, dostupno na: <http://worldclim.org/version2>) u rezoluciji od 30 sekundi. Preuzeto je 19 bioklimatskih varijabli, na osnovu kojih su određene vrednosti na osnovu geografskih koordinata za svaku ispitivanu jedinku. U analizama su korišćene samo osnovne promenljive klimatskih trendova (BIO1 – godišnja prosečna temperatura; BIO12 – godišnja precipitacija), kao i varijable ekstremnih i/ili ograničavajućih sredinskih faktora (BIO5 – maksimalna temperatura najtoplijeg meseca; BIO6 – minimalna temperatura najhladnijeg meseca; BIO8 – prosečna temperatura najvlažnijeg četvoromesečja; BIO9 – prosečna temperatura najsuvljeg četvoromesečja; BIO10 – prosečna temperatura najtoplijeg četvoromesečja; BIO11 – prosečna temperatura najhladnijeg četvoromesečja; BIO13 – precipitacija najvlažnijeg meseca; BIO14 – precipitacija najsuvljeg meseca; BIO16 – precipitacija najvlažnijeg četvoromesečja; BIO17 – precipitacija najsuvljeg četvoromesečja; BIO18 – precipitacija najtoplijeg četvoromesečja; BIO19 – precipitacija najhladnijeg četvoromesečja), dok su sve izvedene varijable i/ili varijable koje ukazuju na sezonalnost klimatskih podataka isključene iz analiza. Sve odabrane bioklimatske varijable (BIO1, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 16, 17, 18, 19) su pre daljih analiza logaritamski transformisane kako bi se smanjila varijansa i dobila normalna distribucija reziduala. Radi lakše intepretacije rezultata, odabrane bioklimatske varijable korišćene su za analizu glavnih komponenti zasnovanu na korelacionoj matrici, i to jedna analiza glavnih komponenti obuhvatila je bioklimatske varijable povezane sa temperaturom, dok je druga analiza glavnih komponenti obuhvatila sve varijable povezane sa precipitacijom, sa ciljem redukcije u manji broj podataka između kojih postoji mali stepen korelacije. Analiza glavnih komponenti izvršena je u SPSS *vers.*20 programu (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp), u kome je takođe vršena i provera postojanja multikolinearnosti u podacima, primenom praga za korelacioni koeficijent od $|r| > 0,7$.

Kod *MT-ND2* i *MT-ND6* gena ispitivan je uticaj sredinskih – klimatskih faktora kao nezavisnih varijabli na distribuciju najzastupljenijih proteinskih varijanti otkrivenih kod oba gena. Kod ispitivanih MHC gena ispitivan je uticaj sredinskih – klimatskih faktora kao nezavisnih varijabli na distribuciju genotipova, koji su sadržali najzastupljenije proteinske

varijante kod oba ispitivana gena. Dodatno kod MHC gena testiran je i uticaj klimatskih faktora na distribuciju heterozigotnosti, kako pojedinačno u oba ispitivana lokusa, tako i efekat heterozigotnosti u oba ispitivana lokusa istovremeno. Svi testirani modeli su izvršeni sa kontrolom uticaja geografskog signala, uzimajući uvek u obzir geografsku dužinu i geografsku širinu kao kontrolne nezavisne promenljive. U zavisnosti od broja različitih mogućnosti za svaku definisanu zavisnu varijablu, vršeni su globalni binomijalni ili multinomijalni modeli regresije u okviru programskog jezika R. Rezultati globalnog modelovanja, koji su obuhvatili sve moguće kombinacije zavisne sa svim ispitivanim nezavisnim promenljivama, rangirani su prema Akaiki informacionom kriterijumu korigovanom za malu veličinu uzorka (AICc), a potom je izvršeno sravnjivanje svih modela, kako bi se odredio relativni doprinos svake od nezavisnih varijabli, odnosno RVI vrednost (eng. *relative variable importance*) (Burnham i Anderson, 2002). Samo one nezavisne varijable koje su pokazivale RVI vrednost veću od 0,7 korišćene su za ponovno izvršavanje pojedinačnih modela binomijalne ili multinomijalne regresije, na osnovu kojih je vršena interpretacija značajnosti rezultata.

Sagledavanje funkcionalne uloge kodona kod kojih je uočen signal delovanja prirodne selekcije izvršeno je predviđanjem sekundarne strukture proteina upotrebom I-TASSER servera (Yang i sar., 2015). Predviđanje sekundarne strukture proteina izvršeno je samo za ispitivane mtDNK gene, dok je funkcionalni značaj kodonskih pozicija u okviru ispitivanih MHC gena sagledavan na osnovu homologije sa građom i funkcijom MHC molekula kod čoveka na osnovu rezultata studije Bondinas i saradnika (2007).

5. REZULTATI

U okviru istraživanja u ovoj doktorskoj disertaciji sagledan je molekularni diverzitet kod 251 jedinke vrste *Lepus europaeus*, a na osnovu varijabilnosti šest odabranih molekularnih markera: tri molekularna markera smeštena u mitohondrijskom genomu, kao i tri molekularna markera jedarnog genoma. Lančana reakcija polimeraze bila je uspešna kod svih ispitivanih jedinki za svaki od ispitivanih molekularnih markera, osim za *MHC-DQB* gen, kod koga je za devet jedinki, i nakon dodatnih optimalizacija protokola, kao i ponavljanja PCR reakcije, izostajalo umnožavanje konačnog produkta.

Sve dobijene nukleotidne sekvence su bile zadovoljavajućeg kvaliteta, i kao takve korišćene u daljim analizama. Uspešnost genotipizacije kod jedarnih gena, kao i rekonstrukcija gametskih faza, odnosno alela, bila je uspešna u 99,2% slučajeva za *MHC-DQA* gen, 97,93% slučajeva za *MHC-DQB* gen, i u 96.81% slučajeva za *TLR2* gen (Prilog II). Kod jedinki kod kojih je verovatnoća za rekonstruisani genotip ispitivanih jedarnih gena bila manja od 90%, informacije o genotipu za taj lokus su tretirane kao nedostajući podaci.

5.1. Molekularni diverzitet mitohondrijske DNK

U ispitivanom setu kombinovanom od ispitivana tri lokusa mtDNK kod 251 jedinke vrste *L. europaeus* ukupne dužine 1268 bp (1270 bp sa prazninama, pri čemu pozicije sa prazninama nisu uključivane u dalje analize) otkriveno je 136 različitih mitotipova, a na osnovu 198 varijabilnih pozicija (Tab. 1). Najveće vrednosti molekularnog diverziteta mtDNK otkrivene su unutar D-petlje, gde je zabeleženo 114 haplotipova sa vrednošću diverziteta od 0,984, dok su najniže vrednosti parametara molekularnog diverziteta otkrivene unutar *MT-ND6* gena (Tab. 1). U pogledu odnosa broja otkrivenih različitih haplotipova i broja ispitivanih jedinki, kod *MT-ND2* gena (0,12) zabeležene su niže vrednosti u odnosu na vrednosti zabeležene kod *MT-ND6* gena (0,22).

U okviru D-petlje mtDNK od 114 otkrivenih haplotipova, 66 su bili jedinstveni haplotipovi, dok je najveći deo preostalih haplotipova bio prisutan u niskim učestalostima u opsegu od 0,79% do 1,59%. Najzastupljeniji haplotipovi su LeDL*25 sa učestalošću od 6,77% i LeDL*3 sa učestalošću od 5,58%. U okviru *MT-ND2* gena od 30 otkrivenih haplotipova 33,33% su bili jedinstveni haplotipovi, dok su najzastupljeniji haplotipovi bili LeND2*1 sa učestalošću od 25,09% i haplotip LeND2*2 sa učestalošću od 23,11%. Od 55

otkrivenih haplotipova kod *MT-ND6* gena, 49% su bili jedinstveni haplotipovi, dok je haplotip LeND6*1 bio najzastupljeniji haplotip sa učestalošću od 43,82%.

Tabela 1. Osnovni parametri molekularnog diverziteta D petlje (DL) i gena za subjedinicu 2 i 6 NADH dehidrogenaze (ND2 i ND6) mitohondrijske DNK kod jedinki vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije / *Table 1. Molecular diversity parameters for the mitochondrial D loop (DL) and NADH Dehydrogenase subunit 2 and 6 genes (ND2 and ND6) in of the studied Lepus europaeus individuals from Europe and Asia Minor*

	DL	ND2	ND6	Mitogenom
L	407	336	525	1268
S	108	34	56	198
SS	25	5	18	48
SP	83	29	38	150
η	121	34	62	217
h	114	30	55	136
Hd	0,984	0,862	0,799	0,989
π	0,030	0,012	0,007	0,016
k	12,062	4,065	3,754	19,881
GC	39,3%	40%	36,7%	38,4%

L – dužina ispitivanog segmenta / *total number of sites*; S – broj varijabilnih pozicija / *number of polymorphic sites*; SS – broj jedinstvenih varijabilnih pozicija / *singleton variable sites*; SP – broj parsimonijski informativnih pozicija / *number of parsimony informative sites*; η - ukupni broj mutacija / *total number of mutations*; h – broj haplotipova / *total number of haplotypes*; Hd – diverzitet haplotipova / *haplotype diversity*; π – diverzitet nukleotida / *nucleotide diversity*; k – prosečan broj nukleotidnih razlika / *average number of nucleotide differences*; %GC –sadržaj GC parova / *GC content*

Prevođenjem nukleotidnih sekvenci ispitivanih protein kodirajućih *MT-ND2* i *MT-ND6* gena u sekvence aminokiselina sagledani su parametri varijabilnosti na nivou aminokiselinskih sekvenci, pri čemu su jedinstvene aminokiselinske sekvence u daljem tekstu označavane kao proteinske varijante. Ispitivani deo sekvence *MT-ND2* gena odgovara fragmentu ND2 proteina dužine 112 aminokiselina, koji obuhvata region od 69 do 180 aminokiselinske pozicije u odnosu na čitavu sekvencu ND2 proteina. Od 34 otkrivene segregirajuće nukleotidne varijabilne pozicije, na šest pozicija su nukleotidne promene uzrokovale nesinonimne aminokiselinske zamene, dajući osam različitih proteinskih varijanti označenih slovima abecede kao ND2A-ND2H (Sl. 3). Prosečna evoluciona udaljenost između otkrivenih proteinskih varijanti iznosila je 0,008, pri čemu nije uočena nijedna pozicija sa više od dve različite aminokiseline. Najveću učestalost od 78,49% imala je proteinska varijanta ND2A, dok je proteinska varijanta ND2B bila zastupljena sa učestalošću od 15,14%. Proteinske varijante ND2F, ND2G i ND2H su otkrivene svaka samo kod jedne individue. Geografska distribucija proteinske varijante ND2A je ukazala na široku rasprostranjenost čitavim evropskim kontinentom, dok je geografska distribucija proteinske varijante ND2B najvećim delom bila ograničena na region Male Azije (Prilog III).

```

      78      88      98      108      118      128      138      148      158      168      178
ND2A ILMMAITLNLIDSGQWTLINPQNHFTPIIMLALIIKLGMAPFFHFVWPEVTQGVPLKSGILLTWQKLAPLSILYQISSSIDSTMMMLVAILSIMVGGWGLNQTQLRKILA
ND2B .....P.....
ND2C .....I.....
ND2D .....T.....
ND2E .....V.....
ND2F .....T.....P.....
ND2G .....V.....P.....
ND2H .....L.....P.....

```

Slika 3. Poravnanje aminokiselinskih sekvenci gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze kod vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Različite proteinske varijante su obeležene slovima abecede od A do H. / **Figure 3.** Amino-acid sequence alignment of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 2 gene in brown hares from Europe and Asia Minor. Different protein variants detected are labeled as A to H.

U slučaju *MT-ND6* gena ispitivana je kompletna nukleotidna sekvenca ovog gena, koja prevodenjem daje ND6 protein dužine 174 aminokiseline. Od 56 nukleotidnih segregirajućih varijabilnih pozicija, na njih 12 su nukleotidne promene vodile u nesinonimne aminokiselinske zamene dajući 17 proteinskih varijanti označenih kao ND6A do ND6Q (Sl. 4). Prosečna evolucionarna udaljenost između otkrivenih proteinskih varijanti iznosila je 0,007, pri čemu su na dve pozicije (kodoni 4 i 102) otkrivene više od dve različite aminokiseline. Najveću učestalost od 67,13% imala je proteinska varijanta ND6A, dok je proteinska varijanta ND2B bila zastupljena sa učestalošću od 13,15%. Proteinske varijante ND6J-Q su otkrivene svaka samo kod jedne individue. Najširu geografsku distribuciju pokazala je varijanta ND6A koja je bila rasprostranjena na teritoriji Evrope, dok je najveći broj različitih proteinskih varijanti uočen na teritoriji Srbije i Bugarske (Prilog IV).

```

      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100      110      120      130      140      150      160      170
ND6A MTTMVFLLSVMFVIGFVGFASKPSPYGGGLGLIVSGGVGCGIILSFGGSPFLGLMMFLIYLGGLVVFVGYITAMATEEYPTWGSNIMILSHLVGLVLEAGLVFMFAVSDVEVVVYFRKMMGDWVVFEGDEVLGILREDSMVAALYSYGSWLVVAGWLSLFFIVIEITRGG
ND6B .....M.....
ND6C .....I.....
ND6D .....L.....
ND6E .....V.....I.....
ND6F .....V.....V.....
ND6G .....M.....
ND6H .....M.....
ND6I .....V.....A.....M.....
ND6J .....F.....D.....
ND6K .....F.....
ND6L .....F.....
ND6M .....V.....
ND6N .....M.....
ND6O .....V.....
ND6P .....L.....
ND6Q .....F.....I.....

```

Slika 4. Poravnanje aminokiselinskih sekvenci gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze kod vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Različite proteinske varijante su obeležene slovima abecede od A do Q. / **Figure 4.** Amino-acid sequence alignment of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 6 gene in brown hares from Europe and Asia Minor. Different protein variants detected are labeled as ND6A to ND6Q.

5.1.1. Filogenetski odnosi i filogeografska struktura na osnovu varijabilnosti nukleotidnih sekvenci mtDNK

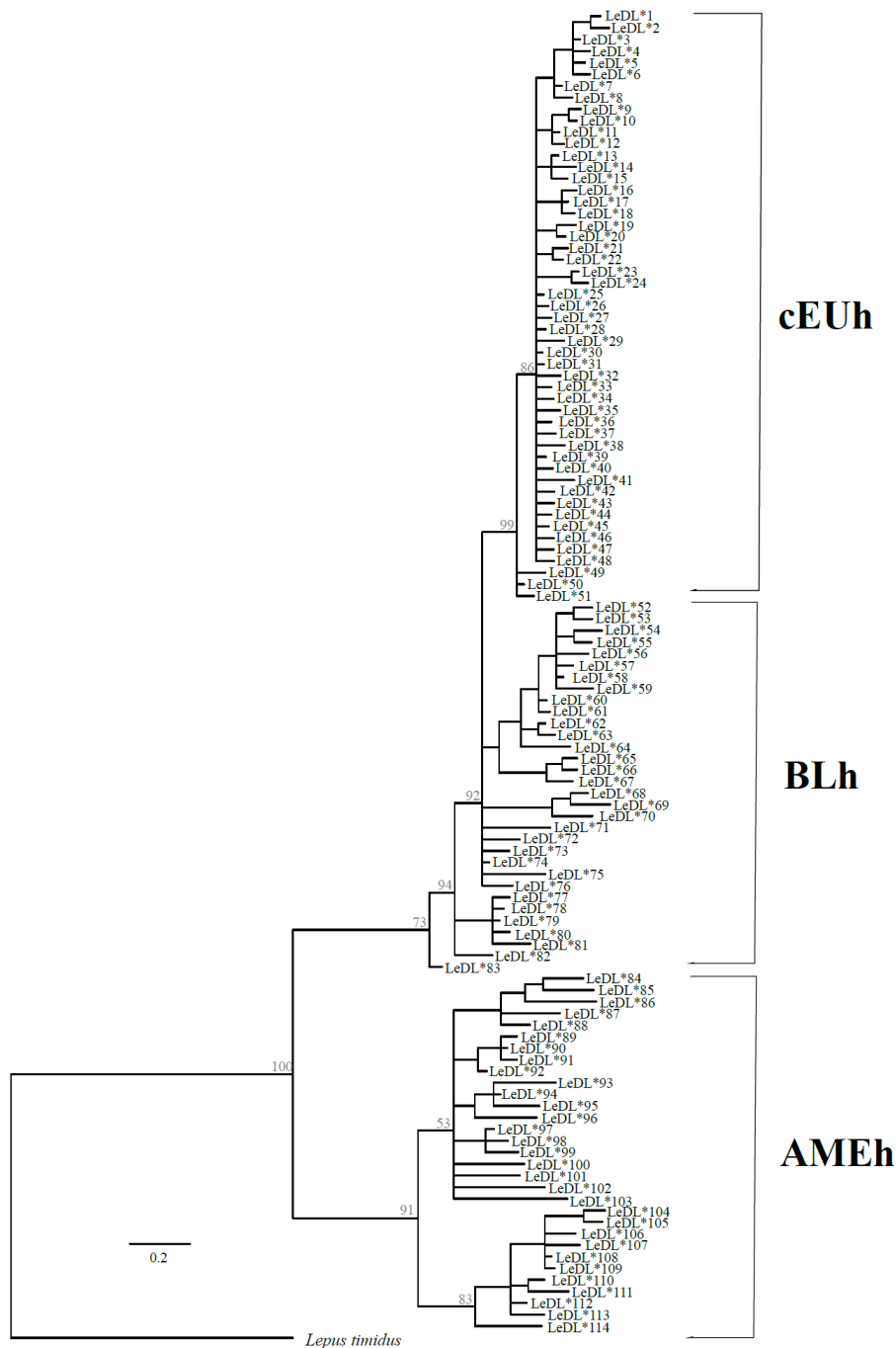
Filogenetski odnosi između otkrivenih haplotipova D petlje mtDNK, kao i haplotipova *MT-ND2* i *MT-ND6* gena ukazali su na slične obrazce distribucije molekularnog diverziteta i postojanje jakog filogeografskog signala koji razdvaja jedinke sa teritorije Male Azije od jedinki sa teritorije Evrope. Analizom D petlje mtDNK u okviru evropske

filogeografske grupe uočava se dodatni signal strukturiranosti razdvajajući jedinke sa teritorije Balkanskog poluostrva od jedinki sa teritorije centralne i zapadne Evrope. Sva tri ispitivana markera mtDNK pokazala su uočljiv gradijent opadanja vrednosti parametara molekularnog diverziteta od Anadolije, ka Balkanu, a potom dalje ka centralnoj i zapadnoj Evropi.

5.1.1.1. Analiza sekvenci D petlje mitohondrijske DNK

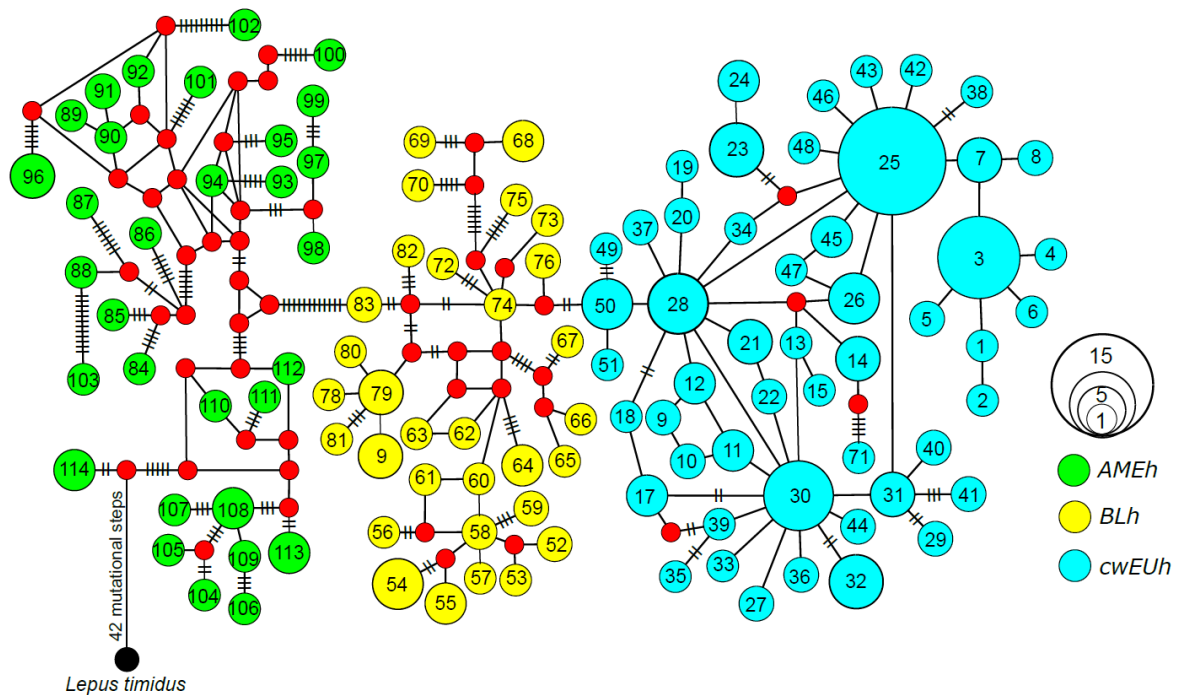
Analiza filogeografske strukturiranosti vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mtDNK ukazala je na prisustvo tri haplogrupe, označene kao anadolijska (AMEh), balkanska (BLh) i evropska haplogrupa (cwEUh) (Sl. 5, Sl. 6). Grupisanje haplotipova D petlje mtDNK u odgovarajuće haplogrupe izvršeno je na osnovu verovatnoća za pouzdanost klada dobijenih konstrukcijom Bajesovog filogenetskog stabla primenom HKY+G+I evolucionog modela označenog kao onog koji najbolje opisuje dati set podataka. Svaka od definisanih haplogrupa bila je podržana visokim vrednostima posteriorne verovatnoće, i to AMEh haplogrupa sa verovatnoćom od 91%, BLh grupa sa verovatnoćom od 94% i cwEUh grupa sa verovatnoćom od 99% (Sl. 5). U okviru AMEh haplogrupe grupisali su se haplotipovi jedinki sa teritorije Turske i Izraela, kao i haplotipovi jedinki sa teritorije istočne Bugarske i moldavskog dela Rumunije (Sl. 5, Prilog I). U okviru BLh grupe našle su se sekvence sa teritorije Bugarske, Grčke, Severne Makedonije, centralnog dela Srbije, kao i manji deo sekvenci sa teritorije Mađarske, Rumunije i Vojvodine. U okviru cwEUh grupe grupisale su sekvence sa teritorije zapadne i centralne Evrope, kao i sekvence sa teritorije severnog dela Srbije - Vojvodine.

Uočeni obrazac filogeografske strukturiranosti podržan je i analizom MJ mreže koja je u potpunosti potvrdila grupisanje haplotipova u gore definisane haplogrupe (Sl. 6). Na osnovu MJ mreže utvrđeno je postojanje 12 mutacionih koraka između AMEh i BLh grupe, koji povezuju jedan neuočeni haplotip sa anadolijske strane sa haplotipom LeDL*83 sa strane BLh grupe, koji je otkriven kod dve individue iz jugoistočnog dela Srbije (Sl. 6). Od 12 otkrivenih mutacionih koraka, četiri mutacije predstavljaju dijagnostičke karaktere koji razdvajaju AMEh grupu od BLh grupe i to mutacije na pozicijama 98, 112, 196 i 362 u odnosu na poravnanje sekvenci korišćeno u ovom istraživanju. Balkanska haplogrupa (BLh) odvojena je od cwEUh haplogrupe preko dva mutaciona koraka (od kojih je mutacija na poziciji 159 dijagnostička pozicija), koji povezuju jedan neuočeni haplotip sa balkanske strane sa haplotipom LeDL*50 koji je otkriven kod jedinki sa teritorije Belgije.



Slika 5. Bajesovo filogenetsko stablo evolucionih odnosa između haplotipova D petlje mitohondrijske DNK jedinki vrste *L. europaeus*. Oznake haplotipova su date u Prilogu I. Na čvorovima su prikazane vrednosti posteriorne verovatnoće. / **Figure 5.** Rooted Bayesian phylogenetic tree reconstructed using brown hare D loop mtDNA haplotype sequences. Posterior probabilities are shown at the nodes. Haplotype designations in the network correspond to those given in Appendix I.

U okviru AMEh grupe, a u manjoj meri i u okviru BLh grupe uočen je signal retikularne evolucije sa velikim brojem neuočenih haplotipova i višestrukim vezama između susednih haplotipova (Sl. 6).



Slika 6. Median-joining mreža haplotipova D petlje mitohondrijske DNK vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji haplotipova, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnošću odgovarajućim haplogrupama. Ukoliko je bilo više od jednog mutacionog koraka između susednih haplotipova, njihov broj je prikazivan vertikalnim crtama. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Oznake haplotipova su prikazane samo brojevima, pri čemu je oznaka LeDL* podrazumevana, a objašnjenja oznaka su data u Prilogu I. / *Figure 6. Median-joining network of the mtDNA D loop haplotypes of Lepus europaeus from Europe and Asia Minor. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to haplogroup membership as shown in the legend. Numbers of mutational steps between haplotypes are indicated by dashes, if more than one step is present. Red circles represent median vectors. Haplotype names correspond to those given in Appendix I.*

Kako je korišćena *out* grupa vrste *Lepus timidus* ukazala na ancestralni položaj AMEh grupe u odnosu na BLh i cwEUh grupu, uočeni obrazac filogeografskog grupisanja jedinki ukazuje da jedinke BLh grupe vode poreklo od jedinki grupisanih u AMEh grupu, dok je BLh grupa ishodišna grupa za dalje naseljavanje centralne i zapadne Evrope jedinkama vrste *Lepus europaeus*. Imajući u vidu uočeni obrazac filogeografskog grupisanja, pozicija haplotipa LeDL*50 koji obuhvata jedinke sa teritorije Belgije se može smatrati neočekivanom obzirom da prekida filogeografski poredak između haplotipova LeDL*74 i LeDL*76 otkrivenih kod jedinki sa teritorije jugoistočne Srbije i Severne Makedonije, sa

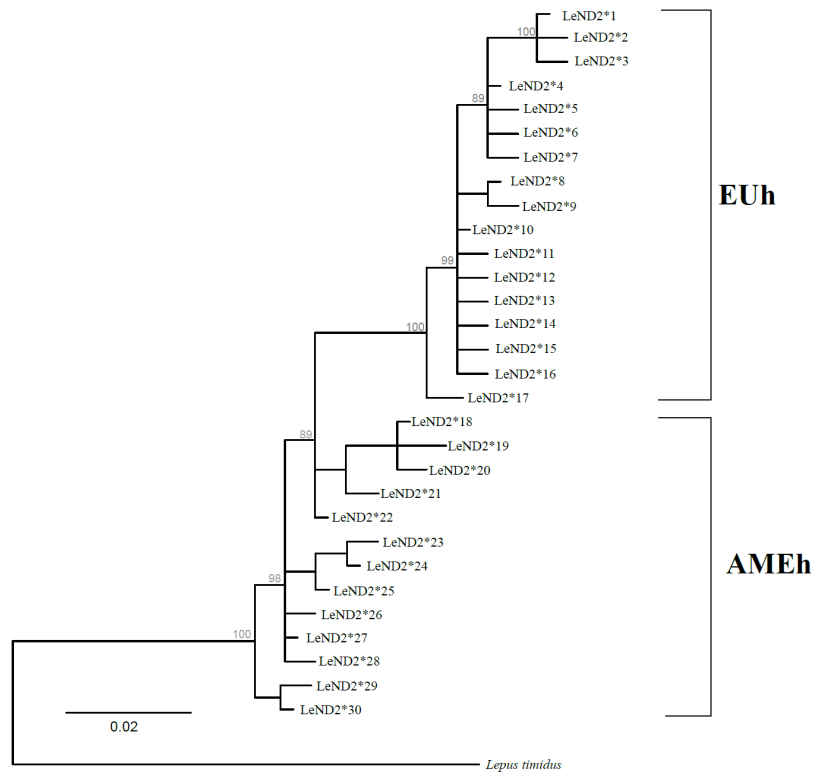
haplotipom LeDL*28, koji obuhvata jedinke sa teritorije severnog dela Srbije i Mađarske. Kako u literaturi nisu poznate informacije o mogućim premeštanjima jedinki između balkanskih zemalja i Belgije, moguće je da pozicija haplotipa LeDL*50 predstavlja rezultat paralelne mutacije. Naime, haplotip LeDL*50 na gotovo svim varijabilnim pozicijama nosi nukleotidne varijante karakteristične za cwEUh grupu, izuzev pozicije 153 na kojoj nosi nukleotidnu varijantu koja je zastupljena u visokoj frekvenciji u BLh haplogrupi, što može dovesti do veštačkog uspostavljanja intermedijarnog položaja ovog haplotipa između BLh i cwEUh haplogrupe.

Uočeni obrazac filogeografskog grupisanja D petlje mtDNK podržan je i distribucijom parametara molekularnog diverziteta. Najveće vrednosti parametara molekularnog diverziteta otkrivene su u AMEh grupi, gde je kod 42 jedinke otkriven 31 haplotip sa vrednostima $Hd=0,980$, $\pi=0,033$ i $k=13,376$, dok su najmanje vrednosti parametara molekularnog diverziteta otkrivene u cwEUh grupi gde je kod 155 jedinki otkriven 51 haplotip sa vrednostima $Hd=0,963$, $\pi=0,008$ i $k=3,333$. U BLh grupi je kod 54 jedinke otkriveno 32 haplotipa sa vrednostima $Hd=0,974$, $\pi=0,021$ i $k=8,654$. Analiza molekularne varijanse je ukazala da je 63,9% ukupne varijabilnosti posledica razlika između haplogrupa, dok je 36,10% varijacija posledica razlika unutar svake od ispitivanih haplogrupa, sa prosečnom Φ_{ST} vrednošću od 0,639 ($p<0,001$).

5.1.1.2. Analiza sekvenci gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze

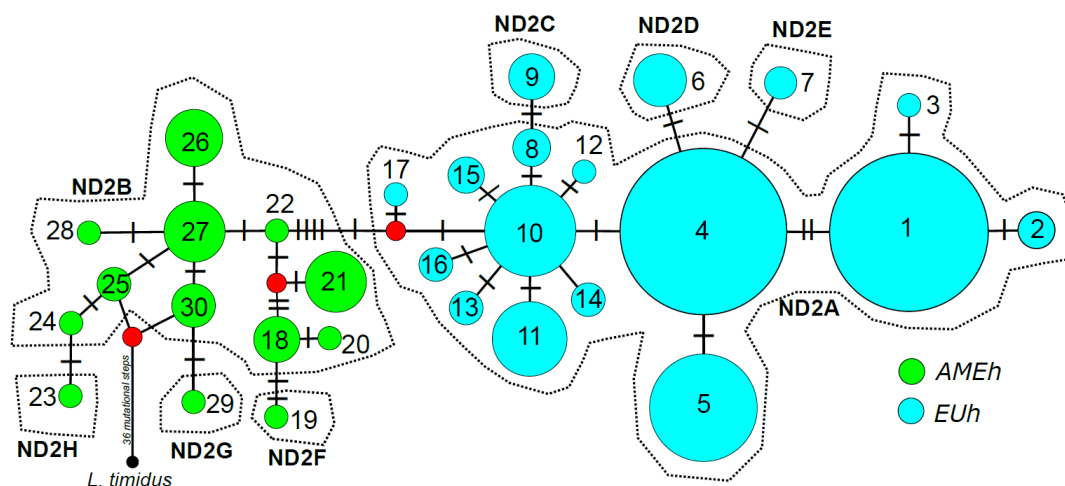
Na osnovu analize filogenetskih odnosa između otkrivenih haplotipova *MT-ND2* gena konstrukcijom Bajesovog filogenetskog stabla uočeno je postojanje dve velike haplogrupe, označene kao anadolijska (AMEh) i evropska (EUh), koje su podržane sa maksimalnim vrednostima posteriornih verovatnoća (Sl. 7). Bajesovo filogenetsko stablo je konstruisano na osnovu HKY evolucionog modela koji je označen kao model koji najbolje opisuje dati set podataka. AMEh grupa je obuhvatila 41 jedinku sa teritorije Turske, Izraela i istočnih delova Bugarske i Rumunije, dok su se u okviru evropske grupe (EUh) našle sve preostale jedinke koje su geografski isključivo uzorkovane na teritoriji Evrope. U okviru AMEh haplogrupe otkriveno je 13 haplotipova sa vrednostima $Hd = 0,885$, $\pi = 0,008$ i $k = 2,833$, dok je u evropskoj haplogrupi kod 210 jedinki pronađeno 17 haplotipova sa vrednostima $Hd = 0,807$, $\pi = 0,005$ i $k = 1,881$. Filogeografska strukturiranost u haplogrupe AMEh i EUh na osnovu analize sekvenci *MT-ND2* gena podržana je i analizom molekularne varijanse koja je ukazala visok nivo genetičke diferencijacije ($\Phi_{ST}=0,783$, $p<0,001$) između ovih grupa, sa 78,31%

varijabilnosti usled razlika između samih grupa, i samo 21,69% varijacija kao posledica varijabilnosti unutar svake od posmatranih grupa.



Slika 7. Bajesovo filogenetsko stablo evolucionih odnosa između haplotipova *MT-ND2* gena vrste *L. europaeus*. Oznake haplotipova su date u Prilogu I. Na čvorovima su prikazane vrednosti posteriorne verovatnoće. / *Figure 7. Rooted Bayesian phylogenetic tree reconstructed using brown hare MT-ND2 haplotype sequences. Posterior probabilities are shown at the nodes. Haplotype designations in the network correspond to those given in Appendix I.*

Grupisanje haplotipova u odgovarajuće haplogrupe podržano je i na osnovu MJ mreže (Sl. 8). AMEh grupa je od BLh grupe razdvojena sa pet mutacionih koraka, pri čemu se svaki od ovih mutacionih koraka može smatrati dijagnostičkim karakterom za razdvajanje obe grupe. Veza između AMEh i EUh grupe ostvarena je između haplotipa LeND2*22 (otkriven kod jedinke iz zapadnog dela Turske) sa anadolijske strane i neotkrivenog haplotipa sa evropske strane, od koga polazi haplotip LeND2*17 otkriven kod jedinki sa severozapada Bugarske.



Slika 8. Median-joining mreža haplotipova gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji haplotipova, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnošću odgovarajućim haplogrupama. Ukoliko je bilo više od jednog mutacionog koraka između susednih haplotipova, njihov broj je prikazivan vertikalnim crtama. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Isprekidanim linijama su zaokruženi haplotipovi koji odgovaraju proteinskim varijantama ND2A-H. Oznake haplotipova su prikazane samo brojevima, pri čemu je oznaka LeND2* podrazumevana, a objašnjenja oznaka su data u Prilogu I. / **Figure 8.** Median-joining network of the mitochondrial NADH Dehydrogenase subunit 2 gene sequences of *Lepus europaeus* from Europe and Asia Minor. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to haplogroup membership as shown in the legend. Numbers of mutational steps between haplotypes are indicated by dashes, if more than one step is present. Red circles represent median vectors. Dashed lines encircle different protein variants coded as ND2A to ND2H. Haplotype names correspond to those given in Appendix I.

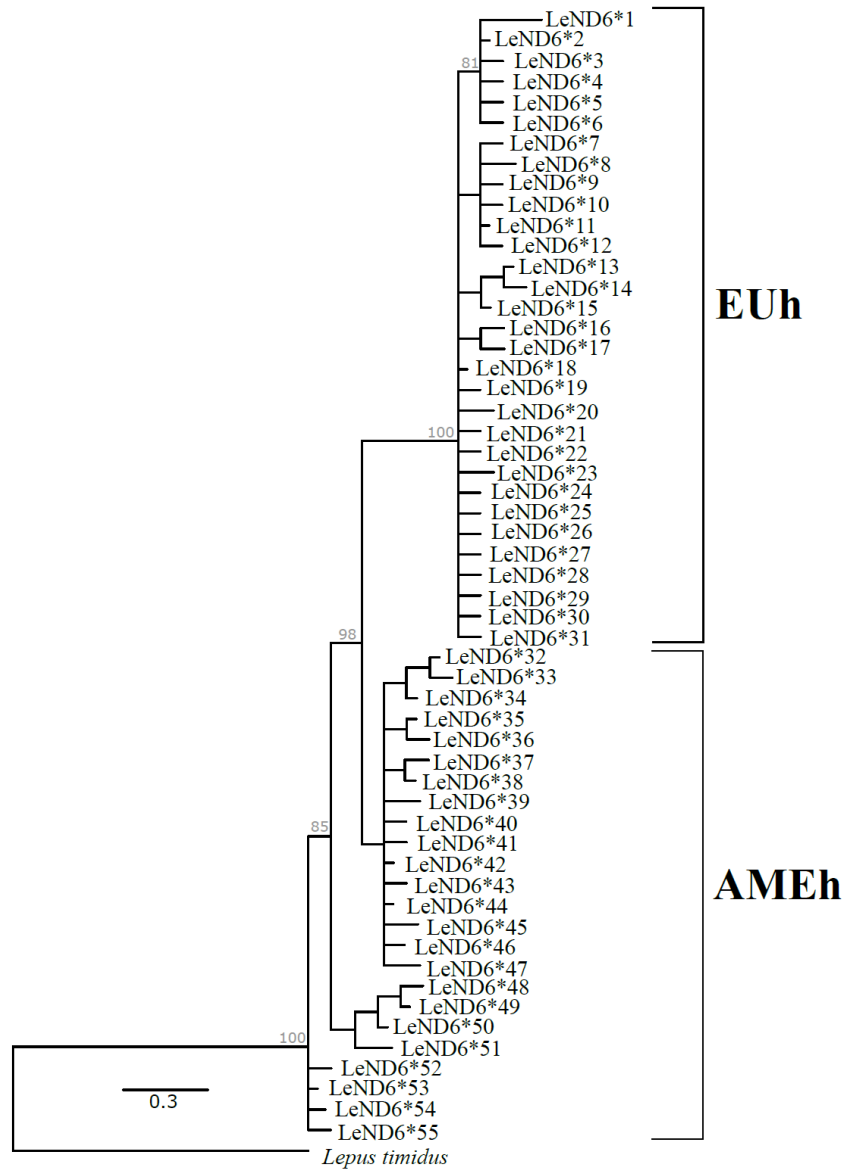
Na osnovu Bajesovog filogenetskog stabla, kao i MJ mreže u okviru EUh grupe može se uočiti signal substrukturiranosti i izdvajanje tri podgrupe, formirane oko haplotipova LeND2*1, LeND2*4 i LeND2*10 (Sl. 8). U okviru podgrupe koju čine haplotipovi grupisani oko haplotipa LeND2*10 našle su se pretežno sekvence jedinki sa teritorije Grčke, Bugarske i južnog i centralnog dela Srbije. U okviru podgrupe skoncentrisane oko haplotipa LeND2*4 grupisale su se sekvence jedinki sa teritorije centralne Srbije i Vojvodine, Mađarske, Rumunije, Austrije, Češke i Slovačke. Podgrupa skoncentrisana oko haplotipa LeND2*1 obuhvatila je pretežno sekvence sa teritorije Belgije, Francuske, Nemačke i Holandije, ali i sekvence sa teritorije Češke, centralnog dela Srbije i Austrije. Ancestralni položaj u mreži zauzela je AMEh grupa, na osnovu ukorenjavanja mreže sekvencom *MT-ND2* gena vrste *Lepus timidus*. Uočena geografska substrukturiranost u okviru evropske haplogrupe, kao i ancestralnost AMEh grupe, pokazuje da je AMEh grupa bila izvorišna za naseljavanje jugoistočnog dela Evrope, koja je dalje delovala kao izvorišna grupa za naseljavanje

centralnog dela Evrope, a jedinke centralnog dela Evrope dalje delovale kao ishodišna grupa za kolonizaciju zapadnog dela Evrope.

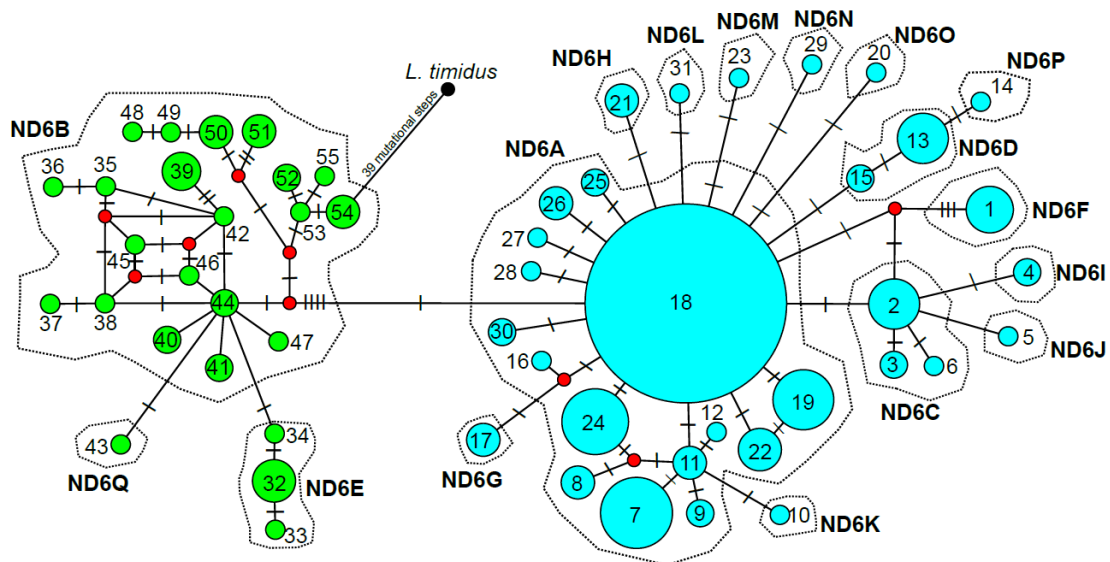
5.1.1.3. Analiza sekvenci gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK

Na osnovu Bajesovog filogenetskog stabla *MT-ND6* gena mitohondrijske DNK otkriveno je prisustvo dve haplogrupe označene kao anadolijska (AMEh) i evropska (EUh) haplogrupa, koje su podržane visokim vrednostima posteriornih verovatnoća (Sl. 9). Bajesovo filogenetsko stablo je formirano na osnovu HKY+G evolucionog modela određenog kao onog koji najbolje opisuje ispitivani set sekvenci. Grupisanje sekvenci u okviru haplogrupa AMEh i EUh bilo je komplementarno kao i u slučaju kod *MT-ND2* gena. U okviru AMEh haplogrupe bile su sekvence jedinki sa teritorije Turske, Izraela, kao i istočnih delova Rumunije i Bugarske, dok su se sekvence preostalih jedinki grupisale u okviru haplogrupe EUh. Kod 210 jedinki u okviru EUh grupe pronađen je 31 haplotip sa vrednostima $Hd = 0,714$, $\pi = 0,003$ i $k = 1,475$, dok je kod 41 jedinke iz AMEh grupe otkriveno 24 haplotipa sa vrednostima $Hd = 0,965$, $\pi = 0,008$ i $k = 4,483$. Genetička diferencija između haplogrupa je bila visoka sa Φ_{ST} vrednošću od 0,686 ($p > 0,001$).

Uočeni obrazac grupisanja podržala je i MJ analiza (Sl. 10), koja je ukazala na prisustvo pet mutacionih koraka koji povezuju jedan neotkriveni haplotip sa anadolijske strane, sa najzastupljenijim haplotipom sa evropske strane, haplotipom LeND6*18. Četiri pozicije (183, 303, 376, 390 i 474) od prisutnih pet su dijagnostičke pozicije koje nedvosmisleno razdvajaju haplotipove AMEh grupe od EUh grupe. MJ mreža nije ukazala na postojanje jasnih signala dodatnog substrukturiranja u okviru EUh grupe, kao u slučaju MJ mreže *MT-ND2* gena. Ukorenjavanje MJ mreže sekvencom *MT-ND6* gena vrste *Lepus timidus*, ukazalo je takođe na ancestralni položaj haplogrupe AMEh, i njen ishodišni karakter u odnosu na EUh haplogrupu kao evolutivno izvedenu mlađu haplogrupu.



Slika 9. Bajesovo filogenetsko stablo evolucionih odnosa između haplotipova *MT-ND6* gena vrste *L. europaeus*. Oznake haplotipova su date u Prilogu I. Na čvorovima su prikazane vrednosti posteriornih verovatnoća. **Figure 9.** Rooted Bayesian phylogenetic tree reconstructed using brown hares *MT-ND6* haplotype sequences. Posterior probabilities are shown at the nodes. Haplotype designations in the network correspond to those given in Appendix I.

