

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Tanja B. Adnađević

**Efekti B hromozoma na genetičku
varijabilnost i strukturu populacija
žutogrlog miša *Apodemus flavicollis*
(Mammalia, Rodentia)**

doktorska disertacija

Beograd, 2012

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Tanja B. Adnađević

**Effects of B chromosomes on genetic
variability and population structure in
yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*
(Mammalia, Rodentia)**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2012

Mentori:

dr Jelena Blagojević, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Univerzitet u Beogradu

dr Dragana Cvetković, vanredni profesor
Biološki fakultet
Univerzitet u Beogradu

Član komisije:

dr Mladen Vujošević, naučni savetnik
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković“
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Ekperimentalni deo doktorske disertacije urađen je u okviru projekata osnovnih istraživanja Ministarstva prosvete i nauke Republike Srbije (143011, 173003), u okviru Odeljenja za genetička istraživanja, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“, Univerziteta u Beogradu.

Zahvaljujem se mentorima dr Jeleni Blagojević i dr Mladenu Vujoševiću na ukazanoj šansi i poverenju, i bez čijih ideja, znanja i iskustva ova disertacija ne bi ni nastala. Dugujem Vam veliku zahvalnost za uvođenje u svet čudesnih B hromozoma, a posebno zbog uvek pozitivnog odgovora na pitanje: „Jel imate minut, treba mi pomoć?“ Posebnu zahvalnost dugujem dr Dragani Cvetković na pomoći i sugestijama koje su doprinele kvalitetu ovog rada.

Zahvalnost dugujem i svojim dragim kolegicama: dr Vidi Jojić za diskusije u vezi sa B hromozomima, dr Gorani Stamenković za pomoć kada PCR ne radi, Ivani Budinski zbog koje sam provela svoju prvu noć u šumi, a posebno dr Vanji Bugarski-Stanojević koja me je uvela u sve tajne rada u laboratoriji i od mene napravila čestitog „molekularca“. Zahvalnost dugujem i Vladi Jovanoviću na bojenju gelova u kasne sate i večitom: "Ovo nisi dobro napisala, popravi!"

Zahvalnost na podršci i pomoći, kao i na pozitivnoj energiji dugujem i drugarima iz Odeljenja za genetiku populacija i ekogenotoksikologiju: Mihailu Jeliću, Mariji Savić i Aleksandri Patenković. Najveće hvala mojim najboljim drugarima dr Zorani Kurbaliji-Novičić i dr Bojanu Kenigu na bezuslovnoj podršci i pomoći da budem još bolja, kao i na sposobnosti da nestane svaki problem i stres izazvan ovom tezom. Hvala im na svim psihokafama i otvaranju novih vidika. Takođe se zahvaljujem drugarima iz Odeljenja za evolucionu biologiju dr Mileni Cvijanović i dr Tanji Vukov bez koje nijedna figura ne bi bila ovako lepa. Veliko hvala i mr Gorčinu Cvijanoviću na dobroj atmosferi koja je olakšala rad u laboratoriji i Dragani Božić na pružanju utočišta. Zahvaljujem se svima koji su na bilo koji način, eksperimentalno, tokom pisanja ili jednostavnom kolegijalnošću pomogli u izradi ove disertacije. Hvala svim drugarima koji su me bodrili i bili uvek tu kada je bilo potrebno!

I naravno, posebnu zahvalnost dugujem svojim roditeljima na verovanju u mene, motivaciji, razumevanju i tome što su uvek tu.

SAMO ZA TEBE SANJA...

Efekti B hromozoma na genetičku varijabilnost i strukturu
populacija žutogrlog miša *Apodemus flavicollis*
(Mammalia, Rodentia)

Rezime

B hromozomi predstavljaju prekobrojne hromozome koji nisu neophodni za normalan rast i razviće svojih nosilaca. Dosadašnja istraživanja, na različitim vrstama, su pokazala da B hromozomi nisu inertni i da se njihovi efekti u različitom stepenu manifestuju od molekularnog do populacionog nivoa. Jedna od vrsta roda *Apodemus*, kod koje su prisutni B hromozomi, jeste žutogrli miš *Apodemus flavicollis*, koja je rasprostranjena u Palearktiku. U cilju utvrđivanja efekata B hromozoma analizirane su četiri populacije vrste *A. flavicollis* sa različitom frekvencom B hromozoma, iz topološki i ekološki različitih staništa iz Srbije. Genotipizacija je izvršena multilokusnom metodom AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) i primenom 14 prajmerskih kombinacija je dobijen ukupno 471 marker. Detektovane su značajne razlike u genetičkom diverzitetu i diferenciranosti među analiziranim populacijama *A. flavicollis*. Najveći genetički diverzitet je detektovan u populaciji sa lokaliteta Fruška gora koji predstavlja optimalno stanište za datu vrstu. Ispitivanje na nivou individua je pokazalo postojanje većih genetičkih razlika između jedinki sa B hromozomima, nego između jedinki bez B hromozoma, kako unutar populacija tako i između populacija. Razlika između jedinki sa i bez B hromozoma nije detektovana ispitivanjem na nivou populacija, ali je detektovana razlika u alelskim frekvencama između ove dve grupe jedinki. Raščlanjivanje genetičke varijabilnosti na različitim populacionim nivoima je pokazalo da je najveći deo genetičke varijabilnosti raspoređen na interpopulacionom i individualnom nivou. Genetičke razlike između jedinki sa i bez B hromozoma nisu detektovane. Visok nivo diferencijacije populacije na osnovu lokaliteta je potvrđen prostornom analizom molekularne varijanse, dok je nepostojanje korelisanosti genetičkih i geografskih distanci pokazalo da nisu genetički diferencirane uprkos udaljenosti. U ovom slučaju veliku genetičku

diferenciranost između ispitivanih populacija možemo da objasnimo postojanjem lokalnih adaptacija. Ukupno dvanaest lokusa je detektovano kao mogući lokusi pod delovanjem selekcije ili koji se nalaze blizu lokusa koji su pod delovanjem selekcije. Tri lokusa su detektovana u svim populacijama, dok je ostalih devet karakteristično ili za populaciju sa nižom (Fruška gora) ili za populacije sa višom frekvencom B hromozoma (Tara, Devojački bunar i Lisine). S obzirom na to da su jedinke iz topološki i ekološki različitih staništa, pretpostavili smo da postoje različiti selekcionni pritisci u zavisnosti od toga da li je stanište optimalno za vrstu ili ne. Testiranje uticaja različitih sredinskih varijabli, koje su značajne za ovu vrstu, pokazalo je da je najveći broj asocijacija AFLP lokusa i sredinskih varijabli detektovan za dve varijable koje su bitne za populacionu dinamiku odnosno za dostupnost hrane koju preferiraju i reprodukciju vrste *A. flavicollis*. Selekcionni pritisci koje nameću dužina zime i leta bi mogli da predstavljaju glavni mehanizam variranja frekvence B hromozoma kako unutar populacija, tako i između populacija iz različitih staništa. U ispitivanim populacijama nije potvrđen efekat B hromozoma na genetički diverzitet i diferenciranost populacija. Pretpostavljamo da selekcija izazvana ekološkim faktorima dovodi do adaptiranosti populacija na specifične uslove sredine i direktno delujući na mehanizam transmisije B hromozoma favorizuje jedinke sa B hromozomima u populacijama koje naseljavaju staništa koja nisu optimalna za datu vrstu. Moguće je da su epistatički ili slabi aditivni efekti B hromozoma efikasniji u neoptimalnim sredinama, mada se ne sme zanemariti i moguće postojanje epigenetičkih procesa koji dovode do modifikacije u ekspresiji gena. U ovom slučaju B hromozomi imaju adaptivnu ulogu čime se potvrđuje heterotični model održavanja B hromozoma u populacijama iz Srbije.

Ključne reči: *Apodemus flavicollis*, B hromozomi, populaciona genomika, AFLP, selekcija, adaptacija

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

UDK broj: 575.17:599.323.45(043.3)

Effects of B chromosomes on genetic variability and
population structure in yellow-necked mouse *Apodemus
flavicollis* (Mammalia, Rodentia)

Summary

B chromosomes (Bs) are supernumerary to the standard set of chromosomes characterized with dispensable nature. Studies on various species, showed that they are not inert, with expression of their effects on different levels from molecular to population level. One of the species from genus *Apodemus* with B chromosomes, yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*, is widespread in Palearctic. In order to determine effects of Bs, four populations of *A. flavicollis* from localities in Serbia, differing in both topological and ecological conditions, as well as frequency of Bs, were examined. Genotyping was done by AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) multiloci method, and 14 primer combinations produced 471 marker. We detected significantly different level of genetic diversity and differentiation between studied populations. Greatest genetic diversity was detected for Fruška gora population, settled in locality with optimal condition for this species. Band based approach estimated greatest genetic differences between individuals with Bs, in comparison with individuals without Bs, on interpopulation as well as intrapopulation level. Allele frequency based approach did not detect difference between individuals with and without Bs, but it showed difference in allele frequencies between these two groups. Partitioning of genetic variability showed that majority of genetic variability is distributed on interpopulation and individual level. Genetic differences between individuals with and without Bs were not detected. Spatial analysis of molecular variance confirmed high level of genetic differentiation based on locality, while lack of correlation of genetic and geographic distances showed that population are not differentiated due to spatial separation. In this case, high level of genetic differentiation detected between populations could be explained by local adaptation. Total of twelve loci were

detected as loci under selection or close to loci under selection. Three of these loci were detected in all populations, while remaining nine were unique to either population with lower frequency (Fruška gora) or populations with higher frequency of Bs (Tara, Devojački bunar and Lisine). Considering the fact that population are settled on topologically and ecologically different habitats, we assumed existence of different selection pressures based on the optimality of habitat for this species. Analysis of association of environmental variables ecologically important for this species with AFLP markers showed that the greatest number of associations was detected for two variables that could influence population dynamics of *A. flavicollis*, by affecting availability of preferred food and timing of reproduction. Selection pressures imposed by duration of winter and summer could represent main factors of Bs frequency variation at intrapopulation and interpopulation level. Effect of Bs on genetic diversity and differentiation was not detected in analyzed populations. Ecologically based selection led to adaptation of populations to different habitats, directly acting on mechanism of Bs transmission, favoring individuals with Bs in populations settled in habitats suboptimal for this species. It is possible that epistatic or very small additive effects of Bs are more effective in suboptimal environments, but their epigenetic effects, like modification of the expression of certain genes, could not be excluded either. In this case Bs can be considered as adaptive, confirming heterotic model of B chromosomes maintenance in populations from Serbia.

Key words: *Apodemus flavicollis*, B chromosomes, population genomics, AFLP, selection, adaptation

Scientific field: Biology

Specific scientific field: Genetics

UDC number: 575.17:599.323.45(043.3)

SADRŽAJ

1.Uvod	1
1.1. Populaciona genomika	2
1.1.1. Principi populacione genomike.....	2
1.1.2. Veličina uzorka.....	3
1.1.3. Genotipizacija	4
1.1.4. Genetički diverzitet	7
1.1.4.1. Koeficijenti genetičkog diverziteta	8
1.1.4.2. Parametri genetičkog diverziteta	9
1.1.5. Detekcija lokusa pod delovanjem selekcije	15
1.2. B hromozomi	18
1.2.1. B hromozomi kod vrste <i>A. flavicollis</i>	19
1.2.2. Poreklo B hromozoma	21
1.2.3. Efekti B hromozoma	23
1.2.4. Efekti B hromozoma kod vrste <i>A. flavicollis</i>	25
2. Ciljevi	28
3. Materijal i metode	30
3.1. Uzorci i opis lokaliteta	31
3.2. Citogenetička analiza	34
3.3. Izolacija DNK	35
3.4. AFLP analiza	35
3.5. Analiza grupisanja.....	40
3.6. Populaciono-genetička analiza.....	41
3.7. Detekcija lokusa pod selekcijom.....	41

3.8. Asocijacija lokusa pod selekcijom sa klimatskim varijablama.....	42
3.9. Genetička diferenciranost populacija	42
3.10. Testiranje modela genetičke diferenciranosti	44
4. Rezultati	45
4.1. Citogenetička analiza	46
4.2. AFLP analiza	47
4.3. Klaster analiza.....	47
4.4. Analiza genetičkog diverziteta	56
4.5. Detekcija lokusa pod selekcijom.....	60
4.6. Asocijacija lokusa pod selekcijom sa klimatskim varijablama.....	62
4.7. Populaciona struktura i genetička diferenciranost.....	65
4.8. Testiranje modela genetičke diferenciranosti.....	71
5. Diskusija.....	72
6. Zaključci	83
7. Literatura.....	86
Biografija autora.....	111

1. UVOD

Adapt or perish, now as ever, is nature's inexorable imperative.

H. G. Wells

1.1. POPULACIONA GENOMIKA

1.1.1. PRINCIPI POPULACIONE GENOMIKE

Populaciona genomika kombinuje koncepte i metodologije genomike i populacione genetike. Bavi se proučavanjem mnogobrojnih lokusa ili delova genoma radi boljeg razumevanja delovanja evolucionih mehanizama (mutacije, genetički drift, protok gena i prirodna selekcija) na genetičku raznovrsnost. Black i sar. (2001) su, međutim, predložili mnogo detaljniju definiciju: „Populaciona genomika predstavlja opsežno testiranje kompletnog genoma u cilju identifikacije i razdvajanja lokus-specifičnih efekata od efekata koji deluju na čitav genom, radi boljeg razumevanja mikroevolucije.“ Lokus-specifični efekti uključuju delovanje selekcije, mutacija, rekombinacija i neslučajnog ukrštanja, odnosno procese koji mogu da deluju na jedan ili nekoliko gena istovremeno. Nasuprot njima, efekti koji deluju na čitav genom, kao što su genetički drift, protok gena i neslučajno ukrštanje, deluju na sve delove genoma podjednako. Mikroevolucija u ovom kontekstu podrazumeva evolucionne procese ili promene tokom kratkog vremenskog perioda, kao što su promene u alelskim frekvencama, strukturi genotipa ili ekspresiji gena, unutar jedne ili između populacija. Termin gen se odnosi na region DNK koji kodira RNK, bez obzira na to da li je ta RNK modifikovana i prevedena u proteine ili ima neku drugu ulogu u ćeliji. Termin lokus se odnosi na položaj određene sekvence DNK u genomu, bez obzira na to da li kodira RNK ili ne. Efekti evolucionih procesa koji deluju na čitav genom daju

informaciju o populacionoj demografiji i filogenetskoj istoriji, dok nam lokus-specifični efekti pomažu da identifikujemo gene koji su važni za fitnes i adaptacije.

Dva osnovna principa populacione genomike kažu da će demografija i evolucionarna istorija uticati na neutralne lokuse na sličan način, dok će lokusi pod delovanjem selekcije pokazivati drugačiji obrazac variranja (Luikart i sar., 2003). Zbog toga je bitno identifikovati autlajer lokuse da bi se pravilno izveo zaključak o populaciono-demografskoj istoriji, ali i da bi se detektovali lokusi pod uticajem selekcije. Osnovni populaciono-genomički pristup istraživanja obuhvata pet koraka koja se zasnivaju na genotipizaciji mnogobrojnih molekularnih markera i identifikaciji autlajer lokusa u skupu podataka određene populacije ili populacija. Autlajer lokusi su lokusi kod kojih je koeficijent inbridinga (F_{ST}) kao mera diferenciranosti populacija značajno drugačiji od onog koji se očekuje pod pretpostavkom neutralnosti i datog demografskog modela.

1.1.2. VELIČINA UZORKA

Populaciona istraživanja uključuju uzorkovanje desetine ili čak i stotine jedinki iz jedne ili nekoliko populacija sa širokog geografskog područja. Neophodan preduslov za eliminisanje neobjektivnih procena populacionih parametara je uzorak koji obuhvata dovoljan broj jedinki (Long i Langley 1999, Wall i sar. 2003). Velike populacije su pogodne za detekciju selekcije koja neće biti maskirana efektima genetičkog drifta usled male efektivne veličine populacije. Na ovaj način moguće je vršiti analizu i na individuu, a ne samo populacijama, kao operativnim jedinicama i dobiti podatak o genetičkim distancama među jedinkama ili o korelisanosti genetičkih i geografskih distanci između jedinki. Međutim, strategija uzorkovanja zavisi i od pitanja na koja tražimo odgovor. Tako na primer, 30-50 jedinki iz jedne populacije je sasvim dovoljan uzorak za određivanje efektivne veličine populacije (Waples 1991), dok je stotine individua iz nekoliko

različitih populacija sa različitih lokaliteta potrebno za određivanje adaptivne genetičke diferenciranosti (Wilding i sar. 2001). Beaumont i Nichols (1996) su testirali uticaj veličine uzorka na distribuciju F_{ST} , sa različitim veličinama uzorka, od 10 do 100 individua po populaciji. Pokazali su da je čak i uzorak osrednje veličine izrazito informativan i da je distribucija F_{ST} za uzorak od 50 jedinki identična distribuciji uzorka od 100 jedinki. Krauss (2000) je pokazao da je za tačnu procenu genetičkog diverziteta iz AFLP podataka dovoljan uzorak od oko 30 jedinki iz svake populacije.

1.1.3. GENOTIPIZACIJA

Nakon uzorkovanja dovoljnog broja jedinki i populacija, drugi korak u populacionom istraživanju uključuje genotipizaciju desetine i stotine marker lokusa, uključujući i navodne neutralne lokuse, koji su rasuti po čitavom genomu. Idealni molekularni pristup populacione genomike bi značio otkrivanje stotine polimorfnih lokusa kao što su mikrosateliti (SSR - *Simple Sequence Repeats*), polimorfizmi dužine umnoženih fragmenata (eng. AFLP - *Amplified Fragment Length Polymorphism*) ili sinonimni i nesinonimni nukleotidni polimorfizmi (eng. SNP-*Single Nucleotide Polymorphism*), a koji bi pokrili čitav genom u jedinom, jednostavnom i pouzdanom eksperimentu. Nažalost, do sada nije pronađen takav pristup, iako AFLP najviše ispunjava date uslove.

AFLP markeri imaju široku primenu u istraživanjima genetičke varijabilnosti ispod nivoa vrste, naročito u ispitivanju populacione strukture i diferenciranosti populacija (Heun i sar. 1997, Triantaphyllidis i sar. 1997, Arens i sar. 1998, Gonzalez i sar. 1998), uključujući i procenu F_{ST} analoga (Travis i sar. 1996, Majer i sar. 1998) i genetičke varijabilnosti na intrapopulacionom nivou (Travis i sar. 1996, Rosendahl i Taylor 1997, Semblat i sar. 1998, Winfield i sar. 1998). Osim u rešavanju problema populacione strukture i varijabilnosti, AFLP

markeri su primenjivani i u procenama protoka gena i širenja populacija (Travis i sar. 1996, Arens i sar. 1998, Semblat i sar. 1998, Majer i sar. 1998), stranooplodnje Gaiotto i sar. 1997), introgresije (Tohme i sar. 1996) i hibridizacije (Beismann i sar. 1997, Arens i sar. 1998), ali i identifikacije klonova (Beismann i sar. 1997, Rosendahl i Taylor 1997, Majer i sar. 1998). U odnosu na ostale markere koji se koriste u populacionim istraživanjima, AFLP markeri imaju niz prednosti. AFLP markeri se mogu dobiti za bilo koji organizam, bez potrebe za ikakvim predznanjem o genomu datog organizma (Ajmone-Marsan i sar. 1997, Rosendahl i Taylor 1997, Arens i sar. 1998, Semblat i sar. 1998). AFLP amplifikacije se izvode u uslovima visoke specifičnosti i time se eliminiše veštačka varijabilnost koja je moguća kod npr. RAPD-PCR (Pérez i sar. 1998). Ponavljanje AFLP amplifikacije je pokazalo skoro savršenu reproducibilnost i ukupnu grešku (uključujući pogrešno vezivanje amplimera i greške rezultata) od manje od 2 % (Huys i sar. 1996, Tohme i sar. 1996, Janssen i sar. 1997, Arens i sar. 1998, Winfield i sar. 1998). Za samu AFLP analizu je potrebna vrlo mala količina DNK, a može se koristiti čak i delimično degradirana DNK (Rosendahl i Taylor 1997). AFLP markeri segregiraju po Mendelovim pravilima (Vos i sar. 1995, Maughan i sar. 1996, Liu i sar. 1998) i zbog toga se preporučuju za populaciona istraživanja i QTL (eng. *Quantitative Trait Loci*) analize. Upotrebom različitih kombinacija amplimera dobija se veliki broj markera, a barem neki od njih će biti locirani u varijabilnim regionima genoma (Vos i sar. 1995). Na osnovu ovoga moguće je detektovati vrlo male genetičke razlike između ispitivanih individua. AFLP markeri su upotrebljeni u raspoznavanju skoro izogenih linija soje koje su se razlikovale u samo jednom, malom regionu genoma (Maughan i sar. 1996).

Najveća mana AFLP markera je njihova dominantna priroda. Dominantni markeri su markeri koji se detektuju kao prisutni (1/1) ili odsutni (0/0, eng. *null homozygot*), bez mogućnosti raspoznavanja heterozigota (1/0). Nasuprot njima, kodominantni markeri imaju mogućnost detekcije i homozigota i heterozigota. Zbog toga kodominantni markeri, kao što su mikrosateliti, imaju prednost u odnosu na dominantne markere jer daju mogućnost preciznog izračunavanja

alelskih frekvenci. Iako je izračunavanje alelskih frekvenci (odnosno heterozigotnosti) dominantnih markera teško, ono je ipak moguće, i to pomoću kvadratnog korena frekvence odsutnog alela, uz pretpostavku Hardy-Vajnbergove ravnoteže. Najprostije rečeno, frekvencija odsutnog alela izračunava se kao kvadratni koren frekvencije individua koje nemaju dati marker.

Optimalan broj AFLP markera zavisi od cilja istraživanja (Mendelson i Shaw 2005). Ukoliko je cilj detekcija lokusa pod selekcijom, ne postoji teorijska gornja granica u broju lokusa pošto je u ovom slučaju poželjno testirati što je moguće više lokusa (Luikart i sar. 2003, Storz 2005). U praksi je, međutim, teško tačno odrediti koliko je analizom pokriven genom, ako ne postoji informacija o veličini genoma i lokalizaciji markera (pomoću genomskog sekvenciranja ili mapiranja vezanosti lokusa). Pregled dosadašnje literature je pokazao da se analize genoma u cilju otkrivanja delovanja selekcije na AFLP lokusima baziraju na ne više od 300 do 400 markera (Wilding i sar. 2001, Campbell i Bernatchez 2004, Bonin i sar. 2006). Nasuprot njima u klasičnim analizama genetičkog diverziteta, populacione strukture ili genetičke povezanosti, postoji broj markera ispod kojeg je varijansa uzorkovanja suviše velika i analiza ne daje validne rezultate. Pokazano je da je 200 markera sasvim dovoljno za procenu genetičke varijabilnosti ili diferenciranosti (Mariette i sar. 2002, Hollingsworth i Ennos 2004, Cavers i sar. 2005, Singh i sar. 2006). Postoji uopšteno pravilo da je za tačnu procenu populacionih parametara potrebno genotipizirati 2-10 puta više jedinki ako se koriste AFLP markeri u odnosu na mikrosatelite i to zbog dominantne prirode samih markera (Lynch i Milligan 1994, Mariette i sar. 2002, Nybom 2004).

Od momenta nastanka, AFLP metoda se primarno koristi za procenu genetičkog diverziteta unutar vrste. Prve analize rađene su na biljkama u prirodnim staništima (npr. Gaudeul i sar. 2004, Nybom 2004, Mba i Tohme 2005) i komercijalno gajenim biljkama (npr. Shan i sar. 2005, Wu i sar. 2006), bakterijama i gljivama (npr. Kis-Papo i sar. 2003, Kolliker i sar. 2006), ali i na beskičmenjacima (Mendelson i Shaw 2005, Conord i sar. 2006) i kičmenjacima (ribe McMillan i sar.

2006, ptice Wang i sar. 2003, sisari Polyakov i sar. 2004, Foulley i sar. 2006, SanCristobal i sar. 2006).

Dve osobine AFLP markera značajno ograničavaju njihovu statističku analizu (Meudt i Clarke 2007). Prva osobina je da AFLP lokusi mogu da daju samo dva alela, alel prisustva trake i alel odsustva trake. Zbog toga je svaki lokus manje informativan od tipičnog multialelskog mikrosatelitskog lokusa, ali veliki broj AFLP markera koji se nalaze rasuti po čitavom genomu nadomešćuju ovaj nedostatak. Druga osobina je njihova dominantna priroda, te je zbog toga teško razlikovati heterozigotnu jedinku od jedinke homozigotne za alel prisustva trake, sem ako nije poznat tačan genotip dobijen pedigre analizom (van Haeringen i sar. 2002).

1.1.4. GENETIČKI DIVERZITET

Na osnovu navedenih karakteristika, postoje dva osnovna pristupa u dobijanju statističkih informacija iz dominantnih markera kao što su AFLP markeri (Kosman i Leonard 2005). Prvi se zasniva na direktnom izučavanju prisustva ili odsustva AFLP markera ili trake (BBA, eng. *Band-based approach*), dok se drugi bazira na proceni alelskih frekvenci svakog lokusa (AFBA, eng. *Allele-frequency-based approach*). Bez obzira na to koji se pristup koristi, ovakva statistička analiza nam služi za procenu genetičkog diverziteta, identifikaciju populacione strukture i moguću detekciju markera povezanih sa nekom fenotipskom osobinom. Ovi pristupi su orijentisani ka drugačijem nivou - BBA ka nivou jedinke, a AFBA ka populacionom nivou.

