



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



Nevena Veličković

**Genetička analiza populacione strukture i filogeografija  
divlje svinje (*Sus scrofa* Linnaeus, 1758)**

- doktorska disertacija -

Novi Sad, 2014.



UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES  
DEPARTMENT OF BIOLOGY AND ECOLOGY



Nevena Veličković

**Wide genetic approach of the wild boar (*Sus scrofa*  
Linnaeus, 1758) population structure and  
phylogeography**

- PhD Thesis -

Novi Sad, 2014.

## **Zahvalnica**

*Istraživanje obuhvaćeno ovom doktorskom disertacijom urađeno je u Laboratoriji za Genetiku, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu i Laboratoriji za Animalnu Genetiku, Departmana za Biologiju, Univerziteta u Aveiru, Portugalija.*

*Veliko hvala mom mentoru **dr Mihajli Đan**, vanrednom profesoru PMF-a u Novom Sadu, na nesebičnoj podršci, pomoći i poverenju koje je imala u mene pri izradi ove doktorske disertacije. Hvala za energiju, pažnju, strpljenje, savete i sve što sam naučila tokom ovih godina.*

*Hvala **dr Dragani Obreht**, vanrednom profesoru PMF-a u Novom Sadu, od koje sam puno toga naučila. Hvala na značajnim sugestijama, pomoći i uputstvima radi poboljšanja kvaliteta rada.*

*Hvala **dr Milošu Beukoviću**, vanrednom profesoru Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, na pruženoj pažnji i na materijalnoj podršci u toku istraživanja.*

*Hvala **dr Carlos Fonseca**, vanrednom profesoru Departmana za biologiju u Aveiru, na ukazanoj pomoći i podršci tokom rada, sakupljenim uzorcima i što me je nesebično primio u svoj tim i omogućio da deo doktorske disertacije uradim korišćenjem savremenih metoda u Laboratoriji za Animalnu Genetiku, Univerziteta u Aveiru u Portugaliji.*

*Neizmerno hvala profesorki **dr Ljiljani Vapi** na svemu što me je naučila, na dragocenim ljudskim i stručnim savetima i pomoći tokom studiranja i rada.*

*Zahvaljujem se kolegi i prijatelju **dr Eduardo Ferreira** iz Laboratorije za Genetiku u Aveiru za svu podršku i interesovanje za moj rad, na idejama i sugestijama u planiranju i izvođenju eksperimentalnog dela, obradi podataka, prezentaciji rezultata, kao i u pisanju teze.*

*Hvala kolegini i prijatelju **Maji Oberman** za svesrdnu pomoć u toku laboratorijskog rada. Hvala koleginicama **Nataši Kočiš Tubić**, **Nataši Jovanović** i **Dunji Popović** na nesebičnoj pomoći kad god je zatrebalo i na prijateljskoj podršci.*

*Hvala kolegama i prijateljima iz Laboratorije u Portugaliji, **Rita Rocha, Tania Baros, Rita Torres, Victor Bandeira, Ana Valente**, koji su uvek bili tu da priteknu u pomoć i pruže podršku.*

*Hvala **Federalnoj Evropskoj Biohemijskoj Zajednici (FEBS – Federal European Biochemical Society)** za finansijsku podršku da deo doktorata uradim u Laboratoriji za Animalnu Genetiku, Univerziteta u Aveiru u Portugaliji.*

*Hvala **Lovačkom Savezu Vojvodine** na materijalnoj podršci za deo eksperimentalnog rada.*

*Za prikupljanje uzoraka na Balkanu zahvalna sam: **prof. dr Mladenu Gagrčinu** sa Poljoprivrednog fakulteta u Novom Sadu, **dr Zoranu Ristiću** direktoru Veretinarskog Instituta u Jagodini, **dr Draganu Rogožarskom** iz Veterinarskog Instituta u Požarevcu, **dr Vlastimiru Adamoviću** iz Veterinarske stanice u Velikom Gradištu, **dr Ranku Saviću** iz Veterinarske stanice u Pljevlji, **dr Darku Cijoviću** iz Veterinarske ambulante u Bjelom Polju, **dr Nebojši Goraševiću** iz Veterinarske ambulante u Nikšiću, kolegici **Ivoni Panić** sa Veterinarskog Instituta u Banja Luci, **prof. dr Albertu Marinculiću** sa Veterinarskog fakulteta u Zagrebu, **prof. dr Vladimiru Maletiću** sa Šumarskog fakulteta u Skoplju, kolegi **Matiji Stergar** sa Šumarskog fakulteta u Ljubljani, **Verici Stevanović**, zaposlenima u **javnom preduzeću Vojvodinašume**, veterinarima i upravnicima lovišta u Vojvodini. Za sakupljanje uzoraka u Italiji zahvalna sam kolegi **Andrea Monaco**. Za uzorke sa Iberijskog poluostrva zahvalnost dugujem **prof. dr Carlos Fonseca**. Kolega **Martin Ernst** iz Češke je sakupio uzorke iz Centralne Evrope. Bez podrške svih nabrojanih i još mnogih drugih ne bi bilo moguće na ovaj način realizovati doktorsku disertaciju.*

*Najveću zahvalnost upućujem mojim roditeljima, sestri Mili i njenoj porodici, za ljubav, podršku, razumevanje i strpljenje koje mi bezrezervno pružaju.*

*Milanu hvala za ljubav i nesebično razumevanje.*

*Novi Sad, 2014.*

*Nevena Veličković*

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. PREGLED LITERATURE .....	4
2.1. Analiza genetičkog diverziteta u prirodnim populacijama .....	4
2.2. Mikrosateliti kao molekularni markeri .....	6
2.3. Mitohondrijalna DNK kao molekularni marker .....	8
2.4. Populaciono genetičke analize u populacijama divlje svinje.....	9
2.5. Opšte karakteristike vrste <i>Sus scrofa</i> .....	14
3. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	17
4. RADNA HIPOTEZA .....	20
5. MATERIJAL I METODE .....	21
5.1. Materijal .....	21
5.2. Metode .....	22
5.2.1. Izolacija DNK .....	22
5.2.2. Analiza polimorfnosti mikrosatelita .....	24
5.2.3. Analiza sekvenci kontrolnog regiona mtDNK.....	25
5.3. Statistička obrada podataka.....	27
5.3.1. Analiza mikrosatelitskih podataka.....	27
5.3.2. Analiza sekvenci kontrolnog regiona mitohondrijalne DNK .....	32
6. REZULTATI.....	36
6.1. Genetička varijabilnost i struktura populacija divlje svinje u Evropi na osnovu analize mikrosatelitskih lokusa .....	36
6.1.1. STRUCTURE analiza u populacijama divlje svinje u Evropi.....	36
6.1.2. Geneland analiza u populacijama divlje svinje u Evropi .....	44
6.1.3. TESS analiza u populacijama divlje svinje u Evropi.....	48
6.1.5. Migranti i hibridi u definisanim subpopulacijama divlje svinje .....	59
6.1.7. Bottleneck analiza u subpopulacijama divlje svinje .....	66
6.1.8. Polimorfnost mikrosatelita i genetička diferencijacija subpopulacija divlje svinje u Evropi .....	70
6.2. Genetička varijabilnost i struktura populacija divlje svinje na osnovu analize kontrolnog regiona mtDNK .....	80
6.2.1. Genetička varijabilnost i struktura populacija divlje svinje na Balkanu na osnovu analize mtDNK .....	80
6.2.2. Varijabilnost kontrolnog regiona mtDNK divljih svinja u Evropsko/Evroazijskom kontekstu.....	86
6.2.3. Filogenetička i filogeografska analiza u populacijama divlje svinje u Evropi i Evroaziji.....	89
7. DISKUSIJA .....	91

7.1. Genetički diverzitet i struktura populacija divlje svinje u Evropi na osnovu analize polimorfnosti mikrosatelita .....	92
7.1.1. Struktura populacija divlje svinje u Evropi .....	92
7.1.2. Prolazak subpopulacija divlje svinje u Evropi kroz usko grlo.....	101
7.1.3. Genetička varijabilnost i diferencijacija subpopulacija divlje svinje u Evropi.....	103
7.2. Genetički diverzitet i struktura populacija divlje svinje na Balkanu na osnovu analize mtDNK .....	106
7.3. Demografska istorija divlje svinje u Evropi na osnovu analize mtDNK.....	109
7.4. Uloga Balkana u biogeografiji divlje svinje u Evropi .....	110
7.5. Uticaj čoveka na genetički diverzitet divljih svinja u Evropi .....	112
8. ZAKLJUČAK .....	116
9. LITERATURA .....	118
10. PRILOG I.....	135
11. EXTENDED ABSTRACT IN ENGLISH .....	157

## Skraćenice korištene u tekstu

**SDS** – natrijum dodecil sulfat

**EDTA** – etidijum diamid tetra sirćetna kiselina

**Tris** – Tris (hidroksimetil) aminoetan

**TE pufer** – Tris-EDTA pufer

**dNTPs** – deoksinukleotid tri fosfati

**Taq** – DNK polimeraza *T. Aquaticus*

**BSA** –Bovine Serum Albumine

**TAE** – Tris Aid EDTA

**TBE** – Tris Borat EDTA

## 1. UVOD

Divlja svinja (*Sus scopa* Linnaeus 1758) je jedna od najzastupljenijih vrsta krupnih sisara u Evropi i predstavlja veoma važnu vrstu divljači u ekološkom i ekonomskom smislu (Randi, 2005; Oliver i Leus, 2008). Pre oko jednog veka, populacije divlje svinje pretrpele su značajan pad brojnosti i lokalna istrebljenja u nekim delovima Evrope usled uticaja čoveka na ekosistem, kao što su intenzivno bavljenje lovom, promene u poljoprivrednoj praksi, izmene staništa i drugo (Appolonio i sar., 1988; Massei i Genov, 2000; Appolonio i sar., 2010; Linnel i Zachos, 2011). U toku poslednjih četrdeset godina divlja svinja je ponovo naselila veći deo svog prirodnog staništa i zapaža se trend naglog povećanja gustine populacija (Fonseca, 2004; Ferreira i sar. 2009; Appolonio i sar., 2010; Scandura i sar., 2011). Krajem devetnaestog veka, sa lokalnim istrebljenjem mnogih vrsta, razvila se svest o značaju zaštite prirodnih populacija (Primack, 2012). Klasičnim metodama analizirane su prirodne populacije i određivani su prioriteti u njihovoj zaštiti. U skorije vreme, sa razvojem tehnika molekularne biologije omogućeni su novi pristupi u menadžmentu i konzervaciji prirodnih populacija (DeYoung i Honeycutt, 2005). Većina populaciono genetičkih istraživanja rađena je u okviru populacija sa malim stepenom rasprostranjenosti koje najčešće karakteriše visok nivo inbridinga kao posledica genetičkog drifta (Frankham i sar., 2010; Tammelaht i sar., 2010). Studije koje se bave genetičkom strukturom kontinuirano rasprostranjenih populacija koje karakteriše velika brojnost i demografski rast su retke. Međutim, i u ovim populacijama se može očekivati struktuiranost i genetička raznolikost unutar grupa, te pojave kao što su introdukcija različitih genotipova mogu da dovedu do promene genetičke strukture i do negativnih posledica u lokalno adaptiranim populacijama (Frankham i sar., 2010; Linnel i Zachos, 2011). Reintrodukcija vrsta na staništa sa kojih su one prethodno bile istrebljene se često dešava bez poznavanja genetičkog potencijala jedinki, što dovodi do nastanka genetičkih diskontinuiteta (Linnel i Zachos, 2011).

Kvartarne klimatske oscilacije, a naročito poslednja glacijacija, praćena toplim periodom, doveli su do vidljivih promena genetičke varijabilnosti i geografske rasprostranjenosti mnogih biljnih i životinjskih vrsta (Hewitt, 2000, 2004). Tokom



poslednje glacijacije, usled prisustva ledenog pokrivača u severnim delovima Evrope, mnoge vrste su bile istrebljene na severu i preživele samo u južnim delovima Evrope koji su predstavljali refugijume, i odakle su vrste ponovo naselile Evropu u toku interglacijalnih toplih perioda (Hewitt, 1999, 2000). Tri južna poluostrva Evrope (Balkansko, Iberijsko i Apeninsko) predstavljali su glavne refugijume za veliki broj vrsta (Taberlet i sar., 1998; Hewit, 1999, 2004), pa tako i za divlje svinje. Zbog odsustva velikih geografskih barijera ka severu, smatra se da je primarna post-glacijalna rekolonizacija Evrope različitim vrstama krenula sa Balkana, te se zbog toga Balkan smatra primarnim genetičkim rezervoarom (Hewitt, 1999; Kasapidis i sar., 2005; Stamatis i sar., 2009; Alexandri i sar., 2012).

Jedan od najvažnijih aspekata razvoja adekvatnih strategija menadžmenta prirodnih populacija jeste poznavanje genetičkog diverziteta i strukture populacija. Na osnovu podataka o genetičkoj varijabilnosti vrste primenom različitih molekularnih markera mogu se razviti strategije biološke konzervacije i menadžmenta prirodnih populacija. U toku poslednje decenije raste naučno i praktično interesovanje za populacije krupnih sisara i njihovu konzervaciju i menadžment u Evropi, a najverovatnije zbog povećane potrebe za razvojem strategija upravljanja vrstom koje su zasnovane na naučnim činjenicama (Zachos i Hackländer, 2011). Ova potreba proizilazi iz rastućih sukoba između interesa čoveka i ekspanzije populacija velikih karnivora i herbivora, koja neminovno ima negativne efekte na populacije domaćih životinja i dovodi do brojnih šteta u poljoprivrednim i šumskim ekosistemima (Randi, 2011; Appolonio i sar., 2010). S obzirom da su populacije divlje svinje u Evropi u stalnom porastu, strategije upravljanja ovom vrstom treba zasnovati na potpunom razumevanju faktora koji određuju adaptabilnost vrste na širok spektar uslova spoljašnje sredine. Zbog toga je detaljan uvid u genetički diverzitet divlje svinje od izuzetnog značaja, a posebno je važno razumevanje kako su kvartarne oscilacije, u prošlosti, i antropogeni faktori, tokom poslednjeg veka, uticali na genetički diverzitet i demografsku strukturu ove vrste.

Jedan od mogućih pristupa u istraživanju genetičke varijabilnosti populacija divljih životinja je analiza polimorfnosti mikrosatelita. Veliki broj alela koji se nalazi u hipervarijabilnim mikrosatelitskim lokusima može da otkrije razlike između populacija i

individua iste vrste, naročito kombinovanjem većeg broja lokusa. Ovakav pristup omogućava izučavanje strukture populacija, procenu kretanja populacija, stepena srodstva, fragmentisanosti populacija, broja migranata, procenu efektivne veličine populacije i definisanje jedinica ekološkog menadžmenta (Wan i sar., 2004; Leberg, 2005; Olivieri i sar., 2008; Orsini i sar., 2008).

Pored mikrosatelita, mitohondijalni genom predstavlja veoma važan genetički marker u populacionoj genetici i evoluciji. Obzirom da je u osnovi haploidan i da se prenosi gotovo uvek uniparentalno, mtDNK je dobar molekularni marker u istraživanjima filogenetike, filogeografije i istorije vrste, procesa introgresije i hibridizacije, ali takođe može biti dodatni marker za procenu genetičkog diverziteta i strukture populacija (DeYoung i Honeycutt, 2005). Uporedne analize nuklearnog i mitohondrijalnog genoma daju najkorisnije rezultate za populaciono genetička istraživanja i omogućavaju direktnu primenu rezultata u menadžmentu i konzervaciji populacija divljači, što može da ima izuzetan značaj kako za zaštitu biodiverziteta, tako i za lovnu ekonomiju.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Analiza genetičkog diverziteta u prirodnim populacijama

Genetička varijabilnost prirodnih populacija se može sagledavati na dva nivoa: (a) genetička varijabilnost između jedinki lokalno adaptiranih populacija i (b) genetička varijabilnost između različitih populacija jedne vrste. Procena genetičke varijabilnosti populacija omogućava sagledavanje demografske strukture i evolucione istorije vrste. Na primer, gubitak genetičkog diverziteta može da ukazuje na prolazak populacija kroz usko grlo (bottleneck efekat). Genetička divergentnost između populacija ukazuje na broj genetičkih razlika među njima i ima važnu ulogu pri konzervaciji i menadžmetu prirodnih populacija.

Razvojem i stalnim napretkom metoda molekularne biologije, omogućeno je da se genetička varijabilnost prirodnih populacija proučava analizom varijabilnosti proteinskih molekula (alozimska varijabilnost) i varijabilnosti na nivou DNK. Veliki napredak u razumevanju genetičke varijabilnosti prirodnih populacija počeo je sredinom šezdesetih godina prošlog veka sa razvojem tehnike elektroforeze proteinskih molekula (Powell, 1994). Obzirom da proteini predstavljaju direktne produkte gena, analizom njihove varijabilnosti vrši se neposredna procena genetičkog diverziteta vrsta (Lewontin, 1974). Iako se analizom proteinskih markera otkriva samo deo ukupnog genetičkog diverziteta, ova metoda se i dalje primenjuje u populaciono genetičkim studijama, s obzirom da je jednostavna za izvođenje, brza, pouzdana i ekonomična (Frankham i sar., 2002; Bertorelle i sar., 2009). Analiza polimorfnosti sekvenci DNK molekula daje najkorisnije informacije u populaciono genetičkim studijama. Prednosti analize genetičkog diverziteta na nivou DNK su višestruke. Sekvenca DNK je mnogo informativnija u odnosu na aminokiselinsku sekvencu proteina, svaki segment DNK molekula nosi određen stepen polimorfnosti i okvir ovakve analize nije vezan samo za protein-kodirajuće regione genoma, već je moguće sagledavati genetičku varijabilnost i u nekodirajućim regionima genoma. Automatizacija procesa analize DNK molekula omogućila je razvoj velikog broja molekularnih markera.

Osnova većine metoda za analizu genetičke varijabilnosti na nivou DNK molekula je lančana reakcija polimeraze (PCR – Polymerase Chain Reaction). Razvojem PCR tehnologije omogućeno je da se u relativno kratkom vremenskom periodu analizira veliki broj DNK fragmenata, odnosno genetičkih markera, tako da je PCR metoda postala nezaobilazni deo istraživanja u oblastima molekularne biologije i genetike. Zajedno sa produkcijom širokog opsega molekularnih podataka razvijene su statističke metode za njihovu analizu.

Najvažniji doprinos populacione genetike u zaštiti biodiverziteta i razvoju adekvatnih strategija upravljanja je da značajno povećamo naše poznavanje različitih aspekata određene vrste, uključujući ponašanje vrste, ekologiju i evoluciju (Avisé, 1996; Holsinger, 1996; Mace i sar., 1996; Reed, 2007). U tom smislu, razvojem velikog broja genetičkih markera i odgovarajućih analitičkih metoda omogućeno je stvaranje sinergije između populacione genetike i konzervacione biologije. Analiza molekularnih markera u kombinaciji sa teorijskim znanjima iz populacione genetike se može koristiti za otkrivanje i predlaganje rešenja, ne samo kada se govori o inbridingu i gubitku genetičkog diverziteta, već i o problemima kao što su hibridizacija između jedinki koje pripadaju različitim lokalno adaptiranim populacijama, struktuiranost populacija, taksonomska pitanja, definisanje mesta reintrodukcije i odgovarajućih genotpova i populacija za takve intervencije (Moritz, 1999, 2002; Ballou i Lacy, 1995; Avisé i Hamrick, 1996; Mace i sar., 1996; Pritchard i sar., 2000; Frankham i sar., 2002; Wilson i Rannala, 2003; DeSalle i Amato 2004; Gaggiotti i sar., 2004). Pored toga, koristeći molekularno-genetičke podatke i matematičke modele omogućeno je da se znanje o biologiji određenih vrsta u velikoj meri poveća, jer je moguće proceniti parametre kao što su efektivna veličina populacije, gustina populacije, fragmentisanost, protok gena, genetički drift, genetički diverzitet, odnos polova, stopa inbridinga, efekat uskog grla, struktura populacija i pedigre analize (Allendorf i Leary, 1986; Templeton, 1998; Luikart i Cornuet, 1998; Ellegren, 1999; Hedrick i Kalinovski, 2000).

Kada se govori o prirodnim populacijama papkara, molekularna genetika pruža mogućnost za razvoj i primenu dijagnostičkih markera koji se mogu koristiti za procenu genetičkog diverziteta i uticaja reintrodukcija i translokacija jedinki na prirodne

populacije. Veoma je važno da translokacije jedinki budu strogo kontrolisane i zasnovane na populaciono genetičkim i filogeografskim analizama. Molekularno-genetički markeri se mogu koristiti za određivanje genetičkog diverziteta lokalno adaptiranih populacija, rekonstrukciju filogeografske istorije vrste, otkrivanje intra- i inter-specijskih hibridizacija, kao i hibrida između divljih i domaćih srodnika (Awise i Hamrick, 1996).

## 2.2. Mikrosateliti kao molekularni markeri

Mikrosateliti su segmenti DNK molekula sačinjeni od nekoliko uzastopno ponovljivih motiva koji se sastoje od 2 do 6 baznih parova, kodominantno se nasleđuju prema Mendelovim principima nasleđivanja i pokazuju visok stepen polimorfnosti, čak i u malim populacijama, što ih čini pogodnim molekularnim markerima. Mogu biti zastupljeni u različitom rasporedu i procentu u okviru pojedinih genoma i mogu se sresti duž čitavog genoma svih eukariota. Stopa mutacije mikrosatelitskih sekvenci iznosi  $10^{-6}$  do  $10^{-2}$  po generaciji, što je značajno više od stope bazne supstitucije. Mutacije u okviru mikrosatelitskih lokusa uglavnom rezultuju u promeni u broju ponovaka (najčešće gubitak ili dodatak jednog repetitivog motiva), zbog čega je broj alela jednog mikrosatelitskog lokusa obično veoma visok. Osim toga, utvrđeno je da stopa mutacije zavisi od tipa mikrosatelita i da nije jedinstvena za sve lokuse. Faktori od kojih zavisi stopa mutacije su dužina ponovljive jedinice, sekvenca ponovljivog motiva, broj ponovaka, stopa rekombinacija, uzvodne i nizvodne sekvence, prekidi mikrosatelita, nivo transkripcije itd. Ako je broj ponovaka ključni faktor određivanja evolucione dinamike mikrosatelitske DNK, važno je ispitati koji parametri utiču na dužinu mikrosatelita. Poređenja između vrsta pokazuju da mikrosatelitski lokusi mogu biti konzervirani dugo tokom evolucionog perioda (Schlötterer i sar., 1991; Rico i sar., 1996). Broj ponovaka nikada nije dostigao ekstremne vrednosti pri ovim poređenjima. Ovaj nedostatak jako dugačkih mikrosatelita uzet je kao dokaz da selekcija favorizuje mikrosatelite pouzdane dužine (Bowcock i sar., 1994; Garya i sar., 1995; Nauta i Weissing, 1996).

Skoro slučajna distribucija mikrosatelita u genomima i visok nivo polimorfnosti poslužio je u konstrukciji genetičkih mapa različitih organizama i pozicioniranju pojedinih

gena u genomu. Skoro istovremeno, mikrosateliti su se pokazali kao najefikasniji markeri u postupku utvrđivanja očinstva i identifikacije individua (Schlötterer, 2000). Takođe, razvojem novih laboratorijskih tehnika mikrosateliti su našli primenu u potpuno novim poljima istraživanja, kao što su analiza uzoraka sa malom i ograničenom količinom DNK (npr. analize socijalnih insekata) ili degradiranom DNK (npr. DNK iz fecesa ili muzejskih ekspanata). Sa razvojem PCR tehnologije, mikrosateliti postaju veoma popularni genetički markeri. Danas je proces analize mikrosatelitskih markera delimično automatizovan i moguće je analizirati veći broj mikrosatelitskih lokusa u samo jednoj PCR reakciji.

Svaki mikrosatelitski marker se može posmatrati kao uzorak genoma, s obzirom da zbog prisustva rekombinacija, selekcije i genetičkog drifta različiti geni i genski regioni mogu imati drugačiju genealošku istoriju (Selkoe i Toonen, 2006). Međutim, genetička ispitivanja samo jednog mikrosatelitskog lokusa bi dovele do velike greške uzorka. Stoga, kombinovanjem većeg broja lokusa ustvari se uzimaju višestruki uzorci genoma, čime se omogućava dobijanje preciznijih rezultata o populacijama i jedinkama jedne vrste. Pored toga, statističke metode koje su od interesa za populacione biologe često zahtevaju analizu većeg broja lokusa (Pearse i Crandall, 2004).

U poslednjoj deceniji mikrosatelitski markeri su se pokazali korisnim u studijama prirodnih populacija divljači. Veliki broj alela koji se nalazi u hipervarijabilnim mikrosatelitskim lokusima omogućava da se utvrde razlike između populacija i individua iste vrste, posebno ako se analizira veći broj lokusa. Ovakav pristup omogućava uvid u određivanje porekla pojedinačne populacije i pogodan je za utvrđivanje genetičkih razlika između populacija. Granične sekvence mikrosatelita su najčešće visoko konzervirane unutar vrste, pa čak i između različitih vrsta, a istovremeno i specifične za određeni mikrosatelitski lokus. Razvoj i otkriće odgovarajućih molekularnih markera koji su informativni za populaciono genetičke studije je dugotrajan i skup proces, tako da se u istraživanjima populacija divlje svinje najčešće koriste markeri koji su otkriveni kod domaće svinje, *Sus scrofa domestica*. Danas postoji mogućnost analize genetičke varijabilnosti divlje svinje savremenim metodama koje podrazumevaju istovremenu analizu većeg broja mikrosatelitskih lokusa čime se povećava pouzdanost dobijenih rezultata i skraćuje vreme potrebno za analizu. Nemačka kompanija "BioType" proizvodi komplet

hemikalija koji se koristi isključivo za genetičke analize populacija domaće i divlje svinje.

### **2.3. Mitohondrijalna DNK kao molekularni marker**

Mitohondrijalni genom sisara je cirkularni dvolančani DNK molekul i predstavlja genetički marker od velikog značaja u populacionoj genetici i evoluciji, jer je u osnovi haploidan i nasleđuje se gotovo uvek materinski. Odsustvo rekombinacija i uniparentalno nasleđivanje omogućavaju da se bilo koji blok lokusa mitohondrijalnog genoma posmatra kao jedan haplotip. Mitohondrijalna DNK se karakteriše visokom polimorfnošću između vrsta i predstavlja dobar model sistem za primenu filogenetičkog načina razmišljanja na mikroevolutivnom nivou (Avice i sar., 1987). Obzirom na odsustvo rekombinacija, mtDNK predstavlja molekularni marker od posebnog interesa za procenu filogenetičke i filogeografske istorije vrste (Avice, 2004).

Kada govorimo o analizi mtDNK, teorija relativno konstantnih stopa mutacija (molekularni sat) (Lushai i sar., 2003) se koristi za procenu vremenskih perioda u kojima su se populacije razdvojile, omogućavajući procenu areala rasprostranjenja vrsta i centara disperzije (Riddle i Honeycutt, 1990; Rocha i sar., 2008). Na taj način se genetička varijabilnost može ispitivati u odnosu na geografsko rasprostranjenje vrste i omogućava se otkrivanje istorijskih, ali i novijih, barijera u protoku gena (Avice, 2000), genetička osnova specijacije i evolucije vrsta i rodova. Zbog viših evolucionih stopa mitohondrijalnog u odnosu na nuklearni genom (Wan i sar., 2004), ovaj marker je od velike važnosti za rasvetljavanje filogenetičkih odnosa i evolucione istorije vrsta, i smatra se veoma važnim molekularnim markerom za poređenja unutar i između vrsta (DeYoung i Honeycutt, 2005; Behura, 2006). Pored toga, mtDNK se smatra veoma važnim alatom za rešavanje taksonomskih problema (Wan i sar., 2004), identifikovanje regiona endemizma (Proudfoot i sar., 2006), i evoluciono značajnih jedinica (ESUs - Evolutionary Significant Units) (Wan i sar., 2004). Nedostaci analize mtDNK su ti što ona pruža malo informacija o skorašnjem gubitku genetičke varijabilnosti i o svim događajima na nivou pojedinačnih jedinki (Wan i sar., 2004).

Regioni mitohondrijalnog genoma koji su od najčešćeg interesa u istraživanjima prirodnih populacija su: kontrolni region, COI (citohrom oksidaza I gen), CytB (citohrom oksidaza b gen) i 12S/16S rRNK (geni za dve rRNK prisutne u mitohondrijalnim ribozomima).

## **2.4. Populaciono genetičke analize u populacijama divlje svinje**

Prve genetičke studije u populacijama divlje svinje u Evropi obuhvatile su analizu biohemijske varijabilnosti alozimskih lokusa u populacijama iz Austrije, Italije, Bugarske, Francuske i Mađarske (Hartl i Csaikl, 1987; Randi i sar., 1992; Hartl i sar., 1993; Ernhaft i Csányi, 1995). U populacijama divlje svinje Austrije prosečna heterozigotnost kretala se od 0,015 do 0,05, u populacijama Bugarske između 0,021 i 0,04, dok je u populacijama divlje svinje Italije bila nešto manja i kretala se u opsegu 0,012-0,03. Uočena genetička varijabilnost na osnovu analize proteinskih markera u ispitivanim populacijama divlje svinje Evrope bila je srednjeg nivoa u poređenju sa drugim populacijama krupnih sisara (Baccus i sar., 1983).

U odnosu na analizu biohemijske varijabilnosti, populaciono genetičke studije bazirane na analizama nuklearnog i mitohondrijalnog genoma na nivou DNK molekula pokazale su različite nivoe polimorfности u populacijama divlje svinje u Evropi (Vernesi i sar., 2003; Ferreira i sar., 2006, 2009; Scandura i sar., 2008; Nikolov i sar., 2009; Alves i sar., 2010; Veličković i sar., 2010, 2012; Alexandri i sar., 2012). Prednosti analize intra- i interpopulacione varijabilnosti na nivou DNK molekula su otkrivanje većeg broja polimorfizama, veliki broj informacija koje se mogu dobiti, i mogućnost primene istih metoda na različitim regionima DNK.

Do danas, sve populaciono genetičke studije bazirane na analizi mikrosatelitskih lokusa u populacijama divlje svinje koristile su mikrosatelitske prajmere koji su razvijeni kod domaće svinje i svi lokusi su u populacijama divlje svinje pokazali veći nivo polimorfizma u poređenju sa analizom istih lokusa kod domaćih rasa svinja (Vernesi i sar., 2003; Ferreira i sar., 2006, 2009; Scandura i sar., 2008; Nikolov i sar., 2009; Veličković i sar., 2010, 2012). Generalni trend uočen u populacijama divlje svinje Evrope



jeste da čak i u prisustvu kontinuiranog staništa, bez većih geografskih barijera, populacije divlje svinje su retko homogene i većinom su podeljene u genetički diferencirane subpopulacije (Scandura i sar., 2011). Struktuiranost prirodnih populacija se javlja zbog činjenice da je geografska rasprostranjenost vrste mnogo veća od areala kretanja jedinki (Nei i Li, 1972; Balloux i Lugon-Moulin, 2002). Wright (1951) je primetio da određeni stepen struktuiranosti prirodnih populacija može predstavljati evolucionu prednost koja omogućava veću genetičku varijabilnost lokalno adaptiranih populacija u odnosu na panmiktičnu populaciju. Genetička struktuiranost u populacijama divlje svinje u Evropi uočena je na Balkanskom i Iberijskom poluostrvu (Ferreira i sar., 2006, 2009; Nikolov i sar., 2009; Veličković i sar., 2012).

Na osnovu analize polimorfnosti mikrosatelita u populacijama divlje svinje u istočnim i zapadnim delovima Balkanskog poluostrva pokazano je da ove populacije imaju veći nivo genetičkog diverziteta u poređenju sa drugim populacijama ove vrste u Evropi (Nikolov i sar., 2009; Veličković i sar., 2010, 2012). Genetičke analize mikrosatelitskih lokusa u populacijama divlje svinje sa područja Bugarske pokazale su postojanje dva genetička klastera, severni i južni, gde se odustvo kontinuiranih šumskih kompleksa i autoput smatraju barijerom za protok gena (Nikolov i sar., 2009). Osim ove barijere, autori ukazuju na činjenicu da uočena struktuiranost može biti posledica adaptacije jedinki na različite ekološke uslove. Jedinke koje pripadaju severnom genetičkom klasteru su sa područja gde je razvijena poljoprivreda i ove jedinke su fenotipski krupnije zbog dostupnosti hrane, dok se individue južnog klastera nalaze u planinskom regionu, gde je poljoprivreda limitirana, i one su sitnije u odnosu na severne populacije kako zbog manje dostupnosti hrane, tako i zbog prilagođavanja na planinske ekološke uslove. Zbog odsustva protoka gena između severnih i južnih populacija, autori su opisane genetičke klastere definisali kao jedinice menadžmenta i naglasili da dalje upravljanje populacijama treba da se radi odvojeno za severne i južne grupe kako bi se zadržao evolucionu potencijal oba definisana klastera i održala stabilnost populacija. Prva karakterizacija divljih svinja na području zapadnog Balkana uključila je analizu mikrosatelitskih lokusa u populaciji divlje svinje iz gatera u Podunavsko-Podravskom regionu (Veličković, 2008; Veličković i sar., 2010), gde je utvrđen visok nivo genetičkog

diverziteta. Opis genetičke strukture ove populacije bio je prvi korak ka genetičkoj karakterizaciji divlje svinje u regionu zapadnog Balkana, što je osnova za razvoj adekvatnih strategija upravljanja i konzervacije prirodnih populacija. Da bi se dobio bolji uvid u genetički diverzitet, tri populacije divlje svinje sa proširenog regiona zapadnog Balkana (Vojvodina, Slavonija i Bosna) su kasnije analizirane i pokazano je postojanje struktuiranosti ovih populacija i prisustvo dva genetička klastera, severni kojem su pripadale populacije divlje svinje iz Vojvodine i Hrvatske i južni koji su činile populacije iz Bosne (Veličković i sar., 2012). Ovakva podela može biti objašnjena razlikama u staništu, gde su Vojvodina i Slavonija uglavnom nizijski predeli, dok su u Bosni prisutni brdoviti krajevi, i takođe reka Sava može predstavljati geografsku barijeru za protok gena između ovih populacija.

Analiza genetičke varijabilnosti u populacijama divlje svinje u Portugaliji primenom 6 polimorfni mikrosatelita pokazala je prisustvo 3 genetička klastera: severni, centralni i južni (Ferreira i sar., 2006, 2009). Preliminarne analize su pokazale da dve velike reke (Douro i Težu) predstavljaju geografsku barijeru u protoku gena (Ferreira i sar., 2006), međutim kasnije je utvrđeno da postoji mešanje jedinki u kontaktnim zonama i da reke kao geografske barijere ne mogu u potpunosti da objasne postojanje genetički divergentnih subpopulacija u Portugaliji (Ferreira i sar., 2009). Autori naglašavaju da uočena struktuiranost populacija divlje svinje u Portugaliji može biti posledica prolaska populacija kroz usko grlo u toku 20-og veka. Ovo je prvi rad u kome je opisano da je pad brojnosti populacija pre oko jednog veka i njihov oporavak tokom poslednjih decenija imao efekat na genetičku strukturu populacija divlje svinje. Struktuiranost populacija divlje svinje u Portugaliji je takođe pokazana analizom sekvenci kontrolnog regiona mtDNK, gde je uočeno da se na osnovu frekvencija haplotipova populacije mogu podeliti u dve grupe, koje odgovaraju geografskim regionima južno i severno od reke Težu (van Ash i sar., 2011).

Na osnovu analize 9 mikrosatelitskih lokusa kvantifikovan je uticaj naglog smanjenja brojnosti populacija divlje svinje krajem 19-og i početkom 20-og veka i translokacija na genetički diverzitet ove vrste u Italiji i Mađarskoj (Vernesi i sar., 2003). U analizi su korišćene tri referentne populacije, jedna iz Mađarske i dve iz Italije, u

kojima reintrodukcija individua nije dokumentovana, i jedna ciljna populacija iz Italije u kojoj se zna da je bilo reintrodukcije jedinki. U ovom istraživanju nisu pronađeni genetički dokazi demografskog pada ni u jednoj od analiziranih populacija, utvrđeno je da su tri referentne populacije bile jasno genetički udaljene, dok su jedinke ciljne populacije pokazale mešanje genetičkih fondova dve parentalne grupe, čime je pokazano da su dokumentovane translokacije uticale na genetičku strukturu ciljne populacije. Osim toga, ovi autori naglašavaju da su mikrosateliti kao molekularni markeri veoma važni za razvoj strategija konzervacije i menadžmenta u prirodnim populacijama divljači. Relativno velika genetička varijabilnost uočena je u sve četiri analizirane populacije, ukazujući na činjenicu da pad brojnosti divljih svinja tokom poslednjeg veka nije imao veliki uticaj na genetički diverzitet ove vrste kao što to je uočeno kod drugih vrsta (Taylor i sar., 1994; Houlden i sar., 1996; O’Ryan i sar., 1998). Analizom sekvenci mtDNK i 10 mikrosatelitskih lokusa na većem broju populacija divlje svinje u Evropi (Scandura i sar., 2008) pokazano je da su skorašnji događaji koji su povezani sa uticajem čoveka (translokacije jedinki, transformacija staništa, intenzivan razvoj poljoprivrede, lovni pritisak i drugo) imali samo mali uticaj na genetički diverzitet divlje svinje koji uočavamo danas, s obzirom da se demografski događaji povezani sa poslednjom glacijacijom dominantno detektuju u populacijama divlje svinje.

Analizom sekvenci mitohondrijalnog genoma divlje svinje pokazano je postojanje tri filogenetičke klade: Evropska, Azijska, i Blisko Istočna (Giuffra i sar., 2000; Larson i sar., 2005). Analizom sekvenci kontrolnog regiona mtDNK u populacijama divlje svinje Evrope otkriveno je prisustvo dve filogenetičke linije u Evropi E1 i E2 (Larson i sar., 2005, 2007; Scandura i sar., 2008), gde je E2 linija pronađena samo u Italiji, dok je E1 rasprostranjena u čitavoj Evropi. Prisustvo E2 linije samo u Italiji ukazuje na činjenicu da se na Apeninskom poluostrvu preglacijalni diverzitet zadržao, i da divlje svinje iz Italije nisu učestvovala u postglacijalnoj rekolonizaciji Evrope (Scandura i sar., 2008). Pored toga, autori su zaključili da je veoma važno uraditi analize većeg broja uzoraka sa Iberijskog i Balkanskog poluostrva sa ciljem da se utvrdi koji refugijum (Italija, Iberija ili Balkan) je najviše uticao na genetički diverzitet koji danas uočavamo u populacijama divlje svinje širom Evrope. Pored E1 i E2 linije, Azijska klada je takođe pronađena u

analizama divlje svinje Evrope (Scandura i sar., 2008; van Ash i sar., 2011; Alexandri i sar., 2012). Prisustvo Azijske linije u genomu divlje svinje je najverovatnije posledica hibridizacije sa domaćom svinjom, s obzirom da se domestifikacija svinje dogodila u Aziji, pa je prisustvo Azijske linije očekivano u genomu domaće, ali ne i divlje svinje u Evropi. Analizom kontrolnog dela mitohondrijalnog genoma kod divlje svinje iz Grčke pronađen je veliki broj jedinstvenih haplotipova ukazujući na prisustvo preglacijalnog diverziteta i na Balkanu (Alexandri i sar., 2012). Slični slučajevi visokog biodiverziteta na Balkanu potvrđeni su i kod drugih vrsta kao što je zec (Kasapidis i sar., 2005; Đan, 2008; Stamatis i sar., 2009), poljski miš (Michaux i sar., 2004), poskok (Ursenbacher i sar., 2008), zelena žaba (Stöck i sar., 2006), skakavac (Hewitt, 1999, 2000, 2004), leptir šahovničar (Habel i sar., 2005; Schmitt i sar., 2006). Sve ove analize, sprovedene na različitim vrstama, ukazuju na to da je Balkan bio jedan od glavnih refugijuma tokom poslednjeg ledenog doba i s obzirom na tu činjenicu jedan od najvažnijih izvora post-glacijalne rekolonizacije Evrope za brojne životinjske vrste. Visoka stopa biodiverziteta na Balkanu se može objasniti činjenicom da su u ovom regionu dugo vladali povoljni ekološki i klimatski uslovi koji su omogućili opstanak stabilnih i genetički divergentnih populacija na Balkanu (Canestrelli i sar., 2010). Analizom kontrolnog regiona mtDNK u populacijama divlje svinje sa Iberijskog poluostrva pokazano je da one dele haplotipove sa divljim svinjama Zapadne Evrope (Alves i sar., 2010), pa se pretpostavlja da su divlje svinje sa Iberijskog poluostrva rekolonizovale Zapadnu Evropu, dok su najverovatnije divlje svinje sa Balkana učestvovalе u rekolonizaciji Centralne i Istočne Evrope (Alexandri i sar., 2012; Kusza i sar., 2014).

## 2.5. Opšte karakteristike vrste *Sus scrofa*

Sistematski položaj vrste *Sus scrofa* u carstvu životinja je sledeći:

Regnum:	<i>Animalia</i>
Phylum:	<i>Chordata</i>
Subphylum:	<i>Vertebrata</i>
Classis:	<i>Mammalia</i>
Ordo:	<i>Artiodactyla</i>
Familia:	<i>Suidae</i>
Genus:	<i>Sus</i>
Species:	<i>Sus scrofa</i>

Porodica svinja (*Suidae*) se deli u dve grupe: (1) *svinje starog sveta* sa pet rodova (*Sus*, *Potamochoerus*, *Phacochoerus*, *Hylochoerus* i *Babyrousa*) i osam vrsta; i (2) *svinje novog sveta* (pekari) sa jednim rodom (*Tayassu*) i dve vrste. Opšta karakteristika obe grupe divljih svinja je da imaju telo pokriveno oštrom dlakom, čekinjama, kao i klinasti oblik tela, sa jako izduženom glavom, koja se završava rilom na vrhu gornje vilične kosti. Rilo je značajno pri pronalaženju hrane u zemlji, što je važna ekološka karakteristika vrste.

Divlja svinja je rasprostranjena na širokom prostoru na severnoj polulopti, od zapadne Evrope i severozapadne Afrike, uključujući i ostrva u Sredozemnom moru – Sardiniju i Korziku, zemlje srednje i južne Evrope, preko centralne Azije, pa sve do dalekog istoka. Najjači prirodni ograničavajući faktor rasprostranjenja divlje svinje ka severu je klima, pre svega niske temperatura i visina snežnog pokrivača. S obzirom na širok geografski areal rasprostranjenja vrste, veliku varijabilnost u uslovima staništa i postojanje različitih genetičkih karakteristika u okviru pojedinih populacija, kao rezultat interakcija genotipa i spoljašne sredine na širem arealu rasprostranjenja, zapažaju se manje ili više upadljive razlike u fenotipu pojedinih populacija. Na osnovu morfoloških karakteristika, posebno istraživanjem kraniološke građe, opisan je veći broj različitih podvrsta divlje svinje.

Na Evropskom kontinentu, divlja svinja je jedna od najrasprostranjenijih vrsta divljih papkara, autohtona je vrsta i odlikuje se izuzetnom prilagođavanju staništu. Divlja

svinja je predak pitome svinje, živi u čoporima, uglavnom oko vlažnih šuma. To je krupna divljač koja se zbog svoje visoke brojnosti dosta lovi. Za tu brojnost je zaslužan veći broj mladih u leglu i nedostatak prirodnih neprijatelja. Po načinu ishrane spadaju u omnivore, uglavnom se hrane biljkama, ali i crvima, insektima, jajima, žabama, miševima.

Divlja svinja vodi poreklo iz Severoistočne Azije, gde je uočen najveći broj vrsta (Lucchini i sar., 2005). *S. scrofa* može biti podeljena u najmanje dve glavne genetičke klade, koje grubo rečeno odgovaraju domaćim formama Evropskih i Azijskih svinja (Giuffra i sar., 2000; Okumura i sar., 2001; Alves i sar., 2003; Larson i sar., 2005). Razdvajanje ovih klada se moglo desiti u periodu pre 0,5 i 0,9 miliona godina, što ukazuje na bar dva nezavisna događaja domestikacije (Giuffra i sar., 2000; Kijas i Anderson, 2001; Alves i sar., 2003). Podvrste su obično klasifikovane u četiri glavne grupe, sa Evropskom divljom svinjom koja odgovara grupi 'Zapadnih rasa' (Oliver i sar., 1993). Kvartarne klimatske oscilacije, a naročito poslednja glacijacija i naredni topli period, doveli su do vidljivih posledica na nivou genetičke varijabilnosti mnogih vrsta (Taberlet i sar., 1998; Petit i sar., 2003). U pogledu divlje svinje desila su se još najmanje četiri procesa povezana sa aktivnošću čoveka: domestikacija u neolitu; prolazak kroz nekoliko uskih grla u različitim oblastima u toku poslednjeg veka; demografska ekspanzija u poslednjih 40-50 godina; nekontrolisane translokacije jedinki sa ciljem da se obnove oblasti gde su divlje svinje izumrle ili su prisutne u malom broju. Kako su divlje svinje samo sporadično prisutne u severnim oblastima kao što su centralne i severne tajge (Briedermann, 1990), njihovo prisustvo u centralnim i severnim delovima Evrope tokom poslednjeg ledenog doba, kada je večiti led skoro izolovao Iberiju, Italiju i Balkan (Hewitt, 2000), izgleda neverovatno. Za razliku od drugih vrsta papkara, divlje svinje pokazuju osobine r-vrsta: visoka ekološka prilagodljivost, oportunistička ishrana i veoma visok reproduktivni potencijal (Boitani i sar., 1995; Geisser i Reyer, 2005). Dakle, možemo pretpostaviti da su nakon poslednje glacijacije, divlje svinje lako rekolonizovale centralne i severne šume Evrope, i tako dostigle kontinuiranu i stabilnu distribuciju koju modifikuju samo sezonske varijacije. Nakon Drugog svetskog rata, gustina i geografska distribucija divlje svinje se povećala u gotovo čitavoj Evropi (Feichtner, 1998; Danilkin,

2001) kao posledica nekoliko faktora: globalno zagrevanje, promene u poljoprivrednoj praksi, dohrana divljači, redukovanje broja predatora (Bieber i Ruf, 2005; Geisser i Reyer, 2005). Porast populacija divlje svinje u nekim oblastima je toliki da dolazi do učestalih uništavanja poljoprivrednih kultura i prirodnih ekosistema (Welander, 2000; Geisser i Reyer, 2004).

Menadžment populacija krupne divljači, naročito kada govorimo o papkarima, se sprovodi sa ciljem dobijanja mesa visokog kvaliteta (Wilke i sar., 2000; Dobrowolska i Meosik, 2008), regulisanja brojnosti populacija kako bi se smanjile štete koje one prave (Boutin, 1990; Geisser i Reyer, 2004; Putman i Staines, 2004), prevencije zaraznih bolesti (Caley i Hone, 2004; Acevedo i sar., 2007; Gortàzar i sar., 2007) i stradanja u saobraćaju, najčešće na autoputevima (Doerr i sar., 2001). Pored toga, adekvatno upravljanje populacijama divljači je takođe neophodno kako bi se izbegao moguć negativan antropogeni uticaj na genetičku strukturu prirodnih populacija (Allendorf i sar., 2008), za očuvanje drugih vrsta (npr. predatora, kompetitora) i čitavih ekosistema (Welander, 2000; Ickes i sar., 2003). S obzirom da je divlja svinja veoma važna autohtona vrsta papkara u Evropi, kako u ekološkom tako i u ekonomskom smislu, neophodan je razvoj adekvatnih strategija menadžmenta za ovu vrstu.

### 3. CILJ ISTRAŽIVANJA

Genetički diverzitet i struktura populacija divlje svinje na Balkanu još uvek nije dovoljno istražena. Osim toga, do danas je objavljen mali broj istraživanja populacija divlje svinje Evrope primenom nuklearnih markera, i u ovim istraživanjima markeri koji su korišćeni nisu bili uniformni (Vernesi i sar., 2003; Ferreira i sar., 2006, 2009; Scandura i sar., 2008; Veličković i sar., 2010, 2012). Obzirom da su populacije divlje svinje u Evropi u stalnom porastu, određivanje genetičkog diverziteta i strukture populacija je veoma važno kako bi se razvile adekvatne strategije upravljanja vrstom i definisale jedinice menadžmenta i konzervacije. Sa druge strane, poznato je da su južna poluostrva Evrope predstavljala glavne refugijalne zone divljih svinja i da su klimatske oscilacije imale jak uticaj na genetičku varijabilnost u populacijama divlje svinje (Scandura i sar., 2008). Definisane puteva post-glacijalne rekolonizacije Evrope je od ključnog značaja za rasvetljavanje filogenetičke i filogeografske istorije vrste. Prethodne filogenetičke i filogeografske studije populacija divlje svinje primenom analize sekvenci kontrolnog regiona mitohondrijalne DNK pokazale su da su u rekolonizaciji Evrope učestvovala populacije Iberijskog i Balkanskog poluostrva (Alves i sar., 2010; Alexandri i sar., 2012), mada još uvek nije jasan i objašnjen uticaj oba refugijuma. Populaciono genetičke studije sprovedene na različitim vrstama, ukazuju na to da je Balkan bio jedan od glavnih refugijuma tokom poslednjeg ledenog doba i jedan od najvažnijih izvora post-glacijalne rekolonizacije Evrope za brojne životinjske vrste. Visoka stopa biodiverziteta na Balkanu je najverovatnije posledica povoljnih ekoloških i klimatskih uslova koji su dugo vladali u ovom regionu i omogućili opstanak stabilnih i genetički divergentnih populacija na Balkanu (Canestrelli i sar., 2010).

Problem istraživanja doktorske disertacije obuhvata utvrđivanje genetičke strukture populacija divlje svinje primenom mikrosatelita i mtDNK kao molekularnih markera, određivanje stepena genetičke divergencije u populacijama divlje svinje u Evropi, i filogenetičke i filogeografske analize populacija divlje svinje kroz ostvarenje sledećih ciljeva:



1. Određivanje polimorfnosti jedanaest tetranukleotidnih mikrosatelitskih lokusa 387A12F, S0655, SBH1, SBH2, SBH4, SBH10, SBH13, SBH18, SBH19, SBH20, i SBH22 u populacijama divlje svinje Evrope; detekcija prisutnih alela i određivanje frekvencije alela u populacijama, utvrđivanje populacione strukture i osnovnih parametara intra- i interpopulacione varijabilnosti: heterozigotnost, polimorfnost, genetička udaljenost. Poređenje nivoa genetičke varijabilnosti na osnovu polimorfnosti mikrosatelita sa publikovanim podacima o varijabilnosti nuklearnog genoma u populacijama divlje svinje različitih regiona.
2. Određivanje varijabilnosti sekvence kontrolnog regiona mtDNK (CR1-mtDNK) kod jedinki divljih svinja sa prostora Balkanskog poluostrva, otkrivanje prisutnih haplotipova, utvrđivanje parametara genetičkog diverziteta na osnovu varijabilnosti mtDNK i utvrđivanje moguće struktuiranosti populacija na Balkanu.
3. Određivanje filogenetičke i filogeografske pozicije populacija divlje svinje sa Balkana u Evropsko/Evroazijskom kontekstu poređenjem dobijenih sekvenci mtDNK sa u Gen Banci dostupnim sekvencama divljih svinja sveta i utvrđivanje jedinstvenih haplotipova karakterističnih za populacije divlje svinje na Balkanu.

Kombinovana analiza nuklearnog i mitohondrijalnog genoma u ovoj studiji predstavlja metod za pouzdano određivanje genetičke varijabilnosti i strukture populacija divlje svinje na Balkanu i u Evropi, sa ciljem sagledavanja potencijala populacija da odgovore na stalno promenljive faktore spoljašnje sredine što je prvi korak u razvoju strategija menadžmenta prirodnih populacija divljači. Osim toga, biće omogućeno definisanje jedinstvenih alela karakterističnih za pojedine populacije divlje svinje Evrope, utvrđivanje da li postoji hibridizacija sa domaćom svinjom, i da li postoji ukrštanje u srodstvu. Dobijeni podaci biće stavljeni u funkciju definisanja populacija i lokaliteta gde su potrebne posebne mere gazdovanja što će doprineti očuvanju genetičkog diverziteta vrste. Sveobuhvatna filogenetička analiza populacija divljih svinja iz različitih regiona Evrope i Evroazije, može doprineti odgovoru na pitanje da li je genetički diverzitet prisutan u populacijama divlje svinje danas rezultat davnih događaja (glacijacija i interglacijalni periodi) ili skorašnjih događaja koji su povezani sa uticajem čoveka na ekosistem što je važno pitanje u definisanju mera upravljanja vrstom. Takođe, veoma je

važno obratiti pažnju na očuvanje jedinstvenih genetičkih varijanti u populaciji, jer se one mogu koristiti za praćenje individua i populacija.

## 4. RADNA HIPOTEZA

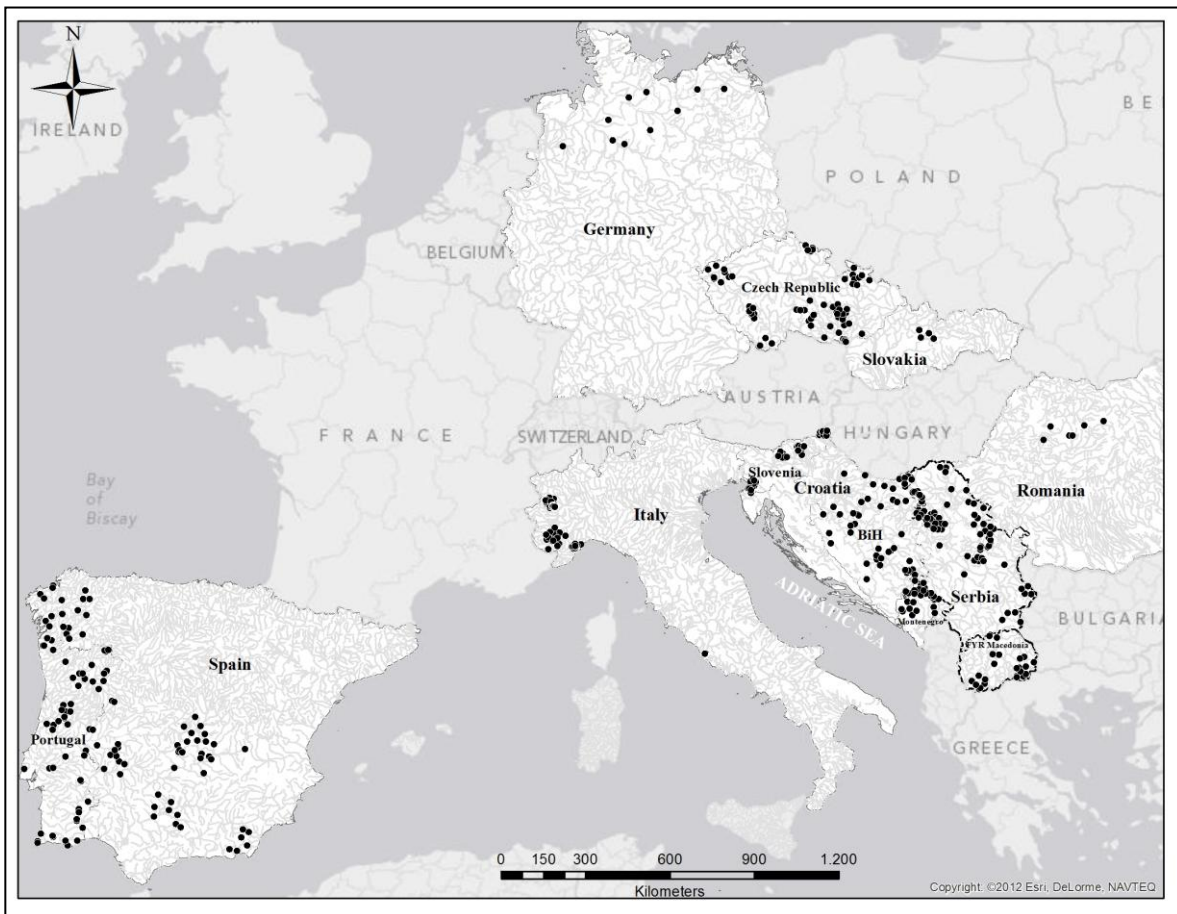
Radne hipoteze ovog istraživanja su:

- odabrani mikrosatelitski lokusi su primenljivi molekularni markeri u analizama strukture i genetičkog diverziteta populacija divlje svinje i ispoljavaju adekvatan nivo polimorfnosti;
- hipervarijabilni domen 1 (CR-1) mtDNK je odgovarajući genetički marker u populaciono genetičkim, filogenetičkim i filogeografskim studijama vrste *Sus scrofa*;
- prisutan je visok genetički diverzitet divljih svinja na Balkanu, gde je najveći u južnim delovima i smanjuje se ka severu;
- postoji struktuiranost populacija divlje svinje na Balkanu i u Evropi;
- u populacijama divlje svinje na Balkanu postoje jedinstveni aleli mikrosatelitskih lokusa i haplotipovi mtDNK koji do danas nisu registrovani u populacijama divlje svinje u Evropi;
- sveobuhvatne genetičke analize populacija divljih svinja bi trebalo da pruže jasne dokaze u korist teorije postglacijalne ekspanzije divljih svinja sa sva tri južna poluostrva Evrope, prema teoriji ekspazivnog fronta (engl. *leading-edge hypothesis*), kao i na ključnu ulogu Balkanskog poluostrva u tom procesu;
- sveobuhvatne genetičke analize pokazuju genetičke signale demografske ekspanzije populacija divlje svinje Evropskog kontinenta.

## 5. MATERIJAL I METODE

### 5.1. Materijal

Za ispitivanje varijabilnosti mikrosatelitskih lokusa i sekvenci kontrolnog regiona mtDNK u populacijama divlje svinje sakupljeni su uzorci mišićnog tkiva, ušne hrskavice, krv i krv na FTA karticama jedinki sa teritorije Srbije, Makedonije, Crne Gore, Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Slovenije, Italije, Portugalije, Španije, Češke, Slovačke, Nemačke i Rumunije u okviru redovnih lovnih sezona (Sl. 1). Neposredno nakon uzorkovanja tkivo svake pojedinačne jedinke je adekvatno obeleženo i čuvano na  $-20^{\circ}\text{C}$  (mišićno tkivo, ušna hrskavica i krv), odnosno na sobnoj temperaturi (krv na FTA karticama).



Slika 1. Karta Evrope sa obeleženim lokalitetima izlova jedinki *Sus scrofa*

Figure 1. Locations of wild boar samples collected in Europe

## 5.2. Metode

### 5.2.1. Izolacija DNK

Prvi korak u analizi polimorfnosti mikrosatelita i CR1-mtDNK podrazumevao je izolaciju ukupne genomske DNK iz sakupljenog tkiva. DNK iz ćelija mišićnog tkiva, ukupne krvi i krvi na FTA karticama izolovana je u postupku fenol-hloroform-izoamilalkohol (PCI) ekstrakcije, po modifikovanoj metodi Sambrook i Russel (2001). DNK iz ćelija ušne hrskavice i mišićnog tkiva kod uzoraka iz Španije izolovana je metodom isoljavanja (Bruford i sar., 1992).

