

Genetska varijabilnost i geografsko strukturiranje populacija gubara (*Lymantria dispar* L.) u šumama Europe

Lacković, Nikola

Doctoral thesis / Disertacija

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Forestry / Sveučilište u Zagrebu, Šumarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:108:103488>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb Faculty of Forestry and Wood Technology](#)





Sveučilište u Zagrebu

Šumarski Fakultet

Nikola Lacković

**Genetska varijabilnost i geografsko
strukturiranje gubara (*Lymantria dispar*
L.) u šumama Europe**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
Prof.dr.sc. Boris Hrašovec

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

Faculty of Forestry

Nikola Lacković

**Geneic variability and geographyc
structuration of gypsy moth (*Lymantria
dispar* L.) in forests of Europe**

DOCTORAL THESIS

Supervisor:
Prof.dr.sc. Boris Hrašovec

Zagreb, 2015.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

TI (naslov)	Genetska varijabilnost i geografsko strukturiranje populacija gubara (<i>Lymantria dispar</i> L.) u šumama Europe
AU (autor)	Nikola Lacković
AD (adresa)	Antuna Mihanovića 3, 10450 Jastrebarsko, Hrvatska nikolal@sumins.hr
SO (izvor)	Šumarska knjižnica – Šumarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu Svetošimunska 25, 10000 Zagreb
PY (godina objave)	2015
LA (izvorni jezik)	hrvatski
LS (jezik sažetka)	engleski
DE (ključne riječi)	<i>Lymantria dispar</i> , gradacije, genska raznolikost, filogeografska struktura, klimatske promjene, pomicanje areala, šume europe
GE (zemlja objave)	Republika Hrvatska
PT (vrsta objave)	doktorska disertacija
VO (obujam)	XXI + 130 str. + 14 tablica + 25 slika + 167 literat.
AB (sažetak)	Gubar je polifagni leptir rasprostranjen većim dijelom sjeverne hemisfere. Za gubara su karakteristične periodičke gradacije, a zbog polifagnosti i sposobnosti za longitudinalne i latitudinalne ekspanzije spada među najznačajnije biotske uzročnike poremećaja i šteta u šumama Europe, a štete se generalno povećavaju od zapada prema istoku i od sjevera prema jugu. Kompleksi prirodnih neprijatelja imaju izraženu ulogu u regulaciji brojnosti i na populacijsku dinamiku gubara, no genska raznolikost s druge strane značajno doprinosi sposobnosti prilagodbe i opstanka vrste. Pojava gradacija varira između različitih područja Europe, što potiče pitanje o genetičkim razlikama između populacija, a što je dodatno potkrijepljeno poznatim posljedicama Kvaternarnih glacijacija. Upotrebom COI mitohondrijskog DNA biljega analizirano je 497 jedinki sa 38 lokaliteta u Europi. Ustanovljena je općenito visoka genska raznolikost i značajna strukturiranost u 8 glavnih filogeografskih grupa. Rekolonizacijski obrazac gubara podudara se sa paradigmom leptir, pri čemu su Dinaridi djelovali kao barijera toku ilirskih gena. Populacije iz Gruzije posjeduju značajno različite haplotipove od ostatka Europe, no one u kontekstu predviđenih pomicanja areala gubara kao posljedice klimatskih promjena ne predstavljaju velik rizik. Međutim, ilirske populacije koje posjeduju najvišu gensku raznolikost, predstavljaju visok rizik u slučaju širenja u genski siromašne populacije koje nastanjuju visoko vrijedne šumske sastojine kontinentalnog bazena Balkanskog poluotoka.