1.1.4.1. KOEFICIJENTI GENETIČKOG DIVERZITETA

BB pristup se zasniva na nekoliko koeficijenata sličnosti koji predstavljaju mere genetičke distance. Procene frekvence markera ili trake, koji se upotrebljavaju u nekim testovima dodeljivanja (Duchesne i Bernatchez 2002), takođe pripadaju ovom pristupu. Da bi se pristup bolje ilustrirao pretpostavimo da imamo dve jedinke I i J i da je prisustvo i odsustvo traka označeno sa a, b, c i d prema sledećoj tabeli:

		Individua I	
		Prisustvo trake 1	Odsustvo trake 0
Individua J	Prisustvo trake 1	a	b
	Odsustvo trake 0	c	d
n=a+b+c+d			

Dajsov koeficijent (Dice 1945) je ekvivalent Nei-Lijevom koeficijentu (Nei i Li 1979) i Sorensenovom koeficijentu (Sørensen 1948). Dajsov koeficijent daje veću važnost prisustvu traka koje su prisutne u obe individue. U tom slučaju, naglašava se sličnost između jedinki, umesto različitosti.

$$\frac{2a}{2a+b+c}$$

SM koeficijent (eng. *Simple-matching*, Sokal i Michener 1958) maksimizira količinu informacija dobijenih iz AFLP profila tako što u obzir uzima sve dobijene lokuse. Istu biološku važnost imaju i traka prisutna kod obe jedinke i traka odsutna kod obe jedinke, što nekada nije adekvatno kao na primer u slučaju česte homoplazije odsutne trake. Ovaj koeficijent ima osobine euklidskih mera te može da se koristi u analizi molekularne varijanse (AMOVA).

$$\frac{a+d}{a+b+c+d} = \frac{a+d}{n}$$

AFBA pristup podrazumeva nekoliko procedura za dobijanje alelskih frekvenci za dominantne markere.

Procedura kvadratnog korena računa alelske frekvence odsutnog alela preko koeficijenta inbridinga i kvadratnog korena frekvence odsutne trake (Stewart i Excoffier 1996). Pošto je koeficijent inbridinga često nepoznat, ovaj metod pretpostavlja Hardi-Vajnbergovu ravnotežu. Takođe, ovakvom pretpostavkom se teži smanjenju pogrešnih procena usled postojanja odsutnih alela sa malim frekvencama.

Bajesovu proceduru, koja predstavlja modifikaciju prethodne procedure, prvi je upotrebio Zhivotovsky (1999) i pokazao da ona daje zadovoljavajuću procenu frekvence odsutnog alela, čak i kada postoje mala odstupanja od Hardi-Vajnbergove ravnoteže. Zbog ovih prednosti, Bajesova procedura se rutinski koristi u većini analiza.

Prethodno navedeni pristupi se zatim koriste za procenu genetičkog diverziteta na različitim hijerarhijskim nivoima (npr. unutar populacije, između populacija nekog regiona, između regiona), a ukupni diverzitet se može raščlaniti na komponente ova tri nivoa. Ovakav hijerarhijski pristup se koristi za određivanje nekoliko parametara genetičkog diverziteta.

1.1.4.2. PARAMETRI GENETIČKOG DIVERZITETA

Kao parametri genetičkog diverziteta koriste se procenat polimorfnih lokusa i Neijev prosečan diverzitet gena koji se zasnivaju na AFBA pristupu.

Procenat polimorfnih lokusa P na $x\%$ nivou poverenja predstavlja procenat polimorfnih lokusa gde p , frekvenca prisustva alela, ispunjava sledeći kriterijum:

$$100 - x \leq 100 \times p \leq x$$

Procenat polimorfnih lokusa se može izračunati i na osnovu frekvence traka.

Neijev prosečan diverzitet gena po lokusu H (Nei 1973) je ekvivalent prosečnoj očekivanoj heterozigotnosti H_E u populaciji:

$$H = H_E = \frac{\sum_i^n (1 - p_i^2 - q_i^2)}{n}$$

gde su p_i i q_i frekvence prisutnog i odsutnog alela na lokusu i , a n je broj testiranih lokusa.

Da bi se izbegla greška u proceni H_E usled male veličine uzorka, uvedena je formula (Nei 1978, 1987):

$$H = H_E = \frac{2N}{2N-1} \cdot \frac{\sum_i^n (1 - p_i^2 - q_i^2)}{n}$$

gde je N broj diploidnih jedinki.

Iako se Neijev diverzitet gena često dovodi pod sumnju zbog zavisnosti od Hardi-Vajnbergove ravnoteže (Mendelson i Shaw 2005), procene ovog indeksa zasnovane na multilokusnim analizama su pokazale da je on otporan na odstupanje od Hardi-Vajnbergove ravnoteže (Kremer i sar. 2005). Ovim se potvrđuje neophodnost pregledanja velikog broja lokusa, barem nekoliko stotina, radi pravilne procene genetičkog diverziteta (Mariette i sar. 2002, Kremer i sar. 2005). Neijev diverzitet gena se smatra pouzdanim kada postoji dovoljan broj jedinki uzorkovan u populaciji, čime se dobija tačna procena alelskih frekvenci (Mba i Tohme 2005) i kada je ispitivana vrsta stranooplodna (Meudt i Clarke 2007).

Za mnoge vrste, razlikovanje populacija je vrlo problematično, posebno kada ne postoji predznanje o granicama populacija. Metodi zasnovani na grupisanju pomoću stabla (eng. *tree-based*, Hollingsworth i Ennos 2004) ili multivarijantnim analizama (npr. principijalna koordinantna analiza - PCA) predstavljaju grafički prikaz matrice genetičkih distanci koji su adaptirani za istraživačke analize. Međutim, za statističke zaključke, pristupi zasnovani na modelu (eng. *model-based*) kao što je Bajesov metod grupisanja (eng. *Bayesian clustering method*) mnogo su prikladniji (Pritchard i sar. 2000).

Najviše korišćen metod kvantifikacije genetičke diferenciranosti populacija zasniva se na Rajtovoj F statistici (Wright 1951). F statistika koristi tri koeficijenta (F_{IS} , F_{ST} i F_{IT}) u cilju detekcije i opisivanja nivoa genetičke varijabilnosti koja postoji kako unutar tako i između populacija. Verovatnoća da su dva alela jedne jedinke identičnog porekla izračunava se pomoću F_{IS} koeficijenta kao udeo opažene heterozogotnosti jedinke (H_I) u očekivanoj heterozigotnosti subpopulacije (H_S) pod uslovom Hardi-Vajnbergove ravnoteže:

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

F_{IT} predstavlja udeo opažene heterozigotnosti jedinke u očekivanoj heterozigotnosti totalne populacije i izračunava se prema sledećoj formuli:

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

Kao mera genetičke diferenciranosti populacija koristi se F_{ST} . Po definiciji F_{ST} predstavlja meru stepena inbridinga u subpopulacijama u odnosu na totalnu populaciju (totalna populacija ovde predstavlja skup svih subpopulacija) i odražava verovatnoću da su dva alela slučajno uzeta iz subpopulacije identičnog porekla. Izračunava se kao udeo očekivane heterozigotnosti subpopulacije (H_S),

pod uslovom Hardi-Vajnbergove ravnoteže, u očekivanoj heterozigotnosti totalne populacije (H_T):

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

U ovom smislu, F_{ST} predstavlja meru razlika alelskih frekvenci datih subpopulacija u odnosu na populaciju od koje su potekle. Postoji nekoliko metoda za procenu F_{ST} iz dominantnih markera, a neke od njih su klasični metod procene F_{ST} (Weir i Cockerham 1984) ili G_{ST} (Nei 1973) koji se zasnivaju na proceni alelskih frekvenci i Φ_{ST} koji se procenjuje u analizi molekularne varijanse (AMOVA, Excoffier i sar. 1992). Bonin i sar. (2007) su, simulirajući različite veličine uzoraka, pokušali da odgovore na pitanje koja od navedenih metoda daje najtačnije rezultate, odnosno najrealniju procenu genetičke diferenciranosti. Na osnovu simulacija pokazano je da pri dovoljnom broju uzorkovanih jedinki, uvek treba preferirati metode zasnovane na alelskim frekvencama.

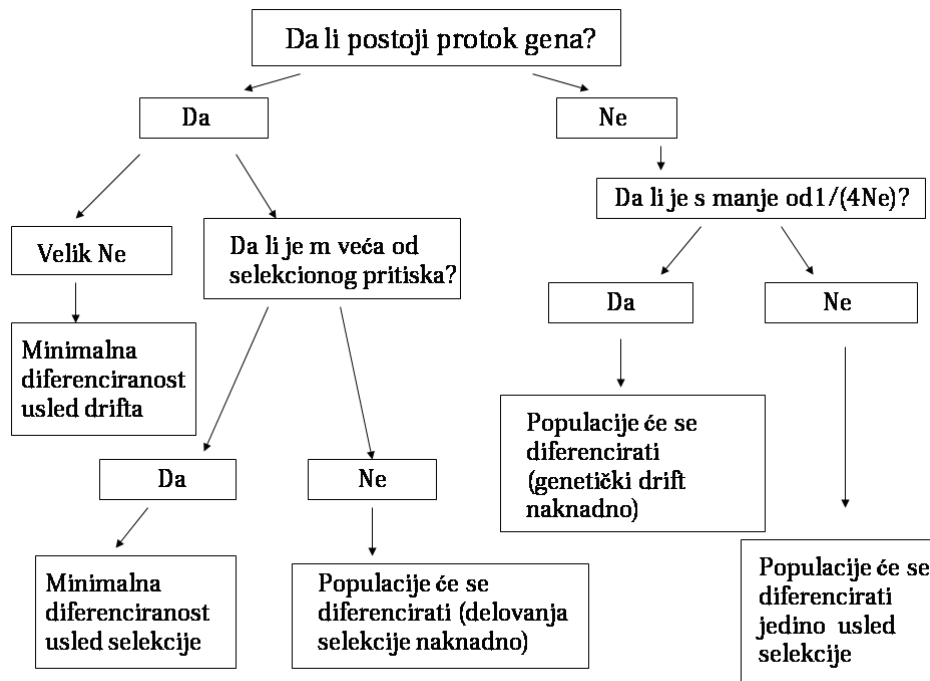
Bez obzira na to koji metod procene koristimo, ukoliko populacije nisu genetički diferencirane, alelske frekvence će biti identične u različitim populacijama i F_{ST} će imati vrednost 0. Sa druge strane, kada su populacije fiksirane za različite alele, tada će F_{ST} biti jednako 1. Generalno je prihvaćena shema interpretacije genetičke diferenciranosti populacija na osnovu F_{ST} vrednosti. Tako F_{ST} vrednosti od 0-0.05 ukazuju na malu genetičku diferenciranost, vrednosti od 0.05-0.25 na umerenu genetičku diferenciranost, dok se sve vrednosti preko 0.25 smatraju merom velike genetičke diferenciranosti ispitivanih populacija. Međutim, ovo je samo uopštena shema interpretacije jer su analize pokazale da čak i male vrednosti F_{ST} mogu da predstavljaju značajan nivo genetičke diferenciranosti populacija. Najcitiraniji primer odstupanja od Rajtove sheme interpretacije vrednosti F_{ST} kao mere genetičke diferenciranosti populacija je analiza populacija evropske jegulje *Anguilla anguilla*. Jedinke ove vrste tokom zime naseljavaju razne, geografski udaljene lokalitete širom Evrope, ali tokom leta sve jedinke migriraju u Sargasko more radi reprodukcije. Ovakav način parenja, kao i

nedostatak dokaza o genetičkoj diferenciranosti između populacija na osnovu analize alozima i podataka mitohondrijalne DNK, bile su osnov za zaključak da evropske jegulje predstavljaju jednu panmiktičnu populaciju (Avice i sar. 1986). Međutim analiza sedam mikrosatelitskih lokusa je pokazala postojanje slabe ($F_{ST} = 0.0017$), ali značajne ($P=0.0014$) genetičke diferenciranosti između grupa jegulja sa različitih zimskih lokaliteta. Najverovatnije objašnjenje je da se jegulje koje prezimljuju na različitim geografskim širinama, i reprodukuju u različito vreme. U tom slučaju, iako su tokom leta sve evropske jegulje u Sargaskom moru, češće će se ukrštati one koje prezimljuju na istim geografskih širinama (Wirth i Bernatchez 2001).

Postoji niz činilaca koji utiču na F_{ST} vrednosti, a odnose se na ekologiju i demografsku istoriju vrste i populacija. Protok gena je najjednostavniji i najočigledniji primer toga. Još je Rajt (1951) pokazao da postoji veza između genetičke diferenciranosti dve populacije, merene preko F_{ST} koeficijenta i protoka gena između njih, i to preko relacije:

$$F_{ST} = \frac{1}{4N_e m + 1}$$

gde je N_e efektivna veličina populacije, a m stopa migracija između populacija, te zbog toga $N_e m$ označava broj reproduktivno sposobnih jedinki migranata. Problem sa ovom merom je to što se zasniva na tzv. ostrvskom modelu populacione strukture, odnosno što pretpostavlja nepostojanje selekcije i mutacija, ali i beskonačan broj populacija, koje su iste veličine i koje imaju istu verovatnoću razmene migranata. $N_e m$ takođe pretpostavlja ravnotežu između migracije i drifta, koja se ostvaruje kada je povećana genetička diferenciranost usled drifta jednaka smanjenju genetičke diferenciranosti uzrokovane protokom gena. Slika 1. prikazuje zavisnost genetičke diferenciranosti populacija od evolucionih mehanizama.



Slika 1. Zavisnost genetičke diferenciranosti populacija od evolucionih mehanizama (modifikovano prema Freeland 2005)

Protok gena je jedan od bitnih procesa u populacionoj genetici. U odsustvu protoka gena, populacije će divergirati kao rezultat genetičkog drifta. Međutim vrlo mali protok gena može da smanji stopu genetičkog drifta i time spreči divergenciju populacija. Postoji teorijska pretpostavka (Wright 1951) da je čak i $N_e m = 1$ po generaciji dovoljno da se značajno smanji diferenciranost populacija usled genetičkog drifta.

Genetički drift je samo jedan od procesa koji utiču na diferenciranost populacija. Staništa predstavljaju nehomogene sredine i zbog toga različiti genotipovi mogu biti favorizovani u različitim delovima areala vrste, što je poznato kao lokalna adaptacija. Protok gena sprečava lokalnu adaptaciju samo ako je stopa migracija veća od selektivnog pritiska, što znači da ako je protok gena mali, čak i slab selekcionni pritisak može da dovede do divergencije populacija. U ovom slučaju

efekat genetičkog drifta je zanemarljiv, ako je selekcionni pritisak veći u odnosu na efektivnu veličinu populacije.

Praktično je vrlo teško proceniti selekcionni pritisak i efektivnu veličinu prirodnih populacija i zbog toga su pronađeni različiti metodi detekcije prirodne selekcije i lokalne adaptacije. Pretpostavka je da protok gena i genetički drift imaju isti efekat na neutralne lokuse, dok će se efekti selekcije razlikovati između neutralnih i neneutralnih lokusa. Zbog toga se pretpostavlja da će svi neutralni lokusi pokazivati sličan nivo genetičke diferenciranosti, dok će autlajer ili neneutralni (ili lokusi vezani za neneutralne lokuse) pokazivati različit nivo genetičke diferenciranosti. Ovo variranje može da ima opseg od izrazito niskih do izrazito visokih vrednosti, u zavisnosti od tipa selekcije koja deluje na date lokuse. Direkciona selekcija deluje tako što povećava genetičku diferenciranost populacija, ako su različiti aleli različito favorizovani u različitim populacijama. Balansna selekcija će delovati tako što će smanjivati genetičku diferenciranost populacija održavanjem istog seta alela u različitim populacijama. Poređenjem genetičke diferenciranosti svakog lokusa pojedinačno, možemo da otkrijemo koji lokus pokazuje neuobičajeni nivo genetičke diferenciranosti što može da nam ukaže na region koji je pod delovanjem selekcije.

1.1.5. DETEKCIJA LOKUSA POD DELOVANJEM SELEKCIJE

Najprihvaćeniji pristup identifikacije lokusa koji su uključeni u adaptivnu divergenciju populacija su multipopulacioni testovi (Lewontin i Krakauer 1973, Wilding i sar. 2001, Akey i sar. 2002) u kojima se simulira nulta distribucija F_{ST} neutralnih lokusa pri različitim modelima populacione strukture, ali većina se zasniva na ostrvskom modelu.

Beaumont i Balding (2004) su predložili metod zasnovan na funkciji verodostojnosti multinomne-Dirihleove raspodele (eng. *multinomial-Dirichlet likelihood*) pod pretpostavkom da F_{ST} vrednost odražava efekat koji je specifičan za svaku populaciju, ali i za svaki lokus. Ovim metodom se procenjuje verovatnoća da je dati lokus pod delovanjem selekcije i to preko dva modela: jednog koji uključuje delovanje selekcije i drugog koji isključuje. Upotrebom metode Markovljevog lanca Monte Karlo simulacije sa reverzibilnim skokom (eng. *reverse jump MCMC*) procenjuje se verovatnoća svakog od dva navedena modela. Ovaj metod zanemaruje efekat neslučajnog ukrštanja, ali i veličine uzorka i broja populacija.

Procena i identifikacija lokusa pod selekcijom mogu često da budu netačne usled velike heterogenosti u varijabilnosti delova genoma. U cilju smanjenja pogrešne procene neutralnosti lokusa, potrebno je analizirati populacione parametre sa i bez lokusa koji su se pokazali kao autlajeri. Ako isključivanjem datih lokusa dolazi do vrlo malog smanjenja vrednosti populacionih parametara, tada te lokuse treba ignorisati, odnosno ne treba ih tretirati kao lokuse pod selekcijom. Međutim ukoliko se lokusi pokažu kao lokusi pod selekcijom, mogu da nam pomognu u odgovaranju na bitna pitanja vezana za adaptivne razlike između populacija. Povezivanje lokusa pod selekcijom sa nekom fenotipskom osobinom je najbolji dokaz adaptivnog značaja samog lokusa. Kohn i sar. (2000, 2003) su detektovali neneutralne mikrosatelitske lokuse u populacijama divljeg pacova koji su pozicionirani blizu gena odgovornih za rezistenciju na otrov, dok su se mikrosatelitski lokusi koji su se nalazili dalje od gena odgovornih za rezistenciju pokazivali neutralni.

Detekcija autlajer lokusa se pokazala kao vrlo dobar način detekcije lokusa koji su u osnovi adaptacija na nadmorsku visinu (Bonin i sar. 2006) ili temperaturu (Jump i sar. 2006), ali i za istraživanje diferencijacije zasnovane na ekotipovima (Wilding i sar. 2001, Campbell i Bernatchez 2004, Egan i sar. 2008, Herrera i Bazaga 2008, Nosil i sar. 2008). Nunes i sar. (2011) su upotrebili AFLP skeniranje genoma populacija guštera *Lacerta lepida* i detektovali nekoliko lokusa kao

autlajere koji su pod delovanjem selekcije duž sredinskog gradijenta na Pirinejskom poluostrvu, kao što je i očekivano na osnovu visoke morfološke i genetičke diferenciranosti podvrsta *L. l. iberica* i *L. l. nevadensis*, lociranih na suprotnim krajevima klimatskog gradijenta. Kod ne-model organizama vrlo je teško pozicionirati lokuse pod selekcijom u genomu, ali istraživanja su pokazala da, barem kada su AFLP lokusi u pitanju, autlajer lokusi često prave genomske klastere (Emelianov i sar. 2004), koncentrisane u kodirajućim regionima (Vasemagi i sar. 2005) ili asocirane sa nekom kvantitativnom osobinom koja učestvuje u lokalnoj adaptaciji (Rogers i Bernatchez 2005, 2007).

1.2. B HROMOZOMI

Početak XX veka (Randolph 1928) uveden je termin B hromozomi koji označava prekobrojne hromozome u standardnom hromozomskom komplementu (A hromozomi), a koji se odlikuju izuzetnom raznovrsnošću morfologije, ponašanja i evolucione dinamike. Međutim, sami B hromozomi otkriveni su još 1907. godine kod jedne hemipterne vrste insekata, *Anisoscelis sp* (Wilson 1907). Od tada pa do danas, iako je prošao ceo vek, i pored brojnih istraživanja ostalo je mnogo otvorenih pitanja vezanih za njihove efekte, poreklo i način održavanja.

Jedina zajednička karakteristika za sve B hromozome je da nisu neophodni za preživljavanje. Odlikuju se visokom varijabilnošću što onemogućava njihovo precizno definisanje. Dodatna otežavajuća okolnost je i to što se sreću kod samo nekih jedinki u samo nekim populacijama. Osnovne karakteristike B hromozoma koje služe za njihovo definisanje su: verovatno poreklo od A hromozoma, nesparivanje i nerekombinovanje sa hromozomima A seta tokom mejoze, nasleđivanje mimo pravila Mendelskog nasleđivanja. Sem toga, često su manji od A hromozoma, morfološki se razlikuju od hromozoma A seta, heterohromatični su i ne nose glavne gene. Svaka od ovih karakteristika odlikuje veći broj vrsta, ali nikada sve navedene zajedno.

Procenjuje se da od svih do sada poznatih biljnih i životinjskih vrsta, čak 15% poseduje B hromozome (Beukeboom 1994). Ovaj broj predstavlja grubu pretpostavku iz razloga što mnoge vrste nisu citološki ispitane ili je kod nekih vrsta broj istraženih jedinki i populacija nedovoljan za detekciju prisustva B hromozoma ili je njihova detekcija otežana usled tkivnog mozaicizma koji je čest kod nosilaca B hromozoma. Među biljkama široko su rasprostranjeni u grupi cvetnica (1300 vrsta), dok su među životinjama najčešći kod insekata (500 vrsta). Od svih životinjskih vrsta koje poseduju B hromozome, 81% čine vrste insekata (redovi

Coleoptera, Diptera i Orthoptera, Jones i Rees 1982). Pretpostavlja se da su intenzivna istraživanja na insektima razlog visokog procenta vrsta sa B hromozomima. Među kičmenjacima su opisani u gotovo svim većim taksonomskim grupama, sem kod ptica (Vujošević i Blagojević 2004). Uzrok nepostojanja B hromozoma kod ptica je mala veličina genoma i nizak sadržaj repetitivnih sekvenci. U grupi sisara utvrđen je veoma mali broj vrsta koje su nosioci B hromozoma (1.2%). B hromozomi se javljaju kod 55 od 4629 sisarskih vrsta. Najveći broj vrsta sisara sa B hromozomima je uočen u okviru reda Rodentia (42 vrsta) u kojem se izdvaja rod *Apodemus* sa čak 7 vrsta (Vujošević i Blagojević 2004).

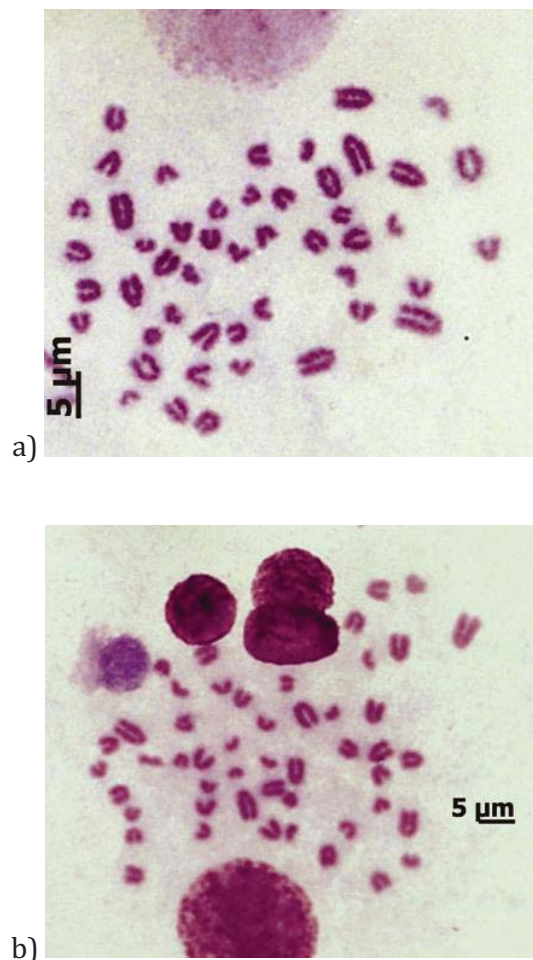
1.2.1. B HROMOZOMI KOD VRSTE *A. FLAVICOLLIS*

Rod *Apodemus* čine 22 vrste (Musser i Carleton 2005), a B hromozomi su detektovani kod 6 vrsta: *A. flavicollis* (Soldatović i sar. 1972, Wolf i sar. 1972), *A. peninsulae* (Hayata 1973, Kartavtseva i sar. 2000), *A. sylvaticus* (Vujošević i Živković 1987, Zima i sar. 1997), *A. mystacinus* (Belcheva i sar. 1988), *A. agrarius* (Kartavtseva 1994), *A. speciosus* (Kral 1971) i *A. argenteus* (Obara i Sasaki 1997). Najveći broj B hromozoma je pronađen kod vrste *A. peninsulae*, čak 30 (Borisov i sar. 2010).

Vrsta *Apodemus flavicollis*, žutogrli miš, je široko rasprostranjena na gotovo čitavom području Palearktika. Prisustvo B hromozoma utvrđeno je unutar čitavog areala rasprostranjenja ove vrste: Nemačka (Wolf i sar. 1972), Austrija (Kral i sar. 1979), Češka (Zima 1984), Rusija (Sablina i sar. 1985), Slovačka, Slovenija, Makedonija, Ukrajina, Turska, Bugarska, Grčka (Zima i Macholan 1995) i u više od 20 proučavanih populacija na prostoru bivše Jugoslavije, pre svega Srbije (Vujošević 1993). Unutar populacija sa prostora bivše Jugoslavije najučestalije su

jedinke sa jednim B hromozomom, mada se mogu naći i nosioci 2, 3, 4 ili čak 5 B hromozoma (Blagojević i Vujošević 1995).

Standardni hromozomski set vrste *A. flavicollis* ima 48 akrocentričnih hromozoma. B hromozomi kod *A. flavicollis* imaju sledeće odlike: prema veličini i morfologiji jednaki su sa 5 najmanjih hromozoma A seta, prema sadržaju hromatina spadaju u grupu euhromatičnih hromozoma, odnosno ne mogu se razlikovati od hromozoma A seta kako u pogledu veličine i morfologije, tako i u pogledu broja i rasporeda traka dobijenih tehnikama diferencijalnog bojenja (Vujošević i Živković 1987). Slika 2. prikazuje kariotip žutogrlog miša bez i sa 1B hromozomom.