#### *Fenol-hloroform-izoamilalkohol ekstrakcija ukupne genomske DNK*

Odmereno je i izmacerirano oko 25 mg mišićnog tkiva na sterilnoj staklenoj podlozi i prebačeno u sterilnu kivetu (1,5 ml). U svaku kivetu dodato je 380  $\mu$ l digestionog pufera (0,1% SDS; 100 mM NaCl; 10 mM EDTA; 100 mM Tris-HCl, pH 8,0), 10  $\mu$ l rastvora proteinaze K (40 mg/ml) i 10  $\mu$ l  $\beta$  – merkaptoetanol. Sadržaj svake kivete je promešan na vorteksu, i uzorci su inkubirani na 65°C 30 minuta. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 4 minuta na 12000 rpm. Supernatant (oko 400 $\mu$ l) je prebačen u sterilnu kivetu (1,5 ml). U svaku kivetu dodata je jedna zapremina fenola i sadržaj je promešan na vorteksu. Centrifugiran je sadržaj svake kivete 4 minuta na 12000 rpm. Mikropipetom je pažljivo prebačena gornja vodena faza u sterilnu kivetu (1,5 ml), bez zadiranja u donju fenolnu fazu. Dodata je jedna zapremina smeše hloroform:izoamilalkohol (24:1), promešan je sadržaj na vorteksu i centrifugiran 4 minuta na 12000 rpm. Pažljivo je prebačena gornja vodena faza u sterilnu kivetu (1,5 ml). Ukoliko je uzorak bio nečist, ponovljeni su koraci ispiranja fenolom i smešom hloroform:izoamilalkohol. Dodato je 0,1 zapremine (oko 40  $\mu$ l) 3M Na acetata i dve zapremine (oko 800  $\mu$ l) 95% etanola rashlađenog na -20°C. DNK je precipitirana 20 minuta na -70°C. Precipitat je centrifugiran 20 minuta na 12000 rpm. Etanol je odliven iz kivete i pelet je ispran sa 1 ml 70% rashlađenog etanola. Precipitat je centrifugiran 5 minuta na 12000 rpm. Etanol je ponovo odliven i pelet osušen dok sav

etanol nije ispario (na 55°C). Pelet je resuspendovan u 50 µl TE pufera (pH 7,6). Uzorci su inkubirani 1-2 minuta na 45-60°C da se ubrza rastvaranje peleta.

#### *Ekstrakcija ukupne DNK isoljavanjem*

Odmereno je i izmacerirano oko 25 mg uzorkovanog tkiva na sterilnoj staklenoj podlozi i prebačeno u sterilnu kivetu (1,5 ml). U svaku kivetu dodato je 410 µl digestionog pufera (10 mM Tris-HCl, pH8,0; 100mM NaCl; 10 mM EDTA) i 15 µl rastvora proteinaze K (20mg/ml). Sadržaj svake kivete je promešan na vorteksu, i uzorci su inkubirani na 55°C oko 2 sata, uz uključenu opciju mešanja, do potpune digestije tkiva. Nakon inkubacije uzorci su centrifugirani 5 minuta na 13000 rpm. Supernatant je prebačen u sterilnu kivetu (1,5 ml) i u svaku kivetu dodato je 180 µl 5M NaCl. Nakon dodavanja NaCl kivete su invertovane 50 puta da bi se smeša homogenizovala. U ovom koraku je uočeno formiranje belog peleta. Centrifugiran je sadržaj svake kivete 5 minuta na 13000 rpm. Odlivanjem je supernatant pažljivo prebačen u sterilnu kivetu (1,5 ml) koja se drži u hladnom reku i dodat je 1 ml ledenog izopropanola. Sadržaj svake kivete je lagano promešan inverzijom i centrifugiran 7 minuta na 13000 rpm. Izopropanol je odličen iz kivete i pelet je ispran sa 250 µl 80% etanola. Kivete su invertovane oko 50 puta da se pelet odlepi sa zidova i potom su uzorci centrifugirani 7 minuta na 13000 rpm. Etanol je pažljivo odličen iz kivete i korak ispiranja peleta sa 80% etanolom je ponovljen. Nakon što je etanol ponovo odličen i pelet osušen dok sav etanol nije ispario (na 50-55°C), DNK je resuspendovana u 50µl sterilne destilovane vode.

Kvalitet i koncentracija izolovane DNK je proverena na NanoDrop spektrofotometru merenjem absorbance na 280nm, 260nm i 230nm. U uzorcima kod kojih je dobijena visoka koncentracija DNK (100 ng/µl i više), pravljena su radna razblaženja od 50 ng/µl koja su korišćena u daljim analizama.

### 5.2.2. Analiza polimorfnosti mikrosatelita

Korišćenjem seta hemikalija „BioType Animal Pig Kit“ analizirano je 11 tetranukleotidnih mikrosatelitskih lokusa kod ukupno 664 divlje svinje, od čega je analizirano 259 jedinki sa prostora Balkana (Srbija - 98, Makedonija - 24, Crna Gora -33, Bosna i Hercegovina -35, Hrvatska - 16 i Slovenija - 53), 131 jedinka sa Iberijskog poluostrva (Portugalija - 65 i Španija - 66), 181 jedinka iz Italije (39 uzoraka je novo analizirano, dok su za 142 jedinke preuzeti kompletni genotipovi iz rada Caratti i sar., 2010) i 93 uzorka iz Centralne Evrope (Češka - 73, Nemačka - 10, Rumunija -6, Slovačka - 4). Uslovi PCR amplifikacije 11 mikrosatelita su postavljeni prema protokolu proizvođača (Biotype, Nemačka).

#### *PCR reakcija*

##### *Komponente*

##### *za 1 reakciju (25µl)*

Reaction Mix D (sadrži Mg <sup>2+</sup> , dNTP Mix, BSA)	5 µl
Primer Mix	2 µl
Multi Taq2 DNA Polymerase (hot start, 2,5U/µl)	0,4 µl
Mili Q voda	16,6 µl

U reakciju je dodavan 1 µl genomske DNK koncentracije 50 ng/µl.

#### *Uslovi PCR reakcije*

1. 94°C            4 min (aktivacija hot start Taq DNK polimeraze)
  2. 94°C            30 sec
  3. 60°C            40 sec
  4. 72°C            30 sec
  5. 72°C            60 min
  6. 4°C
- }      30x

Za vizualizaciju PCR produkata, a u cilju potvrde uspešnosti i utvrđivanja kvaliteta reakcije, korišćena je 2% agarozna elektroforeza. Agarozna je rastvorena u 1xTBE puferu, Gel Red (Biotium) je dodavan direktno u gelove, a uzorci su mešani sa 1 µl 6x Orange Loading Dye (Fermentas) radi vizuelizacije DNK produkata na gelu. Za identifikaciju PCR produkata uz uzorke je na gel nanošena i negativna kontrola (PCR reakcija bez genomske DNK), kao i 50 bp DNK marker. Za elektroforezu je korišten 1xTBE pufer, a razdvajanje fragmenata je teklo pri konstantnoj voltaži od 140V. Vizualizacija fragmenata urađena je pomoću UV transiluminatora.

Nakon potvrde uspešnosti amplifikacije rađena je fragmentna analiza sa ciljem genotipizacije umnoženih mikrosatelita. Fragmentna analiza urađena je kapilarnom elektroforezom na ABI3730xl sekvencioneru (Applied Biosystems) na Institutu za molekularnu medicinu na Univerzitetu u Helsinkiju, Finska. Pre fragmentne analize, svaki uzorak je pomešan sa Hi-Di formamidom i ROX 550 standardom koji je dobijen u korišćenom setu hemikalija. Fragmentna analiza je takođe urađena za kontrolnu DNK (DL157) domaće svinje koja je dobijena u setu hemikalija i marker (engl. *allelic ladder*) što je omogućilo precizno očitavanje genotipova kod analiziranih uzoraka divlje svinje. Nakon fragmentne analize genotipizacija svih uzoraka je urađena korišćenjem Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystem) i Gene Marker v4.2.1. (Softgenetics) programa.

### 5.2.3. Analiza sekvenci kontrolnog regiona mtDNK

PCR amplifikacija kontrolnog regiona mtDNK (CR1-mtDNK) urađena je na uzorku od 163 divlje svinje sa područja Balkana (Sl. 2). Deo kontrolnog regiona mtDNK, između pozicije 15378 i 15900 (na osnovu kompletne sekvence mitohondrijalnog genoma domaće svinje, broj u Gen Banci AJ002189), umnožen je korišćenjem sledećih prajmera:

*Forward: 5' GGAGACTAACTCCGCCATCA 3'*

*Reverse: 5' TGGGCGATTTTAGGTGAGATGGT 3'*



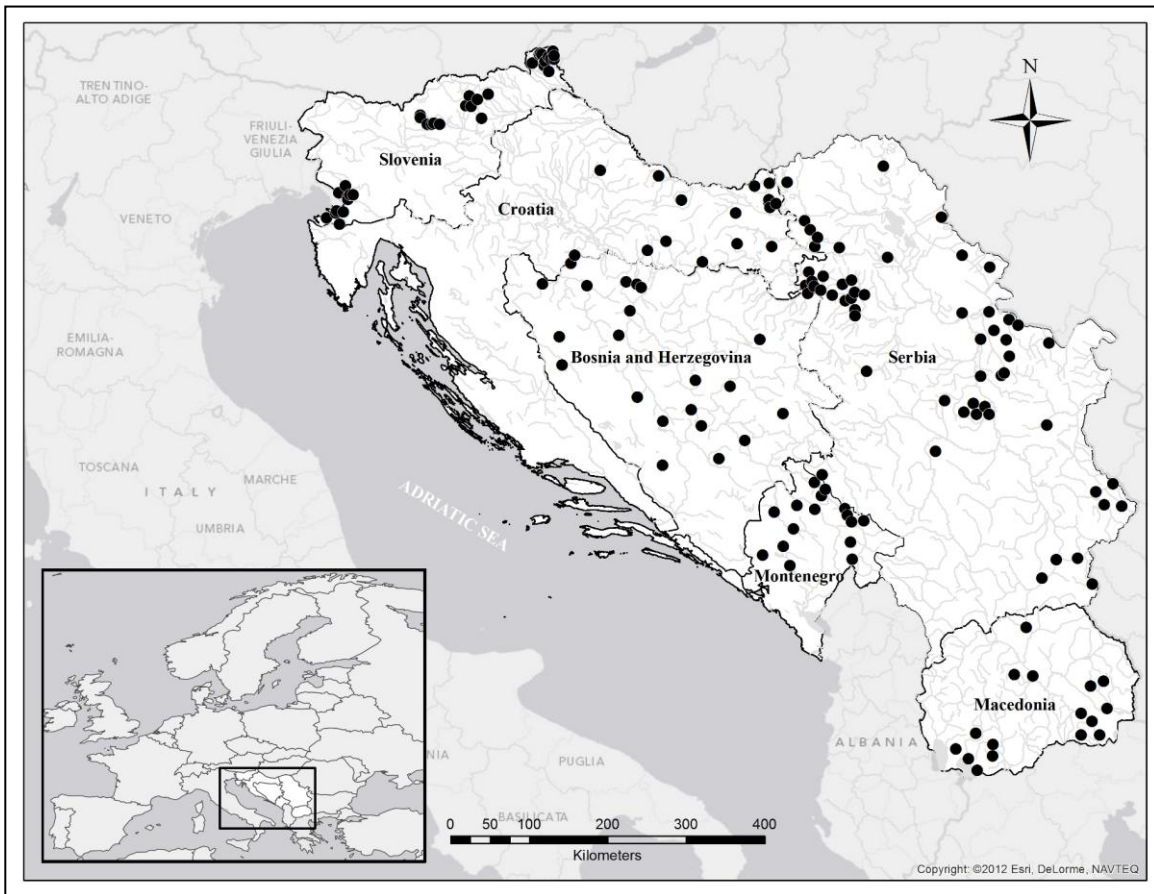
PCR reakcija rađena je u volumenu od 20 $\mu$ l prema sledećem protokolu: 1x Taq pufer (Fermentas), 2,5mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ M svakog nukleotida, 0,1  $\mu$ M svakog prajmera, 1 U Taq DNK polimeraze (Fermentas) i 50ng genomske DNK.

Uslovi PCR reakcije su bili sledeći:

1.	94°C	4 min	
2.	94°C	30 sec	} 20x
3.	65-55°C	30 sec	
4.	72°C	30 sec	
5.	94°C	30 sec	
6.	55°C	30 sec	} 30x
7.	72°C	30 sec	
8.	72°C	10 min	
9.	4°C		

Za vizualizaciju PCR produkata CR1-mtDNK, a u cilju potvrde uspešnosti i utvrđivanja kvaliteta reakcije, korišćena je 2% agarozna elektroforeza. Za identifikaciju PCR produkata uz uzorke je na gel nanošena i negativna kontrola (PCR reakcija bez genomske DNK), kao i 100 bp DNK marker. Za elektroforezu je korišten 1xTAE pufer, a razdvajanje fragmenata je teklo pri konstantnoj voltaži od 100V. Vizualizacija fragmenata urađena je pomoću UV transiluminatora.

Nakon amplifikacije CR1-mtDNK i vizualizacije produkata na gelu, produkti PCR amplifikacije su prečišćeni korišćenjem ExoSAP (Fermentas) seta hemikalija prema uputstvu proizvođača. Za svaki produkt određena je sekvenca mtDNK u jednom smeru, primenom *Forward* prajmera koji je korišćen pri PCR amplifikaciji, na kapilarnom ABI3730xl sekvencioneru (Applied Biosystems) na Institutu za molekularnu medicinu na Univerzitetu u Helsinkiju, Finska.



Slika 2. Karta sa obeleženim lokalitetima izlova jedinki divlje svinje koje su korišćene za analizu sekvenci CR1-mtDNK

Figure 2. Locations of wild boar samples collected in the Balkans and used in CR1-mtDNA sequences analysis

### 5.3. Statistička obrada podataka

#### 5.3.1. Analiza mikrosatelitskih podataka

Prvi korak u analizi mikrosatelitskih lokusa bio je definisanje strukture populacije divlje svinje u Evropi primenom programskih paketa STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard i sar., 2000; Falush i sar., 2003, 2007; Hubisz i sar., 2009), Geneland 4.0.3. (Guillot i sar., 2005a,b) i TESS 2.3. (Durand i sar., 2009) koji na osnovu Bajesove statistike dodeljuju verovatnoću za svaki predpostavljeni genetički klaster i faktorskom analizom (FCA-

Factorial Correspondence Analysis) u programskom paketu Genetix 4.05 (Belkhir i sar., 2004).

### ***STRUCTURE analiza***

U cilju određivanja broja genetičkih klastera u analiziranom uzorku od 664 divlje svinje primenjen je  $\Delta K$  metod Evanno i sar. (2005) koji se zasniva na pronalaženju prekida logaritamske distribucije  $\ln P(D)$  za različite vrednosti  $K$ , gde je  $K$  broj pretpostavljenih genetičkih klastera, a  $\ln P(D)$  je procena *a posterior* verovatnoće za dato  $K$ . Evanno i sar. (2005) su pokazali da u slučaju postojanja nekoliko hijerarhijskih nivoa strukturiranosti populacije  $\Delta K$  metod otkriva samo najviši nivo strukture populacije, pa je u ovom istraživanju analiza koja obuhvata određivanje broja genetičkih klastera  $\Delta K$  metodom i pripadnost pojedinačnih jedinki određenom klasteru rađena u ponavljanjima za svaku od  $K$  grupa određenih u prethodnom koraku. Ovakva procedura je ponavljana sve dok broj genetičkih klastera nije bio jednak 1 ili broj jedinki u klasteru mali. U svakoj fazi, analiza je sprovedena primenom modela u kome se pretpostavlja da uzorci mogu poticati od  $K$  broja parentalnih populacija koje se možda ne nalaze u analiziranom uzorku (engl. *admixture model*) i modela da se frekvencije alela parentalne populacije razlikuju od frekvencija u generaciji potomaka (engl. *correlated allele frequency model*), bez *a priori* informacija o geografskom poreklu jedinki. Svaka analiza se sastojala od *burn-in* perioda od  $10^5$  MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) iteracija i  $10^6$  iteracija posle *burn-in* perioda. Nakon svake analize je provereno da li je dužina analize i *burn-in* perioda bila dovoljna za stabilizaciju logaritma. U svakoj fazi analiza je ponovljena tri puta za svaku ispitivanu  $K$  vrednost. U prvoj fazi analize koja je obuhvatila čitav set od 664 jedinke testirane vrednosti  $K$  su bile 1-20, dok je u sledećim fazama  $K$  vrednost bila postavljena 1-10 ili 1-5 u zavisnosti od broja jedinki koje su bile uključene u analizu i ponašanja logaritma. Kako u Bajesovoj statistici ponovljene analize za jednu  $K$  vrednost mogu dati u maloj meri različite rezultate, nakon svake faze urađeno je sumiranje output fajlova za svako  $K$  korišćenjem programskog paketa CLUMPP 1.1.2b (Jakobsson i Roseberg, 2007). Matrice sa verovatnoćom za pripadnost svake jedinke određenom klasteru

dobijene u programu CLUMPP su posle korišćene kao input fajl u programskom paketu Distruct 1.1 (Rosenberg, 2004) za grafičko prikazivanje rezultata svake STRUCTURE analize. Za predstavljanje rezultata STRUCTURE analize u odnosu na geografsko poreklo jedinki korišćen je Kriging metod u okviru R paketa 'maps' (Becker i Wilks, 2013).

### ***Geneland analiza***

Geneland je programski paket koji pored informacija o genotipu uzima u obzir geografske koordinate izlova svake jedinke za određivanje broja genetičkih klastera u ispitivanom uzorku i genetičkih diskontinuiteta između različitih klastera (Guillot i sar., 2005a). U ovom istraživanju urađeno je 5 nezavisnih analiza u Geneland paketu u okviru R programske platforme (R Core Team, 2013): 1) analiza svih 664 jedinki zajedno; 2) analiza jedinki sa Balkanskog poluostrva; 3) analiza jedinki sa Iberijskog poluostrva; 4) analiza jedinki sa Apeninskog poluostrva; 5) analiza jedinki iz Centralne Evrope. Svaka analiza je ponovljena 10 puta i broj genetičkih klastera je određen na osnovu sledećih parametara: 500000 MCMC iteracija, maksimalna vrednost Poasonovog procesa (engl. *Poisson process*) fiksirana na 300 pri analizi svih uzoraka, odnosno na 100 pri analizi pojedinačnih regiona u Evropi, računata nepouzdanost geografskih koordinata od 5km, maksimalan broj ćelija u Poason-Vernoi mozaiku fiksiran na 900 pri analizi svih uzoraka i 300 pri analizi pojedinačnih regiona u Evropi, i vrednost K je ispitivana u opsegu 1-20 za sve uzorke, odnosno 1-10 za pojedinačne regione. Dirlehtov model je korišćen kao *a priori* verovatnoća za frekvencije alela. Nakon što je na osnovu 10 ponavljanja određen broj populacija u svakoj analizi, svih pet analiza je ponovljeno jos 30 puta sa fiksiranom vrednošću K koja je odgovarala broju procenjenih klastera, dok su ostali parametri analize ostali isti. Za svako od 30 ponavljanja izračunata je srednja vrednost logaritma i *a posterior* verovatnoća za pripadnost populacija svakom od ispitivanih geografskih lokacija za 3 ponavljanja koja su imala najveću srednju vrednost logaritma. Za grafičko predstavljanje rezultata korišćen je Kriging metod u okviru R paketa 'maps'.

### **TESS analiza**

TESS je program koji na osnovu Bajesove statistike analizira broj genetičkih klastera u uzorku i određuje koeficijent pripadnosti pojedinačnih jedinki određenom klasteru na osnovu *a priori* informacija o geografskoj distribuciji ispitivanih jedinki (Chen i sar., 2007; François i sar., 2006). U cilju definisanja strukture populacija divlje svinje u Evropi, u programskom paketu TESS je takođe rađeno 5 nezavisnih analiza, prva koja je obuhvatila svih 664 uzoraka i preostale četiri na pojedinačnim regionima u Evropi. Sve analize su postavljene na sledeći način: primenjen je BYM admixture model, *a priori* je zadato da su frekvencije alela raspoređene prema Dirlehtovoj distribuciji, vrednost parametra  $\psi$  koji određuje koliku važnost treba dati geografskim podacima je bila 0,6, vrednost K je ispitivana u opsegu 1-20 za sve uzorke, odnosno 1-10 za pojedinačne regione i za svaku ispitivanu K vrednost analiza je ponovljena 5 puta, a svako ponavljanje se sastojalo od 50000 ciklusa sa *burn-in* periodom od 10000. Najbolja K vrednost, *Kmax*, je određena na osnovu DIC vrednosti (engl. *Deviance Information Criterion*). Za *Kmax* vrednost u svakoj analizi, urađeno je još 30 ponavljanja sa fiksiranom vrednošću K, a potom je odabrano 10 koje su pokazale najmanju DIC vrednost. Kao i pri STRUCTURE analizi, različita ponavljanja za istu K vrednost se u maloj meri mogu razlikovati i za formiranje jedinstvenog fajla koji sumira 10 odabranih analiza korišćen je program CLUMPP. Za grafičko predstavljanje rezultata TESS analize korišćen je Distruct i Kriging metod u okviru R paketa 'maps'.

### **Određivanje migranata i hibrida između subpopulacija**

Nakon određivanja genetičke strukture populacija, određivanje migranata i hibrida između definisanih grupa urađeno je u programskom paketu NEWHYBRIDS 1.0 (Anderson i Thompson, 2002). Ova analiza je podrazumevala poređenje parova geografski bliskih populacija koje su prethodno definisane. Reprezentativni setovi jedinki su analizirani kako bi se za svaku jedinku utvrdilo poreklo, da li ona pripada roditeljskoj ili hibridnoj klasi. U analizi su uzete u obzir samo P1 i P2 roditeljske klase i F1 hibridi.

Analiza za svaki par populacija je rađena u tri ponavljanja sa *burn in* periodom od 10000 i 100000 iteracija nakon toga. Postojala je opšta saglasnost u logaritamskoj distribuciji nakon sva tri ponavljanja, tako da je za grafičko predstavljanje rezultata ove analize korišćena srednja vrednost za sva tri ponavljanja.

### ***Bottleneck analiza***

Za jasno definisane genetičke klasterne urađeno je testiranje da li su populacije prošle kroz usko grlo (engl. *bottleneck effect*) i za ovu analizu korišćen je program BOTTLENECK (Cornuet i Luikart, 1996). Za procenu da li su populacije prošle kroz usko grlo ili ne, Cornuet i Luikart (1996) su razvili tri testa: *Sign test*, *Standardized differences test* i *Wilcoxon test (Sign-rank test)*. Sva tri testa izračunavaju da li u populaciji postoji značajno povećanje heterozigotnosti, što je jedna od karakteristika populacija koje su nedavno prošle kroz usko grlo. Program BOTTLENECK analizira vrednosti uočene heterozigotnosti ( $H_o$ ), broj alela ( $k_o$ ) i broj genskih kopija ( $n$ ) za svaki od tri testa uzimajući u obzir nultu hipotezu uspostavljanja ravnoteže mutacija i genetičkog drifta (engl. *mutation-drift equilibrium*). Svaki scenario se radi za tri modela mutacije: IAM (*Infinite mutation model*), TPM (*Two phase mutation model*) i SMM (*Stepwise mutation model*). S obzirom da je u ovom istraživanju rađena analiza 11 mikrosatelitskih lokusa, a da prema autorima BOTTLENECK programa za *Standardized differences test* je neophodno minimum 20 lokusa, onda je ovaj test isključen iz analize i rađeni su samo *Sign* i *Wilcoxon* testovi. Za svaki od ovih testova izračunata su četiri parametra za svaki lokus i za svaki model mutacije nezavisno. Parametri koji su računati su bili: očekivana ravnotežna heterozigotnost ( $H_e$ ) i njena standardna devijacija, standardizovana devijacija ( $DH/sd = H_e - H_eq/sd$ ) za 100000 ponavljanja koji su rađeni, i verovatnoća ove devijacije. Vrednost  $DH/sd$  se očekuje da bude pozitivna u slučaju postojanja povećanja heterozigotnosti i negativna u slučaju deficita heterozigotnosti. U slučaju postojanja ravnoteže u populaciji, u nekim lokusima će postojati povećanje, a u nekim smanjenje heterozigotnosti. Kod populacija koje su prošle kroz usko grlo, teorijski se očekuje povećanje heterozigotnosti u svim ili kod većine analiziranih lokusa.

### ***Analiza genetičke varijabilnosti***

U cilju sagledavanja genetičke varijabilnosti unutar svake definisane populacije divlje svinje u Evropi, u okviru programskog paketa ARLEQUIN 3.5.1.2. (Excoffier i Lischer, 2010) određeni su sledeći parametri: broj i frekvencija alela za svaki ispitivani lokus, očekivana i uočena heterozigotnost svakog lokusa, test za utvrđivanje disekvilibriruma genotipske vezanosti (engl. *genotypic linkage disequilibrium test*), koeficijent inbridinga ( $F_{IS}$ ) i test za utvrđivanje da li postoji odstupanje od Hardy-Weinbergovog ekvilibriruma. Svi nivoi signifikantnosti su određeni za  $p < 0,05$ , odnosno  $p < 0,005$  nakon Boniferonijeve korekcije  $p$  vrednosti (Rice, 1989). U ARLEQUIN programskom paketu takođe je urađena analiza molekularne varijanse (AMOVA) i određen je stepen genetičke diferencijacije između svih parova populacija na osnovu  $F_{ST}$  parametra.

Za vizuelizaciju genetičkih odnosa između populacija konstruisani su dendogrami primenom UPGMA metoda na osnovu Nei-jeve  $D_a$  genetičke distance i na osnovu izračunatih  $F_{ST}$  vrednosti. Pouzdanost nodusa dendograma određena je bootstrap analizom sa 100000 permutacija. Za konstruisanje dendograma korišćen je kompjuterski program POPTREE2 (Takezaki i sar., 2010).

### **5.3.2. Analiza sekvenci kontrolnog regiona mitohondrijalne DNK**

U cilju boljeg sagledavanja genetičkog diverziteta divljih svinja na Balkanu, sekvence dobijene u ovom istraživanju su analizirane zajedno sa sekvencama koje su preuzete iz Gen Banke poreklom od jedinki izlovljenih na teritoriji Balkana: 181 sekvenca divljih svinja iz Grčke (Alexandri i sar., 2012), 6 iz Bugarske (Larson i sar., 2007; Alexandri i sar., 2012) i 1 iz Makedonije (Larson i sar., 2007). Set podataka sa sekvencama CR1-mtDNK divljih svinja sa Balkana, koji su činile nove sekvence zajedno sa sekvencama preuzetim iz Gen Banke, se sastojao od 351 sekvence CR1-mtDNK. Pored ovog seta podataka, formiran je i drugi set podataka koji je uključio dodatnih 589 sekvenci koje su preuzete iz Gen Banke (Alves i sar., 2003; Larson i sar., 2005, 2007;

Fang i sar., 2006; Scandura i sar., 2008; Alves i sar., 2010; van Asch i sar., 2011; Alexandri i sar., 2012), tako da se drugi set sekvenci sastojao od ukupno 940 sekvenci divljih svinja koje su uzorkovane širom sveta. Za svaki haplotip koji je preuzet iz Gen Banke, odgovarajući broj jedinki po haplotipu je dodat na osnovu podataka u originalnoj publikaciji.

Za oba seta sekvenci urađeno je poređenje (engl. *alignment*) sekvenci korišćenjem Clustal W algoritma (Thompson i sar., 1994) u okviru programskog paketa MEGA 5 (Tamura i sar., 2011). Nakon poređenja, sekvence oba seta su skraćene i konačna dužina prvog seta sekvenci divljih svinja sa Balkana iznosila je 443bp, dok je drugi set sekvenci skraćen na dužinu od 411bp prema sekvencama iz rada Scandura i sar. (2008). Program MEGA 5 je takođe korišćen za određivanje najboljeg modela bazne supstitucije za svaki set sekvenci posebno. Programski paket ARLEQUIN je korišćen za izračunavanje osnovnih parametara genetičkog diverziteta:  $h$  – diverzitet haplotipova,  $\pi$  – diverzitet nukleotida i  $k$  – prosečan broj nukleotidnih razlika.

Programski paket Network 4.6.1.1. (dostupan na web stranici [://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm](http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm)) je korišćen za konstruisanje Median-joining (MJ) *network*-a za oba analizirana seta sekvenci. Filogenetičke analize zasnovane na Bajesovoj statistici urađene su sa ciljem otkrivanja strukturanosti populacija divljih svinja na Balkanu i rasvetljavanja filogenetičkih i filogeografskih odnosa divljih svinja sa Balkana u Evropsko/Evroazijskom kontekstu. Najbolji model bazne supstitucije u oba seta sekvenci bio je Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) sa Gamma korekcijom za varijacije u stopi mutacije (engl. *Gamma correction for among-site variation in substitution rate*), što je korišćeno kao *a priori* informacija pri konstruisanju filogenetičkih stabala u programu MrBayes ver.3.2. (Ronquist i sar., 2012). Parametri analize u programu MrBayes su bili sledeći: rađeno je dva ponavljanja za četiri Markov Chain Monte Carlo (MCMC) permutacije (jedan hladan i tri topla MCMC lanca), 3 000 000 iteracija za prvi i 10 000 000 iteracija za drugi set sekvenci, gde su beležene logaritamske vrednosti za svakih 100 iteracija. Sekvenca mtDNK vrste *Sus barbatus* (broj u Gen Banci AJ314540) je korišćena kao outgrupa u obe analize, dok je za set sekvenci koji obuhvata divlje svinje iz čitavog sveta uključeno još dve outgrupe (*Hylochoerus meinertzhageni* - GQ338951 i



*Phacochoerus aethiopicus* - AB046876). Za sumiranje rezultata analize i provere da li je li je dužina analize i *burn-in* perioda bila dovoljna za stabilizaciju logaritma korišćen je program Tracer v.1.5. (Rambaut i Drummond, 2007). U obe analize, prvih 10% iteracija je odbačeno kao *burn-in* period, a 50% konsensus stabla su konstruisana u programu FigTree v1.4.0. (Rambaut, 2009).

Na osnovu konstruisanja MJ network-a i Bajesovog filogenetičkog stabla, sve sekvence sa Balkana su podeljene u dve grupe: Južni Balkan i Kontinentalni Balkan. Drugi set sekvenci divljih svinja iz čitavog sveta je podeljen na četiri grupe: Azijska, Blisko Istočna, Evropska E1 i Evropska E2 haplogrupa. Osnovni parametri genetičke varijabilnosti za svaku grupu u oba seta sekvenci izračunati su u programskom paketu ARLEQUIN. Isti program je korišćen i za analizu molekularne varijanse (AMOVA) između i unutar analiziranih grupa u oba seta sekvenci.

U cilju rasvetljavanja demografske istorije divljih svinja na Balkanu, urađena je analiza *mismatch* distribucije za ceo set sekvenci divljih svinja sa Balkana, kao i za dve definisane grupe, uz testiranje nulte hipoteze da dobijeni podaci odgovaraju modelu nagle ekspanzije. Ova analiza urađena je u programskom paketu ARLEQUIN gde je statistička značajnost koliko se uočena *mismatch* distribucija poklapa sa očekivanom distribucijom na osnovu ispitivanog modela procenjena pomoću srednje vrednosti zbira kvadrata odstupanja (SSD – sum of the squared deviations). U programskom paketu ARLEQUIN takođe su urađeni testovi neutralnosti (Fu-ov  $F_s$  i Tajima  $D$  test) uz testiranje nulte hipoteze o selektivnoj neutralnosti i ravnoteži populacija. Oba testa su urađena za čitav set sekvenci sa Balkana, kao i za dve definisane grupe. *Mismatch* analiza i testovi neutralnosti su takođe urađeni za Evropsku E1 i E2 haplogrupu. Fu-ov  $F_s$  test je veoma dobar za otkrivanje demografske ekspanzije u populaciji i u tom slučaju test pokazuje signifikantno negativne  $F_s$  vrednosti (Fu, 1997). Tajima  $D$  test (Tajima, 1989a) je u poređenju sa Fu-ovim  $F_s$  testom manje moćan kada govorimo o demografskoj ekspanziji, ali je veoma koristan za razlikovanje efekata ekspanzije populacije u odnosu na heterogenost stopa mutacija. U slučaju postojanja nagle ekspanzije populacija  $D$  vrednosti su signifikantno negativne, dok nejednake stope mutacije dovode do pozitivnih  $D$  vrednosti (Tajima, 1989a, b; Aris-Bosou i Exoffier, 1996).

Demografska istorija Evropske E1 haplogupe je takođe testirana primenom Bajesove *skyline plot* (BSP) metode (Drummond i sar., 2005) u okviru programskog paketa BEAST v.1.8.0. (Drummond i sar., 2012). Da bi se prevazišlo ograničenje snage računara, odabrana su tri seta od 100 slučajnih sekvenci iz E1 haplogrupe. Analiza se zasniva na teoriji koalescencije i za procenu demografske istorije ispitivanog seta sekvenci program koristi Marko Chain Monte Carlo metod u okviru Bajesovog algoritma. Kao *a priori* informacije u analizi date su pretpostavke *strict clock* modela i 20 diskretnih intervala. Za svaki set od 100 sekvenci urađeno je tri ponavljanja od 20 miliona iteracija, od kojih je prvih 10% odbačeno kao *burn-in*. Parametri modela su preuzimani na svakih 2000 iteracija. Dobijeni output fajlovi (log i tree fajlovi) nakon tri ponavljanja su kombinovani zajedno koristeći LogCombiner v.1.8.0 koji se nalazi u okviru programskog paketa BEAST da bi se dobili jedinstveni *log* i *tree* fajlovi za svaki set od 100 sekvenci. Ovi kombinovani fajlovi su potom analizirani u programu Tracer u kome su kreirani BSP za svaki set slučajno odabranih sekvenci. Kao *a priori* informacija u analizi korišćene su dve različite stope mutacije kontrolnog regiona mtDNK, 8% (Randi i sar., 1998 ) i 10 % ( Birungi i Arctander, 2000), koje su izračunate za druge vrste kopitara, a gore opisana BSP analiza je ponovljena za obe stope mutacije.

## 6. REZULTATI

### 6.1. Genetička varijabilnost i struktura populacija divlje svinje u Evropi na osnovu analize mikrosatelitskih lokusa

Analiza polimorfnosti mikrosatelita u populacijama divlje svinje iz Evrope je obuhvatila analizu 11 mikrosatelitskih lokusa korišćenjem seta hemikalija „BioType Animal Pig Kit“. Genotipizacija svih 664 jedinki je bila uspešna za lokuse SBH2, SBH18, SBH4, SBH20, SBH1, SBH13 i 387A12F, dok genotipizacija nije bila moguća kod jedne jedinke u lokusu S0655, u lokusu SBH22 kod dve, u lokusu SBH10 kod četiri i u lokusu SBH19 kod sedam od 664 analiziranih jedinki. Ovakav rezultat se može objasniti prisustvom nultog alela koji se najčešće javlja usled mutacije prajmer vezujućeg regiona mikrosatelita. S obzirom da je kod 7 analiziranih lokusa uspešnost amplifikacije iznosila 100%, a kod preostala četiri lokusa se kretala od 98,9 do 99,85%, svi lokusi su uključeni u dalje analize genetičke varijabilnosti populacija divlje svinje u Evropi.

U analizi jedanaest mikrosatelitskih lokusa kod 664 jedinki divlje svinje Evrope prvo je određena genetička struktura populacija korišćenjem programskih paketa koji se zasnivaju na Bajesovom algoritmu. U ovu svrhu korišćeni su programski paketi STRUCTURE 2.3.4., Geneland 4.0.3. i TESS 2.3. Jedna grupa je smatrana pravim genetičkim klasterom samo ako je jasno potvrđena u dva od tri urađena pristupa. Pored analize strukture populacije primenom Bajesovog algoritma takođe su urađene faktorske analize (FCA- Factorial Correspondence Analysis) u programskom paketu Genetix 4.05. Iako je faktorska analiza veoma jednostavna, ona se pokazala dobra u smislu sagledavanja strukture populacija i njihove varijabilnosti.

#### 6.1.1. STRUCTURE analiza u populacijama divlje svinje u Evropi

Prvi korak je podrazumevao analizu svih 664 jedinki i u ovoj analizi procenjen broj genetičkih klastera bio je  $K=3$  (Sl. 3). Uočena je korelacija između genotipske

pripadnosti svake jedinice određenom klasteru i geografskog porekla analiziranih jedinici. Naredna STRUCTURE analiza rađena je za jedinice koje su pripadale prvom klasteru, a to su bile jedinice sa Balkana, jednog lokaliteta u Italiji - Castel Porziano i 16 jedinici iz Centralne Evrope. U ovoj analizi procenjen broj genetičkih klastera bio je  $K=2$  (Sl. 4). U geografskom smislu uočava se da je Balkan podeljen na primorski i kontinentalni deo, gde su u klaster sa primorskim delom Bakana uključeni uzorci iz rezervata prirode "Castel Porziano" (Italija). U oba klastera uključen je deo uzoraka iz Centralne Evrope, ali je veći broj uzoraka bio grupisan sa klasterom Kontinentalni Balkan. U sledećoj fazi uzorci koji su pripadali klasteru "Primorski Balkan, Castel Porziano i Centralna Evropa" su analizirani i otkriveno je  $K=2$  genetičkih klastera (Sl. 5). U ovoj analizi se Castel Porziano jasno izdvojio kao poseban genetički klaster. Drugi klaster su činili uzorci iz Bosne, Hercegovine, Crne Gore, primorskog dela Slovenije i Centralne Evrope. STRUCTURE analiza ovog drugog klastera otkrila je da je najbolja vrednost  $K=3$ . Međutim, u ovoj analizi se samo primorski deo Slovenije izdvaja kao jasan genetički klaster (Sl. 5). STRUCTURE analiza klastera "Kontinentalni Balkan i Centralna Evropa" otkrila je da je najbolje  $K=6$ , a takođe visok pik uočen je na  $K=2$  i  $K=4$  (Sl. 6). Ukoliko pogledamo pripadnost svake jedinice određenom klasteru, za sve tri vrednosti  $K$ , jedino se Makedonija izdvaja kao jasan genetički klaster.

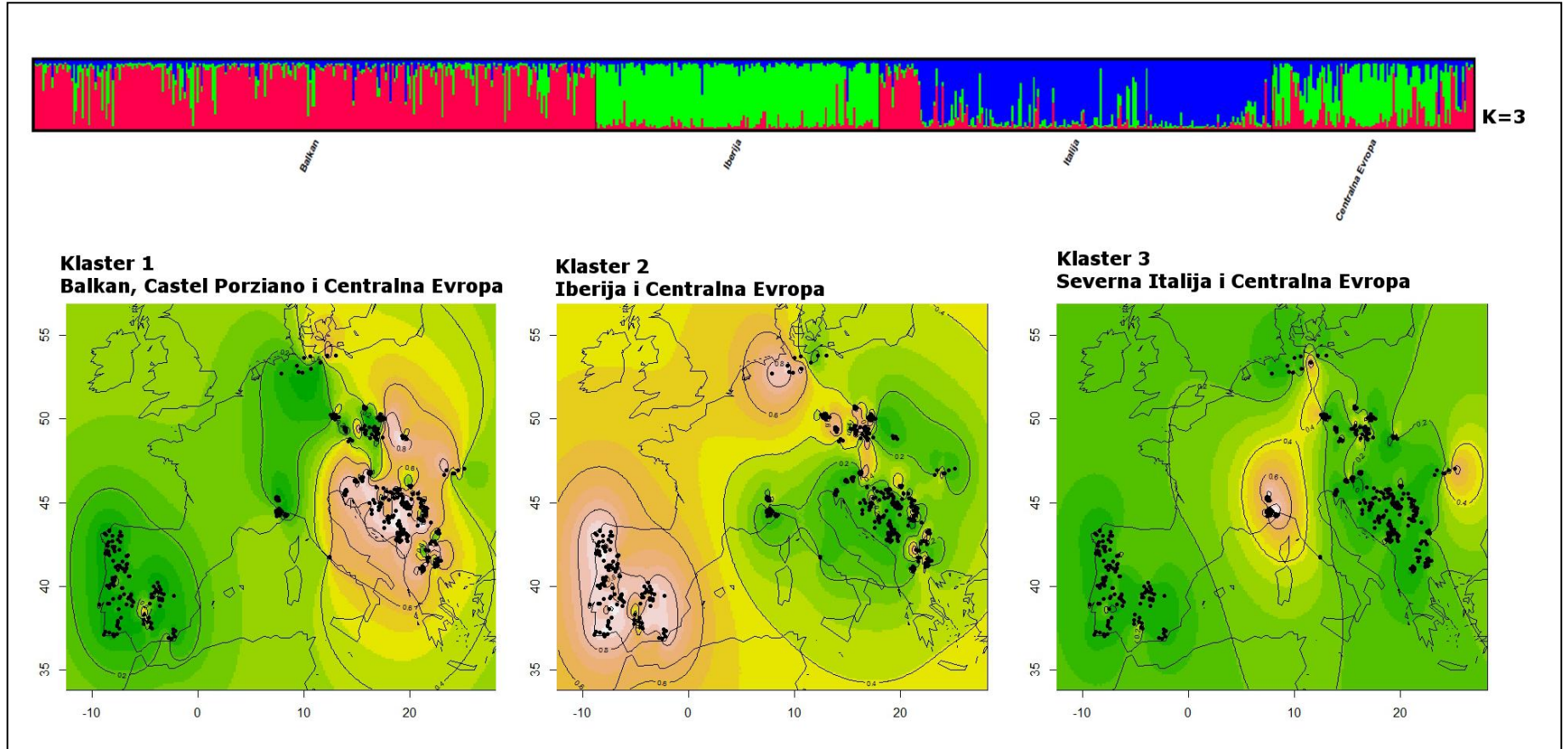
STRUCTURE analiza Iberije i 72 uzorka iz Centralne Evrope koji su u prvoj analizi bili u zajedničkom klasteru pokazala je da je broj genetičkih klastera  $K=2$  (Sl.7). Jedan klaster su činili svi uzorci sa Iberijskog poluostrva izuzev uzoraka sa juga Portugalije, dok su drugi klaster činili Portugalija Jug i Centralna Evropa. Analizom prvog klastera utvrđeno je  $K=2$  (Sl. 7), gde se severni deo Iberijskog poluostrva izdvojio kao nezavistan klaster. Dalja analiza ostalih uzoraka sa Iberijskog poluostrva nije jasno izdvojila ni jedan jasan geografski i genetički klaster (Sl. 7). Analizom klastera "Portugalija Jug i Centralna Evropa", uzorci iz južnog dela Portugalije su se jasno izdvojili kao zaseban genetički klaster (Sl. 7).

Analiza uzoraka iz severnog dela Italije zajedno sa 5 uzoraka Centralne Evrope koji su u prvoj STRUCTURE analizi grupisani zajedno, izdvojila je dva genetička

klastera,  $K=2$  (Sl. 8). Prvi klaster su činili uzorci sa lovnih područja Cuneo i Savona, dok su drugi klaster činili Lanzo, La Mandria i uzorci iz Centralne Evrope.

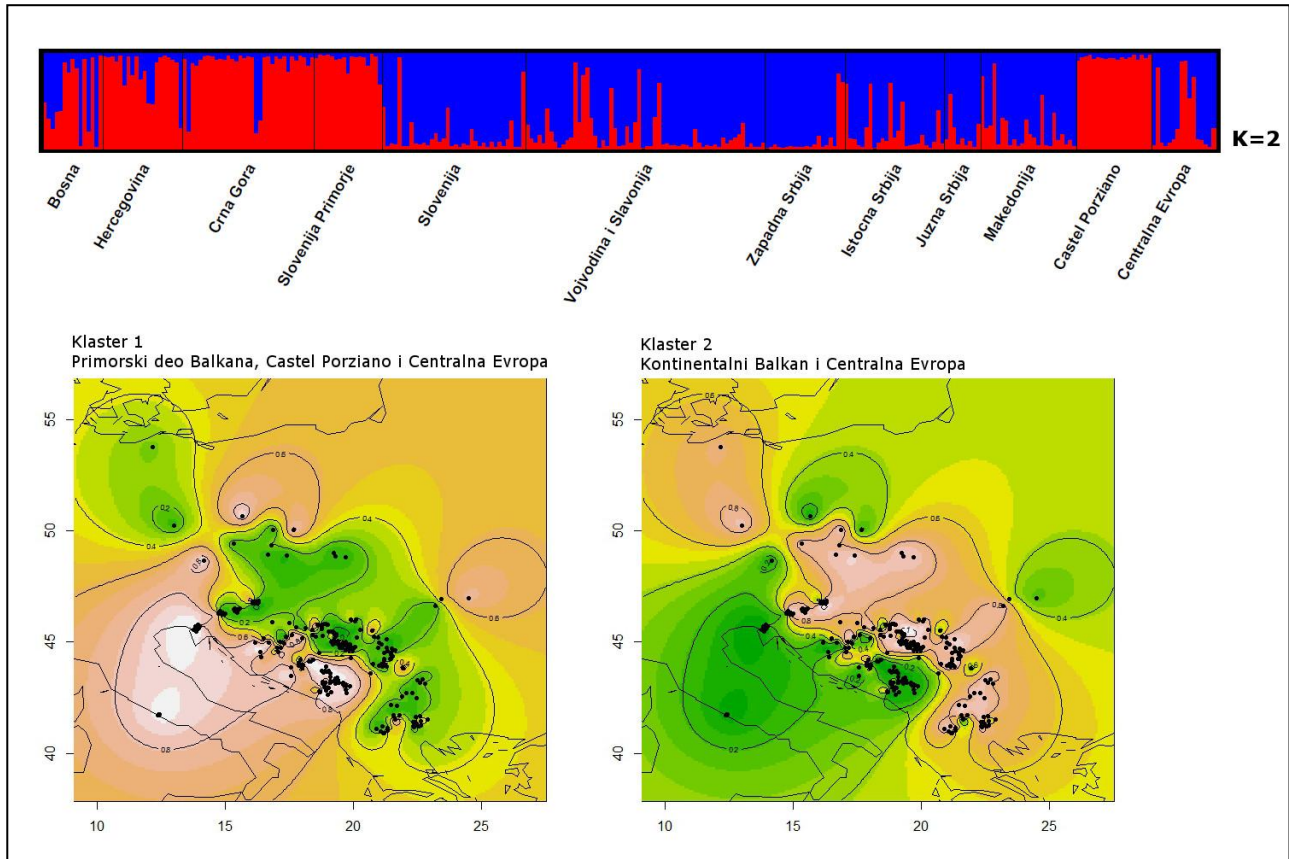
Dakle, na osnovu prikazane hijerarhijske STRUCTURE analize u Evropi se izdvajaju sledeći genetički klasteri:

1. Castel Porziano (Italija)
2. Slovenija Primorje
3. Bosna (7 uzoraka), Hercegovina, Crna Gora i 3 uzorka iz Češke i 2 iz Rumunije
4. Makedonija
5. Srbija, Hrvatska, Bosna (8 uzoraka), Slovenija, Češka (6), Nemačka (1) i Rumunija (4)
6. Centralna Evropa (72 uzorka)
7. Portugalija Jug
8. Iberija Sever
9. Iberija Centar
10. Cuneo i Savona (Italija)
11. La Mandria, Lanzo (Italija) i 5 uzoraka iz Centralne Evrope.



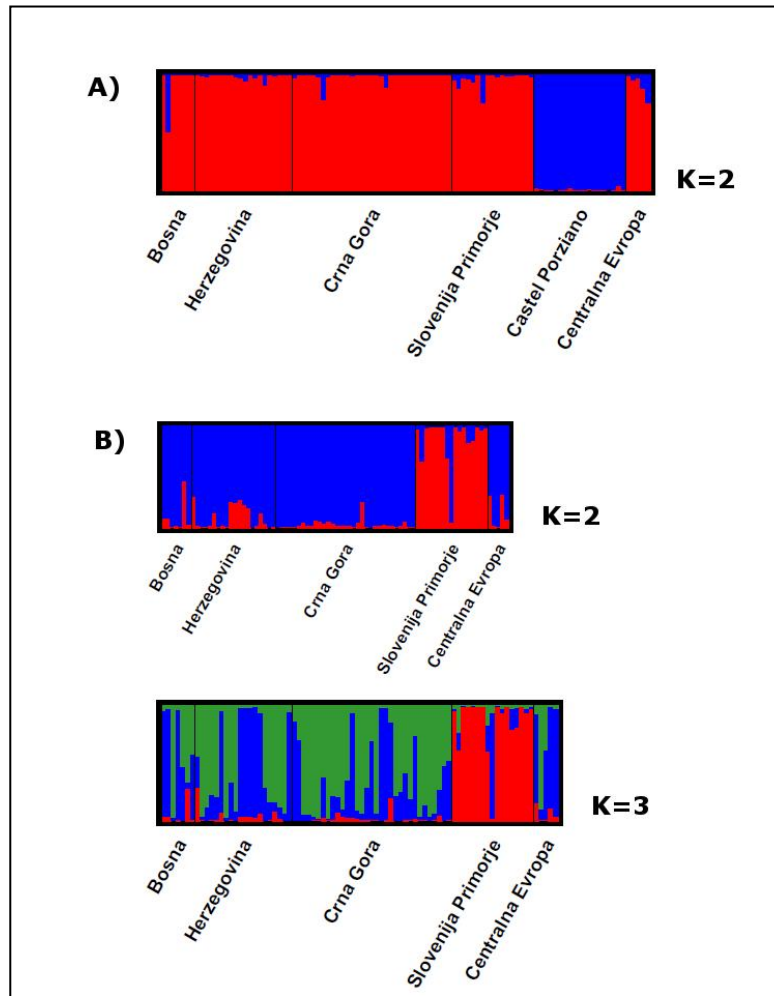
Slika 3. Grafički prikaz STRUCTURE analize kod 664 jedinki divlje svinje iz Evrope. U gornjem delu slike prikazan je bar plot za K=3. U donjem delu prikazana su tri dobijena klastera u odnosu na informacije o geografskom lokalitetu za svaku jedinku. Najsvetliji delovi na mapi predstavljaju najveću verovatnoću za pripadnost jedinke određenom klasteru

Figure 3. Illustrative interpretation of STRUCTURE analysis performed in 664 wild boar samples from Europe. In the upper part of figure barplot for K=3 is presented. In the bottom part three obtained clusters are presented on the map according to information of geographical coordinates for each sample. The brightest parts on the map reflect the highest probability of belonging of individual to particular cluster.



Slika 4. Grafički prikaz STRUCTURE analize kod divljih svinja sa Balkana, sa lokaliteta Castel Porziano (Italija) i 16 uzoraka iz Centralne Evrope. U gornjem delu slike prikazan je bar plot za  $K=2$ . U donjem delu prikazana su dva dobijena klastera u odnosu na informacije o geografskom lokalitetu za svaku jedinku. Najsvetliji delovi na mapi predstavljaju najveću verovatnoću za pripadnost jedinke određenom klasteru

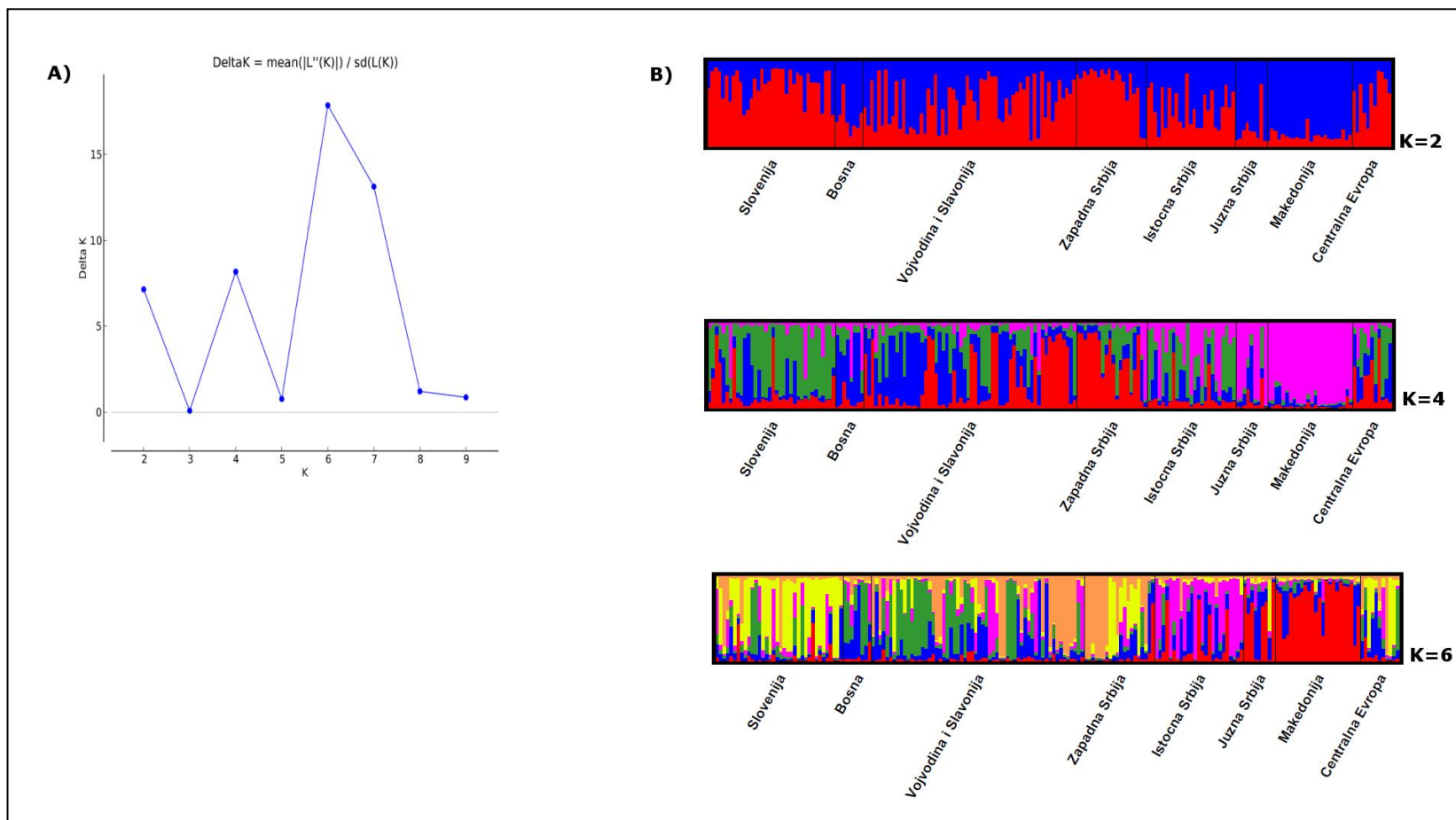
Figure 4. Illustrative interpretation of STRUCTURE analysis performed in wild boars from the Balkans, Castel Porziano (Italy) and 16 samples from Central Europe. In the upper part of figure barplot for  $K=2$  is presented. In the bottom part two obtained clusters are presented on the map according to information of geographical coordinates for each sample. The brightest parts on the map reflect the highest probability of belonging of individual to particular cluster



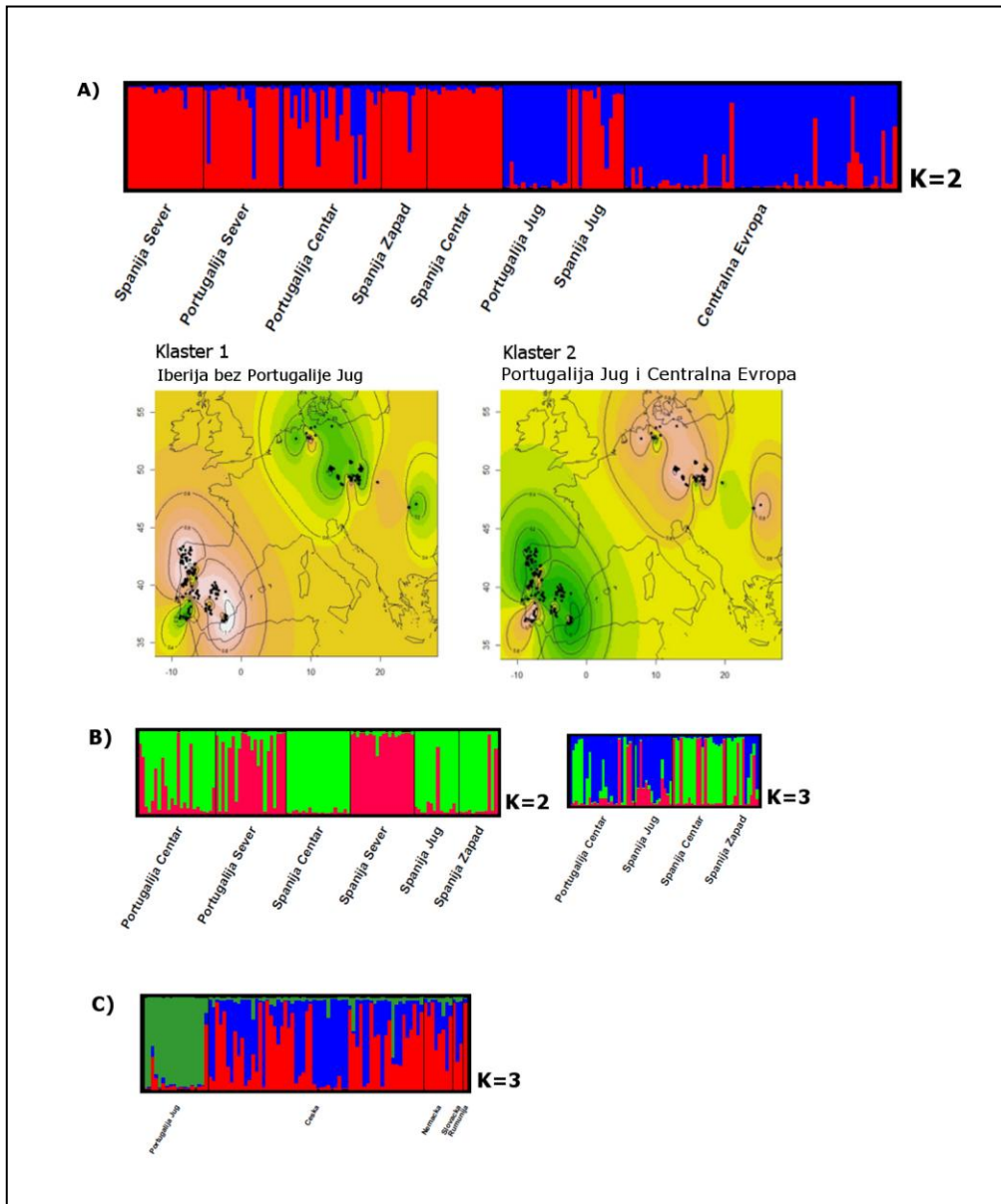
Slika 5. A) Grafički prikaz STRUCTURE analize klastera "Primorski Balkan, Castel Porziano i Centralna Evropa" za K=2. B) Grafički prikaz STRUCTURE analize uzoraka iz Bosne, Hercegovine, Crne Gore, primorja Slovenije i Centralne Evrope za K=2 i K=3

Figure 5. A) Illustrative interpretation of STRUCTURE analysis of genetic cluster „Littoral Balkan, Castel Porziano and Central Europe“ for K=2. B) Illustrative interpretation of STRUCTURE analysis of wild boars from Bosnia and Herzegovina, Montenegro, littoral part of Slovenia and Central Europe for K=2 and K=3



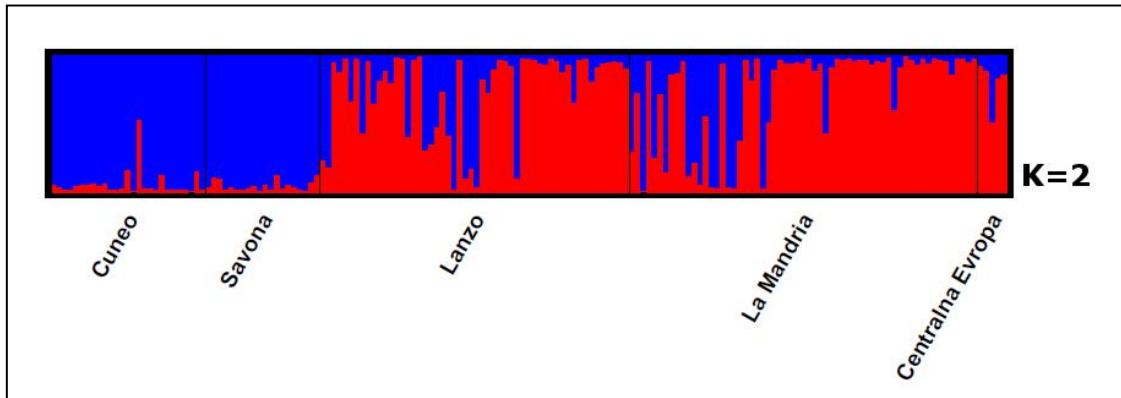


Slika 6. Grafički prikaz STRUCTURE analize klastera "Kontinentalni Balkan i Centralna Evropa". A) Izračunate  $\Delta K$  vrednosti. B) Bar plot za K=2, K=4 i K=6  
 Figure 6. Illustrative interpretation of STRUCTURE analysis of genetic cluster „Continental Balkans and Central Europe“ A) Graph with  $\Delta K$  values; B) Barplots for K=2, K=4 and K=6



Slika 7. Grafički prikaz hijerarhijske STRUCTURE analize za uzorke divljih svinja sa Iberijskog poluostrva i iz Centralne Evrope

Figure 7. Illustrative interpretation of hierarchical STRUCTURE analysis of wild boar samples from Iberian peninsula and Central Europe

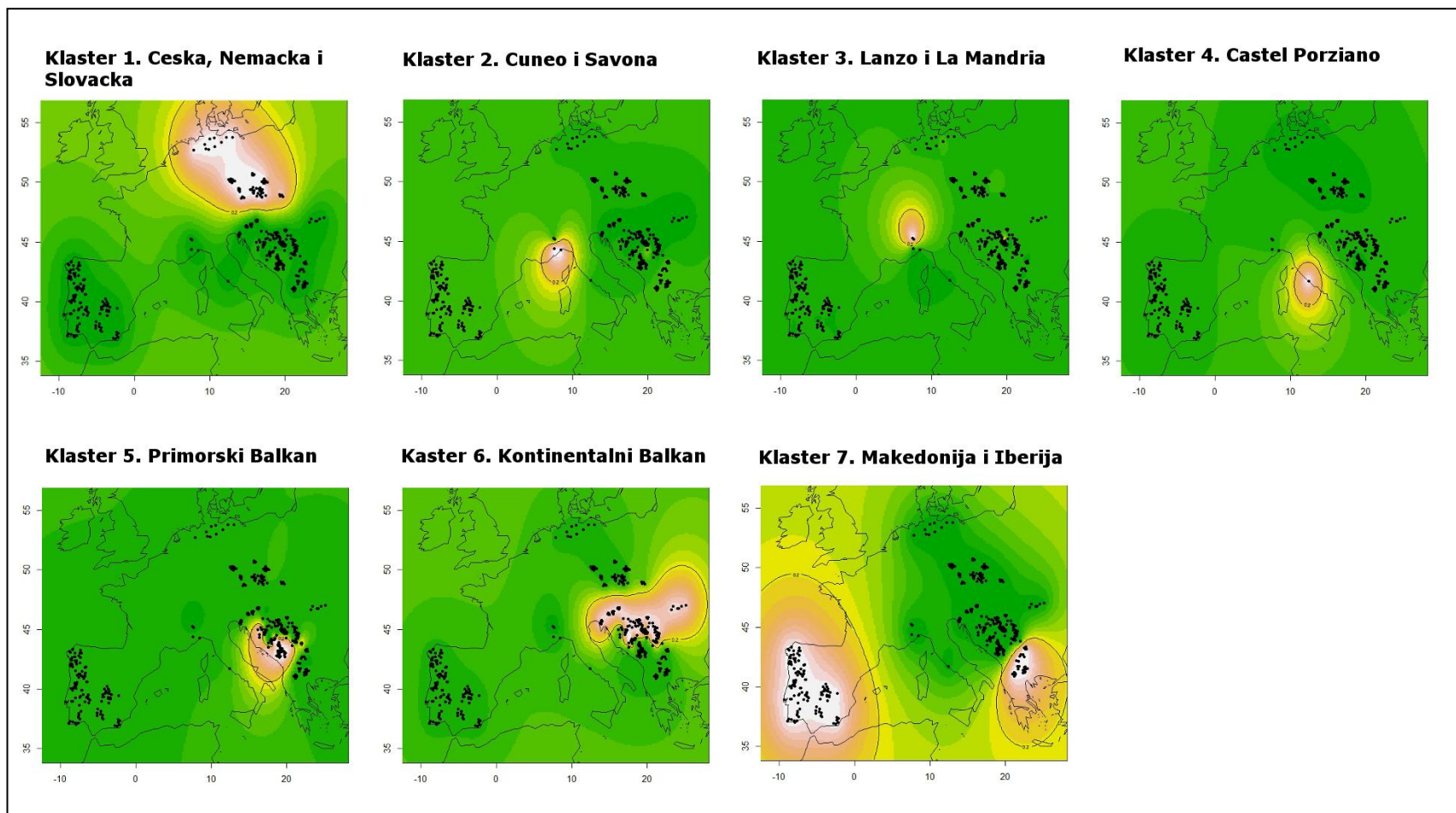


Slika 8. Grafički prikaz STRUCTURE analize za uzorke divljih svinja iz Severne Italije i Centralne Evrope.