BASIC DOCUMENTATION CARD

TI (Title)	Genetic variability and geographic structuration of gypsy moth (<i>Lymantria dispar</i> L.) in forests of Europe
OT (Original Title)	Genetska varijabilnost i geografsko strukturiranje populacija gubara (<i>Lymantria dispar</i> L.) u šumama Europe
AU (Author)	Nikola Lacković
AD (Adress of Author)	Antuna Mihanovića 3, 10450 Jastrebarsko, Hrvatska nikolal@sumins.hr
SO (Source)	Forestry Library of Faculty of Forestry, University of Zagreb, Svetošimunska 25, 10 000 Zagreb
PY (Publication Year)	2015
LA (Language of Text)	croatian
LS (Language of Summary)	english
DE (Descriptors, key words)	<i>Lymantria dispar</i> , outbreaks, genetic diversity, phylogeographic structure, climate change, range shift, forests of Europe
GE (Geo. Headings)	Republic of Croatia
PT (Publication Type)	Doctoral Thesis
VO (Volume)	XXI + 130 pages + 14 tables + 25 pictures + 167 literature citations
AB (Abstract)	The gypsy moth is a polyphagous butterfly spread throughout the northern hemisphere. Gypsy moth has characteristic periodic outbreaks, and due to its polyphagous nature and capabilities for longitudinal and latitudinal expansion it is considered one of the significant biological agents causing disturbances and damage in forests of Europe. The damage is generally higher from west to east and from north to south. Complex of natural enemies play a strong role in the regulation of the gypsy moth population density and dynamics, but the genetic diversity on the other hand significantly contributes to the adaptive capacity and survival of the species. The outbreak occurrence varies between different regions of Europe, which raises the question of possible genetic differences between populations, additionally supported by the known consequences of quaternary glaciations. Using the COI mitochondrial DNA marker, 497 specimens from 38 sites in Europe were analyzed. Generally high genetic diversity and significant structure of the 8 major phylogenetic groups was observed. Recolonisation pattern of gypsy moth is congruent with the butterfly paradigm, with Dinarid Alps acted as a barrier for the Illyrian genes. Populations from Georgia have significantly different haplotypes from the rest of Europe, but in the context of the predicted gypsy moth range shift as a result of climate change they don't represent a high risk. However, the Illyrian populations that possess the highest genetic diversity represent a high risk in the event of expansion in genetically poor populations in highly valuable forest stands of continental basin of the Balkan Peninsula.

POPIS TABLICA

Tablica 1. Popis i naziv lokaliteta, geografske koordinate, vrsta domaćina sa kojega su skupljeni uzorci, ime sakupljača na lokalitetima na kojima nije obavljeno samostalno sakupljanje, datum sakupljanja, broj sakupljenih jedinki i broj jedinki iz kojih je izolirana genomska DNA. Kod lokaliteta korišteno je tijekom analiza za označavanje uzoraka kako bi se olakšala obrada u specifičnim programima.	40
Tablica 2 Distribucija haplotipova po lokalitetima razvrstana silazno prema ukupnoj frekvenciji pojedinog haplotipa u cijelom skupu podataka (sumirano u zadnjoj desnoj koloni). Ukupan broj sekvenci po lokalitetu sumiran je u posljednjem redu, a suma u najdonjoj desnoj ćeliji predstavlja ukupan broj sekvenci odnosno ukupan broj uzoraka na temelju kojeg je provedena filogeografska analiza.....	50
Tablica 3. Indeksi unutarpopulacijske raznolikosti za istraživane populacije (index $\pm$ SD). Kodovi populacija prema Tablica 1. N – ukupni broj sekvenci, #HT - broj haplotipova, Hd – haplotipska raznolikost, MNPD – srednji broj razlika među sekvencama (između populaciji pripadajućih haplotipova), π – nukleotidna raznolikost, r- bogatstvo alela (allelic richness) nakon rarefakcije na 5 (najmanji uzorak) prema Pons i Petit (1996).....	61
Tablica 4. Filogeografske grupe populacija za utvrđivanje filogeografske strukturiranosti populacija analizom molekularne varijance u tri hierarhijska nivoa (AMOVA). Grupe su sastavljane objektivno na temelju pripadnosti populacije biogeografskoj regiji te uzimajući u obzir distribuciju haplotipova koja upućuje na sličnost sa rekolonizacijskim modelom „butterfly“ (Habel i dr. 2005, Schmitt 2007)	65
Tablica 5. Rezultati AMOVA analize za K=8 objektivno grupiranih populacija; sve su komponentne statistički značajne (p<0,001)	67
Tablica 6. Rezultati AMOVA analize za K=11, sa tri izdvojene populacije radi detekcije izvora varijabilnosti između populacija unutar grupa	67
Tablica 7. Tablica indeksa M koji se interpretira kao teoretski efektivni broj jedinki koje u jednoj generaciji migriraju između uspoređenih populacija (Slatkin 1995). Crvenom je bojom obojano 5% indeksa koji pokazuju najveći stupanj migracije, a zelenom bojom 5% indeksa koji pokazuju najmanji stupanj migracije. U ćelijama između populacija za koje je derivacija stupnja migracije bila neizmjereno velika i stoga nije mogla biti prikazana brojem dodjeljena je oznaka „inf“	73
Tablica 8. Lista i opis novih Europskih tipova šuma prema izvješću Forest Europe (2011)...	95
Tablica 9. Lista haplotipskih sekvenci i pripadajućih nukleotidnih nizova u 5' - 3' smjeru	99
Tablica 10. Lista modela prema Akaike informacijskom kriteriju (AIC), prikazani su samo modeli čiji su doprinosi kumulativno doprinosili do 95% vjerodostojnosti za kriterij odabira modela supstitucije.....	129
Tablica 11. Lista modela prema korigiranom Akaike informacijskom kriteriju (AICc), prikazani su samo modeli čiji su doprinosi kumulativno doprinosili do 95% vjerodostojnosti za kriterij odabira modela supstitucije.	129