Slika 2: Kariotip žutogrlog miša bez (a) i sa 1B hromozomom (b)

1.2.2. POREKLO B HROMOZOMA

Ne postoji jedno zajedničko objašnjenje o poreklu B hromozoma. Do sada je postavljeno nekoliko hipoteza, ali nijedna nije zajednička za sve B hromozome (Jones 1995, Camacho i sar. 2000, Berdnikov i sar. 2003, Jones i Houben 2003). Najverovatnije B hromozomi različitih vrsta imaju i različito poreklo. Kod mnogih vrsta je detektovana repetitivna sekvenca na B hromozomu koja pokazuje veoma visok nivo sličnosti sa sekvencama na A hromozomima kao kod npr.: *Secale cereale* (Sandery i sar. 1990, Blunden i sar. 1993, Cuadrado i Jouve 1994, Houben i sar. 1996), *Zea mays* (Alfenito i Birchler 1993, Cheng i Lin 2003), *Crepis capilaris* (Jamilena i sar. 1994, Jamilena i sar. 1995), *Brachycome dichromosomatica* (Leach i sar. 1995, Houben i sar. 2001), *Drosophila subsilvestris* (Gutknecht i sar. 1995). Kod nekih vrsta najveću ulogu u formiranju i evoluciji B hromozoma ima brza amplifikacija rRNK, kao što je i dokazano kod *Eyprepocnemis plorans* (Lopez-Leon i sar. 1994), *Rattus rattus* (Stitou i sar. 2000) i *Trichogramma kaykai* (van Vugt i sar. 2005). Najubedljiviji dokaz ove hipoteze dat je za vrstu *Plantago lagopus* gde je analiza nekoliko generacija jedinki ove vrste i *in situ* lokalizacija rRNK proba pokazala da su B hromozomi rezultat masivne amplifikacije 5S rDNK (Dhar i sar. 2002). Teruel i sar. (2011) su dokazali postojanje gena za histone H3 i H4 na B hromozomu kod vrste skakavca *Locusta migratoria*, ali nisu uspjeli da pokažu da li su sami geni aktivni. Sem toga, pokazano je da se ti isti geni nalaze i na hromozomu 8 ove vrste, što ukazuje na moguće poreklo B hromozoma kod skakavca.

Battaglia (1964) je prvi pretpostavio da B hromozomi mogu nastati i posle interspecijske hibridizacije blisko srodnih vrsta, što su kasnije i drugi potvrdili (McVean 1995, Camacho i sar. 2000). Jedan od primera koji podržavaju ovu teoriju je i nastanak B hromozoma kod ginogenetskih riba vrste *Poecilia formosa*. Inicijacija embriogeneze kod ove ribe zahteva spermu mužjaka srodnih biseksualnih vrsta *P. mexicana* ili *P. latipinna*, a do eliminacije očinskog genoma dolazi tokom ranog razvića, tako da su potomci genetički identični majci. Međutim,

citogenetičke analize su pokazale prisustvo dodatnih mikrohromozoma kod potomaka vrste *P. formosa* koji se javio zbog nepotpune eliminacije paternalnog genoma, a kao rezultat ove nepotpune eliminacije hromozoma potomci imaju istačkanu pigmentaciju. Ovakvi hromozomi se nasleđuju, a različit broj ovih prekobrojnih (B) hromozoma dovodi do različitih varijacija u pigmentaciji, što je posledica aktivnosti zaostalih očevih gena lociranih na B hromozomima (Schartl i sar. 1995).

Kod nekih vrsta, sličnosti u ponašanju tokom mejoze, morfologiji i heteropiknotičnosti B i polnih hromozoma su navodile na zaključak da B hromozomi vode poreklo od polnih hromozoma (Amos i Dover 1981, Green 1990). Dodatni hromozom označen kao B2 kod jedne vrste skakavca *E. plorans* koji sadrži uglavnom dve sekvence (ponovak dužine 180bp i ribozomalnu DNK), pokazao je visok nivo sličnosti u sastavu i lokalizaciji dve DNK probe (prethodno navedenih sekvenci) sa X hromozomom te vrste (Lopez-Leon i sar. 1994). Takođe B hromozom kod žabe *Leiopelma hochstetteri* je pokazao visok nivo sličnosti DNK sa polnim W hromozomom (Sharbel i sar. 1998).

Kod kukuruza analiza sekvenci je pokazala postojanje mnogobrojnih visoko repetitivnih sekvenci, uključujući i transpozone, prisutne i na A i na B hromozomima, ali u mnogo većem broju na B hromozomu (Alfenito i Birchler 1993, Stark i sar. 1996, Theuri i sar. 2005, Lamb i sar. 2007). Postojanje sekvenci specifičnih samo za B hromozome pokazano je tek u nekoliko slučajeva, mada su te sekvence prisutne i na A hromozomima, ali u tragovima. Sekvence specifične samo za B hromozome su: Bd49 tandemski ponovak kod vrste *Brachycome dichromosomatica* (Franks i sar. 1996), E3900 i D1100 kod *Secale cereale* (Sandery i sar. 1990, Blunden i sar. 1993, Houben i sar. 1996, Langdon i sar. 2000) ili B-specifični retroelement kod uklije, *Alburnus alburnus* (Schmid i sar. 2006).

Pretpostavlja se da su B hromozomi kod vrste *A. flavicollis* nastali kao direktan produkt najmanjih A hromozoma putem polizomije praćene procesom

fakultativne heterohromatizacije koji je sličan procesu inaktivacije X hromozoma kod ženki sisara (Vujošević i sar. 1989).

1.2.3. EFEKTI B HROMOZOMA

Dosadašnji rezultati su pokazali da B hromozomi nisu inertni i da se njihovi efekti u različitom stepenu manifestuju od molekularnog do populacionog nivoa. Efekti B hromozoma su najčešće proučavani kod biljaka, pre svega kod gajenih i ekonomski isplativih biljaka kao što su pšenica, raž i kukuruz. Iako retki, dokazi o efektima B hromozoma kod životinja takođe postoje.

Kada postoji mali broj B hromozoma, ne detektuju se fenotipske promene. Međutim različiti fenotipski efekti su korelisani sa prisustvom većeg broja B hromozoma. Često se efekti B hromozoma mogu detektovati na nivou komponenti adaptivne vrednosti, poput vijabiliteta i fertiliteta (Jones i Rees 1982). Uopšteno govoreći, B hromozomi imaju negativan efekat na fitnes i fertilitet biljaka (Östergren 1947, Bosemark 1957, Gonzalez-Sanchez i sar. 2004). Kod vrste *Haplopappus gracilis*, nosioci B hromozoma imaju promenjenu pigmentaciju zida ahenija (Jackson i Newmark 1960). Pruge na listovima kukuruza su regulisane genima koji se nalaze na B hromozomu (Staub 1987). Prisustvo B hromozoma kod vrste *Plantago coronopus* izaziva sterilnost kod muških jedinki (Paliwal i Hyde 1959), mada Raghuvanshi i Kumar (1983) nisu potvrdili ovo opažanje. Hewitt (1976) je kod skakavca *Myrmeleotettix maculatus* uočio da prisustvo više od jednog B hromozoma usporava razvoj embriona, ali samo kod mužjaka (Hewitt i East 1978), kao i to da dolazi do disfunkcije spermatozoida (Hewitt i sar. 1987). Direktne dokaze da B hromozomi mogu delovati i na porast fitnesa svojih nosilaca predstavljaju slučajevi ovsu, *Avena sativa* i patogene gljive *Nectria haematococca*. Kod obe vrste je utvrđeno prisustvo gena na B hromozomima koji kod ovsu obezbeđuju rezistenciju na žitnu rđu, a gljivi povećavaju sposobnost infekcije na

biljci domaćinu, grašku. Adaptivna prednost nosilaca B hromozoma je do sada pokazana samo kod vrste luka *Allium schoenoprasum*, gde prisustvo B hromozoma ubrzava germinaciju semena posebno u uslovima suše (Plowman i Bougourd 1994) i povećava preživljavanje tokom ranih stupnjeva ćelijskog razvića (Holmes i Bougourd 1989).

Međutim, nisu samo negativni efekti povezani sa B hromozomima. Oni mogu da budu i agensi diploidizacije kod aloploidoida, kao što je pokazano kod vrsta roda *Lolium* (Jenkins 1986). Kod pirinča je uočen slab pozitivan efekat B hromozoma na visinu biljke, masu zrna, dužinu metlice, širinu i dužinu semena i negativan efekat na broj stabljika u bokoru (Cheng i sar. 2000). Kod nekih vrsta, jedinke sa B hromozomima imaju višu stopu preživljavanja pod određenim uslovima stresa. Tako na primer, nosioci B hromozoma vrsta luka, *Allium schoenoprasum* i *A. porrum* imaju bolju klijavost semena u uslovima suše (Gray i Thomas 1985, Holmes i Bougourd 1989, Plowman i Bougourd 1994). Jedinke vrste *A. schoenoprasum* (Holmes i Bougourd 1991) koje su nosioci B hromozoma imaju veću adaptivnu vrednost kada se gaje u uslovima velike gustine populacije.

Prisustvo B hromozoma najčešće utiče na povećanje frekvence hijazmi između A hromozoma, mada su zabeleženi i slučajevi smanjenja ili stagnacije nivoa rekombinacija u prisustvu B hromozoma (Burt i Trivers 2006). Kod kukuruza, B hromozomi utiču na taj način što povećavaju frekvencu hijazmi, posebno kada je B hromozom univalent (Carlson 1994). Iako se odavno pretpostavlja da dolazi do rekombinacija između B hromozoma, tek su najnoviji molekularni podaci dokazali postojanje mejotičke rekombinacije između B hromozoma kod lisice *Vulpes vulpes* (Basheva i sar. 2010).

Dosadašnja populaciona istraživanja vezana za B hromozome su uglavnom usmerena na praćenje promena frekvenci jedinki sa B hromozomima. Kod nekih vrsta sa širokim arealom, jedinke sa B hromozomima su prisutne u svim ili u većini populacija, kao što je slučaj sa biljnim vrstama: orhideja *Tania laxiflora*, glavočika *Xanthisma texsanum*, ljiljan *Lilium maximowiczii*, trave *Festuca pratensis* i *Dactylis*

glomerata, raž *Secale cereale* i kukuruz *Zea mays*. Među životinjskim vrstama jedinke sa B hromozomima su prisutne u skoro svim populacijama skakavca *Acrida lata*, žitnog miša *Reithrodontomys megalotis*, istočnog azijskog miša *A. peninsulae* i žutogrlog miša *Apodemus flavicollis*. Postoje i slučajevi gde su jedinke sa B hromozomima prisutne u vrlo malom broju, kao što je slučaj sa *Lolium perenne*, gde samo mali broj populacija ima jedinke sa B hromozomima i to sa frekvencom do samo 5%, iako je vrsta široko rasprostranjena u Evropi i Aziji (Jones i Rees 1982).

Istraživanja vezana za populacionu dinamiku B hromozoma su obično vezana za korelacije frekvence B hromozoma i nekog sredinskog faktora. Opažena je pozitivna korelacija između prosečnog broja B hromozoma po biljci i nadmorske visine u 21 prirodnoj populaciji kukuruza u Argentini (Poggio i sar. 1998, Rosato i sar. 1998), a kao objašnjenje postojanja kline broja B hromozoma predloženo je delovanje prirodne selekcije, što je i potvrđeno pomoću 18 selektivno neutralnih mikrosatelitskih markera (Lia i sar. 2007). Negativna korelacija je uočena između frekvence jedinki sa B hromozomima skakavca *Myrmeleotettix maculatus* i količine padavina (Hewitt i John 1967), gde su jedinke sa B hromozomima najbrojnije u populacijama koje naseljavaju topla i suva staništa, optimalna za ovu vrstu.

1.2.4. EFEKTI B HROMOZOMA KOD VRSTE *A. FLAVICOLLIS*

U proteklih 20 godina B hromozomi žutogrlog miša su bili predmet mnogobrojnih istraživanja. Profilisanje jedinki sa i bez B hromozoma pomoću AP-PCR je pokazalo da postoji marker specifičan za jedinke sa B hromozomima (Tanić i sar. 2000). Nedostatak ove metode je to što nije moguće locirati marker, tj. nije moguće odrediti da li se marker nalazi na samom B hromozomu ili ne. Pretpostavka da su B hromozomi nosioci aktivnih gena i da su transkripciono aktivni zbog njihove euhromatične prirode, testirana je DD RT-PCR (eng.

differential display reverse transcription PCR) koji predstavlja metodu RNK profilisanja. Ovako dobijeni RNK markeri su poslužili za potvrdu diferencijalne ekspresije gena između jedinki sa i bez B hromozoma. U prisustvu B hromozoma je povećan nivo ekspresije tri gena. Izmenjena transkripciona aktivnost ovih gena ipak ne daje odgovor na pitanje da li se ovi geni nalaze na samom B hromozomu. Mogući razlog promene ekspresije je i postojanje nekog *trans*-aktivnog faktora ili pozitivnog plejotropnog efekta koji deluje na gene koji su locirani na A hromozomima (Tanić i sar. 2005).

Pri istraživanju fenotipskih efekata B hromozoma najčešće su ispitivane kvantitativne osobine. Analiziranjem efekata B hromozoma na broj asimetričnih foramena na lobanji u populaciji vrste *Apodemus flavicollis* ustanovljena je korelacija između sezonskih variranja u broju asimetričnih foramena i učestalosti životinja sa B hromozomima, i zaključeno je da B hromozomi ne utiču na razvojnu stabilnost svojih nosilaca. Varijacija u broju B hromozoma utiče na nivo morfološke integracije kranijalnih osobina, pri čemu je nivo korelisanosti kranijalnih osobina veći kod životinja sa B hromozomima (Blagojević i Vujošević 2004). Takođe je pokazano da postoji viši nivo morfološke integracije kod jedinki sa B hromozomima kako unutar pojedinačnih regiona mandibule, tako i u okviru čitave mandibule, dok je hipoteza o modularnosti mandibula potvrđena samo kod jedinki sa B hromozomima (Jojić i sar. 2007).

Frekvenca jedinki sa B hromozomima veoma varira unutar čitavog areala. Od ukupno 16 analiziranih populacija iz različitih zemalja (Češka, Slovačka, Austrija, Slovenija, Makedonija, Grčka, Bugarska, Turska, Rumunija i Ukrajina) jedinke sa B hromozomima nisu bile prisutne jedino u populacijama iz Istočne Slovačke i Rumunije (Zima i Macholan 1995). Frekvenca jedinki sa B hromozomima kretala se od 12.5% u Sloveniji do 93.5% u jednoj populaciji iz Slovačke. Na području bivše Jugoslavije jedinke sa B hromozomima su bile prisutne u većini ispitivanih populacija. Frekvenca jedinki sa B hromozomima se kretala od

0.067 do 0.67 (Vujošević i Živković 1987, Vujošević i sar. 1991, Vujošević 1993, Vujošević i sar. 2009).

Boyeskorov i sar. (1994) su pokazali da je najveća frekvenca jedinki sa B hromozomima (0.81) na periferiji areala, odnosno u uslovima koji nisu optimalni za vrstu. Sem toga istraživanja su pokazala da je frekvenca B hromozoma veća u populacijama koje naseljavaju više nadmorske visine (Zima i Macholan 1995). Povećanje frekvence jedinki sa B hromozomima pozitivno je korelisano sa nadmorskom visinom i snižavanjem prosečne godišnje temperature (Vujošević i Blagojević 2000). Istraživanja u populaciji na Jastrepču su pokazala da postoji ravnoteža u frekvenci jedinki sa B hromozomima tokom 5 godina (Vujošević 1993). Iako je frekvenca stabilna tokom godina, uočena su sezonska variranja u frekvenci jedinki sa B hromozomima (Vujošević i Blagojević 1995). Tendencija održavanja ravnoteže B hromozoma vidi se i iz podatka da sa smanjenjem broja jedinki sa B hromozomima, dolazi do povećanja broja B hromozoma po jedinki (Vujošević 1993, Vujošević i Blagojević 1995). Iako je mehanizam održavanja polimorfizma jedinki sa B hromozomima još uvek nepoznat, upravo su te jedinice regulatori populacione dinamike (Vujošević i Blagojević 1995). U uslovima koji nisu optimalni za vrstu i u ekstremnim sredinskim uslovima, jedinice sa B hromozomima se favorizuju, odnosno imaju višu stopu preživljavanja i veći fitnes u odnosu na jedinice bez B hromozoma (Zima i sar. 2003, Vujošević i sar. 2007). Naime, pokazana je pozitivna veza između prosečnog broja B hromozoma i mase tela, ali samo kod mužjaka, što može da ukazuje na selektivnu prednost mužjaka koji su nosioci B hromozoma tokom preživljavanja zimskog perioda. U tom slučaju jedinice sa B hromozomima bi bile bolje adaptirane na hladne zimske uslove, a kao rezultat toga je povećana masa tela (Zima i sar. 2003). Vujošević i sar. (2007) su uočili da je frekvenca jedinki sa B hromozomima najmanja na staništu koje je optimalno za vrstu. Adaptivni efekat B hromozoma mogao bi da bude rezultat uticaja B hromozoma na genetičku varijabilnost u populacijama i to tako što utiču na adaptabilnost, a ne na stvaranje same adaptacije na spoljašnje uslove (Blagojević i sar. 2009).

2. CILJEVI

Cilj ovog istraživanja je detekcija genetičkog diverziteta unutar i između populacija žutogrlog miša *Apodemus flavicollis* i procena efekata B hromozoma na genetički diverzitet. Za tu svrhu biće upotrebljena AFLP metoda molekularnih markera koja omogućava analizu velikog dela genoma. Sem toga, ispitiće se efekti B hromozoma na genetičku diferenciranost populacija. Raščlanjivanjem genetičke varijabilnosti na različitim populacionim nivoima, biće testirani efekti B hromozoma na genetičku varijabilnost.

Da bi se utvrdili efekti sredine, biće izabrane populacije koje naseljavaju topološki i ekološki različita staništa. Polazna pretpostavka je da postoje različiti selekcionni pritisci u zavisnosti od toga da li je stanište optimalno za vrstu ili ne. U tom smislu testiraće se uticaj selekcije na dobijene lokuse, kao i ispitićati uticaj različitih sredinskih/klimatskih faktora na lokuse i na genetičku diferenciranost populacija u kontekstu razlika u frekvencama jedinki sa B hromozomima.

3. MATERIЈAL I METODE

3.1. UZORCI I OPIS LOKALITETA

U ovom istraživanju korišćene su četiri populacije žutogrlog miša *Apodemus flavicollis* sa različitih lokaliteta u Srbiji. Analiza je obuhvatila uzorak od 166 jedinki (Tabela 1.). Tokom 2006. i 2007. godine pomoću Longworth klopki sakupljeno je 70 jedinki sa lokaliteta Fruška gora (u daljem tekstu FG), 47 jedinki sa lokaliteta Tara (u daljem tekstu TR), 26 jedinki sa lokaliteta Devojački bunar (u daljem tekstu DB) i 23 jedinke sa lokaliteta Lisine (u daljem tekstu LS). Broj ženki i mužjaka sa B (B+) i bez B hromozoma (B0) prikazan je u Tabeli 1.

Tabela 1. Broj ženki i mužjaka sa B (B+) i bez B hromozoma (B0)

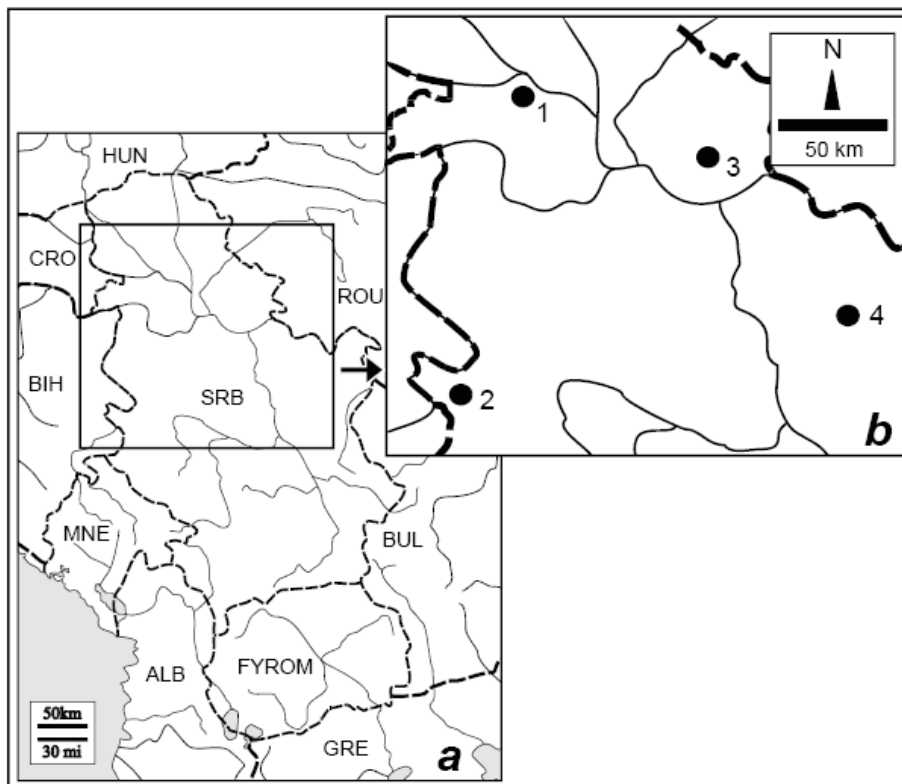
Lokalitet	B+ jedinke		Zbir	B0 jedinke		Zbir	Ukupno
	♀	♂		♀	♂		
Fruška Gora	9	7	16	25	29	54	70
Tara	6	12	18	12	17	29	47
Devojački bunar	4	5	9	9	8	17	26
Lisine	4	3	7	8	8	16	23

Lokalitet Fruška gora (FG, 45°09'17"N i 19°51'03"E) odlikuje klima umereno-kontinentalnog tipa i šumske zajednice mešovitog ili čistog sastava. Monodominantne šume grade kitnjak, bukva i ponegde lipa i hrast, dok u građu dvodominantnih šuma najčešće ulaze lipa i bukva, a ređe grab i kitnjak. Lokalitet Fruška gora predstavlja svetlu šumu, proređenih krošnji, osunčanu tokom celog dana, u kojoj ekološki faktori znatno više variraju nego u tipičnoj tamnoj šumi, visokih gustih krošnji, sa manjim dnevnim i unutar-sezonskim kolebanjem ekoloških faktora. Ovaj lokalitet na nadmorskoj visini od 539 m, može se smatrati lokalitetom koje odlikuju optimalni sredinski uslovi za vrstu *A. flavicollis*.

Ostala tri lokaliteta se opisuju kao neoptimalni za datu vrstu iz nekoliko razloga. Lokalitet Tara (TR, 43°53'46"N i 19°33'23"E) se opisuje kao planinski refugijum (nadmorska visina 1 050 m) sa ostacima tercijarne flore i vegetacijom koju odlikuju mešovite šumske zajednice smrče, jele i bukve. Bukovo-jelova šuma predstavlja tipičnu tamnu šumu, visokih gustih krošnji, sa manjim dnevnim i unutar-sezonskim kolebanjem ekoloških faktora.

Devojački bunar (DB, 45°59'46"N i 20°57'19"E) je lokalitet koji se nalazi u Deliblatskoj peščari, najvećem peščanom terenu u Evropi. Klima umereno-kontinentalnog tipa (nadmorska visina 140 m) i vegetacija koju dominantno čine bagrem, topola i hrast odlike su staništa koje navode na zaključak da je i ovo moguće optimalno stanište za jedinke vrste *A. flavicollis*. Međutim, peščana podloga i specifični mikroklimatski uslovi usled intenzivnog antropogenog uticaja, ovo stanište ipak karakterišu kao neoptimalno za datu vrstu.

Lisine (LS, 44°05'40"N i 21°38'01"E) predstavljaju lokalitet koji se nalazi na planini Beljanici na nadmorskoj visini od 376 m. Pretežno hrastove i bukove šume mogle bi da predstavljaju optimalno stanište za datu vrstu u pogledu vegetacije, ali stenovita podloga koja odlikuje ovaj lokalitet je ograničavajući faktor. Slika 3. prikazuje mapu Srbije sa lokalitetima, a geografske koordinate ispitivanih lokaliteta su prikazane u Tabeli 2.



Slika 3. Mapa Srbije sa označenim ispitivanim lokalitetima: 1- Fruška gora, 2- Tara, 3- Devojački bunar i 4- Lisine

Tabela 2. Geografske koordinate i nadmorska visina ispitivanih lokaliteta

Lokalitet	Geografska širina	Geografska dužina	Nadmorska visina (m)
FG	45°09'17"N	19°51'03"E	539
TR	43°53'46"N	19°33'23"E	1 050
DB	44°59'46"N	20°57'19"E	140
LS	44°05'40"N	21°38'01"E	376

Lokaliteti se međusobno veoma razlikuju u klimatskim uslovima koji vladaju na ispitivanim staništima (Tabela 3.). Podaci o različitim klimatskim varijablama su preuzeti iz baze podataka Republičkog hidrometeorološkog zavoda

za period od 1981-2009 godine (<http://www.hidmet.gov.rs>). Klimatske varijable kojima su opisana staništa su: prosečna godišnja temperatura (Tma), broj mraznih dana (broj dana kada je minimalna dnevna temperatura bila manja od 0°C, Tmin<0), broj ledenih dana (broj dana kada je maksimalna dnevna temperatura bila manja od 0°C, Tmax<0), broj vrelih dana (broj dana kada je maksimalna dnevna temperatura bila veća od 30°C, Tmax≥30), broj dana sa snežnim pokrivačem (Sn), godišnja insolacija (broj sunčanih sati, Insol), godišnja relativna vlažnost vazduha (% , Hum) i prosečna godišnja količina padavina (u mm/m³, Prec). U Tabeli 3. su prikazane prosečne vrednosti klimatskih varijabli za ispitivane lokalitete.