Figure 8. Illustrative interpretation of STRUCTURE analysis of wild boars from Northern Italy and Central Europe

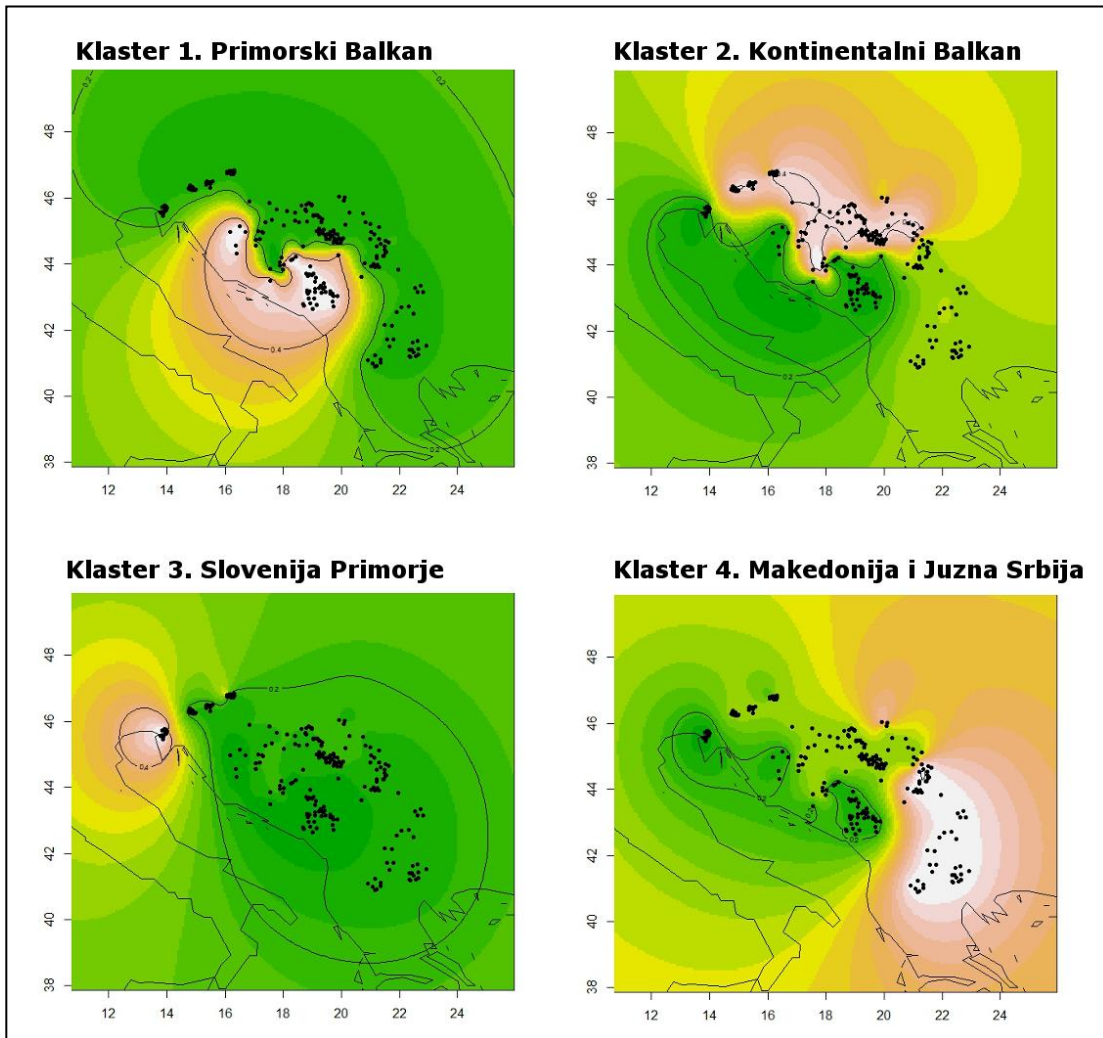
### 6.1.2. Geneland analiza u populacijama divlje svinje u Evropi

Geneland analiza svih 664 uzoraka divljih svinja iz Evrope je pokazala prisustvo 7 genetičkih klastera: (1) Češka, Nemačka i Slovačka; (2) Cuneo i Savona; (3) Lanzo i La Mandria; (4) Castel Porziano; (5) Primorski Balkan (Crna Gora, Hercegovina i deo Bosne); (6) Kontinentalni Balkan (Slovenija, Hrvatska, deo Bosne, Srbija i Rumunija); (7) Makedonija i Iberijsko poluostrvo (Sl. 9). U analizi uzoraka sa Balkana potvrđeno je 4 genetička klastera (Sl. 10): Primorski Balkan (deo Bosne, Hercegovina i Crna Gora); Kontinentalni Balkan (Srbija, Hrvatska, Slovenija i nekoliko uzoraka iz Bosne); Slovenija Primorje, i Makedonija sa uzorcima iz Južne Srbije. Na Iberijskom poluostrvu utvrđeno je takođe 4 klastera (Sl. 11): Severna Iberija; Portugalija Jug i uzorci iz Almerije (Španija); Španija Centar i Zapad, i Portugalija Centar zajedno sa uzorcima iz Kordobe (Španija). U Italiji je otkriveno 4 genetička klastera: Castel Porziano; Cuneo i Savona; La Mandria; i Lanzo (Sl. 12). Analiza samo uzoraka iz Centralne Evrope je otkrila  $K=1$ .



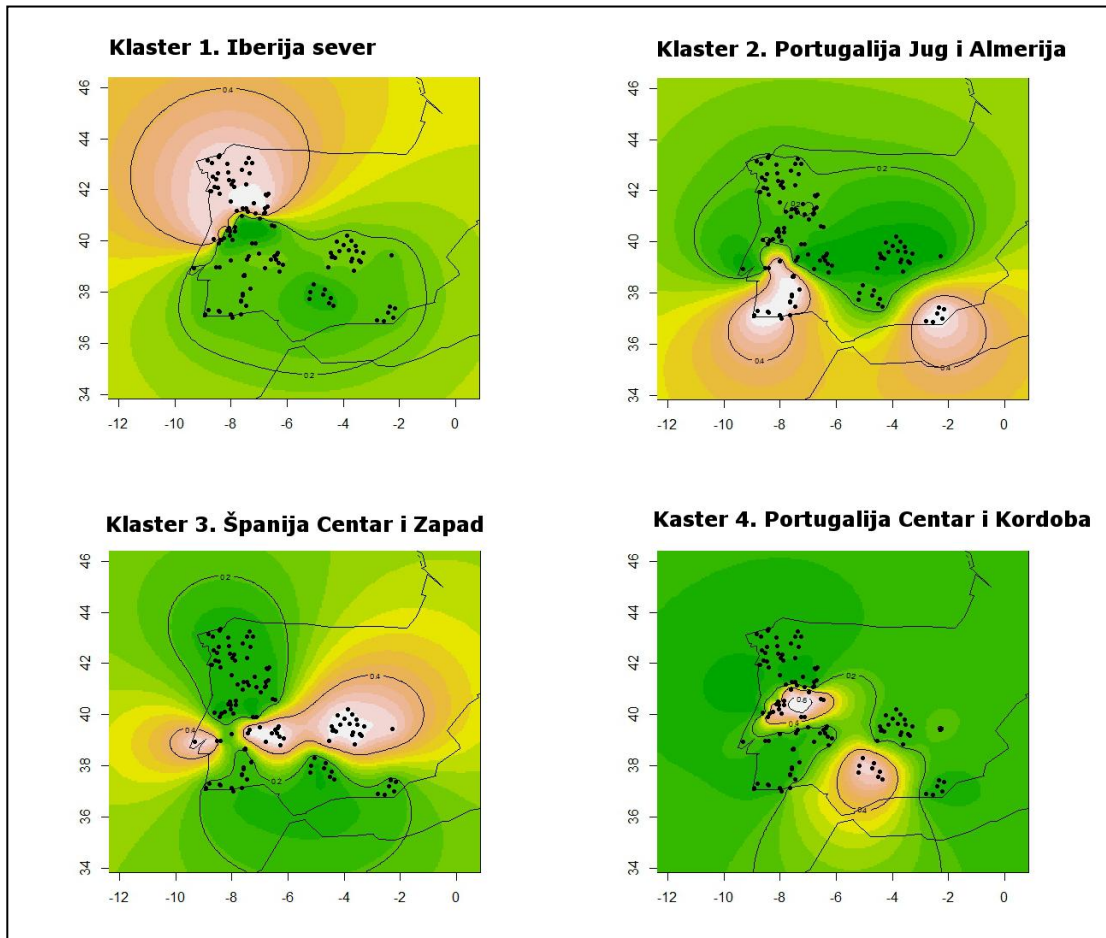
Slika 9. Grafički prikaz Geneland analize za 664 uzoraka divlje svinje u Evropi. Najsvetliji delovi na mapi predstavljaju najveću verovatnoću za pripadnost jedinke određenom klasteru

Figure 9. Illustrative interpretation of Geneland analysis of 664 wild boar samples from Europe. The brightest parts on the map reflect the highest probability of belonging of individual to particular cluster.



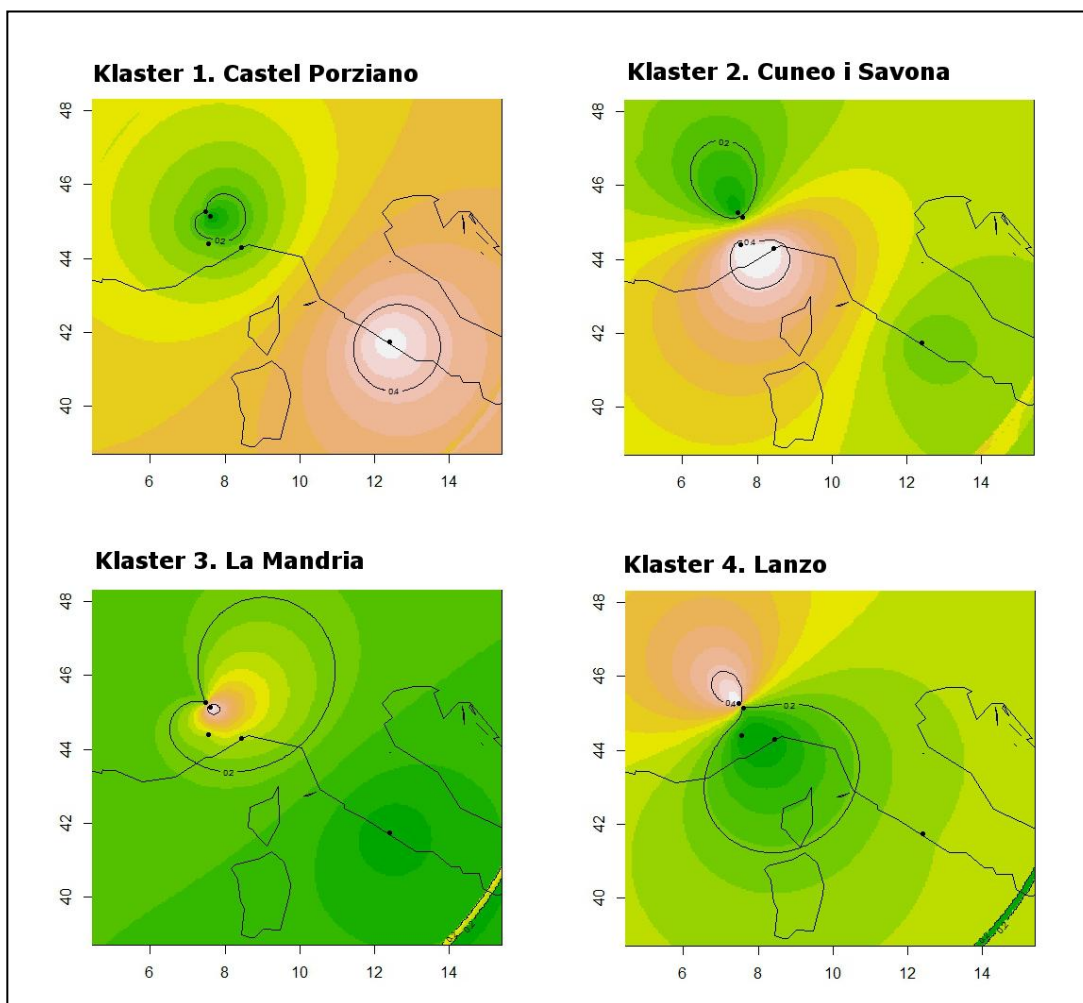
Slika 10. Grafički prikaz Geneland analize divljih svinja na Balkanu. Najsvetliji delovi na mapi predstavljaju najveću verovatnoću za pripadnost jedinke određenom klasteru

Figure 10. Illustrative interpretation of Geneland analysis of wild boars from the Balkans. The brightest parts on the map reflect the highest probability of belonging of individual to particular cluster



Slika 11. Grafički prikaz Geneland analize divljih svinja sa Iberijskog poluostrva. Najsvetliji delovi na mapi predstavljaju najveću verovatnoću za pripadnost jedinke određenom klasteru

Figure 11. Illustrative interpretation of Geneland analysis of wild boars from the Iberian peninsula. The brightest parts on the map reflect the highest probability of belonging of individual to particular cluster



Slika 12. Grafički prikaz Geneland analize divljih svinja iz Italije. Najsvetliji delovi na mapi predstavljaju najveću verovatnoću za pripadnost jedinike određenom klasteru

Figure 12. Illustrative interpretation of Geneland analysis of wild boars from Italy. The brightest parts on the map reflect the highest probability of belonging of individual to particular cluster

### 6.1.3. TESS analiza u populacijama divlje svinje u Evropi

Analiza 664 jedinki divlje svinje iz Evrope primenom TESS programskog paketa otkrila je da je najbolje  $K_{max}=12$  (Sl. 13). Iako je  $K_{max}=12$ , u stvari je otkriveno 11 genetičkih klastera koji su u manjoj ili većoj meri odgovarali klasterima koji su dobijeni nakon hijerarhijske STRUCTURE analize. Klaster pod brojem 11 na Slici 13. odgovara

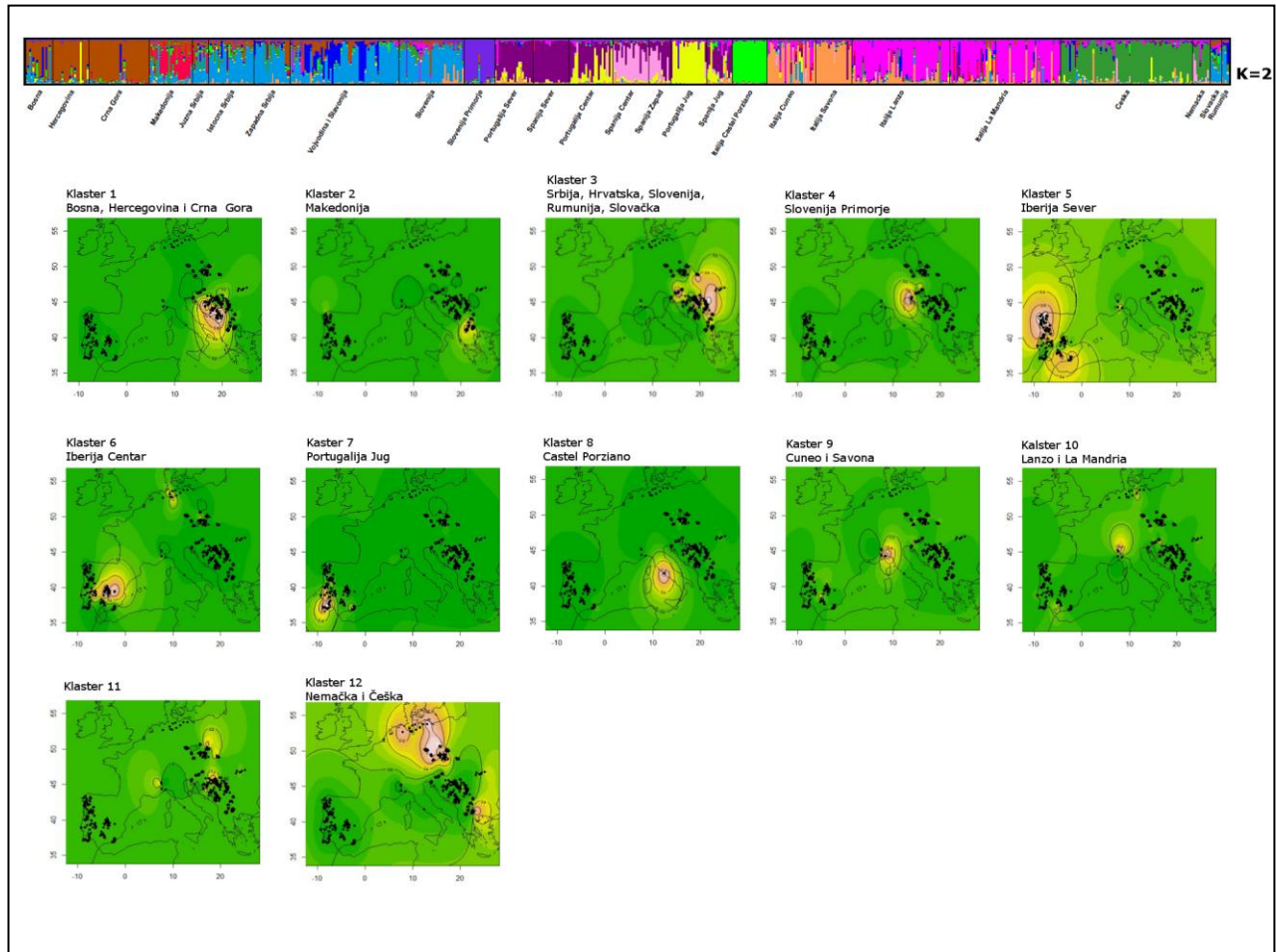
tamno plavo obeleženim uzorcima na bar plotu prikazanom na vrhu slike i jasno se vidi da u ovom slučaju nije moguće govoriti o nezavisnom genetičkom klasteru.

TESS analiza uzoraka divljih svinja sa Balkana otkrila je prisustvo 4 genetička klastera na Balkanu (Sl. 14). Slično prethodnim analizama i ovde je pokazana podela jedinki na zapadne, primorske subpopulacije (klaster "Primorski Balkan") i istočne, kontinentalne subpopulacije (klaster "Kontinentalni Balkan"). Divlje svinje izlovljene u primorskom delu Slovenije i iz Makedonije čine dva zasebna klastera.

Analizom divljih svinja sa Iberijskog poluostrva otkriveno je  $K_{max}=4$  (Sl. 15), pri čemu se severni deo Iberije i Portugalija Jug izdvajaju kao dva jasno, genetički i geografski, definisana klastera. Treći klaster su činile jedinke uzorkovane u centralnom i zapadnom delu Španije, dok su u četvrtom klasteru bile divlje svinje iz centralnog dela Portugalije i sa juga Španije.

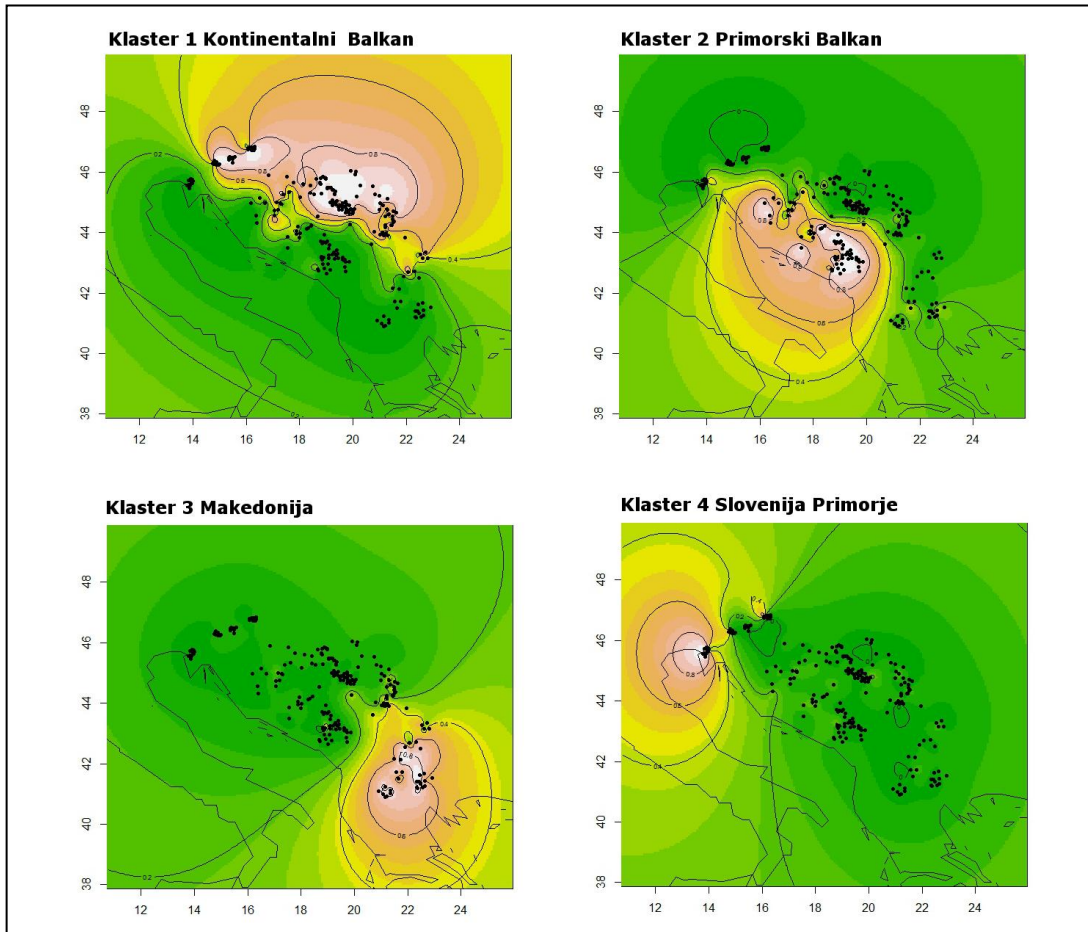
U analizi uzoraka iz Italije otkriveno je  $K_{max}=3$ , što je odgovaralo sledećim genetičkim i geografskim klasterima: (1) Castel Porziano; (2) Cuneo i Savona; (3) La Mandria i Lanzo (Sl. 16). TESS analiza uzoraka iz Centralne Evrope pokazala je  $K_{max}=2$  na osnovu čega se vidi da uzorci iz Češke i Nemačke pripadaju jednom genetičkom klasteru, dok su uzorci iz Slovačke i Rumunije različiti, ali nisu jasno definisani kao genetički klaster (Sl. 17). S obzirom da su prethodne analize svih uzoraka pokazale da su divlje svinje iz Rumunije i Slovačke najbliže uzorcima sa Balkana, verovatno je to posledica zašto je TESS analiza samo uzoraka iz Centralne Evrope pokazala  $K_{max}=2$ .





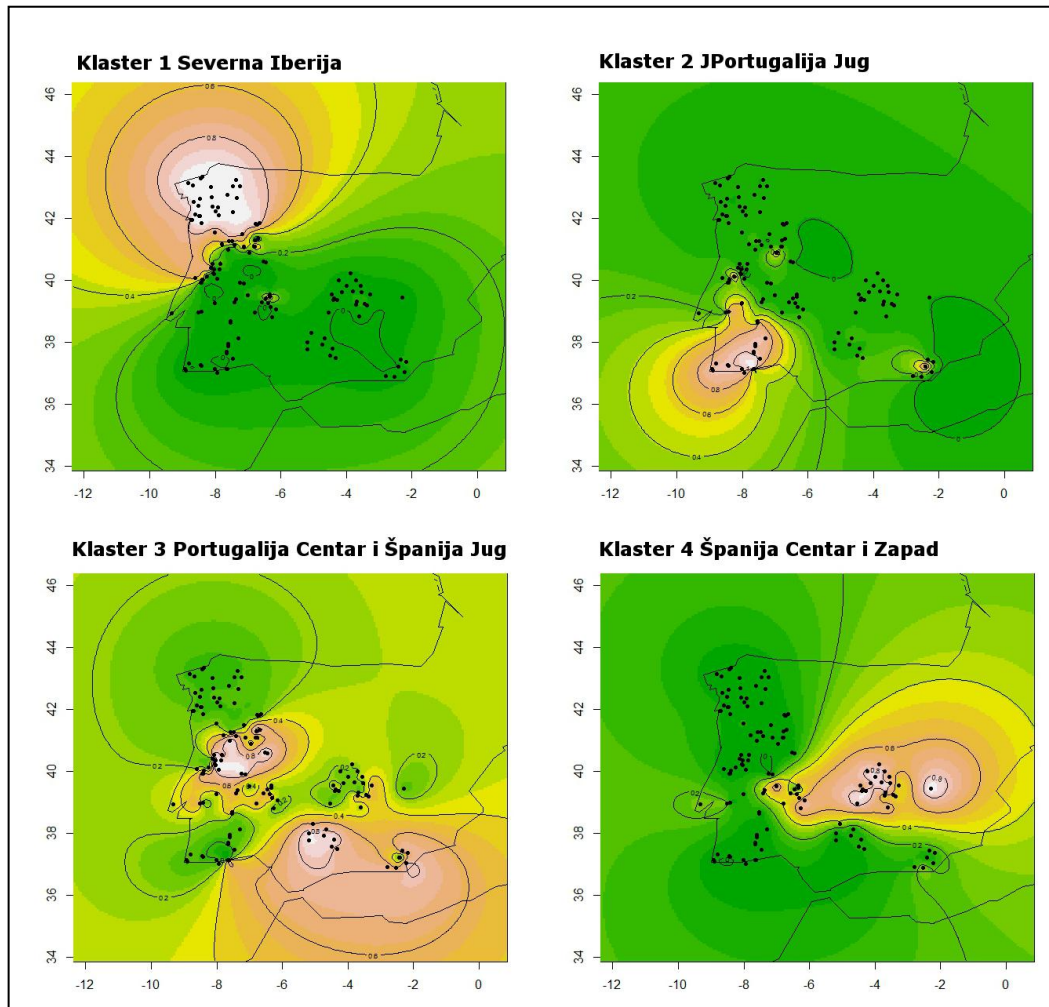
Slika 13. Grafički prikaz TESS analize kod 664 uzoraka divlje svinje iz Evrope. U gornjem delu slike prikazan je bar plot za  $K_{max}=12$ . U donjem delu prikazani su dobijeni klasteri u odnosu na informacije o geografskom lokalitetu za svaku jedinku. Najsvetliji delovi na mapi predstavljaju najveću verovatnoću za pripadnost jedinke određenom klasteru

Figure 13. Illustrative interpretation of TESS analysis of 664 wild boar samples from Europe. . In the upper part of figure barplot for  $K=12$  is presented. In the bottom part obtained clusters are presented on the map according to information of geographical coordinates for each sample. The brightest parts on the map reflect the highest probability of belonging of individual to particular cluster



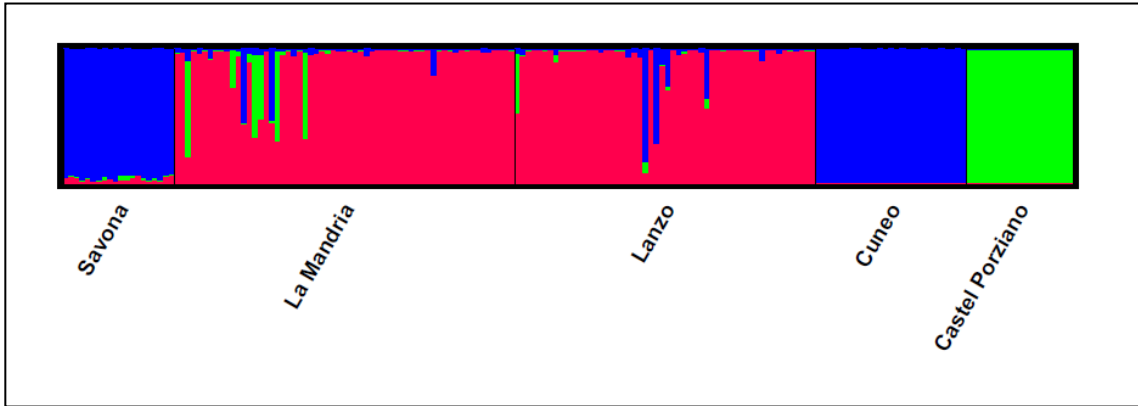
Slika 14. Grafički prikaz TESS analize uzoraka divljih svinja sa Balkanskog poluostrva u odnosu na informacije o geografskom lokalitetu za svaku jedinku. Najsvetliji delovi na mapi predstavljaju najveću verovatnoću za pripadnost jedinke određenom klasteru

Figure 14. Illustrative interpretation of TESS analysis of wild boars from the Balkans. The brightest parts on the map reflect the highest probability of belonging of individual to particular cluster

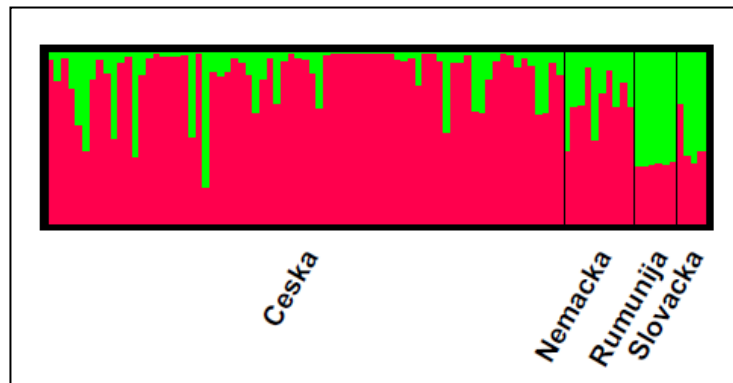


Slika 15. Grafički prikaz TESS analize uzoraka divljih svinja sa Iberijskog poluostrva u odnosu na informacije o geografskom lokalitetu za svaku jedinku. Najsvetliji delovi na mapi predstavljaju najveću verovatnoću za pripadnost jedinke određenom klasteru

Figure 15. Illustrative interpretation of Geneland analysis of wild boars from the Iberian peninsula. The brightest parts on the map reflect the highest probability of belonging of individual to particular cluster



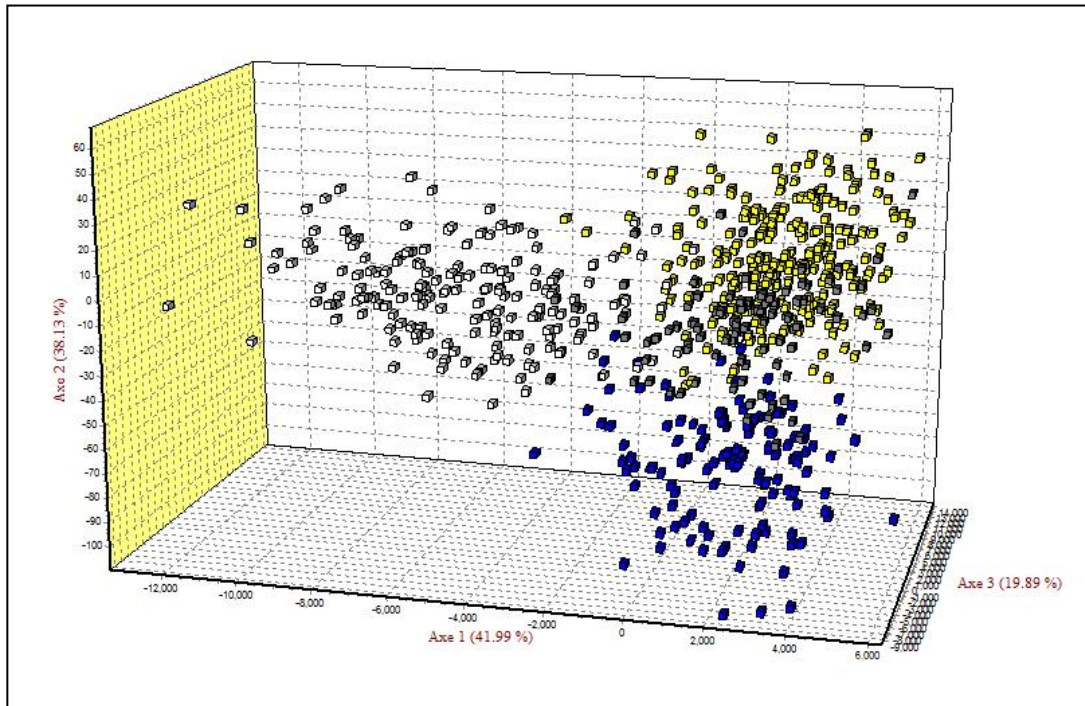
Slika 16. Bar plot TESS analize uzoraka divljih svinja iz Italije za  $K_{max}=3$   
 Figure 16. Barplot of TESS analysis of wild boar samples from Italy for  $K_{max}=3$



Slika 17. Bar plot TESS analize uzoraka divljih svinja iz Centralne Evrope za  $K_{max}=2$   
 Figure 17. Barplot of TESS analysis of wild boar samples from Central Europe for  $K_{max}=2$

#### 6.1.4. FCA u populacijama divlje svinje u Evropi

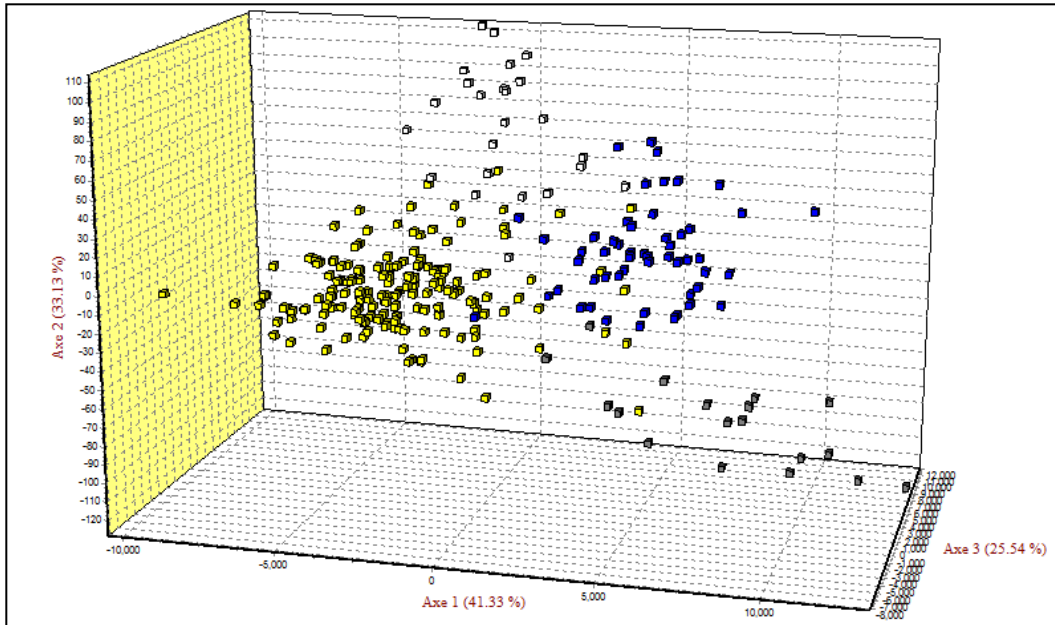
Faktorska analiza svih uzoraka divljih svinja iz Evrope je pokazala da su tri analizirana poluostrva, Balkan, Italija i Iberija, zasebni genetički klasteri dok se uzorci iz Centralne Evrope nalaze u zoni kontakta između ova tri klastera (Sl. 18).



Slika 18. Prikaz trodimenzionalne faktorske analize uradene za 664 uzoraka iz Evrope. Legenda: Beli kvadrati – Apeninsko poluostrvo, žuti – Balkansko poluostrvo, plavi- Iberijsko poluostrvo, sivi - Centralna Evropa

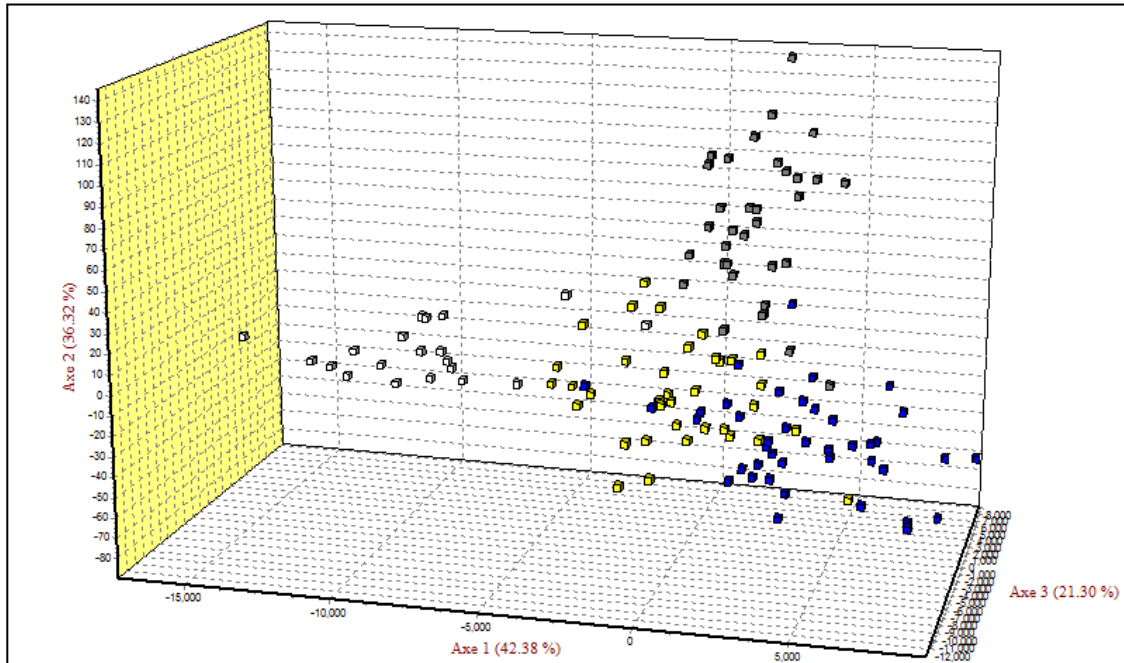
Figure 18. 3D Factorial Correspondence Analysis performed for 664 wild boars from Europe. Apennine peninsula – white filled squares; Balkan peninsula – yellow filled squares; Iberian peninsula – blue filled squares; Central Europe – grey filled squares.

Faktorska analiza kod divljih svinja na Balkanu pokazala je postojanje 4 subpopulacije: (1) Kontinentalni Balkan (Bosna, Srbija, Hrvatska i Slovenija), (2) Primorski Balkan (Crna Gora i Hercegovina), (3) Slovenija Primorje, i (4) Makedonija (Sl. 19).



Slika 19. Prikaz trodimenzionalne faktorske analize urađene za uzorke divljih svinja sa Balkana. Legenda: Beli kvadrati - Makedonija, žuti -Kontinentalni Balkan, plavi- Primorski Balkan, sivi - Slovenija Primorje  
Figure 19. 3D Factorial Correspondence Analysis performed in wild boars from the Balkans. Macedonia – white filled squares; Continental Balkan – yellow filled squares; Littoral Balkan – blue filled squares; Slovenia Littoral – grey filled squares.

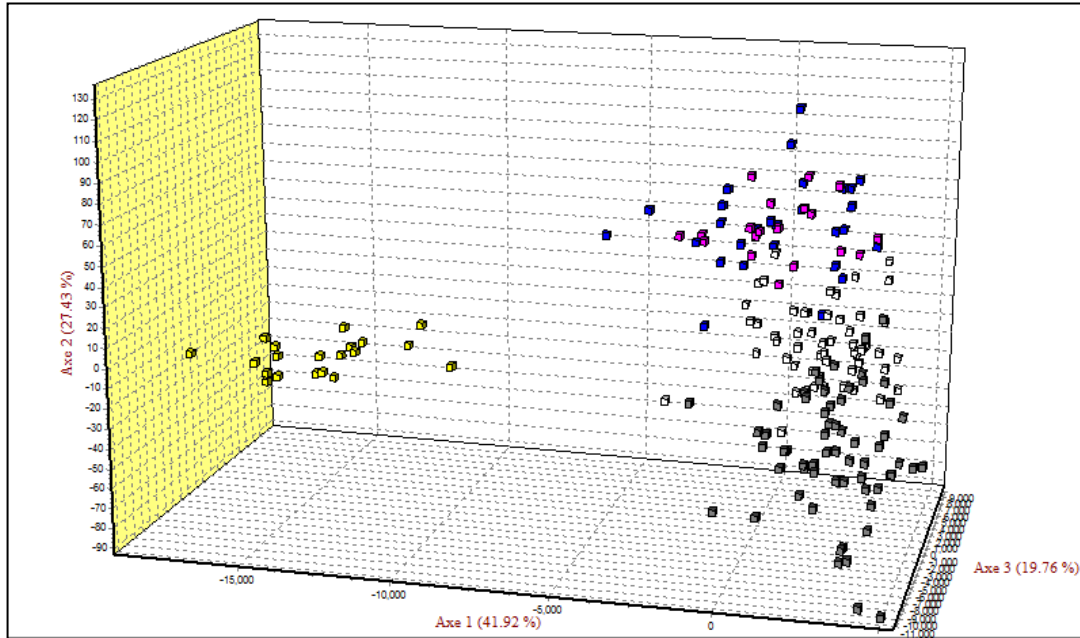
Faktorska analiza uzoraka sa Iberijskog pluostrva jasno je izdvojila Jug Portugalije kao zaseban genetički klaster, dok između ostalih subpopulacija postoji zona kontakta (Sl. 20).



Slika 20. Prikaz trodimenzionalne faktorske analize kod divljih svinja sa Iberijskog poluostrva. Legenda: Beli kvadrati - Portugalija Jug, žuti -Portugalija Centar i Španija Jug, plavi- Iberija Sever, sivi - Španija Centar i Zapad

Figure 20. 3D Factorial Correspondence Analysis performed in wild boars from the Iberian peninsula. South Portugal – white filled squares; Central Portugal & South Spain – yellow filled squares; North Iberia – blue filled squares; Central & Western Spain – grey filled squares

Faktorska analiza divljih svinja iz Italije je pokazala da su jedinke iz parka prirode "Castel Porziano" značajno genetički udaljene od jedinki sakupljenih u severnim delovima poluostrva (Sl. 21). Jedinke sakupljene na lokalitetima Cuneo i Savona se značajno preklapaju i čine jedan klaster, dok između jedinki La Mandria i Lanzo postoji genetička diferencijacija, ali se takođe uočava i velika zona kontakta.

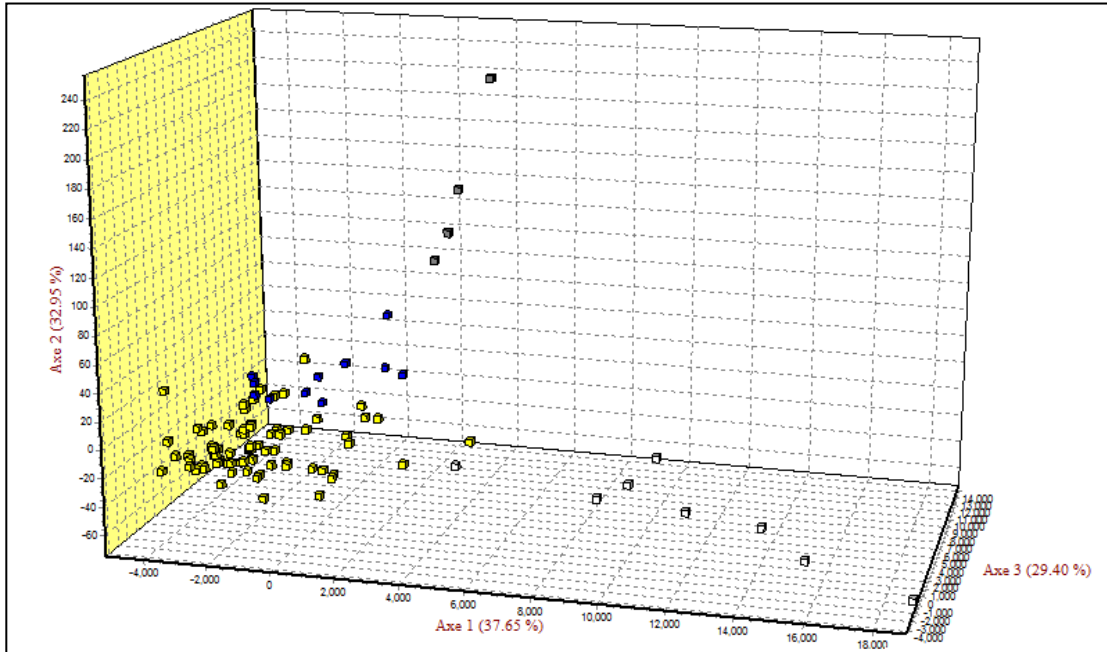


Slika 21. Prikaz trodimenzionalne faktorske analize kod divljih svinja iz Italije. Legenda: Žuti kvadrati - Castel Porziano, beli - Lanzo, sivi - La Madria, plavi- Cuneo, ljubičasti - Savona

Figure 21. 3D Factorial Correspondence Analysis performed in wild boars from the Apennine peninsula. Lanzo – white filled squares; Castel Porziano – yellow filled squares; Cuneo – blue filled squares; La Madria – grey filled squares; Savona – purple filled squares



Faktorska analiza je takođe urađena kod 93 jedinke iz Centralne Evrope (Sl. 22) i pokazala je da se jedinke iz Slovačke i Rumunije razlikuju kako međusobno tako i od jedinki iz Češke i Nemačke koje čine zajednički oblak.



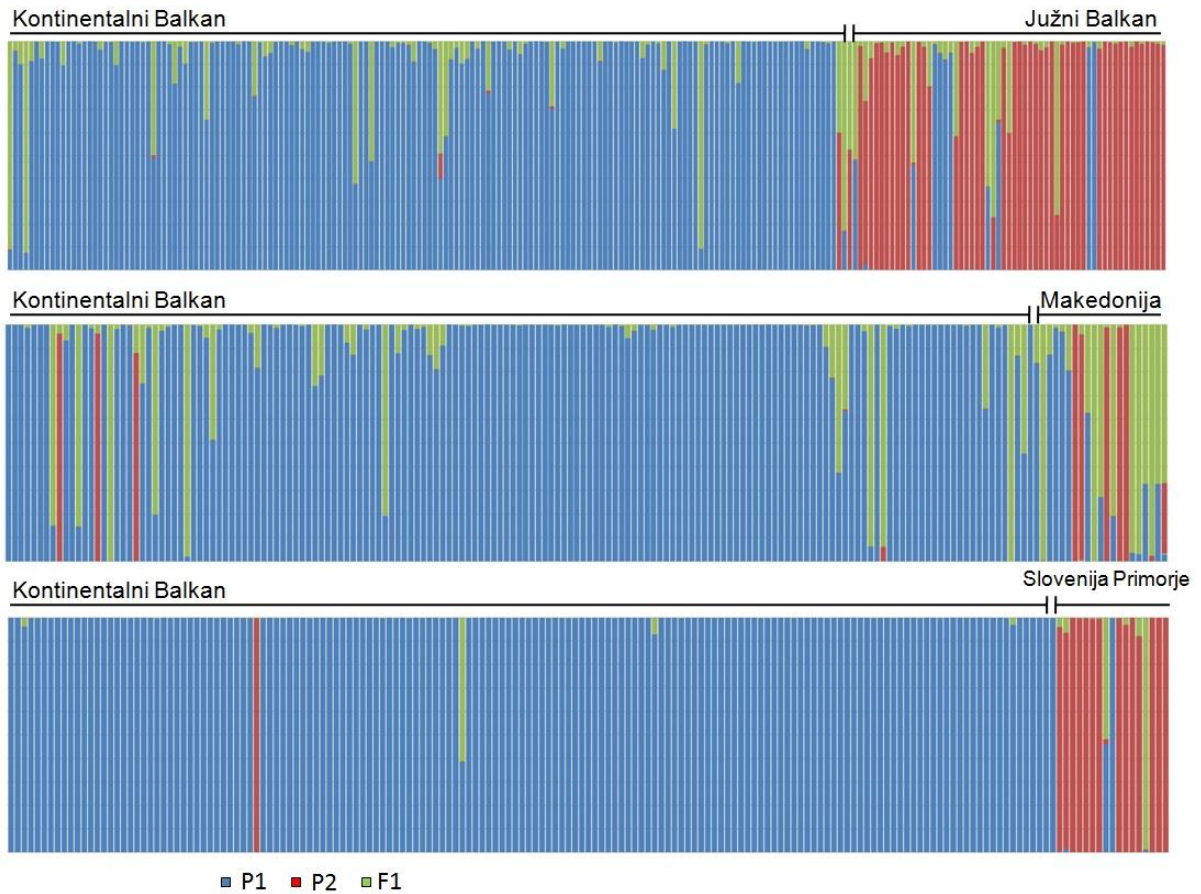
Slika 22. Prikaz trodimenzionalne faktorske analize kod divljih svinja iz Centralne Evrope. Legenda: Žuti kvadrati - Češka, plavi - Nemačka, sivi - Slovačka, beli - Rumunija

Figure 22. 3D Factorial Correspondence Analysis performed in wild boars from Central Europe. Romani – white filled squares; Czech Republic – yellow filled squares; Germany – blue filled squares; Slovakia – grey filled squares

### 6.1.5. Migranti i hibridi u definisanim subpopulacijama divlje svinje

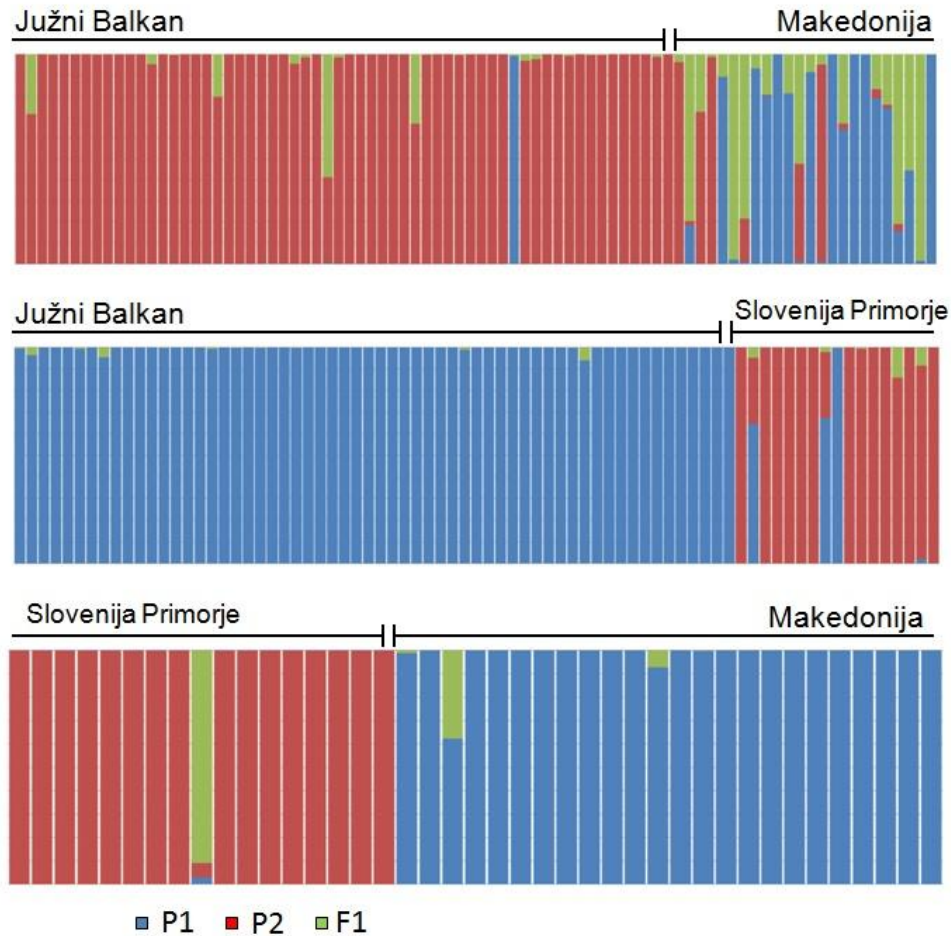
Programski paket NEWHYBRIDS je korišćen za određivanje migranata i hibrida između definisanih grupa. Reprezentativni setovi jedinki su analizirani kako bi se za svaku jedinku utvrdilo poreklo, da li ona pripada roditeljskoj ili hibridnoj klasi. Iako su prethodne analize struktuiranosti populacija neke uzorke iz Centralne Evrope dodelile utvrđenim klasterima na Balkanu ili u Italiji, one su bile isključene iz NEWHYBRIDS analize, jer je analiza podrazumevala samo poređenje parova geografski bliskih jedinki. Kod većine individua, genotipska i geografska pripadnost određenom klasteru su se podudarale. Na osnovu NEWHYBRIDS analize je utvrđeno da su neke jedinke jasno migranti ili F1 hibridi, dok u nekim slučajevima tačno poreklo jedinki nije bilo moguće utvrditi (Sl. 23-27).

S obzirom da su prethodne analize pokazale postojanje četiri subpopulacije na Balkanu, u programu NEWHYBRIDS je urađeno poređenje između svake od njih (Sl. 23 & 24). Subpopulacija "Kontinentalni Balkan" je obuhvatila uzorke iz Srbije, Hrvatske, Slovenije bez primorskog dela i deo uzoraka iz Bosne. U sve tri analize (STRUCTURE, Geneland i TESS) uzorci iz Bosne su delom pripadali istočnom, kontinentalnom klasteru i delom zapadnom, primorskom klasteru. S obzirom da STRUCTURE analiza daje najpreglednije rezultate pripadnosti pojedinačnih jedinki određenom klasteru, uzorci iz Bosne su bili podeljeni u istočni i zapadni klaster na osnovu STRUCTURE-a.



Slika 23. Rezultati NEWHYBRIDS analize u kojoj uzete u obzir samo P1 i P2 roditeljske klase i F1 hibridi za parove subpopulacija na Balkanu. Svaka jedinka je predstavljena vertikalnim stubićem i verovatnoća za pripadnost jedinke jednoj od roditeljskih klasa ili F1 hibridnoj klasi je predstavljena različitom bojom

Figure 23. Results from the simulation considering two parental and one hybrid classes, for pairs of subpopulations on the Balkans, using NEWHYBRIDS. Each individual is represented by a vertical bar. Likelihoods of assignment to parental and F1 classes are plotted in different colours. Horizontal bars represent a priori geographic origin.