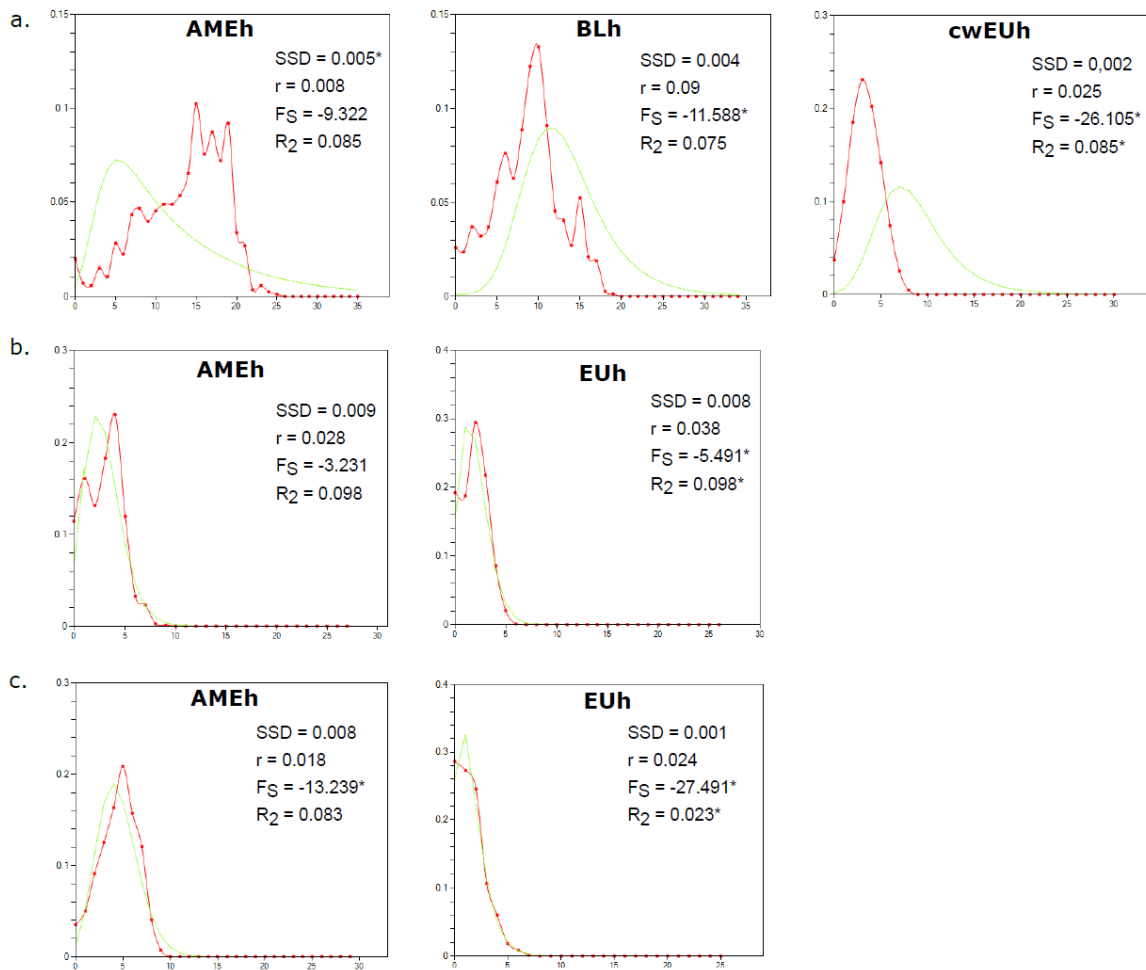


Slika 10. Median-joining mreža haplotipova gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze mitohondrijske DNK vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji haplotipova, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnošću odgovarajućim haplogrupama. Ukoliko je bilo više od jednog mutacionog koraka između susjednih haplotipova, njihov broj je prikazivan vertikalnim crtama. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Isprekidanim linijama su zaokruženi haplotipovi koji odgovaraju proteinskim varijantama ND6A-Q. Oznake haplotipova su prikazane samo brojevima, pri čemu je oznaka LeND6* podrazumevana, a objašnjenja oznaka su data u Prilogu I. / *Figure 10. Median-joining network of the mitochondrial NADH Dehydrogenase subunit 6 gene sequences of Lepus europaeus from Europe and Asia Minor. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to haplogroup membership as shown in the legend. Numbers of mutational steps between haplotypes are indicated by dashes, if more than one step is present. Red circles represent median vectors. Dashed lines encircle different protein variants coded as ND6A to ND6Q. Haplotype names correspond to those given in Appendix I.*

5.1.2. Karakteristike demografske istorije

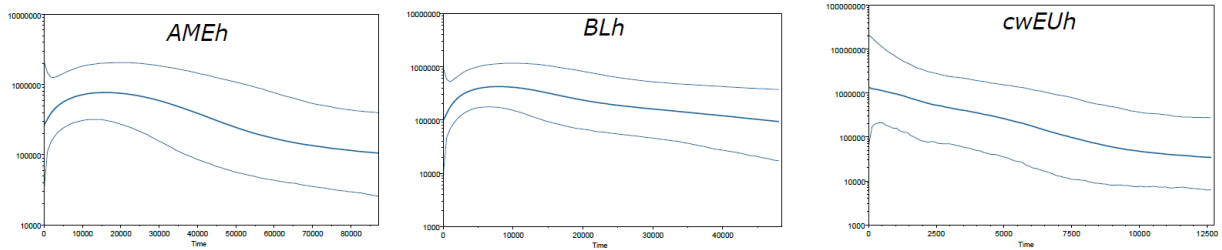
Analiza grafika parova nukleotidnih razlika (engl. *mismatch analysis*) pokazala je unimodalni obrazac distribucije u sve tri evropske haplogrupe definisane na osnovu varijabilnosti tri ispitivana mtDNK markera (Sl. 11), kao i u AMEh grupi definisanoj na osnovu varijabilnosti sekvenci MT-ND6 gena, jasno ukazujući na signal populacione ekspanzije u ovim haplogrupama. Signal populacione ekspanzije u pomenutim haplogrupama podržan je i statistički značajno negativnim vrednostima F_u -ovog F_S testa, kao i statistički značajno pozitivnim vrednostima R_2 parametra. Multimodalni obrazac distribucije parova nukleotidnih razlika u AMEh i BLh haplogrupi definisanoj na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mtDNK, kao i AMEh grupi definisanoj na osnovu varijabilnosti MT-ND2 sekvenci ukazao je na model populacione stabilnosti. Predloženi obrasci distribucije nukleotidnih razlika podržani su i na osnovu SSD vrednosti, koje statistički nisu odbacile model ekspanzije

ni u jednoj od posmatranih haplogrupa, osim u slučaju AMEh grupe definisane na osnovu sekvenci D petlje mtDNK (Sl. 11).



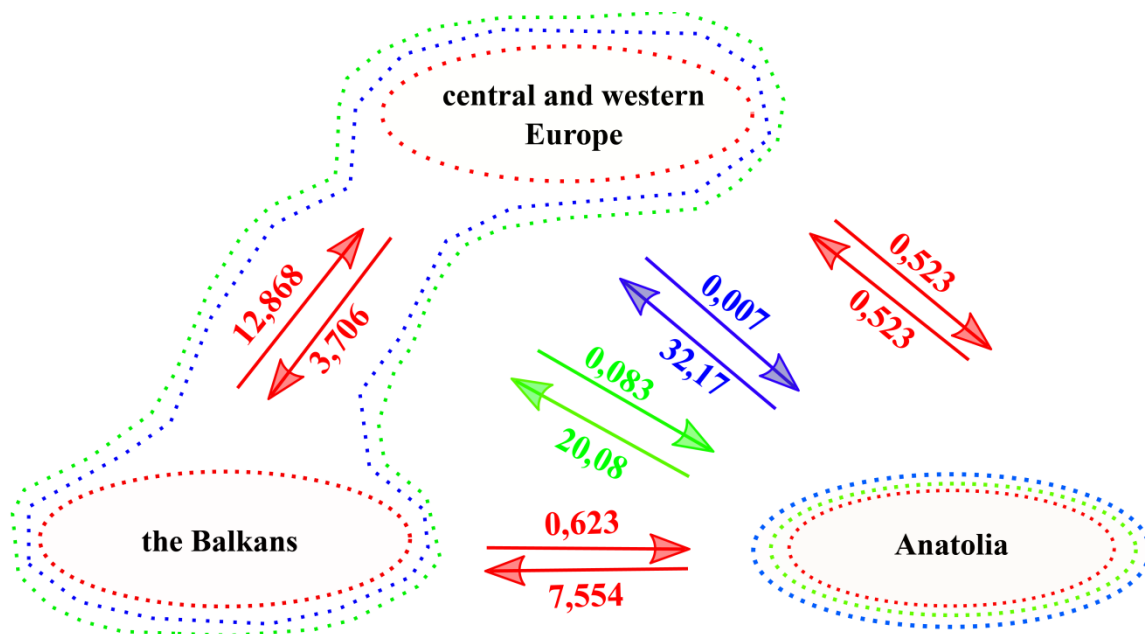
Slika 11. Grafici *mismatch* distribucije za definisane haplogrupe vrste *Lepus europaeus* na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mitohondrijske DNK (a), *MT-ND2* gena (b) i *MT-ND6* gena (c). Na ordinati su prikazani brojevi parova nukleotidnih razlika, a njihove relativne frekvencije na apscisi. Zelenom linijom prikazane su očekivane vrednosti, dok su crvenom linije prikazane uočene vrednosti. / *Figure 11. Mismatch distributions of the defined haplogroups of brown hares based on the mitochondrial D loop sequences (a), MT-ND2 sequences and MT-ND6 sequences (c). The X-axis represents the number of pairwise differences, and the Y-axis represents the relative frequencies of pairwise comparisons. The green line corresponds to the expected frequencies, and the red line corresponds to the frequencies observed.*

Bajesov *skyline* grafik formiran na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mtDNK ukazao je na jasan signal populacione ekspanzije u cwEUh grupi koji započinje pre oko 9.000 godina (Sl. 12). U okviru BLh grupe uočava se blaga populaciona ekspanzija počev od pre oko 20.000 godina, dok je u AMEh grupi uočen signal ekspanzije koji započinje pre oko 55.000 godina. Vremensko datiranje demografske istorije za svaku od tri haplogrupe ukazuje da je AMEh grupa evoluciono najstarija, dok je cwEUh evoluciono najmlađa.



Slika 12. Bajesov skyline grafik promena u efektivnoj veličini populacije za tri haplogrupe definisane na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mitohondrijske DNK kod vrste *Lepus europaeus*. / **Figure 12.** Bayesian skyline plots showing the change in effective female population size for each haplogroup defined based on the variability of mitochondrial D loop sequences in brown hares from Europe and Asia Minor. Solid lines show the median estimate, while light lines show the 95% highest posterior density interval.

Stepen protoka gena tokom evolucione istorije definisanih haplogrupa određen je na osnovu koalescentnog pristupa u Migrate-N programu, a ukazao je na izrazito jak signal asimetričnog protoka gena između anadolijske i evropske haplogrupe (Sl. 13).



Slika 13. Grafički prikaz protoka gena na osnovu M vrednosti između definisanih haplogrupa vrste *Lepus europaeus*. Crvenom bojom prikazane su vrednosti za D petlju mitohondrijske DNK, zelenom bojom za MT-ND2, a plavom bojom za MT-ND6 gen. / **Figure 13.** Graphical summary showing the results of gene flow analyses based on the pairwise gene flow estimates M between brown hare haplogroups. Arrows indicates direction of gene flow. The red colour corresponds to the mitochondrial D loop sequences, the green to the MT-ND2 and the blue to the MT-ND6 gene.

5.1.3. Prostorni obrasci distribucije molekularnog diverziteta mitohondrijske DNK

Postojanje genetički i geografski homogenih grupa testirano je primenom Bajesovog algoritma za grupisanje jedinki u okviru Geneland programa, koji pored genetičkih podataka,

uzima u obzir i geografske koordinate ispitivanih jedinki, te daje posteriornu verovatnoću za pripadnost odgovarajućim klasterima. Komplementarni obrasci prostornog grupisanja jedinki uočeni su analizom sekvenci D petlje mtDNK i *MT-ND2* gena, dok je analiza sekvenci *MT-ND6* gena ukazala na drugačiji prostorni obrazac molekularnog diverziteta. Bez obzira na uočeni prostorni obrazac, svi ispitivani markeri mtDNK su ukazali na postojanje gradijenta opadanja vrednosti parametara molekularnog diverziteta od Anadolije ka jugoistočnoj Evropi, a potom dalje ka centralnoj i zapadnoj Evropi.

Na osnovu Bajesove analize klasterovanja sekvenci D petlje mtDNK kod vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije uočeno je postojanje četiri prostorno i genetički diferencirane grupe (Sl. 14), koje su na osnovu geografskih lokacija jedinki članova svake grupe označene kao: anadolijska grupa (AM), jugoistočno-evropska grupa (SEE), centralno-evropska grupa (CE) i zapadno-evropska grupa (WE). Sve jedinke su pokazale visoke vrednosti posteriorne verovatnoće (>90%) za pripadnost dodeljenim prostornim grupama, izuzev jedinki iz istočne Rumunije kod kojih je verovatnoća za pripadnost jugoistočno-evropskoj grupi iznosila oko 50%, verovatnoća za pripadnost anadolijskoj grupi iznosila oko 36%, dok je preostalih oko 12% ukazivalo na pripadnost centralno-evropskoj grupi (Sl. 14).

Najveće vrednosti parametara genetičke varijabilnosti otkrivene su u AM grupi, dok je najmanji nivo varijabilnosti otkriven u WE grupi (Tab. 2). Uočeni nivo prostornog grupisanja podržan je i analizom molekularne varijanse, koja je ukazala da je 45% varijacije komponenata posledica razlika između uočenih grupa, sa prosečnom Φ_{ST} vrednošću od 0,451 ($p < 0,001$). Najveći nivo genetičke diferencijacije otkriven je između AM i WE grupe, dok je najmanji nivo genetičke diferencijacije otkriven između CE i WE grupe (Tab. 3). Sve Φ_{ST} vrednosti su bile statistički signifikante ($p < 0,001$).



Slika 14. Mapa distribucije posteriornih verovatnoća za pripadnost jedinki vrste *Lepus europaeus* odgovarajućim klasterima označenim različitim bojama na osnovu prostorne analize sekvenci D petlje mitohondrijske DNK. Najtamniji regioni odgovaraju najvećim verovatnoćama za pripadnost grupama. Geografske lokacije jedinki su predstavljene crnim tačkama. AM – Anadolija/Bliski Istok, SEE – jugoistočno-evropska grupa; CE – centralno-veropska grupa; WE – zapadno-evropska grupa. / *Figure 14. Map of posterior probabilities of cluster membership based on spatial clustering of mitochondrial D loop sequences in brown hares from Europe and Asia Minor. Darker areas correspond to higher probability to belong to the demersal cluster, while sampling locations are indicated by black dots. AM – Anatolia /Middle East cluster, SEE – southeastern Europe; CE – central Europe; WE – western Europe.*

Tabela 2. Osnovni parametri molekularnog diverziteta za prostorne grupe vrste *Lepus europaeus* određene na osnovu analize sekvenci D petlje mitohondrijske DNK. / *Table 2. Molecular diversity indices of the brown hare spatial groups as determined by the spatial clustering of D loop mitochondrial sequences.*

	AM	SEE	CE	WE
n	34	63	97	57
h	25	40	37	19
Hd	0,973	0,981	0,938	0,936
π	0,036	0,030	0,012	0,006
k	14,891	12,326	4,891	2,663

n – broj individual / *sample size*; h – broj haplotipova / *total number of haplotypes*; Hd – diverzitet haplotipova / *haplotype diversity*; π – diverzitet nukleotida / *nucleotide diversity*; k – prosečan broj nukleotidnih razlika / *average number of nucleotide differences*

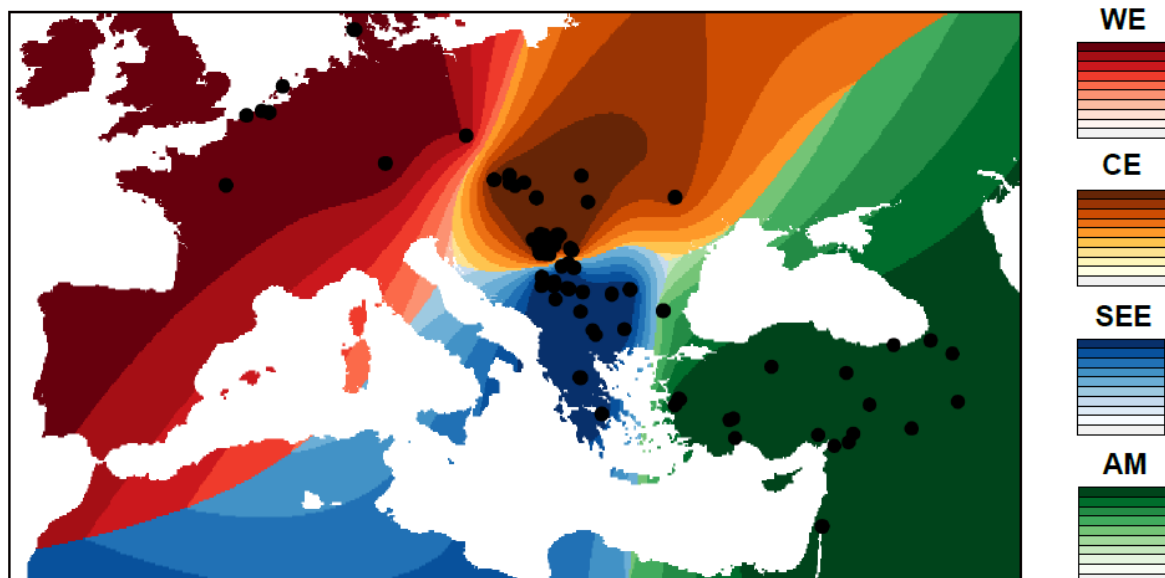
AM – Anadolija/Bliski Istok / *Anatolia /Middle East cluster*, SEE – jugoistočno-evropska grupa/ *southeastern Europe*; CE – centralno-veropska grupa / *central Europe*; WE – zapadno-evropska grupa/ *western Europe*

Tabela 3. Vrednosti genetičke diferencijacije na osnovu Φ_{ST} parametra između prostornih grupa definisanih analizom sekvenci D petlje mitohondrijske DNK vrste *L. europaeus* ispod dijagonale, kao i broj migranata po generaciji prikazan sa gornje strane dijagonale. / *Table 3. Pairwise Φ_{ST} values between brown hare spatial groups revealed by the analysis of D loop mitochondrial sequences below diagonal, and their respective average number of migrants per generation above diagonal.*

	AM	SEE	CE	WE
AM		0,65	0,32	0,26
SEE	0,444		1,67	1,08
CE	0,677	0,250		2,15
WE	0,703	0,309	0,176	

AM – Anadolija/Bliski Istok / *Anatolia/Middle East cluster*, SEE – jugoistočno-evropska grupa/ *southeastern Europe*; CE – centralno-evropska grupa / *central Europe*; WE – zapadno-evropska grupa/ *western Europe*

Analiza distribucije molekularnog diverziteta na osnovu prostornog grupisanja sekvenci *MT-ND2* gena ukazala je na sličan obrazac kao i analiza sekvenci D petlje mtDNK, odnosno prisustvo četiri već definisane prostorne grupe: anadolijaska grupa (AM), jugoistočno-evropska grupa (SEE), centralno-evropska grupa (CE) i zapadno-evropska grupa (WE) (Sl. 15). Pripadnost individua prostornim grupama u najvećem broju slučajeva bila je podržana sa verovatnoćama većim od 90%, osim u slučaju jedinki sa teritorije istočne Bugarske koje su verovatnoćom od oko 63% združene u AM grupu, dok je preostalih 37% predlagalo njihovo združivanje u jugoistočno-evropsku SEE grupu. Takođe, jedinke sa teritorije istočne Rumunije su na osnovu prostorne analize *MT-ND2* sekvenci združene u CE grupu sa verovatnoćom od oko 85%, dok je preostalih 15% ukazivalo na njihovo grupisanje u AM grupu. Vrednosti parametara molekularnog diverziteta bile su najveće u okviru AM grupe, dok su najmanje vrednosti parametara molekularnog diverziteta uočene u okviru WE grupe (Tab. 4). Najmanja genetička diferencija uočena je između SEE i CE grupe, dok je najveća genetička diferencija uočena između AM i WE grupe (Tab. 5). Uočeni prostorni obrazac podržala je i analiza molekularne varijanse koja je ukazala da je svega 30,33% varijabilnosti posledica razlika unutar grupa, dok je 69,67% varijabilnosti posledica razlika između grupa, sa prosečnom vrednošću Φ_{ST} parametra od 0,697 ($p < 0,001$).



Slika 15. Mapa distribucije posteriornih verovatnoća za pripadnost jedinki vrste *Lepus europaeus* odgovarajućim klasterima označenim različitim bojama na osnovu prostorne analize sekvenci *MT-ND2* gena mitohondrijske DNK. Najtamniji regioni odgovaraju najvećim verovatnoćama za pripadnost grupama. Geografske lokacije jedinki su predstavljene crnim tačkama. AM – Anadolija/Bliski Istok, SEE – jugoistočno-evropska grupa; CE – centralno-veropska grupa; WE – zapadno-evropska grupa. / *Figure 15. Map of posterior probabilities of cluster membership based on spatial clustering of mitochondrial NADH Dehydrogenase subunit 2 gene sequences in brown hares from Europe and Asia Minor. Darker areas correspond to higher probability to belong to the demersal cluster, while sampling locations are indicated with black dots. AM – Anatolia /Middle East cluster, SEE – southeastern Europe; CE – central Europe; WE – western Europe.*

Tabela 4. Osnovni parametri molekularnog diverziteta za prostorne grupe vrste *Lepus europaeus* određene na osnovu analize sekvenci *MT-ND2* gena. / *Table 4. Molecular diversity indices of the brown hare spatial groups determined by the spatial clustering of MT-ND2 gene sequences.*

	AM	SEE	CE	WE
n	35	61	93	62
h	11	15	11	4
Hd	0,859	0,843	0,634	0,212
π	0,007	0,005	0,005	0,001
k	2,363	1,776	1,851	0,313

n – broj individua / *sample size*; h – broj haplotipova / *total number of haplotypes*; Hd – diverzitet haplotipova / *haplotype diversity*; π – diverzitet nukleotida / *nucleotide diversity*; k – prosečan broj nukleotidnih razlika / *average number of nucleotide differences*

AM – Anadolija/Bliski Istok / *Anatolia /Middle East cluster*, SEE – jugoistočno-evropska grupa / *southeastern Europe*; CE – centralno-veropska grupa / *central Europe*; WE – zapadno-evropska grupa / *western Europe*

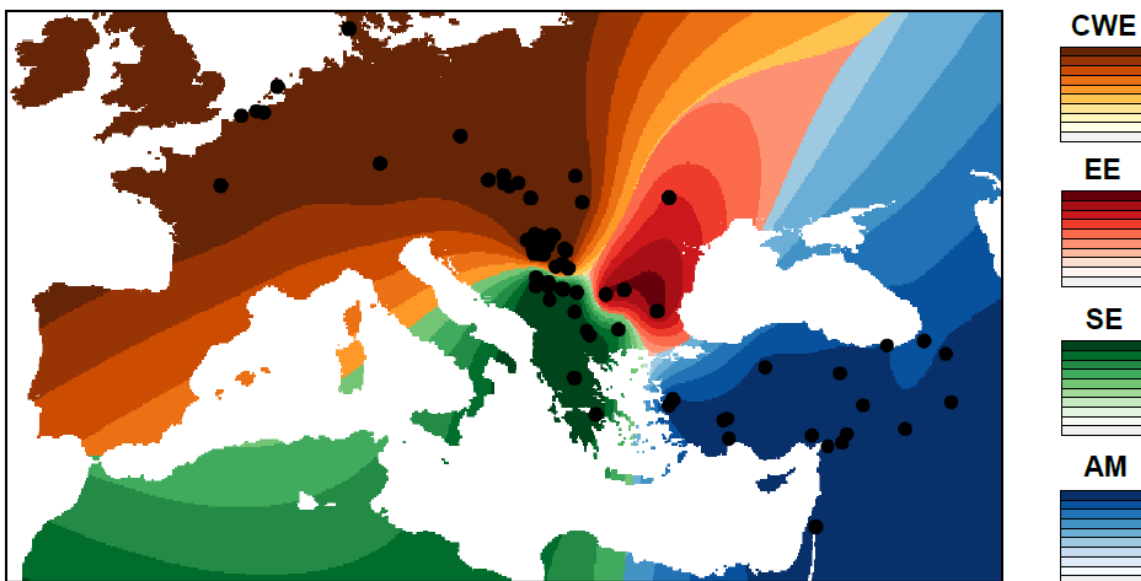
Tabela 5. Vrednosti genetičke diferencijacije na osnovu Φ_{ST} parametra između prostornih grupa definisanih analizom sekvenci *MT-ND2* gena vrste *L. europaeus* ispod dijagonale, kao i broj migranata po generaciji prikazan sa gornje strane dijagonale. / *Table 5. Pairwise Φ_{ST} values between brown hare spatial groups revealed by the analysis of MT-ND2 gene sequences below diagonal, and their respective average number of migrants per generation above diagonal.*

	AM	SEE	CE	WE
AM		0,08	0,08	0,04
SEE	0,767		0,75	0,11
CE	0,776	0,249		0,15
WE	0,899	0,699	0,597	

AM – Anadolija/Bliski Istok / *Anatolia /Middle East cluster*, SEE – jugoistočno-evropska grupa/ *southeastern Europe*; CE – centralno-evropska grupa / *central Europe*; WE – zapadno-evropska grupa/ *western Europe*

Analiza distribucije molekularnog diverziteta na osnovu prostornog grupisanja sekvenci *MT-ND6* gena ukazala je na prisustvo četiri prostorne grupe, koje su na osnovu geografskih lokacija jedinki članova svake grupe označene kao: anadolijska grupa (AM), istočno-evropska grupa (EE), južnoevropska grupa (SE) i zapadno-centralno evropska grupa (WCE) (Sl. 16). Najveći deo jedinki združen je odgovarajućim grupama na osnovu visokih vrednosti posteriornih verovatnoća (>90%). Niže vrednosti posteriornih verovatnoća karakterisale su neke od jedinki locirane u graničnim regionima susednih klastera. Jedinke sa teritorije severne Bugarske su verovatnoćom od 83% združene SE grupi, dok je verovatnoća za njihovu pripadnost EE grupi iznosila oko 16%. Jedinke sa teritorije istočne Rumunije združene su EE grupi na osnovu posteriornih verovatnoće od oko 71%, dok je preostalih oko 18% ukazivalo na njihovu pripadnost CWE grupi. Niže vrednosti posterior verovatnoće pokazale su i jedinke sa teritorije severoistoka Turske, koje su verovatnoćom od oko 82% združene anadolijskoj grupi, dok je oko 15% posteriorne verovatnoće ukazivalo na njihovu pripadnost EE grupi.

Najveće vrednosti parametara molekularnog diverziteta otkrivene su u EE grupi, iako je najveći diverzitet haplotipova uočen u AM grupi (Tab. 6). Uočeni obrazac prostornog grupisanja podržan je i analizom molekularne varijanse koja je ukazala na 59,37% varijacija kao posledicu razlika između grupa, dok je 40,63% varijacija bilo usled razlika unutar svake od grupa, sa prosečnom Φ_{ST} vrednošću od 0,694. Najveća genetička diferencijacija uočena je između AM i CWE grupe, dok je najmanji nivo genetičke diferencijacije uočen između EE i AM grupe (Tab. 7).



Slika 16. Mapa distribucije *posterior* verovatnoća za pripadnost jedinki vrste *Lepus europaeus* odgovarajućim klasterima označenim različitim bojama na osnovu prostorne analize sekvenci *MT-ND6* gena mitohondrijske DNK. Najtamniji regioni odgovaraju najvećim verovatnoćama za pripadnost grupama. Geografske lokacije jedinki su predstavljene crnim tačkama. AM – Anadolija/Bliski Istok; SE – južno-evropska grupa; EE – istočno-evropska grupa; CWE – zapadno-centralno-evropska grupa. / *Figure 16. Map of posterior probabilities of cluster membership based on spatial clustering of mitochondrial NADH Dehydrogenase subunit 6 gene sequences in brown hares from Europe and Asia Minor. Darker areas correspond to higher probability to belong to the demersal cluster, while sampling locations are indicated with black dots. AM –Anatolia /Middle East cluster, SE – southern Europe; EE – eastern Europe; CWE – central and western Europe cluster.*

Tabela 6. Osnovni parametri molekularnog diverziteta za prostorne grupe vrste *Lepus europaeus* određene na osnovu analize sekvenci *MT-ND6* gena. / *Table 6. Molecular diversity indices of the brown hare spatial groups as determined by the spatial clustering of MT-ND6 gene sequences.*

	AM	SE	EE	CWE
n	28	43	22	158
h	18	13	11	20
Hd	0,960	0.850	0,883	0,573
π	0,008	0,004	0,014	0,002
k	4,251	2,038	7,619	0,962

n – broj individua / *sample size*; h – broj haplotipova / *total number of haplotypes*; Hd – diverzitet haplotipova / *haplotype diversity*; π – diverzitet nukleotida / *nucleotide diversity*; k – prosečan broj nukleotidnih razlika / *average number of nucleotide differences*

AM – Anadolija/Bliski Istok / *Anatolia /Middle East cluster*, SE – južno-evropska grupa/ *southern Europe*; EE – istočno-evropska grupa / *eastern Europe*; CWE – zapadno-centralno-evropska grupa/ *central and western Europe*

Tabela 7. Vrednosti genetičke diferencijacije na osnovu Φ_{ST} parametra između prostornih grupa definisanih analizom sekvenci *MT-ND6* gena vrste *L. europaeus* ispod dijagonale, kao i broj migranata po generaciji prikazan sa gornje strane dijagonale. / *Table 7. Pairwise Φ_{ST} values between the brown hare spatial groups as revealed by the analysis of MT-ND6 gene sequences below diagonal, and their respective average number of migrants per generation above diagonal.*

	AM	EE	SE	CWE
AM		0,84	0,11	0,1
EE	0,237		0,43	0,45
SE	0,705	0,423		0,86
CWE	0,818	0,589	0,273	

AM – Anadolija/Bliski Istok / *Anatolia /Middle East cluster*, SE – južno-evropska grupa/ *southern Europe*; EE – istočno-evropska grupa / *eastern Europe*; CWE – zapadno-centralno-evropska grupa/ *central and western Europe*

5.1.4. Detekcija signala dejstva prirodne selekcije na mtDNK gene

Testovi neutralnosti za sekvence *MT-ND2* gena nisu statistički značajno odbacili neutralističku teoriju molekularne evolucije ni za jedan od ispitivanih testova, dok je kod *MT-ND6* gena utvrđeno statističko značajno odstupanje za svaki primenjeni test, potvrđujući signal delovanja prirodne selekcije (Tab. 8).

Tabela 8. Rezultati testova neutralnosti za sekvence gena za subjedinice 2 i 6 mitohondrijske NADH dehidrogenaze kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 8. Results of the neutrality tests for the mitochondrial NADH subunit 2 and 6 genes in brown hares.*

	MT-ND2	MT-ND6
Tajima D	-0,761	-1,868*
Fu and Li's D*	0,223	-2,153*
Fu and Li's F*	-0,238	-2,432*

*<0.05

Na osnovu Z testa selekcije, razlika između prosečnog broja nesinonimnih i sinonimnih supstitucija je statistički značajno odbacila hipotezu neutralnosti ($p < 0,001$). Kod oba ispitivana gena, odnos nesinonimnih i sinonimnih supstitucija je bio statistički značajno manji od 1, ukazujući na dejstvo negativne selekcije, i to kod *MT-ND2* gena vrednost Z testa je iznosila 3,47 ($p = 0,003$), dok je za *MT-ND6* gen vrednost Z testa iznosila 3,91 ($p < 0,001$) u korist alternativne hipoteze negativne selekcije.

Testovi prisustva selekcije zasnovani na analizama pojedinačnih kodona na web portal-u Datamonkey kod *MT-ND2* gena nisu ukazali na statistički značajno prisustvo

delovanja pozitivne selekcije nijednom od primenjenih metoda (MEME, FEL, SLAC i REL metoda), dok je uočen statistički značajan signal delovanja negativne selekcije, i to na kodonima 116 ($p=0,02$) i 130 ($p=0,08$) kada je primenjen FEL metod, odnosno na kodonu 116 ($p=0,09$) kada je primenjen SLAC metod. Analizom sekvenci *MT-ND6* gena signal pozitivne selekcije je uočen samo na kodonu 102 primenom REL metode, dok je signal negativne selekcije potvrđen na kodonima 19, 138 i 167 kada je primenjena SLAC metoda, odnosno na pozicijama 3, 9, 18, 28, 62, 90, 94, 123, 167 i 172 kada je primenjena FEL metoda. GARD analiza nije ukazala na postojanje rekombinacionih događaja ni u jednom od ispitivanih gena (*MT-ND2*, *MT-ND6*).

PAML analiza je odbacila nultu hipotezu neutralnosti kod oba ispitivana gena, ukazujući na prisustvo signala pozitivne selekcije (Tab. 9). Kod *MT-ND2* gena *likelihood-ratio* testovi su bili statistički značajni prilikom poređenja oba modela koji dozvoljavaju signal pozitivne selekcije, dok je poređenje ugnježđenih modela selekcije kod *MT-ND6* gena bilo statistički značajno samo kada je poređen model M1 sa modelom M2 (Tabela 9). Prateći vrednosti Bajesovog empirijskog faktora veće od 95%, kod *MT-ND2* gena signal pozitivne selekcije uočen je samo na kodonu 147 sa ω vrednošću od 5,29, dok je u okviru *MT-ND6* gena signal pozitivne selekcije uočen na kodonu 102 sa ω vrednošću od 3,01.

Tabela 9. Rezultati PAML analize za mitohondrijske gene za subjedinicu 2 i 6 NADH dehidrogenaze kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 9. Results of the PAML analyses for the mitochondrial NADH subunit 2 and 6 genes in brown hares.*

		2 Δ lnL	df	p(2 Δ lnL)	$\omega > 1$
MT-ND2	M0 vs. M3	39,25	4	$p < 0.01$	
	M1 vs. M2	-6.40	2	$p < 0.01$	147*
	M7 vs. M8	-12.66	2	$p < 0.01$	147**
MT-ND6	M0 vs. M3	59.97	4	$p < 0.001$	
	M1 vs. M2	22.69	2	$p < 0,01$	4*, 102**, 126*
	M7 vs. M8	3.42	2	$p = 0,18$	

2 Δ lnL – log likelihood ratio tests; df – broj stepena slobode/degrees of freedom; p(2 Δ lnL) – statistička značajnost poređenja /p-value for model comparisons; *95%, **99% - verovatnoće prema Bajesovom empirijskom faktoru / probabilities for having $\omega > 1$ according to Bayes Empirical Bayes (BEB).

TreeSAAP analiza u slučaju *MT-ND2* gena ukazala je na prisustvo radikalne promene magnitude 8 samo za vrednost ravnotežne konstante (jonizacija karboksilne grupe), ali sa vrednošću Z-testa od 1,94 ($0,001 < p < 0,05$), dok u slučaju *MT-ND6* gena nije uočena radikalna promena magnitude 6, 7 ili 8 ni za jednu od 20 ispitivanih fizikohemijskih karakteristika. PROVEAN analiza je kod *MT-ND2* proteina ukazala na značaj aminokiselinske zamene na kodonu 74 kao promene sa štetnim efektom sa vrednošću testa od -3,213, dok su kod *MT-*

ND6 proteina aminokiselinske zamene na dva kodona označene kao zamene sa štetnim efektom, i to zamena na poziciji 93 (vrednost testa -2,847) i na poziciji 133 (-4,348).

Da bi se izbegla mogućnost lažno pozitivnih rezultata, samo kodoni kod kojih je signal delovanja prirodne selekcije bio potvrđen sa minimalno dva ili više različitih selekcionih testova, su posmatrani kao jedini kodoni sa selekcionim signalom. Uzimajući u obzir ovaj pristup, samo kodonska pozicija 102 u okviru ND6 proteina je smatrana kao pozicija pod dejstvom pozitivne selekcije, dok je kodonska pozicija 116 kod ND2 proteina posmatrana kao pozicija pod dejstvom negativne selekcije, kao i kodonska pozicija 167 kod ND6 proteina.

5.1.5. Detekcija signala molekularnih adaptacija mtDNK

Sa ciljem detekcije signala lokalnih/regionalnih molekularnih adaptacija, izvršeno je testiranje uticaja sredinskih - klimatskih faktora na distribuciju najzastupljenijih proteinskih varijanti kod ispitivanih *MT-ND2* i *MT-ND6* gena. Modelovanje je izvršeno samo za jedinke sa teritorije Evrope, usled činjenice da se kod oba ispitivana gena na teritoriji Anadolije i Izraela bilo moguće pronaći samo dve jedinke koje poseduju proteinske varijante drugačije od ND2-B, odnosno ND6B proteinske varijante. Pored toga, iz modela su dodatno isključene jedinke sa teritorije Belgije, Francuske, Holandije i Nemačke, budući da su kod oba ispitivana gena sve jedinke u ovim regionima posedovale najzastupljenije proteinske varijante u oba gena, tj, varijante ND2A i ND6A. U tom smislu, model je postavljen na filogeografskoj pretpostavci da ostale proteinske varijante, koje su prisutne u niskim učestalostima na teritoriji Balkanskog poluostrva, usled efekta osnivača prilikom naseljavanja centralne i zapadne Evrope nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma nisu imale šansu da se prošire na prostor zapadne Evrope.

Analiza glavnih komponenti klimatskih varijabli povezanih sa temperaturom, na uzorku koji je korišćen za modelovanje, ukazala je na postojanje dve glavne komponente koje su zajedno opisivale 92,85% originalnih podataka. Prva glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa temperaturom (tf1) objašnjava 78,30% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od varijabli može se predstaviti kao faktor koji ukazuje na generalni efekat temperature, osim tokom najvlažnijih perioda godine. Druga glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa temperaturom (tf2) objašnjava 14,55% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od varijabli može se opisati kao temperaturni faktor koji ukazuje na efekat temperature tokom najvlažnijih perioda godine. Analiza glavnih

komponenti klimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom takođe je ukazala na postojanje dve glavne komponente koje su zajedno opisivale 87,85% originalnih podataka. Prva glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom (pf1) objašnjava 44,81% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od varijabli može se predstaviti faktorom koji oslikava vrednosti precipitacije tokom najhladnijih i najvlažnijih perioda godine. Druga glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom (pf2) objašnjava 43,04% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od originalnih varijabli može se predstaviti kao faktor koji ukazuje na generalni uticaj precipitacije, posebno tokom suvih perioda godine. Rezultati binomijalnog logističkog modela regresije sa dva najzastupljenija proteina ND2A i ND2B kao zavisnim varijabilama nisu pokazali statistički značajan efekat klimatskih faktora na distribuciju ovih proteina, ali je utvrđen statistički značajan uticaj geografske dužine na distribuciju proteinske varijante ND2B (Tab. 10, Tab. 11). Naime, individue koje su posedovale proteinsku varijantu ND2B češće su bile zastupljene u istočnim delovima teritorije Rumunije i Bugarske, u poređenju sa individuama koje su posedovale proteinsku varijantu ND2A.

Tabela 10. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja binomijalnih regresionih modela distribucije ND2 proteinskih varijanti kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 10. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the binary logistic model of occurrence of ND2 protein variants of brown hares after model averaging.*

	long	tf1	lat	tf2	pf1	pf2
RVI	1	0,74	0,52	0,49	0,44	0,34
Broj modela / Number of models	32	32	32	32	32	32

lat – geografska širina / *latitude*; long – geografska dužina / *longitude*; pf1 – precipitacioni faktor / *precipitation factor 1*; pf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*; tf1 – temperaturni faktor 1 / *temperature factor 1*; tf2 – temperaturni faktor 2 / *temperature factor 2*

Tabela 11. Sumarni prikaz rezultata binomijalnog regresionog modela distribucije ND2 proteinskih varijanti kod vrste *Lepus europaeus* / *Table 11. Summary results of the binomial logistic regression model of occurrence of ND2 protein variants in brown hares.*

	Koeficijent / <i>Coefficients</i>	Z vrednost / <i>Z value</i>	p
long	1,093	4,300	0,001
tf1	0,673	1,758	0,079

Referentna kategorija – ND2A proteinska varijanta / *Reference category: protein variant ND2A*
long – *longitude*; tf1 – temperaturni faktor 1 / *temperature factor 1*

Kako je kod *MT-ND6* gena uočen signal delovanja pozitivne selekcije, u modelovanje su uključene proteinske varijante ND6A-F, budući da je proteinska varijanta ND6F varijanta sa najmanjom učestalošću, a koja je rezultat nesinonimne zamene od varijante ND6A na

kodonu 102 za koji je utvrđen signal delovanja pozitivne selekcije. Nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnih regresionih modela, najveće RVI vrednosti pokazale su glavne komponentne povezane sa precipitacijom (pf1, pf2), kao i geografska dužina (Tab. 12), koje su potom korišćene za izvršavanje konačnog regresionog modela.

Tabela 12. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnih regresionih modela distribucije ND6 proteinskih varijanti kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 12. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression model of occurrence of ND6 protein variants in brown hares after model averaging.*

RVI	long	pf1	pf2	tf2	lat	tf1
RVI	1	0,97	0,95	0,11	0,09	0,06
Broj modela / <i>Number of models</i>	32	32	32	32	32	32

lat – geografska širina / *latitude*; long – geografska dužina / *longitude*; pf1 – precipitacioni faktor / *precipitation factor 1*; pf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*; tf1 – temperaturni faktor 1 / *temperature factor 1*; tf2 – temperaturni faktor 2 / *temperature factor 2*

Na osnovu rezultata multinomijalnog regresionog modela sve proteinske varijante (izuzev varijante ND6D) su u poređenju sa jedinkama koje su posedovale proteinsku varijantu ND6A statistički značajno bile češće prisutne kod jedinki koje su uzorkovane u istočnim delovima regiona koji je obuhvaćen modelovanjem. Pored toga, uočen je i statistički značajan efekat klimatskih faktora na distribuciju ND6 proteinskih varijanti. Naime, jedinke koje su uzorkovane sa lokacija za koje su karakteristične niske vrednosti precipitacije tokom vlažnih i suvih perioda godine, odnosno visoke vrednosti precipitacije tokom suvih perioda godine češće su posedovale proteinske varijante ND6C i ND6F, u poređenju sa jedinkama koje su posedovale proteinsku varijantu ND6A (Tab. 13).

Na kodonskoj poziciji 102, kod koje je uočen signal pozitivne selekcije kod *MT-ND6* gena, nalazi se jedna od tri moguće aminokiselinske varijante: metionin, valin ili leucin. Naime, kodonska pozicija 102 *MT-ND6* proteina razdvaja evoluciono stariju proteinsku varijantu ND6A kod koje se na ovoj poziciji nalazi leucin, u odnosu na od nje izvedene evoluciono mlađe proteinske varijante, i to ND6F varijantu kod koje je na ovoj poziciji valin, i ND6C varijantu kod koje se na ovoj poziciji nalazi metionin. Proteinska varijanta ND6C zastupljena je kod jedinki sa teritorije Bugarske, Severne Makedonije, kao i centralnog dela Srbije, dok je proteinska varijanta ND6F bila zastupljena kod jedinki sa teritorije Bugarske. Analiza sekundarne strukture proteina je sa verovatnoćom od 99% pokazala da se ova pozicija nalazi u heliksu koji čini četvrti transmembranski domen ND6 proteina. Imajući u vidu neslučajnu distribuciju proteinskih varijanti *MT-ND6* gena, kao i statistički značajan efekat klimatskih parametara na distribuciju onih proteinskih varijanti koje rezultuju iz pozicije koja je pod signalom pozitivne selekcije, uočeni rezultat ukazuje da distribucija ovih

varijanti može biti posledica regionalnih/lokalnih adaptacija na heterogenost klimatskih uslova na teritoriji Balkanskog poluostrva.

Tabela 13. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije ND6 proteinskih varijanti kod vrste *Lepus europaeus* / *Table 13. Summary results of the parameters of the multinomial regression model of occurrence of ND6 protein variants in brown hares.*

	Koeficijent / Coefficients	Z vrednost / Z value	p
ND6B(long)	1,068	2,540	0,011
ND6B(pf1)	-2,604	0,686	0,491
ND6B(pf2)	1,155	0,571	0,562
ND6C(long)	0,764	3,059	0,002
ND6C(pf1)	-7,223	2,945	0,003
ND6C(pf2)	3,353	2,861	0,004
ND6D(long)	0,267	1,560	0,118
ND6D(pf1)	-0,815	1,061	0,289
ND6D(pf2)	0,019	0,040	0,968
ND6E(long)	7,375	2,753	0,006
ND6E(pf1)	-40,687	2,373	0,084
ND6E(pf2)	16,389	2,027	0,087
ND6F(long)	6,794	1,962	0,048
ND6F(pf1)	-52,228	1,741	0,042
ND6F(pf2)	28,541	1,749	0,017

Referentna kategorija – ND6A proteinska varijanta / *Reference category: protein variant ND6A*
 long – longitude ; pf1 – precipitacioni faktor 1 / *precipitation factor 1*; pf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*

5.2. Molekularni diverzitet gena imunskog sistema

Ispitivanje gena imunskog sistema obuhvatilo je umnožavanje parcijalnih sekvenci egzona 2 MHC klase II *DQA* i *DQB* gena dužine 219 bp, odnosno 210 bp, kao i segmenta *TLR2* gena dužine 372 bp koji kodira intracelularni domen *TLR2* receptora.

U okviru *MHC-DQA* gena otkriveno je 30 alela (Tab. 14; Prilog V). Aleli su nazivani prateći predloženu nomenklaturu za imenovanje alela (Klein i sar. 1990), a kako je u ovom istraživanju korišćena metodologija kao u istraživanju de Bellocq i saradnika (2009), imenovanje novootkrivenih alela je nastavljeno od poslednjeg alela opisanog u pomenutoj studiji. Najzastupljeniji alel je bio alel *Leeu-DQA*06* sa učestalošću od 35,94%, dok su aleli *Leeu-DQA*01*, *Leeu-DQA*04*, *Leeu-DQA*10* i *Leeu-DQA*11* bili zastupljeni sa učestalostima od oko 10% (Prilog V). Najveći broj različitih alela otkriven je na teritoriji Turske, gde je uočeno prisustvo 15 alela *MHC-DQA* gena, dok je najmanji broj različitih alela uočen na teritoriji zapadne Evrope, u Belgiji gde su uočena četiri različita alela, kao i na teritoriji Holandije gde su pronađena tri različita alela. Uočena heterozigotnost bila je

statistički značajno manja od očekivane heterozigotnosti, ukazujući da MHC-DQA lokus odstupa od Hardy-Vajnborgove ravnoteže ($F_{IS}=0,181$; 95% CI 0,111 - 0,248).

Od otkrivenih 30 alela *MHC-DQA* gena može se prevesti 27 različitih proteinskih varijanti dužine 73 aminokiseline. Jedino su aleli *Leeu-DQA*4* i *Leeu-DQA*19* kodirali istu proteinsku varijantu, odnosno aleli *Leeu-DQA*6*, *Leeu-DQA*18* i *Leeu-DQA*24* (Sl. 17). Sve proteinske varijante su označavane brojevima alela čijim su prevođenjem nastale, a u slučaju da je za jednu varijantu bilo više od jedne alelne varijante, proteinska varijanta je nazivana po alelu najnižeg broja. Prosečna evoluciona udaljenost između proteinskih varijanti iznosila je 0,169. Najzastupljenija proteinska varijanta bila je varijanta DQA6 sa učestalošću od 37,3%. U ovom istraživanju ispitivan je deo egzona 2 koji pokriva region od 5. do 77. rezidue DQA molekula u odnosu na obeležavanje rezidua prema Bondinas i saradnici (2007). Na ukupno 30 aminokiselinskih segregirajućih mesta, uočeno je 36 nesinonimnih zamena, od čega je njih pet bilo *singleton* tipa.