Tabela 3. Prosečne vrednosti ispitivanih klimatskih varijabli za ispitivane lokalitete

Lokalitet	Tma	Tmin<0	Tmax<0	Tmax≥30	Sn	Insol (h)	Hum (%)	Prec (mm/m ³)
FG	11.06	82.74	17.89	37.52	29.26	2091.95	76.89	40.91
TR	7.43	113.7	39.70	5.05	111.00	2007	75.30	46.45
DB	11.32	77.05	18.26	39.95	30.53	2181.66	74.95	41.83
LS	6.48	124.9	59.45	2.50	117.75	2058	77.95	41.96

3.2. CITOGENETIČKA ANALIZA

Identifikacija individua sa B hromozomima izvršena je citogenetičkom analizom konvencionalno bojenih preparata ćelija koštane srži jedinki *A. flavicollis*. Preparacija hromozoma je vršena direktno iz ćelija koštane srži modifikovanom standardnom metodom (Hsu i Patton 1969). Pre preparacije hromozoma, životinjama je intraperitonealno aplikovan citostatik kolhicin (2 gama po gramu telesne težine). Nakon jednog sata delovanja kolhicina, životinja je žrtvovana. Ćelije koštane srži iz kostiju zadnjih ekstremiteta (*os femur* i *os tibia*) inkubirane su u hipotoničnom rastvoru kalijum hlorida (0.56 M) u trajanju od 25 minuta na

temperaturi od 37°C u vodenom kupatilu. Nakon inkubacije i centrifugiranja (7 min na 1 500 obrtaja/min) dobijeni talog je fiksiran u Karnojevom fiksativu (glacijalna sirćetna kiselina i metanol u srazmeri 1:3) na 4°C u trajanju od 15 minuta. Nakon ponovljenog postupka fiksacije pravljene su mikroskopski preparati i bojeni 10% Gimsa bojom u trajanju od 15 minuta (konvencionalno bojenje). Broj hromozoma za svaku jedinku je utvrđen pregledom 30 metafaznih figura na "Jenaval" mikroskopu pri uveličanju od 1125x. Brojanje hromozoma je obavljeno putem programa Analyst (Malkov i sar. 1997).

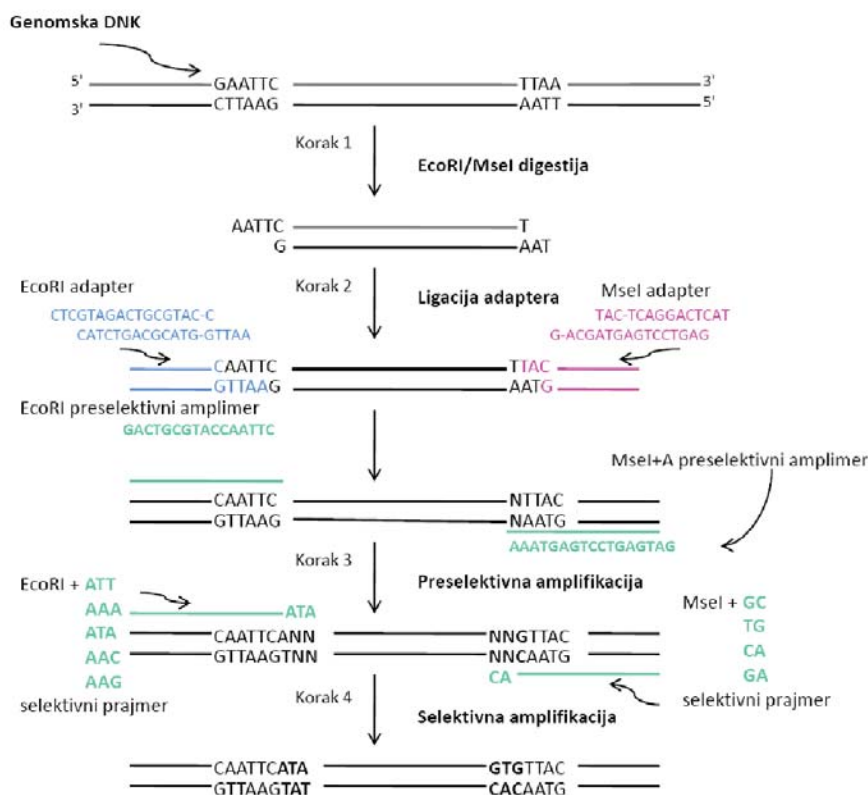
3.3. IZOLACIJA DNK

DNK je izolovana iz zamrznutih jetri žutogrlih miševa. Izolacija je izvršena fenol-hloroformskom metodom po Maniatis i sar. (1982) i pomoću seta za ekstrakciju DNK (Dneasy Blood and Tissue Kit, Quiagen). Kvalitet i čistoća DNK uzoraka veoma su važni za uspešnost i reproducibilnost AFLP reakcije (Vos i sar. 1995). Koncentracija DNK u uzorku je određena spektrofotometrijskom metodom, dok je stepen degradacije DNK testiran vizuelizacijom na 0.8% agaroznom gelu sa 0.5 µg ml⁻¹ etidijum-bromida. Samo nedegradirani DNK uzorci dobrog kvaliteta su korišćeni u analizi.

3.4. AFLP ANALIZA

Polimorfizam dužine restrikcionih fragmenata odnosno AFLP (eng. *Amplification Fragment Length Polymorphism*) je jedan od najznačajnijih i najčešće korišćenih protokola u velikom broju bioloških disciplina. Sam protokol se sastoji iz sledećih koraka:

- Digestije DNK lanaca pomoću dva restrikciona enzima, od kojih jedan prepoznaje i seče lanac sa specifičnom sekvencom (restrikcionim mestom) od 4, a drugi od 6 nukleotida.
- Ligacije odnosno vezivanja adaptera za krajeve isečenih fragmenata. Adapter je oligonukleotid poznate sekvence koji je tako konstruisan da na jednom kraju ima nukleotidnu sekvencu koja je komplementarna sekvenci restrikcionog mesta jednog od upotrebljenih restrikcioni enzima, a na drugom nukleotidnu sekvencu komplementarnu sekvenci amplimera koji će se upotrebiti u preselektivnoj amplifikaciji. Adapter u ovom slučaju ima dve uloge: vezivanjem adaptera za kraj fragmenta ukida se mesto koje prepoznaju restrikcioni enzimi, a istovremeno se dobija mesto za koje će se vezati prajmer.
- Preselektivne amplifikacije (eng. *preselective PCR*) odnosno umnožavanje fragmenata dobijenih restrikcijom za koje su vezani adapteri i to pomoću prajmera sa sekvencom komplementarnom sekvenci adaptera uz dodatak jednog nukleotida na 3' kraju. Na taj način umnožavaju se samo fragmenti koji se završavaju komplementom tog nukleotida, čime se 16 puta smanjuje broj fragmenata koji će se analizirati.
- Selektivne amplifikacije (eng. *selective PCR*) odnosno umnožavanje fragmenata dobijenih preselektivnom amplifikacijom pomoću prajmera identične sekvence kao prajmeri korišćeni u preselektivnoj amplifikaciji uz dodatak 3 nukleotida na 3' kraju. Ovaj korak se i zove selektivna amplifikacija jer je sekvenca prajmera kontrolisana tj. selektivna. Kao krajnji rezultat dobija se amplifikacija samo određenih fragmenata, čime se još dodatno smanjuje broj fragmenata koji će se analizirati. Slika 4. predstavlja shematski prikaz AFLP metode.



Slika 4. Shematski prikaz AFLP metode

AFLP analiza urađena je modifikovanom metodom po Vos i sar. (1995). Korišćen je sledeći protokol za AFLP analizu:

- 200 ng DNK po reakciji podvrgnuto je parcijalnoj digestiji pomoću restriktionog enzima *MseI* (2.5 U) u trajanju od 90 minuta na temperaturi od 65°C, zatim parcijalnoj digestiji pomoću *EcoRI* restriktionog enzima (2.5 U) tokom 90 minuta na temperaturi od 37 °C.
- Preko noći na temperaturi od 37°C je izvršena ligacija (vezivanje) dvolančanih adaptera na krajeve isečenih fragmenata DNK pomoću 0.5 µL 10 x ligacionog pufera, 5 µmol EcoRI adaptera (oligo1: 5' -CTCGTAGACTGCGTACC- 3', oligo2: 5' -CATCTGACGCATGGTTAA-3'), 50 µmol *MseI* adaptera (oligo1: 5'-GACGATGAGTCCTGAG- 3', oligo2: 5' -TACTCAGGACTCAT- 3') i 1U *T4* DNA ligaze u finalnoj zapremini od 25 µl. Svi oligonukleotidi (Tabela 4.) upotrebljeni u analizi su

proizvedeni u Metabion (Nemačka), dok su svi enzimi korišćeni u analizi proizvedeni u Fermentas International Inc. (Kanada).

Ovako pripremljeni uzorci su upotrebljeni za PCR reakcije. Od ukupno 22 raspoloživa para amplimera, 14 se pokazalo kao dovoljno informativno i izabrano je za dalju analizu. PCR reakcije su rađene u 25 µl reakcione smeše sastava: 50 ng restrikciono-ligacione smeše, 1 x PCR reakcioni pufer [750 mM Tris-HCl (pH 8.8 na 25°C), 200 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1% Tween 20], 10 mM dNTP miks, 2.75 µM amplimera i 1U *Taq* DNA polimeraze. Amplimeri korišćeni u preselektivnom PCR su za *EcoRI* (E1) 5'-GACTGCGTACCAATTC-3', a za *MseI* (M1) 5'-GATGAGTCCTGAGTAAA -3'. Uslovi preselektivnog PCR su bili: 2 minuta na 72°C, zatim 20 ciklusa po 30 sekundi na 94°C, 1 minut na 56°C, 1 minut na 72°C, finalna ekstenzija 2 minuta na 72°C i 15 minuta na 65°C. Dobijeni produkt je dvostruko razblažen dejonizovanom vodom i korišćen kao matrica za selektivni PCR. Amplimeri korišćeni u selektivnom PCR su identične sekvence kao prajmeri korišćeni u preselektivnoj amplifikaciji uz dodatak 3 nukleotida na 3' kraju, a predstavljeni su u Tabeli 4. Temperaturni profil selektivnog PCR je: 12 ciklusa po 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 65°C (sa smanjenjem od -0.7°C u svakom narednom ciklusu) i 30 sekundi na 72°C, a zatim 30 ciklusa po 30 sekundi na 94°C, 30 sekundi na 56°C i 1 minut na 72°C. Finalni korak je produžena ekstenzija od 30 minuta na 60°C.

Produkti selektivne PCR amplifikacije su analizirani na 10% nedenaturišućem poliakrilamidnom (PAA) gelu i vizuelizovani metodom bojenja srebro-nitratom. Molekularni markeri standardne dužine (pBR322 DNA/BsuRI Marker, 5; Fermentas) korišćeni su pri svakoj analizi, kao i negativna kontrola (uzorak bez DNK) radi provere moguće kontaminacije.

Tabela 4. Kombinacije amplimera korišćenih za selektivnu amplifikaciju AFLP procedure

	Kombinacija	Amplimer EcoRI	Amplimer MseI	Broj markera
1	E2/M2	E1-ATT	M1-CG	37
2	E2/M3	E1-ATT	M1-GT	33
3	E2/M4	E1-ATT	M1-AC	36
4	E2/M5	E1-ATT	M1-AG	37
5	E3/M2	E1-AAA	M1-CG	35
6	E3/M3	E1-AAA	M1- GT	37
7	E3/M4	E1-AAA	M1- AC	35
8	E3/M5	E1-AAA	M1- AG	31
9	E4/M3	E1-ATA	M1- GT	33
10	E4/M4	E1-ATA	M1- AC	31
11	E5/M3	E1-AAC	M1- GT	32
12	E5/M4	E1-AAC	M1- AC	32
13	E5/M5	E1-AAC	M1- AG	29
14	E6/M3	E1-AAG	M1- GT	33

Samo jasni i reproducibilni PCR amplikoni su bili uključeni u dalju analizu, a oni sa istom pokretljivošću posmatrani su kao identični, bez obzira na intenzitet signala. Softverom Total Lab v.1.10 (Phoretix, Newcastle, UK) fragmenti su detektovani kao dominantni markeri i prevedeni u binarne matrice. Vrednost 1 pokazuje prisustvo, dok 0 pokazuje odsustvo markera. Dužina fragmenata je određena prema položaju fragmenta na PAA gelu u odnosu na marker poznate dužine.

Dobijena binarna matrica je poslužila kao osnova za nekoliko različitih analiza. Jedinke su podeljene u 8 grupa na osnovu pripadnosti populaciji i prisustva B hromozoma: FG B+ (16 jedinki), FG B0 (54 jedinke), TR B+ (18 jedinki),

TR B0 (29 jedinki), DB B+ (9 jedinki), DB B0 (17 jedinki), LS B+ (7 jedinki) i LS B0 (16 jedinki).

3.5. ANALIZA GRUPISANJA

Procena sličnosti između ovih grupa izvršena je preko Neijevih genetičkih distanci dobijenih u POPGENE softveru (Yeh i sar. 1997). Navedene genetičke distance korišćene su u cilju naglašavanja sličnosti između jedinki sa ili bez B hromozoma, a ne različitosti između njih. Analiza je urađena na svakoj populaciji zasebno, ali i na podacima koji obuhvataju sve četiri populacije. Na osnovu dobijenih distanci primenom UPGMA klaster analize formirani su fenogrami u programu STATISTICA 6.0.

Međutim, za statističke zaključke, pristup zasnovan na modelu, kao što je Bajesov metod grupisanja (eng. *Bayesian clustering method*) je mnogo prikladniji (Pritchard i sar. 2000) i implementiran je u program STRUCTURE (Falush i sar. 2007). Program pretpostavlja postojanje Hardi-Vajnbergovog ekvilibrijuma između populacija i na osnovu toga kreira klastere individua koji imaju karakteristične alelske frekvence. Ključni korak u ovoj analizi je odabir broja klastera na osnovu koga program grupiše jedinke. Ukoliko je broj klastera (K) jednak broju populacija sa Hardi-Vajnbergovom ravnotežom, program će grupisati jedinke na osnovu njihove populacione pripadnosti. Analiza je urađena pod pretpostavkom zajedničkog porekla ispitivanih jedinki (eng. *admixture model*) i sličnih alelskih frekvenci između populacija sa različitih lokaliteta (eng. *correlated allele frequencies*), sa 100 000 MCMC (eng. *Markov chain Monte Carlo*) ponavljanja posle odbacivanja prvih 10 000 ponavljanja (eng. *burn-in iterations*). Broj klastera je bio podešen na $K = 2-8$, pri čemu je za svaku vrednost K urađeno 10 nezavisnih simulacija. Broj K je podešen u cilju detekcije klastera na osnovu pripadnosti populaciji i prisustva B hromozoma.

3.6. POPULACIONO-GENETIČKA ANALIZA

Za procenu alelskih frekvenci za svaki lokus upotrebljen je Bajesov metod sa neravnomernom distribucijom alelskih frekvenci (eng. *Bayesian method with nonuniform prior distribution of allele frequencies*, Zhivotovsky 1999) inkorporiran u softver POPGENE. Dobijene vrednosti alelskih frekvenci korišćene su za procenu genetičkog diverziteta i populacione strukture odnosno genetičke diferenciranosti populacija. Za određivanje genetičkog diverziteta korišćeni su procenat polimorfnih lokusa (%P) i Neijev diverzitet gena (H) (Nei 1973). Procenat polimorfnih lokusa predstavlja procenat svih polimorfnih lokusa bez obzira na njihovu frekvencu, dok Neijev diverzitet gena predstavlja frekvencu očekivanih heterozigota za dati lokus pri slučajnom ukrštanju.

Analiza je urađena na jedinkama svake populacije zasebno pri čemu su jedinke grupisane na osnovu prisustva B hromozoma, ali i na jedinkama sve četiri populacije zajedno gde su jedinke grupisane prema populacionoj pripadnosti i prisustvu B hromozoma. Dobijene vrednosti procenta polimorfnih lokusa su međusobno upoređene i testirane na značajnost 2x2 testom, dok su H vrednosti testirane Mann-Whitney U testom u programu STATISTICA 6.0.

3.7. DETEKCIJA LOKUSA POD SELEKCIJOM

Bajesov pristup je iskorišćen i za detekciju lokusa pod selekcijom u softveru Bayescan (Foll i Gaggiotti 2008). F_{ST} vrednost predstavlja doprinos lokus specifičnih efekata, kao što je selekcija, i efekata specifičnih za populaciju ili grupu, kao što su genetički drift ili stopa migracija (Balding i Nichols 1995). Bayescan softver preko hijerarhijskog Bajesovog pristupa procenjuje efekte lokusa i populacije ili grupe na dobijene F_{ST} vrednosti. Radi minimiziranja lažno pozitivnih i

maksimiziranja istinito pozitivnih rezultata, korišćeni su „decisive“ ($P > 0.99$), „very strong“ ($P > 0.97$) i „strong“ ($P > 0.91$) kriterijum na Džefrijevoj (eng. *Jeffrey*) skali za tumačenje Bajesovih faktora. Bajesov faktor se izračunava za svaki lokus i predstavlja verovatnoću da je dati lokus pod delovanjem selekcije. U zavisnosti od toga da li Bajesov faktor ima pozitivnu ili negativnu vrednost, možemo da zaključimo da li je u pitanju direkcionalna ili balansna selekcija.

3.8. ASOCIJACIJA LOKUSA POD SELEKCIJOM SA KLIMATSKIM VARIJABLAMA

Za ispitivanje povezanosti frekvence AFLP markera i klimatskih podataka sa analiziranih lokaliteta upotrebljen je program SAM (Joost i sar. 2008). Program se zasniva na izračunavanju višestrukih modela univarijantne log-regresije. Na ovakav način je moguće detektovati lokuse koji su pod delovanjem selekcije usled različitih sredinskih uslova koji postoje na različitim staništima i povezati razlike u frekvenci lokusa sa konkretnom sredinskom varijablom. Analiza je urađena na čitavom setu AFLP podataka radi asocijacije sa 8 geografskih i klimatskih varijabli (broj mraznih dana, broj ledenih dana, broj vrelih dana, broj dana sa snežnim pokrivačem, godišnja insolacija, godišnja relativna vlažnost vazduha i prosečna godišnja količina padavina). Molekularni podaci korišćeni u ovoj analizi su predstavljeni u obliku matrice. Svaki red matrice predstavlja jednu individuu, dok su u kolonama predstavljene klimatske varijable i binarne informacije koje opisuju svaki AFLP marker. Nivo značajnosti je bio podešen na $P < 0.001$.

3.9. GENETIČKA DIFERENCIRANOST POPULACIJA

Softver Arlequin v.3.5 korišćen je za procenu F_{ST} kao mere diferenciranosti populacija. Izračunata je vrednost za sve populacije, ali i za svaki par populacija, sa statističkom značajnošću procenjenom na osnovu 1 000 permutacija (Excoffier i Lischer 2010). Sem toga poređeni su indeksi dobijeni na osnovu ukupnog seta podataka (471 lokus) i na osnovu redukovanog seta podataka (bez 12 lokusa koji su detektovani kao lokusi pod selekcijom).

Raspodela genetičke varijabilnosti unutar i između grupa ispitivana je analizom molekularne varijanse (AMOVA). AMOVA se zasniva na proceni indeksa genetičke strukture na osnovu informacija o alelskom sastavu haplotipova, kao i na osnovu alelskih frekvenci. Hijerarhijska analiza varijanse deli ukupnu varijansu na kovarijacione komponente usled individualnih (Vc), intrapopulacionih (Vb) i/ili interpopulacionih razlika (Va). Na osnovu kovarijacionih komponenti izračunavaju se fiksacioni indeksi. Značajnost kovarijacione komponente asocirane sa različitim nivoima genetičke strukture testira se neparametrijskom permutacionom procedurom. Nivo značajnosti procenjen je pomoću 1 000 permutacija, a pouzdanost potvrđena sa 2 000 ponavljanja (eng. *Bootstrap*). AMOVA je izvršena na različito grupisanim podacima u cilju što boljeg opisivanja raspodele genetičke varijabilnosti na čitavom skupu podataka sa jedinkama grupisanim na osnovu pripadnosti populaciji (FG, TR, DB i LS) i na skupu podataka bez lokusa koji su detektovani kao lokusi pod selekcijom.

Uticaj geografske udaljenosti populacija na njihovu genetičku strukturu ispitivan je prostornom analizom molekularne varijanse (SAMOVA - eng. *Spatial analysis of molecular variance*) pomoću SAMOVA 1.0 softvera (Dupanloup i sar. 2002). Sama analiza simultano koristi podatke o alelskim frekvencama i geografske podatke mesta uzorkovanja radi identifikacije genetički srodnih populacija koje su geografski homogene i međusobno maksimalno diferencirane.

Kao sporedan rezultat analize, dolazi i do identifikacije mogućih genetičkih barijera između ovih grupa. Urađeno je 10 000 iteracija za svaki od 100 slučajnih inicijalnih uslova i testirane su sve moguće kombinacije grupisanja jedinki sa unapred određenim brojem grupa od 2 do 4.

3.10. TESTIRANJE MODELA GENETIČKE DIFERENCIRANOSTI

Određivanje veze između genetičke diferenciranosti populacija i geografskih distanci izvršeno je pomoću Mantel testa (TFPGA 1.3). Svi Mantel testovi uključivali su 1 000 slučajnih ponavljanja.

4. REZULTATI

4.1. CITOGENETIČKA ANALIZA

Ukupno je analizirano 166 jedinki sa četiri lokalita u Srbiji sa različitim frekvencama B hromozoma: Fruška gora (FG), Tara (TR), Devojački bunar (DB) i Lisine (LS). Broj ispitivanih jedinki po lokalitetu naveden je u Tabeli 5. Citogenetička analiza pokazala je da su frekvence B hromozoma u populacijama: Fruška gora 23%, Tara 38%, Devojački bunar 35% i Lisine 30% (Tabela 5.). U Tabeli 5. prikazani su rezultati citogenetičke analize ispitivanih jedinki.

Tabela 5. Rezultati citogenetičke analize ispitivanih jedinki

Populacija	Broj ispitivanih jedinki	Broj jedinki sa B hromozomima	Frekvencija B hromozoma (%)	Frekvencija jedinki sa 1 B hromozomom	Frekvencija jedinki sa ≥ 2 B hromozoma
Fruška gora	70	16	23	0.75	0.25
Tara	47	18	38	0.56	0.44
Devojački bunar	26	9	35	0.44	0.56
Lisine	23	7	30	0.86	0.14

4.2. AFLP ANALIZA

Genotipizacija jedinki ukupno je dala 471 polimorfni marker. Dužina dobijenih markera je bila od 198 bp do 42 bp. Prosečan broj markera po prajmerskom paru je 33.64 ± 2.56 , u opsegu od 29 do 37. Detektovan je visok nivo polimorfizma ukupno, ali i za svaku populaciju pojedinačno. Marker karakterističan za jedinke sa B hromozomima nije pronađen. Broj markera po populaciji, kao i broj markera karakterističnih za datu populaciju predstavljen je u Tabeli 6.

Tabela 6: Broj markera po populaciji i broj markera karakterističnih za datu populaciju

Populacija	Ukupan broj markera	Broj populaciono-specificnih markera
Fruška gora	310	98
Tara	206	30
Devojački bunar	253	3
Lisine	259	12

4.3. KLASTER ANALIZA

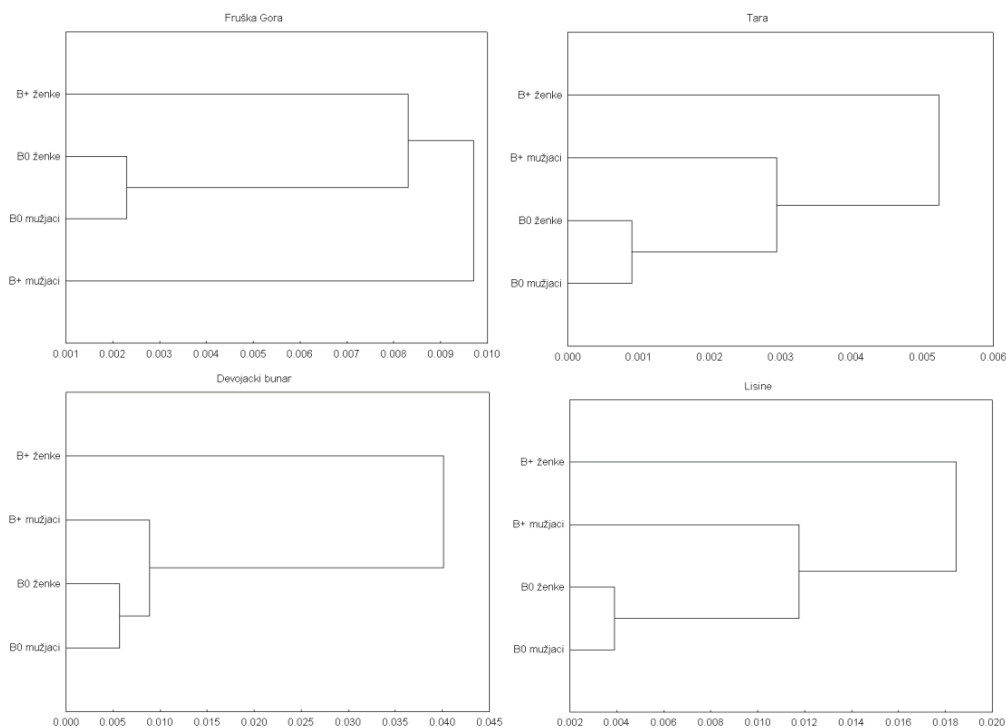
Prosečna genetička distanca između ispitivanih populacija je 0.0707. Prosečne distance u okviru svake populacije su: Fruška gora 0.0090, Tara 0.0031, Devojački bunar 0.0182 i Lisine 0.0114. U Tabeli 7. prikazane su Neijeve genetičke distance između mužjaka i ženki sa i bez B hromozoma u svakoj populaciji zasebno.

U populaciji Fruška gora najveća genetička distanca postoji između jedinki sa B hromozomima (0.0230), dok je najmanja između B0 jedinki (0.0023). U populaciji Tara najveća genetička distanca je takođe između jedinki sa B hromozomima (0.0075), dok je najmanja između jedinki bez B hromozoma (0.0009). Isti trend nastavlja se i u populacijama Devojački bunar i Lisine (DB: B+ 0.0455, B0 0.0057; LS: B+ 0.0257, B0 0.0039). Mogući razlog većih prosečnih genetičkih distanci zabeleženih u populacijama Devojački bunar i Lisine je relativno mali broj jedinki po uzorku, odnosno manji od broja jedinki iz ostale dve populacije. Sem toga moguće je da visok procenat jedinki nosilaca B hromozoma dodatno utiče na povećanje vrednosti genetičkih distanci između jedinki tih populacija.