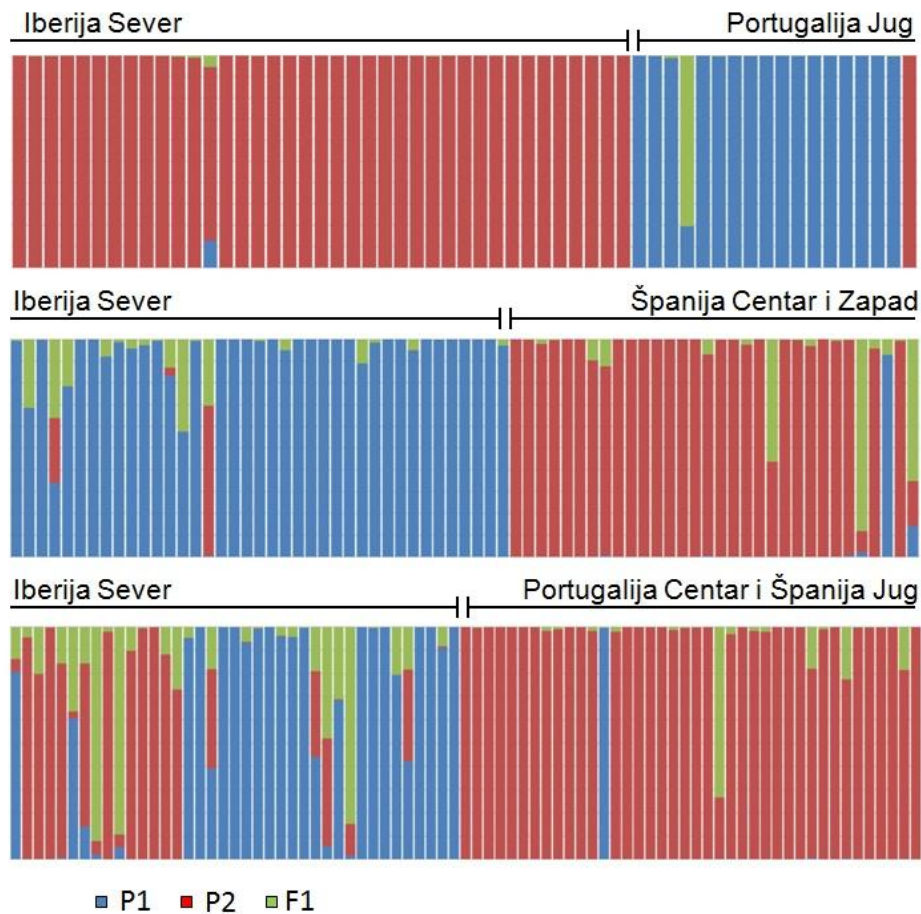


Slika 24. Rezultati NEWHYBRIDS analize u kojoj uzete u obzir samo P1 i P2 roditeljske klase i F1 hibridi za parove subpopulacija na Balkanu. Svaka jedinka je predstavljena vertikalnim stubićem i verovatnoća za pripadnost jedinke jednoj od roditeljskih klasa ili F1 hibridnoj klasi je predstavljena različitim bojom

Figure 24. Results from the simulation considering two parental and one hybrid classes, for pairs of subpopulations on the Balkans, using NEWHYBRIDS. Each individual is represented by a vertical bar. Likelihoods of assignment to parental and F1 classes are plotted in different colours. Horizontal bars represent a priori geographic origin.

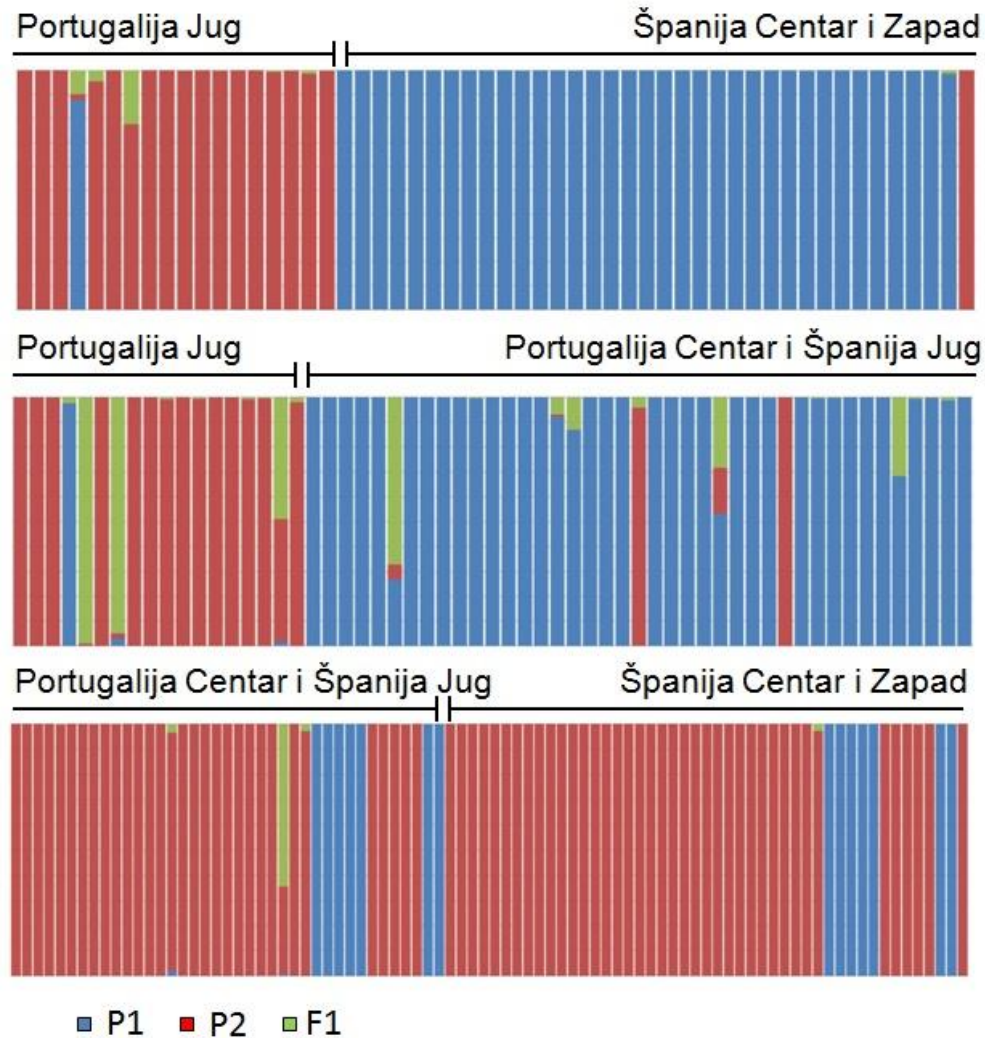
U Iberiji je na osnovu STRUCTURE analize definisano tri genetička klastera: (1) Severna Iberija, (2) Centralna Iberija i (3) Jug Portugalije. Geneland i TESS analize su pokazale postojanje četiri klastera na Iberijskom poluostrvu, odnosno da je klaster Centralna Iberija podeljen na dva: (a) Portugalija Centar i Španija Jug i (b) Španija Centar i Zapad. U prvoj NEWHYBRIDS analizi urađeno je poređenje ove dve grupe i

nije pokazano postojanje dva jasna genetička klastera. Većina jedinki je pripadalo jednoj parentalnoj grupi, a samo nekoliko jedinki je pokazalo pripadnost drugoj roditeljskoj klasi. Kada je urađeno poređenje svih jedinki iz Centralne Iberije sa jedinkama sa severa, a potom i sa jedinkama sa juga Portugalijske nisu dobijeni jasni rezultati. U daljoj analizi su urađena poređenja između svih parova subpopulacija koje su definisane na osnovu TESS i Geneland analize (Sl. 25 & 26).



Slika 25. Rezultati NEWHYBRIDS analize u kojoj uzete u obzir samo P1 i P2 roditeljske klase i F1 hibridi za parove subpopulacija na Iberijskom poluostrvu. Svaka jedinka je predstavljena vertikalnim stubićem i verovatnoća za pripadnost jedinke jednoj od roditeljskih klasa ili F1 hibridnoj klasi je predstavljena različitim bojom

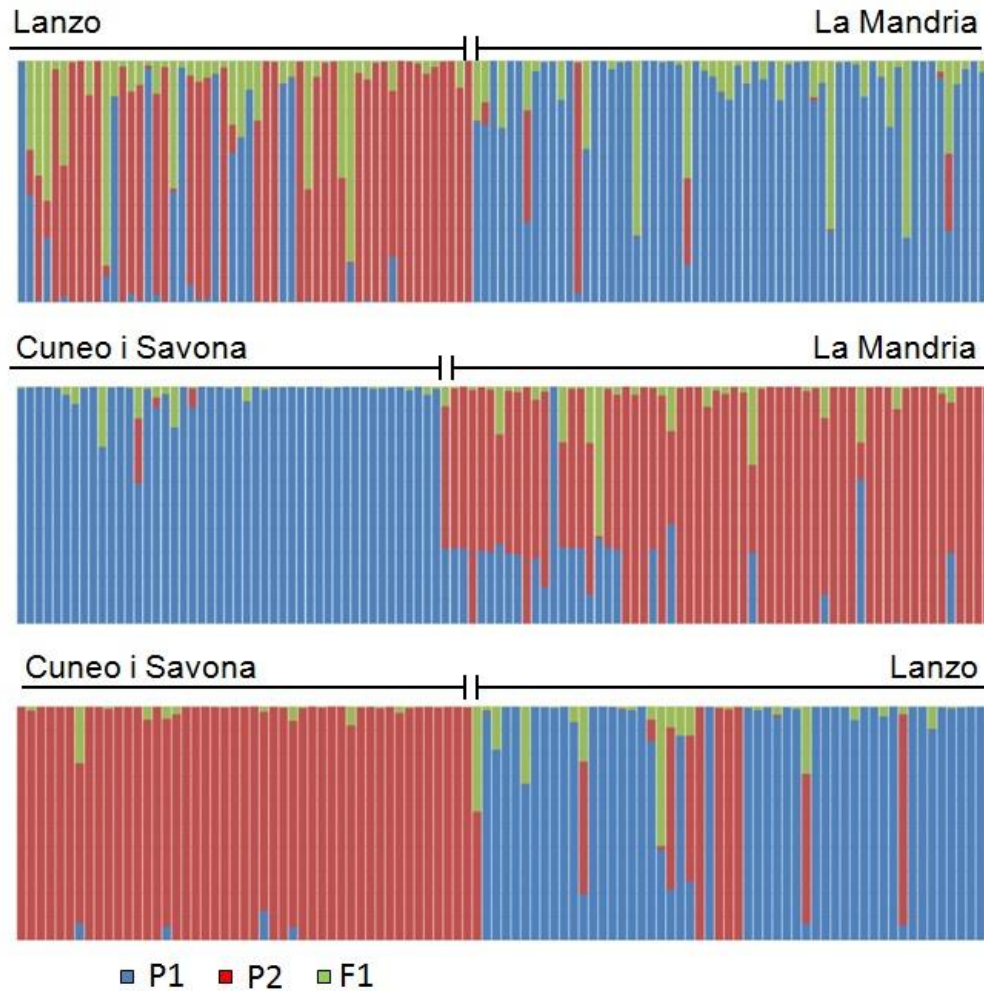
Figure 25. Results from the simulation considering two parental and one hybrid classes, for pairs of subpopulations on the Iberian peninsula, using NEWHYBRIDS. Each individual is represented by a vertical bar. Likelihoods of assignment to parental and F1 classes are plotted in different colours. Horizontal bars represent a priori geographic origin.



Slika 26. Rezultati NEWHYBRIDS analize u kojoj uzete u obzir samo P1 i P2 roditeljske klase i F1 hibridi za parove subpopulacija na Iberijskom poluostrvu. Svaka jedinka je predstavljena vertikalnim stubićem i verovatnoća za pripadnost jedinke jednoj od roditeljskih klasa ili F1 hibridnoj klasi je predstavljena različitom bojom

Figure 26. Results from the simulation considering two parental and one hybrid classes, for pairs of subpopulations on the Iberian peninsula, using NEWHYBRIDS. Each individual is represented by a vertical bar. Likelihoods of assignment to parental and F1 classes are plotted in different colours. Horizontal bars represent a priori geographic origin.

U Italiji je na osnovu STRUCTURE i TESS analize pokazano prisustvo četiri genetička klastera u Italiji, dok je u Geneland analizi pokazano da su La Mandria i Lanzo dve nezavisne subpopulacije. NEWHYBRIDS analiza je potvrdila da jedinke sa lokaliteta Lanzo i La Mandria predstavljaju dve parentalne grupe, gde se u populaciji Lanzo uočava veći broj migranata i F1 hibrida (Sl. 27). Jedinke iz parka prirode „Castel Porziano“ su se jasno razlikovale od ostalih grupa u Italiji i nisu pronađeni migranti ili hibridi sa ovom populacijom. S obzirom da se u prvoj STRUCTURE analizi Castel Porziano našao u klasteru sa uzorcima sa Balkana, NEWHYBRIDS analiza je takođe urađena za parove subpopulacija Castel Porziano i Slovenija Primorje i Castel Porziano i Primorski Balkan. Ni u jednoj od ovih analiza nisu pronađeni migranti ili hibridi između ispitivanih grupa. Na Slici 25. su prikazani rezultati NEWHYBRIDS analize za parove subpopulacija u Severnoj Italiji.



Slika 27. Rezultati NEWHYBRIDS analize u kojoj uzete u obzir samo P1 i P2 roditeljske klase i F1 hibridi za parove subpopulacija u Severnoj Italiji. Svaka jedinka je predstavljena vertikalnim stubićem i verovatnoća za pripadnost jedinke jednoj od roditeljskih klasa ili F1 hibridnoj klasi je predstavljena različitim bojom

Figure 27. Results from the simulation considering two parental and one hybrid classes, for pairs of subpopulations in Italy, using NEWHYBRIDS. Each individual is represented by a vertical bar. Likelihoods of assignment to parental and F1 classes are plotted in different colours. Horizontal bars represent a priori geographic origin.



### 6.1.6. Genetički diferencirane subpopulacije divlje svinje u Evropi

Na osnovu prethodnih analiza genetičke strukture u analiziranom uzorku od 664 jedinke divlje svinje iz Evrope, može se definisati ukupno 13 različitih subpopulacija:

1. Kontinentalni Balkan [Srbija, Hrvatska, Bosna (8 jedinki), Slovenija (kontinentalni deo)], Češka (6), Nemačka (1) i Rumunija (4)
2. Primorski Balkan [Crna Gora, Hercegovina, Bosna (7 jedinki) ], Češka (3) i Rumunija (2)
3. Makedonija
4. Slovenija Primorje
5. Cuneo i Savona (Italija)
6. Lanzo (Italija), Češka (4) i Nemačka (1)
7. La Mandria (Italija)
8. Castel Porziano (Italija)
9. Portugalija Jug
10. Portugalija Centar i Španija Jug
11. Španija Centar i Zapad
12. Iberija Sever
13. Centralna Evropa (73 jedinki).

### 6.1.7. Bottleneck analiza u subpopulacijama divlje svinje

Svaka od 13 definisanih subpopulacija divlje svinje u Evropi je testirana da li je nedavno prošla kroz usko grlo (engl. *bottleneck*) . U Tabeli 1., 2. i 3. su prikazane vrednosti  $DH/sd$  za svaki lokus i za sve testirane subpopulacije, kao i  $p$  vrednost za *Sign* i *Wilcoxon* testove za sva tri modela mutacije. *Sign* test ni za jedan od tri ispitivana modela mutacije nije pokazao statistički značajno povećanje heterozigotnosti, što bi se očekivalo kod populacija koje su prošle kroz usko grlo (Cornuet i Luikart, 1996). Ovaj test je pokazao statistički značajan deficit heterozigota za 6 od 13 ispitivanih subpopulacija i to za SMM model mutacije (Tab. 3). *Wilcoxon* test je pokazao statistički značajno

povećanje heterozigotnosti kod 6 od 13 subpopulacija za IAM model mutacije (Tab 1.). Za TPM model mutacije ovaj test nije pokazao statistički značajno povećanje heterozigotnosti (Tab. 2). Oba testa (*Wilcoxon* i *Sign*) su pokazala statistički značajno smanjenje heterozigotnosti za 6 od 13 subpopulacija divljih svinja.

Tabela 1. Rezultati *bottleneck* analize za IAM mutacioni model za 13 subpopulacija divlje svinje i jedanaest mikrosatelitskih lokusa, kao i sumarni rezultati

*Sign* i *Wilcoxon* testa

Lokus	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa
SBH2	-0,586	-0,011	0,898	1,472	0,134	1,250	0,525	-0,900	0,901	-0,220	1,084	-1,390	0,249
SBH18	1,213	1,561	0,846	0,475	1,380	1,121	1,275	1,196	0,297	0,205	0,823	0,700	0,889
SBH4	0,888	0,728	1,338	-0,017	1,095	1,310	0,972	0,363	0,527	1,168	0,708	1,018	1,117
S0655	0,211	0,084	0,721	0,009	0,748	0,799	0,364	1,187	0,575	0,330	0,713	1,199	0,159
SBH20	1,332	0,346	0,948	0,673	0,668	1,061	0,693	-0,291	0,704	1,424	1,314	1,168	0,254
SBH1	1,228	1,413	0,769	0,450	0,673	1,164	0,758	0,697	0,527	0,774	1,413	1,370	0,476
SBH10	0,704	0,718	1,119	-0,157	0,461	0,934	0,833	-0,637	-1,596	0,918	1,212	1,129	0,997
SBH13	0,476	1,392	1,313	-0,281	0,242	0,690	1,108	1,185	1,280	0,343	1,001	1,155	1,200
387A12F	1,002	1,345	1,181	-1,024	1,022	0,587	0,450	0,009	-0,393	0,533	1,068	1,400	0,586
SBH22	-0,061	-0,446	-0,345	-0,156	-4,264	-2,507	-0,518	-1,083	-0,909	-2,300	0,506	1,144	-0,561
SBH19	1,167	0,888	0,985	1,467	0,708	0,418	0,768	-1,110	0,055	1,152	0,364	0,218	0,148
<b>Sign test p</b>	0,12222	0,11848	0,03076	0,56227	0,03020	0,02984	0,03077	0,61120	0,25464	0,11769	0,00373	0,02862	0,02919
<b>Wilcoxon test p</b>	<b>0,00244</b>	<b>0,00244</b>	<b>0,00049</b>	0,20654	0,02686	0,02686	<b>0,00122</b>	0,31885	0,20654	0,04150	<b>0,00024</b>	0,01050	<b>0,00342</b>

Boldovane vrednosti označavaju statistički značajno povećanje heterozigotnosti za  $p < 0,05$  (odnosno  $p < 0,005$  nakon Boniferonijeve korekcije)

Tabela 2. Rezultati *bottleneck* analize za TPM mutacioni model za 13 subpopulacija divlje svinje i jedanaest mikrosatelitskih lokusa, kao i sumarni rezultati

*Sign* i *Wilcoxon* testa

Lokus	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa
SBH2	-2,953	-1,050	0,537	1,282	-1,000	0,933	-0,349	-1,321	0,651	-1,369	0,794	-2,68	-0,691
SBH18	0,815	1,457	0,448	0,071	1,208	0,779	1,01	0,978	-0,165	-0,67	0,384	0,175	0,364
SBH4	0,031	-0,003	1,196	-0,540	0,775	1,068	0,429	-0,073	0,055	0,871	0,195	0,643	0,67
S0655	-1,228	-0,970	0,320	-0,418	0,150	0,289	-0,721	0,956	0,317	-0,366	0,255	0,908	-0,843
SBH20	0,747	-0,800	0,581	0,286	-0,176	0,552	-0,162	-1,161	0,25	1,221	1,134	0,842	-1,283
SBH1	0,831	1,232	0,347	0,019	0,122	0,836	0,162	0,359	0,092	0,227	1,267	1,186	-0,401
SBH10	-0,661	0,103	0,860	-0,893	-0,486	0,358	0,153	-1,051	-2,748	0,438	0,965	0,828	0,432
SBH13	-0,385	1,136	1,102	-0,658	-0,618	-0,023	0,733	0,961	1,071	-0,441	0,683	0,876	0,901
387A12F	0,271	1,145	0,946	-2,058	0,602	-0,295	-0,538	-0,644	-1,369	-0,196	0,693	1,229	-0,375
SBH22	-1,478	-1,741	-1,159	-0,307	-8,472	-4,692	-2,321	-1,245	-1,298	-4,808	-0,088	0,859	-1,948
SBH19	0,775	0,428	0,684	1,274	0,325	-0,146	0,237	-1,248	-0,472	0,851	-0,266	-0,363	-0,369
<b>Sign test p</b>	0,49412	0,48475	0,02896	0,29409	0,47651	0,51462	0,48483	0,14701	0,49660	0,25556	0,11277	0,11308	0,10658
<b>Wilcoxon test p</b>	0,64990	0,31885	0,01050	0,76758	0,58447	0,10303	0,55078	0,92627	0,71143	0,61768	0,00024	0,04150	0,86084

Tabela 3. Rezultati *bottleneck* analize za SMM mutacioni model za 13 subpopulacija divlje svinje i jedanaest mikrosatelitskih lokusa, kao i sumarni rezultati

*Sign* i *Wilcoxon* testa

Lokus	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa
<b>SBH2</b>	-8,155	-3,126	-0,128	1,147	-3,257	0,403	-2,233	-1,321	0,255	-3,546	0,261	-5,111	-2,891
<b>SBH18</b>	-0,400	1,111	-0,318	-0,552	0,739	-0,005	0,384	0,978	-0,899	-2,418	-0,542	-0,903	-0,849
<b>SBH4</b>	-2,079	-1,709	0,852	-1,392	-0,047	0,305	-0,849	-0,073	-0,751	0,174	-0,917	-0,132	-0,361
<b>S0655</b>	-4,715	-3,168	-0,394	-1,067	-1,192	-0,918	-2,928	0,956	-0,063	-1,773	-0,61	0,431	-3,074
<b>SBH20</b>	-0,430	-3,091	-0,057	-0,288	-1,783	-0,56	-1,944	-1,161	-0,469	0,512	0,646	0,043	-2,823
<b>SBH1</b>	-0,421	0,620	-0,430	-0,711	-0,97	0,036	-1,157	0,359	-0,644	-0,931	0,971	0,787	-2,334
<b>SBH10</b>	-2,306	-1,399	0,325	-2,030	-2,362	-1,012	-1,42	-1,051	-4,582	-0,602	0,385	0,097	-1,031
<b>SBH13</b>	-2,476	0,629	0,789	-1,145	-2,374	-1,62	-0,011	0,961	0,816	-2,072	0,04	0,231	0,117
<b>387A12F</b>	-1,634	0,437	0,522	-3,748	-0,349	-2,131	-2,505	-0,644	-2,807	-1,64	-0,059	0,889	-2,259
<b>SBH22</b>	-5,025	-4,368	-2,409	-0,414	-16,127	-9,023	-5,88	-1,245	-1,965	-9,517	-1,292	0,196	-4,827
<b>SBH19</b>	-0,216	-0,464	0,146	1,112	-0,288	-1,178	-0,918	-1,248	-1,319	0,445	-1,449	-1,339	-1,381
<b>Sign test p</b>	<b>0,00006<sup>1</sup></b>	0,11525	0,26514	<b>0,00762<sup>1</sup></b>	<b>0,00103<sup>1</sup></b>	0,03613	<b>0,00104<sup>1</sup></b>	0,04031	<b>0,00660<sup>1</sup></b>	0,03631	0,26851	0,50748	<b>0,00095<sup>1</sup></b>
<b>Wilcoxon test p</b>	1,00000	0,96631	0,44922	0,95850	0,99878	0,99390	0,99951	0,99951	0,99536	0,99756	0,79346	0,51709	0,99976

<sup>1</sup>signifikantan deficit heterozigota za  $p < 0,05$  (odnosno  $p < 0,005$  nakon Boniferonijeve korekcije)

### 6.1.8. Polimorfnost mikrosatelita i genetička diferencijacija subpopulacija divlje svinje u Evropi

Analizom 11 tetranukleotidnih mikrosatelita u uzorku od 664 divlje svinje na području Evrope pronađeno je ukupno 207 različitih alela. Prosečan broj alela po lokusu,  $N_A$ , iznosio je 18,8. Najveći broj alela pronađen je u lokusu SBH20 (29), dok je najmanji broj alela nađen u lokusu SBH19 (9). Subpopulacija u kojoj je otkriveno najviše alela bila je Kontinentalni Balkan, dok je najmanji broj alela pronađen u subpopulaciji Castel Porziano (Tab. 4). Frekvencije alela po lokusima i po subpopulacijama prikazane su u Tabeli 5.

Uočena heterozigotnost u ispitivanom uzorku divljih svinja Evrope kretala se od 0,31 za lokus SBH2 do 0,83 za lokus SBH20, dok je očekivana heterozigotnost bila od 0,60 za lokus SBH22 do 0,89 za lokuse SBH4, SBH10 i 387A12F (Tab. 6). Vrednosti uočene heterozigotnosti po lokusu za svaku subpopulaciju kretale su se od 0,05 u subpopulaciji divljih svinja iz parka prirode "Castel Porziano" (Italija) za lokuse SBH19 i SBH22, do 0,94 u subpopulaciji Primorski Balkan za lokus SBH18 (Tab. 6). Na osnovu distribucije genotipova u svakoj analiziranoj subpopulaciji urađen je test za utvrđivanje odstupanja od Hardy-Weinberg-ovog ekvilibrijuma (HWE) i u svim subpopulacijama osim subpopulacije Castel Porziano su nađeni lokusi koji su pokazali statistički značajno odstupanje od HWE (Tab. 6). Iako analizirani lokusi nisu vezani, statistički značajna vezanost na nivou značajnosti  $p < 0,05$  (odnosno  $p < 0,005$  nakon Boniferonijeve korekcije) je nađena u svim subpopulacijama za jedan (subpopulacije Slovenija Primorje i Iberija Sever) do 13 parova lokusa (subpopulacija La Mandria) od 55 mogućih kombinacija (Tab. 6). Statistički značajna vezanost između lokusa za koje se zna da nisu vezani može ukazivati na postojanje struktuiranosti populacija (Nei i Li, 1972), tako da je ovaj test kod svih 664 analiziranih uzoraka pokazao statistički značajnu vezanost za 54 od 55 mogućih kombinacija.

Analizom molekularne varijanse je utvrđena veća interpopulaciona (92,51%) nego intrapopulaciona varijabilnost (7,49%) (Tab. 7). Sve izračunate vrednosti genetičke diferencijacije između parova subpopulacija na osnovu  $F_{ST}$  parametra su bile visoko

signifikantne i većina vrednosti je pokazala srednju (49 od 78 kombinacija) i visoku genetičku divergenciju (17 od 78 kombinacija) prema Wright-u (1978) (Tab. 8). Od ukupno 78 mogućih kombinacija, 12 parova subpopulacija je pokazalo nisku genetičku diferencijaciju. Prosečna vrednost koeficijenta inbreedinga  $F_{IS}$  po lokusu se kretala od 0,0126 do 0,4345 (Tab. 9), dok su prosečne vrednosti  $F_{IS}$  po populacijama iznosile 0,0421-0,2072.

Tabela 4. Broj alela po lokusima i po subpopulacijama divlje svinje Evrope

Lokus	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa	Ukupno
SBH2	13	8	8	4	12	6	11	3	4	9	6	6	9	22
SBH18	10	10	9	5	9	8	8	4	5	9	9	8	9	13
SBH4	16	13	10	5	10	13	13	5	7	10	10	8	15	22
S0655	13	9	6	4	10	8	14	3	3	7	7	6	9	17
SBH20	25	13	14	6	16	15	15	8	10	18	14	15	20	29
SBH1	11	12	8	6	7	9	9	4	6	9	7	7	10	15
SBH10	21	10	11	8	14	13	13	3	6	12	12	10	15	27
SBH13	8	7	5	3	9	11	7	4	5	9	7	9	8	12
387A12F	14	11	9	7	10	13	14	6	10	10	13	7	15	23
SBH22	10	8	6	2	10	7	13	2	3	10	8	8	8	18
SBH19	7	6	6	3	4	5	7	2	5	4	7	5	4	9
<b>Prosek</b>	<b>13,455</b>	<b>9,727</b>	<b>8,364</b>	<b>4,818</b>	<b>10,091</b>	<b>9,818</b>	<b>11,273</b>	<b>4</b>	<b>5,818</b>	<b>9,727</b>	<b>9,091</b>	<b>8,091</b>	<b>11,091</b>	<b>18,818</b>

Tabela 5. Frekvencija alela za 11 analiziranih lokusa po subpopulacijama i za ukupan uzorak od 664 divlje svinje u Evropi

Lokus	Alel	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa	Ukupno
SBH2	84	0,5444	0,3333	0,5154	0,2059	0,8684	0,0957	0,3644	0,3607	0,3947	0,7692	0,5244	0,3750	0,4931	0,4639
	88	0,0059	0,2083	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0090
	96	0	0	0	0	0	0,0213	0	0	0	0	0	0	0	0,0015
	108	0	0	0	0	0	0,0638	0	0,0164	0	0	0	0	0	0,0060
	112	0	0	0	0	0	0,0426	0	0,0328	0	0	0	0	0	0,0060
	116	0	0	0	0	0	0,0106	0	0	0	0	0	0	0	0,0008
	120	0	0	0	0	0	0,0319	0	0,041	0	0	0	0	0	0,0060
	136	0,0178	0	0	0	0,0263	0	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0060
	140	0,0118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0610	0	0,0069	0,0075
	144	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0526	0	0	0	0	0,0015
	147	0,0207	0	0,0154	0	0	0,0319	0	0	0	0	0,0244	0	0	0,0105
	151	0,0592	0,1250	0,2846	0,3235	0	0,0745	0,0339	0,0246	0	0	0,0122	0,0312	0,0417	0,0730
	155	0,0976	0,0625	0,1	0	0	0,4043	0,2797	0,1803	0,1053	0,0513	0,0854	0,2500	0,1042	0,1416
	159	0,1538	0,0833	0,0231	0,3529	0,1053	0,1596	0,0763	0,1393	0,4474	0,1026	0,1220	0,1875	0,1736	0,1416
	163	0,0562	0,1458	0,0231	0,1176	0	0,0213	0,0593	0,0246	0	0,0128	0,0854	0,1250	0,1042	0,0572
	167	0,0207	0	0,0077	0	0	0,0426	0,1864	0,1639	0	0	0,0244	0	0,0347	0,0459
	171	0,0030	0,0208	0,0308	0	0	0	0	0	0	0,0256	0,0610	0	0,0347	0,0136
	175	0	0,0208	0	0	0	0	0	0	0	0,0385	0	0,0312	0	0,0045
	179	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0069	0,0008
	187	0,0059	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0015
	191	0	0	0	0	0	0	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0008
	195	0,0030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0008
SBH18	215	0,0118	0,0208	0,0462	0,0882	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0278	0,0136
	219	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0263	0	0,0366	0	0	0,003

Lokus	Alel	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa	Ukupno
	227	0,1450	0,2292	0,1538	0	0	0,0426	0,2627	0,3279	0,5526	0,0641	0,0854	0,0312	0,3333	0,1792
	231	0,0562	0,1250	0,2000	0	0,0526	0,0957	0,0508	0,1230	0,0526	0,0385	0,0732	0,1094	0,1806	0,0956
	235	0,1243	0,1875	0,0846	0,0294	0,1842	0,2447	0,2034	0,1803	0	0,1795	0,0244	0,0156	0,0486	0,1227
	239	0,0296	0,0417	0,1308	0,4412	0	0,2128	0,0763	0,1557	0,2368	0,0128	0,1341	0,1875	0,0139	0,0956
	243	0,1361	0,0208	0,0846	0,0588	0,3684	0,0957	0,0932	0,0656	0,1316	0,4231	0,4756	0,3125	0,0833	0,1589
	247	0,3432	0,2708	0,1538	0,3824	0,3947	0,0213	0,2881	0,0820	0	0,0769	0,0610	0,2031	0,2569	0,2139
	251	0,0917	0,0625	0,0615	0	0	0,0745	0,0085	0,0574	0	0,1154	0,0732	0,0156	0,0417	0,0595
	255	0,0355	0,0417	0,0769	0	0	0,1383	0,0169	0	0	0,0897	0,0366	0,0938	0	0,0414
	259	0,0266	0	0	0	0	0,0745	0	0	0	0	0	0,0312	0,0139	0,0151
	263	0	0	0	0	0	0	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0008
<b>SBH4</b>	316	0	0	0	0	0	0	0,0085	0	0	0	0	0	0	0,0008
	320	0,0030	0,1667	0,0231	0	0	0	0	0	0	0,0128	0,0366	0,0156	0,0139	0,0143
	328	0	0	0	0	0	0	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0008
	340	0,0266	0	0,0154	0	0	0,0106	0,0254	0,0164	0	0	0	0	0,0278	0,0158
	344	0,0414	0,0625	0,0462	0,0588	0	0	0,0508	0	0	0	0,0488	0,0469	0,0486	0,0339
	346	0,0030	0	0	0	0	0	0	0	0,0789	0	0	0	0,0278	0,0060
	348	0,0444	0,0417	0,1154	0,5882	0,5263	0,1064	0,0678	0,0164	0,1053	0,1538	0,2439	0,2031	0,0278	0,1092
	349	0	0	0	0	0	0	0,0339	0	0	0	0	0	0	0,0030
	352	0,2041	0,0833	0,2385	0,2353	0,0263	0,1383	0,0847	0,082	0,0263	0,2436	0,1951	0,0938	0,1806	0,1611
	356	0,0976	0,0833	0,0769	0	0,2895	0,0213	0	0,0328	0,0526	0,0897	0,1341	0,3281	0,0694	0,0866
	360	0,0799	0,125	0,0077	0	0,1053	0,2766	0,1102	0,041	0	0,0256	0	0,0625	0,1528	0,0828
	364	0,2574	0,2292	0,1231	0,0294	0	0,0745	0,161	0,1475	0,3421	0,1538	0,1463	0,125	0,1597	0,1709
	366	0,0089	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0023
	368	0,1331	0,0417	0,2615	0,0882	0	0,0426	0,1441	0,1557	0	0,3077	0,1220	0,0156	0,1458	0,1355
	372	0,0385	0,1042	0	0	0	0	0	0,0328	0,3421	0	0,0244	0	0,0208	0,0301
	376	0,0414	0	0,0077	0	0,0526	0,1596	0,1441	0,2623	0	0,0128	0,0244	0	0,0208	0,0655
	380	0,0148	0	0	0	0	0	0,0085	0,0164	0,0526	0	0,0244	0,0469	0	0,0113
	384	0	0	0,0077	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0625	0	0,0038
	386	0,0030	0	0	0	0	0,0106	0,0085	0,1230	0	0	0	0	0	0,0136
	388	0	0,0625	0,0538	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0833	0,0166
	392	0,003	0	0,0231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0069	0,0038
<b>S0655</b>	417	0,2485	0,3958	0,2769	0,2647	0,2368	0,2234	0,3729	0,3443	0,6842	0,3846	0,2073	0,0781	0,4085	0,3017
	421	0,1006	0	0,0385	0,0588	0	0,0106	0	0,0082	0	0	0,0122	0,0156	0,0563	0,0400
	425	0,0178	0	0	0,0294	0,1842	0,0426	0,0508	0,0328	0,1053	0,0897	0,0366	0,0469	0	0,0339
	434	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0141	0,0015
	437	0,0266	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0488	0	0	0,0098
	441	0,0325	0,0417	0	0	0	0	0	0,1066	0	0	0	0	0	0,0196
	445	0,4142	0,3333	0,4692	0,6471	0	0,3191	0,2966	0,1311	0,2105	0,1667	0,5122	0,3125	0,3592	0,3424
	449	0,0325	0,125	0,0769	0	0	0,1170	0,0254	0,0656	0	0,0256	0,0732	0,1250	0,0282	0,0520
	453	0,0296	0	0	0	0	0,0106	0,0424	0,0902	0	0	0	0,0469	0,0141	0,0241
	457	0	0	0,0077	0	0	0,1383	0,1186	0,1148	0	0	0	0	0	0,0317
	461	0,0740	0	0,0538	0	0,5789	0,1170	0,0593	0,0574	0	0,1026	0	0	0,0352	0,0694
	465	0,0089	0,0417	0,0077	0	0	0	0,0339	0,0082	0	0,2308	0,1098	0,3750	0,0775	0,0551



Lokus	Alel	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa	Ukupno
	473	0	0	0	0	0	0	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0008
	478	0,0089	0	0,0538	0	0	0	0	0,0164	0	0	0	0	0	0,0090
	482	0	0	0	0	0	0,0106	0	0	0	0	0	0	0	0,0008
	486	0,0030	0	0	0	0	0,0106	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0023
<b>SBH20</b>	128	0,0385	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0098
	136	0,0355	0,0208	0,0077	0	0	0,0319	0,1271	0,0246	0,0789	0,0513	0,0976	0,1094	0,2847	0,0738
	140	0,0917	0,2083	0,1077	0	0	0	0	0,0082	0	0	0,1585	0,0938	0,0278	0,0595
	144	0,0148	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0128	0	0	0,0972	0,0151
	147	0,0296	0	0	0,0294	0	0	0,1356	0,2377	0,1579	0,1282	0,0610	0	0,1528	0,0745
	151	0,0473	0	0,0385	0	0	0	0	0	0	0	0,0122	0,0938	0,0069	0,0218
	155	0,1036	0,0208	0,2385	0	0,0263	0	0	0	0	0	0	0	0,0139	0,0527
	156	0,0030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0008
	158	0,0030	0,0417	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0023
	159	0,0030	0,0417	0	0	0	0	0	0,0082	0	0	0	0	0,0347	0,0068
	162	0,0148	0,1042	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0075
	163	0,0089	0,0625	0,0077	0	0	0,0106	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0068
	167	0,0030	0	0	0	0	0	0,0169	0	0	0,1026	0,0244	0,0156	0,0069	0,0113
	171	0,0947	0	0	0,2647	0	0,0106	0,0678	0,0246	0	0,1538	0,0732	0,0781	0,0139	0,0587
	175	0,0266	0	0	0	0,1316	0,0638	0,0593	0,2049	0,0526	0,0769	0,0366	0,1875	0,0278	0,0595
	179	0,0473	0,0417	0,1385	0,3824	0,4737	0,2234	0,1864	0,123	0,0263	0	0,0244	0,0781	0,0347	0,1039
	183	0,0325	0,0208	0,0308	0,0294	0,0263	0,0106	0,0085	0,0082	0	0	0,0366	0,0469	0,0278	0,0233
	187	0,1509	0	0,3231	0,2353	0,0263	0,1915	0,1610	0,0984	0	0	0	0	0,0694	0,1212
	191	0,0592	0,1042	0,0308	0,0588	0	0,0745	0	0	0	0	0	0	0,0208	0,0309
	195	0,0888	0,0833	0	0	0,1842	0,0106	0,0169	0	0	0,0641	0,0854	0,0156	0,0208	0,0452
	199	0,0089	0,0625	0,0154	0	0,1053	0,0638	0,0085	0,1066	0,0263	0,0385	0,0122	0,0469	0,0278	0,0331
	203	0,0473	0	0	0	0,0263	0,0532	0,0085	0,0164	0,0526	0,141	0,0610	0,1094	0,0625	0,0444
	207	0,0178	0,1458	0,0385	0	0	0,0745	0,0169	0	0,2895	0,0128	0,0610	0,0469	0,0278	0,0384
	211	0,0148	0,0417	0,0077	0	0	0,1277	0,1017	0,0738	0,0789	0	0,0488	0	0,0139	0,0377
	215	0,0148	0	0,0154	0	0	0,0213	0,0085	0,0082	0,1842	0,0513	0,0366	0,0156	0,0278	0,0226
	219	0	0	0	0	0	0,0106	0,0763	0,0492	0	0,0128	0,0976	0	0	0,0188
	223	0	0	0	0	0	0,0213	0	0	0,0526	0,1282	0,0488	0	0	0,0136
	227	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0128	0	0,0625	0	0,0038
	231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0128	0,0244	0	0	0,0023
<b>SBH1</b>	286	0,0030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0069	0,0015
	290	0,1509	0,0625	0,0692	0,0882	0,2105	0	0,0508	0	0	0,0385	0,0122	0,0156	0,0208	0,0663
	294	0,0059	0	0,0692	0	0	0	0	0,0082	0	0	0,0244	0	0	0,0105
	298	0	0	0	0	0,0789	0,0106	0,1017	0,0328	0,0263	0,0128	0,0366	0,0469	0,0278	0,0241
	302	0,1775	0,0208	0,0538	0,0588	0	0,2660	0,2203	0,1393	0,1316	0	0,0854	0,1562	0,1944	0,1416
	306	0,1302	0,0625	0,1615	0,0588	0	0,0957	0,2881	0,377	0,4474	0,2692	0,3537	0,1719	0,4236	0,2244
	311	0,2840	0,3750	0,1538	0,4706	0,1316	0,4362	0,1610	0,1885	0,1053	0,2051	0,1585	0,2344	0,1042	0,2267
	315	0,1095	0,1875	0,1462	0,2353	0,5789	0,0106	0,0424	0,1721	0,0263	0,1154	0,0366	0,1562	0,1111	0,1212
	319	0,0473	0,1250	0,1769	0	0	0,1277	0,1102	0,0574	0,2632	0,2051	0,2195	0,2188	0,0625	0,1084
	324	0,0651	0,1042	0,0615	0,0882	0	0,0532	0,0169	0,0082	0	0,1538	0,0732	0	0,0139	0,0497

Lokus	Alel	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa	Ukupno
	332	0	0	0,0077	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0008
	336	0	0	0,0231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0023
	340	0,0030	0	0,0462	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0053
	344	0	0	0,0308	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0030
<b>SBH10</b>	360	0,0178	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0045
	364	0,0178	0	0	0	0	0,1277	0,0593	0,0328	0	0	0	0	0,0143	0,0235
	368	0	0	0	0,0294	0	0	0,0169	0	0	0,0256	0	0	0,0071	0,0045
	372	0,0118	0,0417	0	0	0	0,0319	0,1441	0,0328	0	0,0769	0,0128	0,0469	0,0214	0,0326
	376	0,1834	0,1458	0,1923	0,0294	0	0,0532	0,0339	0,1721	0	0,0128	0,0385	0,0312	0,1214	0,1121
	378	0,0030	0	0,0154	0,0294	0	0	0	0	0	0	0,0256	0	0	0,0045
	380	0,2130	0,1250	0,2000	0,3529	0,8421	0,2021	0,161	0,1475	0,1316	0,1026	0,2692	0,0625	0,1857	0,2030
	382	0,0089	0	0,0385	0,3529	0,0526	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0167
	384	0,1006	0,1875	0,1538	0	0	0,0426	0,0424	0	0,0263	0,2692	0,1154	0,1875	0,1143	0,0992
	386	0	0	0	0,0294	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0008
	388	0,0976	0,1250	0,3308	0,0882	0	0,0957	0,0339	0,0082	0,7105	0,0769	0,1795	0,0938	0,1929	0,1356
	392	0,1272	0,1875	0,0462	0,0882	0,1053	0,2872	0,2034	0,2705	0,0263	0,2051	0,1026	0,0938	0,1214	0,1492
	396	0,0148	0,0417	0	0	0	0,0213	0,0085	0,0328	0	0,1154	0,1026	0,0781	0,0357	0,0311
	400	0,0888	0,0625	0	0	0	0	0,0593	0,0328	0,0789	0	0,0513	0,0781	0,0214	0,0447
	404	0	0,0417	0,0077	0	0	0,0213	0	0,0082	0	0	0	0,0938	0	0,0091
	408	0,0059	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0015
	412	0	0,0208	0	0	0	0	0	0,0164	0	0	0	0	0,0071	0,0030
	416	0,0118	0	0	0	0	0,0106	0,0085	0	0	0	0	0	0,0357	0,0083
	420	0,0030	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0385	0	0	0	0,0030
	424	0,0089	0	0	0	0	0,0532	0,2203	0,1230	0	0,0769	0,0385	0,0156	0,1000	0,0553
	428	0,0059	0	0	0	0	0,0106	0	0	0	0	0	0	0,0071	0,0030
	432	0,0059	0,0208	0,0077	0	0	0,0106	0,0085	0	0,0263	0	0,0385	0,2031	0,0143	0,0189
	436	0,0533	0	0,0077	0	0	0	0	0,1148	0	0	0	0,0156	0	0,0258
	440	0	0	0	0	0	0,0319	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0030
	448	0,0148	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0038
	452	0,0059	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0015
	468	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0256	0	0	0,0015
<b>SBH13</b>	99	0	0	0	0	0	0,0213	0,2712	0,0328	0	0	0	0	0	0,0286
	103	0,0769	0,2500	0,0538	0	0,4737	0,2766	0,0169	0,3279	0,0789	0,1923	0,0732	0,0781	0,0278	0,1235
	107	0	0	0	0	0	0,0106	0,0254	0,0328	0	0,0128	0	0,0469	0	0,0090
	111	0,0237	0	0,1923	0	0	0,0106	0,0424	0	0,1053	0	0	0	0,0694	0,0399
	116	0,0414	0,2500	0,2462	0	0	0,0319	0,2203	0,1803	0	0,0128	0,0854	0,0938	0,1597	0,1099
	120	0,5355	0,3542	0,2615	0,1471	0	0,4149	0,2288	0,2951	0,3684	0,1282	0,3537	0,3438	0,2500	0,3389
	124	0,1805	0,0833	0,1923	0,7941	0,2105	0,0851	0,0169	0,0164	0,2632	0,2692	0,3293	0,2812	0,3194	0,1950
	129	0,1154	0,0625	0,0385	0,0588	0,2368	0,1277	0,0254	0	0,1842	0,1282	0,0976	0,125	0,0833	0,0889
	133	0,0059	0	0,0154	0	0,0789	0,0213	0,1356	0,1148	0	0,0128	0,0122	0,0312	0,0347	0,0361
	137	0,0207	0	0	0	0	0	0,0085	0	0	0	0,0122	0	0,0556	0,0128
	141	0	0	0	0	0	0	0,0085	0	0	0,1154	0,0122	0	0	0,0083
	145	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1282	0,0244	0	0	0,0090

Lokus	Alel	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa	Ukupno	
387A12F	205	0	0	0	0	0	0,0426	0	0,0246	0	0	0	0	0	0,0053	
	206	0,0444	0,0417	0	0,0294	0	0,1277	0,0169	0	0	0,2179	0,1220	0,0781	0,0208	0,0505	
	210	0	0	0	0	0	0	0,0593	0	0	0	0	0	0	0,0053	
	214	0,0089	0,0208	0	0	0	0	0,0085	0,0410	0	0	0	0,0156	0,0486	0,0136	
	215	0	0	0	0	0	0	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0008	
	218	0,0237	0,1042	0,1154	0,0294	0	0	0	0,0410	0,0526	0,2308	0,1220	0,2031	0,0069	0,0587	
	219	0	0	0,0154	0	0	0	0,0085	0	0	0	0,0122	0,0312	0,0556	0,0105	
	222	0,0621	0,0625	0	0	0,0526	0,2234	0,1864	0,2295	0,4211	0,2564	0,3537	0,0938	0,3264	0,1619	
	223	0,1923	0,0625	0,1154	0,0294	0	0,2553	0,0254	0,0082	0	0,0641	0,0244	0,1719	0,0556	0,1039	
	226	0,1420	0,2708	0,2154	0,5294	0,0263	0,0851	0,2966	0,2459	0,1053	0,0641	0,2317	0,0625	0,0486	0,1657	
	227	0,2840	0,1458	0,1154	0,0294	0	0,1809	0,1271	0,0574	0,0526	0,0513	0,0488	0,0156	0,0625	0,1340	
	228	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0526	0	0	0,0156	0	0,0023	
	230	0,1006	0	0,1769	0,3235	0	0,0319	0,1186	0,2131	0,1579	0,1154	0,0122	0,0781	0,1597	0,1167	
	231	0,0592	0,1458	0,0538	0	0,1579	0,0213	0,1271	0,0656	0,0526	0	0,0366	0	0,0486	0,0580	
	233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0156	0	0,0008	
	234	0,0207	0	0,0077	0	0,1316	0,0106	0,0085	0,0328	0,0263	0	0,0366	0,1250	0,0278	0,0264	
	235	0,0207	0,1458	0,0615	0	0	0	0,0085	0	0,0263	0	0	0,0938	0,0417	0,0271	
	239	0	0	0,0077	0	0,0789	0	0,0085	0,0082	0,0526	0	0	0	0,0417	0,0105	
	240	0,0266	0	0,1154	0,0294	0,5526	0,0213	0	0	0	0	0	0	0	0,0361	
	243	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0486	0,0053	
	248	0,0118	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0069	0,0038	
	251	0	0	0	0	0	0	0	0,0164	0	0	0	0	0	0,0015	
	255	0,0030	0	0	0	0	0	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0015	
	SBH22	288	0	0	0	0	0	0	0	0,0082	0	0	0	0	0	0,0008
		292	0,0118	0,0625	0	0,1176	0	0,0426	0,0339	0,1393	0	0,0641	0,0375	0,0938	0	0,0378
296		0	0	0	0	0	0,0319	0,0169	0,0082	0	0	0	0	0	0,0045	
300		0,0237	0	0	0	0	0	0,0169	0,0164	0,0263	0,2308	0,1375	0,0781	0,0141	0,0370	
304		0	0,0208	0	0	0	0	0	0,041	0	0	0	0	0,0211	0,0068	
308		0,0917	0,0417	0,1846	0	0	0,0319	0,0339	0,1148	0	0,0641	0,0375	0	0,1056	0,0763	
312		0,5503	0,5833	0,6077	0,8824	0,9737	0,8191	0,8559	0,4508	0,8684	0,2692	0,6625	0,4531	0,6338	0,6186	
315		0,1272	0,2708	0,0769	0	0	0,0106	0,0339	0,0328	0	0,2051	0,025	0,125	0,0704	0,0838	
316		0,1598	0,0208	0,0077	0	0,0263	0,0106	0	0	0	0	0,0125	0	0,1338	0,0589	
319		0,0059	0	0,0231	0	0	0	0	0,1393	0	0	0	0,0312	0	0,0181	
320		0,0030	0	0,0077	0	0	0	0	0,0082	0	0,0128	0,0125	0	0,0070	0,0045	
322		0	0	0	0	0	0,0106	0	0,0246	0	0	0	0	0	0,0030	
323		0,0178	0	0,0692	0	0	0	0	0	0	0,1410	0,0375	0	0	0,0219	
326		0	0	0	0	0	0,0106	0,0085	0,0082	0,1053	0	0,0250	0,0469	0	0,0091	
328		0	0	0	0	0	0,0106	0	0,0082	0	0	0	0	0,0141	0,0030	
330		0,0089	0	0	0	0	0,0213	0	0	0	0,0128	0,0125	0,1094	0	0,0106	
332		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0625	0	0,0030	
335		0	0	0,0231	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0023	
SBH19	387	0	0	0	0	0	0,0213	0	0,0492	0	0	0	0	0	0,0061	
	389	0,0060	0	0,0077	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0023	

Lokus	Alel	Kontinentalni Balkan	Primorski Balkan	Makedonija	Slovenija Primorje	Cuneo i Savona	Lanzo	La Mandria	Castel Porziano	Portugalija Jug	Portugalija Centar i Španija Jug	Španija Centar i Zapad	Iberija Sever	Centralna Evropa	Ukupno
	<b>391</b>	0,3720	0,3958	0,3538	0,1765	0,9737	0,6170	0,6102	0,3607	0,6053	0,5513	0,5139	0,5000	0,7394	0,4924
	<b>395</b>	0,0030	0	0	0	0	0	0	0,0164	0	0	0	0,0156	0	0,0030
	<b>399</b>	0,1190	0,1042	0,0154	0	0,0263	0	0,0339	0,0164	0,1579	0,0128	0,0417	0,0469	0,1056	0,0624
	<b>403</b>	0,0804	0,2500	0,3000	0,3529	0	0,1489	0,1186	0,2213	0,0263	0,0256	0,2500	0,0938	0,0423	0,1355
	<b>407</b>	0,3006	0,1458	0,3154	0,4706	0	0,2128	0,2288	0,3279	0,1053	0,3718	0,1944	0,1719	0,1127	0,2481
	<b>411</b>	0,1190	0,0833	0,0077	0	0	0	0,0085	0,0082	0,1053	0,0385	0	0,1094	0	0,0464
	<b>415</b>	0	0,0208	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,0625	0	0,0038

Tabela 6. Uočena i očekivana heterozigotnost po lokusu i po subpopulacijama, kao i za ukupan uzorak

Lokus	KontBal		PriBal		Mak		SloPrim		Cun_Sav		Lanzo		Mandria		CP		PortJug		PortCen_ŠpJug		ŠpCen_Zap		IberSever		CenEvr		Ukupno	
	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He	Ho	He
<b>SBH2</b>	0,66	0,66	0,62	0,65	0,63	0,81	0,65	0,74	0,85	<b>0,79</b>	0,51	<b>0,75</b>	0,84	0,79	0,26	0,24	0,47	0,65	0,68	0,70	0,78	0,76	0,38	0,40	0,64	0,71	0,64	<b>0,73</b>
<b>SBH18</b>	0,78	0,82	0,94	0,88	0,83	0,83	0,53	0,67	0,79	0,85	0,80	0,80	0,67	<b>0,81</b>	0,47	0,69	0,63	0,63	0,63	0,74	0,88	0,82	0,74	0,77	0,78	0,78	0,76	<b>0,86</b>
<b>SBH4</b>	0,79	0,85	0,83	0,84	0,83	0,89	0,47	0,60	0,85	0,84	0,81	0,89	0,80	0,86	0,53	0,64	0,74	0,76	0,78	0,85	0,75	0,83	0,77	0,80	0,82	0,89	0,79	<b>0,89</b>
<b>S0655</b>	0,66	0,75	0,74	0,69	0,67	0,72	0,47	0,52	0,74	0,81	0,69	0,76	0,51	<b>0,83</b>	0,74	0,59	0,42	0,49	0,46	<b>0,68</b>	0,66	0,75	0,79	0,76	0,56	<b>0,70</b>	0,64	<b>0,78</b>
<b>SBH20</b>	0,89	0,93	0,78	0,81	0,88	0,91	0,59	0,75	0,91	0,88	0,86	0,89	0,80	0,86	0,74	0,73	0,79	0,86	0,83	<b>0,93</b>	0,72	<b>0,91</b>	0,79	0,91	0,78	<b>0,87</b>	0,83	<b>0,94</b>
<b>SBH1</b>	0,75	0,83	0,91	0,88	0,75	0,80	0,53	0,72	0,74	0,72	0,76	0,82	0,85	0,77	0,68	0,61	0,79	0,72	0,71	0,80	0,72	0,83	0,87	0,82	0,89	0,76	0,79	<b>0,84</b>
<b>SBH10</b>	0,81	0,88	0,77	<b>0,79</b>	0,79	0,89	0,35	<b>0,75</b>	0,81	0,85	0,81	0,86	0,79	0,85	0,21	0,28	0,26	<b>0,48</b>	0,64	0,86	0,81	0,89	0,87	0,85	0,81	0,88	0,75	<b>0,89</b>
<b>SBH13</b>	0,55	0,66	0,72	0,80	0,79	0,75	0,41	0,35	0,72	0,73	0,73	<b>0,81</b>	0,62	<b>0,76</b>	0,53	0,69	0,53	0,76	0,68	0,75	0,63	0,78	0,82	0,84	0,69	0,80	0,65	<b>0,81</b>
<b>387A12F</b>	0,74	<b>0,84</b>	0,89	0,87	0,67	<b>0,86</b>	0,76	0,63	0,64	<b>0,83</b>	0,73	0,83	0,79	<b>0,84</b>	0,63	0,66	0,79	0,79	0,59	0,80	0,78	0,89	0,79	<b>0,82</b>	0,79	0,85	0,75	<b>0,89</b>
<b>SBH22</b>	0,39	<b>0,65</b>	0,20	<b>0,59</b>	0,42	0,59	0,24	0,21	0,28	0,33	0,19	0,27	0,64	<b>0,75</b>	0,05	0,05	0,11	0,24	0,15	<b>0,54</b>	0,38	<b>0,76</b>	0,33	<b>0,81</b>	0,25	<b>0,57</b>	0,31	<b>0,60</b>
<b>SBH19</b>	0,73	0,74	0,69	0,69	0,79	0,76	0,53	0,64	0,55	0,56	0,54	0,56	0,72	<b>0,72</b>	0,05	0,05	0,63	0,60	0,56	0,64	0,66	0,70	0,67	0,56	0,42	0,43	0,62	<b>0,67</b>
<b>Prosek</b>	0,70	0,78	0,74	0,77	0,73	0,80	0,50	0,60	0,72	0,75	0,68	0,75	0,73	0,80	0,44	0,48	0,56	0,64	0,61	0,75	0,70	0,81	0,71	0,76	0,68	0,75	0,68	0,81
<b>LD</b>	3/55		3/55		3/55		1/55		3/55		2/55		13/55		2/55		1/55		4/55		5/55		1/55		2/55		54/55	

Ho - uočena heterozigotnost; He - očekivana heterozigotnost; Boldovane vrednosti označavaju statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinbergove ravnoteže; LD - broj parova lokusa koji su pokazali statistički značajnu vezanost, od mogućih 55 kombinacija.