Tabela 14. Parametri molekularnog diverziteta kod ispitivanih gena imunskog sistema vrste *Lepus europaeus*. / *Table 14. Molecular diversity indices of immune genes of Lepus europaeus*

	<i>MHC-DQA</i>	<i>MHC-DQB</i>	<i>TLR2</i>
n	249	238	243
N	498	476	486
N_A	30	41	13
S	58	57	11
η	70	69	11
Hd	0,829	0,839	0,424
π	0,069	0,066	0,001
k	15,081	13,779	0,513
H_o	0,679	0,651	0,304
H_e	0,829	0,839	0,424
F_{IS}	0,181	0,225	0,283

n – broj individua / sample size; N – ukupan broj alela / total alleles number; N_A – broj različitih alela / number of different alleles; S – broj varijabilnih pozicija / number of polymorphic sites; η – broj mutacija / number of mutations; Hd – diverzitet haplotipova / haplotype diversity; π – diverzitet nukleotida / nucleotide diversity; k – prosečan broj nukleotidnih razlika / average number of nucleotide differences; H_e – očekivana heterozigotnost / expected heterozygosity; H_o – uočena heterozigotnost / observed heterozygosity; F_{IS} – koeficijent inbreedinga prema formuli Weir i Cockerham 1984 / Inbreeding coefficient

Kod *MHC-DQB* gena otkriven je 41 alel (Tab. 14, Prilog VI), a njihovo imenovanje izvršeno je prateći predloženu nomenklaturu za imenovanje alela (Klein i sar., 1990), počev od broja 12, budući da je poslednji opisani alel bio *Leeu-DQB*11*. Najzastupljeniji alel *MHC-DQB* gena bio je *Leeu-DQB*1* sa frekvencijom od 35,08%, dok su aleli *Leeu-DQB*3*, *Leeu-DQB*4*, *Leeu-DQB*12*, i *Leeu-DQB*13* bili zastupljeni u frekvencijama oko 10% (Prilog VI). Najveći broj različitih alela otkriven je na teritoriji Turske gde je otkriveno 15 različitih alela, kao i na teritoriji Srbije gde je otkriveno 14 različitih alela. Uočena heterozigotnost je bila statistički značajno manja od očekivane heterozigotnosti na osnovu F_{IS}

vrednosti od 0,225 (95% CI 0,154 - 0,291) što ukazuje da je i u MHC-DQB lokusu prisutno odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže.

Od otkrivenih 41 alela *MHC-DQB* gena, može se prevesti 35 različitih aminokiselinskih sekvenci dužine 70 aminokiselina. Svi aleli su davali jedinstvene proteinske varijante, osim alela *Leeu-DQB*4*, *Leeu-DQB*10*, *Leeu-DQB*21* i *Leeu-DQB*30* koji su zajedno davali svoju identičnu proteinsku varijantu, zatim aleli *Leeu-DQB*2* i *Leeu-DQB*18*, odnosno aleli *Leeu-DQB*3* i *Leeu-DQB*19*, odnosno aleli *Leeu-DQB*14* i *Leeu-DQB*17* koji su takođe u parovima davali identične proteinske varijante (Sl. 18). Sve proteinske varijante su označavane brojevima alela čijim su prevođenjem nastale, a u slučaju da je za jednu proteinsku varijantu bilo više od jednog haplotipa, proteinska varijanta je nazivana po alelu najnižeg broja. Najzastupljenija proteinska varijanta bila je varijanta DQB1 sa učestalošću od 35,15%. Prosečna evolucionarna udaljenost između proteinskih varijanti *MHC-DQB* gena iznosila je 0,185. U ovom istraživanju ispitivan je deo egzona 2 *MHC-DQB* gena koji pokriva region od 9. do 78. rezidue u odnosu na obeležavanje rezidua prema Bondinas i saradnici (2007). Na ukupno 31 segregirajućem mestu otkrivene su 32 nesinonimne zamene, od kojih su četiri bile *singleton* tipa.

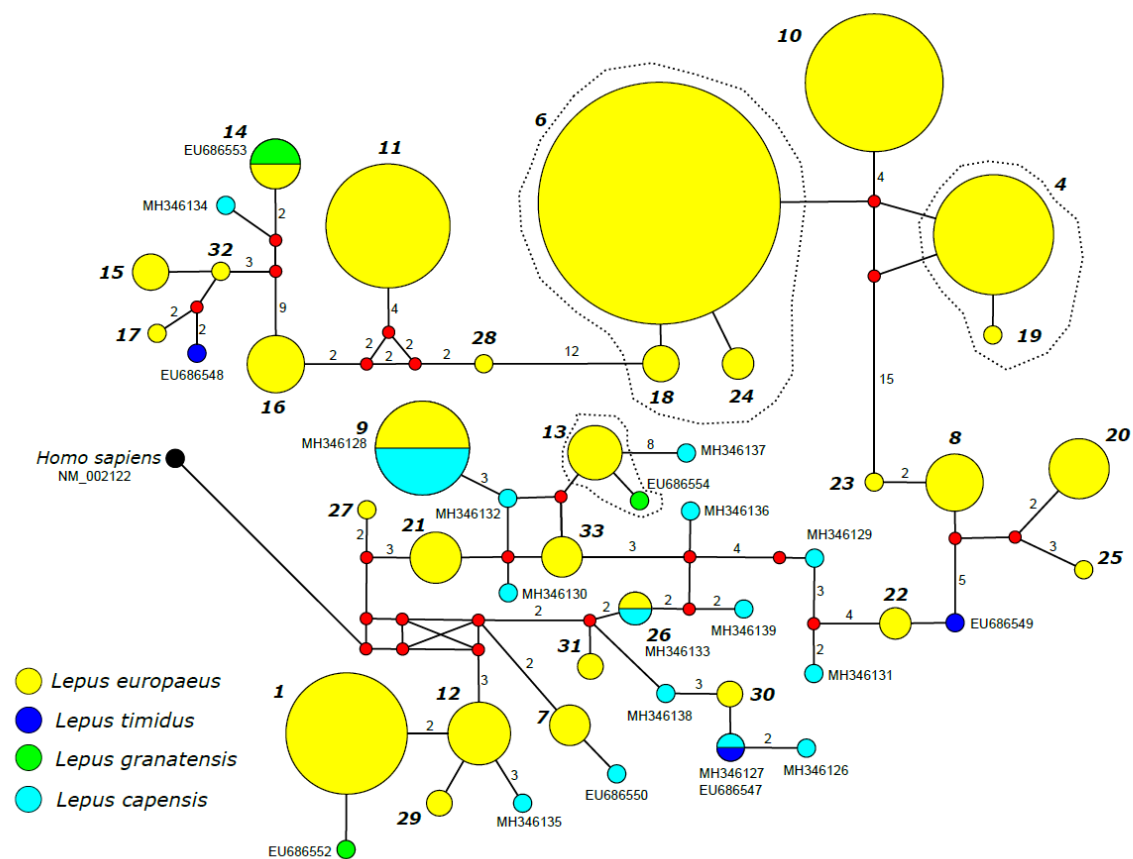
U okviru *TLR2* gena otkriveno je 13 alela (Tab. 14, Prilog VII), koji su označeni kao aleli *LeTLR2h1* do *LeTLR2h13*. Najzastupljeniji su bili aleli *LeTLR2h1* sa učestalošću od 73,25% i alel *LeTLR2h2* sa učestalošću od 19,75%, dok su aleli *LeTLR2h3*, *LeTLR2h8*, *LeTLR2h9*, *LeTLR2h11* i *LeTLR2h13* bili jedinstveni. I u *TLR2* lokusu uočeno je statistički značajno odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže na osnovu F_{IS} vrednosti od 0,283 (95% CI 0,163 - 0,395). Prevođenjem nukleotidnih sekvenci u aminokiselinske sekvence, otkriveno je 6 proteinskih varijanti na osnovu 5 nesinonimnih zamena na 5 segregirajućih mesta, od kojih je svaka zamena bila *singleton* tipa. Prosečna evolucionarna udaljenost između otkrivenih varijanti iznosila je 0,013. Sve proteinske varijante su označene slovima od A do F, kao TLR2A-TLR2F (Sl. 19). Najzastupljenija proteinska varijanta bila je varijanta TLR2A koja je činila 74,28% uzorka, dok je proteinska varijanta TLR2B pokazala učestalost od 24,07%.

5.2.1. Filogenetski odnosi i filogeografska struktura na osnovu alela gena imunskog sistema

Filogenetski odnosi između uočenih alela *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena sagledani na osnovu Bajesovih filogenetskih stabala pokazali su odsustvo izraženog signala filogeografske strukturiranosti (Prilog VIII). Iako se na stablima mogu uočiti geografski

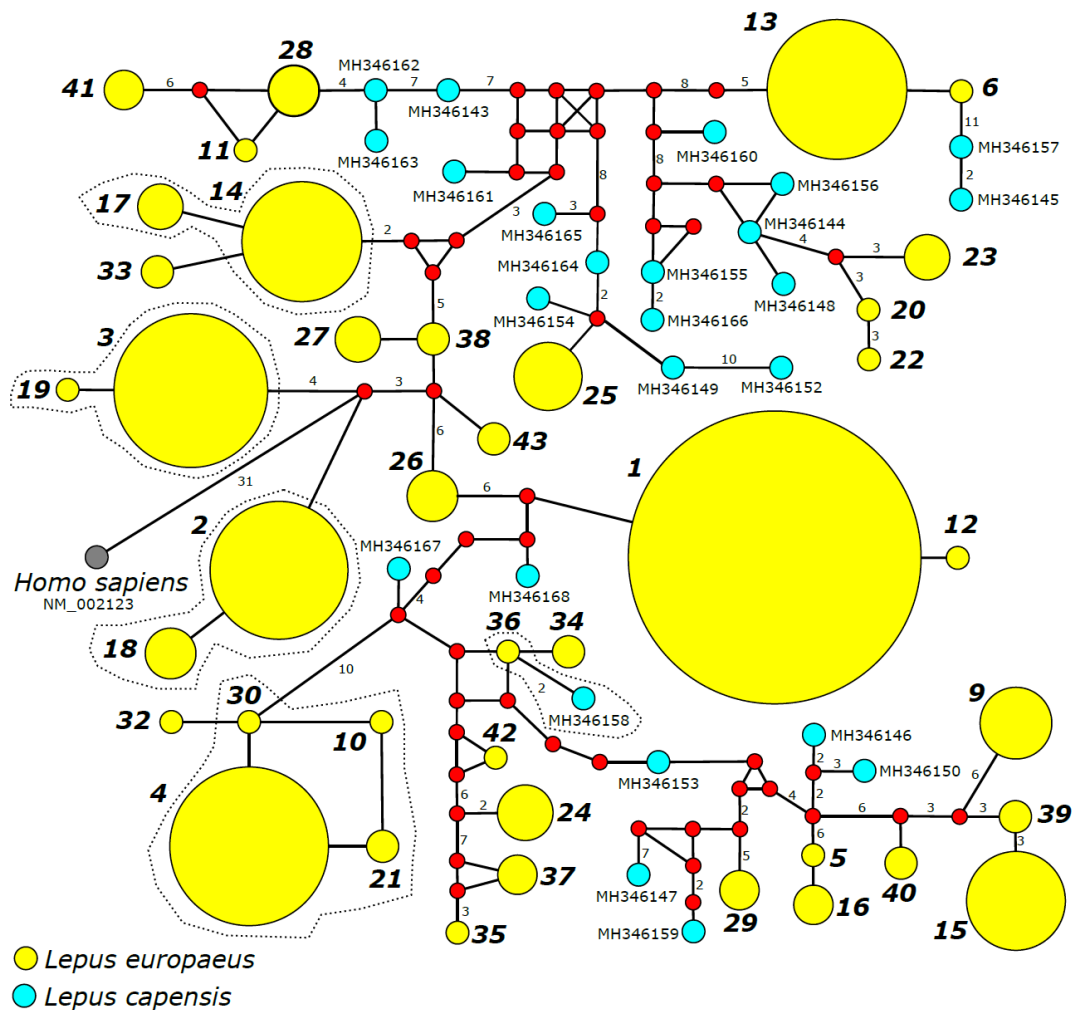
organizovane potklade, one su uključivale mali broj haplotipova i bile dispergovane kroz čitavu topologiju stabla bez mogućnosti za izdvajanje jasnih filogeografskih grupa. Bajesova filogenetska stabla konstruisana su na osnovu evolucionih modela koji su najbolje opisivali date setove podataka, i to za *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gen korišćen je K80+I+G model, dok je za *TLR2* gen korišćen GTR+I model.

Prisustvo *trans-species* polimorfizama testirano je formiranjem MJ mreže za sva tri ispitivana gena, gde su alelima određenim u ovoj studiji pridruženi i aleli preuzeti iz Genbanke (videti Materijal i metode). *Median-joining* mreža *MHC-DQA* gena ukazala je na prisustvo retikulacija i brojnih neuočenih haplotipova (Sl. 17). Signal *trans-species* polimorfizama je uočen kako na nivou nukleotidnih sekvenci, tako i na nivou aminokiselinskih sekvenci. Tri alela *MHC-DQA* gena otkrivena u ovoj disertaciji deljena su sa već poznatim alelima drugih vrsta iz roda *Lepus* (Sl. 17). Aleli *Leeu-DQA*09* i *Leeu-DQA*26* su deljeni sa alelima vrste *Lepus capensis*, dok je alel *Leeu-DQA*14* deljen sa vrstom *Lepus granatensis*. Signal *trans-species* polimorfizama je uočen i na nivou proteinskih varijanti, budući da su aleli *Leeu-DQA*09* i alel vrste *Lepus granatensis* delili identičnu aminokiselinsku sekvencu.



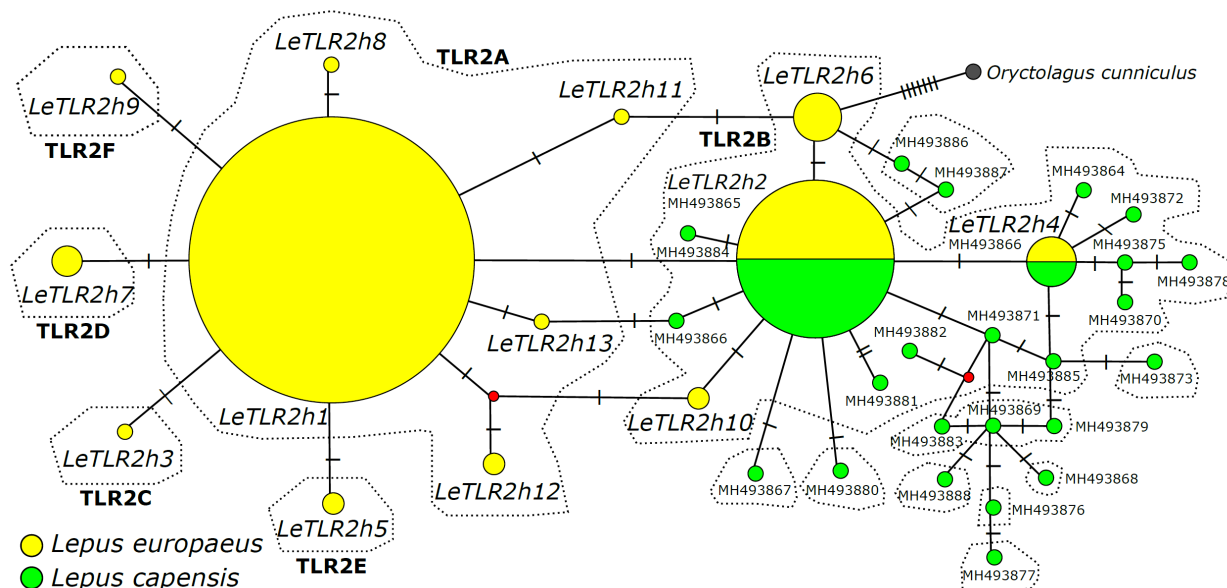
Slika 17. Median-joining mreža alela *MHC-DQA* gena vrste *Lepus europaeus*. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnosti različitim vrstama roda *Lepus*. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Svaki alel prevođenjem u aminokiselinsku sekvencu daje jedinstvenu proteinsku varijantu. Samo u slučaju kada više alela prevođenjem u aminokiselinske sekvence daje identičnu proteinsku varijantu, ti aleli su prikazani prikazani zaokruženi isprekidanim linijama. / *Figure 17. Median-joining network of MHC-DQA alleles of Lepus europaeus. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to Lepus species membership. Red circles represent median vectors. Each allele codes for a different amino-acid variant. Only if two or more alleles code for one and the same protein variant, the respective alleles are encircled by dashed lines.*

Analizom MJ mreže *MHC-DQB* gena (Sl. 18) nisu otkriveni deljeni aleli na nivou nukleotidnih sekvenci, ali je otkrivena deljena proteinska varijanta između alela *Leeu-DQB*36* i alela *Lecp-DQB*16* vrste *Lepus capensis*. MJ mreža se takođe odlikovala retikulacijama, kao i brojnim neotkrivenim haplotipovima, a po čitavoj topologiji mreže bili su dispergovani aleli i jedne i druge vrste bez uočljivih signala grupisanja.



Slika 18. Median-joining mreža alela *MHC-DQB* gena vrste *Lepus europaeus*. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnosti različitim vrstama roda *Lepus*. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Svaki alel prevođenjem u aminokiselinsku sekvencu daje jedinstvenu proteinsku varijantu. Samo u slučaju kada više alela prevođenjem u aminokiselinske sekvence daje identičnu proteinsku varijantu, ti aleli su prikazani prikazani zaokruženi isprekidanim linijama. **Figure 18.** Median-joining network of *MHC-DQB* alleles of *Lepus europaeus*. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to *Lepus* species membership. Red circles represent median vectors. Each allele codes for a different amino-acid variant. Only if two or more alleles code for one and the same protein variants, the respective alleles are encircled by dashed lines. Dashed lines encircle different protein variants.

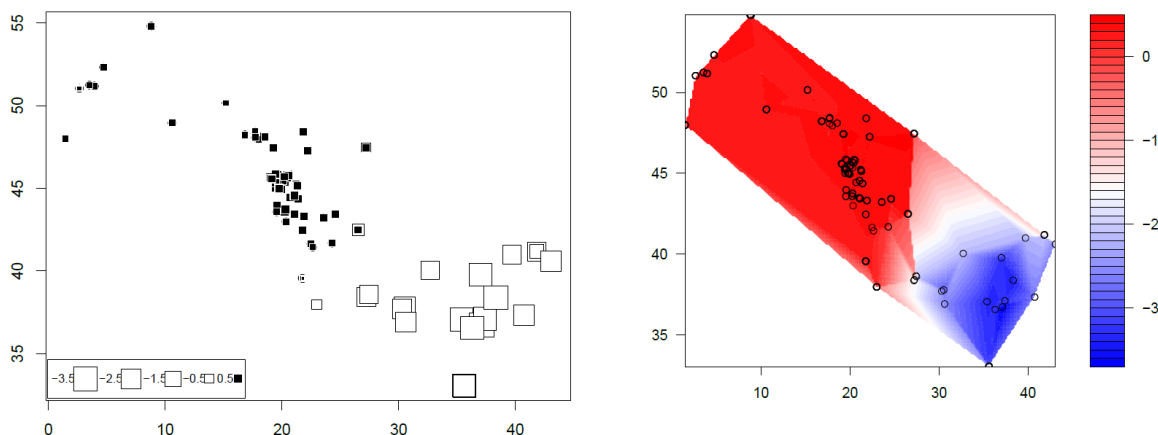
Analizom MJ mreže *TLR2* gena takođe je uočeno prisustvo *trans-species* polimorfizama između vrsta *Lepus europaeus* i *Lepus capensis*, pri čemu su otkriveni deljeni identični aleli na nivou nukleotidnih sekvenci, ali i deljene proteinske varijante (Sl. 19).



Slika 19. Median-joining mreža alela *TLR2* gena vrste *Lepus europaeus*. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji, a krugovi su obojeni u skladu sa pripadnosti različitim vrstama roda *Lepus*. Crveni krugovi odgovaraju pretpostavljenim haplotipovima. Isprekidanim linijama su zaokruženi aleli koji odgovaraju identičnim proteinskim varijantama TLR2A-TLR2F / Figure 19. Median-joining network of *TLR2* alleles of *Lepus europaeus*. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies, and circles are coloured according to *Lepus* species membership. Red circles represent median vectors. Dashed lines encircle different protein variants TLR2A-TLR2F.

5.2.2. Prostorni obrasci distribucije molekularnog diverziteta gena imunskog sistema

Prostorna analiza distribucije molekularnog diverziteta kod tri ispitivana gena imunskog sistema primenom sPCA metode ukazala je na statistički značajno prisustvo globalne strukture ($p > 0,001$), i odsustvo lokalne strukture ($p = 0,24$). *Eigen* vrednosti prve glavne komponentne imale su najveće vrednosti prostorne autokorelacije, kao i najveću varijansu, te je samo prva komponenta korišćena za interpretaciju strukture, dok su za grafički prikaz rezultata korišćene *lagged* interpolirane vrednosti (Sl. 20). Prostorna analiza glavnih komponenti ukazala je na prisustvo dve genetički i geografski diferencirane grupe: jednu koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Anadolije i Bliskog Istoka (AM), i drugu koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Evrope (EU).



Slika 20. Prikaz prostorne distribucije diverziteta gena imunog sistema kod vrste *Lepus europaeus* na osnovu vrednosti prve sPCA komponente interpoliranih na geografsku mapu / *Figure 20. Plot showing lagged spatial principal components analysis (sPCA) scores for the spatial principle component showing the spatial distribution of immune genes diversity in brown hares.*

Najveće vrednosti parametara molekularnog diverziteta otkrivene su u AM grupi, pri čemu je najveća varijabilnost uočena kod *MHC-DQB* gena (Tab. 15). Statistički značajno odstupanje od Hardy-Vajnbergove ravnoteže zabeleženo je u svim ispitivanim lokusima za obe prostorne grupe, osim u slučaju anadolijske grupe u lokusu *TLR2*. Poslednja pomenuta grupa je ujedno i jedina grupa u kojoj je uočena heterozigotnost bila veća od heterozigotnosti očekivane pod pretpostavkom Hardy-Vajnbergove ravnoteže. Statistički značajan signal gametske neravnoteže vezanosti uočen je između *MHC-DQA* i *MHC-DQB* lokusa sa koeficijentom korelacije od 0,079 ($p < 0,001$).

Tabela 15. Parametri molekularnog diverziteta gena imunskog sistema u prostornim grupama vrste *Lepus europaeus* / *Table 15. Molecular diversity indices of immune genes in brown hare spatial groups.*

	<i>MHC-DQA</i>		<i>MHC-DQB</i>		<i>TLR2</i>	
	AM	EU	AM	EU	AM	EU
N	54	222	25	213	22	221
S	27	444	50	426	44	442
N _A	15	18	18	26	9	7
Hd	0,897	0,790	0,931	0,802	0,797	0,362
π	0,077	0,063	0,075	0,063	0,004	0,001
k	17,019	13,848	15,857	13,237	1,323	0,398
Ho	0,741	0,671	0,880	0,624	0,863	0,249
He	0,896	0,789	0,931	0,801	0,797	0,362

n – broj individua / sample size; N – ukupan broj alela / total alleles number; N_A – broj različitih alela / number of different alleles; Hd – diverzitet haplotipova / *haplotype diversity*; π – diverzitet nukleotida / *nucleotide diversity*; k – prosečan broj nukleotidnih razlika / *average number of nucleotide differences*; He - očekivana heterozigotnost / *expected heterozygosity*; Ho – uočena heterozigotnost / *observed heterozygosity*

Posmatrano po lokusima i po prostornim grupama, najveći broj različitih alela primećen je u lokusu *MHC-DQB*, gde je u EU grupi otkriveno 26, dok je u AM grupi

otkriveno 18 različitih alela. Jedino su aleli *Leeu-DQB*2*, *Leeu-DQB*3* i *Leeu-DQB*14* bili zajednički za obe grupe. U lokusu MHC-DQA otkriveno je 18 različitih alela u EU grupi i 15 različitih alela u AM grupi, sa alelima *Leeu-DQA*6*, *Leeu-DQA*12* i *Leeu-DQA*15* otkrivenim u obe prostorne grupe. U TLR2 lokusu, u AM grupi je otkriveno 9 različitih alela, dok je u EU grupi otkriveno 7 različitih alela, sa tri deljena alela: *LeTLR2h1*, *LeTLR2h2* i *LeTLR2h4*.

Prosečna genetička diferencijacija između uočenih grupa na osnovu sva tri ispitivana gena imunog sistema iznosila je $F_{ST} = 0,171$, gde je 17,06% varijacija bilo usled razlika između grupa, dok je 82,94% razlika bilo posledica varijabilnosti unutar grupa. Najveći nivo genetičke diferencijacije između evropske i anadolijske grupe uočen je u TLR2 lokusu, sa prosečnom F_{ST} vrednošću od 0,293, dok je najmanji nivo genetičke diferencijacije uočen u MHC-DQB lokusu, sa prosečnom F_{ST} vrednošću od 0,096. U lokusu MHC-DQA diferencijacija između AM i EU grupe na osnovu F_{ST} vrednosti iznosila je 0,245.

5.2.3. Detekcija signala dejstva prirodne selekcije na gene imunskog sistema

Analizom testova neutralnosti kod *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena odbačena je nulta hipoteza neutralističke teorije molekularne evolucije, ukazujući na signal selekcije u oblikovanju molekularnog diverziteta MHC gena (Tabela 16). Pozitivne vrednosti Tajima D i Fu i Li D* i F* testa mogu biti interpretirane postojanjem signala balansne selekcije. Nasuprot MHC genima, testovi neutralnosti kod *TLR2* gena nisu odbacili neutralističku teoriju molekularne evolucije, ali se negativne vrednosti testova mogu interpretirati kao signal negativne selekcije u ovom lokusu.

Tabela 16. Rezultati testova neutralnosti za gene imunskog sistema kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 16. Results of the neutrality tests for immune genes in brown hares.*

	<i>MHC-DQA</i>	<i>MHC-DQB</i>	<i>TLR2</i>
Tajima D	2,144*	1,769*	-1,488
Fu and Li's D*	2,245*	1,928*	-1,918
Fu and Li's F*	2,645*	2,234*	-2,125

*<0.05

Na osnovu Z testa selekcije, razlika između prosečnog broja nesinonimnih i sinonimnih supstitucija nije bila statistički značajna i nije odbacila hipotezu selektivne neutralnosti, u korist alternativne hipoteze selekcije ni za *MHC-DQA* ($p=0,23$), ni za *MHC-DQB* gen ($p=0,08$). Kod *TLR2* gena Z test je utvrdio statistički značajno manje nesinonimnih

zamena u odnosu na sinonimne zamene i ukazao na signal delovanja negativne selekcije, pri vrednosti Z testa od 1,750 ($p=0,04$).

Testovi selekcije zasnovani na analizama pojedinačnih kodona na web portal-u Datamonkey za *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gen su ukazali prisustvo kodona pod dejstvom pozitivne i/ili negativne selekcije primenom svih korišćenih testova (MEME, FEL, SLAC i REL metoda), dok je u slučaju *TLR2* gena uočen samo signal negativne selekcije primenom REL i FEL pristupa (Tab. 17). GARD algoritam nije uočio prisustvo signala rekombinacija ni za jedan od ispitivanih gena imunog sistema.

Tabela 17. Rezultati kodon-zasnovanih analiza za detekciju prirodne selekcije na Datamonkey serveru kod jedinki vrste *Lepus europaeus*. / *Table 17. Results of the codon-based selection screening methods as implemented on the Datamonkey web server for brown hares*

		MEME	SLAC	FEL	REL
<i>MHC-DQA</i>	+	9,66,70	9,70	9,63,70	9,63,66,68,70,73
	-		1,3,18,27,31,42	1,3,11,18,20,27,31,35,42,54	1,3,18,27,31,42
<i>MHC-DQB</i>	+	6,18	1,6,10,18,26,30,40	18,26,40	6,10,18,20,26,30,40,57,62
	-		3,7,37,63,64	3,7,8,13,31,37,49,63,64	3,7,8,13,31,37,63,64
<i>TLR2</i>	+	/	/		
	-	/	/	38,42,51,82,124	38,42,51,52,82,124

PAML analiza je odbacila nultu hipotezu neutralnosti i sa statističkom značajnošću podržala sve poređene modele u slučaju *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena (Tab. 18), dok u slučaju *TLR2* gena nijedan od poređenih modela nije pokazao statističku značajnost, te kod *TLR2* gena nije otkrivena nijedna kodonska pozicija pod dejstvom selekcionog signala.

TREESAAP analiza ispituje magnitudu uticaja aminokiselinskih zamena, i ukazuje na fizičko-hemijske karakteristike aminokiselina koje mogu biti pod uticajem prirodne selekcije. Da bi se izbegla mogućnost uočavanja lažno pozitivnih rezultata, samo kategorije magnitude 6, 7 i 8 sa značajnošću $p<0,001$ su tretirane kao indikacija direkcione pozitivne selekcije (McClellan i Ellison, 2010). TREESAAP analiza *MHC-DQA* lokusa potvrdila je prisustvo radikalne promene kategorije 6, sa vrednošću Z testa od 4,49 ($p<0,001$), a koja je podrazumevala sklonost ka formiranju alfa zavojnica. Analizom klizajućih prozora uočeno je da ova promena dolazi do izražaja usled aminokiselinskih zamena na kodonima 56 i 59. TREESAAP analiza *MHC-DQB* lokusa je pokazala prisustvo dve radikalne promene, jednu promenu kategorije 8 koja podrazumeva parametar normalizovane hidrofobnosti (vrednost Z testa 4,39), kao i promenu kategorije 6 koja podrazumeva sposobnost nalaženja na N terminalnom kraju proteina (vrednost Z testa 6,78). Dodatnom analizom klizajućih prozora za dve utvrđene fizičko-hemijske karakteristike utvrđeno je da su kodoni 6 (sposobnost

nalaženja na N terminalnom kraju), odnosno kodoni 26 i 40 (parametar normalizovane hidrofobnosti), mesta na kojima aminokiselinske zamene najviše utiču na pomenute karakteristike. Analizom *TLR2* gena otkrivena je jedna karakteristika kao kategorija magnitude 8 (ravnotežna konstanta), ali sa vrednošću Z testa od 2,63 ($0,05 > p > 0,001$), pa kao takva nije posmatrana u analizi klizajućih prozora.

Tabela 18. Rezultati PAML analize za ispitivane gene imunog sistema kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 18. Results of the PAML analysis for immune genes of brown hares.*

		2ΔlnL	df	p(2ΔlnL)	ω > 1
<i>MHC-DQA</i>	M0 vs. M3	345,40	4	P<0.001	-
	M1 vs. M2	55,64	2	P<0.001	9 ^{**} , 28 ^{**} , 44 ^{**} , 46 [*] , 47 ^{**} , 49 ^{**} , 56 [*] , 59 ^{**} , 63 [*] , 70 ^{**}
	M7 vs. M8	65,6	2	P<0.001	4 ^{**} , 9 ^{**} , 12 [*] , 28 ^{**} , 39 ^{**} , 44 ^{**} , 46 [*] , 47 ^{**} , 49 ^{**} , 56 [*] , 58 ^{**} , 59 ^{**} , 63 [*] , 70 ^{**}
<i>MHC-DQB</i>	M0 vs. M3	755,3	4	P<0.001	-
	M1 vs. M2	42,49	2	P<0.001	6 ^{**} , 18 ^{**} , 49 ^{**}
	M7 vs. M8	68,64	2	P<0.001	6 ^{**} , 18 ^{**} , 49 [*]
<i>TLR2</i>	M0 vs. M3	7,52	4	P=0,116	-
	M1 vs. M2	1,65	2	P=0,438	-
	M7 vs. M8	1,63	2	P=0,443	-

2ΔlnL – log likelihood ratio tests; df – broj stepena slobode/*degrees of freedom*; p(2ΔlnL) – statistička značajnost poređenja /*p-value for model comparisons*; *95%, **99% - verovatnoće prema Bajesovom empirijskom faktoru / *probabilities for having ω > 1 according to Bayes Empirical Bayes (BEB)*

Kako rekombinacije mogu da utiču na validnost testova koji detektuju prisustvo selekcije, primenjeno je nekoliko pristupa za otkrivanje prisustva rekombinacija kod ispitivanih gena. Permutacioni test u omegamap paketu ukazao je na negativne vrednosti korelacije između fizičke distance i ispitivanih parametara r^2 , D i G4, koje su statistički bile značajne za G4 testove kod *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena (Tab. 19). Metodi primenjeni u okviru RDP paketa nisu pokazali prisustvo rekombinacionih preloma u *MHC-DQB* i *TLR2* lokusu nijednim od primenjenih metoda, dok su uočena dva moguća događaja rekombinacija u *MHC-DQA* genu. MAXCHI metod je ukazao na jedan rekombinacioni događaj koji uključuje alel *Leeu-DQA*10*, sa nepoznatim glavnim roditeljskim i minor roditeljskim alelom *Leeu-DQA*14*, a obuhvata rekombinacioni prelom poznatog početka na poziciji 154, i neodređenog kraja oko pozicije 211. CHIMAERA metod je pokazao prisustvo rekombinacionog događaja koji uključuje alel *Leeu-DQA*09*, sa roditeljskim alelima *Leeu-DQA*20* i *Leeu-DQA*15*, a obuhvata rekombinacioni prekid nedefinisiranog početka i kraja, u bloku od 39 do 154 pozicije u odnosu na poravnanje korišćeno u ovom istraživanju. Odnos stope rekombinacija i mutacija za oba ispitivana MHC gena ukazao je da su rekombinacije gotovo šest puta izraženiji mehanizam kod *MHC-DQB* gena, u odnosu na *MHC-DQA* gen gde je doprinos mutacija bio veći u odnosu na rekombinacije (Tab. 19).

Tabela 19. Testovi intralokusnih rekombinacija (r^2 , D' and $G4$), stopa mutacija ($\theta = 4 N\mu$) i rekombinacija ($\rho = 4 Nr$) kod jedinki vrste *Lepus europaeus*. / *Table 19. Tests of presence of intralocus recombination (r^2 , D' and $G4$) and population mutation (Wattersons $\theta = 4 N\mu$) and the recombination rate ($\rho = 4 Nr$) in brown hares.*

	r^2	D	$G4$	θ	ρ	ρ/θ
DQA	-0,061	-0,141*	-0,109*	12,16	4,23	0,348
DQB	-0,023	-0,093	-0,136*	10,98	21,13	1,924
TLR2	0,198	-0,169	-0,087			

* $p < 0.05$

Prisustvo selekcionih signala u *MHC-DQA* i *MHC-DQB* genu dodatno je testirano i u okviru omegamap paketa koji određuje kodone pod dejstvom selekcije primenom Bajesove statistike, uz kontrolisanje efekta rekombinacija na rezultate selekcionih analiza. U lokusu *MHC-DQA* sa verovatnoćom većom od 95% otkriveno je 10 kodona sa signalom pozitivne selekcije, i to na kodonima 8, 9, 15, 28, 41, 49, 63, 68, 69, 70. U lokusu *MHC-DQB* lokusu otkriveno je 14 kodona sa verovatnoćom za $\omega > 1$ većom od 95%, i to na sledećim kodonima: 1, 6, 10, 18, 20, 22, 26, 29, 30, 40, 49, 51, 57, 59.

Da bi se izbegla mogućnost lažno pozitivnih rezultata, a kako rezultati selekcije mogu biti osetljivi i na korišćenu metodu za detekciju selekcionog signala, primenjen je konzervativni pristup u kome su samo pozicije potvrđene bar po jednim testom u svakom od tri korišćena pristupa (Datamonkey, PAML i omegamap) posmatrane kao pozicije pod jakim signalom pozitivne selekcije. Primenom ovakvog konzervativnog pristupa kod *MHC-DQA* gena utvrđene su tri pozicije pod jakim signalom pozitivne selekcije (kodoni 9, 63 i 70), dok je kod *MHC-DQB* gena utvrđeno takođe postojanje tri pozicije pod signalom pozitivne selekcije na kodonima 6, 18 i 49. Signali negativne selekcije su testirani samo testovima na Datamonkey portalu, i sa više od dva primenjena pristupa signal negativne selekcije je uočen na šest pozicija kod *MHC-DQA* gena, na pet pozicija kod *MHC-DQB* gena, kao na pet kodona kod *TLR2* gena.

Na osnovu pozicione homologije sa strukturom i funkcijom MHC molekula kod čoveka (Bondinas i sar., 2007) u izgradnji džepa 1 PBR *MHC-DQA* gena regiona učestvuju pozicije 5, 21, 28, 29, 40, i 49, u izgradnji džepa 6 učestvuju pozicije 59, 62, 63, 65, dok u izgradnji džepa 9 učestvuju pozicije 66, 69, 70, 73. Dve od tri pozicije sa višestruko potvrđenim signalom pozitivne selekcije kod *MHC-DQA* gena smeštene su u okviru PBR regiona, i to u okviru džepa 6 i džepa 9.

U izgradnji PBR regiona kod *MHC-DQB* molekula prema Bondinas i saradnici (2007) učestvuju sledeće kodonske pozicije: 1, 3, 5, 18, 20, 22, 29, 39, 49, 53, 59, 62, 63, 66 i

70. Takođe, dve od tri pozicije sa jakim signalom pozitivne selekcije u okviru *MHC-DQB* gena smeštene su u okviru PBR regiona, i to pozicije 18 i 49.

5.2.4. Detekcija signala lokalnih adaptacija u genima imunskog sistema

Regionalne/lokalne adaptacije u heterogenim uslovima sredine pod hipotezom dejstva pozitivne selekcije dovode do razlika u zastupljenosti MHC alela (proteina) kao odgovor na prostorno i vremenski prisutne različite vrste patogena. Kako klimatski uslovi mogu uticati na vremensku i prostornu razliku u bogatstvu i distribuciji patogena, testiranje klimatskog efekta indirektno ukazuje na prisustvo prostorno različitih selekcionih pritsaka koji dovode do lokalnih/regionalnih adaptacija. Modelovanje uticaja klimatskih faktora na prisustvo najzastupljenijih proteinskih varijanti kod ispitivanih MHC gena izvršeno je odvojeno za jedinke sa teritorije Evrope, i odvojeno za jedinke sa teritorije Anadolije i Izarela, prateći rezultate prostornih analiza gena imunskog sistema koje su ukazale na postojanje ove dve prostorne grupe.

Za model koji je obuhvatio jedinke sa teritorije Evrope, ispitivan je uticaj genotipova koji su sadržali sledeće najzastupljenije proteinske varijante: DQA1, DQA4, DQA6, DQA10, DQA11, DQB1, DQB2 and DQB3. Analiza glavnih komponenti klimatskih varijabli povezanih sa temperaturom, na uzorku koji je obuhvatio jedinke sa teritorije Evrope, ukazala je na postojanje dve glavne komponente koje su zajedno opisivale 88,87% originalnih podataka. Prva glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa temperaturom (eutf1) objašnjavala je 54,38% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od varijabli može se predstaviti kao uopšteni temperaturni faktor, posebno izražen tokom hladnih i suvih perioda godine. Druga glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa temperaturom (eutf2) objašnjavala je 34,55% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od varijabli može se opisati kao faktor koji oslikava efekat temperature tokom najtoplijeg perioda godine. Analiza glavnih komponenti klimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom takođe je ukazala na postojanje dve glavne komponente koje su zajedno opisivale 84,63% originalnih podataka. Prva glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom (eupf1) objašnjavala je 45,17% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od originalnih varijabli može se opisati kao efekat precipitacije tokom najsuvljih perioda godine. Druga glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom (eupf2) objašnjavala je 39,45% originalne varijabilnosti, a na

osnovu doprinosa svake od originalnih varijabli može se predstaviti kao generalni precipitacioni faktor, posebno izražen tokom vlažnih perioda godine.

Rezultati multinomijalnog regresionog modela koji su testirali efekat klimatskih varijabli na prisustvo DQA6 proteinske varijante u genotipu kod jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope ukazali su da geografska distribucija individua koje su bilo homozigotne, bilo heterozigotne za ovu varijantu nije bila slučajna u odnosu na distribuciju individua koje u svom genotipu nisu posedovale ovu varijantu. Naime, jedinke koje su bile heterozigotne za ovu proteinsku varijantu su češće bile prisutne u regionima za koje su karakteristične niske vrednosti precipitacije, posebno tokom vlažnih perioda godine, u poređenju sa distribucijom jedinki koje ovu proteinsku varijantu nisu posedovale u svom genotipu (Tab. 20, Tab. 21).

Tabela 20. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA6 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 20. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing DQA6 protein variants in brown hares after model averaging.*

	lat	eupf2	long	eupf1	eutf2	eutf1
RVI	0,99	0,93	0,72	0,60	0,45	0,19
Broj modela / Number of models	32	32	32	32	32	32

lat – geografska širina / *latitude*; long – geografska dužina / *longitude*; eupf1 – precipitacioni faktor / *precipitation factor 1*; eupf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*; eutf1 – temperaturni faktor 1 / *temperature factor 1*; eutf2 – temperaturni faktor 2 / *temperature factor 2*

Tabela 21. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA6 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus* / *Table 21. Summary results of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA6 protein variants in brown hares*

	Koeficijent / Coefficients	Z vrednost / Z value	p
Het (long)	0,101	2,991	0,002
Het (lat)	0,177	2,484	0,011
Het (eupf2)	-0,745	-2,530	0,012
Hom (long)	0,182	3,697	0,001
Hom (lat)	0,329	3,849	0,001
Hom (eupf2)	-0,253	-0,7933	0,423

Referentna kategorija – genotip bez DQA6 varijante / *Reference category: no DQA6 in genotype*

Het – heterozigot / *heterozygote*; Hom – homozigot / *homozygote*; long – *longitude*; lat – *latitude*; eupf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*;

Rezultati multinomijalnog regresionog modela u kom je testiran efekat klimatskih varijabli na prisustvo DQA1 proteinske varijante u genotipu kod jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope, ukazali su da su jedinke homozigotne i heterozigotne za ovu proteinsku varijantu statistički češće bile zastupljene u regionima koje su karakterisale visoke vrednosti

precipitacije, posebno izražene tokom suvih perioda godine, u poređenju sa jedinkama koje nisu posedovale ovu proteinsku varijantu u svom genotipu (Tab. 22, Tab. 23).

Tabela 22. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA1 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus*. / **Table 22.** Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA1 protein variants in brown hares after model averaging.

	eupf1	long	eupf2	eutf2	lat	eutf1
RVI	0,99	0,84	0,6	0,57	0,31	0,22
Broj modela / <i>Number of models</i>	32	32	32	32	32	32

lat – geografska širina / *latitude*; long – geografska dužina / *longitude*; eupf1 – precipitacioni faktor / *precipitation factor 1*; eupf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*; eutf1 – temperaturni faktor 1 / *temperature factor 1*; eutf2 – temperaturni faktor 2 / *temperature factor 2*

Tabela 23. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA1 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus* / **Table 23.** Summary results of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA1 protein variants in brown hares

	Koeficijent / <i>Coefficients</i>	Z vrednost / <i>Z value</i>	p
Het (long)	-0,195	-1,579	0,114
Het (eupf1)	0,603	2,498	0,012
Hom (long)	0,465	2,287	0,122
Hom (eupf1)	1,237	2,608	0,009

Referentna kategorija – genotip bez DQA1 varijante / *Reference category: no DQA1 in genotype*

Het – heterozigot / *heterozygote*; Hom – homozigot / *homozygote*; long – geografska dužina / *longitude*; lat – geografska širina / *latitude*; eupf1 – precipitacioni faktor 1 / *precipitation factor 1*

Multinomijalni regresioni model uticaja klimatskih faktora na prisustvo proteinske varijante DQA10 u genotipu ispitivanih jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope ukazuje da su jedinke heterozigotne za ovu proteinsku varijantu statistički značajno češće bile prisutne u regionima koje karakterišu niske vrednosti temperature, posebno tokom hladnih i suvih perioda godine, dok su jedinke homozigotne za ovu proteinsku varijantu češće bile prisutne u regionima gde su vrednosti temperature tokom suvih i hladnih perioda godine bile visoke, u poređenju sa jedinkama koje ovu varijantu nisu posedovale u svom genotipu (Tab. 24, Tab.25). Nezavisno od klimatskog efekta, rezultati modela su ukazali i na neslučajnu geografsku distribuciju jedinki koje su u genotipovima posedovale proteinsku varijantu DQA10, i to da su homozigotne jedinke češće bile prisutne u severozapadnim delovima ispitivanog regiona, dok su jedinke heterozigotne varijante češće bile zastupljene u severoističnim delovima ispitivanog regiona, u poređenju sa jedinkama koje ove varijantu nisu posedovale u svom genotipu (Tab. 25).

Tabela 24. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnih regresionih modela distribucije genotipova koji sadrže DQA10 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 24. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA10 protein variant in brown hares after model averaging.*

	lat	long	eutf2	eutf1	eupf1	eupf2
RVI	0,99	0,95	0,81	0,44	0,36	0,13
Broj modela / Number of models	32	32	32	32	32	32

lat – geografska širina / *latitude*; long – geografska dužina / *longitude*; eupf1 – precipitacioni faktor / *precipitation factor 1*; eupf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*; eutf1 – temperaturni faktor 1 / *temperature factor 1*; eutf2 – temperaturni faktor 2 / *temperature factor 2*

Tabela 25. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA10 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus* / *Table 25. Summary results of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA10 protein variant in brown hares*

	Koeficijent / Coefficients	Z vrednost / Z value	p
Het (long)	0,244	2,362	0,018
Het (lat)	0,631	2,931	0,001
Het (eutf2)	-2,081	-2,796	0,005
Hom (long)	-3,407	-2,037	0,041
Hom (lat)	2,269	5,398	0,009
Hom (eutf2)	38,804	2,249	0,024

Referentna kategorija – genotip bez DQA10 varijante / *Reference category: no DQA10 in genotype*
 Het – heterozigot / *heterozygote*; Hom – homozigot / *homozygote*; long – *longitude*; lat – *latitude*; eutf2 – temperaturni faktor 2 / *temperature factor 2*

Multinomijalni regresioni model uticaja klimatskih faktora u odnosu na prisustvo DQA11 proteinske varijante u genotipu jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope ukazao je jedino na značajan doprinos geografske širine kao nezavisne varijable ($RVI(lat) = 1$), dok su relativni doprinosi preostalih ispitivanih varijabli bili ispod vrednosti od 0,7 ($RVI(eutf1)=0,4$; $RVI(long)=0,21$; $RVI(eupf1)=0,17$, $RVI(eutf2)=0,16$, $RVI(eupf2)=0,12$). Naime, heterozigoti za proteinsku varijantu DQA11 su statistički značajno češće bili zastupljeni u južnim delovima ispitivanog regiona u poređenju sa svim ostalim jedinkama koje tu varijantu u svom genotipu nisu posedovale (Tab. 26).