Tabela 7. Neijeve genetičke distance između mužjaka i ženki sa i bez B hromozoma u svakoj populaciji zasebno

Fruška gora	B+ ♀	B+ ♂	B0 ♀
B+ ♂	0.0203		
B0 ♀	0.0098	0.0097	
B0 ♂	0.0083	0.0141	0.0023
Tara	B+ ♀	B+ ♂	B0 ♀
B+ ♂	0.0075		
B0 ♀	0.0040	0.0041	
B0 ♂	0.0042	0.0018	0.0009
Devojački bunar	B+ ♀	B+ ♂	B0 ♀
B+ ♂	0.0455		
B0 ♀	0.0389	0.0113	
B0 ♂	0.0359	0.0064	0.0057
Lisine	B+ ♀	B+ ♂	B0 ♀
B+ ♂	0.0257		
B0 ♀	0.0154	0.0118	
B0 ♂	0.0143	0.0117	0.0039

Način povezanosti analiziranih grupa na UPGMA klaster dijagramu (prvo se grupišu jedinke bez B hromozoma, a zatim jedinke sa B hromozomima) ukazuje na činjenicu da postojanje B hromozoma utiče na genetičku sličnost između jedinki ispitivane populacije, odnosno da postoje veće genetičke razlike među jedinkama sa B hromozomima (Slika 5.).



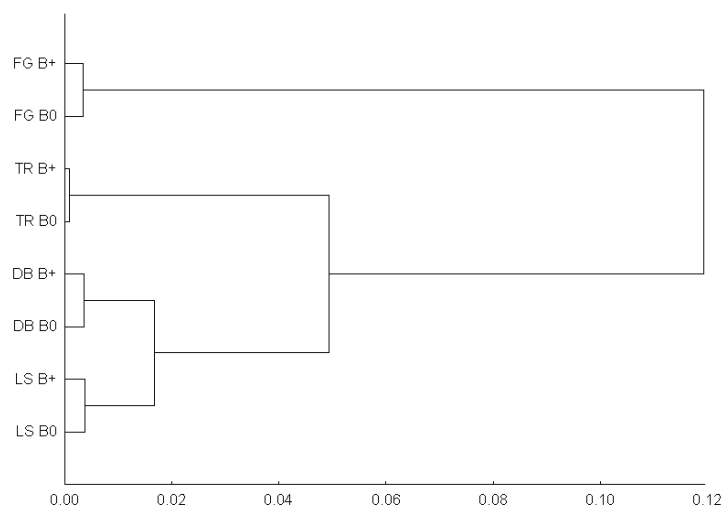
Slika 5: UPGMA klaster dijagram svake populacije dobijen na osnovu Neijevih distanci između ispitivanih jedinki

Analiziranje sve četiri populacije pokazalo je sličan trend (Tabela 8.). Najmanja genetička distanca postoji između B0 jedinki populacije Tara (0.0008), dok je najveća detektovana između B+ jedinki populacija Fruška gora i Lisine (0.1391). Veće genetičke distance uočene su između jedinki sa B hromozomima iz različitih populacija nego između B+ i B0 jedinki iz različitih populacija. Veće intra- i interpopulacione genetičke distance između jedinki sa B hromozomima ukazuju na postojanje veće genetičke varijabilnosti među jedinkama sa B hromozomima.

Tabela 8. Neijeve genetičke distance između jedinki sa i bez B hromozoma u ispitivanim populacijama. Najmanja i najveća genetička distanca su podvučene.

	FB B+	TR B+	DB B+	LS B+	FG B0	TR B0	DB B0
TR B+	0.1098						
DB B+	0.1296	0.0468					
LS B+	<u>0.1391</u>	0.0623	0.0189				
FG B0	0.0034	0.1014	0.1174	0.1298			
TR B0	0.1050	<u>0.0008</u>	0.0479	0.0615	0.0979		
DB B0	0.1287	0.0362	0.0036	0.0182	0.1155	0.0375	
LS B0	0.1343	0.0518	0.0161	0.0037	0.1240	0.0509	0.0141

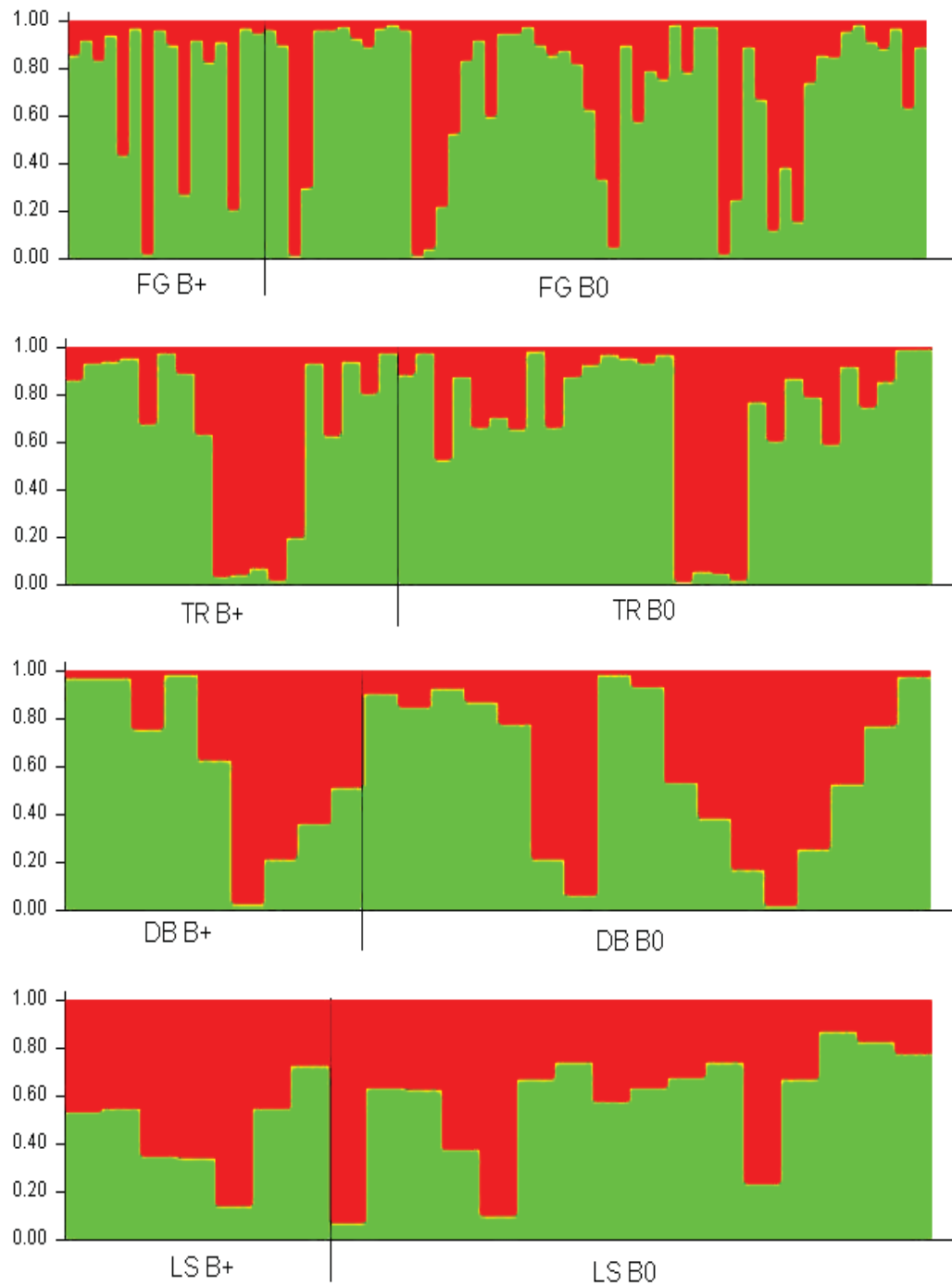
Način povezanosti analiziranih grupa na UPGMA klaster dijagramu (prvo se grupišu jedinke unutar svake populacije, a zatim se grupišu populacije sa višom frekvencom B hromozoma) ukazuje na činjenicu da postojanje B hromozoma utiče na genetičku sličnost između jedinki ispitivanih populacija (Slika 6.).



Slika 6. UPGMA klaster dijagram dobijen na osnovu Neijeve distanci između ispitivanih populacija

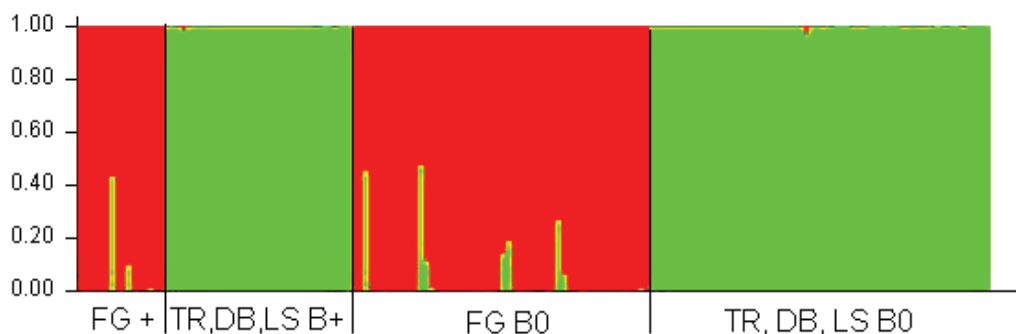
Na osnovu genetičkih distanci, UPGMA klaster dijagram je pokazao da postoje veće genetičke razlike među jedinkama sa B hromozomima, nego što je to slučaj sa B0 jedinkama kada se analiziraju populacije pojedinačno. Analiza svih populacija zajedno pokazala je grupisanje na osnovu populacione pripadnosti i veću sličnost između populacija koje imaju višu frekvencu B nosilaca. Međutim UPGMA klaster dijagram predstavlja samo vizuelizaciju genetičkih distanci, bez statističke potpore rezultata. Za dobijanje statistički značajnih zaključaka o genetičkoj sličnosti između jedinki sa i bez B hromozoma, kako u okviru jedne populacije tako i između populacija, urađen je Bajesov metod grupisanja.

Pojedinačna analiza populacija nije pokazala postojanje pravilnosti i jasnog odvajanja jedinki sa i bez B hromozoma (Slika 7.).



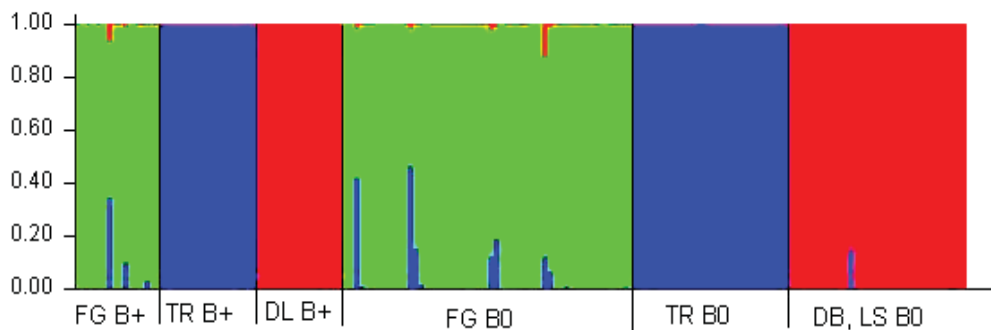
Slika 7. Rezultati Bajesovog metoda grupisanja ispitivanih jedinki svake populacije

Jedinke svih populacija analizirane su sa različito zadatim vrednostima K u zavisnosti od cilja testiranja. Vrednost $K = 2$ je zadata u cilju mogućeg grupisanja jedinki na osnovu prisutnosti B hromozoma (Slika 8.). Međutim jedinke su se grupisale slično grupisanju u UPGMA klaster dijagramu. Populacija Fruška gora se jasno odvojila od ostale tri populacije za koje se pokazalo da su prilično genetički slične.



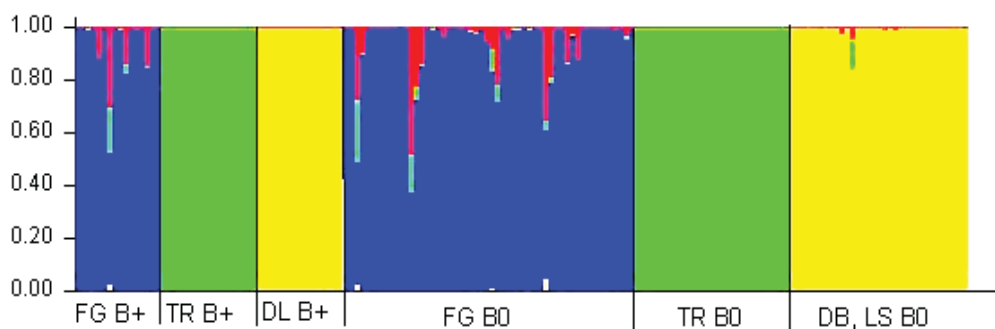
Slika 8. Rezultati Bajesovog metoda grupisanja ($K = 2$) ispitivanih jedinki svake populacije

Za zadatu vrednost $K = 3$, opet se jasno odvojila populacija Fruška gora, ali se odvojila i populacija Tara od populacija Devojački bunar i Lisine (Slika 9.).



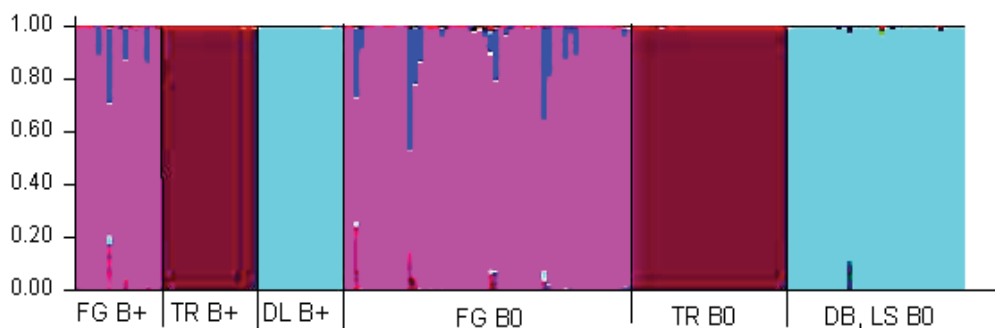
Slika 9. Rezultati Bajesovog metoda grupisanja ($K = 3$) ispitivanih jedinki svake populacije. DL B+ - B+ jedinke iz populacija Devojački bunar i Lisine

Grupisanje sa zadatom vrednošću $K = 4$ je dalo neočekivane rezultate. Naime, nije došlo do grupisanja na osnovu populacione pripadnosti kao što je očekivano na osnovu UPGMA klaster dijagrama, nego su se ponovile grupe iz $K = 3$ analize, sa četvrtom grupom koja se nasumično pojavljuje u svim populacijama, ali je najzastupljenija u populaciji Fruška gora (Slika 10.).



Slika 10. Rezultati Bajesovog metoda grupisanja ($K = 4$) ispitivanih jedinki svake populacije. DL B+ - B+ jedinke iz populacija Devojački bunar i Lisine

Zadata vrednost $K = 8$ je ukazala na postojanje najvećeg genetičkog diverziteta u populaciji Fruška gora. Iako je zadato grupisanje u 8 grupa, preovlađuju 4 grupe (Slika 11.).



Slika 11. Rezultati Bajesovog metoda grupisanja ($K = 8$) ispitivanih jedinki svake populacije. DL B+ - B+ jedinke iz populacija Devojački bunar i Lisine

4.4. ANALIZA GENETIČKOG DIVERZITETA

Genetički diverzitet predstavlja meru genetičke različitosti individua u populaciji ili populacijama. Kao parametri procene genetičkog diverziteta korišćeni su procenat polimorfnih lokusa (%P) i Neijev diverzitet gena (H).

Poređenje procenta polimorfnih lokusa između jedinki sa i bez B hromozoma u okviru svake populacije zasebno, pokazalo je statistički značajne razlike jedino u populaciji Lisine. Međusobnim poređenjem procenta polimorfnih lokusa B+ i B0 jedinki iz različitih populacija pokazano je da se jedinke FG populacije značajno razlikuju od jedinki ostalih populacija bilo da su u pitanju B+, bilo B0 jedinke (Tabela 9). Zanimljiv je podatak da se i B+ i B0 jedinke populacije Tara značajno razlikuju od B0 jedinki populacija Devojački bunar i Lisine, što nije slučaj sa B+ jedinkama datih populacija. Rezultati međusobnog poređenja i testiranja značajnosti razlika u procentu polimorfnih lokusa B+ i B0 jedinki ispitivanih populacija su prikazani u Tabeli 9., a statistički značajne vrednosti χ^2 testa ($P < 0.001$) su podvučene.

Tabela 9. Rezultati međusobnog poređenja i testiranja značajnosti razlika u procentu polimorfnih lokusa B+ i B0 jedinki ispitivanih populacija. Statistički značajne vrednosti χ^2 testa ($P < 0.001$, $df = 1$) su podvučene.

	FG B+	FG B0	TR B+	TR B0	DB B+	DB B0	LS B+
FG B0	1.03						
TR B+	<u>38.39</u>	<u>51.67</u>					
TR B0	<u>33.74</u>	<u>46.28</u>	0.16				
DB B+	<u>20.41</u>	<u>30.47</u>	2.90	1.17			
DB B0	<u>9.58</u>	<u>16.85</u>	<u>9.82</u>	<u>7.51</u>	2.06		
LS B+	<u>30.09</u>	<u>42.02</u>	0.52	0.11	0.96	<u>5.82</u>	
LS B0	<u>12.14</u>	<u>20.17</u>	<u>7.53</u>	<u>5.52</u>	1.09	0.15	<u>4.09</u>

Poređenje Neijevog diverziteta gena između jedinki sa i bez B hromozoma u okviru svake populacije zasebno je pokazalo da ne postoje statistički značajne razlike. Međusobno poređenje Neijevog diverziteta gena B+ i B0 jedinki iz različitih populacija je pokazalo da se samo jedinke FG populacije značajno razlikuju od jedinki ostalih populacija, bilo da su u pitanju B+, bilo B0 jedinke. Rezultati međusobnog poređenja i testiranja značajnosti razlika u Neijevom diverzitetu gena B+ i B0 grupa ispitivanih populacija prikazani su u Tabeli 10., a statistički značajne vrednosti Z testa ($P < 0.001$) su podvučene.

Tabela 10. Rezultati međusobnog poređenja i testiranja značajnosti razlika u Neijevom diverzitetu gena B+ i B0 grupa ispitivanih populacija. Statistički značajne vrednosti Z testa ($P < 0.001$) su podvučene.

	FG B+	FG B0	TR B+	TR B0	DB B+	DB B0	LS B+
FG B0	<u>-0.5979</u>						
TR B+	<u>8.5264</u>	<u>9.2861</u>					
TR B0	<u>8.4535</u>	<u>9.2998</u>	-0.1744				
DB B+	<u>7.4677</u>	<u>8.2461</u>	-1.5010	-1.3734			
DB B0	<u>7.91587</u>	<u>8.58857</u>	-1.8732	-1.4037	-0.1353		
LS B+	<u>7.6069</u>	<u>8.3663</u>	-0.8917	-0.9196	0.2037	0.4261	
LS B0	<u>7.4891</u>	<u>8.4363</u>	-1.6969	-1.3697	-0.1408	-0.4002	-0.3549

Procenat polimorfnih lokusa i Neijev diverzitet gena u ukupnom uzorku predstavljeni su u Tabeli 11.

Tabela 11. Procenat polimorfnih lokusa i Neijev diverzitet gena u ukupnom uzorku

	% P	H		% P	H
FG	65.61	0.241	FG B+	62.21	0.232
			FG B0	65.39	0.240
TR	43.52	0.122	TR B+	42.04	0.120
			TR B0	43.31	0.119
DB	53.29	0.133	DB B+	47.56	0.134
			DB B0	52.23	0.124
LS	53.5	0.133	LS B+	44.37	0.133
			LS B0	50.96	0.126
Ukupno	100	0.229	B+	97.66	0.223
			B0	98.94	0.229

Analiza je pokazala visok nivo polimorfizma među ispitivanim populacijama. Svi lokusi su bili polimorfni. Poređenje procenta polimorfnih lokusa između jedinki sa (97.66 %) i bez B (98.94 %) hromozoma u ukupnom uzorku nije pokazalo statistički značajne razlike ($\chi^2 = 2.29$, $df = 1$, $P = 0.948$). Poređenje populacija pokazalo je da se populacije Fruška gora i Tara značajno razlikuju međusobno kao i od ostalih populacija, dok statistički značajne razlike ne postoje između populacija Devojački bunar i Lisine. U Tabeli 12. prikazani su rezultati 2x2 testa ispitivanja značajnosti razlika u procentu polimorfnih lokusa između ispitivanih populacija, a statistički značajne vrednosti χ^2 testa ($P < 0.001$) su podvučene.

Tabela 12. Rezultati 2x2 testa ispitivanja značajnosti razlika u procentu polimorfnih lokusa između ispitivanih populacija. Statistički značajne vrednosti χ^2 testa ($P < 0.001$, $df = 1$) su podvučene.

	FG	TR	DB
TR	<u>46.31</u>		
DB	<u>14.81</u>	<u>8.99</u>	
LS	<u>14.32</u>	<u>9.39</u>	0.00

Utvrđeni prosečan Neijev diverzitet gena među ispitivanim populacijama je 0.2290. Statistički značajne razlike nisu utvrđene poređenjem H između B+ ($H = 0.2231$) i B0 ($H = 0.2297$) jedinki u ukupnom uzorku ($Z = -0.3971$, $P = 0.6913$). Poređenje vrednosti Neijevog diverziteta gena ispitivanih populacija je pokazalo da se jedinke populacije Fruška gora značajno razlikuju od jedinki ostalih populacija, kao i jedinke populacija Tara i Lisine. Rezultati međusobnog poređenja i testiranja značajnosti razlika u Neijevom diverzitetu gena ispitivanih populacija prikazani su u Tabeli 13. Statistički značajne vrednosti Z testa ($P < 0.001$) su podvučene.

Tabela 13. Rezultati međusobnog poređenja i testiranja značajnosti razlika u Neijevom diverzitetu gena ispitivanih populacija. Statistički značajne vrednosti Z testa ($P < 0.001$) su podvučene.

	FG	TR	DB
TR	<u>9.3003</u>		
DB	<u>8.0439</u>	-1.9534	
LS	<u>7.9788</u>	<u>-2.0230</u>	-0.1090

Procenat polimorfnih lokusa i Neijev diverzitet gena, kao mere genetičkog diverziteta populacija, pokazali su jasno odvajanje populacije Fruška gora od ostale tri populacije. Trend jasnog odvajanje populacije sa najnižom frekvencom B hromozoma (Fruška gora) od ostalih populacija (sa višom frekvencom B

hromozoma) kojim je utvrđeno testiranjem genetičkih distance je ovom prilikom potvrđen.

4.5. DETEKCIJA LOKUSA POD SELEKCIJOM

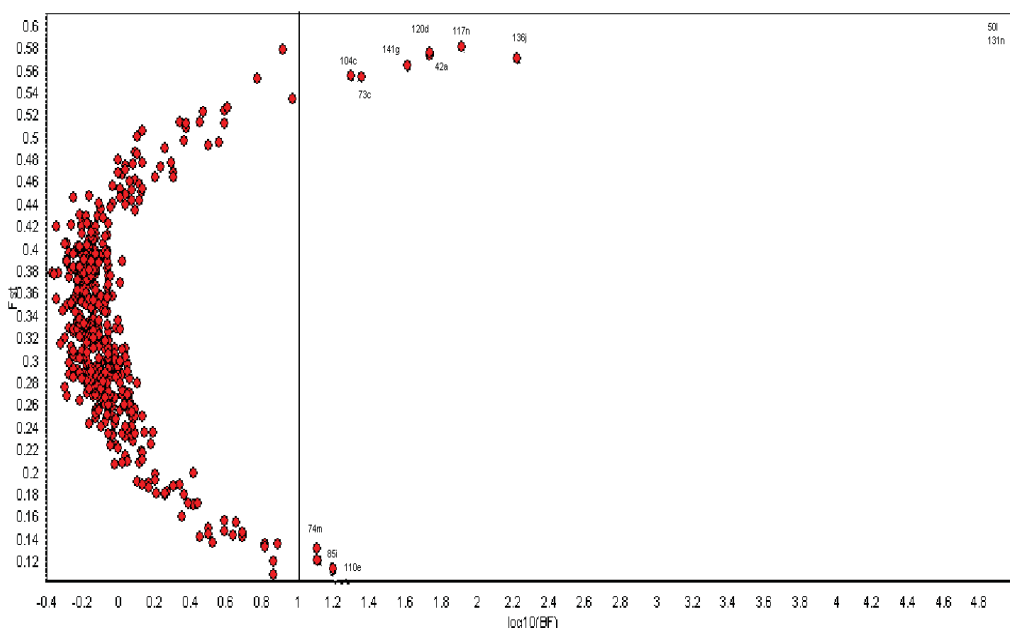
AFLP analiza 166 jedinki sa četiri lokaliteta pokazala je postojanje velikog broja populaciono specifičnih lokusa (Tabela 6.), međutim marker karakterističan za jedinke sa B hromozomima nije utvrđen. Ono što je ipak detektovano jesu razlike u frekvencama alela ispitivanih lokusa između B+ i B0 jedinki, a statistička značajnost tih razlika je testirana Mann-Whitney *U* testom ($Z=11.2261$, $P<0.0001$).

U cilju detekcije lokusa pod delovanjem selekcije jedinke su grupisane na osnovu populacione pripadnosti. Bajesova analiza je detektovala dvanaest lokusa kao lokuse pod uticajem direkcione selekcije (Tabela 14.).