Tabela 7. Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za definisane subpopulacije divlje svinje u Evropi

Izvor varijacije	Varijabilnost komponenti	Procenat varijabilnosti	F <sub>ST</sub>	P
Između populacija	0,3354	7,49	0,0749	0,001
Unutar populacija	4,1409	92,51		

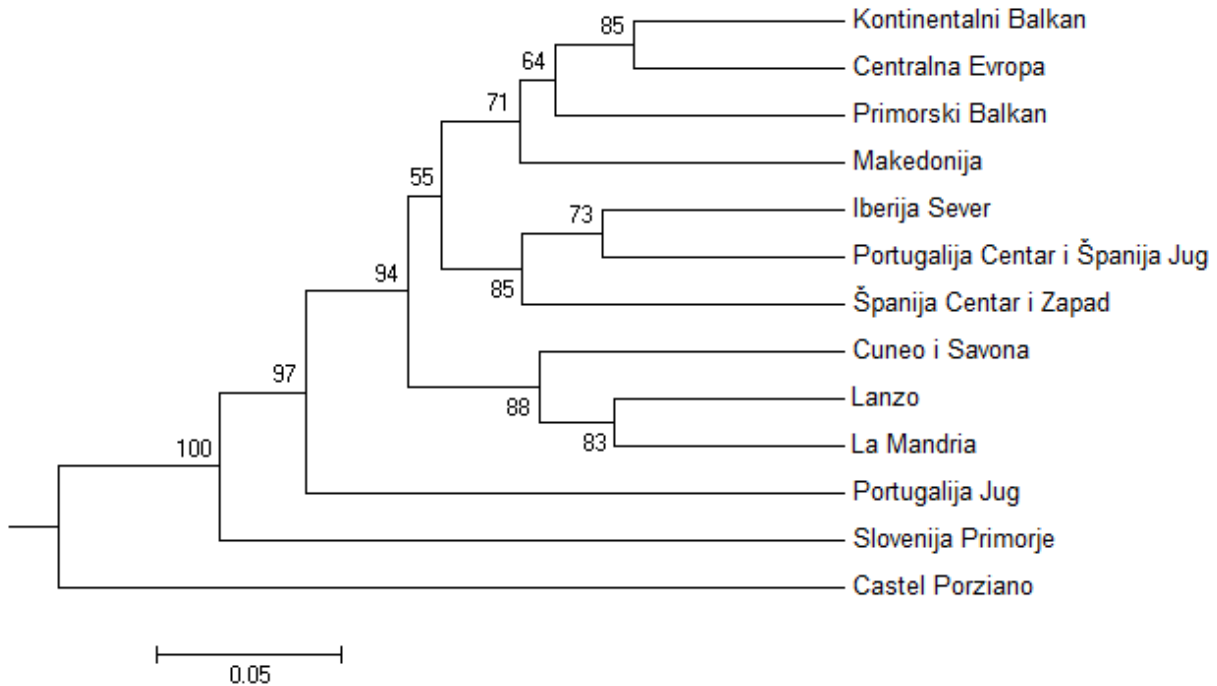
Tabela 8. Vrednosti genetičke udaljenosti ( $F_{ST}$ ) za parove subpopulacija (ispod dijagonale) i broj jedinstvenih alela za svaku subpopulaciju (dijagonala). Gradijentom boje je obeležena veličina genetičke diferencijacije, od male (svetlo zelena), preko srednje (zelena) do visoke divergencije (tamno zelena)

Populacija	KontBal	Mak	PriBal	SloPrim	CP	Cun_Sav	Lanzo	Mandria	PortJug	IberSever	PortCen_ŠpJug	ŠpCen_Zap	CenEvr
<b>KontBal</b>	<b>9</b>												
<b>Mak</b>	0,032	<b>0</b>											
<b>PriBal</b>	0,038	0,043	<b>5</b>										
<b>SloPrim</b>	0,118	0,137	0,105	<b>1</b>									
<b>CP</b>	0,174	0,205	0,195	0,284	<b>0</b>								
<b>Cun_Sav</b>	0,062	0,063	0,082	0,146	0,199	<b>3</b>							
<b>Lanzo</b>	0,056	0,056	0,065	0,144	0,186	0,049	<b>3</b>						
<b>Mandria</b>	0,060	0,051	0,066	0,152	0,197	0,063	0,039	<b>7</b>					
<b>PortJug</b>	0,108	0,108	0,116	0,221	0,282	0,125	0,101	0,105	<b>1</b>				
<b>IberSever</b>	0,069	0,081	0,084	0,183	0,195	0,114	0,096	0,077	0,135	<b>0</b>			
<b>PortCen_ŠpJug</b>	0,046	0,056	0,052	0,124	0,192	0,075	0,062	0,068	0,089	0,046	<b>1</b>		
<b>ŠpCen_Zap</b>	0,050	0,051	0,067	0,137	0,190	0,069	0,076	0,072	0,117	0,055	0,033	<b>0</b>	
<b>CenEvr</b>	0,046	0,057	0,059	0,157	0,184	0,079	0,042	0,058	0,067	0,070	0,044	0,060	<b>3</b>

Tabela 9. Koeficijent inbreedinga,  $F_{IS}$ , po lokusima i po subpopulacijama

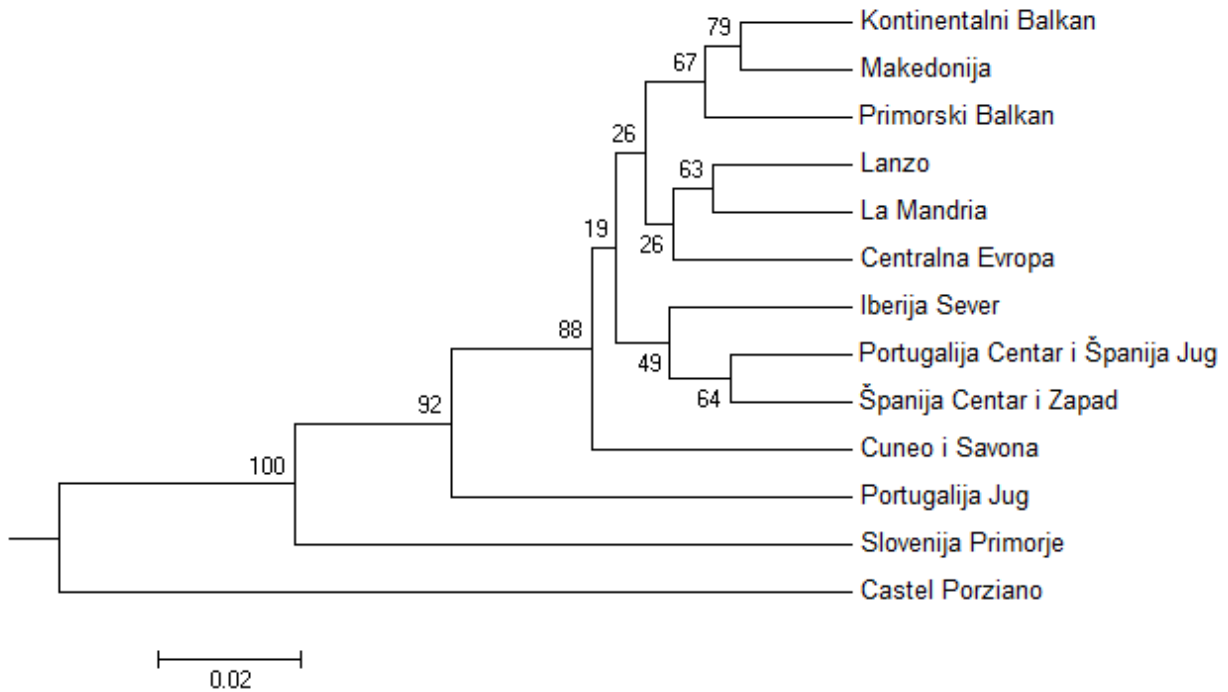
Lokus	KontBal	Mak	PriBal	SloPrim	CP	Cun_Sav	Lanzo	Mandria	PortJug	IberSever	PortCen_ŠpJug	ŠpCen_Zap	CenEvr	Prosek
<b>SBH2</b>	0,0025	0,2359	0,0478	0,1244	-0,0976	-0,0726	0,3240	-0,0545	0,2735	0,0339	0,0180	-0,0340	0,0953	0,0564
<b>SBH18</b>	0,0492	-0,0011	-0,0718	0,2110	0,3193	0,0780	-0,0009	0,1744	0,0046	0,0291	0,1444	-0,0743	0,0074	0,0469
<b>SBH4</b>	0,0707	0,0612	0,0114	0,2266	0,1837	-0,0096	0,0848	0,0680	0,0345	0,0388	0,0860	0,0943	0,0753	0,0654
<b>S0655</b>	0,1156	0,0812	-0,0632	0,1018	-0,2569	0,0792	0,0810	0,3891	0,1429	-0,0443	0,3229	0,1232	0,1933	0,1232
<b>SBH20</b>	0,0363	0,0388	0,0300	0,2157	-0,0100	-0,0378	0,0255	0,0695	0,0816	0,1251	0,1120	0,2165	0,1117	0,0642
<b>SBH1</b>	0,1036	0,0665	-0,0265	0,2727	-0,1196	-0,0374	0,0730	-0,1011	-0,0998	-0,0704	0,1118	0,1352	-0,1737	0,0154
<b>SBH10</b>	0,0741	0,1082	0,0290	0,5396	0,2653	0,0487	0,0534	0,0741	0,4611	-0,0230	0,2601	0,0898	0,0731	0,0934
<b>SBH13</b>	0,1675	-0,0505	0,0952	-0,1667	0,2389	0,0139	0,1013	0,1854	0,3169	0,0213	0,0935	0,2026	0,1313	0,1218
<b>387A12F</b>	0,1228	0,2285	-0,0274	-0,2235	0,0443	0,2363	0,1261	0,0582	0,0037	0,0309	0,2663	0,1258	0,0686	0,0998
<b>SBH22</b>	0,3979	0,3009	0,6623	-0,1035	0,0000	0,1572	0,2997	0,1451	0,5689	0,5938	0,7263	0,5086	0,5549	0,4345
<b>SBH19</b>	0,0168	-0,0467	-0,0030	0,1795	0,0000	0,0075	0,0401	-0,0071	-0,0511	-0,1875	0,1374	0,0693	0,0189	0,0126
<b>Prosek</b>	0,1031	0,1052	0,0930	0,0622	0,1252	0,0516	0,0421	0,1098	0,0910	0,1579	0,0498	0,2072	0,1325	0,1051

Na osnovu Nei-jeve genetičke distance,  $D_a$  (Nei, 1983) i izračunatih  $F_{ST}$  vrednosti za parove subpopulacija konstruisani su UPGMA dendrogrami bootstrapping metodom sa 100000 permutacija (Sl. 28 i 29), čime je pokazano da se subpopulacije Castel Porziano i Slovenija Primorje odvajaju od ostalih subpopulacija i to sa 100 bootstrap vrednosti.



Slika 28. UPGMA dendrogram za subpopulacije divlje svinje u Evropi konstruisan na osnovu Nei-jeve  $D_a$  distance

Figure 28. UPGMA dendrogram for 13 defined wild boar subpopulations in Europe based on Nei's  $D_a$  distance



Slika 29. UPGMA dendrogram za subpopulacije divlje svinje u Evropi dobijen bootstrap analizom  $F_{ST}$  vrednosti

Figure 29. UPGMA dendrogram for 13 defined wild boar subpopulations in Europe based on  $F_{ST}$  estimator of genetic differentiation

## 6.2. Genetička varijabilnost i struktura populacija divlje svinje na osnovu analize kontrolnog regiona mtDNK

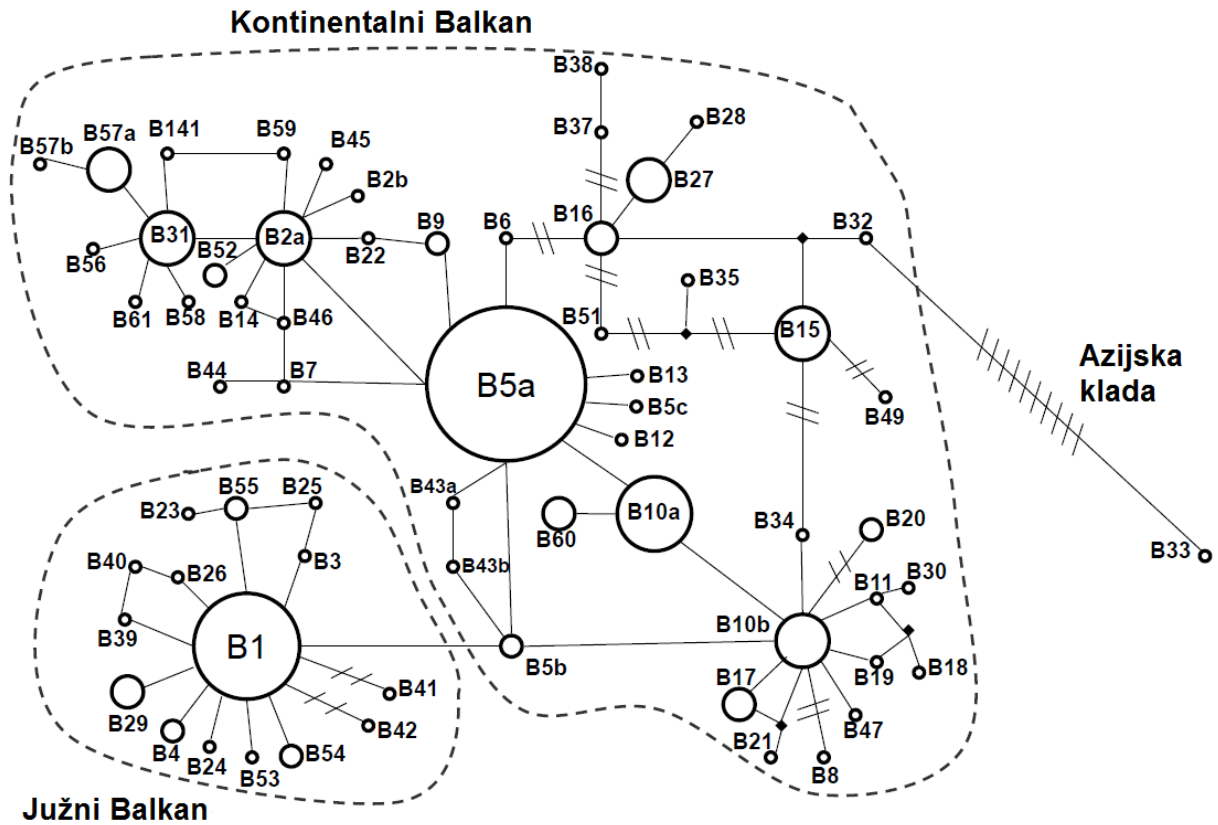
### 6.2.1. Genetička varijabilnost i struktura populacija divlje svinje na Balkanu na osnovu analize mtDNK

Analizom seta od 351 sekvence CR1-mtDNK divljih svinja sa Balkana otkriveno je ukupno 65 različitih haplotipova na osnovu 54 varijabilne pozicije. Diverzitet haplotipova u celokupnom uzorku bio je  $h=0,8722$ , diverzitet nukleotida iznosio je  $\pi=0,8722$ , a prosečan broj nukleotidnih razlika  $k=2,784$ . Na osnovu MJ *networka* (Sl. 30) i Bajesovog filogenetičkog stabla (Sl. 31), sve jedinice (odnosno pojedinačne sekvence) na Balkanu su grupisane u jednu od dve definisane grupe: Južni Balkan i Kontinentalni

Balkan. Izuzetak je bio haplotip B33 koji je pronađen kod jedne jedinke iz Grčke i grupisan u Azijski klaster. Grupu Južni Balkan su formirale sekvence divljih svinja uzorkovane u centralnom delu Grčke, i 88 od 104 jedinke iz ovog regiona je grupisano zajedno na MJ *networku* i Bajesovom stablu, zajedno sa jednim uzorkom iz severno-istočnog dela Grčke koji je pokazao najčešći haplotip iz ove grupe (haplotip B1). Dakle, grupu Južni Balkan su činili haplotip B1, koji je drugi najučestaliji haplotip na Balkanu i odgovara prethodno opisanom haplotipu G (Alexandri i sar., 2012), i manje frekventni haplotipovi koji su jedan ili dva mutaciona koraka udaljeni od B1, tako da B1 zajedno sa haplotipovima koji polaze od njega formira zvezdoliku strukturu (engl. „*star-like pattern*“). Grupu Kontinentalni Balkan su pretežno obrazovale sekvence divljih svinja uzorkovanih u severno-istočnoj Grčkoj, Bugarskoj, Makedoniji, Srbiji, Crnoj Gori, Bosni i Hercegovini, Hrvatskoj i Sloveniji. Od ukupno 246 jedinki uzorkovanih u tom regionu, 245 je grupisano u klaster Kontinentalni Balkan zajedno sa 16 uzoraka iz centralnog dela Grčke (Sl. 30). Haplotip B5a je najzastupljeniji haplotip na Balkanu koji takođe ima i najširu distribuciju. Ovaj haplotip je pronađen kod 82 jedinke divlje svinje iz Srbije, Bosne i Hercegovine, Hrvatske, Makedonije i Slovenije, dok je haplotip B5a nađen kod 12 od ukupno 182 jedinke iz Grčke. Od ovih 12 jedinki 4 je bilo iz centralne Grčke, a 8 iz severno-istočnog dela Grčke. Drugi haplotip takođe zastupljen sa visokom frekvencijom na Balkanu, B10a, je nađen pretežno u uzorcima iz Bosne i Hercegovine, kod nekoliko uzoraka iz Srbije i Makedonije, i to je bio jedini haplotip koji je pronađen kod divljih svinja iz Crne Gore. Dva haplotipa sa srednjom frekvencijom (B2a i B31) su nađena pretežno kod jedinki iz Vojvodine i Slavonije, a druga dva haplotipa sa srednjom frekvencijom (B10b i B15) su nađeni kod uzoraka iz Grčke. Svi ostali haplotipovi su bili prisutni u manjoj frekvenciji i detalji o distribuciji svih haplotipova u odnosu na lokacije izlova jedinki dati su u Prilogu 1. Bajesovo filogenetičko stablo konstruisano na osnovu 65 haplotipova otkrivenih kod divljih svinja na Balkanu pokazuje da sve sekvence, izuzev haplotipa B33, pripadaju Evropskoj E1 haplogrupi (Sl. 31). Pored toga, pokazan je parafiletički odnos haplotipova koji pripadaju grupi Južni Balkan u odnosu na haplotipove iz grupe Kontinentalni Balkan. *A posteriori* verovatnoća za klaster Južni Balkan je bila visoka (89%), ali ne i signifikantna prema opšte prihvaćenim kriterijumima



za tumačenje rezultata Bajesove filogenetičke analize (Huelsenbeck i sar., 2001; Huelsenbeck i Rannala, 2004).

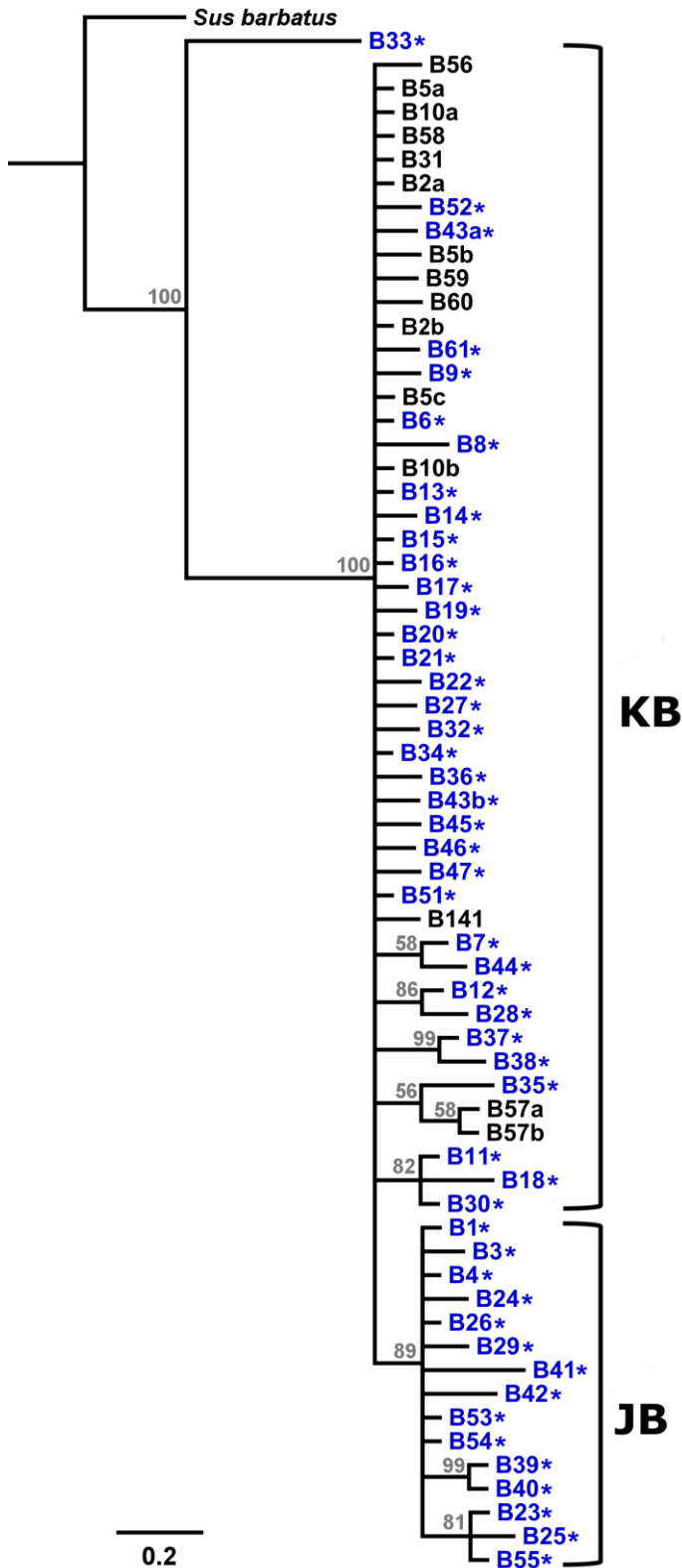


Slika 30. Median-Joining network mtDNK haplotipova otkrivenih kod divljih svinja na Balkanu. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji haplotipova. U slučaju postojanja više od jednog mutacionog koraka, oni su predstavljeni kosim crtama

Figure 30. Median-Joining network of mtDNA haplotypes observed in the Balkans. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies. Mutational steps larger than one between haplotypes are presented with dashes

Nakon definisanja strukture populacija divljih svinja na Balkanu, izračunati su osnovni parametri genetičke varijabilnosti za obe definisane grupe, kao i za uzorak u celini (Tab. 10). U ovim izračunavanjima isključen je uzorak B33 koji je pokazao Azijski

haplotip, a sa ciljem da se dobije jasna slika o genetičkom diverzitetu divljih svinja na Balkanu. Uključivanje Azijskog haplotipa u analizu bi signifikantno uticalo na rezultate izračunavanja osnovnih parametara genetičkog diverziteta, kao i na analizu molekularne varijanse, *mismatch* analizu i testove neutralnosti. Analiza *mismatch* distribucije u obe grupe i u čitavom setu sekvenci sa Balkana nije pokazala statistički značajno odstupanje od testirane hipoteze da dobijeni podaci odgovaraju modelu nagle ekspanzije populacija. Testovima neutralnosti su u obe analizirane grupe dobijene signifikantno negativne  $F_s$  i  $D$  vrednosti, a isti rezultati su dobijeni za čitav set sekvenci (Tab. 11). Analizom molekularne varijanse otkriveno je da je varijabilnost između analiziranih grupa bila signifikantno veća nego unutar grupa (Tab. 12).



Slika 31. Bajesovo filogenetičko stablo konstruisano na osnovu 65 haplotipova CR1-mtDNK nadenih na Balkanu. Brojevi na nodusima predstavljaju *a posterior* verovatnoću za odgovarajuću granu na stablu. Legenda: KB - grupa Kontinentalni Balkan, JB - grupa Južni Balkan. Jedinstveni haplotipovi za Balkansko poluostrvo su obeleženi plavom bojom i zvezdicom

Figure 31. Bayesian tree based on 66 wild boar haplotypes from the Balkans. Numbers on nodes depict Bayesian posterior probabilities. CB: Continental Balkan group, SB: South Balkan group. Haplotypes exclusive to the Balkan peninsula are highlighted in blue and marked with an asterisk.

Tabela 10. Osnovni parametri genetičkog diverziteta za dve definisane grupe na Balkanu i za sve uzorke sa Balkana, kao i za četiri definisane haplogrupe (Azijska, Blisko Istočna, Evropska E1 i Evropska E2)

Populacija	Kontinentalni Balkan	Južni Balkan	Čitav Balkan <sup>1</sup>	Azija (A)	Bliski Istok (NE)	E1	E2
<b>Broj jedinki</b>	261	89	350	84	35	790	32
<b>Parametri genetičke varijabilnosti</b>							
Broj haplotipova	49	15	64	49	13	90	4
Ti/Tv odnos	1,88	0,25	1,27	12,25	7,5	2,125	1
Diverzitet haplotipova (h)	0,836	0,589	0,872	0,967	0,864	0,90	0,619
Diverzitet nukleotida ( $\pi$ )	0,0056	0,0013	0,0061	0,022	0,0105	0,0053	0,0014
Broj nukleotidnih razlika (k)	2,462	0,596	2,712	8,989	4,281	2,176	0,564
Koeficijent procene segregacionih mesta ( $\Theta$ s)	4,072	1,976	5,129	10,396	4,128	6,76	0,4966

Ti/Tv odnos – odnos između broja tranzicija i transverzija; <sup>1</sup>bez uzorka u kome je uočen Azijski haplotip

Tabela 11. Rezultati *mismatch* analize i testova neutralnosti za dve definisane grupe na Balkanu i za čitav Balkan, kao i za Evropsku E1 i Evropsku E2 haplogrupu

Populacija	Kontinentalni Balkan	Južni Balkan	Čitav Balkan <sup>1</sup>	E1	E2
<b>Mismatch analiza</b>					
Sum of squared deviations SSD	0,00064	0,00002	0,0036	0,00031	0,0263
p	0,92	0,98	0,59	0,76	0,05*
<b>Fu-ov <math>F_s</math> test</b>					
Fs	-26,591	-16,751	-26,174	-25,974	-0,273
p	0,000**	0,000**	0,000**	0,001**	0,386
<b>Tajima D test</b>					
D	-1,573	-2,051	-1,620	-1,83	0,258
p	0,023*	0,001**	0,016*	0,003**	0,681

\* p<0,05; \*\* p<0,01; <sup>1</sup>bez uzorka u kome je uočen Azijski haplotip

Tabela 12. Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) za dve definisane grupe na Balkanu i za četiri definisane haplogrupe u setu sekvenci iz čitavog sveta

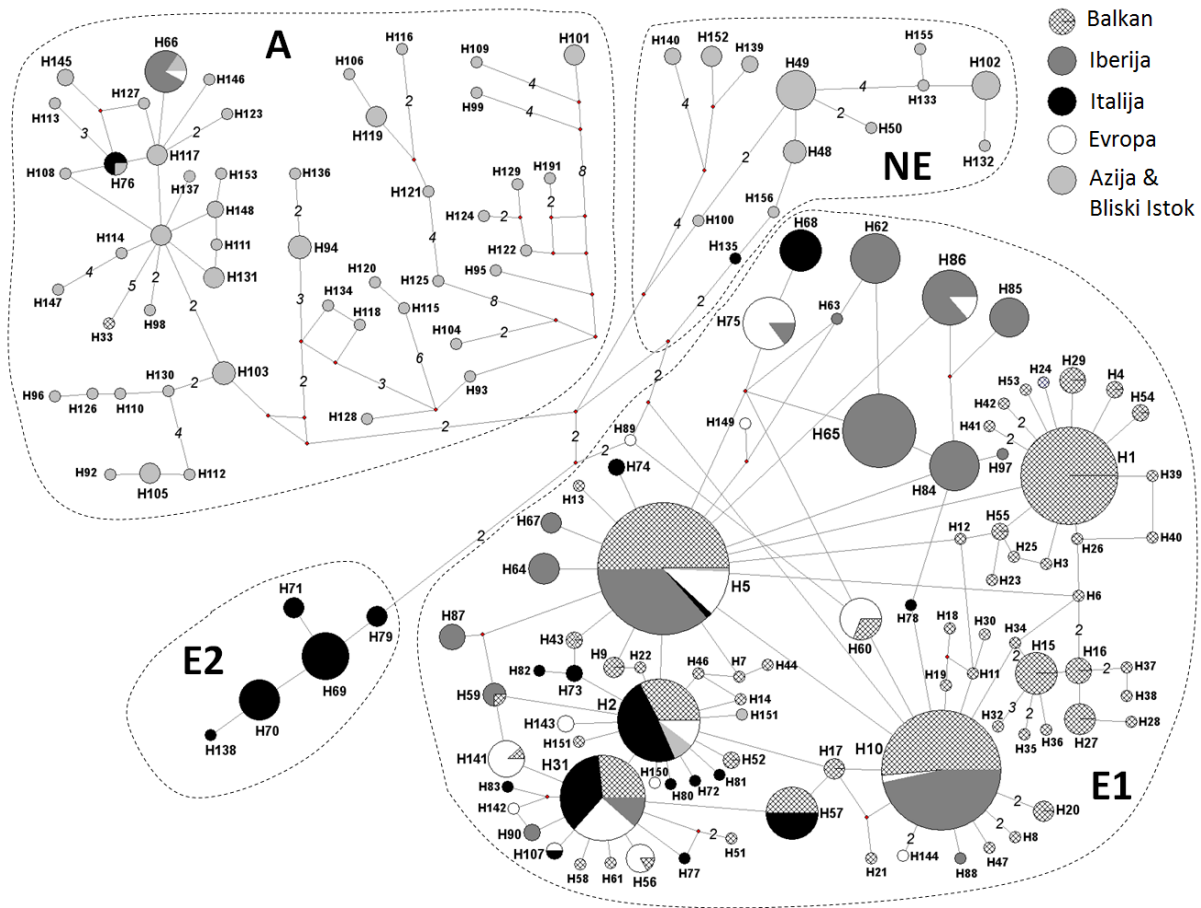
Izvor varijacije	Varijabilnost komponenti	Procenat varijabilnosti	F <sub>ST</sub>	P
<b>Balkan</b>				
Između populacija	0,935	57,37	0,574	0,001
Unutar populacija	0,770	42,63		
<b>Haplogrupe A, NE, E1 i E2</b>				
Između populacija	3,637	71,97	0,7197	0,001
Unutar populacija	1,416	28,03		

### 6.2.2. Varijabilnost kontrolnog regiona mtDNK divljih svinja u Evropsko/Evroazijskom kontekstu

U analizi 940 sekvenci divljih svinja uzorkovanih širom sveta pronađeno je ukupno 156 različitih haplotipova, a na osnovu 107 polimorfnih mesta. S obzirom da je ovaj set sekvenci bio kraći u odnosu na prvi set sekvenci koji su činile samo divlje svinje sa Balkana, određena polimorfna mesta su izgubljena na 5' i 3' krajevima, pa su se neki od prethodno opisanih haplotipova našli zajedno u ovom setu sekvenci (Prilog 1). Diverzitet haplotipova u ovom setu iznosio je  $h=0,929$ , a diverzitet nukleotida  $\pi=0,0125$ , dok je prosečan broj nukleotidnih razlika bio  $k=5,170$ .

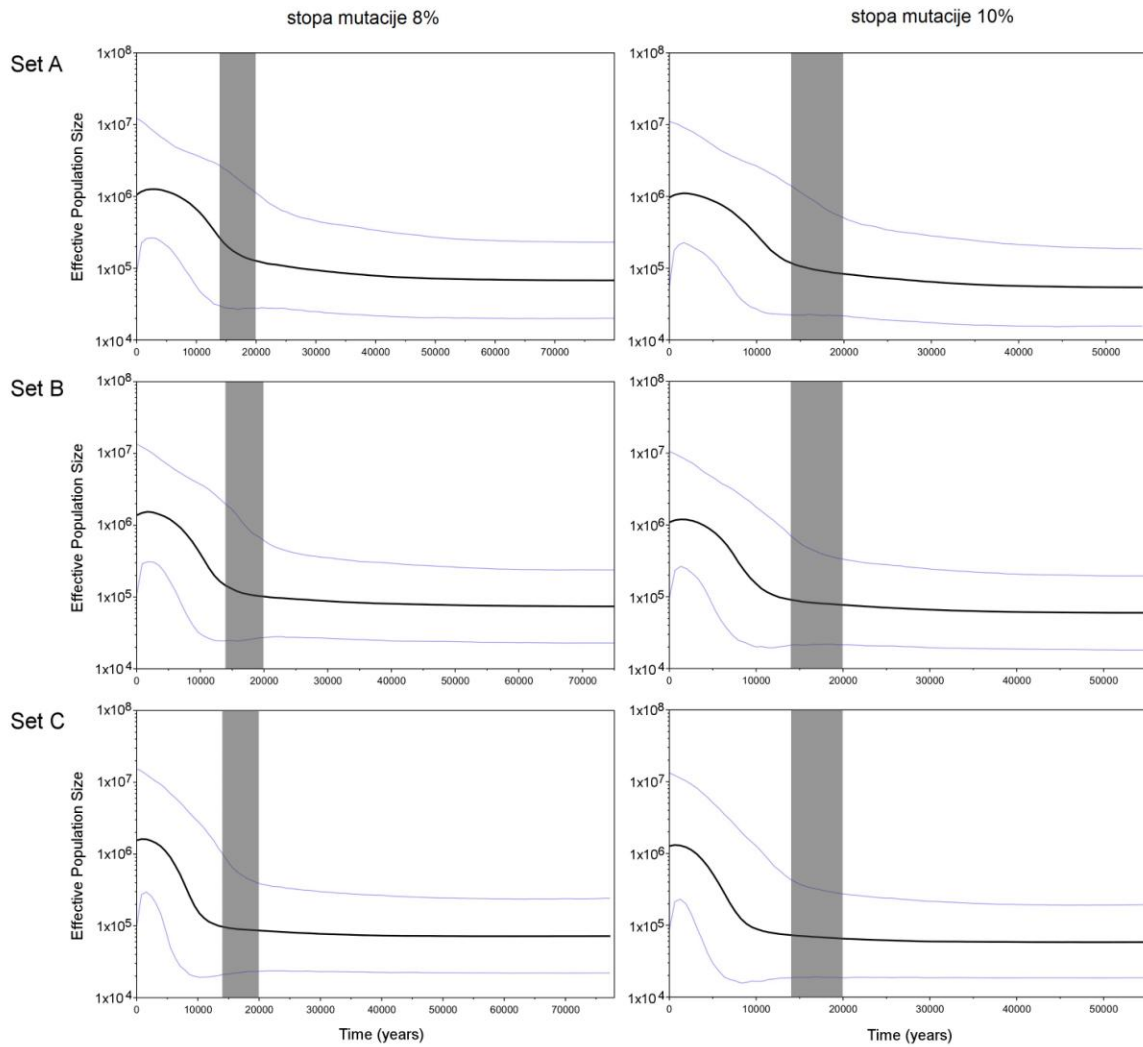
Konstruisanjem MJ *networka* utvrđeno je postojanje 4 velike haplogrupe: Azijska (A), Blisko Istočna (NE), Evropska E1 i Evropska E2 (Sl. 32), koje su ranije već opisane (Larson i sar., 2005; Scandura i sar., 2008; Alexandri i sar., 2012). Na osnovu ove filogenetičke analize i geografskog porekla jedinki, odnosno pojedinačnih sekvenci, sve sekvence su podeljene u četiri haplogrupe. Osnovni parametri genetičke varijabilnosti su izračunati za svaku od četiri haplogrupe i rezultati analize su prikazani u Tabeli 10. *Mismatch* distribucija je signifikantno odstupala od testirane hipoteze o modelu nagle ekspanzije za Evropsku E2 haplogrupu, dok je za Evropsku E1 haplogrupu potvrđena hipoteza nagle ekspanzije (Tab. 11). Testovi neutralnosti su bili signifikantno negativni u E1 haplogrupi, ali ne i u E2. Sa ciljem da se utvrdi demografska istorija Evropske E1 haplogrupe primenjena je Bajesova statistika i konstruisan je Bajesov *skyline plot* (BSP)

na osnovu tri seta slučajno odabranih sekvenci E1 haplogrupe. Rezultati ove analize su pokazali postojanje ekspanzije ove haplogrupe i da se ekspanzija desila nakon poslednje glacijacije (Sl. 33). Analiza molekularne varijanse (AMOVA) je pokazala signifikantno veći procenat varijacije između definisanih grupa (71,97%) nego unutar grupa (28,03%) (Tab. 12).



Slika 32. Median-Joining network konstruisan za 156 mtDNK haplotipova otkrivenih kod 940 divljih svinja uzorkovanih širom sveta. Veličina krugova odgovara uočenoj frekvenciji haplotipova. U slučaju postojanja više od jednog mutacionog koraka, oni su predstavljeni brojevima. A: Azijska haplogrupa; NE: Blisko Istočna haplogrupa; E1: Evropska E1 haplogrupa; E2: Evropska E2 haplogrupa

Figure 32. Median-Joining network of 156 mtDNA haplotypes observed in 940 wild boars from all around the world. Circle sizes are proportional to haplotype frequencies. Mutational steps larger than one between haplotypes are presented with numbers. A: Asian haplogroup; NE: Near Eastern haplogroup; E1: European E1 haplogroup; E2: European E2 haplogroup.



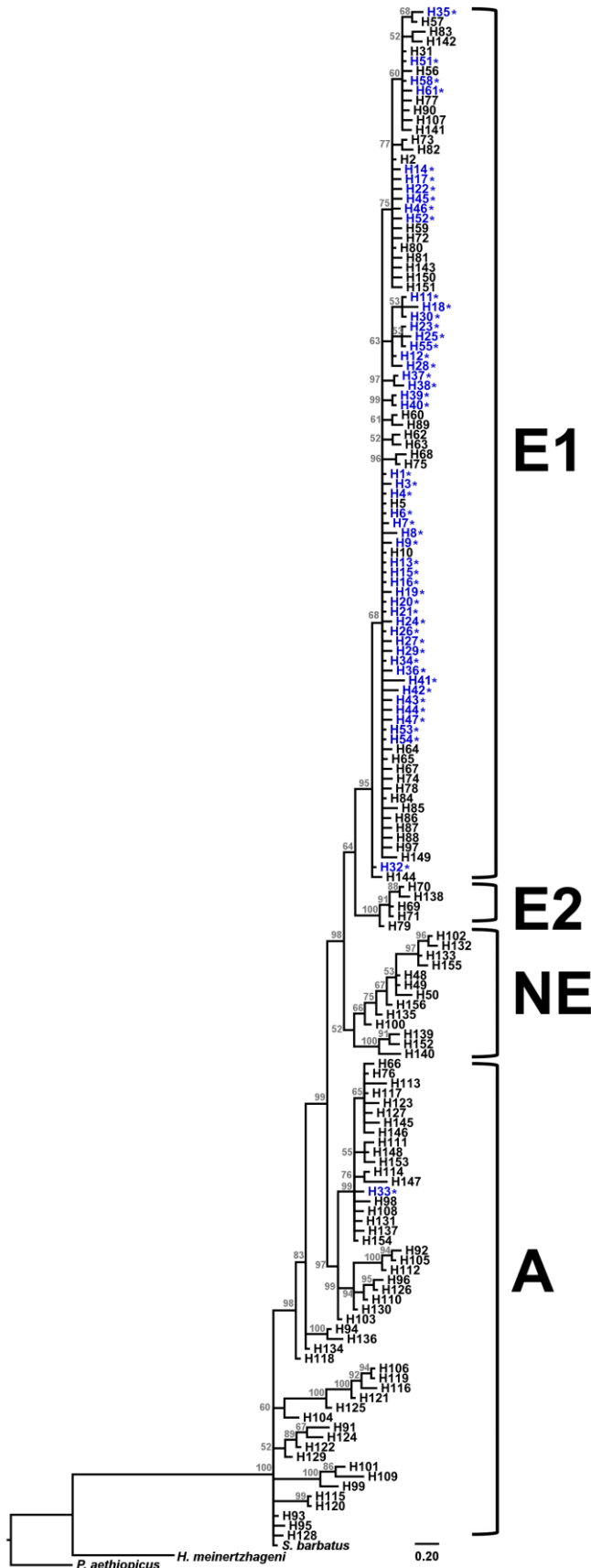
Slika 33. *Bayesian skyline plots* (BSP) konstruisani za tri slučajno odabrana seta od 100 sekvenci u okviru Evropske E1 haplogrupe. BSP su konstruisani za dve različite stope mutacije, 8 i 10%. Na x osi su date vrednosti vremena u godinama, a na y osi je predstavljena efektivna veličina populacije. Za kalibraciju obe ose je korišćena odgovarajuća stopa mutacije sekvenci mtDNK

Figure 33. Bayesian skyline plots obtained from three random sets of 100 individuals, from the total European E1 dataset, based on two different mutation rates (8 and 10%). Values of time and population sizes on the axes are scaled with mutation rate

### 6.2.3. Filogenetička i filogeografska analiza u populacijama divlje svinje u Evropi i Evroaziji

Konstruisanjem MJ *networka* (Sl. 32) i Bajesovog filogenetičkog stabla (Sl. 34) za set od 940 sekvenci divljih svinja uzorkovanih širom sveta pokazano je da sve sekvence sa Balkana pripadaju Evropskoj E1 haplogrupi, sa izuzetkom haplotipa H33 koji pripada Azijskoj haplogrupi. Evropsku E1 haplogrupu činilo je ukupno 90 haplotipova, od kojih je 49 (54,4%) bilo jedinstveno za divlje svinje sa Balkana, 11 (12,2%) je bilo jedinstveno za Iberijsko poluostrvo i 10 haplotipova (11,1%) je nađeno samo kod divljih svinja iz Italije. Jedinstveni haplotipovi pronađeni kod divljih svinja iz centralnog dela Grčke, koji su prethodno opisani kao grupa Južni Balkan, pokazali su sličnu distribuciju na oba MJ *networka* (Sl. 30 & 32). Ovi haplotipovi uključuju jedan od najzastupljenijih haplotipova, haplotip H1 koji odgovara haplotipu B1 na Slici 31., i druge haplotipove blisko vezane sa njim koji formiraju zvezdoliku strukturu oko haplotipa H1. Centralni i visoko zastupljeni haplotipovi H2 i H31 zajedno sa manje frekventnim haplotipovima povezanim u zvezdoliku strukturu sa njima odgovaraju prethodno opisanoj "A-strani" Evropske E1 haplogrupe (Larson i sar., 2005), dok svi ostali haplotipovi pripadaju "C strani". Jedinstveni haplotipovi nađeni kod divljih svinja iz severo-istočnog dela Grčke, Bugarske i Srbije se nalaze na MJ *networku* kao konekcije između "A" i "C" strane Evropske E1 haplogrupe (Sl. 32).





Slika 34. Bajesovo filogenetičko stablo konstruisano na osnovu 156 haplotipova CR1-mtDNK nađenih u setu od 940 sekvenci divljih svinja iz čitavog sveta. Brojevi na nodusima predstavljaju *a posterior* verovatnoću za odgovarajuću granu na stablu. Legenda: E1 - Evropska E1 haplogrupa, E2 - Evropska E2 haplogrupa, NE - Blisko Istočna haplogrupa, A -Azijska haplogrupa. Jedinstveni haplotipovi za Balkansko poluostrvo su obeleženi plavom bojom i zvezdicom

Figure 34. Bayesian tree based on 156 haplotypes observed in 940 wild boar CR mtDNA sequences. Numbers on nodes depict Bayesian posterior probabilities. A: Asian haplogroup; NE: Near Eastern haplogroup; E1: European E1 haplogroup; E2: European E2 haplogroup. The haplotypes highlighted in blue and marked with an asterisk are unique to the Balkan Peninsula

## 7. DISKUSIJA

Važna uloga Balkana kao jednog od refugijuma za brojne biljne i životinjske vrste u toku poslednje glacijacije je već ranije opisana (Hewitt, 1999, 2000, 2004). Prethodne genetičke analize u populacijama divlje svinje u Evropi su pokazale da demografska istorija i distribucija jedinki danas prati generalni trend opisan kod većine sisara (Scandura i sar., 2008; Alexandri i sar., 2012) i da su u rekolonizaciji Evrope nakon poslednje glacijacije najviše učestvovala divlje svinje sa Balkanskog poluostrva. Rekolonizacija Evrope sa Balkana je najverovatnija zato što na Balkanu ne postoje velike geografske barijere na severu, dok su Iberijsko i Apeninsko poluostrvo odvojeni od kontinentalnog dela Evrope Pirinejima i Alpima (Hewitt, 1999). Rezultati dobijeni u ovom istraživanju pre svega daju informacije o genetičkom diverzitetu i strukturi populacija divlje svinje sa Balkana koje prethodno nikada nisu bile analizirane, obezbeđujući dokaze o važnoj ulozi Balkana kao genetičkog rezervoara za populacije divlje svinje u Evropi. Pored toga, sveobuhvatna analiza populacija tri južna poluostrva Evrope i divljih svinja centralne Evrope koje ranije nisu genetički opisane daje uvid koliki je bio uticaj svakog od tri predpostavljena refugijuma u rekolonizaciji Evrope nakon poslednje glacijacije i na koji način su antropogeni faktori tokom poslednjeg veka uticali na genetičku strukturu populacija divlje svinje u Evropi. Sveobuhvatna analiza sekvenci mtDNK divljih svinja sa Balkana zajedno sa sekvencama divljih svinja iz čitavog sveta je omogućila rasvetljavanje puteva postglacijalne rekolonizacije Evrope. Važno je naglasiti da su u ovoj studiji analizirane sekvence samo divlje svinje za razliku od prethodnih filogenetičkih i filogeografskih studija gde su pored sekvenci divlje svinje bile uključene i sekvence domaće svinje (Larson i sar., 2007; Scandura i sar., 2008; Alexandri i sar., 2012). Ovakav pristup je omogućio da se bolje sagleda i razume demografska, filogenetička i filogeografska istorija vrste. Čak i najnovije populaciono genetičke studije divlje svinje (Kusza i sar., 2014) ukazuju na činjenicu da je za rasvetljavanje istorije vrste *Sus scrofa*, neophodno uraditi populaciono genetičke analize jedinki sa prostora zapadnog, severnog i centralnog Balkana.

## **7.1. Genetički diverzitet i struktura populacija divlje svinje u Evropi na osnovu analize polomorfnosti mikrosatelita**

Mikrosateliti predstavljaju veoma polimorfne molekularne markere koji omogućavaju uvid u genetički diverzitet i strukturu populacija iste vrste. U ovom istraživanju analizirana je polimorfnost 11 tetranukleotidnih mikrosatelitskih lokusa korišćenjem seta hemikalija „BioType Animal Pig Kit“ kod uzoraka divlje svinje iz Evrope. Komplet hemikalija „BioType Animal Pig Kit“ je dizajniran za genetičke analize domaćih rasa svinja, ali se pokazao veoma dobar i u analizi divlje svinje. Pre ovog istraživanja urađena je samo jedna studija kod divljih svinja iz Italije korišćenjem istog seta hemikalija (Caratti i sar., 2010). Kompanija koja je dizajnirala „BioType Animal Pig Kit“ naglašava da analiza 11 tetranukleotidnih lokusa daje isti stepen populaciono genetičkih informacija kao analiza 15 dinukleotidnih mikrosatelita. Uspešnost amplifikacije mikrosatelitskih lokusa je maksimalno ostvarena za 7 lokusa, dok je kod preostala četiri ona iznosila od 98,9 do 99,85%.

### **7.1.1. Struktura populacija divlje svinje u Evropi**

Ranije populaciono genetičke studije divljih svinja u Evropi su pokazale da su populacije divlje svinje retko homogene i da su često podeljene u genetički diferencirane subpopulacije (Ferreira i sar., 2006, 2009; Nikolov i sar., 2009; Scandura i sar., 2011; Veličković i sar., 2012). Kako je u ovom istraživanju obuhvaćen veliki broj jedinki sa širokog geografskog područja Evrope, prvi korak u analizi mikrosatelita je bio definisanje strukture populacija. Na osnovu analize genetičke strukture populacija primenom različitih programskih paketa i NEWHYBRIDS analize definisano je ukupno 13 genetički diferenciranih subpopulacija divlje svinje u Evropi u analiziranom uzorku od 664 jedinke. Pored programa koji se standardno koriste za utvrđivanje struktuiranosti populacija (STRUCTURE, Geneland, TESS, FCA), program NEWHYBRIDS koji je

korišćen za utvrđivanje migranata i hibrida između parova populacija se pokazao dobar za finalno definisanje subpopulacija u ovoj studiji.

S obzirom da u slučaju postojanja nekoliko hijerarhijskih nivoa strukturiranosti populacije, STRUCTURE otkriva samo najviši nivo strukture, u ovom istraživanju je primenjena hijerarhijska STRUCTURE analiza koja je ranije opisana u populaciono genetičkoj studiji vrste *Aphelocoma coerulescens* (Coulon i sar., 2008). Prva faza ove analize je obuhvatila svih 664 uzoraka divlje svinje iz Evrope i pokazala prisustvo 3 genetička klastera: (1) Balkan, Castel Porziano (Italija) i 16 uzoraka iz Centralne Evrope, (2) Severna Italija i 5 uzoraka iz Centralne Evrope, (3) Iberija i 72 uzoraka iz Centralne Evrope. Dakle, na prvom nivou stukturiranosti tri poluostrva Evrope se izdvajaju kao zasebni genetički klasteri, zajedno sa manjim ili većim brojem uzoraka iz Centralne Evrope. Ovakav rezultat je u skladu sa prethodnim populaciono genetičkim studijama divlje svinje u Evropi u kojima je pokazano da je poslednja glacijacija imala jak uticaj na genetički diverzitet i strukturu populacija koju uočavamo danas (Scandura i sar., 2008). Poznato je da su pre poslednjeg ledenog doba divlje svinje bile široko rasprostranjene na Evropskom kontinentu i da su usled prisustva ledenog pokrivača na severu, one bile potisnute u južne delove Evrope, pa su nakon glacijacije ponovo naselile Centralnu i Istočnu Evropu. Izdvajanje tri južna poluostrva na prvom nivou stukturiranosti potvrđuje rezultate prethodnih analiza da se događaji povezani sa poslednjom glacijacijom predominantno detektuju u populacijama divlje svinje. Na osnovu dobijenih rezultata da sva tri poluostrva Evrope dele genetički materijal sa divljim svinjama iz Centralne Evrope, možemo postaviti hipotezu da su sva tri potencijalna refugijuma imala ulogu u postglacijalnoj rekolonizaciji Centralne i Istočne Evrope. Dalja STRUCTURE analiza je pokazala četiri hijerarhijska nivoa strukturiranosti populacija i ukupno je izdvojeno 11 subpopulacija divlje svinje u analiziranom uzorku Evrope.

Za razliku od STRUCTURE analize, u prvom koraku Geneland analize za svih 664 uzoraka iz Evrope otkriveno je 7 genetičkih klastera od kojih je 5 jasno odgovaralo rezultatima hijerarhijske STRUCTURE analize (Sl. 9, klasteri 1-5). Klaster 6 koji je nazvan "Kontinentalni Balkan" je pored jedinki koje su i u STRUCTURE analizi grupisani zajedno obuhvatio i divlje svinje izlovljene u primorskom delu Slovenije.

Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da se primorski deo Slovenije u STRUCTURE analizi odvojio tek na četvrtom nivou hijerarhijske struktuiranosti. Klaster 7 su činile jedinke iz Makedonije i sve jedinke sa Iberijskog poluostrva. S obzirom da se radi o dve geografski značajno udaljene lokacije, malo je verovatno da jedinke sa Iberijskog poluostrva i Makedonija predstavljaju jednu populaciju. Moguće objašnjenje zašto se jedinke sa Iberijskog poluostrva grupišu zajedno sa uzorcima iz Makedonije bi moglo da bude da one dele preglacijalni diverzitet. Ukoliko se pogleda karta na Slici 1. može se videti da su divlje svinje sa Iberije uzorkovane u središnjim i južnim delovima poluostrva. Makedonija se takođe nalazi u središnjem delu Balkanskog poluostrva, tako da najbolje objašnjenje zašto je u Geneland analizi Makedonija u klasteru sa Iberijom, a ne ostalim uzorcima sa Balkana, je da se kod ovih jedinki zadržao preglacijalni diverzitet. Ovakav rezultat podržava teoriju da su divlje svinje iz Centralne i Istočne Evrope tokom poslednje glacijacije bile potisnute u refugijume u južnim poluostrvima, kao i prethodna istraživanja da se uticaj poslednje glacijacije na genetičku strukturu populacija divlje svinje u Evropi uočava i danas.

TESS analiza svih 664 uzoraka je pokazala veliko podudaranje sa rezultatima STRUCTURE analize i otkrila 11 subpopulacija koje većinom odgovaraju grupama definisanim nakon hijerarhijske STRUCTURE analize. U ovoj analizi je pokazano da se uzorci divljih svinja iz Rumunije i Slovačke grupišu sa klasterom Kontinentalni Balkan (Srbija, Hrvatska, Slovenija i deo Bosne), dok uzorci iz Češke i Nemačke čine nezavistan genetički klaster. Za razliku od STRUCTURE analize, TESS analiza nije pokazala grupisanje uzoraka iz Centralne Evrope sa uzorcima sa Iberijskog i Apeninskog poluostrva. Moguće objašnjenje za ovakav rezultat je to što u TESS programu pored informacija o genotipovima jedinki, algoritam uzima u obzir i geografske koordinate izlova jedinki, te se uzorci sa geografski udaljenih područja nisu grupisali zajedno.

Pored programa koji koriste Bajesovu statistiku za procenu genetičke strukture određene vrste, u ovom istraživanju urađene su i faktorske analize (FCA - Factorial Correspondence Analysis) u programu Genetix. Faktorske analize iako su veoma jednostavne daju dobre rezultate, jer one obezbeđuju maksimalnu količinu informacija o genetičkim odnosima između jedinki unutar i između populacija koristeći n-

dimenzionalni prostor. U prvoj analizi su genotipovi svih 664 analiziranih jedinki predstavljeni u 3D koordinatnom sistemu (Sl. 18), gde su tri faktora opisala 100% prisutne varijabilnosti. Rezultati ove faktorske analize su se poklapali sa rezultatima prve STRUCTURE analize, odnosno tri poluostrva Evrope su prikazani kao tri oblaka, dok su se uzorci iz Centralne Evrope nalazili između njih. Ono što je interesantno uočiti na ovom FCA dijagramu je da je Italija predstavljena najdužim oblakom, što ukazuje na činjenicu da u Italiji postoji najveći genetički diverzitet. Postojanje visokog genetičkog diverziteta u populacijama divlje svinje u Italiji je i ranije pokazano analizom mikrosatelita i mtDNK (Scandura i sar., 2008).

S obzirom da su STRUCTURE i faktorske analize, koje samo na osnovu informacije o genotipovima individua određuju genetičku strukturu populacija, pokazale jak signal podele svih uzoraka iz Evrope u tri genetička klastera koja odgovaraju južnim poluostrvima Evrope, Geneland i TESS analize, koje pored informacije o genotipovima uzimaju u obzir i geografske koordinate, su urađene za svako poluostrvo posebno.

Ukoliko posmatramo Balkansko poluostrvo, hijerarhijska STRUCTURE analiza je pokazala postojanje 4 genetička klastera: Primorski Balkan (Crna Gora, Hercegovina i deo uzoraka iz Bosne), Kontinentalni Balkan (Srbija, Hrvatska, Slovenija i deo uzoraka iz Bosne), Slovenija Primorje i Makedonija. U Geneland analizi je takođe otkriveno 4 klastera na Balkanu, koji su odgovarali klasterima definisanim na osnovu STRUCTURE analize, sa izuzetkom da su uzorci iz Južne Srbije grupisani zajedno sa uzorcima iz Makedonije. TESS analiza uzoraka sa Balkana je potvrdila prisustvo četiri genetička klastera, koji su odgovarali klasterima definisanim u STRUCTURE i u velikoj meri Geneland analizi, s tim što TESS i STRUCTURE nisu pokazali da se uzorci iz Južne Srbije jasno grupišu sa Makedonijom. Obe analize su pokazale da se u Južnoj Srbiji nalaze mešani genotipovi između Makedonije i klastera Kontinentalni Balkan. Faktorska analiza jedinki sa Balkana je pokazala podelu na zapadni, primorski klaster i istočni, kontinentalni, gde su jedinke divlje svinje iz Bosne podeljene u oba klastera, što je u skladu i sa geografskim položajem Bosne i rezultatima STRUCTURE analize. Takođe se uočava da se jedinke iz Makedonije odvajaju od kontinentalnog klastera, a jedinke iz primorskog dela Slovenije od primorskog klastera. Na FCA dijagramu uzoraka sa

Balkana može se uočiti prisustvo visokog genetičkog diverziteta kod jedinki iz primorskog dela Slovenije (Sl. 19). Poznato je da se u ovom delu Slovenije javljaju jedinke koje su fenotipski drugačije od divljih svinja koje srećemo u drugim delovima zemlje i na Balkanu uopšte. One su poznate kao „male“ divlje svinje, odnosno karakteriše ih mala telesna masa tokom čitavog životnog veka. Pored toga, utvrđeno je da one ranije postaju polno aktivne u odnosu na jedinke koje se javljaju u drugim delovima poluostrva. Smatra se da su ove „male“ divlje svinje naselile Sloveniju iz Italije, tako da je visok genetički diverzitet uočena u ovoj subpopulaciji u skladu sa visokim diverzitetom divljih svinja Italije. STRUCTURE i faktorske analize su pokazale da je osnovna podela populacija divlje svinje na Balkanu na istočni, kontinentalni, i zapadni, primorski, klaster. Slična genetička diferencijacija na Balkanu na istočne i zapadne subpopulacije je nedavno opisana u populacijama vuka na osnovu analize sekvenci CR1-mtDNK (Djan i sar., 2014). S obzirom da divlja svinja predstavlja jednu od najvažnijih lovnih divljači na Balkanu, malo je verovatno da je genetička diferencijacija na istočnu, kontinentalnu, i zapadnu, primorsku, subpopulaciju uzrokovana različitim lovnim pritiscima ili drugim antropogenim faktorima. Kako su populacije divlje svinje u Evropi početkom XX-og veka doživele lokalna istrebljenja, a u toku poslednjih četrdeset godina zapaža se trend naglog povećanja gustine populacija, različita demografska istorija istočnih i zapadnih subpopulacija bi mogla da objasni ovakvu podelu, što je i pokazano u populacijama vuka na Balkanu (Djan i sar., 2014). Populaciono genetičke studije divlje svinje u Bugarskoj su pokazale struktuiranost populacije i postojanje dva genetička klastera, severni i južni (Nikolov i sar., 2009) i opisano je da se odustvo kontinuiranih šumskih kompleksa i autoput smatraju barijerom za protok gena između subpopulacija. Pored toga, autori ukazuju na činjenicu da uočena struktuiranost može biti posledica adaptacije jedinki na različite ekološke uslove. S obzirom da su ranija istraživanja populacija divlje svinje pokazala da velike reke kao geografska barijera ne mogu u potpunosti objasniti struktuiranost populacija (Ferreira i sar., 2009; Veličković i sar., 2012), malo je verovatno da reke Drina i Sava predstavljaju barijeru u protoku gena između subpopulacija Kontinentalni i Primorski Balkan. Sa druge strane, adaptacija jedinki na

različite ekološke uslove može biti jedno od objašnjenja uočene struktuiranosti divlje svinje na Balkanu.

Pored programa koji određuju strukturu populacija, u ovom istraživanju je urađena analiza u kojoj su poređeni parovi geografski bliskih populacija koje su prethodno definisane kako bi se utvrdilo postojanje migranata i hibrida između njih. Hibridizacija između genetički diferenciranih populacija može imati pozitivne efekte u slučaju da kod hibrida dolazi do povećanja genetičke varijabilnosti (Frankham, 2002). Sa druge strane, ovakve hibridizacije mogu imati negativne efekte na vrstu zbog toga što se lokalna adaptacija hibrida razlikuje od parentalne ili se zbog hibridizacije može izgubiti integritet jedne lokalno adaptirane grupe (Rhymer i Simberloff, 1996; Allendorf i sar., 2001). Negativni efekti se još više povećavaju u slučaju hibridizacije sa domaćim srodnicima (Lynch i O'Hely, 2001). Zbog toga je analiza genetičke varijabilnosti i prisustva hibridizacije u prirodnim populacijama divljači neophodna za razvoj adekvatnih strategija upravljanja vrstom (Allendorf i sar., 2001). Za ovu analizu korišćen je program NEWHYBRIDS koji na osnovu Bajesovog algoritma i Mendelovih pravila o nasleđivanju određuje pripadnost svake individue nekoj od parentalnih grupa ili hibridnoj klasi. Kako je ovo istraživanje rađeno na jednoj vrsti i korišćeno je 11 mikrosatelitskih lokusa, u analizi su posmatrane samo P1 i P2 roditeljske klase i F1 hibridi.

U poređenju subpopulacija Kontinentalni Balkan i Južni Balkan utvrđeno je 6 migranata iz subpopulacije Kontinentalni Balkan u Južni Balkan, 3 F1 hibrida u subpopulaciji Kontinentalni Balkan i u obe subpopulacije je bilo po 10 jedinki čije poreklo nije bilo moguće tačno utvrditi. Poređenjem subpopulacija Kontinentalni Balkan i Makedonija, u uzorcima iz Makedonije nađeno je samo 5 jedinki koje su pripadale P2 roditeljskoj klasi, 4 migranta iz subpopulacije Kontinentalni Balkan, a ostale jedinke su bile ili F1 hibridi ili poreklo nije bilo moguće tačno definisati. Ovakav rezultat ukazuje na činjenicu da ne postoji potpuna i jasna diferencijacija između ove dve subpopulacije, što je pokazano i parametrom  $F_{ST}$  koji je između ove dve subpopulacije iznosio 0,032. Analiza između subpopulacija Kontinentalni Balkan i Slovenija Primorje je pokazala postojanje po jednog hibrida i po jedne individue čije poreklo nije moguće tačno utvrditi u obe subpopulacije, i dva F1 hibrida u subpopulaciji Slovenija Primorje. U poređenju



subpopulacija Južni Balkan i Makedonija pronađen je jedan migrant iz Makedonije u Južnom Balkanu i dva migranta iz Južnog Balkana u Makedoniji, 3 F1 hibrida u subpopulaciji Makedonija, dok za 8 jedinki iz Makedonije i 4 iz subpopulacije Južni Balkan poreklo nije bilo moguće jasno utvrditi. Analizom subpopulacija Južni Balkan i Slovenija Primorje nađen je jedan migrant iz Južnog Balkana u subpopulaciji Slovenija Primorje i dve jedinke čije poreklo nije bilo moguće jasno utvrditi. Poređenjem subpopulacija Slovenija Primorje i Makedonija pronađen je samo jedan F1 hibrid u subpopulaciji Slovenija Primorje. Iz NEWHYBRIDS analize između svih parova subpopulacija na Balkanu se može zaključiti da se jedino individue iz primorskog dela Slovenije jasno razlikuju, dok između svih ostalih subpopulacija postoji mešanje. Ovakav rezultat je pokazan i na osnovu  $F_{ST}$  vrednosti, gde subpopulacija Slovenija Primorje u odnosu na ostale tri subpopulacije na Balkanu pokazuje srednji nivo genetičke diferencijacije ( $F_{ST}$  između 0,105 - 0,137), dok je između ostalih subpopulacija na Balkanu pokazan mali stepen genetičke divergencije ( $F_{ST}$  između 0,032-0,043).