Tabela 26. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQA11 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus* / *Table 26. Summary results of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQA11 protein variant in brown hares*

	Koeficijent / Coefficients	Z vrednost / Z value	p
Het (lat)	-0,352	-4,189	0,001
Hom (lat)	0,217	0,591	0,554

Referentna kategorija – genotip bez DQA11 varijante / *Reference category: no DQA11 in genotype*
 Het – heterozigot / *heterozygote*; Hom – homozigot / *homozygote*; lat – *latitude*;

Multinomijalni regresioni model prisustva DQA4 proteinske varijante u genotipu ispitivanih jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope nije ukazao na relativni doprinos veći od 0,7 ni za jednu od ispitivanih varijabli (RVI(eupf2)=0,68; RVI(eupf1)=0,63; RVI(eutf1)=0,45; RVI(lat)=0,36; RVI(long)=0,23; RVI(eutf2)=0,15).

Multinomijalni regresioni model uticaja klimatskih faktora na prisustvo DQB1 proteinske varijante u genotipu jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope ukazao je na relativni doprinos varijabli veći od 0,7 jedino za geografsku dužinu (RVI(lat)=1) i geografsku širinu (RVI(long)=0,99), dok su preostale klimatske promenljive imale sledeće RVI vrednosti: RVI(eupf2)=0,24, RVI(eutf1)=0,24, RVI(eupf1)=0,17 i RVI(eutf2)=0,13. Multinomijalni regresioni model zasnovan na geografskoj dužini i geografskoj širini, ukazao je da su jedinke homozigotne za proteinsku varijantu DQB1 statistički značajno češće bile prisutne u severnijim delovima ispitivanog regiona, dok su jedinke homozigotne za ovu proteinsku varijantu češće bile prisutne u istočnim regionima ispitivanog područja, u poređenju sa jedinkama koje ovu varijantu nisu posedovale u svom genotipu (Tab. 27).

Tabela 27. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQB1 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 27. Summary results of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQB1 protein variant in brown hares.*

	Koeficijent / Coefficients	Z vrednost / Z value	p
Het (lat)	0,311	3,054	0.002
Het (long)	0,116	1,154	0.248
Hom (lat)	0,601	3,941	0.123
Hom (long)	0,408	3,515	0.004

Referentna kategorija – genotip bez DQB1 varijante / *Reference category: no DQB1 in genotype* ;

Het – heterozigot / *heterozygote*; Hom – homozigot / *homozygote*; long – geografska dužina / *longitude*;

lat – geografska širina / *latitude*

Multinomijalni regresioni model uticaja klimatskih faktora na prisustvo DQB3 proteinske varijante u genotipu jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope ukazao je na relativni doprinos varijabli veći od 0,7 jedino za klimatski faktor eupf2 (RVI(eupf2)=0,83), dok su preostale varijable imale sledeće RVI vrednosti: RVI(lat)=0,63, RVI(eutf1)=0,30, RVI(eutf2)=0,28, RVI(eupf1)=0,18 i RVI(long)=0,17). Rezultati multinomijalnog regresionog modela ukazali su da su jedinke heterozigotne za DQB3 proteinsku varijantu statistički značajano češće bile prisutne u regionima za koje su karakteristične niske vrednosti precipitacije posebno tokom vlažnih perioda godine, u poređenju sa jedinkama koje ovu proteinsku varijantu nisu posedovale u svojim genotipovima (Tab. 28).

Tabela 28. Sumarni prikaz rezultata multinomijalnog regresionog modela distribucije genotipova koji sadrže DQB3 proteinsku varijantu kod vrste *Lepus europaeus* / *Table 28. Summary results of the parameters of the multinomial regression model of the occurrence of genotypes containing the DQB3 protein variant in brown hares*

	Koeficijent / Coefficients	Z vrednost / Z value	p
Het (eupf2)	-1,434	-2,020	0,043
Hom (eupf2)	-1,056	-1,099	0,271

Referentna kategorija – genotip bez DQB3 varijante / *Reference category: no DQB3 in genotype* ;

Het – heterozigot / *heterozygote*; Hom – homozigot / *homozygote*; eupf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*

Multinomijalni regresioni model uticaja klimatskih faktora i geografske lokacije na prisustvo DQB4 proteinske varijante u genotipu jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope nije ukazao na relativni doprinos veći od 0.7 ni za jednu od ispitivanih varijabli (RVI(eutf1)=0,28; RVI(lat)=0,23; RVI(eupf2)=0,21; RVI(eutf2)=0,15; RVI(long)=0,14; RVI(eupf1)=0,13)). Testiranje uticaja klimatskih faktora, kao i geografske lokacije na prisustvo proteinskih varijanti u genotipovima jedinke vrste *L. europaeus* sa teritorije Anadolije i Izraela, izvršeno je za sledeće proteinske varijante: *MHC-DQA16*, *MHC-DQA20*, *MHC-DQA21*, *MHC-DQB24*, *MHC-DQB25* and *MHC-DQB26*. Analiza glavnih komponenti klimatskih varijabli povezanih sa temperaturom kod jedinki sa teritorije Anadolije i Izraela ukazala je na prisustvo dve glavne komponente koje zajedno opisuju 88,79% originalnih podataka. Prva glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa temperaturom (amtf1) objašnjavala je 74,38% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od varijabli može se predstaviti kao faktor koji opsiuje generalne temperaturne trendove, osim tokom vlažnih perioda godine. Druga glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa temperaturom (amtf2) objašnjavala je 14,41% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od originalnih varijabli može se predstaviti kao temperaturni faktor koji oslikava tempraturu tokom najvlažnijeg perioda godine. Analiza glavnih komponenti klimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom kod jedinki sa teritorije Anadolije i Izraela ukazala je na postojanje tri glavne komponente koje su zajedno opisivale 97,63% originalnih podataka. Prva glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom (ampf1) objašnjavala je 50,36% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od originalnih varijabli može se predstaviti kao faktor koji oslikava precipitaciju tokom vlažnih i hladnih perioda godine. Druga glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom (ampf2) objašnjavala je 32,85% originalne varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od varijabli može se predstaviti kao faktor koji oslikava vrednosti precipitacije tokom suvih i toplih perioda godine. Treća glavna komponenta bioklimatskih varijabli povezanih sa precipitacijom (ampf3) objašnjavala je 14,41% originalne

varijabilnosti, a na osnovu doprinosa svake od originalnih varijabli može se predstaviti kao faktor koji oslikava vrednosti precipitacije tokom suvih perioda godine.

Rezultati multinomijalnih regresionih modela uticaja geografske lokacije, kao i klimatskih faktora na prisutnost odgovarajućih proteinskih varijanti MHC-DQA i MHC-DQB gena u genotipu jedinki sa teritorije Anadolije i Izraela nisu ukazali na relativni doprinos varijabli veći od 0,7 nizajedan od ispitanih modela (Tab. 29).

Uticaj klimatskih faktora, kao i geografske lokacije na heterozigotnost jedinki vrste *Lepus europaeus* nije ukazao na relativni doprinos varijabli veći od 0,7 ni za model koji je obuhvatio jedinke sa teritorije Evrope, niti za model koji je obuhvatio jedinke sa teritorije Anadolije i Izraela. Pored toga, statistički značaj efekat nije uočen kako za modele koji su testirali heterozigotnost u svakom od ispitivanih lokusa pojedinačno, tako ni za model koji je testirao generalni efekat heterozigotnosti uzimajući u obzir oba ispitivana lokusa (Tab. 30).

Tabela 29. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnih regresionih modela distribucije genotipova koji sadrže najzastupljenije proteinske varijante *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena kod vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Anadolije i Izraela. / *Table 29. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression models of the occurrence of genotypes containing the respective most frequent protein variants of MHC-DQA and MHC-DQB genes in brown hares from Anadolia and Israel after model averaging.*

RVI	long	lat	amtf1	amtf2	ampf1	ampf2	ampf3
Broj modela / number of models	64	64	64	64	64	64	64
DQA16							
RVI	0,056	0,073	0,068	0,060	0,087	0,057	0,243
DQA20							
RVI	0,17	0,3	0,19	0,49	0,08	0,35	0,56
DQA21							
RVI	0,1	0,17	0,61	0,04	0,17	0,45	0,04
DQB24							
RVI	0,07	0,13	0,27	0,12	0,32	0,12	0,15
DQB25							
RVI	0,42	0,41	0,59	0,62	0,28	0,26	0,25
DQB26							
RVI	0,04	0,19	0,16	0,16	0,04	0,43	0,19

lat – geografska širina / *latitude*; long – geografska dužina / *longitude*; ampf1 – precipitacioni faktor 1 / *precipitation factor 1*; ampf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*; ampf3 – precipitacioni faktor 3 / *precipitation factor 3*; amtf1 – temperaturni faktor 1 / *temperature factor 1*; amtf2 – temperaturni faktor 2 / *temperature factor 2*

Tabela 30. Relativni doprinos varijabli (RVI) nakon rangiranja i sravnjivanja multinomijalnih regresionih modela distribucije heterozigotnosti kod vrste *Lepus europaeus*. / *Table 30. Relative variable importance (RVI) of the parameters of the multinomial regression model of heterozygosity in brown hares after model averaging*

RVI	long	lat	tf1	tf2	pf1	pf2	pf3
Evropa / Europe							
Broj modela / Number of models	32	32	32	32	32	32	
RVI	<i>Heterozigotnost u DOA lokusu / DOA Heterozygosity</i>						
	0,32	0,61	0,35	0,34	0,33	0,37	
RVI	<i>Heterozigotnost u DQB lokusu / DQB Heterozygosity</i>						
	0,19	0,34	0,44	0,27	0,29	0,26	
RVI	<i>Heterozigotnost u oba lokusa / General Heterozygosity</i>						
	0,14	0,09	0,35	0,26	0,49	0,65	
Anadolija i Izrael / Anatolia and Israel							
Broj modela / Number of models	64	64	64	64	64	64	64
RVI	<i>Heterozigotnost u DOA lokusu / DOA Heterozygosity</i>						
	0,22	0,46	0,32	0,21	0,27	0,32	0,34
RVI	<i>Heterozigotnost u DQB lokusu / DQB Heterozygosity</i>						
	0,26	0,32	0,28	0,52	0,24	0,24	0,25
RVI	<i>Heterozigotnost u oba lokusa / General Heterozygosity</i>						
	0,06	0,22	0,58	0,09	0,08	0,15	0,11

lat – geografska širina / *latitude*; long – geografska dužina / *longitude*; pf1 – precipitacioni faktor / *precipitation factor 1*; pf2 – precipitacioni faktor 2 / *precipitation factor 2*; pf3 – precipitacioni faktor 3 / *precipitation factor 3*; tf1 – temperaturni faktor 1 / *temperature factor 1*; tf2 – temperaturni faktor 2 / *temperature factor 2*

6. DISKUSIJA

Genetička varijabilnost prirodnih populacija oblikovana je pod dejstvom kako adaptivnih, tako i istorijskih faktora karakterističnih za odgovarajuća životna staništa. Sagledavanje genetičke varijabilnosti prirodnih populacija trebalo bi da bude zasnovano na upotrebi većeg broja molekularnih markera, kako onih koji predstavljaju adaptivno neutralne delove genoma, tako i onih smeštenih u delovima genoma koji su pod uticajem selekcije, ali takođe i da obuhvati geografski dovoljno razuđen uzorak koji se može smatrati reprezentativnim pokazateljem areala ispitivane vrste (Lankau i sar., 2011; Harrisson i sar., 2014; Mimura i sar., 2017). Na taj način omogućava se sveobuhvatno sagledavanje nivoa genetičke varijabilnosti, razumevanje doprinosa različitih evolucionih i ekoloških mehanizama u oblikovanju genetičke varijabilnosti, kao i uočavanje lokalnih i/ili regionalnih adaptacija, i konačno definisanje dugoročnog potencijala prirodnih populacija da odgovore na stalno promenljive uslove životne sredine. U ovoj doktorskoj disertaciji sagledan je molekularni diverzitet, opisana filogeografska struktura, definisana prostorna distribucija genetičke varijabilnosti, i utvrđeno postojanje selekcionih signala i mogućih lokalnih/regionalnih adaptacija kod vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka, primenom analize varijabilnosti sekvenci D petlje, *MT-ND2* i *MT-ND6* gena odabranih markera mitohondrijskog genoma, kao i na osnovu varijabilnosti sekvenci *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena jedarnog genoma na uzorku koji geografski oslikava najveći deo prirodnog areala ove vrste.

6.1. Molekularni diverzitet vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka

U istraživanju je uočen relativno visok nivo molekularnog diverziteta vrste *L. europaeus* za sve ispitivane markere, kako markere smeštene u mitohondrijskom genomu (mtDNK D petlja, *MT-ND2*, *MT-ND6*), tako i ispitivane markere jedarnog genoma (*MHC-DQA*, *MHC-DQB*, *TLR2*). U odnosu na dosadašnja istraživanja genetičke varijabilnosti kod ove vrste, u ovoj disertaciji po prvi put u opisivanju genetičke varijabilnosti korišćena je polimorfnost nukleotidnih i aminokiselinskih sekvenci *MT-ND6* gena i *TLR2* gena.

U dosadašnjim istraživanjima genetičke varijabilnosti prirodnih populacija vrste *L. europaeus* analiza varijabilnosti nukleotidnih sekvenci D petlje mtDNK predstavljala je jedan od najčešće korišćenih molekularnih markera mitohondrijskog genoma (Kasapidis i sar.,

2005; Fickel i sar., 2008; Stamatis i sar., 2009; Djan et al., 2017; Ashrafzadeh i sar., 2018). Sve pomenute studije ukazale su na generalno visok nivo varijabilnosti nukleotidnih sekvenci D petlje mtDNK kod ove vrste, iako je direktno poređenje vrednosti parametara molekularnog diverziteta između ovih studija otežano kako usled značajnih razlika u dužini poravnanja korišćenih nukleotidnih sekvenci kao rezultat upotrebe različitih početnica i/ili sekvenciranja samo jednog od DNK lanaca, tako i usled geografski neujednačene zastupljenosti jedinki u uzorku. Rezultati ove doktorske disertacije su ukazali na generalno visok nivo molekularnog diverziteta sekvenci D petlje mtDNK, koji je u saglasnosti sa prethodnim istraživanjima. U poređenju sa istraživanjem Djan i saradnika (2017) gde je kod 456 jedinki sa teritorije Evrope i Male Azije otkriveno 253 haplotipa, kao i u poređenju sa istraživanjem Ashrafzadeh i saradnika (2018) u kome je kod 447 ispitivanih jedinki takođe sa teritorije Evrope i Male Azije otkriveno 259 haplotipova, generalni odnos broja uočenih haplotipova i ispitivanih jedinki je u istraživanju u okviru ove doktorske disertacije nešto niži (0,45). Međutim važno je napomenuti da su u gore pomenutim studijama (Djan i sar., 2017; Ashrafzadeh i sar., 2018) u analizi parametara molekularnog diverziteta korišćene i sve sekvence D petlje mtDNK jedinki vrste *L. europaeus* dostupne u NCBI bazi, te uočena razlika može biti direktna posledica pristrasnosti u veličini uzorka. Ipak, uzimajući u obzir da su u ovoj disertaciji jedinstveni haplotipovi činili više od 50% svih otkrivenih haplotipova, kao i da je najzastupljeniji haplotip bio prisutan u niskoj frekvenciji (~ 5%), može se utvrditi da je nivo varijabilnosti u okviru D petlje kod ispitivanih jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka otkriven u ovoj studiji relativno visok.

Nasuprot visokim vrednostima molekularnog diverziteta sekvenci D petlje mtDNK, nešto niže vrednosti parametara molekularnog diverziteta otkrivene su analizom varijabilnosti sekvenci *MT-ND2* i *MT-ND6* gena, što je i očekivani rezultat imajući u vidu visoku stopu mutacija unutar kontrolnog regiona mtDNK molekula. Sagledavanjem varijabilnosti sekvenci *MT-ND2* gena kod 133 jedinke vrste *Lepus capensis* sa teritorije Tunisa (Ben Slimen i sar., 2017) otkriven je 41 haplotip na osnovu 47 varijabilnih pozicija. U ovoj disertaciji otkriven je manji broj haplotipova u odnosu na pomenutu studiju, ali je vrednost diverziteta haplotipova (0,862) bila gotovo identična sa vrednošću od 0,859 otkrivenom kod vrste *L. capensis* sa teritorije Tunisa. U ovoj disertaciji otkriven je i veći broj različitih aminokiselinskih sekvenci u odnosu na četiri različite proteinske varijante pronađene kod vrste *L. capensis*. Ancestralna proteinska varijanta ND2B otkrivena u ovoj studiji imala je identičnu aminokiselinsku sekvencu kao i proteinska varijanta ND2d pronađena kod dve jedinke vrste *L. capensis* sa teritorije centralnog i južnog dela Tunisa. Imajući u vidu da je ND2B varijanta otkrivena u

ovoj disertaciji bila u najvećem broju slučajeva prisutna kod jedinki sa teritorije Anadolije i Izraela, prisutnost identičnih aminokiselinskih sekvenci može biti posledica konvergentne evolucije kao rezultat odgovora na slične ekološke niše koje obe vrste naseljavaju.

Najniže vrednosti molekularnog diverziteta mtDNK molekula pronađene su analizom nukleotidnih sekvenci *MT-ND6* gena. Međutim, iako su vrednosti diverziteta haplotipova, kao i diverziteta nukleotida *MT-ND6* gena niže od vrednosti ovih parametara kod sekvenci *MT-ND2* gena, u okviru *MT-ND6* gena prisutan je veći broj haplotipova, kao i veći broj različitih aminokiselinskih sekvenci. U studiji varijabilnosti nukleotidnih sekvenci čitavih genoma mtDNK kod 14 jedinki vrste *L. europaeus*, u okviru *MT-ND6* gena uočeno je gotovo dvostruko manje parsimonijski informativnih mesta u poređenju sa *MT-ND2* genom (Giannoulis i sar., 2018). Nasuprot tome, u ovoj disertaciji veći broj parsimonijskih mesta uočen je kod *MT-ND6* gena. Iako je *MT-ND6* jedan od najvarijabilnijih protein-kodirajućih gena mtDNK molekula, koji usled kratke dužine može biti umnožen i sekvenciran klasičnim Sangerovim pristupom u celosti, ipak ne postoji veliki broj studija koji je istraživao varijabilnost prirodnih populacija na osnovu ovog gena. Pored toga, nekoliko studija koji su se bazirale na analizama sekvenci čitavih genoma isključivao je *MT-ND6* gen iz analiza usled činjenice da je jedini lociran na lakom lancu i da kao takav pokazuje značajne razlike u pogledu sastava baza u odnosu na gene smeštene na teškom lancu mtDNK molekula. Rezultati ove disertacije ukazuju da *MT-ND6* gen poseduje značajan nivo varijabilnosti, i da predstavlja jedan od pogodnih molekularnih markera za opisivanje molekularnog diverziteta kod vrste *L. europaeus*.

Dosadašnja istraživanja varijabilnosti gena imunskog sistema kod vrste *Lepus europaeus* obuhvatila su analizu MHC gena klase II, i to *MHC-DQA*, *MHC-DQB*, *MHC-DRB* i *MHC-DPB* gena (de Belloq i sar., 2009; Campos i sar., 2011; Smith i sar., 2011; Koutsogiannouli i sar., 2009; 2014). Geografski najsvēobuhvatnija bila je studija koja je ispitivala varijabilnost *MHC-DQA* i *MHC-DRB* gena kod 801 jedinke vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije (Koutsogiannouli i sar. 2009; 2014), pri čemu je otkriveno 37 alela u *MHC-DQA* lokusu, odnosno 61 alel u *MHC-DRB* lokusu. Iako je broj *MHC-DQA* alela otkriven u ovoj disertaciji nešto niži nego u pomenutoj studiji, broj varijabilnih nukleotidnih pozicija, kao i broj segregirajućih aminokiselinskih pozicija bio je identičan u oba istraživanja, iako je u ovoj disertaciji ispitivani uzorak gotovo četiri puta manji. Naime, u studiji Koutsogiannouli i saradnika (2009; 2014) za određivanje alela korišćen je pristup zasnovan na polimorfnosti usled konformacionih promena u pojedinačnim lancima (eng. *Single Strand Conformational Polymorphism*) za koji je u nekoliko studija pokazano da usled

smanjene rezolucije same metode, broj otkrivenih alela može biti nešto niži od stvarnog (Sommer i sar., 2013). Sa druge strane, u poređenju sa studijom koja je proučavala varijabilnost *MHC-DQA* gena na uzorku od 326 jedinki sa teritorije istočne Austrije otkriveno je 10 alela (Campos i sar., 2011), u poređenju sa osam *MHC-DQA* alela otkrivenih kod 13 jedinki sa teritoriji Austrije u ovoj disertaciji. Važno je napomenuti da je i u ovoj studiji za određivanje alela korišćen princip kapilarne elektroforeze u ispitivanju SSCP alelskih profila. Međutim, imajući u vidu da su slični nivoi varijabilnosti uočeni nezavisno od veličine uzorka, može se zaključiti da je u ovoj disertaciji i pored manjeg broja uzoraka po pojedinačnim lokalitetima, taj broj i dalje dovoljan da reprezentativno iskaže razlike u geografskoj varijabilnosti u ispitivanim MHC lokusima. Nasuprot dosadašnjim istraživanjima varijabilnosti u *MHC-DQA* i *MHC-DRB* lokusu koje su bile zasnovane na geografski rasprostranjenom uzorku, *MHC-DQB* lokus proučavan je samo regionalno, i to kod 518 jedinki sa teritorije Austrije i Belgije, gde je otkriveno 11 *MHC-DQB* alela na teritoriji Austrije, odnosno devet alela na teritoriji Belgije (Smith i sar., 2011), u poređenju sa 10 alela otkrivenih na teritoriji Austrije, odnosno pet alela otkrivenih na teritoriji Belgije u ovoj disertaciji, ukazujući takođe da nivo detekcije varijabilnosti nije pod izrazitim uticajem veličine uzorka. Generalno govoreći, u okviru MHC gena klase II, dosadašnja istraživanja kako kod vrste *L. europaeus*, tako i kod mnogih drugih vrsta sisara ukazuju da je *MHC-DRB* lokus najvarijabilniji, dok je najmanji nivo polimorfnosti primećen u *MHC-DPB* lokusu, najverovatnije kao posledica odsustva gametske neravnoteže vezanosti sa preostalim genima klase II, kao i gotovo potpunog odsustva rekombinacija (Smith i sar., 2011).

Visoka varijabilnost MHC gena objašnjava se primarno kao posledica delovanja balansne selekcije (Spurgin i Richardson, 2010). Kod svih ispitivanih gena imunskog sistema nivo uočene heterozigotnosti bio je statistički značajno manji u odnosu na vrednosti očekivane pod pretpostavkom Hardi-Vajnebergovog ekvilibrijuma, što ukazuje da je balansna selekcija kroz selektivnu prednost heterozigotnih jedinki manje verovatan mehanizam u oblikovanju uočene varijabilnosti u *MHC-DQA* i *MHC-DQB* lokusu. Identičan rezultat uočen je i u istraživanju varijabilnosti *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena kod jedinki vrste *Lepus capensis* sa teritorije Tunisa, gde je deficit heterozigotnosti takođe uočen u svim ispitivanim populacijama (Awadi i sar., 2018b). Imajući u vidu da je u ovoj disertaciji od 30 otkrivenih alela u *MHC-DQA* lokusu njih 20 bilo zastupljeno u niskim frekvencijama, dok je u *MHC-DQB* lokusu od 41 otkrivenog alela, njih 30 bilo zastupljeno u niskim učestalostima, a pri čemu je najveći broj retko zastupljenih alela u oba lokusa bio prisutan u heterozigotnim genotipovima, uočena varijabilnost u MHC lokusima verovatnije je posledica balansne

selekcije koja favorizuje retke varijante, kroz model selekcije zavisne od učestalosti alela. Slični rezultati dobijeni su i u istraživanju MHC-DQA i MHC-DRB gena kod jedinki vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije, gde je takođe ukazano na model balansne selekcije, kroz favorizaciju retkih alelnih varijanti (Koutsogiannouli i sar., 2009; 2014).

TLR2 gen imunog sistema predstavlja jedan od najčešće proučavanih *TLR* gena upravo zbog mogućnosti da stvara funkcionalne heterodimere sa drugim TLR molekulima, ali i usled činjenice da stupa u interakciju sa velikim brojem različitih ne-TLR molekula (de Oliviera Nascimento i sar., 2012), što ukazuje na mogućnost prepoznavanja širokog spektra patogena. U okviru reda Lagomorpha *TLR2* gen pokazuje ubrzanu stopu mutacija u odnosu na ostale sisare (Neves i sar. 2019), što dodatno ukazuje na značaj ovog gena u prepoznavanje patogena. U ovom istraživanju, po prvi put kod vrste *L. europaeus* analizirana je varijabilnost TIR domena *TLR2* gena. Generalno govoreći, TIR domen *TLR2* gena koji pokazuje visok nivo evolucione očuvanosti kako između preostalih *TLR* gena, tako i između različitih vrsta, kao rezultat funkcionalnih ograničenja vezanih za važnu ulogu u inicijaciji intraćelijskih signalnih kaskada (Jann i sar., 2008). Iako su u ovoj disertaciji otkrivene manje vrednosti varijabilnosti u poređenju sa istraživanjem Awadi i saradnika (2018a) gde je kod 110 jedinki vrste *L. capensis* sa teritorije Tunisa otkriveno 25 *TLR2* alela, koji su prevodjenjem u aminokiselinske sekvence dali 20 različitih proteinskih varijanti, čini se da je generalno, nivo varijabilnosti unutar TIR domena *TLR2* gena u rodu *Lepus* nešto viši u poređenju sa drugim sisarima, najverovatnije kao posledica uočene ubrzane stope evolucije. Na primer, u istraživanju 80 jedinki divljih kunića od 14 uočenih nesinonimnih zamena, samo dve su bile locirane unutar TIR domena (Abrantes i sar., 2013), dok je u istraživanju varijabilnosti *TLR2* gena kod 10 rasa ovaca od 18 varijabilnih pozicija samo dve bilo locirano unutar TIR domena (Smith i sar., 2014).

6.2. Filogeografska struktura i karakteristike demografske istorije vrste *Lepus europaeus*

Vrsta *Lepus europaeus* predstavlja jednu od mnogih vrsta evropskog kontinenta čija je savremena geografska distribucija genetičke varijabilnosti značajno oblikovana pod uticajem smena perioda glacijacije i interglacijacije tokom Pleistocena. Naime, tokom perioda glacijacije najveći deo Evrope bio je pokriven ledom, usled čega su mnoge vrste bile primorane da migriraju u toplije južnije krajeve, tj. teritorije južnih poluostrva: Iberjskog, Apeninskog i Bakanskog poluostrva, koji su imali ulogu refugijuma omogućavajući

preživljavanje nepovoljnih uslova sredine (Hewitt, 1999; Taberlet i sar., 1998). Dosadašnja istraživanja filogeografske strukture vrste *L. europaeus* zasnovana na analizama sekvenci D petlje mtDNK ukazala su na postojanje dve jasno odvojene klade: evropske i anadolijske, odnosno na prisustvo tri velike haplogrupe: jedne koja obuhvata jedinke sa teritorije Bliskog Istoka (AMh), jednu koja uglavnom obuhvata jedinke sa teritorije Balkanskog poluostrva (BLh) i haplogrupu koja je obuhvatala jedinke sa ostalih delova evropskog kontinenta (EUh) (Kasapidis i sar., 2005; Stamatidis i sar., 2009; Djan i sar., 2017; Ashrafzadeh i sar., 2018), što je u potpunosti u saglasnosti i sa rezultatima ove disertacije. Izuzev studije Ashrafzadeh i saradnika (2018) koja je za opisivanje filogeografske struktuiranosti koristila i segment gena za citohrom b, kao i sekvence gena za transportne RNK za prolin i treonin, sve preostale pomenute studije filogeografsku strukturu su definisale na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mtDNK. Naime, D petlja mitohondrijske DNK predstavlja najčešće korišćeni molekularni marker u opisivanju filogeografske strukture, prvenstveno usled visoke stope mutacija u poređenju sa ostalim regionima ovog molekula. U ovoj disertaciji u određivanju filogeografske strukture vrste *Lepus europaeus* korišćene su i sekvence *MT-ND2* i *MT-ND6* gena, koje su takođe ukazale na jasan filogeografski signal i podelu na anadolijsku i evropsku kladu. Iako je usled razlika u mutacionim stopama između različitih delova mtDNK molekula, moguće očekivati diskordantnost u filogenetskim odnosima poređenjem različitih regiona ovog molekula, rezultati ove disertacije ukazuju na jasno prisustvo aspekta II geneaološke konkordantnosti (Avice, 2000), kada je isti filogeografski obrazac podržan analizom većeg broja molekularnih markera.

Definisani filogeografski obrazac vrste *L. europaeus* ukazuje da je anadolijska grupa ancestralna i da je kao izvorišna grupa omogućila naseljavanje jugoistočnog dela Balkanskog poluostrva, tačnije područja Bugarske, Republike Severne Makedonije i jugoistočne Srbije, pri čemu je ovakav protok gena mogao da postoji u nekoliko navrata budući da geološki podaci ukazuju na bar dva perioda niskog nivoa mora tokom srednjeg/kasnog Pleistocena kada je postojao Bosforski zemljouz, pa sve do pre oko 8000 godina kada je ovaj zemljouz poslednji put povezivao Evropu sa Anadolijom (Gökaşan i sar., 1997). Balkanska haplogrupa delovala je kao izvorišna grupa za naseljavanje ostatka Balkanskog poluostrva, dok su jedinke iz centralnih i severnih delova Balkanskog poluostrva bile izvorišna grupa za naseljavanje centralne i zapadne Evrope. Predloženi filogeografski obrazac podržan je analizom sva tri ispitivana markera mtDNK (D petlja, *MT-ND2*, *MT-ND6*), iako u odnosu na prethodna istraživanja nije bilo moguće definisati substrukturiranost Balkanske haplogrupe, najverovatnije usled geografski ograničenog uzorka jedinki sa juga Balkanskog poluostrva

koje su korišćene u ovoj studiji. Predloženi obrazac filogeografske strukturiranosti ukazuje na gotovo kontinuiranu evolucionu trajektoriju od Anadolije ka centralnoj i zapadnoj Evropi bez velikih filogenetskih prekida. Naime, jedino veza između AMh i BLh haplogrupe ukazuje na nešto veću filogenetsku prazninu, gde je otkriveno 13 mutacionih koraka u slučaju D petlje mtDNK, dok je ista veza predstavljena sa svega 6 mutacionih koraka u slučaju *MT-ND2* i *MT-ND6* gena, pri čemu od tih šest samo jedna mutacija predstavlja sinonimnu zamenu. Ipak, ako se uzme u obzir da je maksimalna divergencija haplotipova unutar EUh, BLh i posebno AMh grupe mnogo veća od uočenog filogenetskog prekida između AMh i BLh grupe, on se ipak radije može interpretirati kao plitka filogenetska divergencija. Naime, ovakav obrazac intraspecijske varijabilnosti koji predstavlja relativno plitka retikularna diferencijacija na velikim geografskim regionima sa uočljivim obrascima geografskog particionisanja linija pokazana je i u analizi obrazaca diverziteta mtDNK varijabilnosti kod vrste *L. capensis* (Ben Slimen et al., 2008), kao i kod vrste *L. timidus* (Hamill i sar., 2006), dok su nešto veći filogenetski prekidi uočeni kod vrsta *L. americanus* i *L. yarkadensis* (Li i sar., 2006; Melo-Ferreira i sar. 2014b). Retikularni obrazac evolucije, kao i kompozitna struktura MJ mreže može se predstaviti kao intermedijarni obrazac između kategorije IV i kategorije V obrazaca intraspecijske varijabilnosti mtDNK kod sisara (Avise, 2000), a koja odgovara kontinuiranoj evolucionoj dinamici i prisustvu protoka gena duž udaljenih geografskih regiona, kao i populacionoj ekspanziji bez dužih evolucionih prekida. Ovakav scenario ukazuje da postojanje zone sekundarnog kontakta na teritoriji Bugarske, koja je opisana za mnoge druge vrste, a čiji je značaj za oblikovanje varijabilnosti kod vrste *L. europaeus* ukazivan u ranijim istraživanjima (Stamatis i sar., 2009; Ashrafzadeh i sar., 2018) radije ima relativno mali doprinos u oblikovanju varijabilnosti kod ove vrste. U prilog ovoj tvrdnji ide i činjenica da ni u jednom od ispitivanih mtDNK markera u ovoj disertaciji, što je u saglasnosti i sa prethodnim istraživanjima, haplotipovi karakteristični za balkanske linije nisu uočeni kod jedinki geografski uzorkovanih na teritoriji Bliskog Istoka.

Predloženi filogeografski obrazac podržan je i latitudinalnim gradijentom opadanja parametara molekularnog diverziteta od juga ka severu, koji je uočen kod sva tri ispitivana molekularna markera mtDNK molekula. Naime, prema hipotezi ekspanzivnog fronta (Hewitt, 1999), nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma, povlačenje lednika sa većeg dela teritorije Evrope uslovalo je stvaranje povoljnih uslova za rekolonizaciju ovih regiona, pri čemu su gotovo ekskluzivno samo jedinke sa severnih delova Balkanskog poloustrva delovale kao vodeći front, dok su jedinke sa teritorije centralnih i južnih delova Balkana ostale na neki način blokirane vodećim frontom severnih populacija. U tom smislu, niska varijabilnost

široj centralne i zapadne Evrope direktna je posledica efekta osnivača prilikom rekolonizacije nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma, dok su sa druge strane, periodi intenzivnog mešanja i duže neprekinute evolucije u refugijumima doveli do diverzifikacije i održavanja značajnog nivoa molekularnog diverziteta. Rezultati ove disertacije ukazuju na najveće vrednosti parametara molekularnog diverziteta otkrivene na teritoriji Anadolije i Bliskog Istoka, dok su najmanje vrednosti parametara molekularnog diverziteta otkrivene na teritoriji centralne i zapadne Evrope, što je u saglasnosti sa teorijom ekspanzivnog fronta, ali i u saglasnosti sa prethodnim studijama kod vrste *L. europaeus* (Kasapidis i sar., 2005; Sert i sar., 2005; Fickel i sar., 2008; Stamatis i sar., 2009; Djan i sar., 2017; Ashrafzadeh i sar., 2018).

Karakteristike demografske istorije takođe podržavaju definisanu filogeografsku strukturiranost, sa datiranjem vremenske ekspanzije populacija koja je u potpunosti u skladu sa geološkim promenama, kao i promenama u vegetacijskim pokrivačima tokom kasnog Pleistocena i ranog Holocena (Adams i sar., 1999). Naime, jedinke sa teritorije Anadolije i Izraela pokazuju demografski stabilnu populaciju koja započinje ekspanziju pre oko 50000 godina, signal demografske istorije balkanske grupe datira na pre oko 60000 godina, sa ekspanzijom koja počinje pre oko 20000 godina, dok evropska grupa pokazuje najkraću demografsku istoriju čija ekspanzija započinje pre oko 9000 godina, ubrzo nakon završetka poslednjeg glacijalnog maksimuma (pre oko 15000 godina). Rezultati Migrate-N analize su za sva tri ispitivana markera nedvosmisleno ukazali na gotovo jednosmerni protok gena iz Anadolije na Balkan, budući da je protok gena u suprotnom smeru ukazivao na stopu manje od jedne individue po generaciji. Izraženi signali istorijskih prolazaka kroz usko grlo kod vrste *L. europaeus* nisu uočeni analizom nijednog od tri molekularna markera mtDNK molekula, budući da je multimodalni oblik distribucije nukleotidnih razlika ukazao na dugoročno stabilnu populaciju na teritoriji Anadolije, odnosno signal populacione ekspanzije u evropskoj kladi na osnovu gotovo svih primenjenih testova. Pored toga, analiza distribucije mtDNK haplotipova u okviru MJ mreže takođe je ukazala na obrasce karakteristične za populacije koje prolaze kroz populacionu ekspanziju. Naime, kod sva tri ispitivana markera EUh je okarakterisana jednim (ili nekoliko) veoma zastupljenim haplotipom od koga su polazili jedinstveni haplotipovi i/ili haplotipovi prisutni u niskim frekvencijama, udaljeni sa malim brojem mutacionih koraka, što je obrazac karakterističan za populacionu ekspanziju. Ovakav model populacione radijacije u vezi je sa naglom ekspanzijom populacija prateći kraj poslednjeg glacijalnog maksimuma.

Kada govorimo o filogeografskoj strukturiranosti, važno pitanje je i doprinos različitih južnih poluostrva u rekolonizacionim procesima nakon poslednjeg glacijalnog maksimuma. Ipak ovaj podatak u objašnjavanju filogeografske strukture vrste *L. europaeus* je teško u potpunosti ispitati, budući da najveći broj studija do sada u analizu nije uključivao sekvence jedinki sa teritorije Iberijskog i Apeninskog poluostrva, imajući u vidu simpatričke odnose sa drugim vrstama roda *Lepus*, kao i opisane slučajeve interspecijskih hibridizacija koje bi mogle da naruše rezoluciju filogeografske strukture. Na moguću ulogu Apeninskog poluostrva kao dodatnog refugijuma za vrstu *L. europaeus* ukazano je u studiji Fickel i saradnika (2008). U ovoj disertaciji, u odnosu na prethodne studije korišćen je veći broj jedinki sa teritorije zapadne Evrope, što je uslovalo uočavanje blage substrukturiranosti koja odgovara haplotipovima koji su predominantno posedovale jedinke sa teritorije Belgije, Holandije i Francuske. Iako izdvajanje ovih jedinki od centralno evropskih populacija može biti posledica upliva divergentnijih linija sa Iberijskog i Apeninskog poluostrva, rezultati ove studije ukazuju da se Balkansko poluostrvo čini kao najvažniji refugijum za ovu vrstu usled odsustva velikih geografskih barijera ka severu u poređenju sa drugim poluostrvima. Pored toga, rezultati ove studije nisu ukazali na postojanje neočekivanih filogenetskih odnosa, osim u slučaju jedne jedinke sa teritorije Vojvodine koja se grupisala u okviru AMh grupe. Naime, poznato je da su u drugoj polovini prošlog veka, posebno u toku socijalističkog perioda, vršeni brojni programi translokacije jedinki koji bi mogli da naruše rezoluciju filogeografske strukturiranosti (Kasapdisi i sar., 2005; Stamatis i sar., 2009). U slučaju jedinke sa teritorije Vojvodine, činjenica da je grupisanje u okviru AMh grupe bilo konzistentno za sva tri ispitivana mtDNK markera ukazuje da su translokacije najverovatniji uzrok ovog rezultata.

U odnosu na jak filogeografski signal uočen u analizi mtDNK molekula, potpuno suprotan rezultat dobijen je analizom gena imunskog sistema koji su ukazali na odsustvo filogeografske strukturiranosti, budući da se aleli nisu grupisali u odnosu na geografsku distribuciju, već su bili razruđeni širom topologije Bajesovih stabala i MJ mreže. Jak filogeografski signal uočen u mtDNK molekulu najverovatnije je posledica izraženog filopatričkog obrasca ženki, koji je doveo do izražene prostorne segregacije matrilinearnih linija mtDNK. Sa druge strane, odsustvo filogeografskog signala je već poznata karakteristika MHC gena (Klein i sar., 1998), nastala kao posledica fenomena transspecijskog polimorfizma. Naime, transspecijski polimorfizam MHC gena opisan je kod velikog broja organizama, npr. kod riba (Ottová i sar., 2005), glodara (Cutrera i Lacey, 2006), karnivora (Seddon i Ellegren, 2002), i primata (Azevedo i sar., 2015), a karakterišu ga veće genetičke distance između alela

unutar vrsta nego između različitih vrsta. Transpecijski polimorfizam nastaje kao rezultat selekcionih mehanizama, pri čemu se određene varijante koje su postojale pre divergencije vrsta zadržavaju najverovatnije kao posledica prepoznavanja sličnih patogena i parazita. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju na nekoliko alela MHC-DQA i MHC-DQB lokusa koji su deljeni između različitih vrsta roda *Lepus*, kako na nivou nukleotidnih sekvenci, tako i na nivou aminokiselinskih sekvenci, najverovatnije jer predstavljaju ancestralne varijante koje omogućavaju bolji odgovor na delovanje zajedničkih patogena koji deluju na vrste u okviru roda *Lepus*. U prilog ovoj tvrdnji idu i rezultati nekoliko studija koje su ukazale je da je kvalitativna kompozicija helmintskih zajednica između zečeva i kunića veoma slična (Blasco i sar., 1996; Boag i Iason, 1986). Odsustvo filogeografskog signala na osnovu analize MHC gena pokazano je i u istraživanju Koutsogiannouli i saradnika (2009; 2014) u kome su sagledani filogenetski odnosi između alela MHC-DQA i MHC-DRB lokusa kod jedinki sa teritorije Evrope i Male Azije, a gde je takođe uočena slučajna distribucija alela kroz topologiju stabla bez uočavanja geografskih signala, kao i niske *bootstrap* vrednosti za podržanost uočenih klada, što sve doprinosi niskom filogenetskom signalu.

Iako se transpecijski polimorfizam najčešće opsuje kao dominantan mehanizam u evoluciji MHC gena, u ovoj disertaciji odsustvo izraženog filogeografskog signala, kao i postojanje transpecijskog polimorfizma zabeleženo je i ispitivanjem nukleotidnih sekvenci *TLR2* gena. Pored toga, studije *IgVh* gena koji kodira varijabilni region teškog lanca antitela kod nekoliko vrsta reda *Lagomorpha* (Esteves i sar., 2005), takođe su pokazale prisustvo transpecijskih polimorfizama, što ukazuje da su geni imunskog sistema pod generalnim dejstvom selekcionog signala, te da transpecijski polimorfizam nije posledica idiosinkrazije samo određenih gena koji vode održavanju multiplih linija kroz događaje specijacija (Těšický i Vinkler, 2015).

6.3. Prostorna distribucija genetičke varijabilnosti vrste *L. europaeus*

Razumevanje prostorne distribucije genetičke varijabilnosti, definisanje genetički i porostorno diferenciranih grupa, kao i otkrivanje mogućih genetičkih diskontinuiteta i barijera za protok gena, posebno je važno kada uzorkovanje obuhvata jedinke koje pokazuju široku distribuciju, a gde *a priori* grupisanje u populacije prateći klasičan populaciono-genetički pristup nije moguće usled nedovoljnog broja jedinki po svakom posmatranom lokalitetu. U tom smislu, primena algoritama koji omogućavaju prostorno eksplicitno grupisanje jedinki na osnovu integracije genetičkih podataka sa informacijama o geografskoj

poziciji svake jedinke (François i Durand, 2010), omogućava nepristrasan pristup u opisivanju prostorne distribucije molekularnog diverziteta.

Analiza prostorne distribucije primenom Geneland paketa ukazala je na postojanje komplementarnog prostornog obrasca u slučaju analize sekvenci D petlje mtDNK, kao i sekvenci *MT-ND2* gena. Naime, uočeni obrazac prostorne distribucije gotovo u potpunosti oslikava filogeografski scenario opisan kod ove vrste, ukazujući na nešto veći stepen rezolucije u okviru svake od definisanih haplogrupa. Naime, imajući u vidu da se analize filogeografske strukture najčešće zasnivaju samo na vremenskoj komponenti, odnosno konstrukciji genealoških događaja kroz formiranje MJ mreže ili Bajesovih stabala, primena prostorno eksplicitnih modela pomaže u boljem razumevanju i postizanju veće rezolucije filogeografskih obrazaca, budući da koristi modele zasnovane na genetičkim pretpostavkama, istovremeno uzimajući u obzir i geografske lokacije jedinki, a pored svega toga, daje i statističku podržanost za pripadnost svake jedinke određenoj grupi. U tom smislu, uočeni obrazac prostorne distribucije sekvenci D petlje mtDNK i *MT-ND2* gena ukazao je na statistički značajan signal strukturiranosti u okviru cwEUh haplogrupe, gde se mogu izdvojiti dve prostorne grupe, jedna koja je obuhvatala jedinke sa teritorije zapadne Evrope, i druge koja je obuhvatala jedinke sa teritorije centralne Evrope. Uočena strukturiranost može biti posledica već pomenutog mogućeg doprinosa divergentnijih linija sa Iberijskog polusotrvu. Međutim, imajući u vidu da se u zapadno-evropskim populacijama uočavaju najmanje vrednosti molekularnog diverziteta, one su verovatnije posledica efekta osnivača tokom formiranja ekspanzivnog fronta, dok su centralno-evropske populacije održale nešto više vrednosti parametara molekularnog diverziteta usled upliva divergentnijih linija sa teritorije istočne Evrope (Strzala i sar., 2008; Ashrafzadeh i sar., 2018).