Tabela 14. Lokusi detektovani kao lokusi pod uticajem selekcije. Lokusi su grupisani prema Džefrijevoj skali za tumačenje Bajesovih faktora: prva grupa su „decisive“ ($P > 0.99$), druga grupa su „very strong“ ($P > 0.97$) i treća grupa su „strong“ ($P > 0.91$)

	Alpha	F_{ST}
„decisive“		
131n	1.219	0.604
50l	1.230	0.605
„very strong“		
141g	1.063	0.564
136j	1.079	0.571
120d	1.104	0.577
117n	1.124	0.581
42a	1.097	0.574
„strong“		
110e	-1.467	0.113
104c	1.019	0.556
85i	-1.449	0.121
74m	-1.322	0.131
73c	1.005	0.554

Od dvanaest lokusa detektovanih kao lokusi pod delovanjem selekcije, samo tri su zajednička za sve populacije i to lokusi 110e, 85i and 74m. Lokusi 141g, 120d i 104c su karakteristični za populaciju Fruška gora, dok su preostali lokusi detektovani u ostale tri populacije. Osim toga, opet je pokazano jasno odvajanje populacije Fruške Gore od ostale tri populacije. Slika 12. prikazuje rezultate BayeScan programa za detekciju lokusa pod uticajem selekcije.



Slika 12. Rezultati BayeScan programa za detekciju lokusa pod uticajem selekcije.

Lokusi koji se nalaze desno od vertikalne linije predstavljaju lokuse pod uticajem direkcione selekcije.

4.6. ASOCIJACIJA LOKUSA POD SELEKCIJOM SA KLIMATSKIM VARIJABLAMA

Varijacije u učestalosti AFLP markera su testirane SAM softverom u cilju određivanja asocijacija sa različitim sredinskim varijablama (prosečna godišnja temperatura, broj mraznih dana, broj ledenih dana, broj vreljih dana, broj dana sa snežnim pokrivačem, godišnja insolacija, godišnja relativna vlažnost vazduha i prosečna godišnja količina padavina). Značajne asocijacije utvrđene su za 140 (29.7 %) od 471 ispitivanog lokusa na 99.99 %-tnom intervalu poverenja sa Bonferonijevom korekcijom. Najveći broj lokusa je asociiran sa brojem mraznih dana (72), dok je najmanji broj lokusa asociiran sa godišnjom insolacijom (31). Broj lokusa asociiranih sa ostalim sredinskim varijablama je: prosečna godišnja temperatura - 63, broj ledenih dana - 55, broj vreljih dana - 69, broj dana sa

snežnim pokrivačem - 61, godišnja relativna vlažnost vazduha - 44 i prosečna godišnja količina padavina - 38.

Jedino su lokusi 160h i 54n bili asocirani sa svim testiranim sredinskim varijablama. Lokus 160h je karakterističan za populaciju Fruška gora, dok je lokus 54n detektovan u svim populacijama, ali sa višom frekvencom u populacijama TR, DB i LS. Dvanaest lokusa (98g, 66g, 101h, 148j, 140b, 130b, 80b, 198c, 95c, 75f, 137k i 53l) asocirano je sa 7 sredinskih varijabli.

Program Bayescan je detektovao 12 lokusa koji su pod delovanjem selekcije, međutim SAM program je asocirao samo 6 sa nekom sredinskom varijablom (Tabela 15.). Značajan je podatak da lokusi koji su okarakterisani kao lokusi na koje deluje najjači selekcionni pritisak, nisu asocirani ni sa jednom od 8 testiranih sredinskih varijabli. Lokusi 74m i 120d imaju najveći broj asocijacija (4) sa sredinskim varijablama. Lokus 74m je detektovan u svim populacijama, dok je lokus 120d jedinstven za FG populaciju. Oba lokusa imaju veoma visoku frekvencu kako među B+, tako i među B0 jedinkama. Lokus 85i, koji je detektovan u svim populacijama, asociran je sa tri sredinske varijable i ima višu frekvencu među B+ jedinkama, ali samo u populacijama DB i LS. Treći lokus koji je detektovan u svim populacijama i okarakterisan kao lokus pod delovanjem selekcije, nije asociran ni sa jednim sredinskom varijablom. Lokus 141g, karakterističan za FG populaciju, asociran je jedino sa godišnjom insolacijom. Lokusi 117n i 73c, detektovani jedino u populacijama DB i LS, asocirani su sa brojem mraznih dana i godišnjom relativnom vlažnosti vazduha, i brojem mraznih dana. Lokus 117n ima višu frekvencu kod B+ jedinki, dok lokus 73c ima višu frekvencu među B0 jedinkama.

Tabela 15. Asociranost testiranih sredinskih varijabli i lokusa detektovanih kao lokusi pod uticajem selekcije

	Prosečna godišnja temperatura	Broj mraznih dana	Broj ledenih dana	Broj vrelih dana	Broj dana sa snežnim pokrivačem	Godišnja insolacija	Godišnja relativna vlažnost vazduha	Prosečna godišnja količina padavina
Total	63	72	55	69	61	31	44	38
131n	-	-	-	-	-	-	-	-
50l	-	-	-	-	-	-	-	-
141g	-	-	-	-	-	+	-	-
136j	-	-	-	-	-	-	-	-
120d	+	+	-	+	+	-	-	-
117n	-	+	-	-	-	-	+	-
42a	-	-	-	-	-	-	-	-
110e	-	-	-	-	-	-	-	-
104c	-	-	-	-	-	-	-	-
85i	-	-	-	+	+	-	+	-
74m	+	+	-	+	-	-	+	-
73c	-	+	-	-	-	-	-	-

4.7. POPULACIONA STRUKTURA I GENETIČKA DIFERENCIRANOST

Ispitivane populacije pokazale su veoma visok nivo genetičke diferenciranosti $F_{ST} = 0.405$ ($P < 0.001$). Najveće genetičke diferenciranosti su detektovane između populacije Fruška gora sa ostalim populacijama, sa vrednostima u opsegu od 0.406 (FG B0- TR B+) do 0.472 (FG B+ - LS B0). U populacijama Devojački bunar i Lisine detektovana je veoma slaba diferenciranost na osnovu prisustva B hromozoma, međutim bez značajnosti. U Tabeli 16. prikazani su rezultati međusobnog poređenja F_{ST} na osnovu ukupnog seta podataka. Statistički značajne F_{ST} vrednosti ($P < 0.001$) su podvučene.

Tabela 16. Rezultati međusobnog poređenja F_{ST} dobijeni na osnovu ukupnog seta podataka. Statistički značajne F_{ST} vrednosti ($P < 0.001$) su podvučene.

	FG B+	FG B0	TR B+	TR B0	DB B+	DB B0	LS B+
FG B0	-0.005						
TR B+	<u>0.435</u>	<u>0.406</u>					
TR B0	<u>0.444</u>	<u>0.412</u>	-0.004				
DB B+	<u>0.437</u>	<u>0.423</u>	<u>0.330</u>	<u>0.338</u>			
DB B0	<u>0.461</u>	<u>0.437</u>	<u>0.295</u>	<u>0.303</u>	0.003		
LS B+	<u>0.445</u>	<u>0.437</u>	<u>0.361</u>	<u>0.370</u>	<u>0.060</u>	<u>0.060</u>	
LS B0	<u>0.472</u>	<u>0.449</u>	<u>0.343</u>	<u>0.346</u>	<u>0.084</u>	<u>0.070</u>	0.003

Analiza redukovanog seta podataka (bez lokusa detektovanih kao lokusi pod delovanjem selekcije) pokazala je sličan visok nivo genetičke diferenciranosti između populacija ($F_{ST} = 0.390$, $P < 0.001$). Isti trend najveće diferenciranosti populacije Fruška gora sa ostalim populacijama se zadržao, a opseg vrednosti je od 0.393 (FG B0 - TR B+) do 0.457 (FG B+ - LS B0). U Tabeli 17. prikazani su rezultati

međusobnog poređenja F_{ST} dobijeni na osnovu redukovanog seta podataka. Statistički značajne F_{ST} vrednosti ($P < 0.001$) su podvučene.

Tabela 17. Rezultati međusobnog poređenja F_{ST} dobijeni na osnovu redukovanog seta podataka. Statistički značajne F_{ST} vrednosti ($P < 0.001$) su podvučene.

	FG B+	FG B0	TR B+	TR B0	DB B+	DB B0	LS B+
FG B0	-0.004						
TR B+	<u>0.421</u>	<u>0.393</u>					
TR B0	<u>0.431</u>	<u>0.399</u>	-0.004				
DB B+	<u>0.42</u>	<u>0.407</u>	<u>0.315</u>	<u>0.323</u>			
DB B0	<u>0.446</u>	<u>0.421</u>	<u>0.279</u>	<u>0.286</u>	0.003		
LS B+	<u>0.429</u>	<u>0.421</u>	<u>0.347</u>	<u>0.355</u>	<u>0.063</u>	<u>0.064</u>	
LS B0	<u>0.457</u>	<u>0.433</u>	<u>0.326</u>	<u>0.329</u>	<u>0.085</u>	<u>0.072</u>	0.005

Analiza molekularne varijanse za svaki set markera (ukupan i redukovani) izvršena je na podacima grupisanim na osnovu populacione pripadnosti i prisustva B hromozoma. AMOVA ukupnog seta podataka je pokazala da ne postoji značajan efekat B hromozoma na genetičku varijabilnost populacija i da je genetička varijabilnost raspoređena na međupopulacionom i individualnom nivou. Negativna vrednost genetičke varijanse između B+ i B0 jedinki ukazuje na veće razlike između dve nasumično izabrane jedinke iz iste grupe (B+ ili B0) nego između dve jedinke iz različitih grupa, što je rezultat velike međupopulacione i individualne varijabilnosti. U Tabeli 18. prikazani su AMOVA rezultati na ukupnom setu podataka.

Tabela 18. Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) ukupnog seta podataka

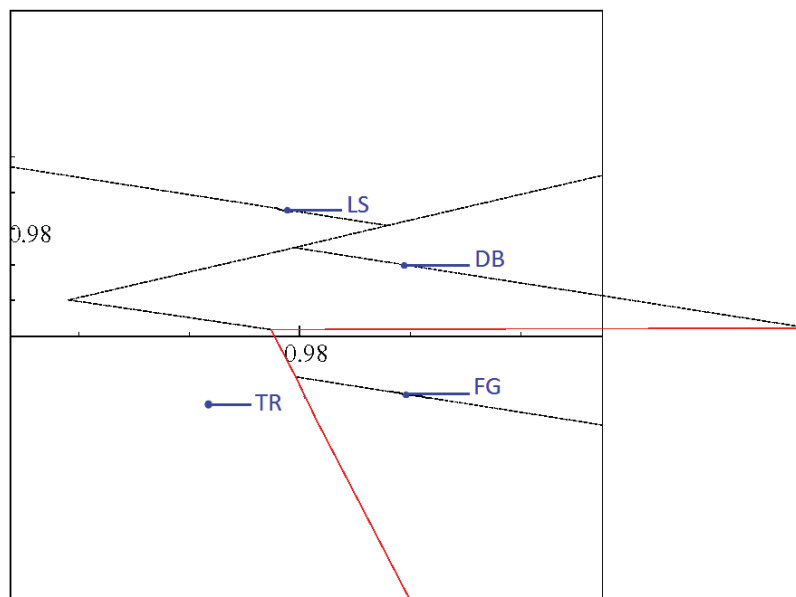
AMOVA	Suma kvadrata	Procenat varijabilnosti (%)	Koeficijent	P-vrednost (*)
Izvor varijabilnosti				
Populacija	3975.318	40.845	$F_{CT} = 0.408$	<0.001
B hromozomi	174.2140	-0.347	$F_{SC} = -0.006$	0.840
Populacija x B hromozomi	7643.191	59.502	$F_{ST} = 0.405$	<0.001
Ukupno	11792.723			

AMOVA redukovanog seta podataka je pokazala da se najveći deo genetičke varijabilnosti detektuje na međupopulacionom i individualnom nivou (Tabela 19.). Iako je analiza redukovanog seta podataka pokazala niže F_{ST} vrednosti, raspodela genetičke varijabilnosti je ostala ista.

Tabela 19. Rezultati analize molekularne varijanse (AMOVA) redukovanog seta podataka

AMOVA	Suma kvadrata	Procenat varijabilnosti (%)	Koeficijent	P- vrednost (*)
Izvor varijabilnosti				
Populacija	3673.50	39.38	$F_{CT} = 0.394$	<0.05
B hromozomi	172.170	-0.33	$F_{SC} = -0.005$	0.661
Populacija x B hromozomi	7486.60	60.95	$F_{ST} = 0.390$	<0.001
Ukupno	11332.25			

Prostorna analiza molekularne varijanse dala je sledeće rezultate. Kada se pretpostavi postojanje 2 grupe, jednu grupu predstavlja populacija Fruška gora, dok drugu grupu čine populacije Tara, Devojački bunar i Lisine (Slika 13.). Raspodela varijabilnosti pod pretpostavkom 2 grupe je prikazana u Tabeli 20.

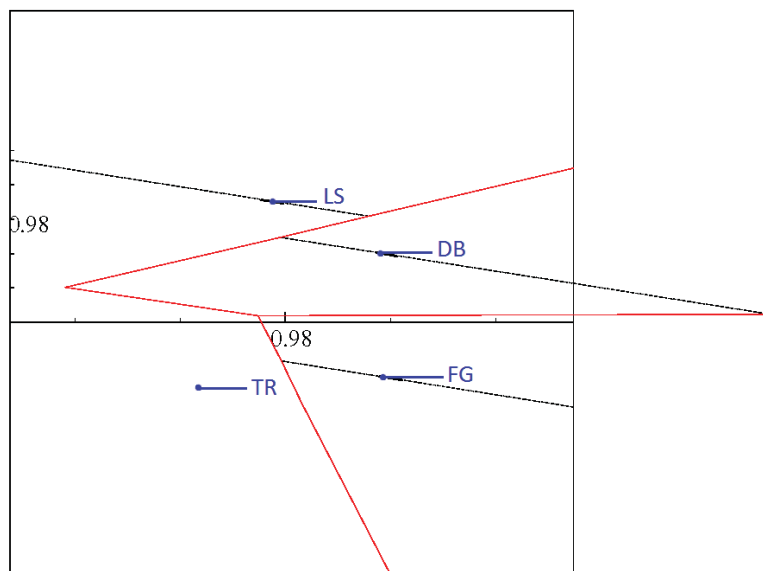


Slika 13. Prostorna analiza molekularne varijanse pod pretpostavkom 2 grupe

Tabela 20. Raspodela varijabilnosti pod pretpostavkom 2 prostorno odvojene grupe

AMOVA	Suma kvadrata	Procenat varijabilnosti (%)	Koeficijent	P- vrednost (*)
<u>Izvor varijabilnosti</u>				
Grupa	2940.317	35.50	$F_{CT} = 0.3549$	0.0332
Populacija	1233.744	10.29	$F_{SC}=0.1595$	<0.001
Grupa x populacija	7696.130	54.22	$F_{ST}=0.4578$	<0.001
Ukupno	11870.192			

Kada se pretpostavi postojanje četiri grupe, jedinke se grupišu na osnovu lokaliteta (Slika 14.), a raspodela varijabilnosti je ista kao predhodno dobijena AMOVA-om (Tabela 21.).



Slika 14. Prostorna analiza molekularne varijanse pod pretpostavkom 4 grupe

Tabela 21. Raspodela varijabilnosti pod pretpostavkom 4 prostorno odvojene grupe

AMOVA	Suma kvadrata	Procenat varijabilnosti (%)	Koeficijent	P- vrednost (*)
Izvor varijabilnosti				
Populacija	4000.714	40.79	$F_{CT} = 0.4079$	<0.05
B hromozomi	173.348	-0.36	$F_{SC} = -0.006$	<0.001
Populacija x B hromozomi	7696.130	59.56	$F_{ST} = 0.4043$	<0.001
Ukupno	11870.192			

4.8. TESTIRANJE MODELA GENETIČKE DIFERENCIRANOSTI

Iako je detektovana veoma visoka genetička diferenciranost populacija, ostalo je nejasno da li je ta diferenciranost rezultat izolacije putem distance ili ne. Mantel test korelacione matrice genetičkih i geografskih distanci nije pokazao značajnu korelaciju ($r = -0.064$, $P = 0.611$).

5. DISKUSIJA

In every walk with nature one receives far more than he seeks.

J. Muir

Istraživanja B hromozoma su u ranim fazama bila bazirana na popisivanju vrsta koje poseduju B hromosome, tipu nasleđivanja, detekciji efekata i njihovom adaptivnom značaju u populacijama (Jones i Rees 1982). Ova faza intenzivnog istraživanja, koja je trajala dekadama i obuhvatala desetine vrsta, predstavlja osnovu znanja o B hromozomima. Zbog nemogućnosti detekcije adaptivne vrednosti B hromozoma na individualnom nivou, sem u nekoliko slučajeva, istraživanja su usmerena u dva pravca. Jedan pravac se bavi istraživanjem interakcije A i B hromozoma, dok se drugi bavi strukturom B hromozoma. Sem toga, većina istraživanja se radi na veoma malom broju vrsta, dok se većina vrsta zanemaruje, a samim tim i mnoga pitanja ostaju bez odgovora.

Kod većine vrsta, frekvencija B hromozoma varira među različitim populacijama, ali se frekvencije uvek nalaze u ravnoteži (Vujošević i Blagojević 1995). Uzrok razlike u frekvencijama može biti genetički, sredinski ili njihova kombinacija. Predhodna istraživanja vezana za genetičku osnovu populacija žutogrlog miša *A. flavicollis* su malobrojna. Do sada je objavljena samo jedna populaciona studija analize alozima koja je pokazala da ne postoji razlika u frekvenciji heterozigota transferin lokusa između jedinki sa i bez B hromozoma u uzorcima populacija sakupljenih tokom nekoliko sezona u Poljskoj i Češkoj (Wójcik i sar. 2004).

Sa izuzetkom retkih i ugroženih vrsta, koje imaju ograničenu distribuciju, skoro svaka do sada ispitivana vrsta pokazala je neki nivo genetičke diferenciranosti. Pomoću 14 prajmerskih kombinacija, detektovali smo značajnu razliku u genetičkom diverzitetu i diferenciranosti između analiziranih populacija. Populacija Fruška gora, locirana na optimalnom staništu za datu vrstu, ima veći

genetički diverzitet nego ostale tri populacije. U analizi su korišćena dva pristupa, koja su orijentisana ka različitim nivoima, BBA ka nivou individue i AFBA ka populacionom nivou. Ispitivanje na nivou individua je pokazalo postojanje većih genetičkih razlika između jedinki sa B hromozomima, nego između jedinki bez B hromozoma, kako unutar populacija, tako i između populacija. Sem toga, analize grupisanja pokazale su da se uvek prvo grupišu populacije sa višom frekvencom B hromozoma. Ispitivanje na nivou populacija je pokazalo jasno odvajanje populacije sa najnižom frekvencom B hromozoma (Fruška gora) od ostalih populacija (sa višom frekvencom B hromozoma). Razlika između jedinki sa i bez B hromozoma nije detektovana ispitivanjem na nivou populacija, ali je detektovana razlika u alelskim frekvencama između ove dve grupe jedinki.

Analize zasnovane na F_{ST} vrednostima odnosno na Rajtovoju F statistici su veoma korisne u kvantifikaciji nivoa adaptivne diferenciranosti populacija (Beaumont 2005). AMOVA je potvrdila da je najveći deo genetičke varijabilnosti raspoređen na interpopulacionom i individualnom nivou. Genetičke razlike između B+ i B0 jedinki nisu detektovane, što je donekle i očekivano, jer nismo opazili marker karakterističan za jedinke sa B hromozomima. Naime, molekularne varijanse se računaju kao sume kovarijacionih komponenti između haplotipova, a pošto nismo detektovali haplotip karakterističan za jedinke sa B hromozomima, svaka jedinka je bila jedan haplotip. Sem toga, mora da se uzme u obzir i činjenica da se u slučaju dominantnih markera vrši raščlanjivanje varijanse haplotipova, a ne varijanse alelskih frekvenci kao što je slučaj kod kodominantnih markera (Excoffier i sar. 2009).

Visok nivo diferencijacije populacije na osnovu lokaliteta je potvrđen prostornom analizom molekularne varijanse, koja najpreciznije rezultate daje kada postoji protok gena, odnosno kada je efekat izolacije putem distance suprimiran (Dupanloup i sar. 2002). Po definiciji, izolacija putem distance predstavlja smanjenje genetičke sličnosti između jedinki različitih populacija usled povećanja geografske udaljenosti između njih (Wright 1951). Mantel test korelisanosti

genetičkih i geografskih distanci je potvrdio da ne postoji izolacija putem distance. Na osnovu ovoga možemo da zaključimo da populacije, iako prostorne udaljene, nisu genetički diferencirane isključivo usled udaljenosti. Kada populacije naseljavaju različita staništa, dolazi do adaptiranosti populacije na lokalne uslove usled ekološke selekcije (Nunes i sar. 2011), te veliku genetičku diferenciranost između ispitivanih populacija možemo da objasnimo postojanjem lokalnih adaptacija.

Za vrste koje imaju široko rasprostranjenje, kao što je *A. flavicollis*, velika genetička diferenciranost nije očekivana, sa obzirom na to da široko rasprostranjenje olakšava protok gena i umanjuje diferenciranost populacija do koje dolazi usled drifta i selekcije. Wright (1951) je postavio koncept genetičke povezanosti koji kaže da je i vrlo mali protok gena (jedna reproduktivno sposobna jedinka po generaciji) dovoljan da se zanemari štetan efekat drifta i ukrštanja u srodstvu, koji može da dovede do adaptivnog pada. Zbog toga prostorno razdvojene populacije koje naseljavaju različita staništa mogu biti pod delovanjem različitih selekcionih režima, a samim tim i adaptirane na date uslove čak i pri delovanju slabih selekcionih pritisaka.

Demografija i neutralna evolucionarna istorija populacija deluju istovetno na sve neutralne lokuse u genomu, dok lokusi koji su pod delovanjem selekcije ili se nalaze blizu lokusa koji je pod delovanjem selekcije pokazuju različiti obrazac variranja (Luikart i sar. 2003). Lokusi kod kojih su aleli selektivno favorizovani u različitim populacijama, pokazuju veće razlike u alelskim frekvencama između različitih populacija nego lokusi sa neutralnim alelima. Slično tome, lokusi koji su pod jakim delovanjem balansne selekcije bi trebalo da pokazuju niži stepen genetičke diferenciranosti (Beaumont 2005). Ukoliko su populacije međusobno udaljene, moguće je detektovati lokalnu selekciju i napraviti razliku između nje i polimorfizma koji održava balansna selekcija unutar populacija (Charlsworth i sar. 1997). Pri detekciji lokusa koji su pod delovanjem selekcije postoji tendencija pojave lažno-pozitivnih rezultata ukoliko postoji korelacija između alelskih

frekvenci ispitivanih populacija, usled zajedničkog skorašnjeg porekla ili efekta izolacije putem distance (Robertson 1975, Excoffier i sar. 2009). Ukupno dvanaest lokusa je detektovano kao lokusi pod delovanjem selekcije ili koji se nalaze blizu lokusa koji su pod delovanjem selekcije. Tri lokusa su detektovana u svim populacijama, dok je ostalih devet karakteristično ili za populaciju sa nižom (FG) ili za populacije sa višom frekvencom B hromozoma (TR, DB i LS).

Rezultati SAM analize su nam dali naznake o mogućem delovanju selekcije na autlajer lokuse u različim lokalitetima. Treba napomenuti da je ovaj program usmeren ka nivou individua, a ne populacija, i da ne pretpostavlja postojanje genetičke struktuiranosti populacija kojima pripadaju te jedinke (Joost i sar. 2008). Iz tog razloga, asocijacije koje detektujemo predstavljaju korelacije između sredinske varijable i frekvence AFLP markera na svakom lokusu, a ne uzročnu vezu između njih (Nunes i sar. 2011). Pošto su sredinske varijable vrlo često međusobno korelisane, veoma je bitno odabrati i testirati sredinske varijable koje su ekološki bitne za vrstu i koje mogu biti okarakterisane kao nosioci selektivnog pritiska. Najveći broj asocijacija je detektovan za broj mraznih dana (72) i broj vrelih dana (69). Ove dve varijable su bitne za populacionu dinamiku odnosno za prisustvo hrane koju preferentno koriste i reprodukciju vrste *A. flavicollis*, koja je karakteristična za stare listopadne šume, i karakteriše je smanjenje brojnosti kada se ide od listopadnih ka četinarskim šumama (Debernardi i sar. 2003). Šume sa bogatom steljom predstavljaju preferentno stanište jer pružaju dovoljno hrane, ali i zaklon i pogodno mesto za brigu o potomcima (Marsh i Harris 2000). Vrsta se karakteriše kao tipično granivorna, a udeo zrna u ishrani sezonski varira i najveći je tokom jeseni i zime (Obrtel i Holisova 1983, Hansson 1985, Abt i Bock 1998). Dužina sezone parenja zavisi od geografskih i klimatskih uslova staništa, a najčešće traje od kasnog februara do oktobra ili novembra, mada može da se produži i tokom zime za vreme plodonosnih godina (Adamczewska 1961, Flowerdew 1984). Asocijacija ovako velikog broja lokusa sa sredinskim varijablama koje su bitne za ekološke potrebe vrste, dokazale su da su populacije adaptirane na specifične uslove svojih staništa.

Veća genetička varijabilnost detektovana u populaciji Fruška gora je u saglasnosti sa tim da je to optimalno stanište za ovu vrstu, dok niža genetička varijabilnost u populacijama Tara, Devojački bunar i Lisine predstavlja rezultat nepovoljnijih klimatskih uslova. Široko je prihvaćeno da nizak nivo genetičke varijabilnosti ima štetan efekat na vijabilnost populacija tako što ograničava mogući adaptivni odgovor (Lande 1995, Frankham i sar. 2002). U tom slučaju genetički drift bi, osim selekcije, mogao da bude odgovoran za nivo genetičke varijabilnosti u ovim populacijama. Nizak genetički diverzitet u trenutno velikoj populaciji se veoma često objašnjava postojanjem uskog grla brojnosti (eng. *bottleneck*) u populacionoj istoriji. Međutim, ova tvrdnja zahteva nezavisan dokaz da se on uopšte dogodio. Kada su u pitanju dobro proučene vrste, ovi dokazi postoje u vidu npr. istorijskih ili filogenetskih podataka. Svaki pad u veličini populacije može da dovede do smanjenja genetičke varijabilnosti, ali ubrzan pad ima mnogo veće i dugoročne posledice. Spore promene dozvoljavaju selekciji da eliminiše štetne alele, dok iznenađan gubitak individua može da dovede do slučajne fiksacije štetnih alela. Sem toga, efekat uskog grla brojnosti zavisi i od efektivne veličine populacije, i to na način što je manja efektivna veličina populacije, to je efekat uskog grla brojnosti veći. Postavilo se pitanje da li su ispitivane populacije, sem selekcije, i pod uticajem genetičkog drifta. Pokazano je da proporcija polimorfnih lokusa mnogo bolje odražava efektivnu veličinu populacije nego heterozigotnost. Ispitivane populacije imaju veoma visok procenat polimorfnih lokusa, što ukazuje na veliku efektivnu veličinu populacije. Sem toga detektovan je i visok nivo genetičkog diverziteta, i na osnovu toga možemo da zanemarimo efekat uskog grla brojnosti u ispitivanim populacijama.