Kod uzoraka sa Iberijskog poluostrva hijerarhijska STRUCTURE analiza je otkrila prisustvo tri genetička klastera: Portugalija Jug, Iberija Sever i Iberija Centar. U Geneland analizi je otkriven jedan klaster više u odnosu na STRUCTURE, ali ako se detaljno pogleda samo klaster Severna Iberija je bio isti u obe analize. Sa klasterom Portugalija Jug su grupisani i uzorci iz Almerije (Španija), dok je klaster Centralna Iberija bio podeljen na dva. TESS analiza uzoraka sa Iberijskog poluostrva je pokazala prisustvo četiri klastera i klinalnu distribuciju subpopulacija divljih svinja od jugo-zapada ka severu poluostrva (Sl. 15). Klasteri Portugalija Jug i Iberija Sever su odgovarali klasterima definisanim u STRUCTURE analizi, dok je klaster Iberija Centar bio podeljen na dva: (1) Portugalija Centar i Španija Jug, (2) Španija Centar i Zapad. Faktorskom analizom uzoraka sa Iberijskog poluostrva je pokazano da se klasteri Portugalija Jug i Španija Centar i Zapad jasno izdvajaju. Ranije analize populacija divljih svinja iz Portugalijske otkrile su postojanje tri genetička klastera: Severni, Centralni i Južni, gde je pokazano da se jedino Južni klaster jasno izdvaja dok je između Severnog i Centralnog bilo mešanja uzoraka (Ferreira i sar., 2009). Na Slici 20. se jasno vidi da postoji

kontaktna zona između klastera Severna Iberija i Portugalija Centar i Španija Jug što je u skladu sa rezultatima Ferreira i sar., 2009.

NEWHYBRIDS analiza jedinki iz Iberije urađena je između svih parova subpopulacija koje su definisane na osnovu TESS i Geneland analize. U poređenju subpopulacija Iberija Sever i Portugalija Jug pronađen je jedan migrant iz Iberije Sever u subpopulaciju Portugalija Jug. Poređenjem subpopulacija Iberija Sever i Španija Centar i Zapad takođe je utvrđen jedan migrant iz Iberije Sever i jedan F1 hibrid u subpopulaciji Španija Centar i Zapad. Poređenjem jedinki subpopulacija Iberija Sever i Portugalija Centar i Španija Jug, pokazan je veliki broj migranata iz centralnog dela Portugalije kod uzoraka sa severa Portugalije. Ovakav rezultat je pokazan i ranije u analizi 6 mikrosatelitskih lokusa kod divljih svinja iz Portugalije (Ferreira i sar., 2009). Rezultati NEWHYBRIDS analize su u jasnoj korelaciji sa vrednostima parametra  $F_{ST}$ , s obzirom da je između subpopulacija Iberija Sever i Portugalija Jug, kao i Iberija Sever i Španija Centar i Zapad utvrđen srednji nivo genetičke diferencijacije (0,135 i 0,055), dok je između subpopulacija Iberija Sever i Portugalija Centar i Španija Jug nađen nizak nivo genetičke divergencije (0,046) što je u skladu sa većim brojem migranata utvrđenim između ove dve subpopulacije. Analizom subpopulacija Portugalija Jug i Španija Centar i Zapad utvrđen je po jedan migrant u obe subpopulacije, dok je poređenjem Portugalije Jug sa subpopulacijom Portugalija Centar i Španija Jug utvrđen jedan migrant u subpopulaciji Portugalija Centar i Španija Jug i dva migranta i dva F1 hibrida u subpopulaciji Portugalija Jug. Poređenjima istih parova subpopulacija na osnovu parametra genetičke udaljenosti ( $F_{ST}$ ) uočen je srednji nivo genetičke diferencijacije (0,117 i 0,089). U NEWHYBRIDS analizi između subpopulacija Španija Centar i Zapad i Portugalija Centar i Španija Jug većina jedinki je pripadalo jednoj parentalnoj klasi, a samo nekoliko jedinki iz obe subpopulacije je pokazalo pripadnost drugoj parentalnoj klasi. Na osnovu parametra  $F_{ST}$  je takođe pokazan nizak nivo genetičke divergencije između ove dve subpopulacije (0,033).

STRUCTURE analiza uzoraka divlje svinje iz Italije je pokazala postojanje tri genetička klastera: Castel Porziano, Cuneo i Savona, i La Mandria i Lanzo. U Geneland analizi uzoraka iz Italije je pokazano prisustvo jednog klastera više u odnosu na

STRUCTURE, a to je da su Lanzo i La Mandria dva nezavisna klastera (Sl. 12). Rezultati TESS analize kod uzoraka iz Italije su se u potpunosti poklapali sa rezultatima STRUCTURE analize. Faktorska analiza uzoraka iz Italije je pokazala prisustvo visokog genetičkog diverziteta u ovom regionu Evrope. Takođe je pokazano da se jedinke izlovljene u parku prirode "Castel Porziano" značajno razlikuju od jedinki sa Severa Italije i da su one genetički udaljene. Ovakav rezultat je pokazan i na osnovu  $F_{ST}$  vrednosti, gde subpopulacija Castel Porziano u odnosu na ostale subpopulacije iz Italije, kao i u odnosu na ostale subpopulacije u Evropi, pokazuje visok nivo genetičke diferencijacije ( $F_{ST}$  između 0,174 - 0,284). Ranije studije u populacijama divlje svinje iz Italije su pokazale da jedinke sa lokaliteta Castel Porziano poseduju haplotipove Evropske E2 haplogrupe (Scandura i sar., 2008), za koje je pokazano da predstavljaju ostatak preglacijalnog diverziteta u Italiji. U subpopulacijama sa Severa Italije je pokazano da jedinke Cuneo i Savona čine jedan genetički klaster, dok je za jedinke sa lokaliteta Lanzo i La Mandria pokazano da se razlikuju, ali da postoji zona kontakta između njih. NEWHYBRIDS analiza je pokazala da su Lanzo i La Mandria dve odvojene subpopulacije, pri čemu se u populaciji Lanzo uočava veći broj migranata i F1 hibrida (Sl. 25). Na osnovu  $F_{ST}$  vrednosti uočen je nizak nivo genetičke diferencijacije između ove dve subpopulacije (0,039). Između subpopulacija La Mandria i Cuneo i Savona je pokazan jedan migrant iz subpopulacije Cuneo i Savona u La Mandria subpopulaciji, dok za veći broj jedinki iz subpopulacije La Madria poreklo nije bilo moguće tačno definisati. Na osnovu parametra genetičke udaljenosti ( $F_{ST}$ ) između ove dve populacije postoji srednji nivo genetičke divergencije (0,063). Poređenjem jedinki subpopulacija Lanzo i Cuneo i Savona, pronađeno je 5 migranata iz subpopulacije Cuneo i Savona u subpopulaciji Lanzo i 8 jedinki u Lanzo subpopulaciji čije poreklo nije bilo moguće tačno utvrditi. I u ovom slučaju su rezultati NEWHYBRIDS analize bili u skladu sa rezultatima parametra  $F_{ST}$ , s obzirom da je između subpopulacija Lanzo i Cuneo i Savona pokazan nizak nivo genetičke diferencijacije (0,049). Istorijski podaci ukazuju na to da su divlje svinje u Italiji bile istrebljene u toku XIX-og i početkom XX-og veka i da su 1920ih godina divlje svinje iz Francuske učestvovala u kolonizaciji severo-zapadne Italije (Vernesi i sar., 2003) odakle su uzorci analizirani u ovom radu. S obzirom na ovakve

istorijske podatke očekivan je veći broj hibrida i jedinki za koje nije moguće tačno odrediti poreklo kod uzoraka iz Severne Italije.

U prvoj STRUCTURE analizi pokazano je da se uzorci iz Centralne Evrope grupišu sa sva tri južna poluostrva Evrope, gde je u kasnijim analizama izdvojeno 72 uzorka kao zaseban genetički klaster Centralna Evropa, dok je 5 uzoraka grupisano sa klasterom Primorski Balkan, 11 sa klasterom Kontinentalni Balkan i 5 sa klasterom Lanzo i La Mandria. U Geneland analizi svih uzoraka iz Centralne Evrope nije otkrivena struktuiranost populacija. U TESS analizi samo uzoraka iz Centralne Evrope utvrđeno je  $K_{max}=2$  gde su uzorci iz Češke i Nemačke jasno odvojeni, dok se uzorci iz Slovačke i Rumunije razlikuju, ali nisu jasno definisani kao genetički klaster (Sl. 17). S obzirom da su prethodne analize svih uzoraka pokazale da su divlje svinje iz Rumunije i Slovačke najbliže uzorcima sa Balkana, najverovatnije je to posledica zašto je TESS analiza uzoraka iz Centralne Evrope pokazala  $K_{max}=2$ . Faktorska analiza jedinki iz Centralne Evrope je pokazala da su Češka i Nemačka jedan genetički klaster, dok se uzorci iz Slovačke i Rumunije izdvajaju kao posebni klasteri. Ovakav rezultat je u skladu i sa prethodnim analizama korišćenjem Bajesove statistike, gde je pokazano da se uzorci iz Rumunije i Slovačke razlikuju od Češke i Nemačke iako nisu jasno definisani kao genetički klasteri. Objasnjenje zašto se u programima koji koriste Bajesov algoritam za procenu struktuiranosti populacije Rumunija i Slovačka nisu jasno izdvojile kao genetički klasteri može biti mali broj uzoraka sakupljen i analiziran na ovom području.

### **7.1.2. Prolazak subpopulacija divlje svinje u Evropi kroz usko grlo**

Svaka od 13 definisanih subpopulacija je testirana da li je prošla kroz usko grlo primenom dva različita testa, *Sign* i *Wilcoxon*, i tri modela mutacija: IAM, TPM i SMM. *Sign* test nije pokazao statistički značajno povećanje heterozigotnosti u poređenju sa ravnotežnom vrednošću ovog parametra na osnovu uočenog broja alela ni za jedan od ispitivanih modela mutacije. *Wilcoxon* test takođe nije pokazao statistički značajno povećanje heterozigotnosti koje je karakteristično za populacije koje su prošle kroz usko grlo za TPM i SMM modele mutacije, dok je za IAM model utvrđeno statistički značajno

povećanje heterozigotnosti kod 6 od 13 analiziranih subpopulacija. S obzirom da mikrosateliti pre prate SMM i TPM model mutacije, nego IAM (Schriver i sar., 1993; Valdes i sar., 1993), onda možemo reći da nijedna od 13 analiziranih subpopulacija divljih svinja u Evropi ne pokazuje genetički signal prolaska kroz usko grlo. Ovakav rezultat je dobijen u analizi 3 populacije iz Italije i jedne populacije iz Mađarske primenom 10 mikrosatelita (Vernesi i sar., 2003), u analizi većeg broja populacija iz Italije, i po jedne populacije iz Francuske, Austrije, Mađarske, Poljske i Španije (Scandura i sar., 2008), kao i u analizi divljih svinja Bugarske primenom 9 mikrosatelitskih lokusa (Nikolov i sar., 2009). Iako je ranija analiza divljih svinja iz Portugalije pokazale da postoji genetički signal prolaska ovih populacija kroz usko grlo (Ferreira i sar., 2009), u ovom istraživanju gde je primenjen veći broj lokusa i veći broj jedinki analizirano nije nađen signal genetičkog drifta u populacijama divljih svinja sa Iberijskog poluostrva. Sa druge strane, oba testa (*Sign* i *Wilcoxon*) su pokazali statistički značajan deficit heterozigota kod 6 od 13 subpopulacija, što se može povezati sa demografskom ekspanzijom populacija (Maruyama i Fuerst, 1984). Efekat genetičkog drifta se smanjuje u populaciji koja je u ekspanziji (Slatkin, 1994), jer je relativna frekvencija retkih alela koji nisu uklonjeni driftom, ali učestvuju u proceni heterozigotnosti, veća nego što se to očekuje u stabilnoj populaciji. Cornuet i Luicart (1996) nisu detaljno analizirali efekte ekspanzije populacije na odnos uočene i ravnotežne heterozigotnosti. Međutim, u nekim simulacijama ovi autori su pokazali da skora ekspanzija populacije može da dovede do deficita heterozigotnosti. Ovakav rezultat, u kombinaciji sa činjenicom da je generacijsko vreme divljih svinja veoma kratko (oko jedne godine; Mauget i Pepin, 1991), ukazuje na činjenicu da uočeno smanjenje heterozigotnosti može biti posledica nagle demografske ekspanzije u poslednjih pedeset godina (Vernesi i sar., 2003).

Iz prethodnog se može zaključiti da postoji struktuiranost populacija divlje svinje u Evropi, i da je protok gena između definisanih subpopulacija relativno mali s obzirom da je u poređenjima parova subpopulacija otkriven mali broj migranata i hibrida između njih i da je koeficijent genetičke udaljenosti ( $F_{ST}$ ) pokazao srednji i visok stepen genetičke diferencijacije za većinu parova subpopulacija.

### 7.1.3. Genetička varijabilnost i diferencijacija subpopulacija divlje svinje u Evropi

U analizi 11 tetranukleotidnih mikrosatelitskih lokusa u ispitivanom uzorku od 664 divlje svinje sa područja Evrope otkriveno je ukupno 207 različitih alela, sa prosekom 18,8 alela po lokusu. Nađeno je ukupno 42 nova alela u odnosu na objavljene alele kod domaćih rasa svinja od strane proizvođača kompleta hemikalija *Biotype Animal Pig Kit* (Biotype, Dresden, Nemačka) koji je korišćen u ovom istraživanju. Novi aleli su pronađeni u 10 od 11 analiziranih lokusa, dok je u lokusu SBH18 nađen jedan alel manje u odnosu na referentni set. U poređenju sa ranijom analizom populacija divljih svinja iz Italije primenom istog seta hemikalija (Caratti i sar., 2010), u ovom istraživanju je pronađeno ukupno 68 novih alela, odnosno od 1-10 novih alela po lokusu. Najveći broj alela pronađen je u lokusu SBH20, što je u skladu sa referentnim setom i rezultatima Caratti i sar. (2010). Najveći broj alela po lokusu uočen je u subpopulaciji Kontinentalni Balkan ( $N_A=13,5$ ), dok je najmanji broj alela pronađen u subpopulaciji Castel Porziano ( $N_A=4$ ). Pored visokog broja alela u subpopulaciji Kontinentalni Balkan je takođe uočeno najviše jedinstvenih alela (Tab. 8). Visok genetički diverzitet u smislu broja alela po lokusu na ovom delu Balkana je i ranije uočen u analizi manjeg broja mikrosatelitskih markera (4) i na manjem geografskom području (Vojvodina, Slavonija i Bosna),  $N_A=19$  (Veličković i sar., 2012). U analizi uzoraka iz parka prirode "Castel Porziano" primenom 9 mikrosatelitskih lokusa Vernesi i sar. (2003) su pronašli nešto veći broj alela po lokusu ( $N_A=7,1$ ) nego što je pronađeno u ovoj studiji na istom lokalitetu. Analizom većeg broja populacija divljesvinje iz Italije, zajedno sa po jednom populacijom iz Francuske, Austrije, Mađarske, Poljske i Španije, primenom 10 mikrosatelitskih lokusa otkriven je manji broj alela po lokusu u poređenju sa ovim istraživanjem (Scandura i sar., 2008). U analizi tri populacije divlje svinje iz Italije zajedno sa jednom populacijom iz Mađarske, Vernesi i sar. (2003) su takođe pronašli manji broj alela po lokusu (ukupno 109 alela,  $N_A=12,11$ ). Kod divljih svinja iz Portugalije (Ferreira i sar., 2009) prosečan broj alela po lokusu iznosio je  $N_A=10,2$ , što je bilo manje nego što je uočeno u ovom istraživanju u analizi uzoraka sa Iberijskog poluostrva ( $N_A=11,5$ ). Mikrosatelitska analiza uzoraka divljih svinja iz Bugarske (Nikolov i sar., 2009) otkrila je manji broj alela po lokusu u

poređenju sa ovim istraživanjem ( $N_A=6,7$ ). Isti autori su kod divljih svinja iz Nemačke otkrili još manji broj alela po lokusu ( $N_A=4,6$ ). Mogući razlozi za odstupanje u broju alela između ove studije i prethodno objavljenih rezultata je to što je u svim prethodnim analizama korišćeno od 6 do najviše 10 dinukleotidnih mikrosatelitskih markera. U ovoj studiji je analizirano 11 tetranukleotidnih markera što odgovara analizi 15 dinukleotidnih mikrosatelita, što je u skladu sa većom rezolucijom dobijenom u ovom istraživanju.

Ukoliko se posmatra prosečna uočena heterozigotnost kao parametar genetičke varijabilnosti, ona je bila najveća u subpopulaciji Primorski Balkan ( $H_o=0,74$ ), a najmanja u subpopulaciji Castel Porziano ( $H_o=0,44$ ). Visoke vrednosti ovog parametra su takođe uočene kod divljih svinja iz subpopulacija Kontinentalni Balkan, Makedonija, Cuneo i Savona, La Mandria, Iberija Sever, i Španija Centar i Zapad (0,70-0,73). Slične vrednosti heterozigotnosti su ranije uočene kod divljih svinja iz Italije i Mađarske (Vernesi i sar., 2003). Vernesi i sar. (2003) su takođe otkrili veću uočenu heterozigotnost kod uzoraka iz parka prirode Castel Porziano ( $H_o=0,66$ ). Prosečna uočena heterozigotnost u ovom istraživanju je bila veća u poređenju sa populacijama divljih svinja Bugarske ( $H_o=0,62$ ; Nikolov i sar., 2009), Portugalije ( $H_o=0,63$ ; Ferreira i sar., 2009), i Italije ( $H_o=0,65$ ; Scandura i sar., 2008).

U analizi svih 664 uzoraka zajedno pokazano je statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinberg-ovog ekvilibrijuma za sve lokuse, kao i statistički značajna vezanost za 54 od mogućih 55 parova lokusa. Statistički značajno odstupanje od HWE ukazuje na struktuiranost populacija (Hartl i Clark, 2007), što je u ovom istraživanju i pokazano. Pored toga, statistički značajna vezanost između lokusa za koje se zna da nisu vezani takođe može ukazivati na postojanje struktuiranosti populacija (Nei i Li, 1972). Nakon podele uzorka na 13 subpopulacija broj lokusa koji odstupaju od HWE je smanjen, ali su i dalje u svakoj subpopulaciji izuzev subpopulacije Castel Porziano nađeni lokusi u kojima je postojalo odstupanje od HWE. U dvanaest subpopulacija je nađen mali broj parova lokusa koji pokazuju statistički značajnu vezanost na nivou signifikantnosti  $p<0,05$  (odnosno  $p<0,005$  nakon Boniferonijeve korekcije), 1-5 parova lokusa od mogućih 55 kombinacija. Nešto veći broj lokusa koji su pokazali statistički značajnu

vezanost uočen je u subpopulaciji La Mandria (13 parova od mogućih 55 kombinacija). U ovoj subpopulaciji je takođe uočen najveći broj lokusa koji su pokazali odstupanje od HWE (6 od 11 lokusa). Ovakav rezultat je očekivan s obzirom da je STRUCTURE analiza pokazala udeo genetičkog klastera Cuneo i Savona u uzorcima sa lokaliteta La Mandria (Sl. 8), a takođe pri poređenju ove dve subpopulacije u NEWHYBRIDS analizi kod većeg broj uzoraka poreklo nije bilo moguće tačno utvrditi (Sl. 25).

Analizom molekularne varijanse pokazano je da je signifikantno veći procenat genetičke varijabilnosti unutar subpopulacija, nego između njih. Slične vrednosti intra- i interpopulacione genetičke varijabilnosti otkrivene su u analizi divljih svinja Bugarske (Nikolov i sar., 2009). Na osnovu  $F_{ST}$  parametra genetičke diferencijacije za većinu parova subpopulacija pokazan je srednji i visok nivo genetičke divergencije. Od ukupno 78 mogućih kombinacija, samo 12 parova subpopulacija je pokazalo nisku genetičku diferencijaciju. U analizi populacija divljih svinja Portugalije takođe su  $F_{ST}$  vrednosti ukazivale na srednju i visoku genetičku diferencijaciju između parova populacija (Ferreira i sar., 2009). Slične rezultate su pokazali Vernesi i sar. (2009) kod divljih svinja iz Italije i Mađarske. Nikolov i sar. (2009) su pokazali srednji nivo genetičke divergencije kod divljih svinja iz Bugarske i visoku divergenciju kod divljih svinja iz Nemačke. Prosečne vrednosti koeficijenta inbreedinga su se kretale od 0,0421 za subpopulaciju Castel Porziano do 0,2072 za subpopulaciju Španija Centar i Zapad. Pozitivne vrednosti ovog parametra ukazuju na postojanje inbreedinga u ispitivanom uzorku.

Za vizuelizaciju genetičkih odnosa između definisanih subpopulacija konstruisani su UPGMA dendogrami na osnovu Nei-jeve  $D_a$  distance i  $F_{ST}$  vrednosti, pri čemu je pokazano da se subpopulacije Slovenija Primorje i Castel Porziano odvajaju od ostalih sa visokom bootstrap vrednošću. Ovakav rezultat se može objasniti činjenicom da se u primorskom delu Slovenije javljaju divlje svinje koje su fenotipski razlikuju od divljih svinja koje srećemo u Evropi, jer ih karakteriše mala telesna masa tokom čitavog životnog ciklusa i rano stupanje u reproduktivne odnose. Kod divljih svinja iz parka prirode "Castel Porziano" je ranije pokazano da one poseduju Evropsku E2 mitohondrijalnu liniju za koju se smatra da predstavlja ostatak preglacijalnog diverziteta (Larson i sar., 2007; Scandura i sar., 2008). Subpopulacija Portugalija Jug se takođe



izdvaja od ostalih subpopulacija, što je u skladu sa rezultatima dobijenim u analizi strukture populacija u ovoj studiji, jer je se u svim pristupima ova subpopulacija izdvajala kao zaseban genetički klaster.

Na osnovu svega navedenog može se potvrditi postojanje struktuiranosti populacija divlje svinje u Evropi gde je većinom prisutan srednji i visok nivo genetičke divergencije između definisanih subpopulacija. Na osnovu analize 11 tetranukleotidnih mikrosatelita utvrđen je visok nivo genetičkog diverziteta u populacijama divlje svinje Evrope, što ukazuje na činjenicu da populacije ove vrste poseduju visok genetički potencijal, s obzirom da je za velike kontinuirano rasprostranjene populacije sisara karakterističan srednji nivo genetičke varijabilnosti. Subpopulacija Kontinentalni Balkan je pokazala najveći nivo genetičke varijabilnosti s obzirom da je najveći broj alela i najviša heterozigotnost uočena u ovoj subpopulaciji, a takođe je u njoj pronađen najveći broj jedinstvenih alela (9). Ovaj rezultat je u skladu sa prethodnim studijama u kojima je pokazano da Balkan predstavlja centar biodiverziteta. Sa druge strane se uočava da je u subpopulacijama Castel Porziano, Slovenija Primorje i Portugalija Jug prisutan niži stepen genetičke varijabilnosti u poređenju sa ostalim subpopulacijama, a moguće objašnjenje za ovakav rezultat je da su ove subpopulacije izolovane, što je i pokazano na osnovu  $F_{ST}$  parametra i pri konstruisanju UPGMA dendograma.

## **7.2. Genetički diverzitet i struktura populacija divlje svinje na Balkanu na osnovu analize mtDNK**

Analiza sekvenci kontrolnog regiona mitohondrijanog genoma je često korišćen marker u populaciono genetičkim i filogenetičkim studijama različitih vrsta divljači, kao što su zec (Stamatis i sar., 2009), mrki medved (Davison i sar., 2011), srndać (Randi i sar., 2004), jelen (Zachos i Hartl, 2011), vuk (Pilot i sar., 2010; Djan i sar., 2014) i divlja svinja (Scandura i sar., 2008; Alves i sar., 2010; Alexandri i sar., 2012). U ovom istraživanju na osnovu analize sekvenci CR1-mtDNK utvrđen je visok stepen genetičke varijabilnosti kod divljih svinja na Balkanu ( $h=0,872$ ). Slične vrednosti diverziteta

haplotipova nađene su kod divljih svinja u Italiji ( $h=0,866$ ; Scandura i sar., 2008) i Centralnoj Evropi ( $h=0,89$ ; Alves i sar., 2010). U populacijama divljih svinja sa Iberijskog poluostrva nađen je nešto viši genetički diverzitet ( $h=0,92$ ; Alves i sar., 2010). Jedna od pretpostavki teorije da su južna poluostrva Evrope predstavljala refugijume tokom poslednje glacijacije (Hewitt, 1999, 2000) je da se nivo genetičkog diverziteta smanjuje od juga ka severu svakog od poluostrva. Ukoliko posmatramo diverzitet haplotipova kao meru genetičke varijabilnosti ova pretpostavka ne važi za populacije divlje svinje s obzirom da su u analizi divljih svinja sa južnih poluostrva Evrope i onih iz Centralne Evrope uočene slične vrednosti diverziteta haplotipova. Međutim, ukoliko se posmatra ukupan broj haplotipova i broj jedinstvenih haplotipova, obe vrednosti su veće kod divljih svinja sa južnih poluostrva Evrope u odnosu na divlje svinje Centralne Evrope. Ukupan broj haplotipova otkriven kod 351 jedinke sa Balkana iznosio je 58, od čega je 49 bilo jedinstveno za Balkansko poluostrvo. Analizom 266 jedinki sa Iberijskog poluostrva otkriveno je 17 haplotipova, od čega je 11 bilo jedinstvenih. U analizi 119 jedinki iz Italije uočeno je 15 haplotipova u okviru Evropske E1 haplogrupe i 5 u okviru Evropske E2 haplogrupe, od čega je bilo 10 jedinstvenih u okviru E1 haplogrupe, a 5 u okviru E2 haplogrupe. U Centralnoj Evropi nađeno je ukupno 15 haplotipova, a 6 jedinstvenih, u analizi ukupno 93 jedinke.

Iz prethodnog se može zaključiti da na Balkanu postoji visok genetički diverzitet u populacijama divlje svinje koji se prvenstveno ogleda u visokoj frekvenciji jedinstvenih haplotipova nađenih na Balkanu (54,4% od ukupnog broja haplotipova u E1 haplogrupi). Većina jedinstvenih haplotipova je uočena kod uzoraka iz južih delova Balkanskog poluostrva: Grčka (43 haplotipa), južna Srbija (H61), i jugo-istočna Bugarska (H8). Tri jedinstvena haplotipa (H9, H43 i H52) su bili zajednički za južni i centralni deo Balkana, a nađeni su kod uzoraka iz Centralne Srbije, Bugarske i Grčke, dok je samo jedan jedinstveni haplotip nađen u severnim delovima Balkana, kod jednog uzorka iz Bosne (H58). Pored velikog broja jedinstvenih haplotipova, koji su nađeni pretežno u južnim delovima poluostrva, još jedan interesantan trend se uočava na Balkanu. Većina uzoraka iz severnih i zapadnih delova Balkana je imala jedan od najučestalijih haplotipova u okviru Evropske E1 haplogrupe (H2, H5, H10 i H31). Za ove haplotipove je pored visoke

frekvencije karakteristično da se nalaze u čvorištima MJ *networka* i da su uočeni i kod uzoraka sa drugih poluostrva (Iberija i/ili Italija) i kod uzoraka iz Centralne Evrope. Prisustvo jedinstvenih haplotipova na jugu Balkana, zajedno sa činjenicom da se u severnim i zapadnim delovima poluostrva uočavaju pretežno visoko frekventni haplotipovi koji su zajednički sa divljim svinjama iz drugih delova Evrope, potvrđuje hipotezu o postglacijalnoj rekolonizaciji Centralne Evrope sa Balkana. Rezultati pokazuju da su u rekolonizaciji Evrope učestvovala divlje svinje iz severnih i zapadnih delova Balkana, dok su divlje svinje sa juga poluostrva u nekoj meri ostale izolovane.

S obzirom na činjenicu da je Balkan jedan od predpostavljenih glacijalnih refugijuma za veliki broj biljnih i životinjskih vrsta i kao takav se smatra centrom biodiverziteta u Evropi (Hewitt, 1999; 2000), analizom velikog broja jedinki iz centralnih, zapadnih i severnih delova Balkana koje ranije nisu genetički opisane, očekivano je bilo da se uoči veći genetički diverzitet kod ovih jedinki. U analizi je otkriveno samo šest novih haplotipova (H56-H61) na Balkanu u poređenju sa prethodnom analizom CR1-mtDNK kod divljih svinja iz Grčke (Alexandri i sar., 2012). Od ovih šest haplotipova, samo dva su bila jedinstvena za Balkan (H58, H61). Ukoliko posmatramo samo set sekvenci sa Balkana u kome je dužina analiziranog fragmenta CR1-mtDNK bila veća i iznosila 443bp, nađeno je ukupno 11 novih haplotipova (B2b, B5c, B10a, B43a, B56-B61) u poređenju sa radom Alexandri i sar. (2012). Sprovedena analiza sekvenci CR1-mtDNK kod 351 jedinke sa Balkana pokazala je da jedinke u severnim i zapadnim delovima Balkana imaju manji genetički diverzitet u poređenju sa jedinkama na jugu poluostrva, manji broj jedinstvenih haplotipova i visoku frekvenciju haplotipova koji su nađeni i kod divljih svinja u Centralnoj Evropi, što sve zajedno potvrđuje hipotezu da su u rekolonizaciji Centralne Evrope učestvovala samo divlje svinje iz severnih delova Balkana koje su se nalazile u ekspanzivnom frontu (engl. *leading-edge colonization*).

Prema teoriji da su južna poluostrva Evrope predstavljala refugijume tokom poslednje glacijacije očekivano je bilo da se nađe struktuiranost populacija divlje svinje od juga ka severu poluostrva i u tom smislu su otkrivene dve genetičke grupe: Južni Balkan i Kontinentalni Balkan (Sl. 30 & 31). Ovakva struktuiranost populacija na

Balkanu je potvrđena činjenicom da su različiti haplotipovi otkriveni kod uzoraka iz centralnog dela Grčke i svih ostalih jedinki uzorkovanih severno u odnosu na njih; velikim brojem jedinstvenih haplotipova nađenim kod uzoraka iz centralnog dela Grčke; signifikantno većom interpopulacionom u odnosu na intrapopulacionu varijabilnost; i visokom *a posterior* verovatnoćom (89%) da je grupa Južni Balkan parafiletička u odnosu na grupu Kontinentalni Balkan pri konstruisanju Bajesovog filogenetičkog stabla (Sl. 31).

### **7.3. Demografska istorija divlje svinje u Evropi na osnovu analize mtDNK**

Analiza *mismatch* distribucije kod divljih svinja na Balkanu je pokazala postojanje demografske ekspanzije populacija (Tab. 11). Ekspanzija populacija divljih svinja na Balkanu je takođe potvrđena testovima neutralnosti u kojima su dobijene signifikantno negativne *F<sub>s</sub>* i *D* vrednosti. Osim u celom uzorku sa Balkana, demografska ekspanzija je takođe nađena u obe analizirane grupe. *Mismatch* analiza i testovi neutralnosti su pokazali postojanje demografske ekspanzije za Evropsku E1 haplogrupu (Tab. 11). Pored toga, distribucija haplotipova E1 haplogrupe na MJ *network*-u takođe potvrđuje demografsku ekspanziju populacija. Na osnovu konstruisanja Bajesovog *skyline plot*-a (BSP) i informacije o stopi mutacije kontrolnog regiona mtDNK kod kopitara bilo je moguće odrediti kada je ekspanzija E1 haplogrupe počela. Primenom dve različite stope mutacija (8% i 10%) utvrđeno je da je ekspanzija populacija divlje svinje u Evropi počela pre oko 14000 godina, odnosno na kraju ili odmah nakon poslednjeg ledenog doba (Sl. 33). Svi dobijeni rezultati ukazuju da je demografska ekspanzija divljih svinja u Evropi u skladu sa teorijom da su južna poluostrva Evrope predstavljala refugijume tokom poslednje glacijacije i da su nakon glacijacije divlje svinje ponovo naselile delove Evrope sa kojih su bile potisnute usled prisustva ledenog pokrivača. Analiza *mismatch* distribucije i testovi neutralnosti nisu potvrdili demografsku ekspanziju za Evropsku E2 haplogrupu. Ovakav rezultat sugerše na činjenicu da haplotipovi koji pripadaju E2 haplogrupi predstavljaju preglacijalni diverzitet koji se zadržao na

Apeninskom poluostrvu i da ovi haplotipovi nikada nisu imali priliku da se prošire u Evropi pošto su najverovatnije bili blokirani haplotipovima E1 grupe koji su tokom glacijacije ušli na Apeninsko poluostrvo sa severa i verovatno se širili ka jugu poluostrva. Najverovatniji scenario je da su opet haplotipovi sa severa učestvovali u postglacijalnoj rekolonizaciji Evrope, tako da haplotipovi E2 haplogrupe nikada nisu imali priliku da se šire i zbog toga ne pokazuju signal demografske ekspanzije.

#### **7.4. Uloga Balkana u biogeografiji divlje svinje u Evropi**

Široka rasprostranjenost pojedinih haplotipova CR1-mtDNK divljih svinja može biti posledica demografske ekspanzije i/ili antropogenih faktora kao što su translokacije i reintrodukcije jedinki (Alves i sar., 2010). Pored toga, ovakvi haplotipovi u Evropi se mogu posmatrati kao ostatak nekada široko rasprostranjenog preglacijalnog diverziteta. Rezultati ovog istraživanja pokazuju da je među najfrekventnijim haplotipovima četiri bilo zajedničko za najmanje dva ili sva tri pretpostavljena refugijuma i Centralnu Evropu. To su haplotipovi H2, H5, H10, i H31. Haplotip H57 koji je takođe zastupljen u visokoj frekvenciji je bio zajednički za divlje svinje sa Balkana i Italije. Većina drugih haplotipova blisko vezanih sa ovih pet su bili nađeni kod uzoraka sa jednog od poluostrva i/ili u Centralnoj Evropi. Neki od ovih blisko vezanih haplotipova imali su srednju frekvenciju i bili su zajednički za uzorke iz Centralne Evrope i samo jedno od tri poluostrva. Haplotipovi H56, H60 i H141 su bili zajednički za divlje svinje sa Balkana i Centralne Evrope. Haplotipovi H75 i H86 su nađeni kod divljih svinja sa Iberijskog poluostrva i u Centralnoj Evropi, a haplotip H107 je nađen u Italiji i Centralnoj Evropi. Činjenica da sva tri poluostrva dele haplotipove sa uzorcima iz Centralne Evrope i da su najučestaliji haplotipovi zajednički za jedinke sa najmanje dva od tri poluostrva i jedinke iz Centralne Evrope, zajedno sa otkrićem jedinstvenih haplotipova u svakom od tri pretpostavljena refugijuma, potvrđuje teoriju da su tri južna poluostrva Evrope predstavljala refugijume za divlje svinje tokom poslednjeg ledenog doba.

Analizom distribucije haplotipova otkrivenih kod divljih svinja sa Balkana na MJ *networku* koji je kreiran za set sekvenci divljih svinja iz čitavog sveta potvrđena je

struktuiranost populacija divljih svinja na Balkanu. Pored toga, detaljnom analizom distribucije haplotipova otkrivenih kod divljih svinja sa sva tri poluostrva Evrope uočen je interesantan trend na osnovu čega je formirana nova hipoteza o filogeografskoj istoriji vrste *Sus scrofa*. Na osnovu analize 940 sekvenci CR1-mtDNK kod divljih svinja uzorkovanih širom sveta, zapaženo je da je odnos dve grupe otkrivene na Balkanu, Južni i Kontinentalni Balkan, sličan odnosu E1 i E2 haplogrupe u Italiji. Dakle, može se pretpostaviti da haplotipovi koji pripadaju grupi Južni Balkan predstavljaju preglacijalni diverzitet koji se zadržao na Balkanu, slično kao što E2 haplogrupa predstavlja preglacijalni diverzitet u Italiji. Na oba poluostrva se uočava kontinentalni genofond koji se javlja kod jedinki u severnim delovima poluostrva, i ovi haplotipovi se javljaju i kod divljih svinja u Centralnoj i Istočnoj Evropi, dok se kod jedinki iz južnih delova javljaju haplotipovi koji su jedinstveni za svako poluostrvo. Najverovatnije objašnjenje za ovakvu distribuciju haplotipova u Italiji i na Balkanu je da haplotipovi nađeni na jugu svakog od poluostrva nikada nisu imali priliku da šire svoju distribuciju ka severu, jer su bili potisnuti genofondom jedinki iz Centralne i Istočne Evrope tokom poslednjeg ledenog doba. Sličan trend uočen je i kod divljih svinja na Iberijskom poluostrvu, ali bez jasne geografske distribucije da se na jugu poluostrva uočavaju jedinstveni haplotipovi, a na severu haplotipovi zajednički i za divlje svinje Centralne i Istočne Evrope kao što je to pokazano za Balkan i Italiju. Međutim, i na Iberijskom poluostrvu nađeni su jedinstveni haplotipovi u visokoj frekvenciji (H62, H65, H85). Pored toga, tri široko rasprostranjena haplotipa u Evropi, H5, H10 i H31, su takođe nađeni u visokoj frekvenciji kod uzoraka sa Iberijskog poluostrva, od kojih polaze haplotipovi koji su jedinstveni za Iberijsko poluostrvo (H67, H88, H90) i haplotip H86 koji je nađen i kod divljih svinja u Centralnoj Evropi (Sl. 32).

Posmatrajući sve haplotipove divljih svinja u Evropi može se doći do sledećeg scenarija o demografskoj i filogeografskoj istoriji vrste: (a) tokom poslednje glacijacije divlje svinje iz centralnih i istočnih delova Evrope su bile potisnute u refugijume na jugu, pa su jedinke koje su nekada naseljavale Evropu bile izolovane na Balkanskom, Apeninskom i Iberijskom poluostrvu; (b) došlo je do diverzifikacije na svakom od poluostrva nezavisno, koja se ogledala u stvaranju novih haplotipova mutacijama

haplotipova koji su došli iz Centralne i Istočne Evrope (u nekim slučajevima isti centralno-istočni haplotipovi su se javljali na sva tri poluostrva, npr. H5, H31); (c) i na kraju postglacijalna rekolonizacija Evrope u kojoj su učestvovali haplotipovi koji su bili potisnuti iz Centralne i Istočne Evrope zajedno sa novoobrazovanim haplotipovima. U ovom svetlu, najverovatnije da originalni haplotipovi svakog od poluostrva (oni koji su postojali pre glacijacije) nisu učestvovali u postglacijalnoj rekolonizaciji Centralne i Istočne Evrope. Jedno od mogućih objašnjenja je da su jedinstveni haplotipovi koji su postojali na svakom od poluostrva bili potisnuti ka jugu od strane haplotipova koji su sa severa dolazili u refugijume, pa zbog toga nikada nisu imali priliku za ekspanziju ka Centralnoj i Istočnoj Evropi. Odsustvo haplotipova koji pripadaju grupi Južni Balkan i haplotipova E2 haplogrupe, kao i jedinstvenih visoko frekventnih haplotipova sa Iberijskog poluostrva kod jedinki iz Centralne i Istočne Evrope potvrđuje ovu hipotezu. Ovakav rezultat je u skladu i sa hipotezom da su samo jedinke koje su se nalazile na severu refugijuma, odnosno u kontaktnoj zoni između refugijuma i Centralne Evrope, učestvovali u rekolonizaciji (engl. *leading edge colonization*; Hewitt, 1999). S obzirom da su jedinke iz Centralne i Istočne Evrope naselile refugijume sa severa, očekivano je da su nakon povlačenja leda u Evropi jedinke koje su bile u kontaktnoj zoni (engl. *expansion front*) istim ili sličnim putem rekolonizovale Evropu. S toga je očekivano da su se u kontaktnoj zoni našli originalni haplotipovi iz Centralne i Istočne Evrope zajedno sa haplotipovima koji su stvoreni tokom glacijacije. BSP analiza je potvrdila postglacijalnu ekspanziju za divlje svinje u Evropi s obzirom da je utvrđeno da je demografska ekspanzija E1 haplogrupe počela odmah nakon poslednjeg ledenog doba (pre oko 14000 godina).

## 7.5. Uticaj čoveka na genetički diverzitet divljih svinja u Evropi

Kod divlje svinje, kao i kod drugih pripitomljenih vrsta, je teško u potpunosti razumeti genetički diverzitet i strukturu populacija zbog simpatrije divljih i domaćih formi. Uticaj čoveka je uvek veći nad domaćim nego nad prirodnim populacijama životinja. Prethodne studije koje su se bavile genetičkim analizama u populacijama

divljih svinja (Scandura i sar., 2008; Alves i sar., 2010; Alexandri i sar., 2012) su analizirale uzorke divlje svinje zajedno sa uzorcima domaće svinje. U ovom istraživanju korišćeni su samo uzorci divljih svinja kako u analizi mikrosatelitskih lokusa, tako i u analizi CR1-mtDNK sa ciljem da se dobije jasna slika o genetičkom diverzitetu, strukturi populacija i filogeografskoj istoriji vrste. U ovakvom pristupu, gde nisu korišćeni uzorci domaćih rasa svinja, moguće je pretpostaviti uticaj čoveka na genetičku strukturu u populacijama divlje svinje u Evropi. S obzirom da je u svim analizama strukture populacija bilo jedinki koje su pokazivale pripadnost u više genetičkih klastera i gde u nekim slučajevima nije bilo moguće povući jasnu granicu između genetičke pripadnosti određenom klasteru i informacije o geografskom poreklu jedinki i da je u svim poređenjima parova populacija u NEWHYBRIDS analizi nađen veći ili manji broj migranata, hibrida i jedinki čije poreklo nije bilo moguće definisati dovodi do zaključka da su translokacije i reintrodukcije jedinki tokom poslednjeg veka imale uticaj na genetičku strukturu populacija divljih svinja u Evropi. Pored toga, u analizi sekvenci CR1-mtDNK je pokazano da je od ukupno 832 divlje svinje sa Evropskog kontinenta, 15 pripadalo Azijskoj haplogrupi (H33 - 1 uzorak iz Grčke, H66 - 1 uzorak iz Centralne Evrope i 10 sa Iberijskog poluostrva) i 1 uzorak je pripadao Blisko-Istočnoj haplogrupi (H135 - 1 uzorak iz Italije). Prisustvo Azijskog haplotipa kod uzoraka divljih svinja u Evropi je dokaz hibridizacije između domaće i divlje svinje, s obzirom da se domestikacija svinje dogodila u Aziji (Fang i sar., 2006; Scandura i sar., 2008). Sa druge strane, prisustvo Blisko-Istočnog haplotipa u Italiji je pre posledica translokacija, nego hibridizacije sa domaćom svinjom s obzirom da ranije studije ukazuju na činjenicu da se u Evropskim rasama domaće svinje sreću samo Evropski E1 i Azijski haplotipovi (Giuffra i sar., 2000; Larson i sar., 2005; Scandura i sar., 2008). Takođe se ne može odbaciti činjenica da neki haplotipovi u okviru Evropske E1 haplogrupe koji su zajednički za divlje svinje Centralne i Istočne Evrope i jedno od poluostrva nisu posledica translokacija jedinki ili hibridizacija sa domaćim rasama. Međutim, uočena distribucija haplotipova u Evropi, zajedno sa dokazima o strukturi populacija i demografskoj ekspanziji vrste potvrđuje hipotezu o post-glacijalnoj rekolonizaciji Evrope



sa tri južna poluostrva. Analiza strukture populacija na osnovu mikrosatelita takođe podržava ovu teoriju.

## **7.6. Implikacije za menadžment i konzervaciju divlje svinje u Evropi**

S obzirom na ekspanziju populacija divlje svinje u Evropi u toku poslednjih četrdeset godina, divlja svinja se može posmatrati kao invazivna vrsta čije demografska ekspanzija može direktno nanositi veće štete u poljoprivrednim ekosistemima i povećava se mogućnost hibridizacije divljih i domaćih formi. Sa druge strane, divlja svinja predstavlja jednu od najvažnijih lovnih divljači u Evropi. Stoga je veoma važno razumeti kako dobijeni rezultati mogu biti iskorišćeni za razvoj adekvatnih strategija menadžmenta. Utvrđena struktuiranost populacija i otkriven visok nivo genetičkog diverziteta pruža jedinstvene informacije za razvoj odgovarajućih strategija upravljanja vrstom. Na osnovu rezultata Svetske organizacije za hranu i poljoprivredu (FAO, 1996), cilj menadžmenta prirodnih populacija je očuvanje najvećeg mogućeg nivoa genetičke varijabilnosti jedne vrste. Da bi se očuvala genetička varijabilnost jedne vrste najmanje nekoliko različitih populacija treba definisati kao jedinice menadžmenta (MU - management units; Avise, 1994). S obzirom da su sve subpopulacije izuzev Castel Porziano, Slovenija Primorje i Portugalija Jug, pokazale visok nivo genetičkog diverziteta onda strategije menadžmeta treba usmeriti ka očuvanju ovog nivoa genetičke varijabilnosti. Menadžment populacija treba biti usmeren ka sprečavanju translokacija jedinki iz jedne subpopulacije u drugu, jer je pokazano da u slučaju postojanja migranata i hibrida između dve subpopulacije dolazi do smanjenja divergencije između njih što može dovesti i do smanjenja genetičkog diverziteta. Posebnu pažnju treba posvetiti lokalno izolovanim populacijama Castel Porziano, Slovenija Primorje i Portugalija Jug, jer je u njima uočen dva i tri puta manji broj alela po lokusu u poređenju sa ostalim subpopulacijama, a takođe su uočene znatno manje vrednosti heterozigotnosti. S obzirom da je kod jedinki iz rezervata prirode "Castel Porziano" uočena Evropska E2 haplogrupa, gubitak ove populacije bi značio gubitak jedne divergentne mtDNK linije. Iz svega navedenog se može zaključiti da za svaku definisanu subpopulaciju treba razviti

odgovarajuće strategije menadžmenta u skladu sa njenim genetičkim potencijalom, a u cilju očuvanja evolucionog potencijala svake od njih kako bi se obezbedila i očuvala stabilnost vrste.

## 8. ZAKLJUČAK

Istraživanje genetičke strukture i filogeografije divlje svinje (*Sus scrofa*) na osnovu analize mikrosatelita i sekvenci CR-1 regiona mitohondrijalne DNK ispunilo je sve postavljene ciljeve. Određena je polimorfnost jedanaest tetranukleotidnih mikrosatelita u uzorku od 664 divljih svinja u Evropi, utvrđivanjem alela prisutnih u populacijama i utvrđivanjem njihove frekvencije. U analiziranom uzorku definisano je prisustvo 13 subpopulacija divljih svinja u Evropi i određeni su osnovni parametri intra- i interpopulacione varijabilnosti. Takođe je određena polimorfnost mtDNK analizom sekvenci kontrolnog regiona mitohondrijalnog genoma (CR1-mtDNK) kod divljih svinja sa Balkanskog poluostrva, nađeni su jedinstveni haplotipovi za Balkansko poluostrvo i utvrđena je struktuiranost populacija divljih svinja na Balkanu. Poređenjem dobijenih sekvenci CR1-mtDNK sa dostupnim sekvencama divljih svinja iz čitavog sveta rasvetljena je demografska i filogeografska istorija vrste *Sus scrofa* i potvrđeno je važna uloga Balkana u rekolonizaciji Evrope nakon poslednjeg ledenog doba.

Sve radne hipoteze ovog istraživanja su u potpunosti potvrđene i pokazano je da:

- odabrani mikrosatelitski lokusi su primenljivi molekularni markeri u analizama strukture i genetičkog diverziteta populacija divlje svinje i ispoljavaju adekvatan nivo polimorfnosti;
- hipervarijabilni domen 1 (CR-1) mtDNK je odgovarajući genetički marker u populaciono genetičkim, filogenetičkim i filogeografskim studijama vrste *Sus scrofa*;
- prisutan je visok genetički diverzitet divljih svinja na Balkanu, gde je najveći u južnim delovima i smanjuje se ka severu što je potvrđeno analizom mtDNK;
- postoji struktuiranost populacija divlje svinje na Balkanu i u Evropi što je potvrđeno analizom mikrosatelita i CR1-mtDNK, pri čemu je na osnovu mikrosatelita definisano 13 subpopulacija divlje svinje u Evropi, a na Balkanu je utvrđeno postojanje 4 subpopulacije analizom mikrosatelita, odnosno 2 na osnovu analize sekvenci CR1-mtDNK;

- na Balkanu postoje jedinstveni aleli i mtDNK haplotipovi koji do danas nisu registrovani u populacijama divljih svinja u Evropi;
- pokazano je da su sva tri južna poluostrva Evrope (Balkansko, Iberijsko i Apeninsko) učestvovala u rekolonizaciji Evrope i da se filogeografska istorija vrste *Sus scrofa* može predstaviti u tri koraka: (1) povlačenje jedinki iz Centralne Evrope u južna poluostrva tokom poslednjeg ledenog doba, (2) nezavisna diverzifikacija u svakom od tri poluostrva, (3) rekolonizacija Evrope od strane haplotipova koji su bili na severu poluostrva (u ekspazivnom frontu);
- divlje svinje u Evropi pokazuju signal demografske ekspanzije;
- rezultati ove disertacije imaju značaj za ekološki menadžment i očuvanje biodiverziteta vrste *Sus scrofa*.

## 9. LITERATURA

- Acevedo, P., Vicente, J., Höfle, Ú., Cassinello, J., Ruiz-Fons, F. & Gortazar, C. (2007) Estimation of European wild boar relative abundance and aggregation: a novel method in epidemiological risk assessment. *Epidemiology & Infection*, **135**, 519-527.
- Alexandri, P., Triantafyllidis, A., Papakostas, S., Chatzinikos, E., Platis, P., Papageorgiou, N., Larson, G., Abatzopoulos, T. J. & Triantaphyllidis, C. (2012) The Balkans and the colonization of Europe: the post-glacial range expansion of the wild boar, *Sus scrofa*. *Journal of Biogeography*, **39**, 713-723.
- Allendorf, F. W. & Leary, R. F. (1986) Heterozygosity and fitness in natural populations of animals. *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity* (ed. by M. E. Soulé), pp. 57–76. Sinauer Associates, Sunderland.
- Allendorf, F.W., Leary, R.F., Spruell, P. & Wenburg, J.K. (2001) The problems with hybrid: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 613-622.
- Allendorf, F.W., England, P.R., Luikart, G., Ritchie, P.A. & Ryman N. (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 327–337.
- Alves, E., Óvilo, C., Rodríguez, M.C. & Silió, L. (2003) Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. *Animal Genetics*, **34**, 319–324.
- Alves, P.C., Pinheiro, I., Godinho, R., Vicente, J., Gortázar., C. & Scandura, M. (2010) Genetic diversity of wild boar populations and domestic pig breeds (*Sus scrofa*) in Southwestern Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **101**, 797–822.
- Anderson, E.C. & Thompson, E.A. (2002) A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics*, **160**, 1217-1229.
- Apollonio, M., Randi, E. & Toso, S. (1988) The systematics of the wild boar (*Sus scrofa* L.) in Italy. *Bollettino Di Zoologia*, **3**, 213-221.

- Apollonio, M., Andersen, R. & Putman R. (2010) *European Ungulates and Their Management in the 21st Century*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Aris-Brosou, S. & Excoffier, L. (1996) The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution*, **13**, 494–504.
- Avise, J. C., J. Arnold, R. M. Ball, E. Bermingham, T. Lamb, J. E. Neigl, C. A. Reeb & Saunders, N.C. (1987) Intraspecific phylogeography: The mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **18**, 489-522.
- Avise, J.C. (1994) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J. C. & Hamrick, J. L. (1996) *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J. C. (1996). Introduction: the scope of conservation genetics. *Conservation Genetics: Case Histories from Nature* (ed. by J. C. Avise & J. L. Hamrick), pp. 1–9. Chapman and Hall, New York.
- Avise, J.C. (2000) *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- Avise, J. C. (2004) *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Baccus, R., Ryman, N., Smith, M.H., Reuterwall, C. & Cameron, D. (1983) Genetic variability and differentiation of large grazing mammals. *Journal of Mammalogy*, **64**, 109–120.
- Ballou, J. D. & Lacy, R. C. (1995) Identifying genetically important individuals for management of genetic variation in pedigreed populations. *Management for Survival and Recovery* (ed. by J. D. Ballou, M. M. Gilpin and T. J. Foose) pp. 76–111. Columbia University Press, New York.
- Balloux, F. & Lugon-Moulin, N. (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **11**, 155–165.

- Becker, R.A. & Wilks, A.R. (2013) Original S code. R version by Ray Brownrigg. Enhancements by Thomas P Minka <tpminka@media.mit.edu> maps: Draw Geographical Maps. R package version 2.3-6. <http://CRAN.R-project.org/package=maps>
- Behura, S.K. (2006) Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, **15**, 3087–3113.
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bertorelle, G., Papetti, C., Hauffe H.C. & Boitani, L. (2009) Monitoring and detecting translocations using genetic data. *Population Genetics for Animal Conservation* (ed. by G. Bertorelle, M. W. Bruford, H. C. Hauffe, A. Rizzoli & C. Vernesi), pp.148-166. Cambridge University Press, UK.
- Bieber, C. & Ruf, T. (2005) Population dynamics in wild boar *Sus scrofa*: ecology, elasticity of growth rate and implications for the management of pulsed resource consumers. *Journal of Applied Ecology*, **42**, 1203–1213.
- Birungi, J. & Arctander, P. (2000) Large sequence divergence of mitochondrial DNA genotypes of the control region within populations of the African antelope, kob (*Kobus kob*). *Molecular Ecology*, **9**, 1997–2008.
- Boitani, L., Trapanese, P., Mattei, L., Nonis, D. (1995) Demography of a wild boar (*Sus scrofa*, L.) population, Tuscany, Italy. *Gibier Faune Sauvage*, **12**, 109–132.
- Boutin, S. (1990) Food supplementation experiments with terrestrial vertebrates: patterns, problems, and the future. *Canadian Journal of Zoology*, **68**, 203-220.
- Bowcock, A.M., Ruiz-Lineares, A., Tonföhrde, J., Minch, E., Kidd, J.R., Cavalli-Sforza, L.L. (1994) High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature*, **368**, 455-457.
- Briedermann, L. (1990) *Schwarzwild*, 2nd edn. Neumann-Neudamm, Melsungen.

- Bruford, M.W., Hanotte, O., Brookfield, J.F.Y. & Burke, T. (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprint. *Molecular Genetic Analysis of Populations, a Practical Approach* (ed. by Hoelzel, A.R.), pp. 225–270. IRL Press, Oxford.
- Caley, P. & Hone, J. (2004) Disease transmission between and within species, and the implications for disease control. *Journal of Applied Ecology*, **41**, 94-104.
- Canestrelli, D., Gaetano, A., Ceccetti, S. & Nascetti, G. (2010) Birth of a hotspot of intraspecific genetic diversity: notes from the underground. *Molecular Ecology*, **19**, 5432–5451.
- Caratti, S., Rossi, L., Sona, B., Origlia, S., Viara, S., Martano, G., Torre, C. & Robino, C. (2010) Analysis of 11 tetrameric STRs in wild boars for forensic purposes. *Forensic Science International: Genetics*, **4**, 339–342.
- Chen, C., Durand, E., Forbes, F. & François O. (2007) Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: A new computer program and a comparison study. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 747-756.
- Cornuet, J.M. & Luikart, G. (1996) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.
- Coulon, A., Fitzpatrick, J.W., Bowman, R., Stith, B.M., Makarewich, C.A., Stenzler, L.M. & Lovette, I.J. (2008) Congruent population structure inferred from dispersal behaviour and intensive genetic surveys of the threatened Florida scrub-jay (*Aphelocoma coerulescens*). *Molecular Ecology*, **17**, 1685–1701.
- Danilkin, A.A. (2001) The wild boar: an unprecedented spread or restoration of the species range? *Doklady Biological Sciences*, **380**, 457–460.
- Davison, J., Ho, S.Y.W., Bray, S.C., Korsten, M., Tammelaht, E., Hindrikson, M., Østbye, K., Østbye, E., Lauritzen, S-E., Austin, J., Cooper, A. & Saarma, U. (2011) Late-Quaternary biogeographic scenarios for the brown bear (*Ursus arctos*), a wild mammal model species. *Quaternary Science Reviews*, **30** (3-4), 418 - 430.
- De Young, R.W. & Honeycutt, R.L. (2005). The molecular toolbox: genetic techniques in wildlife ecology and management. *Journal of Wildlife Management*, **69** (4), 1362-1384.



- DeSalle, R. & Amato, G. (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature Review Genetics*, **5**, 702–712.
- Djan, M., Maletić, V., Trbojević, I., Popović, D., Veličković, N., Burazerović, J. & Ćirović D. (2014) Genetic diversity and structuring of the grey wolf population from the Central Balkans based on mitochondrial DNA variation. *Mammalian Biology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2014.03.001>
- Dobrowolska, A. & Melosik, M. (2008) Bullet-derived lead in tissues of the wild boar (*Sus scrofa*) and red deer (*Cervus elaphus*). *European Journal of Wildlife Research*, **54**, 231–235.
- Doerr, M.L., McAninch, J.B. & Wiggers, E.P. (2001) Comparison of four methods to reduce white-tailed deer abundance in an urban community. *Wildlife Society Bulletin*, **29**, 1105–1113.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. (2005) Bayesian coalescent interference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, **22**, 1185–1192.
- Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. & Rambaut, A. (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, **29** (8): 1969–1973.
- Durand, E., Jay, F., Gaggiotti, O. E. & François, O. (2009). Spatial inference of admixture proportions and secondary contact zones. *Molecular Biology and Evolution*, **26** (9), 1963–1973.
- Đan, M. (2008) Polimorfnost mikrosatelita i mtDNK u poulacijama zeca (*Lepus europaeus* Pallas). Doktorska disertacija, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Ellegren, H. (1999) Inbreeding and relatedness in Scandinavian grey wolves *Canis lupus*. *Hereditas*, **103**, 239–244.
- Ernhaft, J. & Csányi, S. (1995) Data on the biochemical-genetical polymorphism of wild boar in Hungary. *Ibex – Journal of Mountain Ecology*, **3**, 13–14.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611 - 2620.

- Excoffier, L. & Lischer H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 564-567.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567-1587.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology*, 895-908.
- Fang, M., Berg, F., Ducos, A. & Andersson, L. (2006) Mitochondrial haplotypes of European wild boars with  $2n = 36$  are closely related to those of European domestic pigs with  $2n = 38$ . *Animal Genetics*, **37**, 459-464.
- Feichtner, B. (1998) Ursachen der Streckenschwankungen beim Schwarzwild im Saarland. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft*, **44**, 140–150.
- Ferreira, E., Souto, L., Soares, A.M.V.M. & Fonseca, C. (2006) Genetic structure of the wild boar (*Sus scrofa* L.) population in Portugal. *Wildlife Biology in Practice*, **2** (1), 17–25.
- Ferreira, E., Souto, L., Soares, A.M.V.M. & Fonseca, C. (2009) Genetic structure of the wild boar population in Portugal: Evidence of a recent bottleneck. *Mammalian Biology*, **74** (4), 274-285.
- Fonseca, C. (2004) *Population dynamics and management of wild boar (Sus scrofa L.) in Central Portugal and Southeastern Poland*. PhD Thesis, University of Aveiro, Portugal.
- Food and Agricultural Organisation of the United Nations (FAO) (1996) Global Project for the maintenance of domestic animal genetic diversity.
- François, O., Ancelet, S. & Guillot, G. (2006) Bayesian Clustering Using Hidden Markov Random Fields in Spatial Population Genetics. *Genetics*, **174**, 805–816.
- Frankham, R., Ballou, J. D. & Briscoe, D. A. (2002). *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Frankham, R., Ballou, J. & Briscoe D. (2010) *Introduction to Conservation Genetics*, 2<sup>nd</sup> edn. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Fu, Y. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking, and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Gaggiotti, O. E., Brooks, S. P., Amos, W. & Harwood, J. (2004) Combining demographic, environmental and genetic data to test hypotheses about colonization events in metapopulations. *Molecular Ecology*, **1**, 811–825.
- Garya, J.C., Slatkin, M., Freimer, N.B. (1995) Microsatellite allele frequencies in humans and chimpanzees with implications for constraints on allele aspects. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 898-908.
- Geisser, H. & Reyer, H-U. (2004) Efficacy of hunting, feeding, and fencing to reduce crop damage by wild boars. *Journal of Wildlife Management*, **68**, 939-946.
- Geisser, H. & Reyer, H-U (2005) The influence of food and temperature on population density of wild boar *Sus scrofa* in the Thurgau (Switzerland). *Journal of Zoology London*, **267**, 89–96.
- Giuffra, E., Kijas, J.M.H., Amarger, V., Carlborg, O., Jeon, J.T. & Andersson, L. (2000) The origin of the domestic pig: independent domestication and subsequent introgression. *Genetics*, **154**, 1785–1791.
- Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K. & Vicente, J. (2007) Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research*, **53**, 241-256.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F. & Cosson, J.F. (2005a) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, **170**, 1261-1280.
- Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. (2005b) Geneland: A program for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, **5**, 712-715.
- Habel, J.C., Schmitt, T. & Müller, P. (2005) The fourth paradigm of post-glacial range expansion of European terrestrial species: the phylogeography of the marbled white butterfly (Satyrinae, Lepidoptera). *Journal of Biogeography*, **32**, 1489–1497.