Tablica 12. Lista modela prema Bayesian informacijskom kriteriju (BIC), prikazani su samo modeli čiji su doprinosi kumulativno doprinosili do 95% vjerodostojnosti za kriterij odabira modela supstitucije.....	130
Tablica 13. Lista modela prema Decision theory kriteriju (DT), prikazani samo modeli čiji su doprinosi kumulativno spadali u 5% najboljih modela.....	130
Tablica 14. Broj nukleotidnih supstitucija po mjestu (eng. per site) između parova haplotipskih sekvenci (ispod dijagonale) i pripadajuće standardne pogreške (iznad dijagonale)	130

POPIS SLIKA

Slika 1. Prikaz današnjeg geografskog rasprostranjenja gubara. Zelenom bojom prikazana su područja autohtonog areala, a plavom invadirano područje u sjevernoj americi. Preuzeto od sa www.na.fs.fed.us (US Forest Service).	5
Slika 2. Gusjenice gubara u različitim razvojnim stadijima (iz Mihajlović 2008).	6
Slika 3. Grupe kukuljica u prilično obrštenoj krošnji šmrike (<i>Juniperus oxycedrus</i>) u sastojini hrasta crnike na Cresu.	8
Slika 4. Gubar u razvojnom stadiju imaga sa izraženim spolnim dimorfizmom (iz Mihajlović 2008). Ženka je znatno krupnija od mužjaka.	8
Slika 5. Ženke polažu jaja i pokrivaju ih zatkalnim dlačicama formirajući tako karakteristična jajna legla, lijevo: grupimično jajno leglo na deblu hrasta crnike (<i>Q. ilex</i>) na Cresu; desno: ženke polažu grupimično jajno leglo (iz Mihajlović 2008).	9
Slika 6. Gusjenice tijekom razvoja koji traje oko 70 dana pojedju veliku količinu lista te su u vrijeme gradacije sposobne uzrokovati golobrst na velikim površinama šuma.	11
Slika 7. Mladi list hrasta crnike (<i>Q. ilex</i>) u prolistavanju znatno je mekša i kvalitetnija hrana za mlade gusjenice gubara od kožastog višegodišnjeg lista na kojem se mlade gusjenice uglavnom nemogu uspješno razviti (Lukić 2012).	13
Slika 8. Rezultati analize periodiciteta gradacija Klase 5 (>50% intenziteta zaraze šumskih sastojina) prikazuju maksimum pri periodu 10,6 godina (prema Pernek i Pilaš 2005).	16
Slika 9. Karta distribucije 20 dominantnih vrsta drveća u šumama Europe (Brus i dr. 2011). preuzeto sa www.efi.int	24
Slika 10. Tri glavna mediteranska refugija i diferencijacijska centra južne Europe tijekom zadnje ledenog doba; R1: Atlanski-mediteranski, R2: Jadranski-mediteranski, R3: Pontski-mediteranski. Geografska lokacije pet najznačajnijih kontrakcijskih i hibridizacijskih područja gdje su razne vrste došle u sekundarni kontakt tijekom postglacijalnog ekspanzijskog procesa; H1: Pireneji, H2: Alpe, H3: zapadna centralna Europa, H4: istočna centralna Europa i H5: središnja Skandinavija (prema Schmitt 2007). Umetak: karta sa detaljnijim prikazom barijernih i dodirnih zona (crtkane linije) i generaliziranom paradigmom smjerova postglacijalne rekolonizacije europskih biota (prema Hewitt 2000).	31
Slika 11. Obrazac „leptir“ paradigme postglacijalnog rekolonizacijskog obrazasca na temelju filogeografske analize leptira šahovnice (<i>Melanargia galathea</i>) kao brzo ekspandirajuće vrste. Rekolonizacija centralne europe mahom je nastupila iz Jadransko-mediteranskog i Pontsko-mediteranskog refugija, dok je rekolonizacija iz Atlansko-mediteranskog refugija sputana pirenejskim lancem i slabo prodire u već kolonizirano područje jugozapadne Francuske (prema Habel i dr. 2005)	33
Slika 12. Prikaz biogeografskih regija Europe prema klasifikaciji Europske agencije za okoliš. Preuzeto sa http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/biogeographical-regions-in-europe-1 (EEA 2011)	34
Slika 13. Lokaliteti sa kojih su prikupljeni uzorci. Crvene točke predstavljaju kotu, a uokvireni brojevi kod lokaliteta sukladno Tablica 1.	38
Slika 14. Primjer kromatograma i pripadajuće sekvence prilikom vizualne provjere i optimizacije. U primjeru ove sekvence dio do pozicije 40 bio je izbrisan, isto je učinjeno i sa	