Visok nivo genetičkog diverziteta u ispitivanim populacijama, kao i velika genetička diferenciranost između njih nisu objasnili postojanje različitih frekvenci B hromozoma u različitim staništima. Predhodne studije su pokazale da je frekvenca B hromozoma povećana tokom perioda kada su populacije brojčano izrazito redukovane (Kartavtseva 1999). U ovim slučajevima jedinke sa B hromozomima bi bile favorizovane, jer je potvrđeno da nosioci B hromozoma

imaju veću stopu preživljavanja i veći fitness (Zima i sar. 2003, Vujošević i sar. 2007). U suprotnom slučaju, kada je brojnost populacija izrazito velika, primećeno je da se najčešće eliminišu juvenilne jedinke i subadulti koji su nosioci jednog B hromozoma, što nije slučaj sa jedinkama nosiocima većeg broja B hromozoma. Pokazano je da frekvencija jedinki sa jednim B hromozomom raste, odnosno da frekvencija jedinki sa više B hromozoma opada kroz sezone. Na taj način se obezbeđuje rezerva za konstantu prisutnost B hromozoma u populaciji (Vujošević 1987), koja se tokom godina detektuje kao stabilni polimorfizam. Ciklične promene u brojnosti populacije *A. flavicollis* korelisane su sa plodonošenjem drveća odnosno sa raspoloživom hranom (Gorecki i Gebczynska 1962), što indirektno utiče na reproduktivni uspeh jedinki. Selekcioni pritisci koje nameću dužina zime i leta (ispitani preko broja mraznih i vrelih dana) bi tada predstavljali glavni mehanizam variranja frekvencije B hromozoma kako unutar populacija tako i između populacija iz različitih staništa. Sem toga, pokazano je da postoji pozitivna korelacija frekvencije jedinki sa B hromozomima i nadmorske visine, čime se isključuje mogućnost da je povećana frekvencija B hromozoma u populacijama iz neoptimalnih staništa rezultat genetičkog drifta. Na neki način možemo da kažemo da se B hromozomi održavaju kao faktori koji utiču na adaptabilnost populacija (Blagojević i sar. 2009).

Postoji uopštena pretpostavka da na B hromozome ne deluju isti selektivni pritisci kao na ostatak genoma, pošto nisu neophodni za razviće i preživljavanje. Ukoliko su genomski paraziti, imali bi zaseban evolucionarni put i vrlo brzo bi se diferencirali od hromozoma od kojih su nastali. Međutim, ukoliko nisu u konfliktu sa ostatkom genoma njihova evolucija ne bi bila ni brza ni nezavisna. Nedostatak grupisanja ispitivanih jedinki na osnovu prisustva ili odsustva B hromozoma, kao i velika individualna varijabilnost, ukazuju na veću genetičku sličnost B hromozoma sa osnovnim setom, nego što se pretpostavlja po parazitskoj teoriji. Iako su ranije citogenetičke analize pokazale da su B hromozomi kod vrste *A. flavicollis* euhromatičani i po rasporedu G- i C- traka slični malim hromozomima A seta (Vujošević i Živković 1987), ovo je prva analiza koje je to pokazala na

molekularnom nivou. Sem toga, dugo se smatralo da postoji rekombinacija između B hromozoma, ali je to nedavno i potvrđeno kod srebrne lisice (Basheva i sar. 2010). Ovaj podatak može da se iskoristi kao dodatni dokaz da, u nedostatku mejotičkog drajva kao akumulacionog mehanizma, B hromozomi nemaju evoluciju nezavisnu od ostatka genoma.

U populacijama vrste *A. flavicollis* sa B hromozomima postoji dinamička ravnoteža odnosno sezonsko variranje u broju jedinki sa B hromozomima (Blagojević i Vujošević 1995; Vujošević i Blagojević 1995). Međutim prosečna frekvenca jedinki sa B hromozomima ostaje stabilna između godina (Vujošević 1993; Zima i Macholan 1995). Mehanizam održavanja ravnoteže polimorfizma jedinki sa B hromozomima je verovatno različit u populacijama različitih vrsta (Vujošević i Blagojević 2000). U literaturi preovlađuju dva modela kojima se opisuju mehanizmi održavanja jedinki sa B hromozomima u populacijama i oba pretpostavljaju postojanje ravnoteže. Parazitski ili sebični model pretpostavlja štetne efekte B hromozoma na fitnes nosilaca, a njihovo konstantno prisustvo u populacijama se objašnjava postojanjem akumulacionog mehanizma koji se zasniva na mejotičkom drajvu (Jones 1991). Adaptivni ili heterotični model pretpostavlja da se, u nedostatku drajva, ravnoteža održava na osnovu korisnih efekata B hromozoma kada se nalaze u malom broju (White 1973). U tom slučaju bi genotipovi sa B hromozomima imali više adaptivne vrednosti u određenim klimatski uslovima.

Iz svega navedenog možemo da kažemo da su mejotički drajv, genetički drift i selekcija mogući faktori koji određuju evolucionu dinamiku B hromozoma. Ukoliko su B hromozomi štetni za svoje nosioce, logično bi bilo da je njihova frekvenca najviša u staništima koja mogu da se okarakterišu kao optimalna za vrstu jer bi tada bili više tolerisani, kao što je i pretpostavljeno parazitskim modelom. Postoji veliki broj studija koje ovo potvrđuju, pre svega na biljkama (Jones i Houben 2003), ali i na skakavcima (Cabrero i sar. 1997) i na ribama (Neo i sar. 2000). Međutim pokazani su i suprotni slučajevi (Rees i Hutchinson 1973,

Teoh i sar. 1976, Teoh i Jones 1978, Bougourd i Plowman 1996). Ponekad je jako teško definisati model održavanja B hromozoma u populacijama, pa bi mogao da se opiše kao nešto između ova dva opšte prihvaćena modela. Lia i sar. (2007) su ispitivali klinalni raspored B hromozoma u različitim populacijama kukuruza u Argentini i njegovu povezanost sa genetičkom varijabilnošću detektovanom pomoću 18 mikrosatelitskih markera. Primećena je pozitivna korelacija između broja B hromozoma i nadmorske visine i uticaj selekcije na održavanje ove kline. Ovakvo klinalno variranje bi moglo da bude rezultat ili korisnih efekata B hromozoma na višim nadmorskim visinama ili negativne selekcije protiv B hromozoma na nižim nadmorskim visinama. Nijedan od gore navedenih modela nije prihvaćen u potpunosti iz dva razloga. Heterotični model je odbačen jer postoji mehanizam akumulacije B hromozoma kod kukuruza, a parazitski zbog kompleksnosti interakcija između A i B hromozoma kod ove vrste.

Jones i Rees (1982) su postavili hipotezu po kojoj je moguće da neki ekološki faktori koji su povezani sa prisustvom B hromozoma deluju direktno na mehanizam transmisije B hromozoma. U tom slučaju bi selekcija bila odgovorna za različite frekvence B hromozoma, bez obzira na fenotipske efekte prisustva B hromozoma, a koji se odnose na fitnes jedinki. Međutim, kada se rade istraživanja u prirodnim populacijama, jako je teško razgraničiti efekte koje ima selekcija na transmisiju B hromozoma i efekte koje imaju B hromozomi na fitnes. Kod vrste *M. maculatus*, koja je najviše proučavana, ti efekti su razgraničeni i došlo se do sledećih zaključaka. Barker (1966) je prvi primetio da dolazi do povećanja frekvence jedinki sa B hromozoma u sredinskim uslovima koji su optimalni za datu vrstu, odnosno u toplim i suvim staništima. Hewitt i John (1967) su dokazali negativnu korelaciju između frekvence jedinki sa B hromozomima i količine padavina. Frekvencija jedinki sa B hromozomima bila je stabilna tokom niza godina. Zbog toga nema sumnje da su selekcionarni pritisci različite vrste i jačine odgovorni za održavanje ravnotežnog polimorfizma različitih frekvenci B hromozoma u različitim populacijama. Neophodno je istaći dve osobine koje su karakteristične za B hromozome ove vrste, a na osnovu kojih se podržava parazitski model

održavanja B hromozoma u populacijama. Prva je da su B hromozomi uglavnom štetni za svoje nosioce, a druga, koja je donekle povezana sa prvom, je da su B hromozomi najčešći u populacijama koje naseljavaju optimalna staništa.

Kada je u pitanju vrsta *A. flavicollis* postoje mnogobrojni dokazi koji idu u prilog heterotičnom modelu. Tanić i sar. (2005) su pokazali da je prisustvo B hromozoma povezano sa izmenjenom aktivnošću nekih gena, kao što je CCT (eng. *Chaperonin Containing TCP-1*) i zaključili da njegova povećana ekspresija nije odgovor na genomski stres, već stečeno stanje usled prisustva B hromozoma. Povećan nivo ekspresije CCT gena bi u tom slučaju bio koristan za svoje nosioce jer pruža efikasniji i brži odgovor na sredinski stres. Pretpostavka da B hromozomi predstavljaju genomski stres, usled povećane količine DNK, testirana je i metodama baziranim na fluktuirajućoj asimetriji. Naime, fluktuirajuća asimetrija je dobar pokazatelj genetskog stresa, jer sa povećanjem količine DNK, dolazi i do povećanja nivoa fluktuirajuće simetrije. Rezultati su pokazali da se B hromozomi ne ponašaju kao višak genetičkog materijala. Štetni efekti B hromozoma na razvojnu stabilnost nisu utvrđeni ni analizom nemetričkih kranijalnih osobina (Blagojević i Vujošević 2004), što ukazuje na to da kod ove vrste B hromozomi nisu u konfliktu sa ostatkom genoma. B hromozomi utiču na fenotip mandibule i to tako što dovode do povećanja nivoa morfološke integracije koji dovodi do selektivne prednosti jedinki sa B hromozomima (Jojić i sar. 2007). Ispitivanje efekata B hromozoma na veličinu i oblik kranijuma je pokazalo da ne dolazi do smanjenja nivoa razvojne stabilnosti odnosno da B hromozomi ne remete razvojnu homeostazu (Jojić i sar. 2011). Sem toga, kod nosilaca B hromozoma kao primaran mehanizam u generisanju kovariranja kranijalnih osobina je predloženo paralelno variranje razvojnih putanja, koje je podložnije evolucionim promenama u odnosu na morfološku integraciju nastalu putem direktnih interakcija, kao što je slučaj kod jedinki bez B hromozoma. Autori su zaključili da na taj način prisustvo B hromozoma omogućava širi dijapazon mogućih odgovora na različite selektivne pritiske. Nedostatak akumulacionog mehanizma B hromozoma kod ove vrste je potvrđen kod mužjaka (Vujošević i sar. 1989), dok je kod ženki pretpostavljen

usled konstantno iste frekvence B hromozoma kod oba pola. Prisustvo B hromozoma ne utiče na fekunditet ženki kod ove vrste, ali je primećeno da ženke nosioci jednog B hromozoma imaju veći broj potomaka (Blagojević i sar. 2006). Utvrđena je pozitivna korelacija frekvence jedinki sa B hromozomima i nadmorske visine, kao i frekvence jedinki sa B hromozomima i broja ledenih dana, čime je dokazano da u staništima koja nisu optimalna za vrstu dolazi do povećanja frekvence jedinki sa B hromozomima. Rezultati dobijeni ovom analizom podržavaju teoriju da sredinski različiti selekcionni pritisci dovode do razlika u frekvenci jedinki sa B hromozomima među populacijama iste vrste.

U ispitivanim populacijama nije pokazan štetan efekat B hromozoma na nosioce, kao ni prisustvo mejotičkog drajva kao akumulacionog mehanizma (Vujošević i sar. 1989). Nije pokazan efekat B hromozoma na genetički diverzitet i diferenciranost ispitivanih populacija. Možemo da kažemo da selekcija izazvana ekološkim faktorima dovodi do adaptiranosti populacija na specifične uslove sredine i direktno delujući na mehanizam transmisije B hromozoma favorizuje jedinke sa B hromozomima u populacijama koje naseljavaju staništa koja nisu optimalna za datu vrstu. Moguće je da su epistatički ili slabi aditivni efekti B hromozoma efikasniji u neoptimalnim sredinama, mada se ne sme zanemariti i moguće postojanje epigenetičkih procesa koji dovode do modifikacije u ekspresiji gena. U ovom slučaju B hromozomi imaju adaptivnu ulogu čime se potvrđuje heterotični model održavanja B hromozoma u populacijama vrste *A. flavicollis* iz Srbije.

6. ZAKLJUČCI

1. Primenom AFLP metode, pomoću 14 prajmerskih kombinacija, detektovali smo značajnu razliku u genetičkom diverzitetu i diferenciranosti između četiri populacije *A. flavicollis* u Srbiji. Najveći genetički diverzitet je detektovan u populaciji sa lokaliteta Fruška gora, koji predstavlja optimalno stanište za datu vrstu.
2. Analiza molekularne varijanse (AMOVA) je pokazala da najveći deo genetičke varijabilnosti pripada interpopulacionom i individualnom nivou. Genetičke razlike između grupa jedinki sa i bez B hromozoma nisu detektovane.
3. Detektovana je značajna genetička diferenciranost između ispitivanih populacija, a nekorelisanost genetičkih i geografskih distanci je pokazala da do genetičke diferencijacije nije došlo usled izolacija putem distance. Visok nivo genetičke diferenciranosti između ispitivanih populacija se može objasniti postojanjem lokalnih adaptacija.
4. Ukupno dvanaest lokusa je detektovano kao mogući lokusi pod delovanjem selekcije ili koji se nalaze blizu lokusa koji su pod delovanjem selekcije. Tri lokusa su detektovana u svim populacijama, dok je ostalih devet karakteristično ili za populaciju sa nižom (FG) ili za populacije sa višom frekvencom B hromozoma (TR, DB i LS).
5. Najveći broj asocijacija AFLP lokusa i sredinskih varijabli je detektovan za dve varijable koje su bitne za populacionu dinamiku, odnosno za dostupnost hrane koju preferiraju i reprodukciju vrste *A. flavicollis*. Selekcioni pritisci koje nameću dužina zime i leta bi mogli da predstavljaju glavni mehanizam variranja frekvence B hromozoma kako unutar populacija, tako i između populacija iz različitih staništa.

6. Nedostatak grupisanja ispitivanih jedinki na osnovu prisustva ili odsustva B hromozoma, kao i velika individualna varijabilnost, ukazuju na veću genetičku sličnost B hromozoma sa osnovnim setom, nego što se pretpostavlja po parazitskoj teoriji.

7. U ispitivanim populacijama nije potvrđen efekat B hromozoma na genetički diverzitet i diferenciranost ispitivanih populacija. Pretpostavljamo da ekološki faktori koji dovode do lokalne adaptiranosti populacija na specifične uslove sredine direktno deluju na mehanizam transmisije B hromozoma favorizujući jedinke sa B hromozomima u populacijama koje naseljavaju staništa koja nisu optimalna za datu vrstu. Moguće je da su epistatički ili slabi aditivni efekti B hromozoma efikasniji u neoptimalnim sredinama, mada se ne sme zanemariti i moguće postojanje epigenetičkih uticaja. U ovom slučaju B hromozomi imaju adaptivnu ulogu čime se potvrđuje heterotični model održavanja B hromozoma u populacijama *A. flavicollis* iz Srbije.

7. LITERATURA

-
- Abt KF & Bock WF (1998) Seasonal variation of diet composition in farmland field mice *Apodemus* spp. and bank voles *Clethrionomys glareolus*. *Acta Theriologica* 43 (4):379-389
- Adamczewska KA (1961) Intensity of reproduction of the *Apodemus flavicollis* (Melchior 1834) during the period 1954-1959. *Acta Theriologica* 5:1-21
- Ajmone-Marsan P, Valentini A, Cassandro M Vecchiotti-Antaldi G, Bertoni G & Kuiper M (1997) AFLP™ markers for DNA fingerprinting in cattle. *Animal Genetics*, 28: 418-426
- Akey JM, Zhang G, Zhang K, Jin L & Shriver MD (2002) Interrogating a high-density SNP map for signatures of natural selection. *Genome Research*, 12: 1805-1814
- Alfenito MR & Birchler JA (1993) Molecular characterization of a maize B chromosome centric sequence. *Genetics*, 135: 589-597
- Amos A & Dover G (1981) The distribution of repetitive DNAs between regular and supernumerary chromosomes in species of *Glossina* (Tsetse) - a two-step process in the origin of supernumeraries. *Chromosoma*, 81: 673-690
- Arens P, Coops H, Jansen J & Vosman B (1998) Molecular genetic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers. *Molecular Ecology*, 7: 11-18
- Avise JC, Helfman GS, Saunders NC & Hales LS (1986) Mitochondrial DNA differentiation in North Atlantic eels: population genetic consequences of an unusual life history pattern. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 83: 4350- 4354
-

Balding DJ & Nichols RA (1995) A method for quantifying differentiation between populations at multi-allelic loci and its implications for investigating identity and paternity. *Genetica*, 96: 3–12

Barker (1966) Climatological distribution of a grasshopper supernumerary chromosome. *Evolution*, 20: 665-667

Basheva EA, Torgasheva AA, Sakaeva GR, Bidau C, Borodin PM (2010) A- and B-chromosome pairing and recombination in male meiosis of the silver fox (*Vulpes vulpes* L., 1758, Carnivora, Canidae). *Chromosome Research*, 18, 689-696

Battaglia E (1964) Cytogenetics of B chromosomes. *Caryologia*, 17: 245-245

Beaumont M (2005) Adaptation and speciation: what can F_{ST} tell us? *Trends in Ecology and Evolution*, 20 (8): 435-440

Beaumont MA & Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 263: 1619–1626

Beaumont MA & Balding DJ (2004) Identifying adaptive divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology*, 13: 969- 980

Beismann H, Barker JHA, Karp A & Speck T (1997) AFLP analysis sheds light on distribution of two *Salix* species and their hybrid along a natural gradient. *Molecular Ecology*, 6: 989–993

Belcheva RG, Topashka-Ancheva MN & Atanassov N (1988) Karyological studies of five species of mammals from Bulgarian fauna. *Comptes rendus de l'Académie bulgare des Science*, 42: 125-128

Berdnikov VA, Gorel FL, Kosterin OE & Bogdanova VS (2003) Tertiary trisomics in the garden pea as a model of B chromosome evolution in plants. *Heredity*, 91: 577-583

Beukeboom LW (1994) Bewildering Bs: an impression of the first B-chromosome conference. *Heredity*, 73: 328-336

Black WC, Baer CF, Antolin MF & DuTeau NM (2001) Population genomics: genome-wide sampling of insect populations. *Annual Review of Entomology*, 46: 441-469

Blagojević J & Vujošević M (1995) The role of B chromosomes in the population dynamics of yellow-necked wood mice *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). *Genome*, 38: 472-478

Blagojević J & Vujošević M (2004) B chromosomes and developmental homeostasis in the yellow-necked mouse, *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia): Effects on nonmetric traits. *Heredity*, 93: 249-254

Blagojević J, Jojić V, Bugarski-Stanojević V, Adnađević T & Vujošević M (2006) Do B chromosomes affect fecundity in yellow-necked mice *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia)? *Archives of Biological Sciences*, 58, (4): 221-223

Blagojević J, Stamenković G, Jojić-Šipetić V, Bugarski-Stanojević V, Adnađević T & Vujošević M (2009) B chromosomes in populations of yellow-necked mice – stowaways or contributing genetic elements? *Italian Journal of Zoology*, 76 (3): 250-257

Blunden R, Wilkes TJ, Forster JW, Jimenez MM, Sandery MJ, Karp A & Jones RN (1993) Identification of the E3900 family, a 2nd family of rye B chromosome specific repeated sequences. *Genome*, 36: 706-711

Bonin A, Miaud C, Taberlet P & Pompanon F (2006) Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology and Evolution*, 23: 773–783

Bonin A, Ehrich D & Manel S (2007) Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*, 16: 3737–3758

Borisov YM, Afana'ev AG, Lebedev TT & Bochkarev MN (2010) Multiplicity of B chromosomes in a siberian population of mice *Apodemus peninsulae* (2n = 48+ 4-30 chromosomes). *Russian Journal of Genetics*, 46 (6): 705-711

Bosemark NO (1957) On accessory chromosomes in *Festuca pratensis* .5. Influence of accessory chromosomes on fertility and vegetative development. *Hereditas*, 43: 211- 235.

Bougourd SM & Plowman AB (1996) The inheritance of B chromosomes in *Allium schoenoprasum*. *Chromosome Research*, 4 (2): 151-158

Boyeskorov G, Zagoronyuk I, Belyanin A & Lyapunova EA (1994) B-chromosomes in *Apodemus flavicollis* from Eastern Europe. *Polish Ecological Studies*, 20: 523-526

Burt A & Trivers RL (2006) *Genes in Conflict : The Biology of Selfish Genetic Elements*. Belknap Press, Harvard

Cabrero J, Lopez-Leon MD, Gomez R, Castro AJ, Martin-Alganza A & Camacho JPM (1997) Geographical distribution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*, along a river basin, is mainly shaped by non-selective historical events. *Chromosome Research*, 5: 194-198

Camacho JPM, Sharbel TF & Beukeboom LW (2000) B chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, 355: 163-178

Campbell D & Bernatchez L (2004) Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes. *Molecular Biology and Evolution*, 21: 945–956

Carlson WR (1994) Crossover effects of B chromosomes may be selfish. *Heredity*, 72: 636- 638

Cavers S, Degen B, Caron H, Lemes MR, Margis R, Salgueiro F & Lowe AJ (2005) Optimal sampling strategy for estimation of spatial genetic structure in tree populations. *Heredity*, 95: 281–289

Charlesworth B, Nordborg M & Charlesworth D (1997) The effects of local selection, balanced polymorphism and background selection on equilibrium patterns of genetic diversity in subdivided populations. *Genetical Research*, 70: 155-174

Cheng YM & Lin BY (2003) Cloning and characterization of maize B chromosome sequences derived from microdissection. *Genetics*, 164: 299-310

Cheng ZK, Yu HX, Yan HH, Gu MH & Zhu LH (2000) B chromosome in a rice aneuploid variation. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 564-568

Conord C, Lempérière G, Taberlet P & Després L (2006) Genetic structure of the forest pest *Hylobius abietis* on conifer plantations at different spatial scales in Europe. *Heredity*, 97: 46–55

Cuadrado A & Jouve N (1994) Highly repetitive sequences in B chromosomes of *Secale cereale* revealed by fluorescence in-situ hybridization. *Genome*, 37: 709-712

Debernardi P, Patriarca E & Reutter BA (2003) Contribution to the knowledge of *Apodemus* genus in the Gran Paradiso National Park. *Hystrix* 14 (1-2):55-75

Dhar MK, Friebe B, Koul AK & Gill BS (2002) Origin of an apparent B chromosome by mutation, chromosome fragmentation and specific DNA sequence amplification. *Chromosoma*, 111: 332-340

Dice LR (1945) Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology*, 26: 297-302

Duchesne P & Bernatchez L (2002) AFLPOP: a computer program for simulated and real populations allocation, based on AFLP data. *Molecular Ecology Notes*, 2: 380-383

Dupanloup I, Schneider S & Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12): 2571-2581

Egan SP, Nosil P & Funk DJ (2008) Selection and genomic differentiation during ecological speciation: Isolating the contributions of host association via a comparative genome scan of *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles. *Evolution*, 62: 1162-1181

Emelianov I, Marec F & Mallet J (2004) Genomic evidence for divergence with gene flow in host races of the larch budmoth. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 271: 97-105

Excoffier L & Lischer HEL (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

Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes. *Genetics*, 131: 479-491

Excoffier L, Hofer T & Foll M (2009) Detecting loci under selection in a hierarchically structured population. *Heredity*, 103: 285-298

Falush D, Stephens M & Pritchard J K (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7: 574–578

Flowerdew J (1984) *Woodmice and yellow-necked mice*. Mammal Society, London

Foll M & Gaggiotti O (2008) A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. *Genetics*, 180: 977–993

Foulley JL, van Schriek MGM, Alderson L et al. (2006) Genetic diversity analysis using lowly polymorphic dominant markers: the example of AFLP in pigs. *Journal of Heredity*, 97: 244–252

Frankham R, Ballou JD & Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press, Cambridge

Franks TK, Houben A, Leach CR & Timmis JN (1996) The molecular organisation of a B chromosome tandem repeat sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma*, 105: 223-230

Freeland JR (2005) *Molecular ecology*. John Wiley & Sons, Ltd, England.