- Hartl, G.B. & Csaikl, F. (1987) Genetic variability and differentiation in wild boars (*Sus scrofa ferus* L.): comparison of isolated populations. *Journal of Mammalogy*, **68**, 119–125.
- Hartl, G.B., Markov, G., Rubin, A., Findo, S., Lang, G. & Willing, R. (1993) Allozyme diversity within and among populations of 3 ungulate species (*Cervus elaphus*, *Capreolus capreolus*, *Sus scrofa*) of Southeastern and Central Europe. *Zeitschrift für Saugetierkunde*, **58**, 352–361.
- Hartl, D.L. & Clark, A.G. (2007) *Principles on Population Genetics*, fourth ed. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Hedrick, P. W. & Kalinowski, S. T. (2000) Inbreeding depression in conservation biology. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **31**, 139–216.
- Hewitt, G.M. (1999) Post-glacial recolonization of Europe. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87–112.
- Hewitt, G.M. (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907–913.
- Hewitt, G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions Royal Society London B*, **359**, 183–195.
- Holsinger, K. E. (1996). *The scope and the limits of conservation genetics*. *Evolution*, **50**, 2558–2561.
- Houlden, B.A., England, P.R., Taylor, A.C., Greville, W.D. & Sherwin, W.B. (1996) Low genetic variability of the koala *Phascolarctos cinereus* in south-eastern Australia following a severe population bottleneck. *Molecular Ecology*, **5**, 269–281.
- Hubisz, M.J., Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K. (2009) Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1322–1332.
- Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F., Nielsen, R. & Bollback, J.P. (2001) Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science*, **294**, 2310–2314.
- Huelsenbeck, J.P. & Rannala, B. (2004) Frequentist Properties of Bayesian Posterior Probabilities of Phylogenetic Trees Under Simple and Complex Substitution Models. *Systematic Biology*, **53**(6), 904–913.

- Ickes, K., Dewalt, S.J. & Thomas, S.C. (2003) Resprouting of woody saplings following stem snap by wild pigs in a Malaysian rain forest. *Journal of Ecology*, **91**, 222-233.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007) *CLUMPP*: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, **23**, 1801-1806.
- 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**, 55–66.
- Kijas, J.M.H. & Andersson, L. (2001) A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome. *Journal of Molecular Evolution*, **52**, 302–308.
- Kusza, S., Podgórski, T., Scandura, M., Borowik, T., Jávora, A., Sidorovich, V.E., Bunevich, A.N., Kolesnikov, M. & Jędrezejewska B. (2014) Contemporary genetic structure, phylogeography and past demographic processes of wild boar *Sus scrofa* population in Central and Eastern Europe. *PlosONE*, *9* (3), e91401.
- Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Lowden, S., Finlayson, H., Brand, T., Willerslev, E., Rowley-Conwy, P., Andersson, L. & Cooper, A. (2005) Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*, **307**, 1618–1621.
- Larson, G., Albarella, U., Dobney, K., Rowley-Conwy, P., Schibler, J., Tresset, A., Vigne, J.D., Edwards, C.J., Schlumbaum, A., Dinu, A., Balacescu, A., Dolman, G., Tagliacozzo, A., Manaseryan, N., Miracle, P., Van Wijngaarden-Bakker, L., Masseti, M., Bradley, D.G. & Cooper, A. (2007) Ancient DNA, pig domestication, and the spread of the Neolithic into Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **104**, 15276–15281.
- Leberg, P. (2005) Genetic approaches for estimating the effective size of populations. *Journal of Wildlife Management*, **69**, 1385–1399.
- Lewontin, R. C. (1974) *Genetic Basis of Evolutionary Change*. Columbia University Press, New York.

- Linnel, J. & Zachos, F. (2011) Status and distribution patterns of European ungulates: genetics, population history and conservation. *Ungulate Management in Europe: Problems and Practices* (ed. by R. Putman, M. Apollonio & R. Andersen), pp. 12-53. Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Lucchini, V., Meijaard, E., Diong, C.H., Groves, C.P. & Randi, E. (2005) New phylogenetic perspectives among species of South-east Asian wild pig (*Sus* sp.) based on mtDNA sequences and morphometric data. *Journal of Zoology*, **266**, 25–35.
- Luikart, G. & Cornuet, J.-M. (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, **12**, 228–237.
- Lushai, G., Smith, D.A.S., Goulson, D., Allen, J.A. & Maclean, N. (2003) Mitochondrial DNA clocks and the phylogeny of *Danaus* butterflies. *Insect Science and Its Application*, **23**, 309–315.
- Lynch, M. & O’Hely, M. (2001) Captive breeding and the genetic fitness of natural populations. *Conservation Genetics*, **2**, 363-378.
- Mace, G. M., Smith, T. B., Bruford, M. W. & Wayne, R. K. (1996). An overview of the issues. *Molecular Genetic Approaches in Conservation* (ed. by T. B. Smith & R. K. Wayne), pp. 1–21. Oxford University Press, UK.
- Maruyama, T., Fuerst, P.A. (1984) Population bottlenecks and nonequilibrium models in population genetics. I. Allele numbers when populations evolve from zero variability. *Genetics*, **108**, 745-763.
- Massei, G. & Genov, P. (2000) *Il Cinghiale*. Calderini Edagricole, Bologna.
- Mauget, R. & Pepin, D. (1991) Energy intake, growth and timing of puberty in the European wild boar (*Sus scrofa*). *Global Trends in Wildlife Management* (eds Bobek, B., Perzanowski, K. & Regelin, W.), pp. 205-209. Swiat Press, Krakow/Warsaw.
- Michaux, J.R., Libois, R., Paradis, E. & Filippucci, M.G. (2004) Phylogeographic history of the yellow-necked field mouse (*Apodemus flavicollis*) in Europe and in the Near and Middle East. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**, 788–798.

- Moritz, C. (1999) Conservation units and translocation: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*, **130**, 217–228.
- Moritz, C. (2002) Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Systematic Biology*, **51**, 238–254.
- Nauta, M.J. & Weissing, F.J. (1996) Constraints on allele size at microsatellite loci: implications for genetic differentiation. *Genetics*, **143**, 1021–1032.
- Nei, M. & Li, W. (1972) Linkage disequilibrium in subdivided populations. *Genetics*, **75**, 213–219.
- Nikolov, I.S., Gum, B., Markov, G. & Kuehn, R. (2009) Population genetic structure of wild boar *Sus scrofa* in Bulgaria as revealed by microsatellite analysis. *Acta Theriologica*, **54**, 193–205.
- Okumura, N., Kurosawa, Y. & Kobayashi, E. (2001) Genetic relationship amongst the major non-coding regions of mitochondrial DNAs in wild boars and several breeds of domesticated pigs. *Animal Genetics*, **32**, 139–147.
- Oliver W.L.R., Brisbin, I.L. & Takahashi, S. (1993) The Eurasian wild pig, *Sus scrofa*. In *Pigs, Peccaries and Hippos — Status Survey and Action Plan*. (ed. W.L.R.Oliver), pp. 112–121. IUCN/SSC, Gland, Switzerland.
- Oliver, W. & Leus, K. (2008) *Sus scrofa*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species.
- Olivieri, G.L., Sousa, V., Chikhi, L. & Radespiel, U. (2008) From genetic diversity and structure to conservation: genetic signature of recent population declines in three mouse lemur species (*Microcebus* spp.). *Biological Conservation*, **141**, 1257–1271.
- Orsini, L., Corander, J., Alasentie, A., Hanski, I. (2008) Genetic spatial structure in a butterfly metapopulation correlates better with past than present demographic structure. *Molecular Ecology*, **17**, 2629–2642.
- O’Ryan, C., Harley, E.H., Bruford, M.W., Beaumont, M.A., Wayne, R.K. & Cherry, M.I. (1998) Microsatellite analysis of genetic diversity, within fragmented South African buffalo populations. *Animal Conservation*, **1**, 85–94.
- Pearse, D.E. & Crandall, K.A. (2004) Beyond  $F_{ST}$ : analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, **5**, 585–602.

- Petit, R.J., Aguinagalde, I. & de Beaulieu, J-L (2003) Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**, 1563–1565.
- Pilot, M., Branicki, W., Jędrzejewski, W., Goszczyński, J., Jędrzejewska, B., Dykyy, I., Shkvyrya, M. & Tsingarska, E. (2010) Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology*, **10**, 104.
- Powell, J. R. (1994) Molecular techniques in population genetics: a brief history. Pp. 131–156 in Schierwater, B., B. Streit, G. P. Wagner, and R. DeSalle, eds. *Molecular Ecology and Evolution: Approaches and Applications*. Burkhauser Verlag, Basel, Switzerland.
- Primack, R. (2012) *A Primer of Conservation Biology*, 5th edn. Sinauer Associates, Sunderland, MA USA.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.
- Proudfoot, G.A., Honeycutt, R.L. & Slack, R.D. (2006) Mitochondrial DNA variation and phylogeography of the ferruginous pygmy-owl (*Glaucidium brasilianum*). *Conservation Genetics*, **7**, 1–12.
- Putman, R.J. & Staines, B.W. (2004) Supplementary winter feeding of wild red deer *Cervus elaphus* in Europe and North America: justifications, feeding practice and effectiveness. *Mammalian Review*, **34**, 285–306.
- R Core Team (2013). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2007) Tracer v1.4, Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>
- Rambaut, A. (2009). FigTree – The Figure Drawing Tool, version 1.3.1. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.
- Randi, E., Massei, G. & Genov, P. (1992) Allozyme variability in Bulgarian wild boar populations. *Acta Theriologica*, **37**, 271–278.



- Randi, E., Mucci, N., Pierpaoli, M. & Douzery, E. (1998) New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **265**, 793–801.
- Randi, E., Alves, P.C., Carranza, J., Milosevic-Zlatanovic, S., Sfourgaris, A. & Mucci, N. (2004) Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. *Molecular Ecology*, **13** (10), 3071–3083.
- Randi, E. (2005) Management of wild ungulate populations in Italy: captive-breeding, hybridization and genetic consequences of translocations. *Veterinary Research Communications*, **29** (Suppl. 2), 71–75.
- Randi, E. (2011) Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Review*, **41**, 99–111.
- Reed, D. H. (2007) Extinction of island endemics: it is not inbreeding depression. *Animal Conservation*, **10**, 145–148.
- Rhymer, J.M. & Simberloff, D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 83–109.
- Rice, W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223–225.
- Rico, C., Rico, I. & Hewitt, G. (1996) 470 million years of conservations of microsatellite loci among fish species. *Proceedings of Royal Society B*, **263**, 549–557.
- Riddle, B.R. & Honeycutt, R.L. (1990) Historical biogeography in North-american arid regions – an approach using mitochondrial-DNA phylogeny in grasshopper mice (genus *Onychomys*). *Evolution*, **44**, 1–15.
- Rocha, L.A., Rocha, C.R., Robertson, D.R. & Bowen, B.W. (2008) Comparative phylogeography of Atlantic reef fishes indicates both origin and accumulation of diversity in the Caribbean. *BMC Evolutionary Biology*, **8**, 157.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A. & 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.

- Rosenberg, N. A. (2004) Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 137-138.
- Sambrook, J.F. & Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3<sup>rd</sup> edn., Cold Spring Harbor, Laboratory Press, USA.
- Scandura, M., Iacolina, L., Crestanello, B., Pecchioli, E., Benedetto, M.F., Russo, V., Davoli, R., Apollonio, M. & Bertorelle, G. (2008) Ancient vs. recent processes as factors shaping genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable. *Molecular Ecology*, **17**, 1745-1762.
- Scandura, M., Iacolina, L. & Apollonio, M. (2011) Genetic diversity in the European wild boar *Sus scrofa*: phylogeography, population structure and wild x domestic hybridization. *Mammalian Review*, **41**, 125-137.
- Schlötterer, C., Amos, B. & Tautz, D. (1991) Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, **354**, 63-65.
- Schlötterer, C. (2000) Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*, **109**, 365-371.
- Schmitt, T., Habel, J.C., Zimmermann, M. & Muller, P. (2006) Genetic differentiation of the marbled white butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and post glacial range expansion in southeastern Europe. *Molecular Ecology*, **15**, 1889-1901.
- Selkoe, K. A. & Toonen, R. J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to
- Shriver, M. D., Jin, L., Chakraborty, R. & Boerwinkle, E. (1993) VNTR allele frequency distributions under the stepwise mutation a computer simulation approach. *Genetics*, **134**, 983-993.
- Slatkin, M. (1994) Linkage disequilibrium in growing and stable populations. *Genetics*, **137**, 331-336.
- Stamatis, C., Suchentrunk, F., Moutou, K.A., Giacometti, M., Haerer, G., Djan, M., Vapa, Lj., Vukovic, M., Tvrtkovic, N., Sert, H., Alves, P.C. & Mamuris, Z. (2009) Phylogeography of the brown hare (*Lepus europaeus*) in Europe: a legacy of south-eastern Mediterranean refugia? *Journal of Biogeography*, **36**, 515–528.

- Stöck, M., Moritz, C., Hickerson, M., Frynta, D., Dujsebayaeva, T., Eremchenko, V., Macey, R., Papenfuss, T.J. & Wake, D.B. (2006) Evolution of mitochondrial relationships and biogeography of Palearctic green toads (*Bufo viridis* subgroup) with insights in their genomic plasticity. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 63–689.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G. & Cosson, J.F. (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**, 453-464.
- Tajima, F. (1989a) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- Tajima, F. (1989b) The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 597–601.
- Takezaki, N., Nei, M. & Tamura, K. (2010) POPTREE2 : Software for constructing population trees from allele frequency data and computing other population statistics with Windows-interface. *Molecular Biology and Evolution*, **27**, 747-752.
- Tammeleht, E., Remm, J., Korsten, M., Davison, J., Tumanov, I., Saveljev, A., Mannil, P., Kojola, I. & Saarma, U. (2010) Genetic structure in large, continuous mammal populations: the example of brown bears in northwestern Asia. *Molecular Ecology*, **19**, 5359-5370.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, evolutionary distance, and Maximum Parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**, 2731-2739.
- Taylor, A.C., Sherwin, W.B. & Wayne, R.K. (1994) Genetic variation of microsatellite loci in a bottlenecked species: the northern hairy-nosed wombat *Lasiornhinus krefftii*. *Molecular Ecology*, **3**, 277-290.
- Templeton, A. R. (1998) Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**, 381–397.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weigh matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Ursenbacher, S., Schweigher, S., Tomović, L., Crnobrnja-Isailović, J., Fumagalli, L. & Mayer, W. (2008) Molecular phylogeography of the nose-horned viper (*Vipera ammodytes*, Linnaeus (1758)): evidence for high genetic diversity and multiple refugia in the Balkan peninsula. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46**, 1116–1128.
- using and evaluating microsatellite markers, *Ecology Letters*, **9**, 615–629.
- Valdes, A. M., Slatkin, M. & Freiner, N. B. (1993) Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics*, **133**, 737-749.
- van Asch, B., Pereira, F., Santos, L. S., Carneiro, J., Santos, N. & Amorim, A. (2011) Mitochondrial lineages reveal intense gene flow between Iberian wild boars and South Iberian pig breeds. *Animal Genetics*, **43**, 35-41.
- Veličković, N. (2008) Varijabilnost mikrosatelita u populaciji divlje svinje (*Sus scrofa*). Master rad, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad.
- Veličković, N., Djan, M., Obreht, D. & Vapa Lj. (2012) Population genetic structure of wild boars in the West Balkan region. *Russian Journal of Genetics*, **48** (2), 859-863.
- Veličković, N., Djan, M., Zoric, M., Obreht, D., Gagrcin, M. & Vapa, Lj. (2010) An assessment of the genetic diversity in the wild boar population from the Podunavlje-Podravlje hunting area. *Archives of Biological Sciences*, **62** (3), 807-810.
- Vernesi, C., Crestanello, B., Pecchioli, E., Tartari, D., Caramelli, D., Hauffe, H., Bertorelle, G. (2003) The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): A microsatellite analysis. *Molecular Ecology*, **12**, 585-595.
- Wan, Q.H., Wu, H., Fujihara, T. & Fang, S.G. (2004) Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis*, **25**, 2165–2176.
- Welander, J. (2000) Spatial and temporal dynamics of wild boar (*Sus scrofa*) rooting in a mosaic landscape. *Journal of Zoology*, **252**, 263–271.

- Wilke, K., Pohlmeier, K. & Lotthammer, K-H. (2000) Konzentration von Blei und Cadmium beim Schalenwild in autobahnnahen Revieren im Raum Gudow, Schleswig-Holstein. *Zeitschrift Fur Jagdwissenschaft*, **46**, 31-44.
- Wilson, G. A. & Rannala, B. (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, **163**, 1177–1191.
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Ann. Eugen.*, **15**, 323–354.
- Wright, S., 1978. Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. Variability Within and Among Natural Populations. University of Chicago Press, Chicago.
- Zachos, F.E. & Hackländer, K. (2011) Genetics and conservation of large mammals in Europe: a themed issue of *Mammal Review*. *Mammal Review*, **41** (2), 85-86.
- Zachos, F.E. & Hartl, G.B. (2011) Phylogeography, population genetics and conservation of the European red deer *Cervus elaphus*. *Mammal Review*, **41**, 138-150.

## **10. PRILOG I**

Prilog 1. Lista CR1-mtDNK sekvenci divlje svinje koje su dobijene u ovoj studiji i onih preuzetih iz Gen Banke sa imenima haplotipova koji su uočeni u dva analizirana seta sekvenci: Balkan i čitav svet

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
	AD1	1	Adaševac, Srbija	H56	B56	E1	ovo istraživanje
	BA2	1	Kovin, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	BA4	1	Senta, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	BALJ1	1	Bosanska Kostajnica, Bosna i Hercegovina	H57	B57a	E1	ovo istraživanje
	BALJ2	1	Bosanska Kostajnica, Bosna i Hercegovina	H57	B57a	E1	ovo istraživanje
	BIH1	1	Tuzla, Bosna i Hercegovina	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	BL1	1	Banja Luka, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	BL2	1	Banja Luka, Bosna i Hercegovina	H58	B58	E1	ovo istraživanje
	BL5	1	Banja Luka, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	BLT2	1	Osmača, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	BM38	1	Bački Monostor, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	BP1	1	Bjelasica, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	BP2	1	Kurilo, Bijlo Polje, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	BP3	1	Grančarevo, Bijelo Polje, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	BP8	1	Bjelasica, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	BP10	1	Bistrica, Bijelo Polje, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	BP11	1	Lisa Dobrinje, Bijelo Polje, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	DR1	1	Drenovac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	DR7	1	Drenovac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	GA1	1	Gardinovci, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	GL1	1	Gložane, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	HER4	1	Goražde, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	HER7	1	Goražde, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	HER8	1	Goražde, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	HER9	1	Zenica, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	HER11	1	Goražde, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	HER14	1	Bosanski Petrovac, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	HER16	1	Bosanski Petrovac, Bosna i Hercegovina	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	HER30	1	Fojnica, Bosna i Hercegovina	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	HER31	1	Fojnica, Bosna i Hercegovina	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	HER33	1	Fojnica, Bosna i Hercegovina	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	HER37	1	Vareš, Bosna i Hercegovina	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	HER43	1	Semešnica, Donji Vakuf, Bosna i Hercegovina	H57	B57a	E1	ovo istraživanje
	HR1	1	Hrvatska	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	HR3	1	Hrvatska	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	HR7	1	Hrvatska	H2	B2a	E1	ovo istraživanje
	HR11	1	Hrvatska	H2	B2a	E1	ovo istraživanje
	HR21	1	Hrvatska	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	HR23	1	Hrvatska	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	HR31	1	Hrvatska	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	HR37	1	Hrvatska	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	HR45	1	Hrvatska	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	HR50	1	Hrvatska	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	JA1	1	Boljevac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	JA4	1	Jagodina Lipar, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	JA5	1	Svilajnac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	JA6	1	Crni Vrh, Jagodina, Srbija	H52	B52	E1	ovo istraživanje
	JA7	1	Jagodina, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	JA8	1	Jagodina, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	JA9	1	Bosilegrad, Srbija	H43	B43a	E1	ovo istraživanje
	JA10	1	Jagodina Bunar, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	JA11	1	Jagodina Topola, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	K1	1	Hrvatska	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	K4	1	Hrvatska	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	KA2	1	Karakuša, Šabac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
	KA5	1	Karakuša, Šabac, Srbija	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	KM1	1	Kamarište, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	KR3	1	Karadordevo, Srbija	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	KV1	1	Troglav, Kraljevo, Srbija	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	Medja2	1	Međa, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK1	1	Strumica, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK4	1	Prespa, Makedonija	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	MK5	1	Prespa, Makedonija	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	MK8	1	Prespa, Makedonija	H2	B2a	E1	ovo istraživanje
	MK9	1	Radovis, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK10	1	Radovis, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK11	1	Veles, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK13	1	Veles, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK14	1	Gevgelija, Makedonija	H5	B5c	E1	ovo istraživanje
	MK19	1	Valandovo, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK20	1	Valandovo, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK23	1	Kumanovo, Masedonia	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK24	1	Bitola, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK25	1	Bitola, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MK26	1	Demir Hisar, Makedonija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	MNJ1	1	Manjaca, Bosna i Hercegovina	H59	B59	E1	ovo istraživanje
	MOR1	1	Morovic, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	N6	1	Hrvatska	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	NK1	1	Piva, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	NK9	1	Nikšić, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	NK10	1	Nikšić, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	NK13	1	Nikšić, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	OSM1	1	Sremska Mitrovica, Srbija	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	OSM2	1	Sremska Mitrovica, Srbija	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	P12	1	Hrvatska	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	P27	1	Hrvatska	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	PLJ2	1	Bukovica, Šavnik, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	PLJ3	1	Krnjača, Srbija	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	PLJ5	1	Šljivansko, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	PLJ7	1	Visac, Pljevlja, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	PLJ9	1	Bukovica, Šavnik, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	PLJ10	1	Potkovač, Pljevlja, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	PLJ11	1	Gradac, Pljevlja, Crna Gora	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	PR1	1	Prijedor, Bosna i Hercegovina	H57	B57b	E1	ovo istraživanje
	PR3	1	Prijedor, Bosna i Hercegovina	H2	B5a	E1	ovo istraživanje
	PZ3	1	Čovdin, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	PZ5	1	Poljana, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	PZ7	1	Kličevac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	PZ9	1	Melnica, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	PZ13	1	Vezičevo, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	PZ14	1	Smoljinac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	R20	1	Ristovača, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	R21	1	Ristovača, Srbija	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	RD1	1	Radenković, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SJ1	1	Sremski Jarak, Srbija	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	SJ2	1	Sremski Jarak, Srbija	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	SMB12	1	Bosutske šume, Srbija	H2	B2b	E1	ovo istraživanje
	SMK1	1	Kučine, Višnjićevo, Srbija	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	SMK9	1	Kučine, Višnjićevo, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	StPI1	1	Stara Planina, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	StPI2	1	Stara Planina, Srbija	H10	B10a	E1	ovo istraživanje
	StPI3	1	Stara Planina, Srbija	H61	B61	E1	ovo istraživanje
	TM1	1	Temska, Stara Planina, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	VA1	1	Valjevo, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje



Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
	VG1	1	Golubac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	VG2	1	Golubac, Srbija	H9	B9	E1	ovo istraživanje
	VG3	1	Braničevo, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	VG4	1	Tribrode, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	VI1	1	Višnjićevo, Srbija	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	VI2	1	Višnjićevo, Srbija	H31	B31	E1	ovo istraživanje
	VR1	1	Vlasina, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	VR2	1	Vladičin Han, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	VR3	1	Vranje, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	VS1	1	Vršac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	VS2	1	Vršac, Srbija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SL1	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SL3	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SL5	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SL7	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H60	B60	E1	ovo istraživanje
	SL8	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SL9	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SL10	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SL12	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H60	B60	E1	ovo istraživanje
	SL13	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SL15	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H60	B60	E1	ovo istraživanje
	SL17	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H60	B60	E1	ovo istraživanje
	SL20	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SL22	1	Kompas, Prekmurje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLM3	1	Dekani, Primorska, Slovenija	H2	B2a	E1	ovo istraživanje
	SLM4	1	Dekani, Primorska, Slovenija	H57	B57a	E1	ovo istraživanje
	SLM6	1	Videž-Kozina, Primorska, Slovenija	H2	B2a	E1	ovo istraživanje
	SLM7	1	Videž-Kozina, Primorska, Slovenija	H2	B2a	E1	ovo istraživanje
	SLM9	1	Dekani, Primorska, Slovenija	H57	B57a	E1	ovo istraživanje
	SLM11	1	Dekani, Primorska, Slovenija	H2	B2a	E1	ovo istraživanje
	SLM13	1	Gaberk-Divača, Primorska, Slovenija	H2	B2a	E1	ovo istraživanje
	SLM17	1	Gaberk-Divača, Primorska, Slovenija	H57	B57a	E1	ovo istraživanje
	SLM18	1	Gaberk-Divača, Primorska, Slovenija	H57	B57a	E1	ovo istraživanje
	SLM20	1	Tabor Sežana, Primorska, Slovenija	H2	B2a	E1	ovo istraživanje
	SLP1	1	Pohorje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLP5	1	Pohorje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLP8	1	Pohorje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLP9	1	Pohorje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLP16	1	Pohorje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLP17	1	Pohorje, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLS1	1	Dreta-Nazarje, Savinjska dolina, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLS3	1	Gornji Grad, Savinjska dolina, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLS6	1	Braslovče, Savinjska dolina, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLS15	1	Dreta-Nazarje, Savinjska dolina, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLS16	1	Dreta-Nazarje, Savinjska dolina, Slovenija	H57	B57a	E1	ovo istraživanje
	SLS17	1	Gornji Grad, Savinjska dolina, Slovenija	H5	B5a	E1	ovo istraživanje
	SLS18	1	Dreta-Nazarje, Savinjska dolina, Slovenija	H57	B57a	E1	ovo istraživanje
JF774294	ait049	1	Aitoloakarnania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774186	ait072	1	Aitoloakarnania, Grčka	H2	B2a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774359	ait109	1	Aitoloakarnania, Grčka	H3	B3	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774350	ait126	1	Aitoloakarnania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774320	ait127	1	Aitoloakarnania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774308	ait261	1	Aitoloakarnania, Grčka	H4	B4	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774317	ait278	1	Aitoloakarnania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774290	ait286	1	Aitoloakarnania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774312	ait297	1	Aitoloakarnania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774289	ait305	1	Aitoloakarnania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774351	ait400	1	Aitoloakarnania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774182	ait440	1	Aitoloakarnania, Grčka	H5	B5b	E1	Alexandrii i sar., 2012

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
JF774348	ait500	1	Aitolokamania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774212	ark432	1	Arcadia, Grčka	H6	B6	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774231	ark435	1	Arcadia, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774211	ark438	1	Arcadia, Grčka	H7	B7	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774233	ark439	1	Arcadia, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774375	Blg002	1	Bugarska	H8	B8	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774206	Blg003	1	Bugarska	H9	B9	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774276	Blg004	1	Bugarska	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774278	Blg005	1	Bugarska	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774247	dra001	1	Drama, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774271	dra005	1	Drama, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774256	dra007	1	Drama, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774279	dra009	1	Drama, Grčka	H11	B11	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774228	dra012	1	Drama, Grčka	H12	B12	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774234	Dra015	1	Drama, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774229	dra035	1	Drama, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774236	dra046	1	Drama, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774237	dmm016	1	Drama, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774187	dmm037	1	Drama, Grčka	H2	B2a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774232	dmm129	1	Drama, Grčka	H13	B13	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774184	Ebr003	1	Ebros, Grčka	H14	B14	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774260	Ebr008	1	Ebros, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774214	Ebr014	1	Ebros, Grčka	H16	B16	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774188	Ebr017	1	Ebros, Grčka	H2	B2a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774261	Ebr018	1	Ebros, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774219	Ebr020	1	Ebros, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774262	Ebr022	1	Ebros, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774252	EbrT01	1	Ebros, Grčka	H17	B17	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774281	EbrT03	1	Ebros, Grčka	H18	B18	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774283	EbrT04	1	Ebros, Grčka	H19	B19	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774244	EbrT05	1	Ebros, Grčka	H20	B20	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774255	EbrT11	1	Ebros, Grčka	H21	B21	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774248	EbrT15	1	Ebros, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774253	EbrT18	1	Ebros, Grčka	H17	B17	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774207	EbrT21	1	Ebros, Grčka	H22	B22	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774254	EbrT22	1	Ebros, Grčka	H17	B17	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774280	EbrT27	1	Ebros, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774183	eur061	1	Evritania, Grčka	H5	B5b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774305	eur062	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774332	eur088	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774336	eur092	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774306	eur307	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774333	eur308	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774355	eur310	1	Evritania, Grčka	H23	B23	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774335	eur312	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774307	eur316	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774334	eur480	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774284	eur492	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774285	eur506	1	Evritania, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774309	fok046	1	Fokida, Grčka	H4	B4	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774298	fok050	1	Fokida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774354	fok055	1	Fokida, Grčka	H24	B24	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774323	fok064	1	Fokida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774345	fok115	1	Fokida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774297	fok116	1	Fokida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774324	fok290	1	Fokida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774358	fok298	1	Fokida, Grčka	H25	B25	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774302	fok430	1	Fokida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774329	fok450	1	Fokida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
JF774339	fok452	1	Fokida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774303	fth080	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774330	fth082	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774338	fth084	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774304	fth216	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774331	fth217	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774337	fth250	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774363	fth253	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774362	fth254	1	Fthiotida, Grčka	H26	B26	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774344	fth255	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774364	fth259	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774365	fth268	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774366	fth269	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774326	fth274	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774342	fth505	1	Fthiotida, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774220	Hlk001	1	Halkidiki, Grčka	H27	B27	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774263	Hlk002	1	Halkidiki, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774221	Hlk003	1	Halkidiki, Grčka	H27	B27	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774222	Hlk004	1	Halkidiki, Grčka	H27	B27	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774223	Hlk005	1	Halkidiki, Grčka	H27	B27	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774224	Hlk006	1	Halkidiki, Grčka	H27	B27	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774225	Hlk007	1	Halkidiki, Grčka	H27	B27	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774226	Hlk008	1	Halkidiki, Grčka	H27	B27	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774227	Hlk036	1	Halkidiki, Grčka	H28	B28	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774368	ioa208	1	Ioannina, Grčka	H29	B29	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774295	ioa211	1	Ioannina, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774347	ioa212	1	Ioannina, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774282	ioa317	1	Ioannina, Grčka	H30	B30	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774193	ioa319	1	Ioannina, Grčka	H31	B31	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774371	ioa320	1	Ioannina, Grčka	H29	B29	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774369	ioa322	1	Ioannina, Grčka	H29	B29	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774370	ioa405	1	Ioannina, Grčka	H29	B29	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774249	ioa406	1	Ioannina, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774257	ioa507	1	Ioannina, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774321	ioa509	1	Ioannina, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774264	Kbl001	1	Kavala, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774215	Kbl002	1	Kavala, Grčka	H16	B16	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774265	Kbl004	1	Kavala, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774266	Kbl006	1	Kavala, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774267	Kbl007	1	Kavala, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774241	Kbl012	1	Kavala, Grčka	H32	B32	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774408	Kbl020	1	Kavala, Grčka	H33	B33	A	Alexandrii i sar., 2012
JF774379	Kbl021	1	Kavala, Grčka	H34	B34	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774380	Kbl022	1	Kavala, Grčka	H35	B35	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774376	Kbl023	1	Kavala, Grčka	H36	B36	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774208	Kbl025	1	Kavala, Grčka	H37	B37	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774374	Kbl026	1	Kavala, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774273	Kbl028	1	Kavala, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774209	Kbl029	1	Kavala, Grčka	H38	B38	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774378	Kbl030	1	Kavala, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774310	krm124	1	Korinthos, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774235	krm125	1	Korinthos, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774288	lar223	1	Larisa, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774311	lar224	1	Larisa, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774360	lar225	1	Larisa, Grčka	H39	B39	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774258	lar226	1	Larisa, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774291	lar228	1	Larisa, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774318	lar230	1	Larisa, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774292	lar231	1	Larisa, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
JF774319	lar232	1	Larisa, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774349	lar233	1	Larisa, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774293	lar234	1	Larisa, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774361	lar235	1	Larisa, Grčka	H40	B40	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774322	lar513	1	Larisa, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774296	mag222	1	Magnisia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774316	mag227	1	Magnisia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774313	mag229	1	Magnisia, Grčka	H41	B41	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774346	mag518	1	Magnisia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774353	mag523	1	Magnisia, Grčka	H42	B42	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774315	mag524	1	Magnisia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774213	pel350	1	Pella, Grčka	H2	B2a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774373	pel351	1	Pella, Grčka	H43	B43b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774230	pel352	1	Pella, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774210	pel353	1	Pella, Grčka	H44	B44	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774352	pel354	1	Pella, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774204	pel355	1	Pella, Grčka	H45	B45	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774205	Rod001	1	Rodopi, Grčka	H9	B9	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774238	Rod002	1	Rodopi, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774239	Rod003	1	Rodopi, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774250	Rod006	1	Rodopi, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774274	Rod007	1	Rodopi, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774216	Rod008	1	Rodopi, Grčka	H16	B16	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774217	Rod010	1	Rodopi, Grčka	H16	B16	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774185	Rod012	1	Rodopi, Grčka	H46	B46	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774277	Rod015	1	Rodopi, Grčka	H47	B47	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774218	Rod017	1	Rodopi, Grčka	H16	B16	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774240	RodT08	1	Rodopi, Grčka	H5	B5a	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774245	RodT09	1	Rodopi, Grčka	H20	B20	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774246	RodT10	1	Rodopi, Grčka	H20	B20	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774372	thp407	1	Ioannina, Grčka	H29	B29	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774367	thp408	1	Ioannina, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774268	Ths001	1	Thessaloniki, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774269	Ths002	1	Thessaloniki, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774198	Ths003	1	Thessaloniki, Grčka	H51	B51	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774270	Ths004	1	Thessaloniki, Grčka	H15	B15	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774192	ths128	1	Thessaloniki, Grčka	H52	B52	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774251	tri357	1	Trikala, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774275	tri359	1	Trikala, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774299	tri360	1	Trikala, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774259	tri514	1	Trikala, Grčka	H10	B10b	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774314	voi003	1	Voiotia, Grčka	H53	B53	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774325	voi011	1	Voiotia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774343	voi013	1	Voiotia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774286	voi014	1	Voiotia, Grčka	H54	B54	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774356	voi056	1	Voiotia, Grčka	H55	B55	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774300	voi236	1	Voiotia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774327	voi237	1	Voiotia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774357	voi242	1	Voiotia, Grčka	H55	B55	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774341	voi264	1	Voiotia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774301	voi306	1	Voiotia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774328	voi422	1	Voiotia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774340	voi423	1	Voiotia, Grčka	H1	B1	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774287	voi445	1	Voiotia, Grčka	H54	B54	E1	Alexandrii i sar., 2012
JF774381	Sam001	1	Samos, Grčka	H48		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774382	Sam002	1	Samos, Grčka	H48		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774392	Sam004	1	Samos, Grčka	H49		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774383	Sam006	1	Samos, Grčka	H48		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774384	Sam007	1	Samos, Grčka	H49		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
JF774385	Sam008	1	Samos, Grčka	H49		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774386	Sam010	1	Samos, Grčka	H49		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774387	Sam012	1	Samos, Grčka	H49		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774388	Sam013	1	Samos, Grčka	H49		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774389	Sam014	1	Samos, Grčka	H49		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774390	Sam015	1	Samos, Grčka	H49		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JF774391	Sam016	1	Samos, Grčka	H49		Near Eastern	Alexandrii i sar., 2012
JN031444	PWB5-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031445	PWB6-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031446	PWB20-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031447	PWB53-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031448	PWB56-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031449	PWB91-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031450	PWB92-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031451	PWB93-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031452	PWB94-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031453	PWB95-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031454	PWB96-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031455	PWB97-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031456	PWB98-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031457	PWB99-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031458	PWB100-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031459	PWB103-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031460	PWB104-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031461	PWB106-	1	Portugalija	H62		E1	van Asch i sar., 2011
JN031462	PWB21-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031464	PWB23-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031465	PWB24-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031466	PWB25-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031467	PWB26-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031468	PWB27-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031469	PWB28-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031470	PWB29-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031471	PWB30-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031472	PWB31-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031473	PWB32-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031474	PWB33-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031475	PWB62-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031476	PWB63-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031477	PWB64-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031479	PWB66-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031480	PWB67-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031481	PWB68-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031482	PWB69-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031483	PWB70-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031484	PWB71-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031485	PWB72-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031486	PWB73-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031487	PWB74-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031488	PWB89-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031489	PWB107-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031490	PWB110-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031491	PWB112-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031492	PWB113-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031493	PWB115-	1	Portugalija	H65		E1	van Asch i sar., 2011
JN031329	PWB57-	1	Portugalija	H64		E1	van Asch i sar., 2011
JN031330	PWB58-	1	Portugalija	H64		E1	van Asch i sar., 2011
JN031331	PWB59-	1	Portugalija	H64		E1	van Asch i sar., 2011
JN031332	PWB60-	1	Portugalija	H64		E1	van Asch i sar., 2011

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
JN031333	PWB61-	1	Portugalija	H64		E1	van Asch i sar., 2011
JN031334	PWB102-	1	Portugalija	H64		E1	van Asch i sar., 2011
JN031335	PWB105-	1	Portugalija	H64		E1	van Asch i sar., 2011
JN031501	PWB54-	1	Portugalija	H67		E1	van Asch i sar., 2011
JN031502	PWB55-	1	Portugalija	H67		E1	van Asch i sar., 2011
JN031283	PWB117-	1	Portugalija	H10		E1	van Asch i sar., 2011
JN031494	PWB90-	1	Portugalija	H10		E1	van Asch i sar., 2011
JN031495	PWB108-	1	Portugalija	H10		E1	van Asch i sar., 2011
JN031157	PWB111-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031158	PWB114-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031159	PWB116-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031411	PWB1-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031412	PWB7-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031413	PWB8-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031414	PWB9-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031415	PWB10-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031416	PWB11-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031417	PWB12-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031418	PWB13-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031419	PWB14-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031420	PWB15-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031421	PWB16-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031422	PWB17-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031423	PWB18-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031424	PWB19-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031425	PWB34-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031426	PWB35-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031427	PWB36-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031428	PWB37-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031429	PWB38-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031430	PWB75-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031431	PWB76-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031432	PWB77-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031433	PWB78-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031434	PWB79-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031435	PWB80-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031436	PWB81-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031437	PWB82-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031438	PWB83-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031439	PWB84-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031440	PWB85-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031441	PWB86-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031442	PWB87-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031443	PWB88-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031497	PWB42-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031498	PWB49-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031499	PWB50-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031500	PWB52-	1	Portugalija	H5		E1	van Asch i sar., 2011
JN031503	PWB39-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031504	PWB40-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031505	PWB41-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031506	PWB43-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031507	PWB44-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031508	PWB45-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031509	PWB46-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031510	PWB47-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031511	PWB48-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031512	PWB51-	1	Portugalija	H66		A	van Asch i sar., 2011
JN031356	PWB2-S8	1	Portugalija	H59		E1	van Asch i sar., 2011

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
JN031357	PWB3-S8	1	Portugalija	H59		E1	van Asch i sar., 2011
JN031358	PWB4-S8	1	Portugalija	H59		E1	van Asch i sar., 2011
JN031496	PWB101-	1	Portugalija	H63		E1	van Asch i sar., 2011
HM74719	Haplotype	2	Austrija	H60		E1	Alves i sar. 2010
HM74719	Haplotype	1	Austrija	H89		E1	Alves i sar. 2010
HM74719	Haplotype	6	Portugalija/Francuska	H31		E1	Alves i sar. 2010
HM74719	Haplotype	3	Španija	H75		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	2	Francuska	H75		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	19	Iberija	H10		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	11	Iberija	H5		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	6	Iberija	H10		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	15	Iberija	H84		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	14	Španija	H5		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	6	Španija	H5		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	2	Španija	H10		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	8	Španija	H65		E1	Alves i sar. 2010
HM74720	Haplotype	5	Španija	H10		E1	Alves i sar. 2010
HM74721	Haplotype	11	Španija	H85		E1	Alves i sar. 2010
HM74721	Haplotype	16	Španija	H86		E1	Alves i sar. 2010
HM74721	Haplotype	3	Španija	H84		E1	Alves i sar. 2010
HM74721	Haplotype	5	Španija	H87		E1	Alves i sar. 2010
HM74721	Haplotype	1	Španija	H88		E1	Alves i sar. 2010
HM74721	Haplotype	3	Španija	H10		E1	Alves i sar. 2010
EU36240	AR16	1	Arezzo, Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36241	AR17	1	Arezzo, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36241	AR18	1	Arezzo, Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36241	AR20	1	Arezzo, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36241	AR21	1	Arezzo, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36241	AR22	1	Arezzo, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36241	AR23	1	Arezzo, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36241	AR24	1	Arezzo, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36241	FO1	1	Forli', Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36241	FO2	1	Forli', Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36241	FO3	1	Forli', Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	FO4	1	Forli', Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	FO5	1	Forli', Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	FO6	1	Forli', Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	FO7	1	Forli', Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	FO8	1	Forli', Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	FO9	1	Forli', Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	FO10	1	Forli', Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	SI1	1	Siena, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	SI2	1	Siena, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36242	SI3	1	Siena, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SI4	1	Siena, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SI5	1	Siena, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SI6	1	Siena, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SI7	1	Siena, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SI9	1	Siena, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SA1	1	Salerno, Italija	H77		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SA2	1	Salerno, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SA3	1	Salerno, Italija	H78		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SA4	1	Salerno, Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36243	SA5	1	Salerno, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36244	SA6	1	Salerno, Italija	H76		A	Scandura i sar., 2008
EU36244	SA7	1	Salerno, Italija	H76		A	Scandura i sar., 2008
EU36244	SA8	1	Salerno, Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36244	SA9	1	Salerno, Italija	H70		E2	Scandura i sar., 2008
EU36244	SA10	1	Salerno, Italija	H76		A	Scandura i sar., 2008

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
EU36244	FI27	1	Florence, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36244	FI29	1	Florence, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36244	FI30	1	Florence, Italija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36244	FI31	1	Florence, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36244	FI33	1	Florence, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36245	FI34	1	Florence, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36245	FI36	1	Florence, Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36245	FI37	1	Florence, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36245	FI40	1	Florence, Italija	H70		E2	Scandura i sar., 2008
EU36245	FI47	1	Florence, Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36245	MR1	1	Maremma RP, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36245	MR2	1	Maremma RP, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36245	MR3	1	Maremma RP, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36245	MR4	1	Maremma RP, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36245	MR5	1	Maremma RP, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36246	MR6	1	Maremma RP, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36246	MR8	1	Maremma RP, Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36246	MR9	1	Maremma RP, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36246	MR11	1	Maremma RP, Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36246	MR12	1	Maremma RP, Italija	H68		E1	Scandura i sar., 2008
EU36246	MR14	1	Maremma RP, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36246	SR2	1	San Rossore, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36246	SR6	1	San Rossore, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36246	SR10	1	San Rossore, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36246	SR11	1	San Rossore, Italija	H69		E2	Scandura i sar., 2008
EU36247	SR12	1	San Rossore, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36247	SR15	1	San Rossore, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36247	SR16	1	San Rossore, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36247	SR17	1	San Rossore, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36247	SR18	1	San Rossore, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36247	SR20	1	San Rossore, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36247	CP6	1	Castel Porziano, Italija	H71		E2	Scandura i sar., 2008
EU36247	CP8	1	Castel Porziano, Italija	H70		E2	Scandura i sar., 2008
EU36247	CP10	1	Castel Porziano, Italija	H70		E2	Scandura i sar., 2008
EU36248	CP13	1	Castel Porziano, Italija	H70		E2	Scandura i sar., 2008
EU36248	CP14	1	Castel Porziano, Italija	H70		E2	Scandura i sar., 2008
EU36248	CP15	1	Castel Porziano, Italija	H70		E2	Scandura i sar., 2008
EU36248	CP16	1	Castel Porziano, Italija	H70		E2	Scandura i sar., 2008
EU36248	CP20	1	Castel Porziano, Italija	H71		E2	Scandura i sar., 2008
EU36248	CP26	1	Castel Porziano, Italija	H71		E2	Scandura i sar., 2008
EU36248	SS1	1	Sardinija, Italija	H79		E2	Scandura i sar., 2008
EU36248	SS4	1	Sardinija, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36248	SS16	1	Sardinija, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36248	SS33	1	Sardinija, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	SS36	1	Sardinija, Italija	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	SS37	1	Sardinija, Italija	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	SS38	1	Sardinija, Italija	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	SS42	1	Sardinija, Italija	H80		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	SS43	1	Sardinija, Italija	H81		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	SS45	1	Sardinija, Italija	H82		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	SS48	1	Sardinija, Italija	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	SS50	1	Sardinija, Italija	H83		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	GO1	1	Gorizia, Italija	H57		E1	Scandura i sar., 2008
EU36249	GO4	1	Gorizia, Italija	H57		E1	Scandura i sar., 2008
EU36250	GO5	1	Gorizia, Italija	H57		E1	Scandura i sar., 2008
EU36250	GO6	1	Gorizia, Italija	H57		E1	Scandura i sar., 2008
EU36250	GO11	1	Gorizia, Italija	H57		E1	Scandura i sar., 2008
EU36250	GO13	1	Gorizia, Italija	H57		E1	Scandura i sar., 2008
EU36250	GO15	1	Gorizia, Italija	H57		E1	Scandura i sar., 2008



Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
EU36250	GO18	1	Gorizia, Italija	H57		E1	Scandura i sar., 2008
EU36250	GO19	1	Gorizia, Italija	H57		E1	Scandura i sar., 2008
EU36250	SP2	1	Španija	H10		E1	Scandura i sar., 2008
EU36250	SP3	1	Španija	H10		E1	Scandura i sar., 2008
EU36250	SP6	1	Španija	H10		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	SP8	1	Španija	H10		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	SP9	1	Španija	H10		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	SP10	1	Španija	H10		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	SP12	1	Španija	H10		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	SP13	1	Španija	H10		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	SP15	1	Španija	H10		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	FR2	1	Francuska	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	FR3	1	Francuska	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	FR6	1	Francuska	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36251	FR8	1	Francuska	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	FR10	1	Francuska	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	FR11	1	Francuska	H2		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	FR13	1	Francuska	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	FR15	1	Francuska	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	FR16	1	Francuska	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	FR20	1	Francuska	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	AS1	1	Austrija	H56		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	AS3	1	Austrija	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	AS4	1	Austrija	H60		E1	Scandura i sar., 2008
EU36252	AS5	1	Austrija	H56		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	AS6	1	Austrija	H56		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	AS10	1	Austrija	H56		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	AS11	1	Austrija	H60		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	AS12	1	Austrija	H60		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	AS13	1	Austrija	H31		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	AS14	1	Austrija	H56		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	PO8	1	Poljska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	PO11	1	Poljska	H75		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	PO12	1	Poljska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36253	PO14	1	Poljska	H75		E1	Scandura i sar., 2008
EU36254	PO16	1	Poljska	H75		E1	Scandura i sar., 2008
EU36254	PO24	1	Poljska	H75		E1	Scandura i sar., 2008
EU36254	PO25	1	Poljska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36254	PO27	1	Poljska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36254	UN1	1	Mađarska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36254	UN2	1	Mađarska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36254	UN9	1	Mađarska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36254	UN10	1	Mađarska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36254	UN15	1	Mađarska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36255	UN17	1	Mađarska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36255	UN18	1	Mađarska	H5		E1	Scandura i sar., 2008
EU36255	UN24	1	Mađarska	H60		E1	Scandura i sar., 2008
EU36255	UN28	1	Mađarska	H60		E1	Scandura i sar., 2008
EU36255	MS15	1	Sardinija, Italija	H72		E1	Scandura i sar., 2008
EU36255	MS17	1	Sardinija, Italija	H73		E1	Scandura i sar., 2008
EU36255	MS18	1	Sardinija, Italija	H73		E1	Scandura i sar., 2008
EU36255	MS26	1	Sardinija, Italija	H74		E1	Scandura i sar., 2008
EU36255	MS28	1	Sardinija, Italija	H74		E1	Scandura i sar., 2008
DQ87293	GL374	1	Rumunija	H150		E1	Larson i sar., 2007
DQ87293	GL392	1	Rumunija	H60		E1	Larson i sar., 2007
DQ87293	GL749	1	Poljska	H5		E1	Larson i sar., 2007
DQ87293	GL750	1	Irak	H102		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87293	GL752	1	Iran	H49		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87293	GL753	1	Iran	H151		E1	Larson i sar., 2007

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
DQ87294	GL754	1	Turska	H48		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87294	GL769	1	Iran	H49		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87294	GL771	1	Iran	H152		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87294	GL779	1	Irak	H2		E1	Larson i sar., 2007
DQ87294	GL781	1	Iran	H152		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87294	GL783	1	Iran	H139		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87295	GL786	1	Iran	H153		A	Larson i sar., 2007
DQ87295	GL788	1	Iran	H148		A	Larson i sar., 2007
DQ87295	GL789	1	Iran	H2		E1	Larson i sar., 2007
DQ87295	GL791	1	Iran	H154		A	Larson i sar., 2007
DQ87295	GL792	1	Iran	H154		A	Larson i sar., 2007
DQ87295	GL793	1	Iran	H155		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87295	GL794	1	Iran	H154		A	Larson i sar., 2007
DQ87296	GL799	1	Rumunija	H5		E1	Larson i sar., 2007
DQ87296	GL912	1	Iran	H102		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87296	GL918	1	Rusija	H5		E1	Larson i sar., 2007
DQ87296	GL919	1	Rusija	H5		E1	Larson i sar., 2007
DQ87296	GL935	1	?	H5		E1	Larson i sar., 2007
DQ87296	GL940	1	Turska	H156		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87296	GL943	1	Egipat	H152		Near Eastern	Larson i sar., 2007
DQ87296	GL944	1	Georgia	H144		E1	Larson i sar., 2007
DQ87297	GL945	1	Slovakia	H60		E1	Larson i sar., 2007
DQ87297	GL946	1	Mađarska	H5		E1	Larson i sar., 2007
DQ87297	GL948	1	Kos, Grčka	H31		E1	Larson i sar., 2007
DQ87297	GL951	1	Bugarska	H141	B141	E1	Larson i sar., 2007
DQ87298	GL1009	1	Turkmenistan	H148		A	Larson i sar., 2007
DQ37924	113	1	Belgija	H66		A	Fang i sar., 2006
DQ37926	DB-2	1	Kina	H145		A	Fang i sar., 2006
DQ37926	DB-4	1	Kina	H145		A	Fang i sar., 2006
DQ37926	DB-5	1	Kina	H117		A	Fang i sar., 2006
DQ37926	DB-3	1	Kina	H131		A	Fang i sar., 2006
DQ37926	HN-8	1	Kina	H146		A	Fang i sar., 2006
DQ37926	HN-9	1	Kina	H147		A	Fang i sar., 2006
DQ37923	Sm10	1	Francuska	H31		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	S1	1	Francuska	H141		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	S2	1	Francuska	H141		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	S3	1	Francuska	H141		E1	Fang i sar., 2006
DQ37923	S4	1	Francuska	H31		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	S6	1	Francuska	H141		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	S7	1	Francuska	H141		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	S8	1	Francuska	H141		E1	Fang i sar., 2006
DQ37926	S9	1	Francuska	H141		E1	Fang i sar., 2006
DQ37926	S10	1	Francuska	H141		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	Sm9	1	Francuska	H31		E1	Fang i sar., 2006
DQ37923	96	1	Belgija	H143		E1	Fang i sar., 2006
DQ37923	105	1	Belgija	H143		E1	Fang i sar., 2006
DQ37924	mitS1	1	Francuska	H75		E1	Fang i sar., 2006
DQ37924	mitS2	1	Francuska	H75		E1	Fang i sar., 2006
DQ37924	mitS3	1	Francuska	H144		E1	Fang i sar., 2006
DQ37924	Sm1	1	Francuska	H75		E1	Fang i sar., 2006
DQ37924	Sm2	1	Francuska	H75		E1	Fang i sar., 2006
DQ37924	Sm4	1	Francuska	H75		E1	Fang i sar., 2006
DQ37924	Sm5	1	Francuska	H75		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	Sm6	1	Francuska	H75		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	Sm7	1	Francuska	H75		E1	Fang i sar., 2006
DQ37925	Sm8	1	Francuska	H75		E1	Fang i sar., 2006
DQ37923	81	1	Belgija	H86		E1	Fang i sar., 2006
DQ37923	83	1	Belgija	H86		E1	Fang i sar., 2006
DQ37923	89	1	Belgija	H86		E1	Fang i sar., 2006

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
DQ37923	78	1	Belgija	H142		E1	Fang i sar., 2006
DQ37924	114	1	Belgija	H10		E1	Fang i sar., 2006
AY88460	GL43	1	Indonezija	H91		A	Larson i sar., 2005
AY88461	GL44	1	Kina	H92		A	Larson i sar., 2005
AY88461	GL45	1	Indonezija	H93		A	Larson i sar., 2005
AY88461	GL46	1	Indija	H94		A	Larson i sar., 2005
AY88461	GL48	1	Indonezija	H95		A	Larson i sar., 2005
AY88461	GL51	1	Papua Nova Gvineja	H96		A	Larson i sar., 2005
AY88461	GL52	1	Španija	H97		E1	Larson i sar., 2005
AY88461	GL53	1	Tajvan	H98		A	Larson i sar., 2005
AY88461	GL54	1	Pakistan	H99		A	Larson i sar., 2005
AY88461	GL55	1	Turska	H100		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88462	GL56	1	Nepal	H101		A	Larson i sar., 2005
AY88462	GL57	1	Novi Zeland	H2		E1	Larson i sar., 2005
AY88462	GL59	1	Iran	H102		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88462	GL60	1	Burma	H103		A	Larson i sar., 2005
AY88462	GL62	1	Indonezija	H104		A	Larson i sar., 2005
AY88462	GL63	1	Nemačka	H2		E1	Larson i sar., 2005
AY88462	GL64	1	Kina	H105		A	Larson i sar., 2005
AY88462	GL65	1	Sardinija	H79		E2	Larson i sar., 2005
AY88462	GL67	1	Burma	H103		A	Larson i sar., 2005
AY88463	GL68	1	Tajland	H103		A	Larson i sar., 2005
AY88463	GL70	1	Malezija	H106		A	Larson i sar., 2005
AY88463	GL71	1	Francuska	H107		E1	Larson i sar., 2005
AY88463	GL72	1	Japan	H108		A	Larson i sar., 2005
AY88463	GL73	1	Morocco	H5		E1	Larson i sar., 2005
AY88463	GL75	1	Sri Lanka	H109		A	Larson i sar., 2005
AY88463	GL76	1	Papua Nova Gvineja	H110		A	Larson i sar., 2005
AY88463	GL77	1	Iran	H111		A	Larson i sar., 2005
AY88463	GL78	1	Kina	H105		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL79	1	Kina	H112		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL80	1	Kina	H113		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL81	1	Kina	H76		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL83	1	Indija	H114		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL84	1	Indonezija	H115		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL85	1	Indonezija	H116		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL86	1	Malezija	H117		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL87	1	Burma	H118		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL88	1	Indonezija	H119		A	Larson i sar., 2005
AY88464	GL89	1	Indonezija	H101		A	Larson i sar., 2005
AY88465	GL99	1	Indonezija	H120		A	Larson i sar., 2005
AY88465	GL100	1	Indonezija	H121		A	Larson i sar., 2005
AY88465	GL101	1	Indonezija	H119		A	Larson i sar., 2005
AY88466	GL102	1	Indonezija	H122		A	Larson i sar., 2005
AY88466	GL103	1	Indonezija	H123		A	Larson i sar., 2005
AY88466	GL104	1	Indonezija	H124		A	Larson i sar., 2005
AY88466	GL105	1	Indonezija	H125		A	Larson i sar., 2005
AY88466	GL107	1	Nemačka	H31		E1	Larson i sar., 2005
AY88466	GL108	1	Nemačka	H2		E1	Larson i sar., 2005
AY88466	GL109	1	Nemačka	H5		E1	Larson i sar., 2005
AY88466	G110	1	Nemačka	H2		E1	Larson i sar., 2005
AY88466	GL111	1	Sardinija	H2		E1	Larson i sar., 2005
AY88466	GL112	1	Holandija	H2		E1	Larson i sar., 2005
AY88467	GL113	1	Makedonija	H10	B10b	E1	Larson i sar., 2005
AY88467	GL133	1	Norveška	H10		E1	Larson i sar., 2005
AY88467	GL135	1	Indija	H94		A	Larson i sar., 2005
AY88467	GL136	1	Indija	H94		A	Larson i sar., 2005
AY88467	GL138	1	Malezija	H119		A	Larson i sar., 2005
AY88467	GL140	1	USA/Hawaii	H126		A	Larson i sar., 2005

Br. u Gen Banci	Kod jedinke	Br. jedinki	Lokacija	Haplotip set sekvenci čitav svet	Haplotip set sekvenci Balkan	Haplogrupa	Izvor
AY88467	GL141	1	Jermenija	H2		E1	Larson i sar., 2005
AY88468	GL142	1	Jermenija	H102		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88468	GL143	1	Korzika	H57		E1	Larson i sar., 2005
AY88468	GL144	1	Sardinija	H107		E1	Larson i sar., 2005
AY88468	GL147	1	Kina	H105		A	Larson i sar., 2005
AY88468	GL148	1	Kina	H127		A	Larson i sar., 2005
AY88468	GL154	1	Indonezija	H128		A	Larson i sar., 2005
AY88468	GL155	1	Indonezija	H129		A	Larson i sar., 2005
AY88468	GL156	1	Indonezija	H130		A	Larson i sar., 2005
AY88468	GL162	1	Indija	H94		A	Larson i sar., 2005
AY88469	GL190	1	Sardinija	H79		E2	Larson i sar., 2005
AY88469	GL191	1	Rusija/Vladivostok	H131		A	Larson i sar., 2005
AY88469	GL192	1	Rusija/Vladivostok	H131		A	Larson i sar., 2005
AY88469	GL193	1	Jermenija	H132		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88469	GL194	1	Jermenija	H133		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88469	GL195	1	Burma	H134		A	Larson i sar., 2005
AY88469	GL220	1	Korzika	H135		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88469	GL221	1	Portugalija	H5		E1	Larson i sar., 2005
AY88469	GL222	1	Portugalija	H75		E1	Larson i sar., 2005
AY88470	GL232	1	Kina	H66		A	Larson i sar., 2005
AY88470	GL235	1	Indija	H136		A	Larson i sar., 2005
AY88471	GL236	1	Jermenija	H102		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88471	GL237	1	Rusija/Siberija	H137		A	Larson i sar., 2005
AY88471	GL240	1	Burma	H103		A	Larson i sar., 2005
AY88471	GL241	1	Indija	H101		A	Larson i sar., 2005
AY88471	GL242	1	Španija	H67		E1	Larson i sar., 2005
AY88471	GL244	1	Italija	H138		E2	Larson i sar., 2005
AY88471	GL245	1	Italija	H69		E2	Larson i sar., 2005
AY88471	GL246	1	Italija	H69		E2	Larson i sar., 2005
AY88471	GL247	1	Italija	H70		E2	Larson i sar., 2005
AY88472	GL248	1	Italija	H70		E2	Larson i sar., 2005
AY88472	GL249	1	Italija	H70		E2	Larson i sar., 2005
AY88472	GL250	1	Italija	H69		E2	Larson i sar., 2005
AY88472	GL251	1	Italija	H69		E2	Larson i sar., 2005
AY88472	GL252	1	Italija	H2		E1	Larson i sar., 2005
AY88472	GL254	1	Iran	H139		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88472	GL270	1	Jermenija	H140		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88472	GL271	1	Jermenija	H102		Near Eastern	Larson i sar., 2005
AY88481	LeiffFranc	1	Francuska	H141		E1	Larson i sar., 2005
AY23286	SWB1	1	Španija	H86		E1	Alves i sar., 2003
AY23286	SWB2	1	Španija	H86		E1	Alves i sar., 2003
AY23287	SWB3	1	Španija	H86		E1	Alves i sar., 2003
AY23287	SWB6	1	Španija	H10		E1	Alves i sar., 2003
AY23287	SWB4	1	Španija	H90		E1	Alves i sar., 2003
AY23287	SWB5	1	Španija	H90		E1	Alves i sar., 2003
AY23287	SWB7	1	Španija	H65		E1	Alves i sar., 2003
AF136555	EWB1	1	Poljska	H149		E1	Giuffra i sar., 2000
AF136556	EWB2	1	Poljska	H5		E1	Giuffra i sar., 2000
AF136563	EWB3	1	Italija	H70		E2	Giuffra i sar., 2000

## 11. EXTENDED ABSTRACT IN ENGLISH

**Introduction:** The wild boar (*Sus scrofa*) is one of the most abundant wild ungulates. Native to Europe, Asia and northern Africa, it is an important wildlife species, both economic and ecologically (Briedermann, 1990; Randi, 2005; Oliver & Leus, 2008;). Strong demographic declines and regional extinctions occurred in wild boar populations in several European countries during the nineteenth and early twentieth centuries; mainly due to human impacts on the ecosystem such as hunting pressure, changing agricultural practices, habitat transformation, etc. (Appolonio *et al.*, 1988; Massei & Genov, 2000; Appolonio *et al.*, 2010; Linnel & Zachos, 2011). In the last four decades, wild boars have recovered most of their native habitat and have shown a remarkable increase in population density (Fonseca, 2004; Ferreira *et al.*, 2009; Appolonio *et al.*, 2010; Scandura *et al.*, 2011). In the late 19<sup>th</sup> century, when many species became locally extinct, wildlife protection became a widespread concern (Primack, 2012). More recently, advances in molecular biology have provided new tools for wildlife management and conservation, with the diversification of molecular tools promoting their generalized usage, which continues apace (DeYoung & Honeycutt, 2005). However, the vast majority of molecular investigations have dealt with small populations facing high inbreeding effects and genetic drift (Frankham *et al.*, 2010; Tammeleht *et al.*, 2010). Studies of genetic variation in large, continuous and expanding populations are rare, since the effects are less visible. However, in large expanding populations, intraspecific introgression may occur and remain hidden but, nonetheless, adversely affect locally-adapted populations (Frankham *et al.*, 2010; Linnel & Zachos, 2011). Therefore, additional attention should be paid to genetic studies of large continuous populations.