drugog kraja sekvence. U slučaju da se u ostatku sekvence pojavilo dvosmislenih baza cijela bi sekvenca bila odbačena.	44
Slika 15. Haplotipske sekvence nalaze se u zadnjoj polovici COI gena u rasponu od 700 do 1376 baze u odnosu na poznatu sekvencu COI gena gubara kako je utvrđeno alatom za lokalno sravnjivanje (BLAST) na Banci Gena pri NCBI.	47
Slika 16. Grafički prikaz relativnih frekvencija pojedinog haplotipa u ukupnom skupu sekvenci. Najzastupljeniji su haplotipovi LD13, LD4 i LD7. Udio haplotipova LD61, LD20 i LD6 je razmjerno velik. Uočljiv je vrlo velik broj haplotipova predstavljenih sa samo dvije ili jednom sekvencom, tzv. samotnjaka (eng. singletone).....	53
Slika 17. Parsimonska kladistička mreža 60 haplotipova pronađenih na području istraživanja sa granicom spajanja 95%. Mreža je uobličena i obojana u programu Corel na temelju mreže konstruirane porogramom TCS 1.21. Nejasnoće kladograma (kružne veze) razrješene su prema uputama Crandall i Templeton (1993), veličina kruga oslikava frekvenciju haplotipa. Uz svaki krug upisan je broj haplotipa bez prefiksa LD. Izdvojeni sivo obojeni krugovi predstavljaju haplotipove LD52 do LD54 pronađene u Gruziji, a skupina odgovara monofiletskoj grupi (kladij) A, dok ostatak haplotipova pripredstavlja monofiletsku grupu (kladij) B u rekonstruiranom filogenetičkom stablu (Slika 18). Zvezadsta rekonstrukcija veza sa najzastupljenijim haplotipovima karakteristična je za populacije koje doživljavaju demografsku ekspanziju.	54
Slika 18. Molekularno filogenetička analiza metodom najveće vjerojatnosti (Maksimum Likelihood). Evolucijsko stablo rekonstruirano je na temelju Tamura-Nei modela (Tamura i Nei 1993), i inicijalnog stabla definiranog u programu jModelTest. Robusnost stabla testirana je heurističkom metodom bootstrap sa 500 replikacija samoučitanja u programu MEGA6 te je podrška prikazana brojem pored svakog čvora. Jasno se razlučuje podskupina tri haplotipa iz Gruzije (A) dok se daljnje grupiranje 57 haplotipova iz užeg područja Europe (B) naznačuje, ali bez veće statističke podrške.	55
Slika 19. Karta Europe sa distribucijom haplotipova po istraživanim populacijama. Veličina dijagrama proporcionalna je broju uzoraka po populaciji, a boja haplotipa sukladna je obojenjima iz parsimonske mreže (Slika 17). U pozadini karta biogeografskih regija Europe (EEA, 2011)	58
Slika 20. Vizualizacija distribucije genske raznolikosti po istraživanim populacijama konstruirana u programu ArcMap 9.3 (ESRI, SAD) korištenjem alata Genetic landscape (Vandergast i dr. 2011). Boje gradiraju od crvene (visoka raznolikost) do plave (niska raznolikost).....	60
Slika 21. Grafički prikaz razvoja indeksa fiksacije haplotipske raznolikosti na tri hierarhijska nivoa ovisno o predodređenom broju grupacija. Idealnim brojem grupa smatra se onaj za kojeg je indeks fiksacije između grupa (F_{CT}) najveći. Uočava se da F_{CT} za zadane podatke ne nailazi na plato sve do maksimalnog broja grupa što se vjerojatno može objasniti postojanjem velike unutarpopulacijske varijabilnosti koja proizlazi iz općenito visoke haplotipske raznolikosti utvrđene za cijeli skup podataka.	65
Slika 22. Prikaz filogeografskih grupa ustanovljenih na temelju molekularno filogenetičke analize varijance objektivno grupiranih populacija i izdvajanja divergentnih populacija. Grupa 9 predstavlja populaciju 1, grupa 10 populaciju 30, a grupa 11 populaciju 16. Ostale populacije obilježene su u skladu sa grupiranjem u Tablica 4.	68