U odnosu na komplementarni obrazac prostorne distribucije dobijenom analizom D petlje mtDNK i *MT-ND2* gena, prostorni obrazac varijabilnosti na osnovu sekvenci *MT-ND6* gena nije ukazao na signal strukturiranosti na teritoriji centralne i zapadne Evrope, ukazujući na postojanje jedne prostorne grupe, ali je nasuprot tome, ukazao na postojanje jasnog signala geografske diferencijacije balkanskih populacija na istočne i zapadne. Budući da strukturiranost balkanskih populacija ne može biti povezana sa nekom uočljivom geografskom barijerom, a imajući u vidu da je otkriveno dejstvo signala pozitivne selekcije u okviru *MT-ND6* gena (više u poglavlju koje sledi), moguće je da se strukturiranost na Balkanskom poluostrvu javlja kao posledica dejstva selekcionih mehanizama. Iako su vrednosti parametara molekularnog diverziteta u okviru definisanih prostornih grupa kod sva tri ispitivana markera na nivou nukleotidnih sekvenci pratila očekivanja po pretpostavljenom

filogeografskom modelu evolucije, odnosno postojanje gradijenta opadanja vrednosti molekularnog diverziteta od Anadolije ka Balkanu, pa dalje ka centralnoj i zapadnoj Evropi, neočekivano suprotan rezultat uočen je na osnovu varijabilnosti aminokiselinskih sekvenci. Naime, u okviru genetičke grupe koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Anadolije i Izraela samo dve aminokiselinske zamene su bile nesinonimne u odnosu na 20 sinonimnih zamena. Nasuprot tome, na teritoriji Balkanskog poluostrva, u okviru zapadne prostorne grupe, od 8 aminokiselinskih zamena čak 5 su bile nesinonimne, dok su u istočnom klasteru uočene 4 nesinonimne zamene. Ovakav rezultat dodatno ukazuje na mogući doprinos selekcionih mehanizama u oblikovanju prostorne distribucije mtDNK varijabilnosti kod vrste *L. europaeus*.

Kada govorimo o razumevanje prostorne distribucije varijabilnosti gena imunskog sistema mora se napomenuti da je njeno razumevanje otežano usled nemogućnosti primene klasičnih metoda za određivanje populacione strukturiranosti, budući da se većina opisanih modela zasniva na pretpostavkama Hardi-Vajnbergove ravnoteže, što u slučaju molekularnih markera koji su pod dejstvom selekcije nije slučaj. Najveći broj studija do sada je razumevanje distribucije varijabilnosti MHC gena zasnivao je na metodama ordinacije koje su primenjivane na *a priori* definisane populacije na osnovu njihove geografske lokacije. U tom smislu, prednost nedavno razvijene sPCA analize u odnosu na klasične ordinacione metode, jeste u uključivanju informacija o geografskoj lokaciji jedinki u analize. Naime, na ovaj način omogućava se razumevanje obrazaca varijabilnosti zasnovano na prostornoj distribuciji razlika u učestalosti alela bez *a priori* definisanih populacija, čime se dobijaju informacije o postojanju globalne strukture (postojanje geografskih klina ili grupa), odnosno informacije o lokalnoj strukturi koja nastaje kao posledica razlika između bliskih geografskih suseda (Jombart i sar., 2012). Primenom ovog pristupa u analizi sva tri ispitivana gena imunskog sistema kod vrste *L. europaeus* sa teritorije Anadolije i Izraela u ovom istraživanju uočeno je prisustvo dve prostorne grupe, jedne koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Evrope, i druge koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Anadolije i Izraela. Uočena distribucija prostorne varijabilnosti ukazuje na postojanje filogeografskog signala koji nije uočljiv primenom klasičnih metoda filogeografije (MJ mreža, Bajesovo stablo). Međutim analiza molekularne varijanse ukazala je na nizak nivo genetičke diferencijacije gde je svega 17,06% bila posledica razlika između dve uočene grupe, što je u saglasnosti i sa rezultatima kada je poređenja razlika između ovih grupa na osnovu *MHC-DQA* i *MHC-DRB* gena gde je 15,30% varijacija bilo usled regionalnih podela (Koutsogiannouli i sar., 2009; 2014). Vrednosti parametara molekularnog diverziteta u okviru AM grupe su bile veće kod sva tri

ispitivana gena imunskog sistema, što je u skladu kako sa rezultatima ove disertacije zasnovanim na mtDNK markerima, ali i sa prethodnim istraživanjima zasnovanim na mtDNK i alozimima (Sert et al., 2005; Stamatis et al., 2009). Sa druge strane, u odnosu na izraženu strukturiranost populacija sa teritorije Evrope uočenu na osnovu analiza mtDNK molekula, suprotan rezultat uočen je u analizi gena imunskog sistema budući da nije ukazano postojanje dodatnih genetičkih prostornih grupa. Rezultati prostorne varijabilnosti MHC gena generalno se mogu uporediti sa rezultatima zasnovanim na mikrosatelitima koji su takođe ukazali na odsustvo značajnijeg signala diferencijacije širom Evrope i Bliskog Istoka (Demirbaş i sar., 2019; Ben Slimen i sar., 2008). Iako u prilog ovoj tvrdnji idu i niže vrednosti F_{ST} parametara kod ispitivanih MHC gena u poređenju sa mtDNK genima, ovakva poređenja svakako nisu inidikativna imajući u obzir razlike u efektivnoj veličini posmatranih genoma.

Iako je distribucija parametara molekularnog diverziteta mtDNK na teritoriji Evrope pokazivala latitudinalni gradijent opadanja vrednosti diverziteta kao posledica efekta osnivača nakon ekspanzije populacija iz Balkanskog refugijuma (Taberlet i sar., 1998), kod ispitivanih MHC gena ovaj signal nije tako izražen. Naime, ako se uporede vrednosti broja alela korigovanih za veličinu uzorka, uočavaju se slični parametri vrednosti molekularnog diverziteta širom Evropskog kontinenta. Ovi rezultati su i u skladu sa istraživanjima Koutsogiannouli i saradnika (2009; 2014) gde su takođe uočene slične vrednosti parametara diverziteta *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena između Balkanskih i centralno evropskih populacija. Imajući u vidu da je varijabilnost MHC gena rezultat delovanja različitih evolucionih mehanizama, ovi rezultati ukazuju da je efekat demografske istorije (genetički drift i efekat osnivača) imao relativno mali doprinos u oblikovanju uočene prostorne distribucije, ukazujući na veći značaj drugih evolucionih mehanizama (rekombinacije, mutacije, selekcija).

Iako u okviru evropske grupe nije uočen signal strukturiranosti, pored postojanja alela sa širokom distribucijom, uočeni su i aleli specifični za lokalne geografske regione. Postojanje lokalno specifičnih alelnih varijanti pokazano je i analizom *MHC-DRB* gena (Koutsogiannouli i sar., 2014), što ukazuje da čak i usled odsustva strukturiranosti protok gena nije u mogućnosti da u potpunosti homogenizuje genske fondove, u slučaju kada postoje diferencijalni signali selekcije koji variraju vremenski i prostorno.

Pored toga, slaba diferencijacija između anadolijske i evropske grupe, podržana je i postojanjem deljenih alela između ovih grupa kod sva tri ispitivana gena imunskog sistema, što je u skladu i sa rezultatima zasnovanim na analizi mikrosatelitskih lokusa (Demirbaş i sar., 2019). Nasuprot rezultatima ovog istraživanja, Konstiagouli i saradnici (2009; 2014) su

pronašli deljene alele između anadolijske i evropske klade samo u MHC-DRB lokusu, dok iste nisu uočili u MHC-DQA lokusu. Iako su pomenuti autori ovaj rezultat objasnili delovanjem različitih mehanizama na oblikovanje varijabilnosti u MHC-DQA i MHC-DRB lokusu, predlažući da su usled adaptacija na nove uslove određeni aleli favorizovani u jednom lokusu, a određeni izgubljeni u drugom lokusu, rezultati ovog istraživanja ne idu u prilog ovoj tvrdnji. Najverovatnije, posledica ovih razlika može biti veoma sužena geografska distribucija uzoraka sa teritorije Turske u pomenutoj studiji, budući da je varijabilnost opisana na osnovu dva lokaliteta sa krajnjeg juga i jednog lokaliteta sa severoistočnog dela Turske, ostavljajući ogroman deo teritorije neistražen.

6.4. Selekcija na jedarne i mtDNK gene kod vrste *Lepus europaeus*

Uloga prirodne selekcije u oblikovanju genetičke varijabilnosti prirodnih populacija organizama predstavlja jedno od centralnih pitanja populacione genetike. Detekcijom delovanja prirodne selekcije na gene i/ili genomske regione omogućava se sa jedne strane razumevanje mehanizama odgovornih za evolucione procese koji deluju u prirodnim populacijama, dok se sa druge strane omogućava razumevanje funkcionalnih aspekata povezanih sa delovanjem prirodne selekcije (Nielsen, 2005).

Pozitivna i/ili negativna selekcija na gene OXPHOS sistema dokazana je kod mnogih životinjskih vrsta u različitim ekološkim kontekstima, tokom poslednje dve decenije (Ballard i Melvin 2010; Finch i sar. 2014; Silva i sar. 2014; Morales i sar. 2015; Ghiselli i Milani, 2019). Značajan broj studija bavio se i detekcijom signala pozitivne selekcije na gene mtDNK molekula kod različitih vrsta roda *Lepus*. Naime, Melo-Ferreira i saradnici (2014a) su analizom 11 sekvenci čitavih genoma kod devet vrsta ovog roda (*L. timidus*, *L. corsicanus*, *L. arcticus*, *L. othus*, *L. townsendii*, *L. granatensis*, *L. capensis*, *L. americanus*, *L. californicus*, *L. europaeus*) primenom nekoliko pristupa za uočavanje delovanja selekcije (Datamonkey web portal, PAML, TreeSAAP) utvrdili signal delovanja pozitivne selekcije na 18 kodona u okviru osam gena OXPHOS sistema, od čega je na 10 kodona signal selekcije potvrđen sa više od dva različita primenjena testa. Među tih 10 kodona, jedan je bio lociran u okviru *MT-ND2* gena (kodon 92), dok su dva kodona bila locirana unutar *MT-ND6* gena (kodoni 14 i 108). U ovoj doktorskoj disertaciji signal pozitivne selekcije na osnovu bar dva različita primenjena testa pokazan je samo u okviru *MT-ND6* gena, i to na kodonskoj poziciji 102, koja razdvaja najzastupljeniju proteinsku varijantu ND6A od dve izvedene proteinske varijante ND6C i ND6F.

Ukoliko se izvrši poređenje rezultata ove disertacije sa rezultatima istraživanja Melo-Ferreira i saradnika (2014a), i to uzimajući u obzir sve kodonske pozicije na kojima je uočen signal pozitivne selekcije bar nekim od primenjenih testova, poklapanje se uočava jedino za kodonsku poziciju 126 u okviru *MT-ND6* gena koja je u ovoj studiji uočena primenom PAML metode, dok je u studiji Melo-Ferreira i saradnika (2014a) potvrđena primenom TreeSAAP metode, i to kao promena magnitude 8 koja utiče na ravnotežnu konstantu. Istim poređenjem, uočeno je slaganje i za kodonsku poziciju 103 u okviru *MT-ND2* gena, koja je u oba istraživanja ukazana na osnovu TreeSAAP metode kao promena magnitude 8 za vrednost ravnotežne konstante (jonizacija karboksilne grupe). Sa druge strane, u analizi sekvenci *MT-ND2* gena kod 22 vrste iz roda *Lepus* signal pozitivne selekcije koji je potvrđen sa više od dva primenjena testa otkriven je kod 5 kodona (Ben Slimen i sar., 2018), međutim jedino je kodon 103 potvrđen bar jednim od primenjenih testova, kako u studiji Melo-Ferreira i saradnika (2014a), tako i u ovom istraživanju. Uočeno neslaganje između rezultata selekcionih testova, kao i razlike u određenim kodonima koji su pod dejstvom pozitivne selekcije su opisane i u drugim studijama, i mogu se smatrati čestom pojavom (Kosakovsky i Frost 2005; Morales i sar., 2015). Naime, selekциони testovi se zasnivaju na različitim teoretskim pretpostavkama, pri čemu svaki od testova pokazuje određeni nivo senzitivnosti, pored toga analize selekcije su takođe pod uticajem dužine sekvenci ispitivanog regiona, kao i broja različitih sekvenci (haplotipova). U tom smislu, u interpretaciji rezultata detekcije signala delovanja prirodne selekcije na molekularnom nivou treba uzeti u obzir, kako senzitivnost svake od primenjenih metoda, tako i broj različitih testova kojima je signal selekcije potvrđen na odgovarajućem kodonu. Na taj način, izbegava se mogućnost definisanja kodona pod signalnom selekcije usled grešaka tipa I (“lažno pozitivan rezultat”). U prethodnim istraživanjima, signal pozitivne selekcije na nekoj kodonskoj poziciji prihvaćen je samo ukoliko je potvrđen sa bar dva različita selekciona testa (Melo-Ferreira i sar., 2014a; Ben Slimen i sar., 2017; 2018). U tom smislu, u ovoj doktorskoj disertaciji signal pozitivne selekcije prihvaćen je samo na kodonskoj poziciji 102 kod *MT-ND6* gena. Pored signala pozitivne selekcije, uočeni su i signali delovanja negativne selekcije kod oba ispitivana gena (*MT-ND2* i *MT-ND6*). Zapravo, prisustvo signala negativne selekcije pokazano je i u prethodnim istraživanjima varijabilnosti mtDNK gena, smatra se da usled važne uloge produkata ovih gena u procesima ćelijskog disanja i energetskeg metabolizma postoji snažan efekat funkcionalnih ograničenja usled čega je signal negativne selekcije prisutniji u oblikovanju varijabilnosti ovih gena (Morales i sar., 2015; Galtier i sar., 2009).

Kada govorimo o genetičkoj varijabilnosti u MHC lokusima važno je naglasiti da je ona oblikovana delovanjem nekoliko mehanizama, koji uključuju mutacije, rekombinacije, seksualnu selekciju, mada dosadašnje studije ukazuju na dominantan udeo balansne i diversifikujuće selekcije u oblikovanju varijabilnosti ovih gena u prirodnim populacijama (Spurgin i Richardson, 2010). Rezultati ove disertacije pokazali su signal viška nesinonimnih u odnosu na sinonimne zamene kod oba ispitivana *MHC* lokusa na većem broju različitih kodona, a pored signala pozitivne selekcije, uočeno je i delovanje negativne selekcije. Budući da su testovi za detekciju signala selekcije u prisustvu rekombinacija skloni ukazivanju na lažno pozitivne rezultate (Anisimova i sar., 2003), a imajući u vidu značajn uticaj rekombinacija na oblikovanje varijabilnosti MHC gena, veoma je važno sagledati njihov generalni doprinos na uočenu varijabilnost MHC gena. Rezultati ove studije ukazuju na postojanje dva rekombinaciona događaja koja su obuhvatila alele *Leeu-DQA*09* i *Leeu-DQA*10*, pri čemu je poslednji alel pokazan kao rekombinanti i u istraživanju Smith i saradnika (2011). Nasuprot istraživanju Awadi i saradnika (2018b), gde je kod vrste *Lepus capensis* signal rekombinacionih događaja uočen kod oba ispitivana MHC-DQA i MHC-DQB lokusa, rezultati ove studije nisu ukazali na rekombinacione događaje u MHC-DQB lokusu. Pored toga rezultati ove studije ukazuju da su oba ispitivana MHC lokusa pokazala slične vrednosti stope supstitucija, ali su rezultati rekombinacionih testova pokazali gotovo pet puta veće vrednosti stope rekombinacija u okviru *MHC-DQB* gena, u poređenju sa *MHC-DQA* genom. Sličan rezultat uočen je i u istraživanju varijabilnosti ovih gena kod vrste *L. capensis* (Awadi i sar. 2018b), pri čemu su autori uočenu razliku objasnili pretpostavkom da je diverzitet u okviru MHC-DQA lokusa rezultat dugoročne varijabilnosti, dok je diverzifikacija u okviru MHC-DQB lokusa rezultat brojnih intralokusnih rekombinacija. Iako rezultati ove disertacije ukazali na prisustvo mogućih rekombinacionih događaja u MHC-DQB lokusu, u prilog prethodnoj tvrdnji ide činjenica da se na osnovu odnosa stope rekombinacija i stope supstitucija kod MHC-DQB lokusa uočava značajan doprinos akumulacije rekombinacija na uočeni diverzitet, nasuprot MHC-DQA lokusu, u kome isti odnos naglašava veći doprinos mutacija u oblikovanju uočene varijabilnosti ovih gena.

Imajući u vidu da rezultati ove disertacije ukazuju na prisustvo rekombinacija u oblikovanju varijabilnosti ispitivanih MHC gena, važno je uzeti u obzir njihov mogući uticaj na ishod selekcionih testova. Naime, jedino omegaMap kao pristup u detekciji selekcije istovremeno uzima u obzir i potencijalni uticaj rekombinacija na rezultate selekcionih testova, dok testovi u okviru PAML i Datamonkey web portal taj efekat ne sagledavaju direktno u samoj analizi. Studije koje su određivanje selekcije zasnivale samo na omegaMap

pristupu češće ukazuju na manji broj kodona pod signalom pozitivne selekcije, dok studije koje su analize zasnivale na pristupima koji ne kontrolišu efekat rekombinacija obično ukazuju na veći broj kodona pod dejstvom pozitivne selekcije, i kao takve ih treba potencijalno tretirati sa oprezom, usled detekcije mogućih lažno pozitivnih rezultata (Smith i sar., 2011). U ovom istraživanju, primenjen je veoma konzervativan pristup u prihvatanju kodona pod signalom pozitivne selekcije, koji je u obzir uzimao jedino one kodonske pozicije koje su potvrđene bar jedinim testom u okviru svakog od primenjenih pristupa (PAML, Datamonkey, omegaMap). Vodivši se ovim pravilom, konzistentan signal pozitivne selekcije uočen je na tri kodona u okviru *MHC-DQA* gena (9, 63 i 70) i tri kodona u okviru *MHC-DQB* gena (6, 18 i 49).

U poređenju sa prethodnim studijama roda *Lepus*, de Bellocq i saradnici (2009) su kod jedinki vrste *L. europaeus* sa teritorije Austrije primenom PAML metoda otkrili jednu poziciju pod dejstvom pozitivne selekcije u *MHC-DQA* genu, i to poziciju 49, koja je i u ovoj disertaciji pokazala signal pozitivne selekcije jedino primenom istog algoritma. U studiji koja je ispitivala jedinke vrste *L. europaeus* sa teritorije Austrije i Belgije, Smith i saradnici (2011) su u okviru *MHC-DQB* gena otkrili dva kodona (18 i 51) pod dejstvom pozitivne selekcije primenom omegaMap paketa, a koji su potvrđeni i u ovoj studiji. U poređenju sa istraživanjem signala selekcije u *MHC-DQA* i *MHC-DQB* genima kod jedinki vrste *Lepus capensis* sa teritorije Tunisa (Awadi i sar., 2018b), sve kodonske pozicije za koje je uočen signal pozitivne selekcije primenom PAML i omegaMap paketa potvrđene su primenom istih pristupa i u ovoj disertaciji. Nasuprot tome, samo jedna od šest kodonskih pozicija otkrivenih na osnovu testova u okviru web portala Datamonkey potvrđena je i u ovoj studiji, i to kodonska pozicija 70. Kada uporedimo rezultate za MHC-DQB lokus, može se uočiti da je u ovoj disertaciji potvrđeno dva od pet kodona uočenih u istraživanju Awadi i saradnika (2018b) za testove na Datamonkey portal, potom za tri od deset kodonskih pozicija uočenih primenom PAML paketa, kao i za osam od 11 kodonskih pozicija uočenih primenom omegaMap paketa. Rezultati ovih poređenja dodatno ukazuju da je prilikom interpretacije rezultata selekcionih testova kod MHC gena, važno uzimati u obzir efekat rekombinacija. Naime, većina neslaganja proizilazi iz poređenja rezultata na osnovu PAML i Datamonkey analiza, dok su rezultati analiza na osnovu omegaMap paketa koji uzima obzir rekombinacioni signal gotovo potpuno kongruentni. Pored toga, rezultati ovih poređenja ukazuju i na slične mehanizme delovanja rekombinacija i selekcije u oblikovanju varijabilnosti MHC gena kod ove dve vrste.

Nasuprot signalu pozitivne selekcije u oblikovanju varijabilnosti MHC gena, kod ispitivanih sekvenci *TLR2* gena uočen je signal delovanja negativne selekcije, što je potvrđeno na osnovu statistički značajnog signala negativne selekcije kroz Z test, detekcijom nekoliko kodona pod signalom negativne selekcije na Datamonkey portal, kao i generalnom topologijom MJ mreže. Naime, na osnovu mreže može se uočiti jedan prevalentno zastupljeni haplotip TLR2h1, iz koga polaze gotovo svi preostali otkriveni haplotipovi. Kao što je već napomenuto, u ovoj disertaciji ispitivan je TIR domen koji je važan za aktivaciju intraćelijskih signalnih kaskada, i usled jakih funkcionalnih ograničenja, varijabilnost je oblikovana pod dejstvom signala negativne selekcije (Jann i sar., 2008). Rezultati ove disertacije u skladu su i sa istraživanjima varijabilnosti *TLR2* gena kod vrste *L. capensis* gde je takođe uočen signal delovanja negativne selekcije u oblikovanju varijabilnosti ovih gena (Awadi i sar., 2018a).

6.5. Genetički signali lokalnih/regionalnih adaptacija kod vrste *Lepus europaeus*

Varijabilnost u okviru gena OXPHOS sistema mtDNK molekula oblikovana pod dejstvom prirodne selekcije može dovesti do divergencije mtDNK linija kroz adaptacije na različite energetske zahteve u slučaju postojanja heterogenosti uslova životne sredine (Fontanillas i sar., 2005; Tieleman i sar., 2003; Scott i sar., 2011). Laboratorijski eksperimenti ukazuju da su mehanizmi mitohondrijskih adaptacija posledica optimizacije efikasnosti enzimskih sistema OXPHOS kompleksa na različite sredinske – klimatske režime, kroz oblikovanje varijabilnosti mtDNK molekula i kroz mitonuklearne koadaptacije (Arnqvist i sar., 2010; Hoekstra i sar., 2013). Veliki broj studija kod sisara, ukazao je da se lokalne adaptacije mtDNK javljaju usled asocijacije između molekularne varijabilnosti ovih molekula i sredinskih varijacija (pre svega temperature i precipitacije) kao funkcionalni odgovor mitohondrija na bazalnu stopu metabolizma (Lowell i Spiegelman, 2000; Tieleman i sar., 2003; Williams i Tieleman, 2005). Smatra se da su priпадnici roda *Lepus* idealna grupa za izučavanje i razumevanje delovanja procesa pozitivne selekcije i adaptacija u okviru mtDNK molekula budući da predstavljaju evoluciono mladu grupu sa izrazitom radijacijom, retikularnim modelom evolucije, čestim hibridizacijama ili deljenim predačkim polimorfizmima usled neotpunog linijskog soritranja, kao i usled činjenice da su rasprostranjeni u različitim staništima u okviru različitih klimatskih područja (Melo-Ferreira i sar., 2014a). Uticaj klimatskih faktora i pozitivne selekcije na varijabilnost mtDNK molekula pokazan je u istraživanjima kod vrste *Lepus capensis* sa teritorije Tunisa, gde je uočen

značajan uticaj prosečne godišnje temperature na distribuciju najzastupljenijih proteinskih varijanti *ATP6* gena, kao i uticaj prosečne temperature tokom najhladnijih perioda godine na distribuciju najzastupljenijih proteinskih varijanti *MT-ND2* gena (Ben Slimen i sar., 2017).

U ovoj disertaciji uočen je statistički značajan efekat klimatskih parametara i delovanje pozitivne selekcije na distribuciju proteinskih varijanti *MT-ND6* gena kod jedinki vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope. Naime, rezultati ove disertacije ukazuju da jedinke koje poseduju proteinske varijante ND6C ili ND6F su češće zastupljene u regionima za koje su karakteristične niske vrednosti parametara precipitacije tokom vlažnih i suvih perioda godine. Pored toga, jedinke koje poseduju proteinske varijante ND6C ili ND6F takođe su češće bile prisutne u regionima za koje su karakteristične više vrednosti precipitacije tokom najsuvljih perioda godine; u poređenju sa jedinkama koje su posedovale najzastupljeniju proteinsku varijantu ND6A. Sa druge strane, nezavisno od uočenog klimatskog efekta pokazan je i značajan efekat geografske dužine na distribuciju proteinskih varijanti ovog gena. Imajući u vidu da prostorna distribucija varijabilnosti sekvenci *MT-ND6* gena odstupa od modela koji prate D petlja i *MT-ND2* gen, kao i usled dokazanog dejstva pozitivne selekcije upravo na kodonskoj poziciji 102 koja vodi nastanku proteinskih varijanti ND6F i ND6C, uočeni rezultat može se interpretirati kao posledica molekularnih adaptacija na heterogene uslove sredine. Naime, ranije studije su već ukazale na negativni uticaj visokih stopa precipitacije na povećanu smrtnost mladih jedinki ove vrste usled visokih energetske zahteva za termoregulaciju tokom ranih perioda ontogenije (Hackländer i sar., 2002; Rödel i Dekker, 2012). Uočeni signal mogao bi da bude posledica adaptacija uočenih varijanti usled bolje optimizacije procesa energetskog metabolizma u heterogenim klimatskim sredinama, imajući u vidu da altitudinalne varijacije širom Balkanskog poluostrva mogu da utiču na postojanje razlika u stopama precipitacije. Pored toga, rezultati ove disertacije ukazali su na veoma nisku varijabilnost proteinskih varijanti *MT-ND6* gena kod jedinki sa teritorije Anadolije koje karakteriše evoluciono starija i stabilna populaciona istorija, u odnosu na evolucionu mlađu evropsku grupu. Međutim, na teritoriji Evrope otkriven je značajno veći broj različitih proteinskih varijanti *MT-ND6* gena. Naime, dolazak jedinki sa teritorije Anadolije na Balkan pre oko 50000 godina, praćen drastičnim promenama klime usled perioda glacijacije i interglacijacije, kao i intenzivne promene u vegetacijskom pokrivaču mogao je takođe da deluje kao selektivni pritisak na bolju optimizaciju gena OXPHOS sistema, u heterogenim uslovima sredine.

Kodonska pozicija 102 u okviru *MT-ND6* gena za koju je pokazano prisustvo signala pozitivne selekcije, na osnovu modela predviđanja sekundarne strukture nalazi se u

transmembranskom domenu IV, što je u saglasnosti sa prethodnim studijama koje su ukazale da je najveći broj pozicija od adaptivnog značaja u mtDNK molekulu smešteno unutar funkcionalno relevantnih transmembranskih domena (Yu i sar., 2011; Morales i sar., 2015). I pored odsustva informacija o direktnom funkcionalnom značaju kodonske pozicije 102 u okviru MT-ND6 gena, ranije studije su već ukazale na mogućnost uticaja pojedinačnih nukleotidnih promena i/ili aminokiselinskih zamena na razlike u energetske performansama OXPHOS sistema, kao i pojavu metaboličkih i degenerativnih bolesti, kancera ili starenja usled energetske disfunkcije (Dimauro, 2011). Pored toga, pokazano je da produkti *MT-ND6* gena imaju važnu ulogu u sklapanju kompleksa I OXPHOS sistema, a da aminokiselinske zamene u ovom kompleksu mogu da utiču na efikasnost rada protonskih pumpi, te da dovode do razlika u metaboličkim performansama (da Fonseca i sar., 2008).

Imajući u vidu sve navedeno, iako činjenice idu u prilog tvrdnji genetičkog signala regionalnih adaptacija u okviru *MT-ND6* gena, važno je napomenuti da je u cilju potvrde ovih tvrdnji neophodno sprovesti funkcionalne studije na osnovu kojih bi se ispitao efekat odgovarajućih aminokiselinskih zamena na efikasnost energetske metabolizma u različitim klimatskim režimima.

Pored sagledavanja signala lokalnih adaptacija usled delovanja prirodne selekcije na gene smeštene u mtDNK, u ovoj tezi uočeno je prisustvo pozitivne selekcije, kao i efekat klimatskih karakteristika na distribuciju varijabilnosti MHC gena kod jedinki u okviru evropske prostorne grupe. Naime, postojanje varijacija u učestalostima MHC alela između prirodnih populacija kao posledica distribucije u različitim geografskim delovima areala i/ili pod uticajem različitih sredinskih faktora u okviru staništa koja naseljavaju već je pokazana u značajnom broju studija kod različitih vrsta (npr. Alcaide i sar., 2008; Ekblom i sar., 2007; Cammen i sar., 2011; Talarico i sar., 2019). Postojanje geografske varijabilnosti u učestalosti MHC alela može se objasniti kao posledica lokalnih/regionalnih imunogenetičkih adaptacija na geografske varijacije u selekcionim pritiscima usled razlika u diverzitetu i brojnosti patogena (Lenz i sar., 2013; Clozato i sar., 2015). Razlike u selekcionim pritiscima patogena na domaćina uslovljene su sredinskim karakteristikama koje značajno oblikuju bogatstvo vrsta parazita i patogena, njihovo preživljavanje, rasprostranjenost, kao i sposobnost da dovedu do pojave bolesti (Froeschke i sar., 2014). Sa druge strane, sredinske komponente utiču i na populacionu dinamiku, imunokompetencije i nutritivni status domaćina, koje zajedno ukazuju na sklonost ili otpornost prema bolestima (Fuller i sar., 2011; Hayman i sar., 2016). Na kraju sama interakcija između domaćina i patogena takođe je uslovljena njihovom populacionom istorijom, njihovim ekološkim i razlikama u ponašanju, kao i faktorima

spoljašnje sredine (Brunner i Eizaguirre, 2016). U tom smislu, sagledavanje uloge sredinskih faktora predstavlja veoma važno pitanje u razumevanju varijabilnosti MHC gena (Salmier i sar., 2016). Statistički značajan efekat sredinskih – klimatskih faktora, i to prosečne godišnje temperature i precipitacije na distribuciju MHC proteinskih varijanti već je pokazan u ranijim istraživanjima kod vrsta iz roda *Lepus*, naime kod vrste *L. capensis* sa teritorije Tunisa, i to nezavisno od signala geografske širine i dužine koji je takođe statistički značajno uticao na distribuciju proteinskih varijanti, ukazujući na postojanje regionalnih/lokalnih adaptacija kao posledice razlika u distribuciji patogena duž ispitivanog ekološkog gradijenta (Awadi i sar., 2018b). Statistički značajan uticaj klimatskih faktora na distribuciju proteinskih varijanti *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena utvrđen je i u ovoj disertaciji. Naime, pokazano je da individue koje su heterozigoti za proteinske varijante DQA6 i DQB3 su češće zastupljene u regionima gde su vrednosti parametara precipitacije niske posebno tokom vlažnih perioda godine, u poređenju sa individuama koje nisu posedovale ovu varijante u svojim genotipovima, ili u odnosu na individue koje su bile homozigotne za ove varijante. Pored toga, uočen je i efekat klimatskih parametara na distribuciju homozigota i heterozigota za proteinsku varijantu DQA1, odnosno DQA10. Imajući u vidu da sredinski faktori, posebno temperatura, precipitacija i vlažnost vazduha mogu uticati na razlike u distribuciji parazita i patogena (Hoberg i Brooks, 2015), uočeni klimatski efekat može se indirektno objasniti kao posledica imunogenetičkih adaptacija na lokalno prisutnu kompoziciju parazita i patogena. Iako bi se na prvi pogled uočene imunogenetičke adaptacije mogle objasniti kao direktna posledica overdominantnog modela delovanja balansne selekcije, u ovoj disertaciji nije uočen statistički značajan efekat klimatskih parametara na heterozigotnost ni u jednom od ispitivanih lokusa. Pored toga, zabeleženi deficit uočenih heterozigota takođe ne doprinosi modelu overdominantnog modela balansne selekcije. Prisustvo balansne selekcije u oblikovanju varijabilnosti MHC gena kod vrste *L. europaeus* može se objasniti i odsustvom izražene strukturiranosti širom evropske grupe, u poređenju sa rezultatima zasnovanim na analizi D-petlje mtDNK gena kao neutralnih markera, kao i usled toga da je najveći broj retko zastupljenih alela karakterističan za određene delove ispitivanog areala ove vrste, što se uklapa u model delovanja balansne selekcije zavisne od učestalosti alela. Naime, čini se da je balansna selekcija u prošlosti delovala tako da održi zastupljenost proteinskih varijanti na čitavom geografskom arealu, a da su lokalne razlike u frekvencijama alela moguća posledica lokalnih imunogenetičkih adaptacija, kao i u slučaju vrste *L. capensis* sa teritorije Tunisa (Awadi i sar. 2018b). U prilog ovoj tvrdnji ide i činjenica da su rezultati modelovanja ukazali na značajan uticaj geografske širine i/ili dužine na distribuciju najzastupljenijih proteinskih

varijanti *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena ukazujući na postojanje signala prostornih razlika u distribuciji proteinskih varijanti ovih gena. Neslučajna distribucija odgovarajućih proteinskih varijanti u kombinaciji sa potvrđenim signalima delovanja pozitivne selekcije može se interpretirati kao signal diversifikujuće selekcije usled razlika u lokalnoj distribuciji patogena koja vodi imunogenetičkim adaptacijama. Naime, ovakav rezultat ide u korist novijim hipotezama koje smatraju da se signal lokalnih adaptacija može uočiti i na mikrogeografskim skalama, kada sredinska heterogenost stvara adaptivnu varijabilnost, čak i kada se protok gena odvija u određenoj meri (Larson i sar., 2014). Uzimajući u obzir sve navedeno, rezultati ove studije ukazuju da je proces oblikovanja varijabilnosti MHC gena pod uticajem složene kombinacije većeg broja različitih evolucionih mehanizama, te da je vrlo teško razdvojiti efekat delovanja svakog mehanizma pojedinačno.

Odsustvo efekta klimatskih parametara na distribuciju proteinskih varijanti *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena u okviru prostorne grupe koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Bliskog Istoka najverovatnije je posledica male veličine uzorka, koja se kroz broj ispitivanih nezavisnih varijabli mogla odraziti kroz statističku nestabilnost modela.

Zanimljivo je napomenuti da se uočava generalni uticaj precipitacije kako na distribuciju proteinskih varijanti *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena, tako i na distribuciju proteinskih varijanti *MT-ND6* gena. Ovakav rezultat ukazuje da ne bi trebalo isključiti ni mogućnost koadaptacija gena imunskog sistema i mtDNK gena usled hipoteze da bolja efikasnost OXPHOS sistema daje energiju organizmima neophodnu za uspešnu borbu protiv patogena i parazita (West i sar., 2011).

Iako pretpostavljene razlike u distribuciji patogena mogu da dovedu do regionalnih imunogenetičkih adaptacija, važno je napomenuti da se najveći broj dosadašnjih studija, kao i ova doktorska disertacija ne oslanjaju na direktni dokaz za ove tvrdnje. Razlog tome je što takav pristup zahteva analizu kako MHC varijabilnosti, tako i analizu prisustva patogena i parazita kod ispitivanih jedinki, ali i analizu distribucije i bogatstva patogena u ispitivanom arealu, što je do sada urađeno u svega nekoliko slučajeva (npr. Dionne i sar., 2007; Evans i Neff, 2009).

7. ZAKLJUČAK

U doktorskoj disertaciji sagledan je molekularni diverzitet vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka, a na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mtDNK, *MT-ND2*, *MT-ND6*, *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena i izvedeni su sledeći zaključci:

- uočen je visok nivo parametara molekularnog diverziteta za sve ispitivane molekularne markere
- uočeno je prisustvo filogeografske strukturiranosti vrste na osnovu mtDNK, kao i postojanje dve velike klade, jedne koja obuhvata jedinke sa teritorije Bliskog Istoka, i druge koja obuhvata jedinke sa teritorije Evrope, a koja se na osnovu varijabilnosti sekvenci D petlje mtDNK može dodatno podeliti u balkansku i centralnoevropsku haplogrupu
- analize demografske istorije mtDNK molekula ukazale su na postojanje populacione stabilnosti kod jedinki sa teritorije Anadolije, odnosno signal populacione ekspanzije kod jedinki sa teritorije Evrope. Vremensko datiranje na osnovu sekvenci D petlje mtDNK ukazalo je na postojanje najduže istorije kod jedinki sa teritorije Anadolije, zatim ekspanziju kod jedinki sa teritorije Balkana koja započinje pre oko 50000 godina, kao i ekspanziju kod jedinki sa teritorije centralne i zapadne Evrope koja započinje pre oko 12000 godina
- uočen je asimetričan protok gena jedinki sa teritorije Anadolije na teritoriju Balkana na osnovu D petlje mtDNK, *MT-ND2* i *MT-ND6* gena, dok je na osnovu sekvenci D petlje mtDNK uočena gotovo tri puta veća stopa protoka gena sa Balkana u centralnu i zapadnu Evropu
- utvrđeno je postojanje prostorne distribucije mtDNK varijanti, koje je ukazalo na postojanje četiri prostorne grupe, kod kojih je uočen gradijent opadanja parametara molekularnog diverziteta od juga ka severu
- utvrđeno je prisustvo signala pozitivne selekcije u okviru *MT-ND6* gena, kao i efekat klimatskih parametara (precipitacije) na distribuciju proteinskih varijanti ND6C i ND6F, kao moguća posledica regionalnih adaptacija na razlike u sredinskim uslovima
- uočeno je odsustvo signala filogeografske strukturiranosti na osnovu *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena, kao i signal transpecijskih polimorfizama

- uočeno je postojanje prostorne strukturiranosti na osnovu gena imunskog sistema, i definisane su dve prostorne grupe, jedna koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Bliskog Istoka, i druga koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Evrope
- više vrednosti parametara molekularnog diverziteta uočene su u anadolijskoj grupi, u poređenju sa evropskom grupom
- uočen je signal delovanja pozitivne i negativne selekcije u *MHC-DQA* i *MHC-DQB* genima, kao i signal negativne selekcije u *TLR2* genu
- uočen je efekat klimatskih parametara na distribuciju najzastupljenijih proteinskih varijanti *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena kao indirektni pokazatelj imunogenetičkih adaptacija na sredinski uslovljene pretpostavljene razlike u distribuciji patogena
- mehanizam oblikovanja varijabilnosti MHC gena rezultat je uzajamnog delovanja mutacija, rekombinacija i selekcije

Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da primena molekularnih markera smeštenih u različitim delovima genoma, kao i sa različitim selektivnim karakteristikama može da ukaže na različite doprinose mehanizama koji doprinose održavanju genetičke varijabilnosti. Rezultati dobijeni primenom mtDNK markera ukazuju na predominantan značaj adaptivno neutralnih procesa (genetički drift preko efekta osnivača) u oblikovanju varijabilnosti ove vrste, kao i prisustvo izraženog obrasca filogeografske strukturiranosti kroz postojanje tri velike grupe. Sa druge strane, geni imunskog sistema ukazuju na odsustvo signala geografske strukturiranosti, ali na postojanje izraženog delovanja selekcionih mehanizama i rekombinacija u oblikovanju varijabilnosti ovih gena, kao i na postojanje lokalnih/regionalnih imunogenetičkih adaptacija na maloj geografskoj skali. U tom smislu programi održivog upravljanja prirodnim populacijama trebalo bi da uzmu u obzir kako rezultate koji ukazuju na očuvanje genetičke prošlosti kroz uočenu filogeografsku strukturiranost, tako i informacije o postojanju lokalno/regionalno adaptiranih jedinica.

8. LITERATURA

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. (2010) Osnovna imunologija. Funkcije i poremećaji imunskog sistema. Beograd: Datastatus.
- Abrantes, J., Areal, H., Esteves, P. J. (2013) Insights into the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) innate immune system: genetic diversity of the toll-like receptor 3 (TLR3) in wild populations and domestic breeds. *BMC genetics*, 14(1): 73.
- Acevedo-Whitehouse, K., Cunningham, A. A. (2006) Is MHC enough for understanding wildlife immunogenetics? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(8): 433-438.
- Adams, J., Maslin, M., Thomas, E. (1999) Sudden climate transitions during the Quaternary. *Progress in Physical Geography*, 23(1): 1-36.
- Akira, S., Takeda, K., Kaisho, T. (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8): 675.
- Alcaide, M., Edwards, S.V., Negro, J.J., Serrano, D., Tella, J.L. (2008) Extensive polymorphism and geographical variation at a positively selected MHC class II B gene of the lesser kestrel (*Falco naumanni*). *Molecular Ecology*, 17: 2652-2665.
- Alves, P. C., Ferrand, N., Suchentrunk, F., Harris, D. J. (2003) Ancient introgression of *Lepus timidus* mtDNA into *L. granatensis* and *L. europaeus* in the Iberian Peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 27(1): 70-80.
- Alves, P. C., Melo-Ferreira, J., Freitas, H., Boursot, P. (2008) The ubiquitous mountain hare mitochondria: multiple introgressive hybridization in hares, genus *Lepus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1505): 2831-2839.
- Amoutzias, G. D., Giannoulis, T., Moutou, K. A., Psarra, A. M. G., Stamatis, C., Tsipourlianos, A., Mamuris, Z. (2016) SNP identification through transcriptome analysis of the european brown hare (*Lepus europaeus*): Cellular energetics and mother's curse. *PloS one*, 11(7), e0159939.
- Anisimova, M., Nielsen, R., Yang, Z. (2003) Effect of recombination on the accuracy of the likelihood method for detecting positive selection at amino acid sites. *Genetics*, 164(3): 1229-1236.

- Antoniou, A., Magoulas, A., Platis, P., Kotoulas, G. (2013) Assessing the genetic landscape of a contact zone: the case of European hare in northeastern Greece. *Genetica*, 141(1-3): 23-40.
- Arif, I. A., Khan, H. A., Bahkali, A. H., Al Homaidan, A. A., Al Farhan, A. H., Al Sadoon, M., Shobrak, M. (2011) DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi journal of biological sciences*, 18(3): 219-225.
- Arnqvist, G., Dowling, D. K., Eady, P., Gay, L., Tregenza, T., Tuda, M., Hosken, D. J. (2010) Genetic architecture of metabolic rate: environment specific epistasis between mitochondrial and nuclear genes in an insect. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 64(12): 3354-3363.
- Ashrafzadeh, M. R., Djan, M., Szendrei, L., Paulauskas, A., Scandura, M., Bagi, Z., Ilie, D.E., Kerdikoshvili, N., Marek, P., Soos, N., Kusza, S. (2018) Large-scale mitochondrial DNA analysis reveals new light on the phylogeography of Central and Eastern-European Brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *PloS one*, 13(10), e0204653.
- Avise, J. C. (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Cambridge(MA): Harvard university press.
- Avise, J. C. (2004) Molecular markers, natural history, and evolution. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Awadi, A., Ben Slimen, H., Smith, S., Kahlen, J., Makni, M., Suchentrunk, F. (2018a) Genetic diversity of the toll-like receptor 2 (TLR2) in hare (*Lepus capensis*) populations from Tunisia. *Comptes rendus biologiques*, 341(6): 315-324.
- Awadi, A., Ben Slimen, H., Smith, S., Knauer, F., Makni, M., Suchentrunk, F. (2018b) Positive selection and climatic effects on MHC class II gene diversity in hares (*Lepus capensis*) from a steep ecological gradient. *Scientific reports*, 8.
- Azevedo, L., Serrano, C., Amorim, A., Cooper, D. N. (2015) Trans-species polymorphism in humans and the great apes is generally maintained by balancing selection that modulates the host immune response. *Human genomics*, 9(1): 21.
- Ballard, J. W. O., Whitlock, M. C. (2004) The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology*, 13(4): 729-744.

- Ballard, J. W. O., Rand, D. M. (2005) The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 36: 621-642.
- Ballard, J. W. O., Melvin, R. G. (2010) Linking the mitochondrial genotype to the organismal phenotype. *Molecular ecology*, 19(8): 1523-1539.
- Balloux, F., Handley, L. J. L., Jombart, T., Liu, H., Manica, A. (2009) Climate shaped the worldwide distribution of human mitochondrial DNA sequence variation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1672): 3447-3455.
- Bandelt, H. J., Forster, P., Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1): 37-48.
- Beerli, P. (2004). Migrate documentation. School of Computational Science and Department of Biological Science. Florida State University, Tallahassee, FL.
- Belkhir, K. (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. <http://www.genetix.univ-montp2.fr/genetix/genetix.htm>.
- Bensasson, D., Zhang, D. X., Hartl, D. L., Hewitt, G. M. (2001) Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in ecology & evolution*, 16(6): 314-321.
- Ben Slimen, H., Suchentrunk, F., Stamatis, C., Mamuris, Z., Sert, H., Alves, P.C., Kryger, U., Shahin, A.B. and Elgaaied, A.B.A. (2008) Population genetics of cape and brown hares (*Lepus capensis* and *L. europaeus*): A test of Petter's hypothesis of conspecificity. *Biochemical Systematics and Ecology*, 36(1): 22-39.
- Ben Slimen, H., Schaschl, H., Knauer, F., Suchentrunk, F. (2017) Selection on the mitochondrial ATP synthase 6 and the NADH dehydrogenase 2 genes in hares (*Lepus capensis* L., 1758) from a steep ecological gradient in North Africa. *BMC evolutionary biology*, 17(1): 46.
- Ben Slimen, H., Awadi, A., Tolesa, Z. G., Knauer, F., Alves, P. C., Makni, M., Suchentrunk, F. (2018) Positive selection on the mitochondrial ATP synthase 6 and the NADH dehydrogenase 2 genes across 22 hare species (genus *Lepus*). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 56(3): 428-443.
- Bernatchez, L., Landry, C. (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years?. *Journal of evolutionary biology*, 16(3): 363-377.