The genetic diversity and geographical distribution of many European temperate species has been shaped by Quaternary climatic oscillations (Hewitt, 2000, 2004). During the Last Glacial Maximum (LGM), species went extinct over large parts of their range in northern Europe, but survived in southern refugia; from where they expanded back into Europe during warmer interglacial periods (Hewitt, 1999, 2000). The southern European

peninsulas (Iberia, Italy and the Balkans), along with the Caspian/Caucasus region, served as the primary refugial areas for many animal and plant species (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 1999, 2004). Due to the absence of large geographical barriers to northward expansion, and its location as a bridge for species coming from Asia Minor during the Pleistocene (Hewitt, 1999), the Balkans have been postulated as the primary source of post-glacial expansions and represent one of the most important European genetic reservoirs of game species (Kasapidis *et al.*, 2005; Stamatis *et al.*, 2009; Alexandri *et al.*, 2012).

The knowledge of species genetic diversity and structure is one of the most important aspects in wildlife population management and conservation. Scientific and practical interest in large mammals and their genetics and conservation in Europe has grown recently, perhaps due to the increased need for science based management plans (Zachos & Hackländer, 2011). Science based management plans is needed because of growing conflicts between human interests and population expansion of large carnivores or herbivores that inevitably lead to livestock depredation and crop and forest damage (Randi, 2011; Appolonio *et al.*, 2010). Since the wild boar populations in Europe are continuously expanding, management strategies of this species should be based on a complete understanding of the factors determining its adaptation to a wide range of environmental conditions. Therefore, a detailed insight into the genetic diversity of wild boars is of great importance, and it is particularly important to understand how the Quaternary fluctuations in the past and anthropogenic factors during the last century, influenced the genetic diversity and demographic structure of this important wildlife species.

Due to the all named factors, accompanied by the developments of molecular genetic tools for wildlife management and conservation, wild boar populations in Europe and worldwide have become in a scope of interest in different studies (Vernesi *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006, 2009; Scandura *et al.*, 2008, 2011; Alexandri *et al.*, 2012; Alves *et al.*, 2010; Kusza *et al.*, 2014), dealing with the investigations of genetic diversity and phylogeny of this game species. The genetic diversity and population structure of wild boars in the Northern Dinaric Balkan region (western, northern and central Balkans)

are not well known because an extensive survey covering most of the Balkan Peninsula has not yet been carried out. The first characterizations of wild boars in the western part of the Balkans involved microsatellite analysis of several wild boar populations from Serbia, Croatia and Bosnia, and revealed high genetic diversity and population structuring (Velickovic *et al.*, 2010, 2012). These studies revealed structuring similar to that found in genetic analysis of Portuguese wild boars, where it was suggested that to a certain extent rivers could act as geographical barriers for this species (Ferreira *et al.*, 2006, 2009). In both areas, the defined genetic clusters presented overlapping distributions and admixture in the contact areas, suggesting that river barriers could not completely explain the observed divergence. Similar structuring has been observed in brown hares, where the occurrence of Anatolian lineages east of the Nestos River in northeastern Greece (Stamatis *et al.*, 2009) suggests that this river does not represent a substantial barrier to gene flow. Different genetic clusters were also found in wild boar populations in Bulgaria (Nikolov *et al.*, 2009). A high proportion of unique mtDNA haplotypes among wild boars has been revealed in Greece, indicating the Balkans as the main refugial area for the species (Alexandri *et al.*, 2012). These authors suggested the hypothesis that after LGM wild boars from the Balkans recolonized Central and Eastern Europe by the model of "leading edge" dispersal. Kusza *et al.* (2014) pointed out that in order to prove this hypothesis of "leading edge" dispersal of wild boars from Balkans to Central Europe and further, it is crucial to analyze samples from the Northern Dinaric Balkans where no data on wild boar mtDNA diversity is available. Strong evidence for northward expansion out of the Balkans has also been shown for other species such as the brown hare (Kasapidis *et al.*, 2005; Stamatis *et al.*, 2009) and marbled white butterfly (Schmitt *et al.*, 2006).

Previous genetic research of wild boar populations in Europe provided relevant, but insufficient, information about the distribution of genetic variation across the species' range. It was stressed by Kusza *et al.* (2014) that it is essential to perform genetic analysis of wild boars from the Northern Dinaric Balkan region in order to answer questions of postglacial routes of colonization of Eastern and Central Europe. This study was designed

in order to provide a more detailed insight into the patterns of genetic variation and population structure of wild boars across Europe, especially in the Balkans.

**Aims:** This research was performed in order to assess population structure, genetic diversity, phylogeny and phylogeography of wild boars in Europe based on microsatellites and mtDNA sequences analyses, with a specific aims to: (1) estimate polymorphism of 11 tetranucleotide microsatellites and detect all present alleles and their frequency; (2) define population structure of wild boars in Europe and basic genetic indices of intra- and interpopulation variability such as heterozygosity, gene flow, hybridisation and number of migrants; (3) assessment of current levels of genetic diversity and inbreeding in defined subpopulations and testing subpopulations for bottleneck with the aim to understand demographic history of wild boars in Europe; (4) estimate mtDNA polymorphism and reveal possible structuring of wild boar populations in the Balkans by including numerous individuals from the western, northern and central Balkans; (5) find evidence of demographic expansion of wild boar in the Balkans and Europe; (6) define the role of the Balkan gene pool in the post-LGM recolonization of Europe; (7) and to infer the phylogenetic position of European and Balkan wild boar in a Eurasian context.

**Material and methods:** Total number of 664 wild boar samples was collected from different localities across Serbia, Macedonia, Montenegro, Bosnia and Herzegovina, Croatia, Slovenia, Italy, Portugal, Spain, Czech Republic, Germany, Slovakia and Romania during regular hunting seasons (Fig. 1). Total DNA was extracted using Proteinase K digestion followed by standard phenol-chloroform-isoamylalcohol extraction (Sambrook & Russel, 2001) and saline extraction procedures (Bruford *et al.*, 1992). Multiplex PCR amplification of 11 tetranucleotide microsatellites was carried out using Animaltype Pig PCR Amplification Kit (Biotype AG, Dresden, Germany) following the manufacturer recommendations. Typing was done by capillary electrophoresis on the ABI3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystem). The products of fragment analysis of these 11 microsatellites were analyzed using Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystem) in comparison to allelic ladder and a control DNA



sample (DL157) of known genotype provided with the kit. In order to infer the existence of population structuring of wild boars in Europe, Bayesian cluster analyses implemented in STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.*, 2000; Falush *et al.*, 2003, 2007; Hubisz *et al.*, 2009), Geneland 4.0.3. (Guillot *et al.*, 2005a,b) and TESS 2.3. (Durand *et al.*, 2009) were performed. Population structure was also examined through factorial correspondence analysis using GENETIX (Belkhir *et al.*, 2004). Detection of migrants and hybrids between subpopulations was performed using computer package NEWHYBRIDS 1.0 (Anderson and Thompson 2002). Bottleneck analysis was carried out in each defined wild boar subpopulation in Europe using program BOTTLENECK (Cornuet & Luicart, 1996). Computer package ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) was used to assess potential HWE and LE deviations as well as to estimate allele frequencies and gene diversity for the inferred subpopulations and the total population. Analysis of molecular variance (AMOVA) and pairwise genetic distances among the inferred subpopulations ( $F_{ST}$ ) was also estimated with ARLEQUIN. Based on calculated  $F_{ST}$  values and Nei Da genetic distances UPGMA dendograms were constructed using POPTREE 2 (Takezaki *et al.*, 2010) in order to visualize genetic relations among defined wild boar subpopulations.

A fragment of the mtDNA control region (CR1-mtDNA) was amplified in 163 wild boars from the western, northern and central Balkans (Fig. 2). In order to get a better insight into the genetic diversity and demographic history of wild boars in the Balkan Peninsula, the sequences generated in this study were combined with other Balkan wild boar sequences retrieved from GeneBank (Larson *et al.*, 2007; Alexandri *et al.*, 2012) and the total dataset consisted of 351 mtDNA control region sequences. In further analyses, we included an additional 589 mtDNA control region sequences retrieved from GenBank (Alves *et al.*, 2003; Larson *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2006, Larson *et al.*, 2007; Scandura *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2010; van Asch *et al.*, 2011; Alexandri *et al.*, 2012) and this final dataset comprised 940 mtDNA wild boar sequences, sampled worldwide. For each downloaded haplotype, the respective numbers of individuals per haplotype were obtained from the original publication. Both datasets (Balkans and worldwide) were aligned using the Clustal W algorithm (Thompson *et al.*, 1994) implemented in MEGA5

(Tamura *et al.*, 2011), and final adjustments were done by eye. After alignment, both sequence sets were trimmed. The final length of sequences in the Balkan dataset was 443-bp whereas, for the worldwide dataset, a shorter segment of 411bp was used, equivalent to that reported by Scandura *et al.* (2008). MEGA 5 was also used to determine, separately, the best-fit model of nucleotide substitution for each dataset. DNA polymorphism ( $h$  – haplotype diversity,  $\pi$  – nucleotide diversity,  $k$  – mean number of pairwise differences) for both datasets was estimated using ARLEQUIN. Median-joining (MJ) networks (Bandelt *et al.*, 1999) were constructed for both datasets using the software Network 4.6.1.1 (available at <http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>). The Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) model of nucleotide substitution with Gamma correction for among-site variation in substitution rates was the best-fit for both datasets, and these parameters were used as priors in MrBayes ver.3.2 for construction of Bayesian phylogenetic trees (Ronquist *et al.*, 2012). Based on the MJ network and Bayesian inference tree, all individual sequences from the Balkans were clustered into two groups: South Balkan and Continental Balkan. The worldwide dataset was divided into four groups according to the observed mtDNA haplogroups: Asian, Near Eastern, E1 European and E2 European. Basic genetic indices for each group in both datasets were calculated using ARLEQUIN. Population genetic structure among and within analyzed groups in both cases were estimated by an analysis of molecular variance (AMOVA) implemented in ARLEQUIN. To gain an insight into the possible demographic history of wild boars from the Balkans and Europe, mismatch analysis and neutrality tests were performed. In addition, the demographic history of the European E1 haplogroup was inferred using the Bayesian skyline plot (BSP) methodology (Drummond *et al.*, 2005) as implemented in BEAST v.1.8.0 (Drummond *et al.*, 2012).

**Results:** In order to investigate genetic variability and population structure of wild boars in Europe, the analysis of 11 tetranucleotide microsatellites was performed. All markers showed high level of polymorphism, and number of observed alleles per locus varied from 9 at locus SBH19 to 29 at locus SBH20, with an average of 18.8 alleles per locus (Tab. 4). The first goal of this study was to assess genetic structure of wild boars across

Europe using several computer packages. For the STRUCTURE analysis Evanno *et al.* (2005) showed that  $\Delta K$  method detects the uppermost level of population structure when several hierarchical levels exist. Based on this fact, the STRUCTURE analysis (estimation of the number of groups with the  $\Delta K$  method + assignment of the individuals to the groups) was repeated on each of the  $K$  groups inferred in the previous step. This process was repeated until the number of genetic groups inferred was 1, or the number of individuals was small. In total, four levels of population structuring was observed and 664 individuals were assigned to 11 genetic clusters: (i) Castel Porziano (Italy); (ii) Slovenia Littoral; (iii) Bosnia (7 samples), Herzegovina, Montenegro, Czech Republic (3) and Romania (2); (iv) Macedonia; (v) Serbia, Croatia, Bosnia (8 samples), Slovenia Czech Republic (6), Romania (4) and Germany (1); (vi) Central Europe (72 samples); (vii) South Portugal; (viii) North Iberia; (ix) Central Iberia; (x) Cuneo and Savona (Italy); (xi) La Mandria, Lanzo (Italy) and Central Europe (5 samples) (Fig. 3-8). Geneland and TESS analyses were performed for all 664 samples and for each peninsula and Central Europe separately. Geneland analysis of all samples revealed 7 genetic clusters (Fig. 9), while in TESS analysis 11 clusters were obtained which corroborated to clusters defined after hierarchical STRUCTURE analysis (Fig. 13). Both Geneland and TESS analyses revealed 4 genetic clusters on Balkans and 4 on Iberia (Fig. 10, 11, 14 & 15). In Italy, Geneland analysis showed 4 different clusters (Fig. 9), while in TESS analysis 3 clusters were observed (Fig. 16), the same ones as in STRUCTURE analysis. In the analysis of Central Europe, both Geneland and TESS revealed one cluster, but it was shown that samples from Romania and Slovakia are genetically closer to Balkans than to other Central European samples. Factorial Correspondence Analysis (FCA) was also applied for assessing the degree of structuring and results corroborated the results of Bayesian clustering (Fig. 18-22). The final population structure was defined based on results of NEWHYBRIDS analysis and 664 individuals were assigned to 13 subpopulations: (i) Continental Balkans [Serbia, Croatia, Bosnia (8 samples), Slovenia], Czech Republic (6), Romania (4) and Germany (1); (ii) Littoral Balkans [Montenegro, Herzegovina, Bosnia (7 samples)], Czech Republic (3) and Romania (2); (iii) Macedonia; (iv) Slovenia Littoral; (v) Cuneo and Savona (Italy); (vi) Lanzo (Italy), Czech Republic (4) and

Germany (1); (vii) La Mandria (Italy); (viii) Castel Porziano (Italy); (ix) South Portugal; (x) Central Portugal and South Spain; (xi) Central and Western Spain; (xii) North Iberia; (xiii) Central Europe (72 samples). Geographically close subpopulations were pairwise analyzed for hybrid or parental origin of each individual (Fig. 23-27). For most individuals, the genotype-based assignment matched their previous geographic clustering criterion. However, according to their genotype, some individuals were either clearly miss-assigned appeared to be F1 hybrids or migrants or their origin could not be determined. The relative excess of  $H_E$  predicted in bottlenecked populations (Cornuet & Luikart, 1996) was not observed in the inferred wild boar subpopulations in Europe (Tab. 1-3). The observed heterozygosity for all samples varied between 0.31 and 0.83, with a mean of 0.68, while expected heterozygosity ranged between 0.60 to 0.89, with a mean of 0.81 (Tab. 6). Observed heterozygosity per locus and per subpopulations varied from 0.05 at loci SBH19 and SBH22 for the subpopulation Castel Porziano to 0.94 at locus SBH18 in the subpopulation Slovenia Littoral. Considering 13 defined subpopulations, in 12 of them from two to six loci showed significant deviations from the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE). Analysis of molecular variance showed higher interpopulation variability (92.51%) comparing to intrapopulation variability (7.49%) (Tab.7). Genetic distances between pairs of subpopulations, calculated using  $F_{ST}$  estimator, were always highly significant ( $p < 0.001$ ). Most of estimated values corresponded to moderate to high values of genetic differentiation (Wright 1978). Only 12 out of 78 combinations showed low level of genetic differentiation (Tab. 8). UPGMA genetic trees showed that subpopulations Slovenia Littoral and Castel Porziano were separated from all others with 100 bootstraps (Fig. 28 & 29).

In the analysis of CR1-mtDNA in wild boars from the Balkans, total of 65 different haplotypes were identified, based on 54 variable sites. Overall haplotype diversity ( $h$ ) was 0.8722, nucleotide diversity ( $\pi$ ) was 0.0063, and the average number of nucleotide differences ( $k$ ) was 2.784. Based on the MJ network (Fig. 30) and Bayesian tree (Fig. 31), all individuals (i.e. individual sequences) from the Balkans could be assigned to one of two groups (South Balkan or Continental Balkan). All sequences obtained in this study were grouped in Continental Balkan group. Haplotype B33

(Alexandrii et al., 2012) remained ungrouped and in further analyses was clustered with Asian haplotypes. The South Balkan group includes majority of wild boars from north, west and central (NWC) Greece, and one sample from north-eastern (NE) Greece. The Continental Balkan group mainly includes wild boars from Serbia, Macedonia, Montenegro, Bosnia and Herzegovina, Croatia, Slovenia, north-eastern Greece and Bulgaria. Bayesian inference strongly supports the monophyly of all haplotypes belonging to haplogroup European E1, relative to the haplotype B33 that belongs to the Asian haplogroup (Fig. 31). The analysis suggests a paraphyletic relationship of the haplotypes comprising the South Balkan haplogroup relative to the Continental Balkan haplotypes. However, despite high probability (89%), the support for a South Balkan clade is not statistically significant. The basic molecular diversity indices were determined for each group, and for all Balkan sequences except haplotype B33 that was assigned to the Asian haplogroup, in order to get a clear overview of the genetic diversity of wild boars in the Balkans (Tab. 10). The mismatch distribution did not show a statistically-significant deviation from expectations under a sudden expansion model in either group or in the overall dataset (Tab. 11). Fu's  $F_s$  test presented statistically-significant negative  $F_s$  values for both Balkan wild boar groups. These findings were supported by the results of the Tajima  $D$  tests, for which significantly negative  $D$  values were found in both groups. Significantly negative Tajima  $D$  and Fu's  $F_s$  values were also obtained when these analyses were performed on the overall Balkan dataset. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed significantly higher genetic variability among (57.37%) than within populations (42.63%) for the Balkan groups (Tab. 12).

In the worldwide dataset, total of 156 different haplotypes were observed, with a total number of 107 polymorphic sites. Due to the reduction in the total length of sequences used for the analyses, several Balkan haplotypes collapsed together in this dataset. Haplotype and nucleotide diversity values were 0.929 and 0.0125, respectively, and the average number of nucleotide differences ( $k$ ) was 5.170. In this dataset, the MJ network (Fig. 32) suggests a haplotype distribution consistent with four major haplogroups: Asian (A), Near Eastern (NE), European E1 and European E2, as previously inferred by other authors (Larson *et al.*, 2005; Scandura *et al.*, 2008;

Alexandri *et al.*, 2012). The mismatch distribution significantly deviated from expectations under a sudden expansion model for the European E2 haplogroup, but not for European E1. Neutrality tests were significantly negative for the E1 haplogroup, but not for E2 (Tab. 11). The Bayesian skyline plot method was also applied by considering three randomly-created datasets within the European E1 haplogroup and the results confirmed demographic expansion of this haplogroup after the LGM (Fig. 33). The analysis of molecular variance, AMOVA, showed a significantly higher percentage of variation among defined groups (71.97%) compared to within groups (28.03%) (Tab. 12). The MJ network and Bayesian tree (Fig. 32 & 34) constructed using the worldwide dataset revealed that all Balkan sequences clustered in the E1 haplogroup, with the exception of one sequence possessing an Asian haplotype (H33). The European E1 haplogroup comprised 90 haplotypes and, among those, 49 haplotypes (54.4%) were unique to Balkan wild boar populations, 11 haplotypes (12.2%) to wild boars from Iberia and 10 haplotypes (11.1%) to Italian wild boars. In the worldwide dataset, a shorter fragment of mtDNA (relatively to the Balkan dataset) was used, only 6 new haplotypes were found in the Northern Dinaric Balkans. Of those six, only two were unique for the Balkans (H58 found in Bosnia and H61 found in Macedonia) and the majority of wild boars sampled in the Northern Dinaric Balkans possessed one of the most frequent haplotypes in Europe (H2, H5, H10, H31). Haplotypes H2 and H31 (and those connected to them in a star-like pattern) correspond to the previously-described “A side” of the European E1 clade (Larson *et al.*, 2005), with all others forming a “C side”. The unique Balkan haplotypes found in wild boars from Serbia, Bulgaria and north-eastern Greece have positions in the network intermediate between these two clusters of the E1 clade. Analyses of individuals from Northern Dinaric Balkans revealed the presence of both “A side” and “C side” haplotypes in the study area, with the prevalence of “C side”.

**Discussion:** The role of the Balkans as one of the refugia in Europe for many species during the LGM is already well known (Hewitt, 1999, 2004; Alexandri *et al.*, 2012). There is evidence that wild boar distribution in Europe followed the general pattern exhibited by the majority of mammalian species (Scandura *et al.*, 2008; Alexandri *et al.*,

2012), and that the re-colonization of Europe might have been predominantly derived from the gene pool of the Balkan Peninsula. This pattern is the most likely one because no northern barriers exist in the Balkans, compared to Iberia and Italy, which are separated from mainland Europe by the Pyrenees and the Alps, respectively (Hewitt, 1999). However, prior to this study, there had never been a comprehensive sampling of wild boar in the Balkans. Presented results provide new information from a large and not previously sampled region of the north, central and western Balkans and provide further evidence to support the role of the Balkans as one of the genetic reservoirs of wild boar in Europe.

Previous genetic studies of wild boars in Europe showed that wild boar populations are rarely homogenous and usually divided in genetically differentiated subpopulations (Ferreira *et al.*, 2006; 2009; Nikolov *et al.*, 2009; Scandura *et al.*, 2008; Veličković *et al.*, 2012). The first step in the comprehensive analysis of 664 wild boars from different location across Europe was the assessment of genetic structure in analyzed sample. Total of 13 genetically differentiated subpopulations were defined based on results of Bayesian clustering, factorial correspondence and NEHYBRIDS analyses. The first round of hierarchical STRUCTURE analysis revealed existence of 3 genetic clusters in analyzed sample of 664 wild boars from Europe: (i) Balkans, Castel Porziano (Italy) and 16 samples from Central Europe; (ii) North Italy and 5 samples from Central Europe; (iii) Iberia and 72 samples from Central Europe (Fig. 3). Observed results are consisted with previous genetic study of wild boar populations in Europe in which it was shown that last glaciation had major impact on present-day genetic diversity and structure of the species (Scandura *et al.*, 2008). The fact that southern European peninsulas formed separate genetic clusters at first level of structuring support the hypothesis that events related to last glaciation shaped genetic diversity of wild boars in Europe. Moreover, findings that all three European peninsulas are clustered together with samples from Central Europe may indicate that all three potential refugees had role in postglacial recolonization of Europe by wild boars. Further STRUCTURE analysis revealed four levels of population structuring and 11 subpopulations were defined. Geneland analysis of 664 wild boars showed 7 genetic clusters, from which 5 clearly corroborated to the

clusters previously defined by STRUCTURE (Fig. 9, clusters 1-5). Cluster of all samples from Iberia with samples from Macedonia was the only one where no meaningful relation between individual assignment and the geographical origin of individuals was found. These findings may indicate that this cluster represents remnant of preglaciation diversity. Based on southern refugia theory before Last Glacial Maximum (LGM) wild boars were widespread on European continent, and during LGM they were retracted to southern peninsulas. Since samples from Iberia are all collected in interior part of the peninsula, and also Macedonia is in interior part of the Balkans, the possible explanation why these samples clustered together is that they are sharing preglaciation diversity. TESS analysis revealed 11 genetic clusters that corroborated in high percent to the clusters defined by STRUCTURE (Fig. 13). Factorial Correspondence Analysis (FCA) was also applied for assessing the degree of structuring. FCA is a canonical analysis that results in a powerful method for recovering maximum information on the genetic relationships among individuals within and between populations using n-dimensional space. Samples were plotted in a 3D diagram, where the three main factors (axes in the diagram) explain 100% of the total inertial value. The results of FCA analysis performed for all 664 samples are matched with first round of STRUCTURE and it was shown that southern European peninsulas represent different clusters and that samples from Central Europe is shared with all three peninsulas (Fig. 18).

If we analyse each peninsula separately, on the Balkans, the main division observed in all analyses was on western, littoral, and eastern, continental, cluster. Similar genetic differentiation was recently found in grey wolf populations on the Balkans based on analysis of CR1-mtDNA sequences (Djan *et al.*, 2014). Due to the fact that the wild boar is one of the most important game species on the Balkans, it is unlikely that observed genetic differentiation on eastern, continental, and western, littoral, subpopulations is caused by hunting pressure or any other anthropogenic factors. Since strong demographic declines and regional extinctions occurred in wild boar populations in several European countries during the nineteenth and early twentieth centuries and a remarkable increase in population density was observed in last four decades, different demographic history of the eastern and western subpopulations could explain this



division. Genetic analysis of wild boar populations from Bulgaria suggested existence of two clusters, one north and one south-west of the Thracian valley, indicating that the Thracian valley acts as barrier to gene flow (Nikolov *et al.*, 2009). The additional explanation of this division was the absence of continuous forest complex in the Thracian valley and the existence of a highway running through half of the valley. In addition, the authors suggested that observed structure may be the result of adaptation of individuals to different environmental conditions. Previous genetic studies in wild boars from Iberia and Western Balkans showed that rivers as geographical barriers could not completely explain the existence of population structuring (Ferreira *et al.*, 2009; Velickovic *et al.*, 2012). Thus, it is unlikely that rivers Drina and Sava represent a barrier to gene flow between Littoral and Continental Balkans subpopulations. On the other hand, the adaptation of individuals to various environmental conditions can not be excluded as possible cause of observed population structuring on the Balkans. Beside this two large subpopulations observed on the Balkans, it was shown that Slovenia Littoral and Macedonia represent separate genetic clusters. Based on NEWHYBRIDS results and  $F_{ST}$  values, the admixture between all pairs of subpopulations on the Balkans was found with exception for subpopulation Slovenia Littoral.

On Iberian peninsula, clinal distribution of samples from south-west to north of peninsula was observed and total of four different subpopulations were defined: (i) South Portugal; (ii) Central Portugal and South Spain; (iii) Central and Western Spain; (iv) Northern Iberia. The observed division was in correlation with previous results of microsatellite analysis of wild boars from Portugal (Ferreira *et al.*, 2009). As it was shown for the Balkans, strong agreement was revealed between results of NEWHYBRIDS analysis and estimations of genetic differentiation based on  $F_{ST}$ .

For samples from Italy, in STRUCTURE and TESS analysis three different clusters were revealed, while in Geneland analysis one more cluster was found. NEWHYBRIDS and FCA analysis confirmed the results of Geneland and following clusters were defined: (i) Castel Porziano; (ii) Cuneo and Savona; (iii) Lanzo; (iv) La Mandria. Factorial correspondence analysis and  $F_{ST}$  values showed that samples from Castel Porziano are highly divergent from all other Italian samples. These findings are in

agreement with previous genetic studies of wild boars from this region (Scandura *et al.*, 2008) in which it was shown that wild boars from Castel Porziano possess divergent mtDNA lineage (European E2). In NEWHYBRIDS analysis of samples from northern Italy, higher number of migrants, hybrids and samples that origin could not be clearly determined were observed, which can be related with historical records that wild boars from French recolonized northwestern Italy in 1920s (Vernesi *et al.*, 2003).

The excess of heterozygosity compared with the value predicted at equilibrium from the observed number of alleles (a signature of demographic decline), was not observed. Similar results were found in microsatellite analysis of Italian and Hungarian wild boar populations (Vernesi *et al.*, 2003), larger number of Italian samples together with several samples from French, Austria, Hungary, Poland and Spain (Scandura *et al.*, 2008) and in wild boars from Bulgaria (Nikolov *et al.*, 2009). In previous analysis of wild boars in Portugal using 6 microsatellites, the evidence of recent bottleneck in Portuguese boar populations was found (Ferreira *et al.*, 2009). In this study samples from larger area of Iberian Peninsula were analyzed and more loci were included, but genetic signal of demographic decline was not observed. On the other hand, evidence of heterozygosity deficiency was found in 6 out of 13 analyzed subpopulations, possibly correlated with a demographic expansion (Maruyama & Fuerst, 1984). The effects of genetic drift are in fact reduced in expanding populations (Slatkin, 1994), and the relative proportion of rare alleles not removed by random drift but contributing only slightly to the heterozygosity is therefore higher than expected in stable populations. Cornuet & Luikart (1996) did not analyze in detail the effects of a population expansion on the relationship between the computed and the equilibrium heterozygosities. However, some of their simulations show that even recent expansions could actually produce a heterozygosity deficiency. These results, combined with the fact that wild boars have a very short generation time (females are fertile at about one year of age, Mauget & Pepin 1991), suggest that observed heterozygosity deficiency might be related to the demographic expansion which occurred in wild boars in the last 50 years.

Above mentioned facts drive to the conclusion that strong population structure of wild boars in Europe exist and that gene flow between defined subpopulations is

relatively small. The last is supported by the fact that small number of migrants and hybrids were revealed and that estimated genetic distances between subpopulations indicated a moderate to high genetic differentiation in 66 out of 78 combinations.

All loci presented a high degree of polymorphism and a total of 207 alleles were detected in 664 wild boars, with a mean of 18.8 alleles per locus (Tab. 4). In comparison to number of alleles provided by manufacturer of Animaltype Pig Kit (Biotype, Dresden, Germany), in this study 42 new alleles were found. New alleles were observed in 10 of 11 analyzed loci, while in locus SBH18 one allele less was found comparing to referent set. Animaltype Pig Kit was previously used in analysis of wild boar populations from Italy (Caratti *et al.*, 2010). Comparing to that study, in this study 68 new alleles were detected, 1-10 new alleles per locus. The highest number of alleles was found in locus SBH20, and this finding is in accordance with referent set and results of Caratti *et al.* (2010). The highest number of alleles per locus was observed in subpopulation Continental Balkan ( $N_A=13.5$ ), while lowest number was recorded in subpopulation Castel Porziano ( $N_A=4$ ). In subpopulation Continental Balkan the highest number of private alleles was found. High genetic diversity according to number of alleles per locus had been earlier reported for wild boars in this part of the Balkans ( $N_A=19$ , Veličković *et al.*, 2012). In earlier microsatellite analysis of wild boars from Castel Porziano higher number of alleles per locus was reported (Vernesi *et al.*, 2003) comparing to number of alleles observed in this study. In this research higher number of alleles per locus was found comparing to previous microsatellites analyses of wild boars from different parts of Europe (Vernesi *et al.*, 2003; Ferreira *et al.*, 2006; 2009; Scandura *et al.*, 2008; Nikolov *et al.*, 2009). Possible reasons named differences is that in all previous analyses from 6 to a maximum of 10 dinucleotide microsatellites were used. In this study analysis of 11 tetranucleotide microsatellite markers was performed which correspond to analysis of 15 dinucleotide microsatellites, and this is in accordance with the higher resolution obtained.

The observed heterozygosity was highest in subpopulation Littoral Balkan ( $H_O=0.74$ ), while the lowest was in subpopulation Castel Porziano ( $H_O=0.44$ ) (Tab. 6). The high observed heterozygosity values were also detected in subpopulations Continental Balkan, Macedonia, Cuneo and Savona, La Mandria, North Iberia and

Central and Western Spain (0.70-0.73). Similar values of these parameters were reported earlier in wild boars from Italy and Hungary (Vernesi *et al.*, 2003). In wild boar populations from Bulgaria lower heterozygosity was detected ( $H_o=0.62$ , Nikolov *et al.*, 2009), as well as in Portuguese and Italian wild boars ( $H_o=0.63$ , Ferreira *et al.*, 2009;  $H_o=0.65$ , Scandura *et al.*, 2008).

In the analysis of all 664 wild boars from Europe, statistically significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium at all loci was observed, as well as statistically significant deviation from linkage disequilibrium for 54 pairs of loci out of 55 possible combinations. According to Hartl and Clark (2007) statistically significant deviation from HWE conditions might represent evidence of population structure, which was confirmed for the analyzed sample. In the same way, linkage disequilibrium (between unlinked loci) in a population might also indicate an admixture between subpopulations with different allele frequencies (Nei & Li, 1972). The number of loci that deviate from HWE conditions was lower when individual subpopulations were analyzed, and significant deviation from linkage disequilibrium was found for 1-5 pairs of loci out of 55 possible combinations in 12 subpopulations. In subpopulation La Mandria 13 pairs of loci out of 55 possible combinations showed deviation from linkage disequilibrium. In this subpopulation highest number of loci also deviated from HWE (6 out of 11 analyzed loci). These results correspond to STRUCTURE and NEWHYBRIDS results, where it was shown that higher number of migrants and hybrids exist in this subpopulation.

In the analysis of molecular variance (AMOVA) higher variability was observed within defined subpopulations (92.51%) than among subpopulations (7.49%). Similar values of intra- and interpopulation variability were reported in the study of wild boar populations in Bulgaria (Nikolov *et al.*, 2009). Most of estimated values of  $F_{ST}$  were moderate to high values of genetic differentiation and only 12 out of 78 combinations showed low level of genetic divergence. Moderate and high values of this estimator were also observed in Portuguese wild boars (Ferreira *et al.*, 2009), as well as in wild boars from Italy and Hungary (Vernesi *et al.*, 2003). In the analysis of wild boars from Bulgaria

moderate level of genetic divergence was reported, while high level of genetic differentiation was observed in wild boars from Germany (Nikolov *et al.*, 2009).

UPGMA trees showed that subpopulations Slovenia Littoral and Castel Porziano were separated from all others with 100 bootstraps (Fig. 28 & 29). The fact that animals in littoral part of Slovenia are clearly separated from all other subpopulations could be related with data that wild boars in this area are phenotypically different, characterized as “small boars“ because of low body weight during the whole life cycle, and probably they were introduced in this part of Slovenia from Italy. In wild boar samples from Castel Porziano earlier studies on mtDNA sequences showed that they possess divergent mtDNA lineage, European E2, and that this lineage represents remnant of preglaciation diversity in Italy (Larson *et al.*, 2007; Scandura *et al.*, 2008). Thus, it was expected that subpopulation Castel Porziano is divergent from other analyzed subpopulations.

According to derived data, high genetic diversity is present in wild boar populations in Europe, indicating high genetic potential of the species, since for large continuously dispersed populations of mammals medium level of genetic polymorphism is expected. The highest level of genetic variability was observed in subpopulation Continental Balkan, confirming the fact that Balkans represent biodiversity hotspot and very important genetic reservoir of game species. On the other hand, lower levels of genetic diversity were observed in subpopulations Castel Porziano, Slovenia Littoral and South Portugal, indicating that these subpopulations might be isolated.

In the analysis of CR1-mtDNA sequences high variability was found in wild boars from the Balkans ( $h=0.872$ ) as it was expected. Similar haplotype diversity was obtained for Italian ( $h=0.866$ ; Scandura *et al.*, 2008) and Central European wild boars ( $h=0.89$ ; Alves *et al.*, 2010), while similar analysis of Iberian wild boar populations showed even higher levels of genetic diversity ( $h=0.92$ ; Alves *et al.*, 2010). One of the predictions of the southern refugia theory (Hewitt, 1999, 2000) is that genetic diversity will decrease in a south to north cline. The similar values of haplotype diversity obtained for the southern peninsulas and Central Europe do not support this prediction. However, the total number and the number of unique haplotypes were higher in all southern peninsulas compared to Central Europe. Therefore, the main contributor to the high genetic diversity found in

Balkan wild boars may be the high frequency of unique haplotypes found (49, corresponding to 54.4% of the haplotypes within the E1 haplogroup). The majority of unique haplotypes were found in samples from the southern part of the Balkan Peninsula: Greece (43 haplotypes), southern Serbia (H61), and south-eastern Bulgaria (H8). Another three unique Balkan haplotypes (H43, H9 and H52) were shared between the central and southern part of the peninsula (Central Serbia, Bulgaria and Greece), and only one was found in the north (Bosnia, H58). Furthermore, the most frequent haplotypes within the E1 haplogroup (H2, H5, H10, H31), which are also shared among different peninsulas and Central European countries, were detected in the majority of wild boars sampled in the northern and western Balkans. Both these findings support the scenario of a post-glacial northward expansion of wild boars from the Balkans to Central Europe and beyond, with the gene pool from the northern and western Balkans disproportionately contributing to the re-colonization process, while the gene pool from southern parts of the peninsula contributed less. Since the Balkans have been postulated as a biodiversity hotspot and a glacial refugium (Hewitt 1999, 2000) higher levels of diversity in the Northern Dinaric Balkans were expected. However, only six new haplotypes (H56-H61) were reported for the Balkans in our worldwide analysis, relative to the previous study of Alexandri *et al.* (2012). Of those six new haplotypes, only two (H58, H61) were unique haplotypes to the Balkans. Even if consider the larger fragment (443bp) used in the dataset restricted to the Balkans, only 11 new haplotypes (B2b, B5c, B10a, B43a, B56-B61) were found relative to the study of Alexandri *et al.* (2012). These results provide evidence for a leading-edge colonization of Central Europe from the northern Balkans, as proposed by Alexandri *et al.* (2012). The new data presented here supports this hypothesis in two ways; it was revealed that the northern Balkans have lower genetic diversity compared to the southern Balkans, but a higher frequency of shared haplotypes with populations in Central Europe. Considering the southern refugia theory, genetic structuring of wild boars was expected along a south-north axis in the Balkans and, in this context, two groups were revealed: Continental Balkan and South Balkan (Fig. 30 & 31). This structuring was supported by the presence of different haplotypes and different haplotype frequencies in the two groups, the large number of unique haplotypes in NWC

Greece, the significantly higher intergroup variance revealed by AMOVA and the high (89%), though not significant, support under Bayesian inference analysis for the paraphyletic South Balkan clade.

The mismatch analysis supports a demographic expansion of wild boars in the Balkan Peninsula (Tab. 11). These findings are also supported by the results of the two neutrality tests, with significant or highly significant negative values indicating demographic expansion. Support was also found for demographic expansion of the E1 haplogroup according to both mismatch analyses and neutrality test results. The star-like pattern of connectivity between haplotypes in the MJ network analysis also provides additional support for population expansion (Slatkin & Hudson, 1991) in the European E1 haplogroup (Fig. 32). The Bayesian skyline plot showed that demographic growth of the E1 haplogroup began after the LGM (Fig. 33). Combined, these results may suggest that the demographic expansion is in line with the southern refugia theory and expectations of a post-glacial expansion. For the European E2 haplogroup, mismatch analysis did not provide evidence for demographic expansion and the results of the neutrality tests were non-significant. This suggests that the E2 haplogroup might be a remnant of pre-glaciation diversity in the Italian Peninsula, and that it never expanded out of the peninsula because it was blocked by pressure from a more northerly gene pool that was advancing southwards during the LGM. Thus, since it never expanded northwards and has been present in the Italian Peninsula since even before the LGM, the E2 haplogroup does not present a signature of demographic expansion.

The widespread distribution of some wild boar mtDNA haplotypes could be the result of demographic expansion or of anthropogenic processes such as translocations and reintroductions (Alves *et al.*, 2010). However, within Europe, it could also be interpreted as a remnant of a widely-distributed pre-LGM genetic pool. Presented results in this study show that of the most frequently sampled haplotypes in Europe, five of them (H2, H5, H10, H31, and H57) are shared by at least two of the postulated LGM refugia and, also, frequently with Central-Eastern Europe. Moreover, most of the haplotypes closely-related to these five haplotypes were sampled in only one of the refugia and/or elsewhere in Europe. Some of these closely-related haplotypes have moderate frequencies in Europe

and are shared between Central-Eastern Europe and only one of the three peninsulas. For example, haplotypes H56, H60 and H141 occur only in the Balkans and Central-Eastern Europe, haplotypes H75 and H86 occur only in Iberia and Central Europe, and one haplotype H107 is present only in Italy and Central Europe, suggesting the origin of each haplotype present in Central-Eastern Europe. These findings, together with the presence of unique haplotypes in all three peninsulas and the fact that widely-distributed European haplotypes are shared by at least two peninsulas, support the theory that all three peninsulas acted as refugia for wild boars during the LGM. Detailed analyses of the position of each Balkan haplotype in the worldwide MJ network indicate that the signal for population structuring in the Balkan peninsula is strong, since the South Balkan group sequences show the same pattern of grouping as in the MJ network constructed with only Balkan haplotypes. Furthermore, the detailed analyses of the positions of each haplotype present in the southern peninsulas of Europe suggested interesting patterns and revealed potential new hypothesis. First, it was noticed that the relationship between Continental Balkan and Southern Balkan groups is similar to the pattern for the European E1/E2 haplogroups in Italy. Thus, the South Balkan haplogroup may represent a remnant of the pre-LGM gene pool of the Balkans, the same way as the European E2 haplogroup is a remnant of pre-LGM diversity in Italy. In both regions, a more continental gene pool dominates the northern part of the peninsulas, which is shared with Central-Eastern Europe, while southerly-biased gene pools are restricted to the peninsulas. It is possible that these latter gene pools never expanded because of pressure from the Central-Eastern Europe gene pool entering the peninsulas from the north during the LGM. A similar pattern occurs in Iberia, but without the clear geographical correspondence of southern unique and northern shared haplotypes as shown for the Balkans and Italy. Unique haplotypes with high frequencies (H62, H65, H85) occur in the Iberian Peninsula. Three widespread European haplotypes (H5, H10, H31) are also present in high frequencies in Iberian wild boars, which have closely-related haplotypes that occur only in Iberia (H67, H88, H90) or in both Iberia and Central Europe (H86).

This pattern is consistent with a scenario of: (a) southward movement and isolation in the peninsulas, during the LGM, of haplotypes that were present in central



Europe prior to the LGM; (b) independent diversification in each peninsula, arising from the generation of new haplotypes through mutation of recently-arrived Central-Eastern European haplotypes (in some cases, the same Central-Eastern European haplotypes diversified in all three peninsulas, e.g. H5, H31); (c) and posterior recolonization of Central-Eastern Europe, based on gene pools consisting of both the original and newly-derived haplotypes. It is most probable that the original (pre-LGM) peninsular haplotypes did not have a role in the recolonization of Central-Eastern Europe. It could be hypothesized that they were pushed southwards by gene pools coming from the north and, ultimately, never expanded out of the peninsulas, which is supported by the absence of South Balkan and E2 haplotypes in Central-Eastern Europe, as well as some frequent unique Iberian haplotypes. The results also give support to a leading edge colonization hypothesis (Hewitt, 1999), since re-colonization was only based on the "original" Central-Eastern European haplotypes and some of the newly-generated ones. Both types of haplotypes would certainly be in the "expansion front" since they would have entered the peninsulas by the same (or similar) route they expanded from later towards the north. Furthermore, the Bayesian skyline plot analysis supports post-glacial expansion of wild boars in Europe, since the date of demographic expansion of the European E1 haplogroup was estimated to be immediately after or around the LGM, which has been dated to have occurred around 14,000 YBP.

As for other domesticated species, wild boar diversity patterns are difficult to decipher due to the sympatry of domestic and wild stocks. The influence of humans is unquestionably higher on domestic than wild populations. Previous studies on wild boar genetics (Scandura *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2010; Alexandri *et al.*, 2012) analyzed diversity patterns of wild boars together with domestic pigs. In this study, it is present a different perspective based only on analysis of the CR mtDNA of wild boar populations in order to get a better insight into natural patterns. Even so, clear evidence of a human-mediated influence on wild boar genetic diversity was detected. In the analyses of genetic structure based on microsatellite markers, in some cases it was not possible to clearly distinguish between individual assignments in genetic cluster and the geographical origin of individuals and in all comparison performed in NEWHYBRIDS migrants, hybrids and

individuals that origin could not be determined were observed. These findings could be related to undocumented translocations and reintroductions of individuals in Europe during last century. In the worldwide analysis of mtDNA sequences from wild boar, 832 were from Europe. Of these sequences, 15 possessed Asian haplotypes (H33 – 1 Balkan sample; H66 - 1 Central European and 10 Iberian samples; and H76 – 3 Italian samples) and 1 was a Near Eastern haplotype (H135 – 1 Italian sample). The possession of Asian haplotypes by European wild boars is evidence of introgression of the domestic pig gene pool into wild boars (Fang *et al.*, 2006; Scandura *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2010; van Ash *et al.*, 2011). On the other hand, it is more likely that the Near Eastern haplotype observed in one Italian wild boar is the result of a past translocation rather than hybridization with domestic pig since it has been shown that the extant European domestic pig gene pool has been influenced by European E1 and Asian mtDNA lineages (Giuffra *et al.*, 2000; Larson *et al.*, 2005; Scandura *et al.*, 2008). The hypothesis that some E1 haplotypes shared between Central-Eastern Europe and southern peninsulas may be the result of human-mediated translocations or domestic pig introgression cannot be discounted. However, such events are largely undocumented. The observed haplotype distribution across Europe, the pattern of genetic diversity, the evidence of structuring and demographic expansion and the estimated time of the E1 demographic expansion all fit the hypothesis of a post-LGM recolonization of Central-Eastern Europe from southern peninsulas and, also, the predictions of the southern refugia theory. Analysis of population structure based on microsatellite loci provide further support to this theory. In conclusion, the most important event in shaping the observed pattern of diversity seems to have been the last glaciation, which was followed by a sudden demographic and spatial expansion from one or more southern refugia. The genetic signature of more recent processes, which were mostly related to human activities, can be detected but it appears marginal.

Since wild boar populations in Europe are worryingly increasing in the last four decades, the wild boar can be treated as invasive species, with a relevant impact on biodiversity, agriculture and livestock. Wild boar is also very important game species and of large interest for hunters. Therefore, it is important to consider the implications of

obtained results for the management of this species. Population genetic structure and high genetic diversity of wild boars in Europe were revealed and those results provide unique information for development of adequate management strategies. According to Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO, 1996) management strategies that will maintain the highest possible level of variation across the species is required. To conserve the genetic variation in a species, at least several different populations should be defined as management units (MU, Avise, 1994). Since 10 out of 13 defined subpopulations showed high level of genetic diversity, management strategies should be narrowed to preserve this level of genetic variability. Management of wild boar populations in Europe should be focused on preventing uncontrolled translocations of individuals, since it was shown that in cases where higher number of migrants and hybrids between two subpopulation are present, there is a reduction of genetic divergence, which can lead to a reduction in genetic diversity of species. Particular attention should be paid to the local isolated subpopulations such as Castel Porziano, Slovenia Littoral and South Portugal, because in this subpopulations two or three times smaller number of alleles per locus were observed compared to other subpopulations, and also observed heterozygosity values were lower. Since wild boars from Castel Porziano possess European E2 haplogroup, loss of this subpopulation would mean the loss of divergent mtDNA lineage. In conclusion, for each defined subpopulation adequate strategies should be defined and each subpopulation should be managed separately in order to preserve their evolutionary potential and to secure the long-term stability of wild resources.

## BIOGRAFIJA



Nevena Veličković je rođena 27. novembra 1984. u Novom Sadu, gde je završila osnovnu školu i gimnaziju. Prirodno-matematički fakultet u Novom Sadu, smer diplomirani biolog – molekularni biolog je upisala 2003. godine. Fakultet je završila 2007. godine sa prosečnom ocenom 9,16 i odbranjenim diplomskim radom sa ocenom 10. Tokom studija bila je stipendista Ministarstva prosvete i sporta i dobitnica mnogih fakultetskih nagrada.

Nakon završenih redovnih studija, 2007. godine upisuje Master akademske studije, modul Funkcionalna biologija na Departmanu za biologiju i ekologiju, PMF-a, Univerziteta u Novom Sadu. Ovaj stepen studija završava 2008. godine prosečnom ocenom 9,75 i odbranjenim završnim radom sa ocenom 10.

Doktorske studije, studijski program Doktor bioloških nauka, na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu upisuje 2008. godine. Februara 2009. postaje stipendista Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj.

Novembra 2007. birana je u zvanje istraživača-pripravnika za užu naučnu oblast Genetika na tri godine. Decembra 2010. birana je u zvanje istraživača-saradnika za užu naučnu oblast Genetika. Septembra 2011. zasniva radni odnos na određeno vreme u zvanju asistenta za užu naučnu oblast Genetika na Departmanu za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu. Od novembra 2007. angažovana je u izvođenju vežbi iz grupe predmeta Genetika za studente PMF-a smera biolog, molekularni biolog, ekolog i biohemičar. Školske 2012-2013. godine učestvuje u izvođenju vežbi iz predmeta Humani genom i epigenetika i pod mentorstvom dr Mihajle Đan učestvuje u izvođenju dela nastave na predmetu Preimplantaciona genetička dijagnostika za studente master studija smera master reproduktivni biolog.

Kao stipendista Federalne Evropske Biohemijske Zajednice (FEBS – Federal European Biochemical Society), u toku 2012. godine tri meseca je radila u Laboratoriji za Animalnu Genetiku na Departmanu za biologiju, Univerziteta u Aveiru, Portugalija. U istoj Laboratoriji radila je dva meseca u toku 2013. godine. Dobitnica je stipendije za razmenu nastavnih radnika Univerziteta u Novom Sadu u okviru Erasmus Mundus programa JoinEUSee i 2013. godine provela mesec dana u Laboratoriji za Animalnu Genomiku na Poljoprivrednom fakultetu, Univerziteta u Bolonji, Italija.

Oblast naučne delatnosti je Genetika – proučavanje genetičke varijabilnosti populacija biljnih i životinjskih vrsta upotrebom molekularnih markera. Koautor je 1 rada u istaknutom međunarodnom časopisu, 4 radova u međunarodnim časopisima, 1 rada u naučnom časopisu, 9 saopštenja sa međunarodnih skupova štampana u celini i 18 saopštenja u izvodu, 1 saopštenje sa domaćeg skupa štampano u celini i 2 u izvodu. Nevena je do sada bila učesnik na dva naučna projekta finansirana od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije, 5 naučnih projekata finansiranih

od strane Pokrajinskog Sekretarijata za poljoprivredu, vodoprivredu i šumarstvo AP Vojvodine i jednoj međunarodnoj COST akciji.

Član je Društva genetičara Srbije i Biohemijskog Društva Srbije, i predstavnik Srbije u međunarodnom odboru Internacionalne Unije biologa divljači (International Union of Game Biologists - IUGB). U okviru COST akcije TD1101 učestvovala je u organizaciji sastanka „The First Lagomorph Genomics Meeting” održanog u Bolonji, Italija i osnivanju konzorcijuma “International Lagomorph Genomics Consortium for the sequencing of the genomes of all Lagomorph Species (LaGomiCs)”. Angažovana je kao sekretar i suorganizator drugog i trećeg međunarodnog simpozijuma o lovstvu „Savremeni aspekti održivog razvoja u populacijama divljači“. Osnivač je i član nadzornog odbora udruženja „Divljač Balkana-naučno društvo“. Takođe je osnivač i pomoćnik urednika naučnog časopisa „Balkan Journal of Wildlife Research“ ISSN:2335-0113.

Služi se engleskim jezikom.

Novi Sad, 2014.

Nevena Veličković

**UNIVERZITET U NOVOM SADU  
PRIRODNO MATEMATIČKI FAKULTET  
KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Nevena Veličković
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Mihajla Đan, vanredni profesor, PMF, Novi Sad
Naslov rada: NR	Genetička analiza populacione strukture i filogeografija divlje svinje ( <i>Sus scrofa</i> Linnaeus, 1758)
Jezik publikacije: JP	Srpski/Latinica sa proširenim izvodom na engleskom jeziku
Jezik izvoda: JI	Srpski/Engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Vojvodina
Godina: GO	2014
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	Novi Sad, Bulevar Despota Stefana 10
Fizički opis rada: FO	9 poglavlja, 134 stranice, 34 slika, 175 literaturnih navoda, 12 tabela, 1 prilog, prošireni izvod na engleskom jeziku (23 stranice)
Naučna oblast: NO	Biologija

Naučna disciplina: ND	Genetika
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Mikrosateliti, mtDNK, struktura populacije, genetička varijabilnost, filogeografija, divlja svinja
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Departmana za biologiju i ekologiju, PMF, Novi Sad
Važna napomena: VN	
<p>Izvod: IZ</p> <p>U radu je analizirana struktura populacija i stepen genetičke varijabilnosti u populacijama divlje svinje u Evropi. Određena je polimorfnost jedanaest tetranukleotidnih mikrosatelita u uzorku od 664 divljih svinja u Evropi, utvrđivanjem alela prisutnih u populacijama i utvrđivanjem njihove frekvencije. U analiziranom uzorku definisano je prisustvo 13 subpopulacija divljih svinja u Evropi i određeni su osnovni parametri intra- i interpopulacione varijabilnosti. Pokazano je da je protok gena između definisanih subpopulacija relativno mali obzirom da je utvrđen srednji i visok nivo genetičke divergencije između definisanih subpopulacija. Utvrđen je visok nivo genetičkog diverziteta u populacijama divlje svinje Evrope, što ukazuje na činjenicu da populacije ove vrste poseduju visok genetički potencijal. Analizom polimorfnosti CR1-mtDNK nađeni su jedinstveni haplotipovi za Balkansko poluostrvo i utvrđena je stuktuiranost populacija divljih svinja na Balkanu. Poređenjem dobijenih sekvenci CR1-mtDNK sa dostupnim sekvencama divljih svinja iz čitavog sveta rasvetljena je demografska i filogeografska istorija vrste <i>Sus scrofa</i> i potvrđeno je važna uloga Balkana u rekolonizaciji Evrope nakon poslednjeg ledenog doba. Pokazano je da su sva tri južna poluostrva Evrope (Balkansko, Iberijsko i Apeninsko) učestvovala u rekolonizaciji Evrope i da se filogeografska istorija vrste <i>Sus scrofa</i> može predstaviti u tri koraka: (1) povlačenje jedinki iz Centralne Evrope u južna poluostrva tokom poslednjeg ledenog doba, (2) nezavisna diverzifikacija u svakom od tri poluostrva, (3) rekolonizacija Evrope od strane haplotipova koji su bili na severu poluostrva (u ekspazivnom frontu). Na osnovu rezultata ovog istraživanja data je preporuka da za svaku definisanu subpopulaciju treba razviti odgovarajuće strategije menadžmenta u skladu sa njenim genetičkim potencijalom, a u cilju očuvanja evolucionog potencijala svake od njih kako bi se obezbedila i očuvala stabilnost vrste.</p>	
Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP	20.06.2013
Datum odbrane: DO	

<p>Članovi komisije: (ime i prezime / titula / zvanje / naziv organizacije / status) KO</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>- predsednik: dr Dragana Obreht, vanredni profesor, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno matematički-fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</li><li>- član: dr Mihajla Đan, vanredni profesor, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno matematički-fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, mentor</li><li>- član: dr Miloš Beuković, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu</li><li>- član: dr Carlos Fonseca, vanredni profesor, Departman za biologiju, Univerzitet u Aveiru, Portugalija</li></ul>
---	--



UNIVERSITY OF NOVI SAD  
FACULTY OF SCIENCES  
KEY WORD DOCUMENTATION

Accession number: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph type
Type of record: TR	Printed text
Contents code: CC	PhD Thesis
Author: AU	Nevena Veličković
Mentor: MN	Mihajla Đan, associate professor, Faculty of Sciences, Novi Sad
Title: TI	Wide genetic approach of the wild boar ( <i>Sus Scrofa</i> Linnaeus, 1758) population structure and phylogeography
Language of text: LT	Serbian with the extended abstract in English
Language of abstract: LA	Serbian/English
Country of publication: CP	Serbia
Locality of publication: LP	Vojvodina
Publication year: PY	2014
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	Novi Sad, Bulevar Despota Stefana 10
Physical description: PD	9 chapters, 134 pages , 34 figures, 175 literature items, 12 tables, 1 supplement, extended abstract in English (23 pages)
Scientific field SF	Biology

Scientific discipline SD	Genetics
Subject, Key words SKW	Microsatellites, mtDNA, population structure, genetics variability, phylogeography, wild boar
UC	
Holding data: HD	Department of Biology and Ecology, library, Faculty of Sciences, Novi Sad
Note: N	
<p>Abstract: AB</p> <p>In this paper an assessment of the wild boar genetic structure and phylogeography was performed based on the analysis of microsatellites and CR-1 region of mitochondrial DNA. Polymorphism of eleven tetranucleotide microsatellites was determined in a sample of 664 wild boars in Europe by detection of alleles present in the populations and their frequency. In the analyzed sample of 664 wild boars, 13 genetically different subpopulations were defined and basic parameters of intra- and interpopulation variability were estimated. It was shown that gene flow between defined subpopulations is relatively small since estimated genetic distances between subpopulations indicated a moderate to high genetic differentiation. According to derived data, high genetic diversity is present in wild boar populations in Europe, indicating high genetic potential of the species. In the analysis of mtDNA control region sequences in wild boars from the Balkan peninsula unique haplotypes were found and population structure was observed. A detailed inspection of results reveals that a similar phylogeographic pattern emerges in all southern European peninsulas, arising from post-LGM expansion, and that all three peninsulas had a similar role in the wild boar post-glacial recolonization of Europe. This pattern could be explained by: the southward migration of Central-European haplotypes during the LGM to southern peninsulas; independent diversification in each peninsula; and post-LGM leading edge recolonization of Europe involving all three peninsulas. Based on the results of this research, it was recommended that for each defined subpopulation adequate management strategies should be defined and each subpopulation should be managed separately in order to preserve their evolutionary potential and to secure the long-term stability of wild resources.</p>	
Accepted on Scientific Board on: AS	20.06.2013
Defended: DE	

<p>Thesis Defend Board: DB</p>	<ul style="list-style-type: none"><li>- president: dr Dragana Obreht, Associate Professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad</li><li>- member: dr Mihajla Đan, Associate Professor, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Univerziti of Novi Sad, supervisor</li><li>- member: dr Miloš Beuković, Associate Professor Faculty of Agriculture, University of Novi Sad</li><li>- member: dr Carlos Fonseca, Associate Professor with Habilitation, Department of Biology, University of Aveiro, Portugal</li></ul>
------------------------------------	---