Slika 23. Vizualizacija toka gena interpolacijom iz matrice indeksa M (Slatkin 1995) producirana u programu ArcMap 9.3 (ESRI, SAD) upotrebom alata Genetic Landscape (Vandergast i dr. 2011). Boje se kreću od crvene (visok tok gena) do plave (nizak tok gena).	72
Slika 24. Prikaz rasprostranjenosti hrasta lužnjaka (<i>Q. robur</i>) na području Europe prema podacima EUFORGEN.	97
Slika 25. Produkti uspješne amplifikacije predstavljeni su izraženom jednostrukom linijom, dok broj jažice bez linije predstavlja neuspješno amplificirani i odbačeni uzorak. Preostale svijetle zone su primer-dimer fragmenti i ostali fragmenti DNA predloška zbog kojih treba pročistiti produkte prije sekvenciranja.	98

SAŽETAK

Gubar (*Lymantria dispar*) je polifagni leptir rasprostranjen većim dijelom sjeverne hemisfere i smatran je jednim od najvećih šumskih štetnika na svijetu. Za gubara su karakteristične periodičke gradacije, a zbog polifagnosti i sposobnosti za longitudinalne i latitudinalne ekspanzijespada među značajnije biotske uzročnike poremećaja i šteta u šumama Europe. Fluktuacije gradacija variraju između različitih područja Europe, a štete se generalno povećavaju od zapada prema istoku i od sjevera prema jugu. Kompleksi prirodnih neprijatelja koji su prisutni na području Europe, uključujući novo unesenu gljivu *Entomophaga maimaiga*, imaju izraženu ulogu u regulaciji brojnosti i populacijsku dinamiku gubara. S druge strane, genetička raznolikost značajno doprinosi sposobnosti prilagodbe i opstanka vrste u promijenjivim uvjetima okoline. Učestalije gradacije na području Ilirske obale u odnosu na populacije iz kontinentalnog dijela Europe potiču pretpostavku o genetičkim razlikama između populacija, što je dodatno potkrijepljeno poznatim posljedicama Kvaternarnih glacijacija koje su dovodile do formiranja centara raznolikosti na područjima južnih europskih poluotoka i naknadne rekolonizacije centralne i zapadne Europe. Upotrebom COI mitohondrijskog DNA biljega analizirano je 497 jedinki gubara sa 38 lokaliteta u Europi. Determinirano je 60 haplotipskih sekvenci te ustanovljena općenito visoka genska raznolikost i značajna strukturiranost ($G_{ST} < N_{ST(op.)} > N_{ST(teor.)}$) u 8 glavnih filogeografskih grupa. Rekolonizacijski obrazac gubara podudara se sa paradigmom „leptir“, pri čemu su Dinaridi djelovali kao barijera toku „ilirskih“ gena. Populacije iz Gruzije posjeduju značajno različite haplotipove od ostatka Europe, no one u kontekstu predviđenih pomicanja areala gubara kao posljedice klimatskih promjena ne predstavljaju velik rizik. Međutim, ilirske populacije koje posjeduju najvišu gensku raznolikost ($r_{(7)} 2,815$, $r_{(7)} 2,555$), predstavljaju visok rizik u slučaju širenja u genski siromašne populacije koje nastanjuju visoko vrijedne šumske sastojine kontinentalnog bazena Balkanskog poluotoka. Rezultate ovog istraživanja potrebno je verificirati upotrebom jezgrinih biljega, a dodatnim uzorkovanjem na području Ilirske obale, Dinarida i Male Azije razriješile bi se neke nedoumice oko filogenetičke rekonstrukcije te bi se stvorila robusna temeljna baza za monitoring budućih migracija ovog opasnog štetnika.

KLJUČNE RIJEČI: *Lymantria dispar*, gradacije, genska raznolikost, filogeografska struktura, klimatske promjene, pomicanje areala, šume europe