- Beugin, M. P., Letty, J., Kaerle, C., Guitton, J. S., Muselet, L., Queney, G., Pontier, D. (2017) A single multiplex of twelve microsatellite markers for the simultaneous study of the brown hare (*Lepus europaeus*) and the mountain hare (*Lepus timidus*). *Ecology and Evolution*, 7(11): 3931-3939.
- Blasco, S., Torres, J., Feliu, C., Casanova, J. C., Miquel, J., Moreno, S. (1996) The helminthfauna of *Oryctolagus cuniculus* (Linnaeus, 1758) in the Iberian Peninsula. Faunistic and ecological considerations. *Parasite*, 3(4): 327-333.
- Boag, B., Iason, G. (1986) The occurrence and abundance of helminth parasites of the mountain hare *Lepus timidus* (L.) and the wild rabbit *Oryctolagus cuniculus* (L.) in Aberdeenshire, Scotland. *Journal of Helminthology*, 60(2): 92-98.
- Bondinas, G. P., Moustakas, A. K., Papadopoulos, G. K. (2007) The spectrum of HLA-DQ and HLA-DR alleles, 2006: a listing correlating sequence and structure with function. *Immunogenetics*, 59(7): 539-553.
- Bonino, N., Cossíos, D., Menegheti, J. (2010) Dispersal of the European hare, *Lepus europaeus* in South America. *Folia Zoologica*, 59(1): 9-15.
- Brunner, F. S., Eizaguirre, C. (2016) Can environmental change affect host/parasite-mediated speciation? *Zoology*, 119(4): 384-394.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R. (2002) Model Selection and Multimodel Inference: A Practical Information-Theoretic Approach. New York: Springer Publishing.
- Butler, S. J., Vickery, J. A., Norris, K. (2007) Farmland biodiversity and the footprint of agriculture. *Science*, 315(5810): 381-384.
- Cammen, K., Hoffman, J. I., Knapp, L. A., Harwood, J., Amos, W. (2011) Geographic variation of the major histocompatibility complex in Eastern Atlantic grey seals (*Halichoerus grypus*). *Molecular Ecology*, 20(4): 740-752.
- Campos, J. L., de Bellocq, J. G., Schaschl, H., Suchentrunk, F. (2011) MHC class II DQA gene variation across cohorts of brown hares (*Lepus europaeus*) from eastern Austria: Testing for different selection hypotheses. *Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde*, 76(3): 251-257.
- Canu, A., Scandura, M., Luchetti, S., Cossu, A., Iacolina, L., Bazzanti, M., Apollonio, M. (2013) Influence of management regime and population history on genetic diversity

- and population structure of brown hares (*Lepus europaeus*) in an Italian province. *European Journal of Wildlife Research*, 59(6): 783-793.
- Chapman, J. R., Hellgren, O., Helin, A. S., Kraus, R. H., Cromie, R. L., Waldenström, J. (2016) The evolution of innate immune genes: purifying and balancing selection on β -defensins in waterfowl. *Molecular biology and evolution*, 33(12): 3075-3087.
- Choi, Y., Chan, A. P. (2015). PROVEAN web server: a tool to predict the functional effect of amino acid substitutions and indels. *Bioinformatics*, 31(16): 2745-2747.
- Clarke, B., Kirby, D. R. S. (1966) Maintenance of histocompatibility polymorphisms. *Nature*, 211(5052): 999-1000.
- Clozato, C. L., Mazzoni, C. J., Moraes-Barros, N., Morgante, J. S., Sommer, S. (2015) Spatial pattern of adaptive and neutral genetic diversity across different biomes in the lesser anteater (*Tamandua tetradactyla*). *Ecology and evolution*, 5(21): 4932-4948.
- Cutrera, A. P., Lacey, E. A. (2007). Trans-species polymorphism and evidence of selection on class II MHC loci in tuco-tucos (Rodentia: Ctenomyidae). *Immunogenetics*, 59(12): 937-948.
- Da Fonseca, R. R., Johnson, W. E., O'Brien, S. J., Ramos, M. J., Antunes, A. (2008) The adaptive evolution of the mammalian mitochondrial genome. *BMC genomics*, 9(1): 119.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. D. Posada. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8): 772.
- De Belloq, J.G., Suchentrunk, F., Baird, S.J., Schaschl, H. (2009) Evolutionary history of an MHC gene in two leporid species: characterisation of Mhc-DQA in the European brown hare and comparison with the European rabbit. *Immunogenetics*, 61(2): 131-144.
- Demirbaş, Y., Albayrak, İ., Koca, A. Ö., Stefanović, M., Knauer, F., Suchentrunk, F. (2019) Spatial genetics of brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from Turkey: Different gene pool architecture on either side of the Bosphorus? *Mammalian Biology*, 94: 77-85.
- De Oliveira Nascimento, L., Massari, P., Wetzler, L. M. (2012). The role of TLR2 in infection and immunity. *Frontiers in immunology*, 3: 79.

- DiMauro, S. (2011) A history of mitochondrial diseases. *Journal of inherited metabolic disease*, 34(2): 261-276.
- Dionne, M., Miller, K. M., Dodson, J. J., Caron, F., Bernatchez, L. (2007) Clinal variation in MHC diversity with temperature: evidence for the role of host–pathogen interaction on local adaptation in Atlantic salmon. *Evolution*, 61(9): 2154-2164.
- Djan, M., Obreht, D., Vapa, L. (2006) Polymorphism of mtDNA regions in brown hare (*Lepus europaeus*) populations from Vojvodina (Serbia and Montenegro). *European Journal of Wildlife Research*, 52(4): 288-291.
- Đan, M. (2008) Polimorfnost mikrosatelita i mtDNK u poulacijama zeca (*Lepus europaeus Pallas*). Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad
- Djan, M., Veličković, N., Stefanović, M., Marković, V., Vidaković, D. O., Vapa, L. (2015) Genetic variation within and among brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) populations in Serbia as inferred from microsatellites. *Balkan Journal of Wildlife Research*, 2(1): 18-26.
- Djan, M., Stefanović, M., Veličković, N., Lavadinović, V., Alves, P. C., Suchentrunk, F. (2017) Brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from the Balkans: a refined phylogeographic model. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, 28(2): 1-8.
- Doherty, P. C., Zinkernagel, R. M. (1975) Enhanced immunological surveillance in mice heterozygous at the H-2 gene complex. *Nature*, 256(5512): 50.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Shapiro, B. E. T. H., Pybus, O. G. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution*, 22(5): 1185-1192.
- Drummond, A. J., Rambaut, A., Suchard, M. (2013). BEAST 1.8.0.
- Dunn, R. R., Davies, T. J., Harris, N. C., Gavin, M. C. (2010) Global drivers of human pathogen richness and prevalence. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1694): 2587-2595.
- Ekblom, R., Sæther, S. A., Fiske, P., Kålås, J. A., Höglund, J. (2010) Balancing selection, sexual selection and geographic structure in MHC genes of Great Snipe. *Genetica*, 138(4): 453-461.

- Esteves, P. J., Lanning, D., Ferrand, N., Knight, K. L., Zhai, S. K., Van Der Loo, W. (2005) The evolution of the immunoglobulin heavy chain variable region (IgV H) in Leporids: an unusual case of transspecies polymorphism. *Immunogenetics*, 57(11): 874-882.
- Estonba, A., Solís, A., Iriondo, M., Sanz-Martín, M. J., Perez-Suarez, G., Markov, G., Palacios, F. (2006) The genetic distinctiveness of the three Iberian hare species: *Lepus europaeus*, *L. granatensis*, and *L. castroviejo*. *Mammalian Biology*, 71(1): 52-59.
- Evans, M. L., Neff, B. D. (2009) Major histocompatibility complex heterozygote advantage and widespread bacterial infections in populations of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). *Molecular ecology*, 18(22): 4716-4729.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*, 10(3): 564-567.
- Fearnhead, P., Donnelly, P. (2001) Estimating recombination rates from population genetic data. *Genetics*, 159(3): 1299-1318.
- Fickel, J., Schmidt, A., Putze, M., Spittler, H., Ludwig, A., Streich, W. J., Pitra, C. (2005). Genetic structure of populations of European brown hare: implications for management. *The Journal of wildlife management*, 69(2):760-770.
- Fickel, J., Hauffe, H. C., Pecchioli, E., Soriguer, R., Vapa, L., Pitra, C. (2008). Cladogenesis of the European brown hare (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *European journal of wildlife research*, 54(3): 495.
- Finch, T. M., Zhao, N., Korkin, D., Frederick, K. H., Eggert, L. S. (2014) Evidence of positive selection in mitochondrial complexes I and V of the African elephant. *PLoS One*, 9(4): e92587.
- Flux, J. E. C., Angermann, R. (1990). Rabbits, hares and pikas. Status survey and conservation action plan. The hares and jackrabbits. Gland, Switzerland, and Cambridge, UK: IUCN/SSC Lagomorph Specialist Group, 61-94.
- Fontanillas, P., Depraz, A., Giorgi, M. S., Perrin, N (2005) Nonshivering thermogenesis capacity associated to mitochondrial DNA haplotypes and gender in the greater white-toothed shrew, *Crocidura russula*. *Molecular Ecology*, 14(2): 661-670.

- Frölich, K., Wisser, J., Schmäser, H., Fehlberg, U., Neubauer, H., Grunow, R., Nikolaou, K., Priemer, J., Thiede, S., Streich, W.J. Speck, S. (2003) Epizootiologic and ecologic investigations of European brown hares (*Lepus europaeus*) in selected populations from Schleswig-Holstein, Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(4): 751-761.
- François, O., Durand, E. (2010) Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics. *Molecular Ecology Resources*, 10(5): 773-784.
- Frankham, R., Ballou, J. D. Briscoe, D. A. (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge(UK): Cambridge University Press.
- Fredsted, T., Wincentz, T., Villesen, P. (2006) Introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into wild brown hares (*Lepus europaeus*) in Denmark. *BMC ecology*, 6(1): 17.
- Froeschke, G., Sommer, S. (2014) Role of selection versus neutral processes determining genetic variation in a small mammal along a climatic gradient in southern Africa. *Evolutionary ecology*, 28(6): 1169-1190.
- Fu, Y. X., Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 133(3): 693-709.
- Fuller, C. A., Postava-Davignon, M. A., West, A., Rosengaus, R. B. (2011) Environmental conditions and their impact on immunocompetence and pathogen susceptibility of the Caribbean termite *Nasutitermes acajutlae*. *Ecological Entomology*, 36(4): 459-470.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G. D. D. (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular ecology*, 18(22): 4541-4550.
- Ghiselli, F., Milani, L. (2019) Linking the mitochondrial genotype to phenotype: a complex endeavour. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. B375: 20190169.
- Giannoulis, T., Stamatis, C., Tsipourlianos, A., Mamuris, Z. (2018) Mitogenomic analysis in European brown hare (*Lepus europaeus*) proposes genetic and functional differentiation between the distinct lineages. *Mitochondrial DNA Part A*, 29(3): 353-360.
- Gissi, C., Iannelli, F., Pesole, G. (2008) Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, 101(4): 301

- Gökaşan, E., Demirbag, E., Oktay, F. Y., Ecevitog, B., Şimşek, M., Yüce, H. (1997) On the origin of the Bosphorus. *Marine Geology*, 140(1-2): 183-199.
- Göriz, F., Faßbender, M., Broich, A., Quest, M., Lange, A., Blottner, S., Gilles, M., Lengwinat, T., Spittler, H. and Hildebrandt, T.B. (2001) Untersuchungen zur reproduktiven Fitness lebender weiblicher Feldhasen aus unterschiedlichen Habitaten. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, 47(2): 92-99.
- Goszczyński, J., Wasilewski, M. (1992) Predation of foxes on a hare population in central Poland. *Acta theriologica*, 37(4): 329-338.
- Grover, A., Sharma, P. C. (2016) Development and use of molecular markers: past and present. *Critical reviews in biotechnology*, 36(2): 290-302.
- Guillot, G., Mortier, F., Estoup, A. (2005) GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular ecology notes*, 5(3): 712-715.
- Guernier, V., Hochberg, M. E., Guégan, J. F. (2004) Ecology drives the worldwide distribution of human diseases. *PLoS biology*, 2(6): e141.
- Hackländer, K., Arnold, W., Ruf, T. (2002) Postnatal development and thermoregulation in the precocial European hare (*Lepus europaeus*). *Journal of Comparative Physiology B*, 172(2): 183-190.
- Hackländer, K., Schai-Braun, S. (2018) *Lepus europaeus* Pallas, 1778 European Hare. In: A.T. Smith, C.H. Johnston, P.C. Alves, and K. Hackländer (eds), *Lagomorphs: Pikas, Rabbits, and Hares of the World*, pp. 187-190. Baltimore (MD, USA): Johns Hopkins University Press.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: *Nucleic acids symposium series* (Vol. 41, No. 41, pp. 95-98). [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000.
- Hamill, R. M., Doyle, D., Duke, E. J. (2006) Spatial patterns of genetic diversity across European subspecies of the mountain hare, *Lepus timidus* L. *Heredity*, 97(5): 355-365.
- Harrisson, K. A., Pavlova, A., Telonis-Scott, M., Sunnucks, P. (2014) Using genomics to characterize evolutionary potential for conservation of wild populations. *Evolutionary Applications*, 7(9): 1008-1025.

- Harrison, K., Pavlova, A., Gan, H. M., Lee, Y. P., Austin, C. M., Sunnucks, P. (2016) Pleistocene divergence across a mountain range and the influence of selection on mitogenome evolution in threatened Australian freshwater cod species. *Heredity*, 116(6): 506.
- Hartl, G. B., Suchentrunk, F., Nadlinger, K., Willing, R. (1993) An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europaeus* based on morphology, allozymes, and mitochondrial DNA. *Acta Theriologica*, 38: 33-33.
- Hayman, D. T., Pulliam, J. R., Marshall, J. C., Cryan, P. M., Webb, C. T. (2016) Environment, host, and fungal traits predict continental-scale white-nose syndrome in bats. *Science advances*, 2(1): e1500831.
- Hoberg, E. P., Brooks, D. R. (2015) Evolution in action: climate change, biodiversity dynamics and emerging infectious disease. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1665): 20130553.
- Hoekstra, L. A., Siddiq, M. A., Montooth, K. L. (2013) Pleiotropic effects of a mitochondrial–nuclear incompatibility depend upon the accelerating effect of temperature in *Drosophila*. *Genetics*, 195(3): 1129-1139.
- Hoffmann, M., Hilton-Taylor, C., Angulo, A., Böhm, M., Brooks, T.M., Butchart, S.H., Carpenter, K.E., Chanson, J., Collen, B., Cox, N.A. and Darwall, W.R. (2010) The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. *Science*, 330 (6010): 1503–1509.
- Hedrick, P. (2003) The major histocompatibility complex (MHC) in declining populations: An example of adaptive variation. In W. V. Holt, A. R. Pickard, J. C. Rodger, D. E. Wildt (Eds.), *Reproduction science and integrated conservation* (pp. 97–113). Cambridge (UK): Cambridge University Press.
- Hewitt, G. M. (1999) Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological journal of the Linnean Society*, 68(1-2): 87-112.
- Jann, O. C., Werling, D., Chang, J. S., Haig, D., Glass, E. J. (2008) Molecular evolution of bovine Toll-like receptor 2 suggests substitutions of functional relevance. *BMC evolutionary biology*, 8(1): 288.

- Jay, F., Manel, S., Alvarez, N., Durand, E.Y., Thuiller, W., Holderegger, R., Taberlet, P. François, O. (2012) Forecasting changes in population genetic structure of alpine plants in response to global warming. *Molecular ecology*, 21(10): 2354-2368.
- Jombart, T. (2008) adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11): 1403-1405.
- Kasapidis, P., Suchentrunk, F., Magoulas, A., Kotoulas, G. (2005) The shaping of mitochondrial DNA phylogeographic patterns of the brown hare (*Lepus europaeus*) under the combined influence of Late Pleistocene climatic fluctuations and anthropogenic translocations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34(1): 55-66.
- Kawai, T., Akira, S. (2006) TLR signaling. *Cell death and differentiation*, 13(5): 816.
- Kimura, M. (1983) The neutral theory of molecular evolution. Cambridge (UK): Cambridge University Press.
- Kirk, H., Freeland, J. R. (2011) Applications and implications of neutral versus non-neutral markers in molecular ecology. *International journal of molecular sciences*, 12(6): 3966-3988.
- Klein, J. (1986) Natural history of the major histocompatibility complex. Hoboken (NJ, USA):Wiley.
- Klein J, Bontrop RE, Dawkins RL, Erlich HA, Gyllensten UB, Heise ER, Jones PP, Parham P, Wakeland EK, Watkins DI (1990) Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: a proposal. *Immunogenetics*, 31: 217–219.
- Klein, J., Sato, A., Nagl, S., O'hUigín, C. (1998) Molecular trans-species polymorphism. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 29(1): 1-21.
- Kosakovsky Pond, S. L., Frost, S. D. (2005) Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Molecular biology and evolution*, 22(5): 1208-1222.
- Koutsogiannouli, E. A., Moutou, K. A., Sarafidou, T., Stamatis, C., Spyrou, V., Mamuris, Z. (2009) Major histocompatibility complex variation at class II DQA locus in the brown hare (*Lepus europaeus*). *Molecular ecology*, 18(22): 4631-4649.

- Koutsogiannouli, E. A., Moutou, K. A., Stamatis, C., Mamuris, Z. (2012) Analysis of MC1R genetic variation in *Lepus* species in Mediterranean refugia. *Mammalian Biology*, 77(6): 428-433.
- Koutsogiannouli, E. A., Moutou, K. A., Stamatis, C., Walter, L., Mamuris, Z. (2014) Genetic variation in the major histocompatibility complex of the European brown hare (*Lepus europaeus*) across distinct phylogeographic areas. *Immunogenetics*, 66(6): 379-392.
- Kreitman, M. (2000) Methods to detect selection in populations with applications to the human. *Annual review of genomics and human genetics*, 1(1): 539-559.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6): 1547-1549.
- Lam, H. M., Ratmann, O., Boni, M. F. (2017) Improved algorithmic complexity for the 3SEQ recombination detection algorithm. *Molecular biology and evolution*, 35(1): 247-251.
- Lankau, R., Jørgensen, P. S., Harris, D. J., Sih, A. (2011) Incorporating evolutionary principles into environmental management and policy. *Evolutionary Applications*, 4(2): 315-325.
- Larson, W. A., Seeb, J. E., Dann, T. H., Schindler, D. E., Seeb, L. W. (2014) Signals of heterogeneous selection at an MHC locus in geographically proximate ecotypes of sockeye salmon. *Molecular Ecology*, 23(22): 5448-5461.
- Leigh, J. W., Bryant, D. (2015) Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110-1116.
- Lenz, T. L., Eizaguirre, C., Rotter, B., Kalbe, M., Milinski, M. (2013) Exploring local immunological adaptation of two stickleback ecotypes by experimental infection and transcriptome-wide digital gene expression analysis. *Molecular ecology*, 22(3): 774-786.
- Li, Z., Xia, L., Li, Y., Yang, Q., Liang, M. (2006) Mitochondrial DNA variation and population structure of the yarkand hare *Lepus yarkandensis*. *Acta theriologica*, 51(3): 243-253.
- Lowell, B. B., Spiegelman, B. M. (2000) Towards a molecular understanding of adaptive thermogenesis. *Nature*, 404(6778): 652.

- Lynch, M, Walsh, B. (2007) The origins of genome architecture. Sunderland: Sinauer Associates.
- Lynch, M. (2010) Evolution of the mutation rate. *TRENDS in Genetics*, 26(8): 345-352.
- Macdonald, D. W., Barrett, P. (2002) Mammals of Europe. Princeton (NJ): Princeton University Press.
- Mamuris, Z., Sfougaris, A. I., Stamatis, C. (2001) Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis: implications for conserving genetic diversity. *Biological Conservation*, 101(2): 187-196.
- Mamuris, Z., Moutou, K. A., Stamatis, C., Sarafidou, T., Suchentrunk, F. (2010) Y DNA and mitochondrial lineages in European and Asian populations of the brown hare (*Lepus europaeus*). *Mammalian Biology*, 75(3): 233-242.
- Martin, D., Rybicki, E. (2000) RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16(6): 562-563.
- Martin, D. P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B. (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus evolution*, 1(1).
- McClellan, D. A., Ellison, D. D. (2010). Assessing and improving the accuracy of detecting protein adaptation with the TreeSAAP analytical software. *International Journal of Bioinformatics Research and Applications*, 6(2): 120.
- Melo-Ferreira, J., Boursot, P., Suchentrunk, F., Ferrand, N., Alves, P. C. (2005) Invasion from the cold past: extensive introgression of mountain hare (*Lepus timidus*) mitochondrial DNA into three other hare species in northern Iberia. *Molecular ecology*, 14(8): 2459-2464.
- Melo-Ferreira, J., Alves, P. C., Freitas, H., Ferrand, N., Boursot, P. (2009) The genomic legacy from the extinct *Lepus timidus* to the three hare species of Iberia: contrast between mtDNA, sex chromosomes and autosomes. *Molecular ecology*, 18(12): 2643-2658.
- Melo-Ferreira, J., Vilela, J., Fonseca, M. M., da Fonseca, R. R., Boursot, P., Alves, P. C. (2014a) The elusive nature of adaptive mitochondrial DNA evolution of an arctic lineage prone to frequent introgression. *Genome biology and evolution*, 6(4): 886-896.

- Melo-Ferreira, J., Seixas, F. A., Cheng, E., Mills, L. S., Alves, P. C. (2014b) The hidden history of the snowshoe hare, *Lepus americanus*: extensive mitochondrial DNA introgression inferred from multilocus genetic variation. *Molecular Ecology*, 23(18): 4617-4630.
- Mengoni, C., Mucci, N., Randi, E. (2015) Genetic diversity and no evidences of recent hybridization in the endemic Italian hare (*Lepus corsicanus*). *Conservation genetics*, 16(2): 477-489.
- Mikami, T., Miyashita, H., Takatsuka, S., Kuroki, Y., Matsushima, N. (2012) Molecular evolution of vertebrate Toll-like receptors: evolutionary rate difference between their leucine-rich repeats and their TIR domains. *Gene*, 503(2): 235-243.
- Mimura, M., Yahara, T., Faith, D.P., Vázquez-Domínguez, E., Colautti, R.I., Araki, H., Javadi, F., Núñez-Farfán, J., Mori, A.S., Zhou, S., Hollingsworth, P.M. (2017) Understanding and monitoring the consequences of human impacts on intraspecific variation. *Evolutionary applications*, 10(2): 121-139.
- Mitchell-Jones, A.J., Amori, G., Bogdanowicz, W., Krystufek, B., Reijnders, P.J.H., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J.B.M., Vohralik, V. and Zima, J. (1999) Atlas of European Mammals. London (UK): Poyser Natural History.
- Morales, H. E., Pavlova, A., Joseph, L., Sunnucks, P. (2015) Positive and purifying selection in mitochondrial genomes of a bird with mitonuclear discordance. *Molecular Ecology*, 24(11): 2820-2837.
- Mukherjee, S., Karmakar, S., Babu, S. P. S. (2016) TLR2 and TLR4 mediated host immune responses in major infectious diseases: a review. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 20(2): 193-204.
- Nabholz, B., Glémin, S., Galtier, N. (2009) The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evolutionary Biology*, 9(1): 54.
- Nei, M., Gojobori, T. (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular biology and evolution*, 3(5): 418-426.
- Nei, M. (1987) Molecular evolutionary genetics. New York City (USA): Columbia university press.

- Nielsen, R., Yang, Z. (1998) Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics*, 148: 929–936.
- Nielsen, R. (2005) Molecular signatures of natural selection. *Annual Review of Genetics*, 39: 197-218.
- Neves, F., Águeda-Pinto, A., Pinheiro, A., Abrantes, J., Esteves, P. J. (2019) Strong selection of the TLR2 coding region among the Lagomorpha suggests an evolutionary history that differs from other mammals. *Immunogenetics*, 71(5-6): 437-443.
- Oleksyk, T. K., Smith, M. W., O'Brien, S. J. (2010) Genome-wide scans for footprints of natural selection. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1537): 185-205.
- Ottová, E., Šimková, A., Martin, J. F., de Bellocq, J. G., Gelnar, M., Allienne, J. F., Morand, S. (2005) Evolution and trans-species polymorphism of MHC class II β genes in cyprinid fish. *Fish & shellfish immunology*, 18(3): 199-222.
- Padidam, M., Sawyer, S., Fauquet, C. M. (1999) Possible emergence of new gemini viruses by frequent recombination. *Virology*, 265(2): 218-225.
- Panek, M. (2013) Long-term changes in the feeding pattern of red foxes *Vulpes vulpes* and their predation on brown hares *Lepus europaeus* in western Poland. *European journal of wildlife research*, 59(4): 581-586.
- Pierpaoli, M., Riga, F., Trocchi, V., Randi, E. (1999) Species distinction and evolutionary relationships of the Italian hare (*Lepus corsicanus*) as described by mitochondrial DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 8(11): 1805-1817.
- Piertney, S. B., Oliver, M. K. (2006) The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity*, 96(1): 7.
- Pietri, C., Alves, P. C., Melo-Ferreira, J. (2011). Hares in Corsica: high prevalence of *Lepus corsicanus* and hybridization with introduced *L. europaeus* and *L. granatensis*. *European Journal of Wildlife Research*, 57(2): 313-321.
- Posada, D., Crandall, K. A. (2001) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24): 13757-13762.

- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M. A. (2018) Posterior summarization in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5): 901-904.
- Ramos-Onsins, S. E., Rozas, J. (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular biology and evolution*, 19(12): 2092-2100.
- Räsänen, K., Hendry, A. P. (2008) Disentangling interactions between adaptive divergence and gene flow when ecology drives diversification. *Ecology letters*, 11(6): 624-636.
- Rattenborg, E. E. (1994) Diseases in the hare (*Lepus euroaeus*) population in Denmark—epidemiological description and analysis of post-mortem data. The Royal Veterinary & Agricultural University, Copenhagen, Denmark.
- Razgour, O., Taggart, J.B., Manel, S., Juste, J., Ibanez, C., Rebelo, H., Alberdi, A., Jones, G. and Park, K. (2018) An integrated framework to identify wildlife populations under threat from climate change. *Molecular ecology resources*, 18(1): 18-31.
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing.
- Reichlin, T., Klansek, E., Hackländer, K. (2006) Diet selection by hares (*Lepus europaeus*) in arable land and its implications for habitat management. *European journal of wildlife research*, 52(2): 109-118.
- Roach, J.C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M.K., Smith, K.D., Hood, L.E., Aderem, A. (2005) The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(27): 9577-9582.
- Robinson, T. J., Matthee, C. A. (2005) Phylogeny and evolutionary origins of the Leporidae: a review of cytogenetics, molecular analyses and a supermatrix analysis. *Mammal Review*, 35(3-4): 231-247.
- Rödel, H. G., Dekker, J. J. (2012) Influence of weather factors on population dynamics of two lagomorph species based on hunting bag records. *European journal of wildlife research*, 58(6): 923-932.
- Rohland, N., Reich, D. (2012) Cost-effective, high-throughput DNA sequencing libraries for multiplexed target capture. *Genome research*, 22(5): 939-946.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. and Huelsenbeck, J.P. (2012) MrBayes 3.2: efficient

- Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, 61(3): 539-542.
- Rousset, F. (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular ecology resources*, 8(1): 103-106.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., Sánchez-Gracia, A. (2017) DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12): 3299-3302.
- Salmier, A., de Thoisy, B., Crouau-Roy, B., Lacoste, V., Lavergne, A. (2016) Spatial pattern of genetic diversity and selection in the MHC class II DRB of three Neotropical bat species. *BMC evolutionary biology*, 16(1): 229.
- Sambrook, J.F., Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor (NY, USA): Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schai-Braun, S. C., Reichlin, T. S., Ruf, T., Klansek, E., Tataruch, F., Arnold, W., Hackländer, K. (2015) The European hare (*Lepus europaeus*): a picky herbivore searching for plant parts rich in fat. *PloS one*, 10(7): e0134278.
- Schai-Braun, S.C. and Hackländer, K. (2016) Family Leporidae (hares and rabbits). In: D.E. Wilson, T.E. Lacher Jr. and R.A. Mittermeier (eds), *Handbook of the Mammals of the World, Volume 6, Lagomorphs and Rodents I*, (pp. 62-148). Barcelona: Lynx Edicions.
- Scott, G. R., Schulte, P. M., Egginton, S., Scott, A. L., Richards, J. G., Milsom, W. K. (2011) Molecular evolution of cytochrome c oxidase underlies high-altitude adaptation in the bar-headed goose. *Molecular biology and evolution*, 28(1): 351-363.
- Seddon, J. M., Ellegren, H. (2002) MHC class II genes in European wolves: a comparison with dogs. *Immunogenetics*, 54(7): 490-500.
- Sert, H., Slimen, H. B., Erdoğan, A., Suchentrunk, F. (2009) Mitochondrial HVI sequence variation in Anatolian hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778). *Mammalian Biology*, 74(4): 286-297.
- Silva, G., Lima, F. P., Martel, P., Castilho, R. (2014) Thermal adaptation and clinal mitochondrial DNA variation of European anchovy. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1792): 20141093.

- Smith, J. M. (1992) Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of molecular evolution*, 34(2): 126-129.
- Smith, R. K., Vaughan Jennings, N., Harris, S. (2005) A quantitative analysis of the abundance and demography of European hares *Lepus europaeus* in relation to habitat type, intensity of agriculture and climate. *Mammal review*, 35(1): 1-24.
- Smith, S., Mang, T., De Bellocq, J. G., Schaschl, H., Zeitlhofer, C., Hacklaender, K., Suchentrunk, F. (2010a) Homozygosity at a class II MHC locus depresses female reproductive ability in European brown hares. *Molecular ecology*, 19(19): 4131-4143.
- Smith, S., Turbill, C., Suchentrunk, F. (2010b) Introducing mother's curse: low male fertility associated with an imported mtDNA haplotype in a captive colony of brown hares. *Molecular Ecology*, 19(1): 36-43.
- Smith, S., De Bellocq, J. G., Suchentrunk, F., Schaschl, H. (2011) Evolutionary genetics of MHC class II beta genes in the brown hare, *Lepus europaeus*. *Immunogenetics*, 63(11): 743-751.
- Smith, S. A., Haig, D., Emes, R. D. (2014) Novel ovine polymorphisms and adaptive evolution in mammalian TLR2 suggest existence of multiple pathogen binding regions. *Gene*, 540(2): 217-225.
- Sommer, S. (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Frontiers in zoology*, 2(1): 16.
- Sommer, S., Courtiol, A., Mazzoni, C. J. (2013) MHC genotyping of non-model organisms using next-generation sequencing: a new methodology to deal with artefacts and allelic dropout. *BMC genomics*, 14(1): 542.
- Spurgin, L. G., Richardson, D. S. (2010) How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1684): 979-988.
- Stamatis, C., Suchentrunk, F., Moutou, K.A., Giacometti, M., Haerer, G., Djan, M., Vapa, L., Vukovic, M., Tvrtković, N., Sert, H. and Alves, P.C. (2009) Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia?. *Journal of Biogeography*, 36(3): 515-528.

- Stephens, M., Smith, N. J., Donnelly, P. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *The American Journal of Human Genetics*, 68(4): 978-989.
- Stewart, J. B., Freyer, C., Elson, J. L., Wredenberg, A., Cansu, Z., Trifunovic, A., Larsson, N. G. (2008) Strong purifying selection in transmission of mammalian mitochondrial DNA. *PLoS biology*, 6(1): e10.
- Stockwell, C. A., Hendry, A. P., Kinnison, M. T. (2003) Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(2): 94-101.
- Strzała, T., Stamatis, C., Kosowska, B., Moska, M., Marszałek-Kruk, B., Mamuris, Z. (2008) Genetic variability of the Polish brown hare (*Lepus europaeus*) based on PCR-RFLP mtDNA analysis (preliminary results). *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. Series Veterinary Medicine*, 11(1).
- Suchentrunk, F., Slimen, H. B., Sert, H. (2008) Phylogenetic aspects of nuclear and mitochondrial gene-pool characteristics of south and North African cape hares (*Lepus capensis*) and European hares (*Lepus europaeus*). In: *Lagomorph Biology* (pp. 65-85). Berlin, Heidelberg: Springer.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A. G., Cosson, J. F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular ecology*, 7(4): 453-464.
- Tajima, F. (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3): 585-595.
- Takeda, K., Akira, S. (2004) TLR signaling pathways. In *Seminars in immunology* (Vol. 16, No. 1, pp. 3-9). Cambridge (MA, USA): Academic Press.
- Talarico, L., Babik, W., Marta, S., Pietrocini, V., Mattoccia, M. (2019) MHC structuring and divergent allele advantage in a urodele amphibian: a hierarchical multi-scale approach. *Heredity*, 123(5): 593-607.
- Těšický, M., Vinkler, M. (2015) Trans-species polymorphism in immune genes: general pattern or MHC-restricted phenomenon?. *Journal of immunology research*, 2015.
- Thulin, C. G., Jaarola, M., Tegelström, H. (1997) The occurrence of mountain hare mitochondrial DNA in wild brown hares. *Molecular Ecology*, 6(5): 463-467.

- Thulin, C. G., Fang, M., Averianov, A. O. (2006) Introgression from *Lepus europaeus* to *L. timidus* in Russia revealed by mitochondrial single nucleotide polymorphisms and nuclear microsatellites. *Hereditas*, 143: 68-76.
- Tieleman, B. I., Williams, J. B., Bloomer, P. (2003) Adaptation of metabolism and evaporative water loss along an aridity gradient. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1511): 207-214.
- Trowsdale, J., Parham, P. (2004) Mini-review: defense strategies and immunity-related genes. *European journal of immunology*, 34(1): 7-17.
- Ujvari, B., Belov, K. (2011) Major histocompatibility complex (MHC) markers in conservation biology. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(8): 5168-5186.
- Van Wieren, S. E., Wiersma, M., Prins, H. H. (2006) Climatic factors affecting a brown hare (*Lepus europaeus*) population. *Lutra*, 49(2): 103-110.
- Vapa, L. J., Djan, M., Obreht, D., Hammer, S., Suchentrunk, F. (2007) Allozyme variability of brown hares (*Lepus europaeus*) from the Vojvodina (Serbia), compared to central and south eastern European populations. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 53(1): 75-87.
- Vitti, J. J., Grossman, S. R., Sabeti, P. C. (2013) Detecting natural selection in genomic data. *Annual review of genetics*, 47: 97-120.
- West, A. P., Shadel, G. S., Ghosh, S. (2011) Mitochondria in innate immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 11(6): 389-402.
- Wibbelt, G., Frölich, K. (2005) Infectious diseases in European brown hare (*Lepus europaeus*). *Wildlife Biology in Practice*, 86-93.
- Wiederstein, M., Sippl, M. J. (2007) ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic acids research*, 35(suppl_2), W407-W410.
- Williams, J. B., Tieleman, B. I. (2005) Physiological adaptation in desert birds. *Bioscience*, 55(5): 416-425.
- Wilson, D. J., McVean, G. (2006). Estimating diversifying selection and functional constraint in the presence of recombination. *Genetics*, 172(3): 1411-1425.

- Woolley, S., Johnson, J., Smith, M. J., Crandall, K. A., McClellan, D. A. (2003). TreeSAAP: selection on amino acid properties using phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 19(5): 671-672
- Yang, Z., Nielsen, R., Goldman, N., & Pedersen, A. M. K. (2000a) Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics*, 155(1): 431-449.
- Yang, Z. (2000b) Phylogenetic analysis by maximum likelihood (PAML).
- Yang, Z., Swanson, W. J. (2002) Codon-substitution models to detect adaptive evolution that account for heterogeneous selective pressures among site classes. *Molecular Biology and Evolution*, 19: 49–57.
- Yang, Z., Wong, W. S., Nielsen, R. (2005) Bayes empirical Bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Molecular biology and evolution*, 22(4): 1107-1118.
- Yang, Z. (2007). PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular biology and evolution*, 24(8), 1586-1591.
- Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nature methods*, 12(1): 7.
- Yu, L., Wang, X., Ting, N., Zhang, Y. (2011) Mitogenomic analysis of Chinese snub-nosed monkeys: Evidence of positive selection in NADH dehydrogenase genes in high-altitude adaptation. *Mitochondrion*, 11(3): 497-503.

PRILOG I Lista uzoraka sa državama uzorkovanja i oznakama otkrivenih haplotipova za D petlju mitohondrijske DNK (DL), gen za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze (MT-ND2) i gen za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze (MT-ND6).

APPENDIX I List of samples with country assignment and mitochondrial DNA haplotype designations for D-loop (DL), NADH dehydrogenase subunit 2 (MT-ND2) and NADH dehydrogenase subunit 6 (MT-ND6)

Oznaka uzorka <i>Specimen ID</i>	Zemlja uzorkovanja <i>Country</i>	DL haplotip <i>DL haplotype</i>	MT-ND2 haplotip <i>MT-ND2 haplotype</i>	MT-ND6 haplotip <i>MT-ND6 haplotype</i>
LE1	Austrija / Austria	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE2	Austrija / Austria	LeDL*26	LeND2*4	LeND6*18
LE3	Austrija / Austria	LeDL*26	LeND2*4	LeND6*18
LE4	Austrija / Austria	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE5	Austrija / Austria	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE6	Austrija / Austria	LeDL*26	LeND2*4	LeND6*18
LE7	Austrija / Austria	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE8	Austrija / Austria	LeDL*27	LeND2*1	LeND6*18
LE9	Austrija / Austria	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE10	Austrija / Austria	LeDL*26	LeND2*4	LeND6*18
LE11	Austrija / Austria	LeDL*26	LeND2*4	LeND6*18
LE12	Austrija / Austria	LeDL*26	LeND2*4	LeND6*18
LE13	Austrija / Austria	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE14	Belgija / Belgium	LeDL*49	LeND2*1	LeND6*19
LE15	Belgija / Belgium	LeDL*50	LeND2*1	LeND6*19
LE16	Belgija / Belgium	LeDL*50	LeND2*1	LeND6*19
LE17	Belgija / Belgium	LeDL*50	LeND2*1	LeND6*19
LE18	Belgija / Belgium	LeDL*50	LeND2*1	LeND6*19
LE19	Belgija / Belgium	LeDL*50	LeND2*1	LeND6*19
LE20	Belgija / Belgium	LeDL*50	LeND2*1	LeND6*19
LE21	Belgija / Belgium	LeDL*28	LeND2*1	LeND6*18
LE22	Belgija / Belgium	LeDL*28	LeND2*1	LeND6*18
LE23	Belgija / Belgium	LeDL*13	LeND2*1	LeND6*18
LE24	Belgija / Belgium	LeDL*29	LeND2*1	LeND6*19
LE25	Belgija / Belgium	LeDL*51	LeND2*1	LeND6*19
LE26	Belgija / Belgium	LeDL*29	LeND2*1	LeND6*19
LE27	Belgija / Belgium	LeDL*30	LeND2*1	LeND6*18
LE28	Bugarska / Bulgaria	LeDL*71	LeND2*10	LeND6*20
LE29	Bugarska / Bulgaria	LeDL*77	LeND2*11	LeND6*1
LE30	Bugarska / Bulgaria	LeDL*104	LeND2*18	LeND6*52
LE31	Bugarska / Bulgaria	LeDL*89	LeND2*26	LeND6*32
LE32	Bugarska / Bulgaria	LeDL*90	LeND2*90	LeND6*32
LE33	Bugarska / Bulgaria	LeDL*92	LeND2*92	LeND6*33
LE34	Bugarska / Bulgaria	LeDL*92	LeND2*92	LeND6*32
LE35	Bugarska / Bulgaria	LeDL*105	LeND2*105	LeND6*52
LE36	Bugarska / Bulgaria	LeDL*91	LeND2*91	LeND6*32
LE37	Bugarska / Bulgaria	LeDL*91	LeND2*91	LeND6*32
LE38	Bugarska / Bulgaria	LeDL*77	LeND2*77	LeND6*1
LE39	Bugarska / Bulgaria	LeDL*70	LeND2*70	LeND6*16
LE40	Bugarska / Bulgaria	LeDL*78	LeND2*78	LeND6*1
LE41	Bugarska / Bulgaria	LeDL*77	LeND2*77	LeND6*1
LE42	Bugarska / Bulgaria	LeDL*77	LeND2*77	LeND6*1
LE43	Bugarska / Bulgaria	LeDL*79	LeND2*79	LeND6*1
LE44	Bugarska / Bulgaria	LeDL*72	LeND2*72	LeND6*2
LE45	Bugarska / Bulgaria	LeDL*31	LeND2*31	LeND6*18
LE46	Češka / Czech Republic	LeDL*19	LeND2*1	LeND6*21

Prilog I (nastavak) / Appendix I (table continued)

LE47	Češka / Czech Republic	LeDL*20	LeND2*1	LeND6*21
LE48	Češka / Czech Republic	LeDL*20	LeND2*1	LeND6*21
LE49	Češka / Czech Republic	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE50	Češka / Czech Republic	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE51	Francuska / France	LeDL*30	LeND2*1	LeND6*18
LE52	Francuska / France	LeDL*30	LeND2*1	LeND6*18
LE53	Francuska / France	LeDL*21	LeND2*1	LeND6*18
LE54	Francuska / France	LeDL*28	LeND2*1	LeND6*22
LE55	Francuska / France	LeDL*28	LeND2*1	LeND6*22
LE56	Francuska / France	LeDL*28	LeND2*1	LeND6*22
LE57	Francuska / France	LeDL*21	LeND2*1	LeND6*18
LE58	Francuska / France	LeDL*30	LeND2*1	LeND6*22
LE59	Francuska / France	LeDL*28	LeND2*1	LeND6*22
LE60	Francuska / France	LeDL*21	LeND2*1	LeND6*18
LE61	Francuska / France	LeDL*21	LeND2*1	LeND6*18
LE62	Severna Makedonija / North Macedonia	LeDL*73	LeND2*10	LeND6*3
LE63	Severna Makedonija / North Macedonia	LeDL*74	LeND2*10	LeND6*3
LE64	Nemačka / Germany	LeDL*9	LeND2*1	LeND6*18
LE65	Nemačka / Germany	LeDL*11	LeND2*1	LeND6*18
LE66	Nemačka / Germany	LeDL*11	LeND2*1	LeND6*18
LE67	Nemačka / Germany	LeDL*32	LeND2*1	LeND6*18
LE68	Nemačka / Germany	LeDL*32	LeND2*1	LeND6*18
LE69	Nemačka / Germany	LeDL*32	LeND2*1	LeND6*18
LE70	Nemačka / Germany	LeDL*32	LeND2*1	LeND6*18
LE71	Nemačka / Germany	LeDL*32	LeND2*1	LeND6*18
LE72	Nemačka / Germany	LeDL*32	LeND2*1	LeND6*18
LE73	Nemačka / Germany	LeDL*9	LeND2*1	LeND6*18
LE74	Nemačka / Germany	LeDL*12	LeND2*1	LeND6*18
LE75	Nemačka / Germany	LeDL*10	LeND2*1	LeND6*18
LE76	Nemačka / Germany	LeDL*32	LeND2*1	LeND6*18
LE77	Nemačka / Germany	LeDL*12	LeND2*1	LeND6*18
LE78	Nemačka / Germany	LeDL*11	LeND2*1	LeND6*18
LE79	Nemačka / Germany	LeDL*12	LeND2*1	LeND6*18
LE80	Nemačka / Germany	LeDL*10	LeND2*1	LeND6*18
LE81	Nemačka / Germany	LeDL*30	LeND2*2	LeND6*18
LE82	Nemačka / Germany	LeDL*33	LeND2*3	LeND6*18
LE83	Nemačka / Germany	LeDL*22	LeND2*1	LeND6*18
LE84	Nemačka / Germany	LeDL*22	LeND2*1	LeND6*18
LE85	Nemačka / Germany	LeDL*34	LeND2*1	LeND6*18
LE86	Nemačka / Germany	LeDL*35	LeND2*1	LeND6*18
LE87	Nemačka / Germany	LeDL*30	LeND2*2	LeND6*18
LE88	Nemačka / Germany	LeDL*30	LeND2*1	LeND6*18
LE89	Nemačka / Germany	LeDL*30	LeND2*2	LeND6*18
LE90	Grčka / Greece	LeDL*52	LeND2*8	LeND6*7
LE91	Grčka / Greece	LeDL*64	LeND2*10	LeND6*8
LE92	Grčka / Greece	LeDL*52	LeND2*8	LeND6*7
LE93	Grčka / Greece	LeDL*64	LeND2*10	LeND6*8
LE94	Grčka / Greece	LeDL*64	LeND2*10	LeND6*8
LE95	Grčka / Greece	LeDL*56	LeND2*10	LeND6*7
LE96	Grčka / Greece	LeDL*52	LeND2*8	LeND6*7
LE97	Grčka / Greece	LeDL*75	LeND2*12	LeND6*23
LE98	Grčka / Greece	LeDL*53	LeND2*9	LeND6*7
LE99	Grčka / Greece	LeDL*53	LeND2*9	LeND6*7
LE100	Grčka / Greece	LeDL*53	LeND2*9	LeND6*7
LE101	Grčka / Greece	LeDL*53	LeND2*9	LeND6*7
LE102	Grčka / Greece	LeDL*53	LeND2*9	LeND6*7
LE103	Mađarska/Hungary	LeDL*23	LeND2*4	LeND6*24

Prilog I (nastavak) / Appendix I (table continued)

LE104	Mađarska / Hungary	LeDL*23	LeND2*4	LeND6*24
LE105	Mađarska / Hungary	LeDL*68	LeND2*4	LeND6*17
LE106	Mađarska / Hungary	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*17
LE107	Mađarska / Hungary	LeDL*23	LeND2*4	LeND6*24
LE108	Mađarska / Hungary	LeDL*23	LeND2*4	LeND6*24
LE109	Mađarska / Hungary	LeDL*68	LeND2*4	LeND6*24
LE110	Mađarska / Hungary	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE111	Mađarska / Hungary	LeDL*28	LeND2*4	LeND6*13
LE112	Mađarska / Hungary	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*24
LE113	Mađarska / Hungary	LeDL*23	LeND2*4	LeND6*24
LE114	Izrael / Israel	LeDL*96	LeND2*27	LeND6*39
LE115	Izrael / Israel	LeDL*96	LeND2*27	LeND6*39
LE116	Izrael / Israel	LeDL*96	LeND2*27	LeND6*39
LE117	Izrael / Israel	LeDL*114	LeND2*21	LeND6*51
LE118	Izrael / Israel	LeDL*96	LeND2*27	LeND6*39
LE119	Izrael / Israel	LeDL*114	LeND2*21	LeND6*51
LE120	Izrael / Israel	LeDL*114	LeND2*21	LeND6*51
LE121	Holandija / Netherlands	LeDL*14	LeND2*1	LeND6*18
LE122	Holandija / Netherlands	LeDL*36	LeND2*1	LeND6*25
LE123	Holandija / Netherlands	LeDL*14	LeND2*1	LeND6*18
LE124	Holandija / Netherlands	LeDL*36	LeND2*1	LeND6*25
LE125	Holandija / Netherlands	LeDL*14	LeND2*1	LeND6*18
LE126	Holandija / Netherlands	LeDL*14	LeND2*4	LeND6*18
LE127	Rumunija / Romania	LeDL*106	LeND2*19	LeND6*53
LE128	Rumunija / Romania	LeDL*107	LeND2*5	LeND6*18
LE129	Rumunija / Romania	LeDL*108	LeND2*18	LeND6*54
LE130	Rumunija / Romania	LeDL*108	LeND2*20	LeND6*55
LE131	Rumunija / Romania	LeDL*62	LeND2*13	LeND6*9
LE132	Rumunija / Romania	LeDL*108	LeND2*18	LeND6*54
LE133	Rumunija / Romania	LeDL*37	LeND2*4	LeND6*15
LE134	Rumunija / Romania	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE135	Rumunija / Romania	LeDL*24	LeND2*4	LeND6*24
LE136	Rumunija / Romania	LeDL*37	LeND2*4	LeND6*15
LE137	Rumunija / Romania	LeDL*38	LeND2*4	LeND6*18
LE138	Srbija / Serbia	LeDL*39	LeND2*4	LeND6*13
LE139	Srbija / Serbia	LeDL*40	LeND2*4	LeND6*18
LE140	Srbija / Serbia	LeDL*54	LeND2*14	LeND6*10
LE141	Srbija / Serbia	LeDL*54	LeND2*14	LeND6*11
LE142	Srbija / Serbia	LeDL*83	LeND2*10	LeND6*2
LE143	Srbija / Serbia	LeDL*57	LeND2*10	LeND6*7
LE144	Srbija / Serbia	LeDL*1	LeND2*5	LeND6*18
LE145	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE146	Srbija / Serbia	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE147	Srbija / Serbia	LeDL*25	LeND2*5	LeND6*18
LE148	Srbija / Serbia	LeDL*23	LeND2*4	LeND6*24
LE149	Srbija / Serbia	LeDL*109	LeND2*18	LeND6*54
LE150	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE151	Srbija / Serbia	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE152	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE153	Srbija / Serbia	LeDL*41	LeND2*4	LeND6*18
LE154	Srbija / Serbia	LeDL*7	LeND2*5	LeND6*18
LE155	Srbija / Serbia	LeDL*4	LeND2*4	LeND6*18
LE156	Srbija / Serbia	LeDL*5	LeND2*5	LeND6*18
LE157	Srbija / Serbia	LeDL*42	LeND2*4	LeND6*18
LE158	Srbija / Serbia	LeDL*43	LeND2*4	LeND6*18
LE159	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE160	Srbija / Serbia	LeDL*58	LeND2*10	LeND6*7
LE161	Srbija / Serbia	LeDL*59	LeND2*10	LeND6*7