Gaiotto FA, Bramucci M & Grattapaglia D (1997) Estimation of outcrossing rate in a breeding population of *Eucalyptus urophylla* with dominant RAPD and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 842–849

Gaudeul M, Till-Bottraud I, Barjon F & Manel S (2004) Genetic diversity and differentiation in *Eryngium alpinum* L. (Apiaceae): comparison of AFLP and microsatellite markers. *Heredity*, 92: 508–518

Gonzalez M, Rodríguez R, Zavala ME, Jacobo JL, Hernández F, Acosta J, Martínez O & Simpson J (1998) Characterization of Mexican isolates of *Colletotrichum*

lindemuthianum by using differential cultivars and molecular markers. *Phytopathology*, 88: 292–299

Gonzalez-Sanchez M, Chiavarino M, Jimenez G, Manzanero S, Rosato M & Puertas MJ (2004) The parasitic effects of rye B chromosomes might be beneficial in the long term. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 386-393

Gorecki & Gebczynska (1962) Food conditions for small rodents in a deciduous forest. *Acta Theriologica*, 6 (10): 275-294

Gray CT & Thomas SM (1985) Germination and B chromosomes in *Allium porrum* L. *Journal of Plant Physiology*, 121: 281-285

Green DM (1990) Muller Ratchet and the evolution of supernumerary chromosomes. *Genome*, 33: 818-824

Gutknecht J, Sperlich D & Bachmann L (1995) A species specific satellite DNA family of *Drosophila subsilvestris* appearing predominantly in B chromosomes. *Chromosoma*, 103: 539-544

Hansson L (1985) The food of bank voles, wood mice and yellow-necked mice. *Symposia of the Zoological Society of London* 55:141-168

Hayata I (1973) Chromosomal polymorphism caused by supernumerary chromosomes in the field mouse, *Apodemus giliacus*. *Chromosoma*, 42: 403-414

Herrera CM & Bazaga P (2008) Population-genomic approach reveals adaptive floral divergence in discrete populations of a hawk moth-pollinated violet. *Molecular Ecology*, 17: 5378– 5390

Heun M, Schäfer-Pregl R, Klawan D, Castagna R, Accerbi M, Borghi B & Salamini F (1997) Site of einkorn wheat domestication identified by DNA fingerprinting. *Science*, 278: 1312–1314

-
- Hewitt GM (1976) Meiotic drive for B chromosomes in primary oocytes of *Myrmeleotettix maculatus* (Orthoptera-Acrididae). *Chromosoma*, 56: 381-391
- Hewitt GM & John B (1967) The B-chromosome system of *Myrmeleotettix maculatus* (Thunb.) III. The statistics. *Chromosoma*, 21: 140-162
- Hewitt GM & East TM (1978) Effects of B chromosomes on development in grasshopper embryos. *Heredity*, 41: 347-356
- Hewitt GM, East TM & Shaw MW (1987) Sperm dysfunction produced by B chromosomes in the grasshopper *Myrmeleotettix maculatus*. *Heredity*, 58: 59-68
- Hollingsworth PM & Ennos RA (2004) Neighbour-joining trees, dominant markers and population genetic structure. *Heredity*, 92: 490-498
- Holmes DS & Bougourd SM (1989) B chromosome selection in *Allium schoenoprasum*. 1. Natural populations. *Heredity*, 63: 83-87
- Holmes DS & Bougourd SM (1991) B chromosome selection in *Allium schoenoprasum*. 2. Experimental populations. *Heredity*, 67: 117-122
- Houben A, Kynast RG, Heim U, Hermann H, Jones RN & Forster JW (1996) Molecular cytogenetic characterisation of the terminal heterochromatic segment of the B-chromosome of rye (*Secale cereale*). *Chromosoma*, 105: 97-103
- Houben A, Verlin D, Leach CR & Timmis JN (2001) The genomic complexity of micro B chromosomes of *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma*, 110: 451-459
- Hsu TC & Patton JL (1969) Bone marrow preparations for chromosome studies. In: *Comparative Mammalian Cytogenetics* (Benirschke K, ed), 454-460, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
-

-
- Huys G, Coopman R, Janssen P & Kersters K (1996) High-resolution genotypic analysis of the genus *Aeromonas* by AFLP fingerprinting, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 46: 572–580
- Jackson RC & Newmark P (1960) Effects of supernumerary chromosomes on production of pigment in *Haplopappus gracilis*. *Science*, 132: 1316-1317
- Jamilena M, Rejon CR & Rejon MR (1994) A molecular analysis of the origin of the *Crepis capillaris* B chromosome. *Journal of Cell Sciences*, 107: 703-708
- Jamilena M, Garridoramos M, Rejon MR, Rejon CR & Parker JS (1995) Characterization of repeated sequences from microdissected B chromosomes of *Crepis capillaris*. *Chromosoma*, 104: 113-120
- Janssen P, Maquelin K, Coopman R, Tjernberg I, Bouvet P, Kersters K & Dijkshoorn L (1997) Discrimination of *Acinetobacter* genomic species by AFLP fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 47: 1179–1187
- Jenkins G (1986) Synaptonemal complex formation in hybrids of *Lolium temulentum* x *Lolium perenne* (L.). *Chromosome*, 93 (5): 413-419
- Jojić V, Blagojević J, Ivanović A, Bugarski-Stanojević V & Vujošević M (2007) Morphological integration of the mandible in yellow-necked field mice: The effects of B chromosomes. *Journal of Mammalogy*, 88 (3): 689-695
- Jojić V, Blagojević J & Vujošević M (2011) B chromosomes and cranial variability in yellow-necked field mice (*Apodemus flavicollis*). *Journal of Mammalogy*, 92: 396-406.
- Jones RN (1991) B-chromosome drive. *American Naturalist*, 137: 430–442
- Jones RN (1995). B chromosomes in plants. *New Phytologist*, 131: 411-434
-

-
- Jones RN & Rees H (1982) B-chromosomes. Academic Press, London, UK
- Jones RN & Houben A (2003) B chromosomes in plants: escapees from the A chromosome genome? *Trends in Plant Science*, 8 (9): 417- 423
- Joost S, Kalbermatten M & Bonin A (2008) Spatial analysis method (SAM): a software tool combining molecular and environmental data to identify candidate loci for selection. *Molecular Ecology Resources*, 8: 957–960
- Jump AS, Hunt JM, Martinez-Izquierdo JA & Penuelas J (2006) Natural selection and climate change: temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*. *Molecular Ecology*, 15: 3469–3480
- Kartavtseva IV (1994) Description of B-chromosomes in the karyotype of the field mouse *Apodemus agrarius*. *Cytology and Genetics*, 28: 100-102
- Kartavtseva IV (1999) Seasonal observations on supernumerary chromosomes, mosaicism, and dynamics in two populations of the Eastern-Asian wood mouse *Apodemus peninsulae* (Rodentia) from Primorskii Krai. *Russian Journal of Genetics*, 35: 811-817
- Kartavtseva IV, Roslik GV, Pavlenko MV, Amachaeva EY, Sawaguchi S & Obara Y (2000) The B chromosome system of the Korean field mouse *Apodemus peninsulae* in the Russian far east. *Chromosome Science*, 4 (1): 21-29
- Kis-Papo T, Kirzhner V, Wasser SP & Nevo E (2003) Evolution of genomic diversity and sex at extreme environments: fungal life under hypersaline Dead Sea stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 100: 14970–14975
- Kohn MH, Pelz H-J & Wayne RK (2000) Natural selection mapping of the warfarin-resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 97: 7911–7915
-

Kohn MH, Pelz H-J & Wayne RK (2003) Locus-specific genetic differentiation among warfarin resistant rat populations. *Genetics*, 164: 1055–1070

Kolliker R, Kraehenbuehl R, Boller B & Widmer F (2006) Genetic diversity and pathogenicity of the grass pathogen *Xanthomonas translucens* pv. *graminis*. *Systematic and Applied Microbiology*, 29: 109–119

Kosman E & Leonard KJ (2005) Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology*, 14: 415–424

Kral B (1971) Chromosome characteristics of certain murine rodents (Muridae) of Asiatic part of the USSR. *Zoologicke Listy*, 20: 331-347

Kral B, Zima J, Herzig-Straschil B & Streba O (1979) Karyotypes of certain small mammals from Austria. *Folia Zoologica*, 28: 5-11

Krauss SL (2000) Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Molecular Ecology*, 9: 1241–1245

Kremer A, Caron H, Cavers S, Colpaert N, Ghezen G, Gribel R, Lemes M, Lowe AJ, Margis R, Navarro C & Salgueiro F. (2005) Monitoring genetic diversity in tropical trees with multilocus dominant markers. *Heredity*, 95: 274–280

Lamb JC, Meyer JM, Corcoran B, Kato A, Han F & Birchler JA (2007) Distinct chromosomal distributions of highly repetitive sequences in maize. *Chromosome Research*, 15: 33-49

Lande R (1995) Mutation and conservation. *Conservation Biology*, 9: 782–791

Langdon T, Seago C, Jones RN, Ougham H, Thomas H, Forster JW & Jenkins G (2000) De novo evolution of satellite DNA on the rye B chromosome. *Genetics*, 154: 869-884

Leach CR, Donald TM, Franks TK, Spiniello SS, Hanrahan CF & Timmis JN (1995) Organisation and origin of a B chromosome centromeric sequence from *Brachycome dichromosomatica*. *Chromosoma*, 103: 708-714

Lewontin RC & Krakauer JK (1973) Distribution of gene frequency as a test of the theory of the selective neutrality of polymorphisms. *Genetics*, 74: 175-195

Lia VV, Confalonieri VA & Poggio L (2007) B chromosome polymorphism in maize landraces: Adaptive vs. demographic hypothesis of clinal variation. *Genetics*, 177: 895-904

Liu Z, Nichols A, Li A & Dunham RA (1998) Inheritance and usefulness of AFLP markers in channel catfish (*Ictalurus punctatus*), blue catfish (*I. furcatus*), and their F1, F2, and backcross hybrids. *Molecular and General Genetics*, 258: 260-268

Lopez-Leon MD, Neves N, Schwarzacher T, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM & Camacho JP (1994) Possible origin of a B chromosome deduced from its DNA composition using double FISH technique. *Chromosome Research*, 2: 87-92

Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S & Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics*, 4: 981- 994.

Lynch M & Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91-99

Majer D, Lewis BG & Mithen R (1998) Genetic variation among field isolates of *Pyrenopeziza brassicae*. *Plant Pathology* 47: 22-28

Malkov A, Vujošević M & Jovanović A (1995) One method for automatic chromosome analysis and comparison. 12th Panhellenic Congress in Mathematics

Education (Mathematics and Other Sciences), Heraclion, Crete, Greece, Proceedings: 371-378

Maniatis T, Fritsch E & Sambrook J (1982). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY

Mariette S, Le Corre V, Austerlitz F & Kremer A (2002) Sampling within the genome for measuring within-population diversity: trade-offs between markers. *Molecular Ecology*, 11: 1145–1156

Marsh ACW & Harris S (2000) Partitioning of woodland habitat resources by two sympatric species of *Apodemus*: lessons for the conservation of the yellow-necked mouse (*A. flavicollis*) in Britain. *Biological Conservation* 92:275-283

Maughan P, Saghai Maroof MA, Buss GR & Huestis GM (1996) Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near-isogenic line analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 392– 401

Mba C & Tohme J (2005) Use of AFLP markers in surveys of plant diversity. In: *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B* (eds Zimmer EA, Roalson EH), pp. 177–201. Academic Press, San Diego, California.

McMillan AM, Bagley MJ, Jackson SA & Nacci DE (2006) Genetic diversity and structure of an estuarine fish (*Fundulus heteroclitus*) indigenous to sites associated with a highly contaminated urban harbor. *Ecotoxicology*, 15: 539–548

McVean GT (1995) Fractious chromosomes - hybrid disruption and the origin of selfish genetic elements. *Bioessays*, 17: 579-582

Mendelson TC & Shaw KL (2005) Use of AFLP markers in surveys of arthropod diversity. In: *Molecular Evolution: Producing the Biochemical Data, Part B* (eds Zimmer E.A., Roalson E.H.), 161– 177. Academic Press, San Diego, California

Meudt HM & Clarke AC (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses, and advances. *Trends in Plant Science*, 12: 106–117

Musser GG & Carleton MD (2005) 'Family Muridae' in Wilson ED, Reeder DM (eds.) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*, 3rd ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, pp. 501-806.

Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 70: 3321–3323

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89: 583–590

Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Nei M & Li WH (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 5269–5273

Neo DM, Moreira O & Camacho JPM (2000) Altitudinal variation for B chromosome frequency in the characid fish *Astuanax scabripinnis*. *Heredity*, 85: 136-141

Nosil P, Egan SP & Funk DJ (2008) Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: "Isolation by adaptation" and multiple roles for divergent selection. *Evolution*, 62: 316–336

Nunes V, Beaumont M, Butlin R & Paulo O (2011) Multiple approaches to detect outliers in a genome scan for selection in ocellated lizards (*Lacerta lepida*) along an environmental gradient. *Molecular Ecology*, 20: 193-205

Nybom H (2004) Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13: 1143–1155

-
- Obara Y & Sasaki S (1997) Fluorescent approaches on the origin of B chromosomes of *Apodemus argenteus hokkaidi*. *Chromosome Science* 1: 1-5
- Obrtel R & Holisova V (1983) Winter and spring diet of three coexisting *Apodemus* spp. *Folia Zoologica* 32 (4): 291-302
- Östergren G (1947) Heterochromatic B chromosomes in *Anthoxanthum*. *Hereditas*, 33: 261-296
- Paliwal RL & Hyde BB (1959) The association of a single B chromosome with male sterility in *Plantago coronopus*. *American Journal of Botany*, 46: 460-466
- Pérez T, Albornoz J & Domínguez A (1998) An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, 7: 1347–1358
- Plowman AB & Bougourd SM (1994) Selectively advantageous effects of B chromosomes on germination behavior in *Allium schoenoprasum* L. *Heredity*, 72: 587- 593
- Poggio L, Rosato M, Chiavarino AM & Naranjo CA (1998) Genome size and environmental correlations in maize (*Zea mays* ssp. *mays*, Poaceae). *Annals of Botany*, 82: 107-115
- Polyakov A, Beharav A, Avivi A & Nevo E (2004) Mammalian microevolution in action: adaptive edaphic genomic divergence in blind subterranean mole-rats. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 271: 156–159
- Pritchard JK, Stephens M & Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945– 959
- Raghuvanshi SS & Kumar G (1983) No male sterility gene on B chromosomes in *Plantago coronopus*. *Heredity*, 51: 429-429
-

-
- Randolph LF (1928) Types of supernumerary chromosomes in maize. *Anatomical record*, 41: 102
- Rees H & Hutchinson J (1973) Nuclear DNA variation due to B chromosomes. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 38: 175-182
- Robertson A (1975) Gene frequency distribution as a test of selective neutrality. *Genetics*, 81: 775-785
- Rogers SM & Bernatchez L (2005) Integrating QTL mapping and genome scans towards the characterization of candidate loci under parallel selection in the lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*). *Molecular Ecology*, 14: 351-361
- Rogers SM & Bernatchez L (2007) The genetic architecture of ecological speciation and the association with signatures of selection in natural lake whitefish (*Coregonas* sp., Salmonidae) species pairs. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1423-1438
- Rosato M, Chiavarino AM, Naranjo CA, Hernandez JC & Poggio L (1998) Genome size and numerical polymorphism for the B chromosome in races of maize (*Zea mays* ssp. *Mays*, Poaceae). *American Journal of Botany*, 85: 168-174
- Rosendahl S & Taylor JW (1997) Development of multiple genetic markers for studies of genetic variation in arbuscular mycorrhizal fungi using AFLP. *Molecular Ecology*, 6: 821-829
- Sablina OV, Radiabli SI & Golenishchev FN (1985) B chromosomes in karyotype of *Apodemus flavicollis* from Leningrad District. *Zoologičeskij žurnal* 64: 1901-1903
- SanCristobal M, Chevalet C, Peleman J et al. (2006) Genetic diversity in European pigs utilizing amplified fragment length polymorphism markers. *Animal Genetics*, 37: 232-238
-

Sandery MJ, Forster JW, Blunden R & Jones RN (1990) Identification of a family of repeated sequences on the rye B chromosome. *Genome*, 33: 908-913

Schartl M, Nanda I, Schlupp I, Wilde B, Epplen JT, Schmid M & Parzefall J (1995) Incorporation of subgenomic amounts of DNA as compensation for mutational load in a gynogenetic fish. *Nature* 374, 196-196.

Schmid M, Ziegler CG, Steinlein C, Nanda I & Schartl M (2006) Cytogenetics of the bleak (*Alburnus alburnus*), with special emphasis on the B chromosomes. *Chromosome Research*, 14: 231-242

Semblat JP, Wajnberg E, Dalmaso A, Abad P & Castagnone-Sereno P (1998) High-resolution DNA fingerprinting of parthenogenetic root-knot nematodes using AFLP analysis. *Molecular Ecology*, 7: 119–125

Shan F, Clarke HC, Plummer JA, Yan G & Siddique KHM (2005) Geographical patterns of genetic variation in the world collections of wild annual *Cicer* characterized by amplified fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics*, 110: 381–391

Sharbel TF, Green DM & Houben A (1998) B-chromosome origin in the endemic New Zealand frog *Leiopelma hochstetteri* through sex chromosome devolution. *Genome*, 41: 14-22

Singh M, Chabane K, Valkoun J & Blake T (2006) Optimum sample size for estimating gene diversity in wild wheat using AFLP markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 53: 23–33

Sokal RR & Michener CD (1958) A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38: 1409–1438

Soldatović B, Savić I, Dulić B, Milošević M & Mikes M (1972) Study of the karyotype of the genus *Apodemus* Kaup, 1829 (Mammalia, Rodentia). *Archives of Biological Science*, 24: 125-130

Sørensen T (1948) A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species content and its application to analyses of the vegetation on Danish commons. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Biologiske Skrifter*, 5: 1-34

Stark EA, Connerton I, Bennett ST, Barnes SR, Parker JS & Forster JW (1996) Molecular analysis of the structure of the maize B-chromosome. *Chromosome Research*, 4: 15-23

StatSoft, Inc.: STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa, OK, 74104-4442, (918) 749-1119, fax: (918) 749-2217, e-mail: info@statsoft.com, WEB: <http://www.statsoft.com>. (2001).

Staub RW (1987) Leaf striping correlated with the presence of B chromosomes in maize. *Journal of Heredity*, 78: 71-74

Stewart CN & Excoffier L (1996) Assessing population genetic structure and variability with RADP data: application to *Vaccinium macrocarpon* (American Cranberry). *Journal of Evolutionary Biology*, 9: 153-171

Stitou S, de la Guardia RD, Jimenez R & Burgos M (2000) Inactive ribosomal cistrons are spread throughout the B chromosomes of *Rattus rattus* (Rodentia, Muridae). Implications for their origin and evolution. *Chromosome Research*, 8: 305-311

Storz JF (2005) Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence. *Molecular Ecology*, 14: 671- 688

Tanić N, Dedović N, Vujošević M & Dimitrijević B (2000) DNA profiling of B-chromosomes from the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia). *Genome Research*, 10 (1): 55-61

Tanić N, Vujošević M, Dedović N & Dimitrijević B (2005) Differential gene expression in yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Rodentia, Mammalia) with and without B chromosomes. *Chromosoma*, 113: 418-427

Teoh SB & Jones RN (1978) B chromosome selection and fitness in rye. *Heredity*, 41 (1): 35-48

Teoh SB, Ress H & Hutchinson J (1976) B chromosome selection in *Lolium*. *Heredity*, 37: 207-213

Teruel M, Sørensen JG, Loeschcke V, Cabrero J, Perfectti F & Camacho JPM (2011) Level of heat shock proteins decreases in individuals carrying B-chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Cytogenetic and Genome Research*, 132: 94-99

Theuri J, Phelps-Durr T, Mathews S & Birchler J (2005) A comparative study of retrotransposons in the centromeric regions of A and B chromosomes of maize. *Cytogenetic and Genome Research*, 110: 203-208

Tohme J, Orlando Gonzalez D, Beebe S & Duque MC (1996) AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Science*, 36: 1375-1384

Travis S, Maschinski J & Keim P (1996) An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var. *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Molecular Ecology*, 5: 735-745

Triantaphyllidis GV, Criel GRJ, Abatzopoulos TJ, Thomas KM, Peleman J, Beardmore JA & Sorgeloos P (1997) International study on Artemia. LVII. Morphological and

molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. *Marine Biology*, 129: 477–487

van Haeringen WA, Den Bieman MG, Lankhorst AE, van Lith HA & van Zutphen LF (2002) Application of AFLP markers for QTL mapping in the rabbit. *Genome*, 45: 914–921

van Vugt JJ, de Nooijer S, Stouthamer R & de Jong H (2005) NOR activity and repeat sequences of the paternal sex ratio chromosome of the parasitoid wasp *Trichogramma kaykai*. *Chromosoma*, 114: 410-419

Vasemagi A, Nilsson J & Primmer CR (2005) Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Biology and Evolution*, 22: 1067–1076

Vos P, Hogers R, Bleeker M et al. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23: 4407–14.

Vujošević M (1987) Hromozomski polimorfizam kod tri vrste roda *Apodemus* (Rodentia, Mammalia). Doktorska teza, Univerzitet u Beogradu.

Vujošević M (1993) B chromosomes in mammals. *Genetika*, 25: 247-258

Vujošević M & Živković S (1987) Numerical chromosome polymorphism in *Apodemus flavicollis* and *A. sylvaticus* (Mammalia, Rodentia) caused by supernumerary chromosomes. *Acta Veterinaria* 37: 115-122

Vujošević M & Blagojević J (1995) Seasonal changes of B-chromosome frequencies within the population of *Apodemus flavicollis* (Rodentia) on Cer mountain in Yugoslavia. *Acta Theriologica*, 40: 131-137

-
- Vujošević M & Blagojević J (2000) Does environment affect polymorphism of B chromosomes in the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*? *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 65: 313-317
- Vujošević M & Blagojević J (2004) B chromosomes in populations of mammals. *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 247-256
- Vujošević M, Radosavljević J, Živković S (1989) Meiotic behavior of B chromosomes in yellow necked mouse *Apodemus flavicollis*. *Archives of Biological Sciences*, 41: 39-42
- Vujošević M, Blagojević J, Radosavljević J & Bejaković D (1991) B chromosome polymorphism in populations of *Apodemus flavicollis* in Yugoslavia. *Genetica*, 83: 167-170
- Vujošević M, Jojić V, Bugarski-Stanojević V & Blagojević J (2007) Habitat quality and B chromosomes in the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis*. *Italian Journal of Zoology*, 74 (4): 313 - 316
- Vujošević M, Blagojević J, Jojić-Šipetić V, Bugarski-Stanojević V, Adnađević T & Stamenković G (2009) Distribution of B chromosomes in age categories of the yellow-necked mouse *Apodemus flavicollis* (Mammalia, Rodentia). *Archives of Biological Sciences*, 61 (4): 653-658
- Wang ZS, Baker AJ, Hill GE & Edwards SV (2003) Reconciling actual and inferred population histories in the house finch (*Carpodacus mexicanus*) by AFLP analysis. *Evolution*, 57: 2852-2864
- Waples RS (1991) Genetic methods for estimating the effective size of cetacean populations. *Report of the International Whaling Commission (Special Issue)*, 13: 279-300
-

-
- Weir B & Cockerham C (1984) Estimating F -statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358–1370
- White MJD (1973) *Animal Cytology and Evolution*, 3rd ed, Cambridge University Press, London
- Wilding CS, Butlin RK & Grahame J (2001) Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *Journal of Evolutionary Biology*, 14: 611–619
- Wilson EB (1907) The supernumerary chromosomes of Hemiptera. *Science*, 26: 870–871
- Winfield MO, Arnold M, Cooper F, Le Ray M, White J, Karp A & Edwards KJ (1998) A study of genetic diversity in *Populus nigra subsp. betulifolia* in the Upper Severn area of the UK using AFLP markers. *Molecular Ecology*, 7: 3–10
- Wirth T & Bernatchez L (2001) Genetic evidence against panmixia in the European eel. *Nature*, 409: 1037–1040
- Wójcik JM, Wójcik AM, Macholán M, Piálek J & Zima J (2004) The mammalian model for population studies of B chromosomes, the wood mouse (*Apodemus*). *Cytogenetic and Genome Research*, 106: 264–270
- Wolf U, Vioculescu I, Zenzes MT, Vogel W & Engel W (1972) Chromosome polymorphism in *Apodemus flavicollis*, possibly due to creation of a new centromere. In: *Modern aspects of Cytogenetics: Constitutive Heterochromatin in Man* (Pfeiffer A, Schautter FK, eds), pp. 163–168, Springer, Stuttgart
- Wright S (1951) The genetical structure of natural populations. *Annals of Eugenics*, 15: 323–354
-

Wu B, Liu N & Zhao H (2006) PSMIX: an R package for population structure inference via maximum likelihood method. *BMC Bioinformatics*, 7: 317–326

Yeh FC, Yang R-C, Boyle TBJ, Ye Z-H & Mao JX (1997) POPGENE (version 1.32), the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada

Zhivotovsky L (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, 8: 907–913

Zima J (1984) Chromosomes of certain small mammals from southern Bohemia and the Sumava mts (CSSR). *Folia Zoologica*, 33: 133-141

Zima J & Macholán M (1995) B chromosomes in the wood mouse (genus *Apodemus*). *Acta Theriologica (Suppl)*, 3: 75-86

Zima J, Macholán M & Slivková L (1997) Confirmation of the presence of B chromosomes in the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*). *Folia Zoologica* 46: 217-221

Zima J, Piálek J & Macholán M (2003) Possible heterotic effect of B chromosomes on body mass in a population of *Apodemus flavicollis*. *Canadian Journal of Zoology*, 81: 1312-1313

BIOGRAFIJA AUTORA

Tanja Adnađević je rođena 29. oktobra 1978. godine u Zemunu, a osnovnu i srednju školu je završila u Indiji. Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala školske 1997/1998. godine na studijskoj grupi Biologija. Fakultet je završila 2005. godine, a iste godine je upisala Poslediplomske studije na smeru Genetika, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu. Doktorske studije na smeru Genetika, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu je upisala 2006. godine.

Od januara 2006. godine radi kao istraživač pripravnik u Odeljenju za genetička istraživanja. U zvanje istraživač saradnik je izabrana 2009. godine. Tanja Adnađević je tokom istraživačkog rada učestvovala u realizaciji dva nacionalna projekta Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije (143011), odnosno Ministarstva na nauku i prosvetu Republike Srbije (173003). 2011. godine je bila angažovana na realizaciji međunarodnog projekta Evropske komisije iz grupe FP7 (FP7-PEOPLE-2011-NIGHT). Od 2012. je učesnik međunarodnog projekta Evropske komisije iz grupe FP7 (Simfonicum, no. 316471)

Od 2008. godine je angažovana kao istraživač saradnik i predavač u Istraživačkoj stanici Petnica. Od iste godine je angažovana u popularizaciji nauke u okviru Festival nauke.

Tanja Adnađević je član Društva genetičara Srbije, Srpskog biološkog društva i European Society of Mutagenesis. 2012. godine je bila član organizacionog odbora simpozijuma „II Symposium of Population and Evolutionary Genetics, 9-12 May 2012, Belgrade. “