EXTENDED ABSTRACT

Gypsy moth (*Lymantria dispar* L.) is a polyphagous folivore insect with natural range in Europe, Asia and northern parts of Africa between 20° to 60° N, and altitudinal range up to 1600 m above sea level. Scientific species name „*dispar*“ stands for evident sexual dimorphism in adults, while characteristic egg masses became local name inspiration in many languages. Its caterpillars are capable to feed on more than 400 plant species, with preference of species from genera *Quercus*. Due to its polyphagous nature, outbreak dynamics and ability of longitudinal and latitudinal expansion, it is considered one of the major biotic factors causing disturbances and damage in forests of Europe. In Croatia, gypsy moth was considered one of the main factors, along with the fungus *Microsphaera alphitoides*, that causes oak forest decline. After introduction in North America in 1869, it successfully spread westwards and southwards causing major ecological and economical damages that promoted it to the most severe invasive insect pest in USA ever. In Europe as natural range, gypsy moth exhibits periodical outbreaks when its caterpillars defoliate large areas of forests, agriculture and urban forests. Defoliation caused by gypsy moth can lead to 30% (even 70% in some cases) drop in annual wood increment, and two consecutive defoliations can lead to 27% oak tree dieback. Beside this direct loss, expenses of management and control measures are regularly expressed in millions. Further, impacts of gypsy moth outbreak are considered to induce profound disturbances in forest ecosystems, leading to further socio-economical and ecological damages. However, outbreak fluctuations differ between different regions, and damages are generally greater from west to east and from north to south of Europe. In continental regions, outbreaks occur every 10 to 11 years and are synchronized over large areas (phenomenon known as Moran effect), while in coastal parts of Balkan peninsula that period is 3 to 4 years. Beside abiotic factors as temperature and moisture, natural enemies complex in Europe, including newly introduced fungus *Entomophaga maimaiga*, are considered to be an important biotic regulating factor of gypsy moth population development and abundance, that way partly influencing the population dynamics. Active migration abilities of gypsy moth are reduced to nocturnal flight of male adults, while females in Europe are known to have low or non-flight capabilities. On the other hand, ability of dispersion of neonate larvae by wind (so called „ballooning“) can facilitate long distance dispersal and massive redistribution of population. Finally, ethology of female egg mass deposition can facilitate large distance intra and intercontinental anthropogenic dispersal of gypsy moth. This phenomenon is shown to be the primary cause of stratified dispersal and pulsed invasion of gypsy moth in North America, as well as it facilitated introduction of Asian gypsy moth on

western coast of North America but also on New Zealand. Observed intraspecific variation resulted in definition of European (*L. dispar dispar*) and Asian (*L. dispar asiatica*) gypsy moth with major difference manifesting as absence and existence of female flight ability, wing span and body weight. This differentiation is confirmed on molecular genetic level and molecular tools are developed for discrimination between North American, European and Asian strains of gypsy moth, but without sufficient correlation with female flight ability. Beside confirmed worldwide genetic differentiation, small scale analyses are suggested to better understand biology and ecology of gypsy moth. Differences in outbreak periodicity are thus triggering the question of possible genetic differences between populations inhabiting different regions of Europe. These questions are especially important in light of predicted range shift due to ongoing climate change, i.e. global warming.

Forests are covering 1,02 billion hectares or 44,5% of European landmass, which makes about 25% of global forest area. This major complex of forest ecosystems represents irreplaceable natural resource with prominent economical, ecological, social and protective functions. Economic contribution constantly grows and in 2010. market value of round wood was 21,1 billion euro, while non-wood goods accounted for additional 2,7 billion euro. Ecological functions are represented through landscape, biological and genetic diversity, but also through global nitrogen cycle, CO₂ assimilation. Protective functions are highly recognized and more than 20% of European forests are determined to fulfill functions of soil, water and other ecosystem protection, as well as protection of other natural resources and infrastructure. Roughly 4 million people are employed in forestry sector in Europe, which along with recreational and educational functions account for importance of social contribution of forest ecosystems. Taking into account various climatic, geographic, orographic, pedographic and vegetation factors, forests of Europe are classified in 14 different categories. European forests are dominated with slightly more than 20 forest tree species, among which *Abies alba*, *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur* i *Quercus petraea* are economically the most important. For decades, forests have been stressed with immisions, overcutting, intersected by human infrastructure and oversized populations of ungulate game, which resulted in destabilization to a large extent. One of the consequences of destabilization is increasingly frequent outbreaks of different insect species, including gypsy moth. Approximately 2% of European forests are annually damaged, and more than half of that amount is due to insects and diseases. Among insects, gypsy moth is one of the most important biotic factors causing disturbances and damages in European forests, and due to its

polyphagous nature and ability of longitudinal and latitudinal expansion it will probably continue to be.

Evolution is a theory which explains the change in heritable traits of populations in successive generations. Changes in heritable traits are result of various evolutionary processes which generates diversity on all levels of biological organization. Changes are driven by microevolutionary processes (mutation, genetic drift, gene flow and selection) which through certain number of generations result in macroevolutionary processes of adaptation, speciation and extinction. Genetic diversity of population is presented through frequency of different alleles found in population, and frequency of these alleles in natural populations are maintained by principles of Hardy-Weinberg equilibrium, and current state is the result of historical interactions of evolutionary processes. Existence of diversity is the main prerequisite for selection and exclusion of extinction as one of evolutionary outcomes. As Kimura postulated in the neutral theory of molecular evolution, deleterious mutations are swiftly removed from natural populations, while positive mutations have only 2% chance of fixation, thus most of accumulated genetic diversity is result of effectively neutral mutations. Thus, evolutionary processes can be progressive and regressive in context of diversity and complexity of organisms, and new lines will become simpler or complex according to selective advantage of given form. Unconstrained gene flow would ultimately maintain equilibrium and homogeneity of genetic diversity. However, in nature organisms that are distributed over great areas and inhabit regions of different ecological conditions, due to adaptation and reproductive isolation almost regularly undergo process of speciation. Time needed for speciation to occur is difficult to assess due to many factors acting on natural populations, but that process continuously takes place as a consequence of evolutionary processes, gradually leading to accumulation of differences in gene pools of separate populations. This accumulation of differences is reflected through geographic distribution of genealogical lines. Investigation of spatial and temporal dimensions of gene genealogy is defined under scientific discipline of phylogeography which encompasses principles and processes that have shaped contemporal geographic distribution of genealogical lines, especially on intraspecific and between closely related species. Advent and development of molecular biology and discovery of mitochondrial DNA (mtDNA) as excellent molecular phylogenetic marker were the milestones in development of phylogeography.