Prilog I (nastavak) / Appendix I (table continued)

LE162	Srbija / Serbia	LeDL*16	LeND2*6	LeND6*18
LE163	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE164	Srbija / Serbia	LeDL*30	LeND2*4	LeND6*13
LE165	Srbija / Serbia	LeDL*17	LeND2*6	LeND6*18
LE166	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE167	Srbija / Serbia	LeDL*17	LeND2*6	LeND6*18
LE168	Srbija / Serbia	LeDL*67	LeND2*15	LeND6*26
LE169	Srbija / Serbia	LeDL*65	LeND2*15	LeND6*26
LE170	Srbija / Serbia	LeDL*66	LeND2*15	LeND6*26
LE171	Srbija / Serbia	LeDL*76	LeND2*16	LeND6*4
LE172	Srbija / Serbia	LeDL*83	LeND2*10	LeND6*5
LE173	Srbija / Serbia	LeDL*80	LeND2*11	LeND6*2
LE174	Srbija / Serbia	LeDL*59	LeND2*10	LeND6*7
LE175	Srbija / Serbia	LeDL*58	LeND2*10	LeND6*12
LE176	Srbija / Serbia	LeDL*80	LeND2*11	LeND6*2
LE177	Srbija / Serbia	LeDL*79	LeND2*11	LeND6*2
LE178	Srbija / Serbia	LeDL*40	LeND2*4	LeND6*18
LE179	Srbija / Serbia	LeDL*60	LeND2*10	LeND6*7
LE180	Srbija / Serbia	LeDL*15	LeND2*4	LeND6*18
LE181	Srbija / Serbia	LeDL*79	LeND2*11	LeND6*2
LE182	Srbija / Serbia	LeDL*31	LeND2*4	LeND6*18
LE183	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE184	Srbija / Serbia	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE185	Srbija / Serbia	LeDL*28	LeND2*4	LeND6*13
LE186	Srbija / Serbia	LeDL*24	LeND2*4	LeND6*24
LE187	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE188	Srbija / Serbia	LeDL*17	LeND2*6	LeND6*18
LE189	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE190	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE191	Srbija / Serbia	LeDL*28	LeND2*4	LeND6*14
LE192	Srbija / Serbia	LeDL*24	LeND2*6	LeND6*18
LE193	Srbija / Serbia	LeDL*44	LeND2*4	LeND6*13
LE194	Srbija / Serbia	LeDL*45	LeND2*4	LeND6*18
LE195	Srbija / Serbia	LeDL*79	LeND2*11	LeND6*2
LE196	Srbija / Serbia	LeDL*63	LeND2*13	LeND6*9
LE197	Srbija / Serbia	LeDL*82	LeND2*10	LeND6*11
LE198	Srbija / Serbia	LeDL*55	LeND2*10	LeND6*11
LE199	Srbija / Serbia	LeDL*18	LeND2*6	LeND6*18
LE200	Srbija / Serbia	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE201	Srbija / Serbia	LeDL*76	LeND2*16	LeND6*4
LE202	Srbija / Serbia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE203	Srbija / Serbia	LeDL*69	LeND2*4	LeND6*17
LE204	Srbija / Serbia	LeDL*8	LeND2*5	LeND6*18
LE205	Srbija / Serbia	LeDL*46	LeND2*4	LeND6*18
LE206	Srbija / Serbia	LeDL*68	LeND2*4	LeND6*24
LE207	Srbija / Serbia	LeDL*23	LeND2*4	LeND6*24
LE208	Srbija / Serbia	LeDL*47	LeND2*4	LeND6*18
LE209	Srbija / Serbia	LeDL*61	LeND2*10	LeND6*18
LE210	Srbija / Serbia	LeDL*45	LeND2*4	LeND6*18
LE211	Srbija / Serbia	LeDL*27	LeND2*1	LeND6*27
LE212	Srbija / Serbia	LeDL*7	LeND2*5	LeND6*28
LE213	Srbija / Serbia	LeDL*30	LeND2*4	LeND6*13
LE214	Srbija / Serbia	LeDL*81	LeND2*11	LeND6*6
LE215	Srbija / Serbia	LeDL*2	LeND2*5	LeND6*18
LE216	Srbija / Serbia	LeDL*8	LeND2*5	LeND6*18
LE217	Srbija / Serbia	LeDL*44	LeND2*4	LeND6*13
LE218	Srbija / Serbia	LeDL*7	LeND2*5	LeND6*18
LE219	Srbija / Serbia	LeDL*5	LeND2*5	LeND6*18
LE220	Slovačka / Slovakia	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18

Prilog I (nastavak) / Appendix I (table continued)

LE221	Slovačka / Slovakia	LeDL*48	LeND2*4	LeND6*29
LE222	Slovačka / Slovakia	LeDL*31	LeND2*7	LeND6*30
LE223	Slovačka / Slovakia	LeDL*31	LeND2*7	LeND6*30
LE224	Slovačka / Slovakia	LeDL*30	LeND2*1	LeND6*18
LE225	Slovačka / Slovakia	LeDL*25	LeND2*4	LeND6*18
LE226	Slovačka / Slovakia	LeDL*3	LeND2*5	LeND6*18
LE227	Slovačka / Slovakia	LeDL*7	LeND2*5	LeND6*18
LE228	Slovačka / Slovakia	LeDL*45	LeND2*4	LeND6*18
LE229	Slovačka / Slovakia	LeDL*6	LeND2*5	LeND6*18
LE230	Slovačka / Slovakia	LeDL*41	LeND2*4	LeND6*31
LE231	Turska / Turkey	LeDL*100	LeND2*27	LeND6*40
LE232	Turska / Turkey	LeDL*93	LeND2*27	LeND6*40
LE233	Turska / Turkey	LeDL*101	LeND2*22	LeND6*41
LE234	Turska / Turkey	LeDL*87	LeND2*29	LeND6*41
LE235	Turska / Turkey	LeDL*112	LeND2*21	LeND6*42
LE236	Turska / Turkey	LeDL*113	LeND2*21	LeND6*50
LE237	Turska / Turkey	LeDL*113	LeND2*21	LeND6*50
LE238	Turska / Turkey	LeDL*113	LeND2*21	LeND6*50
LE239	Turska / Turkey	LeDL*94	LeND2*28	LeND6*35
LE240	Turska / Turkey	LeDL*102	LeND2*23	LeND6*43
LE241	Turska / Turkey	LeDL*86	LeND2*30	LeND6*44
LE242	Turska / Turkey	LeDL*103	LeND2*26	LeND6*34
LE243	Turska / Turkey	LeDL*97	LeND2*25	LeND6*45
LE244	Turska / Turkey	LeDL*98	LeND2*24	LeND6*37
LE245	Turska / Turkey	LeDL*84	LeND2*30	LeND6*46
LE246	Turska / Turkey	LeDL*88	LeND2*30	LeND6*44
LE247	Turska / Turkey	LeDL*110	LeND2*21	LeND6*48
LE248	Turska / Turkey	LeDL*99	LeND2*25	LeND6*38
LE249	Turska / Turkey	LeDL*85	LeND2*30	LeND6*47
LE250	Turska / Turkey	LeDL*111	LeND2*27	LeND6*49
LE251	Turska / Turkey	LeDL*95	LeND2*27	LeND6*36

PRILOG II Lista verovatnoća za odgovarajuće parove haplotipova/alela nakon određivanja gametske faze primenom PHASE algoritma za sva tri ispitivana jedarna markera (MHC-DQA, MHC-DQB i TLR2 gen)

APPENDIX II Confidence probabilities for most likely haplotype/allele pairs after gametic phase imputation with the PHASE algorithm for the examined nuclear molecular markers (MHC-DQA, MHC-DQB and TLR 2 gene)

Oznaka uzorka <i>Specimen ID</i>	DQA	DQB	TLR2
LE1	1	1	1
LE2	1	0,999679	1
LE3	1	0,999137	1
LE4	1	1	1
LE5	1	1	1
LE6	1	0,999137	1
LE7	1	1	1
LE8	1	1	1
LE9	1	0,999921	1
LE10	1	0,999921	1
LE11	1	0,999679	1
LE12	0,999983	0,999137	1
LE13	1	0,999679	1
LE14	1	1	1
LE15	1	1	1
LE16	1	1	1
LE17	1	1	1
LE18	1	1	1
LE19	1	0,999678	1
LE20	1	1	1
LE21	1	1	1
LE22	1	1	0,765539
LE23	1	0,999869	1
LE24	1	1	0,762898
LE25	1	1	1
LE26	1	1	1
LE27	1	1	1
LE28	1	1	1
LE29	1	1	1
LE30	1	1	1
LE31	0,999472	1	1
LE32	1	1	1
LE33	1	1	1
LE34	1	1	1
LE35	0,999472	1	1
LE36	1	1	1
LE37	1	1	1
LE38	1	1	1
LE39	1	0,99098	1
LE40	1	1	1
LE41	1	0,675973	1
LE42	1	1	1
LE43	1	1	1
LE44	1	1	1
LE45	1	0,99842	1
LE46	1	1	1
LE47	0,999472	0,64567	1
LE48	1	0,666292	1

Prilog II (nastavak) / Appendix II (table continued)

LE49	1	-	1
LE50	1	-	1
LE51	1	1	1
LE52	1	1	1
LE53	1	1	1
LE54	1	1	1
LE55	1	1	1
LE56	0,999988	1	1
LE57	0,9997	1	1
LE58	1	1	1
LE59	1	1	1
LE60	0,9997	1	1
LE61	1	1	1
LE62	1	1	1
LE63	1	1	1
LE64	1	0,999823	1
LE65	1	1	1
LE66	0,9997	1	1
LE67	1	1	1
LE68	1	1	0,993296
LE69	1	0,9999962	1
LE70	1	0,9999962	0,993375
LE71	1	1	1
LE72	1	1	1
LE73	1	1	1
LE74	1	1	1
LE75	1	1	1
LE76	1	1	1
LE77	1	1	1
LE78	0,999272	1	1
LE79	1	1	1
LE80	1	0,999963	1
LE81	1	1	1
LE82	1	0,999963	1
LE83	1	1	1
LE84	1	1	1
LE85	1	1	1
LE86	1	1	1
LE87	1	1	1
LE88	0,9997	1	1
LE89	1	1	1
LE90	1	-	1
LE91	1	-	1
LE92	1	1	1
LE93	1	-	1
LE94	0,999202	-	1
LE95	1	-	1
LE96	0,999971	1	1
LE97	0,999998	1	1
LE98	1	1	1
LE99	0,999999	1	1
LE100	0,943729	1	1
LE101	1	1	1
LE102	1	1	1
LE103	1	1	1
LE104	1	1	1
LE105	0,999472	1	1
LE106	1	1	1
LE107	1	1	1

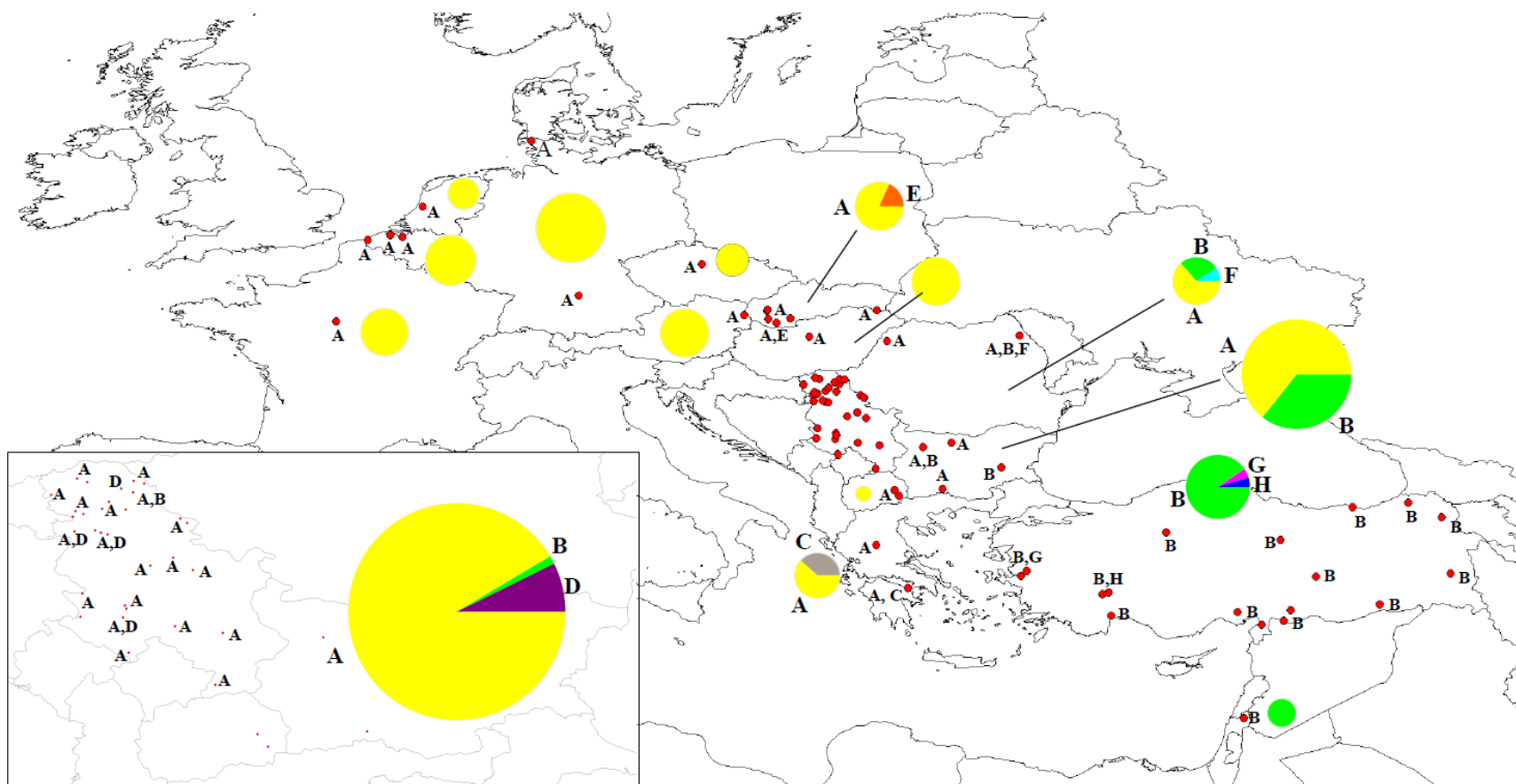
Prilog II (nastavak) / Appendix II (table continued)			
LE108	0,9997	0,999829	1
LE109	1	1	1
LE110	1	1	1
LE111	1	1	1
LE112	1	1	1
LE113	0,999472	0,999829	1
LE114	1	1	1
LE115	1	1	0,960619
LE116	1	1	0,960561
LE117	1	1	1
LE118	1	1	0,902756
LE119	1	1	1
LE120	0,99999	1	1
LE121	1	1	1
LE122	1	1	1
LE123	1	0,999679	1
LE124	1	0,999962	1
LE125	1	1	1
LE126	1	1	1
LE127	1	1	1
LE128	1	1	1
LE129	1	1	1
LE130	1	1	1
LE131	1	1	1
LE132	1	0,999962	1
LE133	0,999983	1	1
LE134	1	1	1
LE135	1	0,999962	1
LE136	1	1	1
LE137	1	1	1
LE138	0,999472	1	1
LE139	1	1	1
LE140	0,698528	1	1
LE141	1	1	1
LE142	0,9997	0,999823	1
LE143	1	1	1
LE144	1	0,999825	1
LE145	1	1	1
LE146	1	1	1
LE147	1	1	1
LE148	1	1	1
LE149	0,999472	1	1
LE150	1	1	1
LE151	1	0,985632	1
LE152	0,999472	1	1
LE153	1	1	1
LE154	1	1	1
LE155	1	1	1
LE156	1	0,999898	1
LE157	0,999996	1	1
LE158	1	1	1
LE159	0,999989	0,999996	1
LE160	1	1	1
LE161	0,999902	0,999898	1
LE162	1	1	1
LE163	1	1	1
LE164	1	0,999898	1
LE165	1	1	1
LE166	1	1	1

Prilog II (nastavak) / Appendix II (table continued)			
LE167	1	1	1
LE168	0,999472	1	1
LE169	1	0,991943	1
LE170	1	0,999826	1
LE171	0,986656	1	1
LE172	1	1	1
LE173	1	1	1
LE174	1	1	1
LE175	1	1	1
LE176	0,999998	1	1
LE177	1	1	1
LE178	0,999497	1	1
LE179	1	1	1
LE180	1	1	1
LE181	0,999472	1	1
LE182	0,999472	0,999137	1
LE183	1	1	1
LE184	0,999472	1	1
LE185	1	1	1
LE186	1	1	1
LE187	0,999999	1	1
LE188	0,999472	1	1
LE189	1	1	1
LE190	1	1	1
LE191	1	1	1
LE192	1	0,991943	1
LE193	1	1	1
LE194	1	1	1
LE195	1	0,999829	1
LE196	1	1	1
LE197	1	1	1
LE198	1	1	1
LE199	0,999902	1	1
LE200	1	1	1
LE201	0,992028	1	1
LE202	1	1	1
LE203	1	1	1
LE204	1	1	1
LE205	1	1	1
LE206	1	1	1
LE207	1	1	1
LE208	1	1	1
LE209	1	1	1
LE210	1	1	1
LE211	0,999472	1	1
LE212	1	1	1
LE213	1	1	1
LE214	1	0,999962	1
LE215	1	1	1
LE216	1	1	1
LE217	1	1	1
LE218	1	1	1
LE219	1	1	1
LE220	0,999907	1	1
LE221	0,999896	0,999137	1
LE222	1	1	1
LE223	0,999472	1	1
LE224	1	1	1
LE225	1	1	1

Prilog II (nastavak) / Appendix II (table continued)			
LE226	0,99999	0,999981	1
LE227	1	1	1
LE228	1	1	1
LE229	1	1	1
LE230	1	0,999137	1
LE231	1	1	1
LE232	1	0,999933	1
LE233	0,99898	1	0,960527
LE234	1	1	0,960639
LE235	1	1	0,485312
LE236	0,999963	0,780591	1
LE237	1	1	1
LE238	1	1	1
LE239	1	1	1
LE240	1	0,998859	1
LE241	0,997892	1	1
LE242	1	1	0,500281
LE243	1	-	1
LE244	0,580863	0,614859	0,594322
LE245	1	-	1
LE246	1	1	1
LE247	1	1	0,727927
LE248	1	1	0,725948
LE249	1	1	1
LE250	1	1	1
LE251	1	0,999999	0,330565

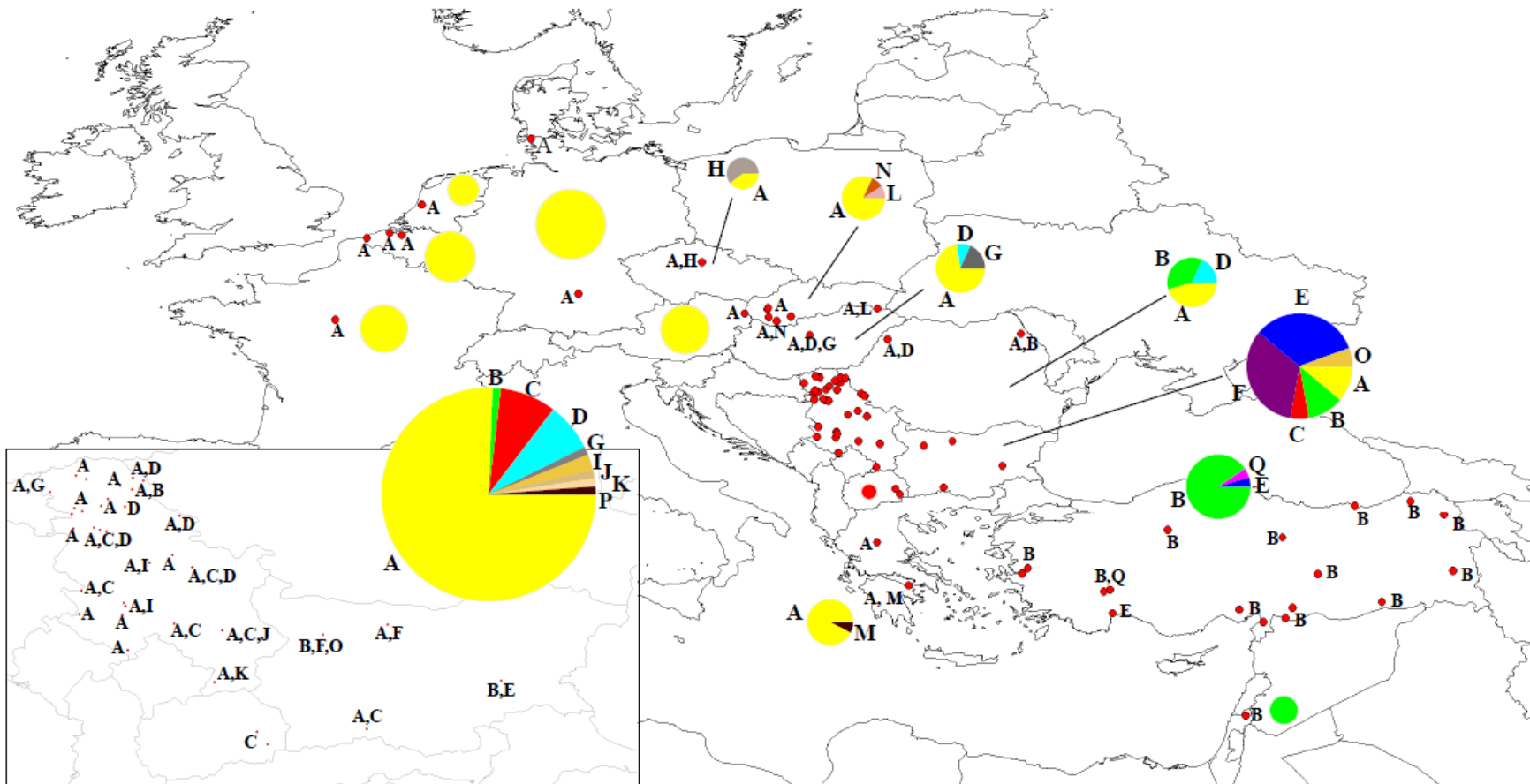
Prilog III Geografska distribucija i zastupljenost proteinskih varijanti gena za subjedinicu 2 NADH dehidrogenaze kod jedinki vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije

Appendix III Geographic distribution and frequencies of NADH Dehydrogenase subunit 2 protein variants by countries in bown hares from Europe and the Middle East



Prilog IV Geografska distribucija i zastupljenost proteinskih varijanti gena za subjedinicu 6 NADH dehidrogenaze kod jedinki vrste *Lepus europaeus* sa teritorije Evrope i Male Azije

Appendix IV Geographic distribution and frequencies of NADH Dehydrogenase subunit 6 protein variants by countries in brown hares from Europe and the Middle East



Prilog V Zastupljenosti alela kod MHC klase II DQA gena po zemljama uzorkovanja vrste *Lepus europaeus* **Appendix V** Allele frequencies of the MHC class II DQA gene in brown hares from Europe and the Middle East by countries

Alele / Allele	AU	BE	BG	CZ	FR	MK	DE	GR	HU	IL	NL	RO	RS	SK	TR	Total
Leeu-DQA*01	0,154	0,036	0,222	0,200	0,182		0,058	0,077				0,046	0,111	0,091		0,090
Leeu-DQA*04			0,167	0,100		0,250			0,136				0,198	0,046		0,088
Leeu-DQA*06	0,462	0,036	0,222	0,300	0,409		0,462	0,077	0,727		0,500	0,727	0,444	0,364	0,050	0,359
Leeu-DQA*07	0,039			0,100	0,046		0,019							0,046		0,010
Leeu-DQA*08	0,039		0,056						0,046			0,046	0,031			0,020
Leeu-DQA*09	0,077		0,083		0,182	0,500		0,115	0,046			0,046	0,049			0,048
Leeu-DQA*10	0,077	0,857	0,111				0,192				0,417	0,091	0,019	0,364		0,117
Leeu-DQA*11	0,077	0,071	0,139		0,091	0,250	0,154	0,269	0,046				0,117			0,094
Leeu-DQA*12	0,077						0,096				0,083		0,012		0,050	0,024
Leeu-DQA*13					0,091		0,019	0,231								0,018
Leeu-DQA*14								0,077								0,004
Leeu-DQA*15								0,077							0,050	0,008
Leeu-DQA*16										0,143					0,200	0,020
Leeu-DQA*17								0,039								0,002
Leeu-DQA*18													0,019	0,046		0,008
Leeu-DQA*19												0,046				0,002
Leeu-DQA*20										0,500					0,100	0,022
Leeu-DQA*21										0,286					0,100	0,016
Leeu-DQA*22															0,075	0,006
Leeu-DQA*23														0,046		0,002
Leeu-DQA*24				0,300												0,006
Leeu-DQA*25															0,025	0,002
Leeu-DQA*26															0,050	0,004
Leeu-DQA*27															0,025	0,002
Leeu-DQA*28															0,025	0,002
Leeu-DQA*29															0,050	0,004
Leeu-DQA*30															0,050	0,004
Leeu-DQA*31															0,050	0,004
Leeu-DQA*32								0,039								0,002
Leeu-DQA*33										0,071					0,100	0,010
N	13	14	18	5	11	2	26	13	11	7	6	11	81	11	20	249
N_A	8	4	7	5	6	3	7	9	5	4	3	6	9	7	15	30
He	0,766	0,267	0,856	0,844	0,784	0,833	0,727	0,868	0,468	0,692	0,621	0,476	0,738	0,753	0,928	0,828
Ho	0,769	0,286	0,611	0,800	0,818	1,000	0,654	0,846	0,546	0,429	0,833	0,546	0,704	0,636	0,850	0,679
A_R																

N – broj uzoraka / sample size; *N_A* – broj različitih alela / number of different alleles; *He* – očekivana heterozigotnost / expected heterozygosity; *Ho* – uočena heterozigotnost / observed heterozygosity; *A_R* – bogatstvo alela / allelic richness

AU – Austrija / Austria; BE – Belgija / Belgium; BG – Bugarska / Bulgaria; CZ – Češka / Czech Republic; FR – Francuska / France; MK – Seevrna MAkedonija / Northern Macedonia; DE – Nemačka / Germany; HU – Mađarska / Hungary; IL – Izrael / Israel; NL – Holandija / Netherlands; RO – Rumunija / Romania; RS – Srbija / Serbia; SK – Slovačka / Slovakia; TR – Turska / Turkey

Prilog VI Zastupljenosti alela kod MHC klase II DQB gena po zemljama uzorkovanja vrste *Lepus europaeus* / **Appendix V** Allele frequencies of the MHC class II DQB gene in brown hares from Europe and the Middle East by countries

Alele / Allele	AU	BE	BG	CZ	FR	MK	DE	GR	HU	IL	NL	RO	RS	SK	TR	Total
<i>Leeu-DQB*01</i>	0,346	0,750	0,441	1	0,318		0,442	0,063	0,318		0,750	0,591	0,274	0,682		0,351
<i>Leeu-DQB*02</i>		0,071	0,088		0,091		0,096				0,083		0,134	0,046	0,028	0,078
<i>Leeu-DQB*03</i>	0,154		0,088						0,409			0,227	0,134	0,091	0,028	0,097
<i>Leeu-DQB*04</i>	0,039	0,071	0,088		0,046		0,212		0,046		0,083	0,091	0,165			0,103
<i>Leeu-DQB*05</i>	0,039															0,002
<i>Leeu-DQB*06</i>													0,006			0,002
<i>Leeu-DQB*09</i>	0,039		0,029			0,250			0,046				0,031	0,046		0,021
<i>Leeu-DQB*10</i>	0,039															0,002
<i>Leeu-DQB*11</i>					0,046											0,002
<i>Leeu-DQB*12</i>													0,006			0,002
<i>Leeu-DQB*13</i>	0,115	0,036	0,118		0,227		0,019					0,046	0,128	0,091		0,080
<i>Leeu-DQB*14</i>	0,077		0,088		0,227	0,750		0,250	0,046				0,055		0,028	0,059
<i>Leeu-DQB*15</i>	0,115	0,071					0,173	0,063			0,083		0,018			0,040
<i>Leeu-DQB*16</i>	0,039						0,019							0,046		0,006
<i>Leeu-DQB*17</i>							0,039						0,012			0,008
<i>Leeu-DQB*18</i>												0,046	0,024			0,011
<i>Leeu-DQB*19</i>													0,006			0,002
<i>Leeu-DQB*20</i>					0,046											0,002
<i>Leeu-DQB*21</i>									0,091							0,004
<i>Leeu-DQB*22</i>									0,046							0,002
<i>Leeu-DQB*23</i>															0,111	0,008
<i>Leeu-DQB*24</i>										0,143					0,111	0,013
<i>Leeu-DQB*25</i>										0,143					0,194	0,019
<i>Leeu-DQB*26</i>										0,357						0,011
<i>Leeu-DQB*27</i>										0,286						0,008
<i>Leeu-DQB*28</i>								0,313								0,011
<i>Leeu-DQB*29</i>								0,188								0,006
<i>Leeu-DQB*30</i>								0,063								0,002
<i>Leeu-DQB*31</i>								0,063								0,002
<i>Leeu-DQB*32</i>			0,029													0,002
<i>Leeu-DQB*33</i>			0,029										0,006			0,004
<i>Leeu-DQB*34</i>															0,056	0,004
<i>Leeu-DQB*35</i>															0,028	0,002
<i>Leeu-DQB*36</i>															0,028	0,002
<i>Leeu-DQB*37</i>															0,083	0,006
<i>Leeu-DQB*38</i>															0,056	0,004

Prilog VI (nastavak) / Appendix VI (table continued)

Alele / Allele	AU	BE	BG	CZ	FR	MK	DE	GR	HU	IL	NL	RO	RS	SK	TR	Total
<i>Leeu-DQB*39</i>															0,056	0,004
<i>Leeu-DQB*40</i>															0,056	0,004
<i>Leeu-DQB*41</i>															0,083	0,006
<i>Leeu-DQB*42</i>										0,071						0,002
<i>Leeu-DQB*43</i>															0,056	0,004
N	13	14	17	1	11	2	26	8	11	7	6	11	82	11	18	238
N_A	10	5	9	1	7	2	7	7	7	5	4	5	14	6	15	41
He	0,849	0,437	0,781	0	0,818	0,500	0,732	0,842	0,749	0,802	0,455	0,615	0,845	0,537	0,930	0,839
Ho	0,923	0,500	0,588	0	0,455	0,500	0,577	0,625	0,727	0,571	0,500	0,364	0,695	0,546	1	0,651
A_R																

N – broj uzoraka / sample size; *N_A* – broj različitih alela / number of different alleles; *He* – očekivana heterozigotnost / expected heterozygosity; *Ho* – uočena heterozigotnost / observed heterozygosity; *A_R* – bogatstvo alela / allelic richness

AU – Austrija / Austria; *BE* – Belgija / Belgium; *BG* – Bugarska / Bulgaria; *CZ* – Češka / Czech Republic; *FR* – Francuska / France; *MK* – Sevrna Makedonija / Northern Macedonia; *DE* – Nemačka / Germany; *HU* – Mađarska / Hungary; *IL* – Izrael / Israel; *NL* – Holandija / Netherlands; *RO* – Rumunija / Romania; *RS* – Srbija / Serbia; *SK* – Slovačka / Slovakia; *TR* – Turska / Turkey

Prilog VII Zastupljenosti alela kod *TLR2* gena po zemljama uzorkovanja kod vrste *Lepus europaeus*

Appendix VII Allele frequencies of the *TLR2* gene in brown hares from the Europe and the Middle East by countries

lele / Allele	AU	BE	BG	CZ	FR	MK	DE	GR	HU	IL	NL	RO	RS	SK	TR	Total
<i>LeTLR2h1</i>	0,577	0,583	0,972	0,700	0,727	1	0,519	0,885	0,864	0,214	0,917	0,773	0,854	0,682	0,333	0,733
<i>LeTLR2h2</i>	0,423	0,417	0,028	0,200	0,273		0,327	0,115	0,136	0,357	0,083	0,227	0,116	0,273	0,233	0,198
<i>LeTLR2h3</i>				0,100												0,002
<i>LeTLR2h4</i>							0,154								0,033	0,019
<i>LeTLR2h5</i>										0,143						0,004
<i>LeTLR2h6</i>										0,286					0,200	0,021
<i>LeTLR2h7</i>													0,024			0,008
<i>LeTLR2h8</i>													0,006			0,002
<i>LeTLR2h9</i>														0,046		0,002
<i>LeTLR2h10</i>															0,067	0,004
<i>LeTLR2h11</i>															0,033	0,002
<i>LeTLR2h12</i>															0,067	0,004
<i>LeTLR2h13</i>															0,033	0,002
N	13	12	18	5	11	2	26	13	11	7	6	11	82	11	15	243
N_A	2	2	2	3	2	1	3	2	2	4	2	2	4	3	8	13
He	0,508	0,507	0,056	0,511	0,416		0,612	0,212	0,247	0,780	0,167	0,368	0,259	0,481	0,809	0,424
Ho	0,385	0,167	0,056	0,600	0,182		0,346	0,077	0,273	0,857	0,167	0,455	0,220	0,455	0,867	0,304

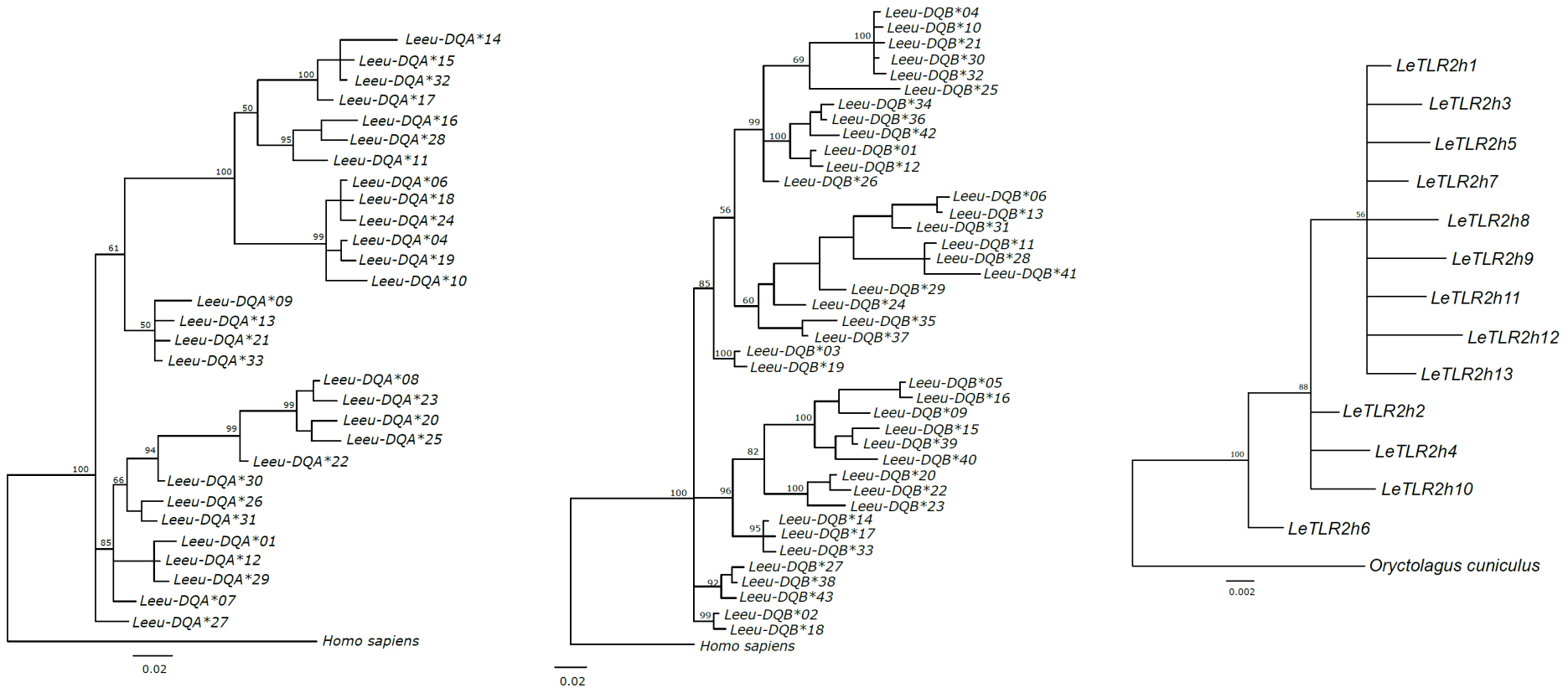
N – broj uzoraka / sample size; *N_A* – broj različitih alela / number of different alleles; *He* – očekivana heterozigotnost / expected heterozygosity; *Ho* – uočena heterozigotnost / observed heterozygosity;

A_R – bogatstvo alela / allelic richness

AU – Austrija / Austria; BE – Belgija / Belgium; BG – Bugarska / Bulgaria; CZ – Češka / Czech Republic; FR – Francuska / France; MK – Seevrna MAKedonija / Northern Macedonia; DE – Nemačka / Germany; HU – Mađarska / Hungary; IL – Izrael / Israel; NL – Holandija / Netherlands; RO – Rumunija / Romania; RS – Srbija / Serbia; SK – Slovačka / Slovakia; TR – Turska / Turkey

Prilog VIII Bajesova filogenetska stabla evolucionih odnosa između alela *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena jedinki vrste *Lepus europaeus*. Na čvorovima su prikazane vrednosti posteriorne verovatnoće.

Appendix VIII Rooted Bayesian phylogenetic tree reconstructed using brown hare *MHC-DQA*, *MHC-DQB* and *TLR2* gene sequences. Posterior probabilities are shown at the nodes.



10. EXTENDED ABSTRACT

Introduction: Brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) are widely distributed across Europe, Asia Minor, and other parts of western and southwestern Eurasia, occurring in a variety of environments - from sea level up to high altitudes above 2400m (Hackländer and Schai-Braun, 2018). Furthermore, they have been successfully introduced in areas of North and South America, New Zealand, Australia, as well as some tropical and subantarctic islands (Flux and Angermann, 1990). Even though this species is known to show regional population fluctuations, a remarkable population decline has been reported all over Europe since the 1960s. Due to the observed decline, numerous ecological and genetical studies have been performed in order to investigate the possible reasons. Intensification of agricultural activities lead to reduction and fragmentation of non-cropped habitats, followed by reduced field heterogeneity, less availability of quality food, usage of pesticide and fertilizers; and these are all known to be the most important reasons (Smith et al., 2005). In addition, climatic factors, overhunting, predation and spread of disease are also known to influence the observed population decline of this species (e.g., Goszczyński and Wasilewski, 1992; van Wieren et al., 2006; Wibbelt and Fröhlich, 2005). So far, the majority of genetic analyses in brown hares was based on utilization of neutral molecular markers (mitochondrial DNA and microsatellites), as well as low resolution protein markers (allozymes), in order to resolve taxonomic issues, understand phylogeographic patterns and demographic history, as well as to detect genetic structuring and gene flow rates. Neutral molecular markers can indicate the evolution history of species, as well as the impact of human related habitat changes on its genetic structuring and gene flow, however, they cannot explain mechanisms related to adaptive variability as the only potential that a population needs in order to respond to continuous and long-term changes in the environment. In fact, even though local adaptations actually occurred, sometimes a time span between population divergence can be too short, or gene flow may be too high, to leave a signal at neutral loci. Therefore, the application of adaptive molecular markers is necessary in order to properly observe local adaptations through geographically varying selection which is favouring alternative alleles at different locations. Among adaptive molecular markers, the immune genes are the best option to estimate the level of functionally adaptive variability, given their important function in fighting pathogens as a constantly present selection pressure (e.g., Sommer 2005; Ujvari and Belov, 2011). The ability of organisms to respond to a variety of pathogens is determined by the variability of peptide binding regions, which is encoded by the exon 2 of MHC genes.

Therefore, MHC genes are widely used in the estimation of functional variability in wildlife animal populations, and may indicate local adaptations of hosts residing in different habitats. Since differences in the diversity of pathogens are often directly linked to environmental characteristics, the distribution of local MHC gene variants can be expected to be also shaped by climatic and environmental characteristics, leading to the adaptation to those regional pathogenic landscapes. On the other hand, even though mtDNA was considered to be a neutral molecular marker, its supposed neutrality is under debate already for quite a while. A number of studies indicated the importance of positive selection and adaptations in this molecule (e.g. Balloux et al., 2009; Morales et al., 2015; Harrisson et al., 2016), which is a consequence of selection acting on genes involved in the oxidative phosphorylation system pathway (OXPHOS). In fact, population divergence and local adaptations could be promoted through favouring certain protein variants which maximize the efficiency of energy metabolism in different environmental conditions. Therefore, only joint analyses based both on adaptive and neutral molecular markers, should be employed in assessing the long-term population potential of adaptation, and in defining proper strategies and plans for sustainable management of wild populations of this species. Brown hares occur in a variety of heterogeneous landscapes and are animals which raise their young above the ground, where they are immediately exposed to the environmental influence (Göritz et al., 2001). The developmental rate in the first weeks of their lives is very fast, which suggests particularly effective immune genes, because a lot of energy needs to be allocated to metabolic pathways for growth and to provide successful response to the local environment. This is particularly important since several pathogens are known to affect regional survival in brown hares. Given general population declines of this species observed in many regions, and having all the above statements in mind, it seems from the conservation genetic point of view that the most appropriate approach for the development of proper management plans would be to investigate the importance of molecular markers related to immune response and also genes related to metabolic pathways, such as OXPHOS. Furthermore, previous studies in hares and jackrabbits indicated the evidence of positive selection acting on mitochondrial OXPHOS genes (Melo-Ferreira et al., 2014a; Ben Slimen et al., 2018), but also significant climate effects on the distribution of some mitochondrial protein variants in cape hares from Tunisia (Ben Slimen et al., 2017). The latter study has proved a significant climate effect on spatial distribution of MHC genes variability, supposedly as a consequence of adaptations to regional pathogenic landscapes. So far, no studies in brown hares were based on the variability of genes of the OXPHOS system, but even though some studies were based on

MHC genes variability, none of them evaluated the importance of climatic conditions and possible local adaptation to regional pathogenic landscapes.

Aims: In this doctoral dissertation, several molecular markers were used, namely mitochondrial D loop, mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 2 (*MT-ND2*), mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6 (*MT-ND6*), exon 2 of MHC Class II genes *MHC-DQA*, *MHC-DQB* and Toll-like Receptor 2 (*TLR2*) gene, with the following aims:

- determination of molecular diversity indices of brown hares from Europe and Asia Minor, based on the variability of mitochondrial DNA nucleotide sequences of D loop, *MT-ND2* and *MT-ND6* genes, as well as on the variability of nucleotide sequences of *MHC-DQA*, *MHC-DQB* and the *TLR2* gene of the nuclear genome;
- determination of phylogeographic structure, demographic history and spatial distribution of genetic variability of brown hares, based on mitochondrial DNA D-loop sequences;
- determination of the spatial distribution of molecular diversity of brown hares from Europe and Asia Minor based on the analysis of *MT-ND2* and *MT-ND6* genes, detection of possible selection signals shaping the evolution of these genes, as well as the presence of local/regional adaptations in correlation with climatic conditions;
- determination of the spatial distribution of the immune system gene variability, detection of selection signals, as well as local adaptations correlated with environmental-climatic variables in brown hares from Europe and Asia Minor.

Material and methods: Skeletal muscle tissue samples of 251 brown hares (*Lepus europaeus* Pallas, 1778) were collected during regular hunts from 74 localities across Europe and Asia Minor (Fig. 1; Appendix I). Total genomic DNA was extracted following a phenol/chloroform/isoamyl alcohol procedure (Sambrook and Russell, 2001) or using the *GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep kit* (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) following the manufacturer recommendations. Six molecular markers (three molecular markers of mitochondrial DNA (D-loop, *MT-ND2*, and *MT-ND6*) and three nuclear markers (*MHC-DQA*, *MHC-DQB*, and *TLR2*) were amplified by polymerase chain reaction and bi-directionally sequenced by the Sanger dideoxy method. Amplification of the mtDNA D loop fragment was performed according to Kasapidis et al. (2005), the amplification of partial sequence of *MT-ND2* gene was performed according to Smith et al. (2010), while the entire coding sequence of the *MT-ND6* gene was amplified following the procedure of Stefanović et al. (2019). Amplification of the *MHC-DQA* and *MHC-DQB* partial exon 2 sequences was done following the procedure described by Gouy de Bellocq et al. (2010) and Smith et al.