Genetic markers can be generally defined as any trait of an organism that can be connected with its genome. According to tat, distinctive parts of DNA and other biomolecules are

genetic markers as they originate from genome and are its representatives. Before advent of electrophoresis and molecular genetic techniques, only few Mendelian traits as pigmentation of body parts were available for genetic studies. Fast development of means of molecular biology resulted in several classes of markers that can be used in studies of population genetics, but they differ in resolution, precision, reproducibility and technical complexity and analytical effort. Discovery of mtDNA as usable molecular marker in late 1970's rapidly increased the number of analyses of evolutionary processes. Mitochondrial DNA is still the preferred genetic marker used in molecular ecology, i.e. for phylogenetic and phylogeographic analyses.

Specific geography, geomorphology and glacial history gave rise to complex biogeography of Europe made it an interesting playground for phylogeographic studies to many researchers. Approximately 2,5 million years before present (BP), climatic conditions on Earth resulted in formation of Arctic Ice Sheet, and quaternary climatic oscillations went along with enormous temperature shifts of 7 to 14°C within few decades. Last 700 000 years were dominated by great ice ages with cycles of approximately 100 000 years interspersed with relatively short warm interglacials like the one we live in. Climatic stability in last 8000 years seems like an exception rather than rule. Structures of Alpine mountains and Mediterranean Sea form the strong west-east oriented barriers that limited the migration of European biota during these severe climatic changes. With each oscillation species went extinct on large portions of their range, they were dispersed in new areas and separated in refugia. Almost all European species originated from refugia in one of the three major European peninsula in Mediterranean region; Iberian, Italy and Balkan, also called Atlantic-Mediterranean, Adriatic-Mediterranean and Pontic-Mediterranean centers of diversity respectively. One refugia also existed in present Moscow area, as well as many smaller microrefugia and cryptic refugia. In most cases, populations inhabiting these separate refugia exhibited none or low gene flow and were evolving independently, which often resulted in three major genetic groups related to each of peninsulas. Phylogenetic research on several animal species confirmed the idea of further division within Balkan refugia to western subcenter in area of Illyric coast and eastern subcenters in area of Aegean coast, and southwestern coast of Black Sea. In process of expansion from refugia organisms have recolonized ameliorated area of Europe in certain patterns defined under paradigms of recolonisation. There are four major paradigms: (1) hedgehog – expansion from all three refugia, (2) bear – expansion of western and eastern lines and confinement of Adriatic-Mediterranean lines by Alpine mountain chains, (3) butterfly –

expansion of Adriatic- and Pontic- Mediterranean and confinement of Atlantic-Mediterranean lines by chain of Pyrenees Alps and (4) grasshopper – main expansion in central Europe only from Balkans and confinement of Atlantic- and Adriatic-Mediterranean lines by mountain chains of Pyrenees and Alps. Ongoing process of environmental change and evolution of life resulted in contemporal geographic distribution of European biota, which in combination with other important habitat traits served as a key for classification of Europe to 11 biogeographic regions. On the other hand, forests are classified in 14 different categories that mostly follow the borders of biogeographic classification, but are more diverse and often disjunctly distributed.

Increasingly more evidences indicate that genetic structure of population plays important role in individual fitness and meta-analyses show negative correlation between susceptibility of populations to extinction and associated regional diversity of genes. Regarding that fact, continental populations are generally more susceptible in western parts of Europe than in Eastern while Mediterranean populations are more vital and resistant on „genetically richer“ south than north. By observing genetic diversity as basis of biodiversity and evolution of organisms, differences in rate of variability can give us subtle information about potential fitness of investigated populations, i.e. differences in potential fitness between populations. Information on genetic diversity and geographic distribution of genealogical lines (phylogeographic structure) can serve for subsequent tests of correlation with other traits that can be of interest. Further, determination of temporal phylogeographic structure can serve as a basis for future monitoring of migration pathways on area of interest and between populations of interest. Hence, data obtained from phylogeographic researches present a valuable source of information for improvements of methods and decision making not only in field of forestry but also in other biotechnological disciplines with aim to conduct biosecurity measures. In Forestry, these information can contribute to rationalization of monitoring of forest pests and decision making for successful implementation of integrated forest protection in light of global climate change. Previous investigations lack in information on genetic diversity and phylogeography of gypsy moth in Europe. Thus, this dissertation represents the first research with goal to investigate the genetic variability and possible phylogenetic structure between gypsy moth populations in Europe. For that purpose, highly polymorphic 3' region of COI gene of mtDNA was used as molecular genetic marker suitable for intraspecific and interpopulation studies.