(2011), while *TLR2* sequences were amplified according to Awadi et al. (2018). Prior to sequencing, mtDNA D loop, *MT-ND2*, *MT-ND6* and *TLR2* amplified products were purified following the Exo SAP protocol (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), while *MHC-DQA* and *MHC-DQB* amplified products were cleaned using the *Sera-Mag* magnetic beads (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Sequencing was conducted using the BigDye Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) on an ABI 3130xl DNA Analyzer or an ABI 3730xl DNA Analyzer. The sequence and chromatogram analyses were performed using the SeqScape[®] software (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), where the alignment of all protein coding sequences was done based on the provided templates, while the mtDNA D loop sequences were aligned using the ClustalW algorithm as implemented in BioEdit (Hall, 1999). Diploid genotypes of nuclear markers were determined through allelic phase reconstruction using the PHASE algorithm (Stephens and Donnelly, 2003) as implemented in DnaSP (Rozas et al., 2017). Prior to phasing, all heterozygote positions were coded using the corresponding IUPAC ambiguity codes, while the outcome of the haplotype reconstruction was improved using all of the already determined NCBI available alleles for brown hares. Molecular diversity indices for nucleotide sequence data were calculated in DnaSP and Arlequin (Excoffier and Lischer, 2010), while diversity indices for nuclear genotypes data were calculated in GENEPOP (Rousset, 2008) and GENETIX (Belkhir, 2004), and the molecular diversity indices for protein sequences were calculated in MEGA X (Kumar et al. 2018). In order to assess phylogenetic relations between the obtained haplotypes/alleles and to define haplogroups, Bayesian phylogenetic trees were constructed in MrBayes (Ronquist et al., 2012) based on the best nucleotide evolution model, as suggested by jModelTest (Darriba et al., 2012), while a median-joining (MJ) network was constructed with the software PopART (Leigh and Bryant, 2015). Demographic characteristics were examined through mismatch distribution analyses in DnaSP and Arlequin, historical gene flow rates were calculated in Migrate-N (Berli 2004), while a Bayesian skyline plot for mtDNA D loop sequences was constructed in BEAST (Drummond et al., 2013). Spatial clustering of individual mtDNA sequences was done based on the uncorrelated frequencies model using Geneland (Guillot et al., 2005), while spatial clustering of nuclear sequences was tested based on the variable polymorphic sites through spatial Principal Component Analysis (sPCA) in adegenet (Jombart, 2008) in R (R core team 2019). Molecular diversity indices and genetic differentiation (pairwise Φ_{ST} / F_{ST} differences and analyses of molecular variance) were calculated for all the defined groups in DnaSP and Arlequin. The presence of natural selection was tested by several approaches.

Neutrality test analyses were performed in DnaSP. Overall, average omega values based on codon-Z tests were performed in MEGA. Codon-specific signatures of selection were tested on the Datamonkey web server using the MEME, FEL, SLAC and REL approaches, while the presence of recombination was tested by the GARD method. Codeml in PAML (Yang, 2007) was used for detection of codon specific signals of selection comparing the null models (M0, M1, M7) with positive selection models (M3, M2, M8) by likelihood ratio tests. In addition, MHC genes detection of sites under positive selection was tested by the omegaMap program (Wilson and McVean, 2006) which accounts for the recombination effects. The latter software was also used to check for the presence of recombination through PERMUTE based on r^2 , D, and G4 parameters, while recombination breakpoints were evaluated using the following methods RDP, GENECONV, MAXCHI, CHIMAERA and 3Seq, as implemented in the RDP4 package (Martin and Rybicki, 2000). For ND2, a logistic regression model was run with the two most prevalent protein variants as dependent variable, while for ND6, a multinomial logistic regression model was run with protein variants as dependent variable, with individual principal component factor scores resulting from the bioclimatic variables as explanatory variables, controlling at the same time for likely geographic (latitude, longitude) variation. For the *MHC-DQA* and *MHC-DQB* genes, multinomial logistic models were performed to test for possible effects of climatic factors as well as longitude and latitude on the genotypes of selected alleles. Furthermore, logistic models were also performed in order to determine the effects of climatic factors as well as latitude and longitude on heterozygosity or homozygosity at both of the examined loci. All the models were performed in R (R Core team), with model ranking using the Akaike Information Criterion corrected for small sample sizes (AICc) and model averaging. Based on the obtained relative variable importance (RVI) for each variable, single models were re-run using only those explanatory variables with RVI values higher or equal to 0.7. The respective locality-specific bioclimatic variables were downloaded for each individual from the WORLDCLIM data set for 2.5min intervals (<http://www.worldclim.org/bioclim.htm>). The selected bioclimatic variables were used to run a principal-component analyses (PCA) based on correlation matrixes in SPSS vers. 20 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp). Prior to PCA, all the downloaded bioclimatic variables were *ln*-transformed in order to reduce variances and obtain normal distributions of residuals.

Results: In this PhD thesis, molecular diversity of three mitochondrial DNA markers and three immune genes was analysed in 251 individuals of brown hares from Europe and the Middle East. PCR amplification was successful for all the examined individuals for all

molecular markers, except for *MHC-DQB* gene where nine individuals failed to give an amplified product, even after the additional reaction optimization. All protein coding genes showed no presence of indels, frame shifts or premature stop codons, proving that no amplification of pseudo genes has occurred.

Mitochondrial DNA molecular diversity: The combined alignment of the D loop, *MT-ND2*, and *MT-ND6* sequences of all studied individuals with a final length of 1268bp revealed 136 mitotypes based on 198 polymorphic sites (Table 1). Highest molecular diversity indices were found within the mtDNA D loop sequences where 114 haplotypes were detected, with 66 of them being unique. The most frequent haplotypes were LeDL*25 (6.77%) and LeDL*3 (5.58%), while all others were present in low frequencies, ranging from 0.79 to 1.59%. Out of 30 haplotypes revealed in the *MT-ND2* gene, 10 haplotypes were unique, with LeND2*1 (25.09%) and LeND2*2 (23.11%) being the most frequent. In the *MT-ND6* gene, 55 haplotypes were revealed, of which 27 were unique, while the most frequent haplotype was LeND6*1 (43.82%). According to the Bayesian tree and median-joining network of D loop sequences, three haplogroups may be defined, namely AMEh, BLh and cwEUh (Fig. 5, Fig. 6), while the same analyses employing the *MT-ND2* and *MT-ND6* genes indicated two big haplogroups namely AMEh and EUh (Fig.7-10). The proposed phylogeographic grouping was consistent for all mtDNA markers, except that the *MT-ND2* and *MT-ND6* genes combined the BLh and cwEUh groups into one EUh group. The AMEh group consisted mainly of sequences of individuals from Turkey and Israel together with several individuals from eastern Bulgaria and Romania, while BLh consisted mainly of sequences of individuals from the Balkan countries together with Romania and Hungary, and the cwEUh of individuals from central and western Europe. The connections between all haplogroups were through one branch, which in the case of D loop sequences indicated 12 mutational steps to European side, and only five mutational steps in the case of *MT-ND2* and *MT-ND6* sequences. The phylogenetic rooting indicated the AMEh group for all markers as the most ancestral group, and suggested an evolutionary pathway from AMEh to BLh, and from the latter to cwEUh. A gradual decrease of molecular diversity in this evolutionary trajectory was obtained for all of the examined molecular markers, with AMEh showing the highest value of molecular diversity indices, and cwEUh showing the lowest. Furthermore, a historical analyses of gene flow suggested an asymmetrical, almost unidirectional gene flow from Anatolia to Europe, and only some gene flow across Europe (Fig. 13). The demographic history analyses revealed a unimodal pattern for all of the European haplogroups together with significantly negative F_u 's F_S values and positive R_2 values, which indicated a strong

signal of population expansion (Fig. 11). Based on the Bayesian skyline plot constructed with the D loop sequences, estimated the time of the start of the population expansion in the cwEUh before at approximately 9000 years b.p. (Fig 12). The results of spatial genetic clustering of individuals suggested a similar spatial pattern both for the D loop and *MT-ND2* sequences, indicating the presence of four spatial groups namely AM, SEE, CE and WE (Fig. 14, Fig. 15), while a slightly different spatial pattern was suggested for the *MT-ND6* sequences (Fig. 16) also with four detected spatial groups, named AM, EE, SE and WCE. For all of the examined molecular markers, the highest values of molecular diversity indices were detected within the Anatolia/Middle East (AM) group, while the lowest values were detected within central and western Europe (Tables 2, 4 and 6). The observed pattern of spatial clustering was further supported with significant Φ_{ST} values (Tables 3, 5 and 7) and analyses of molecular variances which showed that 45%, 59.37% and 40.63% of the variation were due to differences among individuals between the spatial groups for D-loop, *MT-ND2* and *MT-ND6* respectively. When translating to amino-acid sequences, eight different protein variants was detected for *MT-ND2* gene based on six nonsynonymous substitutions (Fig. 3), while 17 different protein variants were detected for *MT-ND6* gene (Fig. 4). The most common protein variants for *MT-ND2* gene was ND2A (Appendix III), while the most common protein variant for the *MT-ND6* gene was ND6A (Appendix IV). The neutrality tests based on *MT-ND2* and *Mt-ND6* sequences (Tajima's D, Fu and Li's F^* and D^*) returned significant negative values only for the latter (Table 8). Codon-based Z tests indicated significantly lower numbers of non-synonymous changes to synonymous changes per site for both mtDNA genes indicating an overall signal of purifying selection. Codon-based tests on the Datamonkey server indicated only sites under negative selection with the FEL method (codons 116 and 130) and the SLAC method (codon 116) for the *MT-ND2* gene, the codon 102 within the *MT-ND6* gene was proved under positive selection by REL method, while negative selection signals were detected by the SLAC and FEL methods. No evidence of recombination was found, as suggested by the GARD analysis. The PAML analyses based on comparison of likelihood ratio tests, showed significant differences for all test comparisons in the *MT-ND2* gene where, according to Bayes Empirical Bayes, codon 148 was revealed under positive selection. For the *MT-ND6* only the comparison between M1 vs. M2 model was significant indicating the positions 4, 102, and 126 to be under positive selection (Table 9). Only codon position 102 of the *MT-ND6* gene was proved to be under positive selection by more than two tests. This latter codon position separates the most widespread protein ND6A

containing leucine, from ND6C containing methionine: ND6C was distributed in Bulgaria, North Macedonia, and south and central Serbia. The codon position 102 also separated the ND6A protein variant from ND6F, containing valine, and that latter was distributed in Bulgaria. The modelling of the effects of the climatic factors on the occurrence of ND6 protein variants indicated that all the proteins variants ND6A-ND6E (except for ND6D) were more frequently occurring in the eastern part of Europe in comparison to individuals not having this protein variant. Furthermore, protein variants ND6C and ND6F were favoured at locations of lower general precipitation values during the wettest and coldest period of the year, or of higher precipitation values during the driest period of the year, as compared to protein variant ND6A.

Immune gene molecular diversity: The determination of the immune genes allelic phase with probabilities higher than 90% was successful in 99.2% for *MHC-DQA*, 97.93% for *MHC-DQB* and 96.81% for *TLR2* gene (Appendix II). Within the *MHC-DQA* gene 30 alleles were identified, in the *MHC-DQB* gene 41 alleles were identified, and 13 alleles were identified in the *TLR2* gene (Table 14, Appendix V, VI and VII). The nucleotide sequences of each gene translated into 27, 35, and 6 protein variants for the *MHC-DQA*, *MHC-DQB*, and *TLR2* genes, respectively (Fig. 17, 18, 19). The phylogenetic tree of the observed alleles did not yield any phylogeographic signal (Appendix VIII). However, based on median-joining network analysis a signal of trans-species polymorphism was observed through shared alleles between *L. capensis*(from North Africa) and *L. granatensis* for *MHC-DQA*, and between *L. europeus* and *L. capensis*(from North Africa) for *TLR2*, whereas shared protein variants with *L. capensis* were detected for the *MHC-DQB* (Fig. 17, 18, 19). Spatial clustering based on sPCA analyses indicated the presence of two spatial groups, one comprising mainly of individuals from Anatolia and the Middle East and another one comprising the individuals from Europe (Fig. 20), with higher molecular diversity indices in the Anatolian and Middle Eastern group (Table 15), than in the Europe group, with an overall F_{ST} value of 0.293 for *MHC-DQA*, 0.096 for *MHC-DQB* and 0.245 for the *TLR2* locus. The neutrality tests rejected neutral evolution for the *MHC-DQA* and *MHC-DQB* genes, but failed to do so for the *TLR2* gene (Table 16). The codon-based *Z* tests indicated significantly lower numbers of non-synonymous changes to synonymous changes per site only for the *TLR2* gene, but no significant difference was observed for none of the MHC genes. The datamonkey tests indicated a presence of positive and negative selection for both of the MHC genes, but only a signal of negative selection was detected for the *TLR2* gene (Table 17). PAML indicated significant differences for comparisons of all models for the MHC genes, but none of the

comparisons was significant for *TLR2* gene (Table 18). OmegaMap revealed 12 codons for *MHC-DQA* and 15 codons for *MHC-DQB* to be under positive selection. No recombination was detected by the GARD analyses, but PERMUTE in omegaMap indicated significant values of G4 for *MHC-DQA* and *MHC-DQB* (Table 19). The analyses in the RDP package showed two possible recombination events only for *MHC-DQA*, one involving allele *Leeu-DQA*10* and another one involving allele *Leeu-DQA*09*. Based on the conservative consensus of sites confirmed by all applied approaches, only codons 9, 63, and 70 for *MHC-DQA* and codons 6, 18, 49 for *MHC-DQB* were consistently proved under positive selection. Modelling of the effects of MHC genotypes containing the most frequent alleles indicated latitudinal and longitudinal effects in several cases affecting only hares from Europe, as well as several climatic effects. Specifically, individuals heterozygous for protein variant DQA6 and DQB3 were more often occurring in regions with lower precipitation during the wettest period of the year, while both individuals homozygous and heterozygous for protein variants DQA1 were more often occurring in regions with higher precipitation especially during the dry period of the year, in comparison to individuals not having those protein variants in their genotypes. Furthermore, a temperature effect was observed for individuals heterozygous for the DQA10 protein variant that occurred in regions with lower temperatures, especially during the cold and dry period of the year. Contrary, individuals homozygous for DQA10 occurred more often in regions with higher temperatures as compared to individuals not having this allele in their genotype. For the hares from Anatolia and Israel, however, no statistical model failed to prove any such effects as reported above.

Discussion: In this dissertation a high level of genetic diversity was observed for mitochondrial DNA and three immune genes in brown hares from Europe and the Middle East. Moreover, a strong signal of phylogeographic and spatial structuring was detected in the mtDNA, in comparison to the spatial structuring of the immune genes, which was less pronounced. Furthermore, signals of positive selection were detected in mtDNA genes, as well as in immune genes, along with significant climate effects of shaping the spatial distribution of the most prevalent protein variants of these genes.

Mitochondrial DNA molecular diversity: The highest level of molecular diversity was observed in the D-loop sequences, which is in accordance with previous research of this species using the same molecular marker (Kasapidis et al., 2005; Fickel et al., 2008; Stamatis et al., 2009; Djan et al., 2017; Ashrafzadeh et al., 2018). A moderate level of diversity was found for the *MT-ND2* and *MT-ND6* genes, with similar values of haplotype and nucleotide diversity in the *MT-ND2* gene as compared to cape hares from Tunisia (Ben Slimen et al.,

2017). On the other hand, in comparison to a study that has compared 14 full mitochondrial genomes of brown hare individuals and that has revealed almost double the number of parsimonious sites in the *MT-ND2* genes than in the *MT-ND6* genes (Giannoulis et al., 2018), in this dissertation a higher number of such sites was observed. Based on the Median-joining network (MJN) and Bayesian phylogenetic trees, the signal of phylogeographic structuring was pronounced in all three examined mtDNA markers, indicating the existence of two main clades, one encompassing individuals from Anatolia/Israel (AMh), and the other encompassing individuals from Europe, with the latter being further divided into two haplogroups based on D-loop sequences: one encompassing mostly individuals from the Balkans (BLh) and the other encompassing individuals from central and western Europe (cwEUh). The observed structuring is in accordance with previous phylogeographic studies of this species, which translates into the following scenario: individuals from Anatolia/Israel acted as a source population for migration to the south eastern Balkans; the territory of south eastern Europe (in particular regions of Bulgaria, south eastern Serbia and the Northern Republic of Macedonia) acted as a source region for further colonization of the Balkan Peninsula, while the central and western Europe was populated almost exclusively from individuals from the northern part of the Balkan Peninsula. The observed scenario was further supported with an evident decrease of molecular diversity indices based on all three examined mtDNA markers along this evolutionary trajectory, with hares from the Anatolian Peninsula exhibiting the highest values, in comparison to hares from central and western Europe where the lowest level of diversity indices were observed. This decrease of molecular diversity indices is in accordance with the leading edge hypothesis of the colonization of Europe, after the late glacial maximum (LGM); as diversification was occurring in the southern regions, whereas individuals from the northern part of the Balkans acted as a leading front during the colonization period, while low diversity across Europe likely represents purely a founder effect of these individuals (comp. Hewit et al., 1999). Based on the architecture of the currently developed median joining networks (MJNs) for examined mtDNA markers, no large phylogenetic gaps were observed, except for the D loop sequences where 12 mutational steps were detected between the AMh and BLh phylogroups. However, this divergence seems to be negligible in comparison to the maximal divergence observed between the haplotypes within each of the haplogroups, particularly as six mutational steps representing this gap within the *MT-ND2* and *MT-ND6* genes displayed only one nonsynonymous change, respectively. This scenario of intraspecific evolution based on shallow reticulate genetic differentiation across large geographic areas, corresponds to an

intermediate position of phylogenetic categories IV (lineages allopatric) and category IV (lineages sympatric) according to Avise (2000), which may be interpreted as a continuous evolutionary process and population dynamics history with no obvious strong evolutionary gaps. According to the ancestral position based on MJ network rooting, the observed evolutionary development was also supported by the timing of demographic events based on D loop sequences, which indicated the longest evolutionary history in Anatolia/Israel; a younger evolution of the Balkans group starting around 60000 bp, and the youngest evolutionary history in the central and western European group with expansion starting approximately around 9000 bp, which perfectly fits to the climate and landscape after the LGM and the concomitant vegetation cover changes in Europe (Adams et al. 1999; Hewitt et al. 1999). Furthermore, this evolutionary trajectory was confirmed by a coalescence theory-based migration analyses which indicated almost asymmetrical and unilateral gene flow from Anatolia to the Balkans, with less than one individual per generation in the opposite direction. Demographic tests also indicated a longer stable population in Anatolia/Israel, while Europe faced the obvious signal of population expansion as revealed; a concordant signal was also revealed by the topology of the MJN which showed a typical *star-like* topology. Since the MJN and the Bayesian phylogenetic trees do not take into the consideration the geographic positions of individuals directly, a spatial distribution of molecular diversity results in a better insight into the geographic distribution of diversity, as cluster distribution and posterior probabilities for the membership to each cluster are obtained. Based on the spatial analyses of the three examined mtDNA markers, the existence of four spatial groups was revealed, namely one group corresponding to individuals from Anatolia/Israel, while within Europe, three additional clusters were found. In principle, spatial clustering in D-loop and the *MT-ND2* gene gave the same pattern, indicating the existence of one cluster in the Balkans, one cluster in central Europe, and one cluster encompassing individuals from Western Europe. On the other hand, a bit different scenario was observed in the *MT-ND6* genes, where two clusters were observed in the Balkan peninsula dividing it into an eastern and a western cluster, while all individuals from central and western Europe were within one and the same spatial cluster. This scenario is in accordance with the proposed neutral model of evolution based on the phylogeography of D loop sequences. Even though the Apennine and the Iberian peninsulas do not seem to play an important role in the phylogeography of hares, as the Balkans seem to be the most important phylogeographic region for its recent evolution in Europe, a slight separation of individuals from Western Europe might indicate the presence of divergent lineages from the Iberian Peninsula. Nevertheless, this scenario is actually a pure

consequence of a founder effect following the first colonization wave after the LGM, while the separation of the central European cluster may be due to the presence of more divergent lineages influx from Eastern Europe. Indeed, previous studies already indicated somewhat divergent population in the eastern part of Europe (Strzala et al., 2008; Ashrafzadeh et al., 2018). The observed spatial structuring followed the proposed neutral model, with molecular diversity indices decreasing from Anatolia to the Europe, and then from South to West Europe. A bit unexpectedly, the higher number of nonsynonymous changes was found within the hares from the evolutionarily younger European phylogroups, in comparison to the evolutionarily older individuals from Anatolia/Israel, for both of the examined mtDNA genes. When considering only the sites confirmed by a minimum of two different applied tests (Melo-Ferreira et al., 2014; Ben Slimen et al., 2017, 2018), one position was found to be under positive selection in *MT-ND6* gene, but no such position was found *MT-ND2*, and several positions were found to be under negative selection. Purifying selection is already known to maintain the molecular diversity of mtDNA genes, given their high functional constraints as mtDNA genes are involved in the important process of energy production through the OXPHOS pathway. On the other side, an increasing number of studies indicates that positive selection on OXPHOS genes may convey a signal of molecular adaptations, and cause a divergence through differences in energy production and metabolic adaptations to varying environmental, particularly climatic conditions (eg. Morales et al., 2015; Galtier et al., 2009; Ben Slimen et al., 2017, 2018). The position proved under positive selection within the *MT-ND6* gene was separating the two younger proteins ND6C and ND6F from ND6A, the most common protein variant detected in Europe. In order to test whether the distribution of these protein variants was affected by climatic parameters, a multinomial regression model was run on the distribution of six ND6 protein variants (setting the threshold at the evolutionarily speaking latest (youngest) protein arising from the position proved to be under positive selection) but only for individuals from Europe, as in Anatolia only two individuals had other protein variants than ND6B. Furthermore, the model in Europe did not include individuals from western Europe, as they exclusively harboured the most common protein variant ND6A, probably as a consequence of a founder effect, as the diversity of proteins in the Balkans simply did not have a chance to reach central and western Europe, given the short evolutionary period following the founder effect after the LGM. A significant effect of climatic parameters was found for the protein variants ND6-C and ND6-F, as the individuals harbouring these variants were significantly more often occurring at locations with lower precipitation values during the wettest period of the year, or with higher precipitation values

during the dry period of the year, in comparison to the individuals carrying the most common ND6A protein variant. Given that climatic effects may influence the energetic performances of OXPHOS genes, and since there is a significant geographic effect on the occurrence of protein variants independent from the observed climatic effects, with variant ND6F being more frequent in the eastern spatial cluster, and variant ND6C being more frequent in the western cluster, but also having in mind the signal of positive selection; everything mentioned above may indicate a sign of molecular adaptations of an individual having these variants, in order to better optimize for energetic performances under these conditions. In fact, previous studies already indicated that high precipitation increases mortality in leverets (Hackländer et al., 2002; Rödel and Dekker, 2012), and also having in mind that a high altitudinal diversity across the Balkan Peninsula may impose differences in precipitation, a molecular adaptation may occur. Furthermore, since there is little protein variants diversity in the evolutionarily older Anatolian phylogroup, diversity and climatic effects on mtOXPHOS protein variants in Europe may also have resulted from probably more pronounced environmental changes during the late Pleistocene and early Holocene, which likely more severe climatic perturbations in Europe. According to the predictions of secondary protein structure, this position under positive selection seems to be located within the transmembrane domain IV of *MT-ND6* gene. This is accordance with previous studies, and it indicates that most of the sites showing adaptive divergence are located within the functionally relevant transmembrane domain (Yu et al., 2011; Morales et al., 2015), even though some studies suggested that all adaptive signals were almost solely based within the loop regions (da Fonseca et al., 2008). Even though no functional importance was indicated for this position in previous researches (Melo-Ferreira et al., 2014), it is important to note that a signal of positive selection and the statistically significant climatic effects alone do not prove actual adaptations. Without performing the functional tests on the proteins, the impact of these amino acid changes on the metabolic performances, they might be considered rather as elusive. Having in mind everything stated above, and given the fact that previous studies have indicated that even a single amino-acid change in OXPHOS genes has proven to affect the efficiency of cellular respiration processes, but also since there are a number of neurodegenerative and metabolic diseases, cancer and ageing as a consequence of energetic dysfunction of OXPHOS genes (Dimauro, 2011), all the present findings indicate a solid support for possible adaption of OXPHOS genes to varying environmental-climatic conditions.

Molecular diversity of immune genes: A total number of 30 alleles coding for 27 different protein variants were found within the *MHC-DQA* gene, while 41 alleles coding for 35 protein variants were found within the *MHC-DQB* gene. A high diversity of MHC genes was also observed in previous research of hares. Namely, in the study of 801 brown hare individuals from Europe and Asia Minor, a similar number of alleles (37) was found for the *MHC-DQA* locus, while 61 alleles were found for the *MHC-DRB* locus (Koutsogiannouli et al., 2009; 2014). Even though those studies encompassed a large number of individuals across a larger study range, a similar number of alleles was detected in the present doctoral dissertation. This suggests that even the four times lower number of individuals presently used, together with the limited number of individuals from different populations, were still enough to representatively characterize the diversity found in the examined MHC genes. In favour of this argumentation are also the results of the study that revealed ten alleles among 326 individuals from eastern Austria (Campos et al., 2011), in comparison to eight alleles found in thirteen individuals from Austria in the present dissertation. Similar results are observed for *MHC-DQB* locus as well, as in a study of 518 individuals from Austria and Belgium, ten and nine *MHC-DQB* alleles were found, respectively. Even though MHC genes are highly variable, previous studies indicated differences between loci, with *MHC-DRB* locus being the most polymorphic, while *MHC-DPB* locus is the least polymorphic of all MHC class II genes examined so far in hares (Smith et al., 2011). Within the *TLR2* gene, a similar number of alleles and molecular diversity was revealed as in the study of cape hares from Tunisia (Awadi et al., 2018a), but still a slightly higher number of diversity in comparison to other mammals, probably as a consequence of a higher mutational rate observed for this gene within the lagomorphs order (Neves et al., 2019). Actually, a highly conserved intracellular part of this gene, the TIR domain which is involved in the initiation of the downstream signal cascade, was examined in the present dissertation, and therefore it is under functional constraints resulting in less diversity. In comparison to other mammals, for example in the study of ten sheep breeds out of 18 variable positions, only two were within the TIR domain (Smith et al., 2014). Based on the MJN and Bayesian phylogenetic tree and contrary to mtDNA, a lack of a strong phylogeographic signal was found presently within the examined immune gene. Even though phylopatric behaviour of females may produce such a signal, trans-species polymorphism was already shown as characteristic element of the evolution of MHC genes in various species (Klein et al., 1998), namely resulting from the fact that alleles were more divergent within species, than alleles between different species. Based on the currently performed MJN analyses which included MHC and *TLR2* alleles from

other leporids, shared alleles and/or protein variants were found, which may indicate that these alleles represent ancestral variants dating from even before the major speciation events among Leporid genera, and are maintained as a consequence of a selection mechanism due to similar pathogenic communities acting on those species. This is already suggested by several studies, e.g. helminth communities in rabbits and hares seem to be similar (Blasco et al., 1996). On the other hand, when spatial PCA analyses were performed, two main spatial groups were revealed, one encompassing individuals from Anatolia/Israel, and the other one encompassing individuals from Europe, therefore implying a signal of phylogeographic division. However, further structuring across Europe was not evident as suggested by mtDNA. On the contrary, a rather shallow divergence was observed which is in accordance with previous studies based on microsatellites (Ben Slimen et al. 2008; Demirbaş et al. 2019). Furthermore, it seems like that demography has played a small role in shaping the distribution of MHC genes in Europe as compared to mtDNA, since there are no observed signals of decrease in molecular diversity from south to north as a consequence of one or more potential founders effect after the LGM. These findings are also in agreement with the study of *MHC-DQA* and *MHC-DRB* genes in hares from Europe and Asia Minor, where even bigger diversity in some of central and northern European populations was revealed in comparison to some of the Balkan and Anatolian populations (Koutsogiannouli et al., 2009; 2014). In this dissertation, shared alleles between the Anatolian and the European spatial group were found for all of the three examined immune genes, contrary to the study of Koutsogiannouli et al. (2009; 2014) where shared alleles were found only at the MHC-DRB locus, but not at the MHC-DQA locus. This led the authors to suggest different evolutionary mechanisms acting at each locus, namely making alleles at one locus advantageous under certain environmental conditions, but disadvantageous at the other locus. Actually, genetic diversity within MHC loci is shaped by several mechanisms including point mutations, recombination, gene conversions and different selection pressures. The latter are further shaped through combined effects of demography, environmental characteristics, behavioural and ecological differences in pathogens, and host-pathogen interactions. Given the facts mentioned above, it seems that demography did not play a strong effect on the observed diversity of currently studied MHC genes. Balancing selection was already proved to be the most important evolutionary force shaping the variability of MHC genes, through overdominance or frequency-dependant selection (Spurgin and Richardson, 2010). In this dissertation, all the loci studied within both spatial groups exhibited a smaller number of observed heterozygosity in comparison to heterozygosity values as expected to Hardy-

Weinberg equilibrium, which is not in favour of the general overdominance effect. Hence, a high diversity of alleles across the examined study region, together with a signal of low spatial genetic structuring, rather is being considered to reflect balancing selection resulting from a frequency-dependant mechanism. This interpretation is supported by the observation that the majority of detected alleles were present in low frequencies, and most of them were occurring in heterozygote genotypes. When considering the effects of selection shaping the distribution of MHC genes, it is important to take into account the potential occurrence of recombination, as it can influence the outcome of selection tests (Anisimova et al., 2003). In fact, presently, two recombination events were detected within the MHC-DQA locus, and no recombination events was detected for *MHC-DQB* gene based on RDP package analyses. One of the alleles involved in recombination in this dissertation was already shown to be recombinant in previous research of brown hares from Europe (Smith et al., 2011). On the other hand, presence of recombination according to PERMUTE statistics was indicated for both of the examined MHC genes. Based on PERMUTE statistics, similar values of population mutation rates were found for both MHC loci, while the recombination rate was almost five times higher at the MHC-DQB locus than the MHC-DQA locus. These findings are in agreement with results obtained for the same MHC loci examined in cape hares from Tunisia (Awadi et al., 2018b), which the authors explained due by a longer persistence of MHC-DQA diversity in their study populations, as compared to the MHC-DQB diversity that more likely had resulted from higher intra-locus recombination. Indeed, given the ratio of recombination to mutation rate, the results of this study also indicate that recombination was more important for shaping the diversity within the *MHC-DQB* genes, whereas point mutations were a more pronounced mechanism at the MHC-DQA locus. Given the fact that recombination seems to play an important role in MHC diversity of the examined brown hares, and that only the omegaMap approach accounts for the recombination in the selection detection tests simultaneously, a very stringent conservative approach was applied in this dissertation, in order to avoid any false positive results, by considering sites to evolve under positive selection, only if those codons were confirmed by at least one additional test among all applied approaches (PAML, omegaMap and Datamonkey). In the end, this rule resulted in three codons constantly proved to be under the positive selection for both genes. In both MHC genes, two of these codons were located within the peptide-binding region (PBR) as suggested by homology modelling to human the PBR according to Bondinas et al. (2007). In comparison to previous research in hares, codon sites proved under positive selection were also reported by other studies, eg. in a study of brown hares from Austria and Belgium (Gouy

de Bellocq et al., 2009; Smith et al., 2011). In comparison to selection analyses in MHC genes in cape hares from Tunisia (Awadi et al., 2018b), a high congruence was presently found at sites under positive selection revealed by omegaMap in the present study, while some differences were found when comparing other approaches applied in both studies. The selection mechanism on MHC genes is acting through a combination of balancing selection and diversifying selection, driven mainly as a consequence of differences in selection pressure of pathogens varying across time and space. Given that differences in climatic parameters may impose favourable or/and unfavourable conditions for parasites and pathogens, indirect climatic effects on MHC protein variants may be interpreted as genetic signals of local/regional adaptations to different pathogenic landscapes in heterogeneous environments. The effects of climatic parameters (temperature and precipitation) have already been demonstrated to have shaped significantly the distribution of DQA and DQB protein variants supposedly as a consequence of adaptation to local pathogenic landscapes in cape hares from Tunisia (Awadi et al., 2018b). In this dissertation, climatic parameters were proved to have a significant effect on the distribution of the most frequent protein variants in both MHC loci for the individuals within the European cluster, but no such effects were found for individuals from the Anatolia/Israel spatial group. Specifically, individuals heterozygous for DQA6 and DQB3 protein variants were more frequently occurring at locations with relatively low precipitation during the wet period of the year as compared to individuals not carrying these alleles, irrespective of the genotype for these variants. A climatic effect was also observed on the distribution of homozygous or heterozygous individuals carrying the DQA1 or DQA10 protein variants in comparison to individuals not having those alleles in their respective genotypes. Since those environmental factors, especially temperature, precipitation and humidity are known to affect the distribution of pathogens and parasites; it is plausible to interpret the findings as adaptations to locally varying immunogenetic landscapes. Since the distribution of some of the MHC protein variants was mainly related to the precipitation parameters, similarly to the distribution of ND6 protein variants, but also because of a significant differences in geographical distribution of these variants independently from climate, this result may also indicate a possible co adaptation of OXPHOS genes and immune genes, as it is already known that this co adaptation may arise from adaptations leading to higher energetic requirements in order to better fight the pathogens (West et al., 2011). On the other hand, no such effect of climate parameters was found for individuals in Anatolia/Israel, probably due to the low number of individuals examined, as the statistical model applied required a higher number of individuals

for the battery of independent variables used. Furthermore, no effect of heterozygosity was found to the distribution of the MHC protein variants, neither in both of the examined MHC loci, nor for Anatolia/Israel or Europe. A lack of a heterozygosity effect was also confirmed in study of cape hares from Tunisia (Awadi et al., 2018b). Having in mind everything stated above, it seems that balancing selection maintains the high allele diversity across the current study area through frequency dependent mechanism, while diversifying selection promotes local immunogenetic adaptations on small geographic scales presumably caused by regionally varying pathogenic landscapes. These results indicate that mechanisms and their contribution to the evolution of MHC genes are rather complex, but also that adaptation may occur even under little population divergence and high gene flow although the opposite has been postulated as a requirement for adaptations. However, it should be stressed that the current interpretations are drawn from indirect evidence of climate parameters, which are supposed to represent varying different pathogen distributions. Therefore, further studies based on pathogen distributions, infection analyses, and host-pathogen interactions are necessary to prove the current interpretations. Regarding the TLR2 gene, negative selection was found to be the predominant force shaping its variability, most likely as a consequence of being under strong functional constraints given the important role the analysed protein has for downstream signal cascades. The predominant effect of negative selection in shaping the evolution of the TIR domain in hares was already proved in the study of cape hares from Tunisia (Awadi et al., 2018a).

Conclusions: A high level of molecular diversity was found in brown hares from Europe and Anatolia/Israel based on the variability of mtDNA D loop sequences, *MT-ND2*, *MT-ND6*, *MHC-DQA*, *MHC-DQB* and *TLR2* genes. A strong signal of phylogeographical and spatial structuring was observed for mtDNA, most likely as a consequence of climatic perturbations during the late Pleistocene. The evolutionary development of hares from Anatolia/Israel to the Balkans, and furthermore to central and western Europe was suggested by several lines of evidence, which include dating the population demography based on D-loop sequences, the observed migration patterns, results of demographic tests, and apparent reduction in molecular diversity indices along this spatial and evolutionary trajectory. Positive selection acting on *MT-ND6* gene was detected, together with significant climatic effects shaping the distribution of the most prevalent protein variants found in this gene, supposedly as a consequence of local/regional adaptations due to the environmentally induced different energetic requirements and optimization of OXPHOS genes. On the other hand, a clearly less pronounced phylogeographical signal and absence of strong spatial structuring was revealed

in the studied MHC genes. High diversity at MHC genes seems to be shaped by the interplay of recombination, selection mechanisms and adaptations. Balancing selection seems to maintain a high molecular diversity within these genes, while directional selection supposedly promotes local/regional adaptations to pathogenic landscapes, as indirectly suggested by a significant effect of climatic parameters on the spatial distribution of protein variants in both examined MHC genes. Results of this thesis suggest that when defining management strategies for this species, contrasting results of different applied molecular markers must be taken into account. Therefore, conserving the historically shaped diversity means the recognition of three evolutionary-significant units represented by detected haplogroups based on mtDNA analyses, while not disturbing the local adaptation occurring on a microgeographic scale, as revealed by the analyses of adaptive functional genetic variability.

BIOGRAFIJA



Milomir Stefanović rođen je 2.maja 1985. godine u Čačku. Nakon završene osnovne škole i gimnazije prirodno-matematičkog smera, upisuje studije medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Novom Sadu upisuje 2008. godine na studijskom programu diplomirani biolog (modul: molekularni biolog). Diplomirao je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,54, kada upisuje i diplomatske master studije na istom fakultetu, na studijskom programu diplomirani biolog master - molekularni biolog. Diplomirao je 2014. godine sa prosečnom ocenom 10,00 odbranivši master rad pod nazivom “Molekularni diverzitet vrste *Lepus europaeus* (Pallas, 1778)”. Doktorske studije na studijskom programu Doktor nauka – biološke nauke upisao je 2014. godine, i položio je sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10,00.

Od 2014. godine radi kao istraživač-pripravnik, a od 2017. godine kao asistent za užu oblast Genetika na Departmanu za biologiju i ekologiju Prirodno-matematičkog fakulteta Univerziteta u Novom Sadu. Tokom doktorskih studija boravio je na više od deset istraživačkih poseta Univerzitetu veterinarske medicine u Beču. Učestvovao je na pet nacionalnih projekata, kao i na dva međunarodna projekta. Kao autor ili koautor objavio je deset radova u časopisima indeksiranim na SCI listi, i više od 50 saopštenja sa međunarodnih skupova. Dobitnik je nagrade Departmana za biologiju i ekologiju za najboljeg asistenta u školskoj 2017/18. godini, prema oceni studenata.

Tokom osnovnih studija boravio je na stipendiranom istraživačkom programu na institutu “Robert Giffard” Laval Univerziteta u Kvebeku (Kanada). Učestvovao je na pet međunarodnih škola za obradu molekularnih i genomskih podataka u Nemačkoj i Francuskoj. Dobitnik je *One-Month-Visit* stipendije Austrijskog Federalnog Ministarstva za obrazovanje, nauku i istraživanje. Dobitnik je Izuzetne nagrade Univerziteta u Novom Sadu za naučni i stručni rad studenata u školskoj 2011/2012. godini. Dobitnik je prve nagrade za najbolju prezentaciju na Drugom međunarodnom kongresu šakala i srodnih vrsta (2018, Atina, Grčka), kao i druge nagrade za najbolje usmeno izlaganje na 8. međunarodnom kongresu mladih lekara i studenata medicine (2008, Kluž Napoka, Rumunija).

Član je Društva genetičara Srbije, Srpskog društva za molekularnu biologiju i World Lagomorph Society.

Govori engleski i španski jezik.



UNIVERZITET U NOVOM SADU
PRIRODNO-MATEMATIČKI FAKULTET



KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

Redni broj: RD	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada: VR	Doktorska disertacija
Autor: AU	Milomir Stefanović
Mentor: MN	dr Mihajla Đan, dr Franz Suchentrunk
Naslov rada: NR	Molekularni diverzitet i genetički signali lokalnih adaptacija vrste <i>Lepus europaeus</i> Pallas, 1778 u heterogenim uslovima sredine
Jezik publikacije: JP	Srpski (latinično pismo) sa proširenim izvodom na engleskom jeziku
Jezik izvoda: JI	srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2020
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Trg Dositeja Obradovića 2
Fizički opis rada: FO	poglavlja (10), strana (165), tabela (30), slika (20), literarnih navoda (221), priloga (8), produženi abstrakt na engleskom (1)
Naučna oblast: NO	Biologija
Naučna disciplina: ND	Genetika

Ključne reči: *Lepus europaeus*, filogeografija, imunogenetika, selekcija, MHC, mtDNK, molekularni diverzitet

Univer. Dec. klasifikacija:
UDK

Čuva se: Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet,
ČU Novi Sad

Važna napomena:
VN

Izvod:
IZ

U ovom radu sagledan je molekularni diverzitet, filogeografska struktura, prostorna distribucija molekularnog diverziteta, kao i prisustvo selekcionih signala i genetičkih signala lokalnih adaptacija kod 251 jedinke vrste *Lepus europaeus* (Pallas, 1778) sa teritorije Evrope i Bliskog Istoka, a na osnovu analize varijabilnosti sekvenci D petlje mtDNK, *MT-ND2*, *MT-ND6*, *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena. Uočen je visok nivo parametara molekularnog diverziteta za sve ispitivane molekularne markere. Utvrđeno je postojanje filogeografske strukturiranosti vrste na osnovu mtDNK, kao i asimetričan protok gena jedinki sa teritorije Anadolije na teritoriju Balkana na osnovu D petlje mtDNK, *MT-ND2* i *MT-ND6* gena, dok je na osnovu sekvenci D petlje mtDNK uočena gotovo tri puta veća stopa protoka gena sa Balkana u centralnu i zapadnu Evropu. Utvrđeno je prisustvo signala poizivne selekcije u okviru *MT-ND6* gena, kao i efekat klimatskih parametara (precipitacije) na distribuciju proteinskih varijanti ND6C i ND6F, kao moguća posledica regionalnih adaptacija na razlike u sredinskim uslovima. Pokazano je odsustvo signala filogeografske strukturiranosti na osnovu *MHC-DQA*, *MHC-DQB* i *TLR2* gena. Uočeno je postojanje prostorne strukturiranosti na osnovu gena imunskog sistema, i definisane su dve prostorne grupe, jedna koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Bliskog Istoka, i druga koja je obuhvatala jedinke sa teritorije Evrope. Više vrednosti parametara molekularnog diverziteta uočene su u anadolijskoj grupi, u poređenju sa evropskom grupom. Uočen je signal delovanja pozitivne i negativne selekcije u *MHC-DQA* i *MHC-DQB* genima, kao i signal negativne selekcije u *TLR2* genu. Pokazan je efekat klimatskih parametara na distribuciju najzastupljenijih proteinskih varijanti *MHC-DQA* i *MHC-DQB* gena kao indirektni pokazatelj imunogenetičkih adaptacija na sredinski uslovljene pretpostavljene razlike u distribuciji patogena. Mehanizam oblikovanja varijabilnosti MHC gena rezultat je uzajamnog delovanja mutacija, rekombinacija i selekcije.

Datum prihvatanja teme od strane NN veća:
DP 15.06.2017.

Datum odbrane:
DO

Članovi komisije:
KO

predsednik: dr Dejan Beuković, docent
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

član: dr Mihailo Jelić, docent,
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

mentor: dr Mihajla Đan, redovni profesor,
Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

mentor: dr Franc Zuhentrunk, naučni savetnik
Univerzitet veterinarske medicine u Beču



UNIVERSITY OF NOVI SAD
FACULTY OF SCIENCES



KEY WORDS DOCUMENTATION

Accession number:
AN

Identification number:
INO

Document type: Monograph type
DT

Type of record: Printed text
TR

Contents code: PhD Thesis
CC

Author: Milomir Stefanović
AU

Mentor: dr Mihajla Đan, dr Franz Suchentrunk
MN

Title: Molecular diversity and genetic signatures of local adaptations in brown hares
(*Lepus europaeus* Pallas, 1778) from heterogenous landscapes
TL

Language of text: Serbian (Latin alphabet) with extended abstract in English
LT

Language of abstract: Serbian (Latin alphabet) / English (Latin alphabet)
LA

Country of publication: Republic of Serbia
CP

Locality of publication: Vojvodina
LP

Publication year: 2020
PY

Publisher: Autor's reprint
PU

Publication place: Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Dositej
Obradovic Sq 2
PP

Physical description: Chapters (10), pages (165), tables (30), figures (20), references (221),
supplements (8), extended abstract in English (1)
PD

Scientific filed: Biology
SF

Scientific discipline: Genetics
SD

Key words: *Lepus europaeus*, phylogeography, immunogenetics, selection, MHC, mtDNA, molecular diversity
KW

Univer. Dec. classifications:
UDC

Holding data: The Library of Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences,
HD Dositelj Obradovic Sq 2, Novi Sad

Note:
N

Abstract: In this doctoral dissertation, molecular diversity, phylogeographic structure, AB
spatial distribution of molecular diversity, detection of possible selection signals shaping the evolution of these genes, as well as the presence of local/regional adaptations in correlation was examined in 251 brown hares from Europe and the Middle East based on the analyses of mitochondrial D loop, mitochondrially Encoded NADH Dehydrogenase 2 (*MT-ND2*), mitochondrially Encoded NADH Dehydrogenase 6 (*MT-ND6*), exon 2 of MHC Class II genes *MHC-DQA*, *MHC-DQB* and Toll Like Receptor 2 (*TLR2*) gene sequences. A high level of molecular diversity was found based on the all applied markers. Strong signal of phylogeographical and spatial structuring was observed for mtDNA, most likely as a consequence of climatic perturbations during the Pleistocene. The evolutionary development of hares from Anatolia/Israel to the Balkans, and furthermore to central and western Europe was suggested by several lines of evidences, which include dating the population demography based on D-loop sequences, the observed migration patterns, results of demographic tests, and apparent reduction in molecular diversity indices along this trajectory. Positive selection acting on *MT-ND6* gene was detected, together with significant climatic effect shaping the distribution of the most prevalent protein variants found in this gene, supposedly as a consequence to local/regional adaptations due to the environmentally induced different energetic requirements and optimization of OXPHOS genes. On the other side, less evident phylogeographic signal and absence of strong structuring was revealed in MHC genes. High diversity at MHC genes seems to be shaped by the interplay of recombination, selection mechanisms and adaptations. Balancing selection seems to maintain a high molecular diversity within these genes, while directional selection promotes local/regional adaptations to pathogenic landscapes, as indirectly suggested by a significant effect of climatic parameters on the distribution of protein variants in both examined MHC genes.

Accepted by the Scientific
Board on:
ASB

June 15th 2017

Defended on:
DE

Thesis defend board:
DB

president: dr Dejan Beuković, assistant professor
Faculty of Agriculture, University of Novi Sad

member: dr Mihailo Jelić, assistant professor,
Faculty of Biology, University of Belgrade

supervisor: dr Mihajla Đan, full professor,
Faculty of Sciences, University of Novi Sad

supervisor: dr Franz Suchentrunk, senior scientist
University of Veterinary Medicine Vienna