Analyses, equipment, materials, literature and education utilized for conduction of this dissertation have been performed in Croatian Forest Research Institute, Institute for Forest entomology, forest pathology and forest protection (IFFF) at BOKU, Vienna, and Department of forest protection and game management at Faculty of forestry, University of Zagreb.

Samples were collected between 2010. and 2014. in cooperation with colleagues researchers on broader area of Europe. In total 635 individuals were collected from 38 localities in 16 European countries including Georgia. Samples were collected in all life stages except pupae, bearing in mind to collect from distant trees in order to avoid sampling of same maternal mtDNA. Upon collecting, samples were stored in 99% ethanol at -20°C. Samples are labeled with special codes composed like „number of locality – number of individual“, and each individual was given row in excel table formed for this study.

Extraction of genomic DNA was performed from 563 individuals following manufacturer's instruction of SIGMA Aldrich mammalian genomic DNA extraction kit used for this purpose. Amplification of DNA was performed by conventional PCR method, using primers UEA5 and UEA10 defined by Lunt et al. (1996) which resulted in cca 800bp long amplicons of 3' region of COI mtDNA gene. In each PCR assay one vial with H₂O_{dd} instead of DNA template was used for negative control. Amplification success was checked by electrophoresis in 2% agarose gel stained with 0,5 µg/ml of GelRed Nucleic Acid Stain. Products were visualized on UV transiluminator and photographed, and only positive products were sent for sequencing to Eurofins MWG Operon in Germany and sequences and chromatograms were delivered electronically.

Each sequence was thoroughly visually checked, optimized and clipped on the ends. Ambiguous sequences were discarded and final set of sequences were aligned in BioEdit and clipped to length of complete overlap. There were in total 497 verified sequences 676 bp in length used in further analysis. Haplotype sequences were defined by TCS 1.21., and singleton haplotype sequences were verified by additional PCR and sequencing from other side. GenBank search was performed by BLAST and 29 overlapping sequences were extracted but there was no location information in accompanied description so they were not used in further analysis. However, two sequences of complete gypsy moth mtDNA were found and they were used to define the exact position of haplotype sequences obtained in this study. Maximum likelihood phylogenetic tree reconstruction was performed by jModeltest 2.1.7 by average phylogeny of models that covered for 95% reliability according to corrected

Akaike information criterion, among 88 tested models. Robustness of tree was assessed by 500 bootstrap replications in MEGA 6, using Tamura Nei substitution model identified as best by jModeltest. Parsimony network was reconstructed by TCS 1.21, and ambiguities of certain haplotypes were solved using topological, geographic and frequency criterion. Population genetic indices of haplotype diversity, nucleotide diversity and mean number of pairwise differences were calculated for each population using ARLEQUIN. Allelic richness index (r) was calculated for all populations after rarefaction to 5, using program CONTRIB. Phylogeographic structure significance was assessed by testing if G_{ST} was significantly smaller from N_{ST} using heuristic permutation test with 1000 replicates in PERMUT. Phylogeographic structure of objectively defined groups was tested by analysis of the source of molecular variance on three hierarchical levels: among groups of populations, among populations within groups, and within populations. Objective grouping of populations was performed in ArcMap 9.3 taking into account affiliation of each population to certain biogeographic region and assumed pattern of recolonisation by paradigm „butterfly“. Pairwise analysis of fixation indices was performed in order to calculate Slatkin's M index of migration between pairs of population. Though, results of M cannot be used as absolute, but they can give us objective indices of rates of gene flow (i.e. migration) between pairs of population, which can be especially interesting in terms of monitoring the future migration patterns of gypsy moth.

In total, 60 haplotype sequences were determined on basis of 46 mutations, 676 bp in length and spanning between 700 and 1376 nucleotide base of gypsy moth COI gene. The most common haplotypes were LD13 (134), LD4 (117) and LD7 (57), followed by LD61 (29), LD20 (21), LD6 (15) and LD1 (10). Haplotypes from Georgia are seven mutations differentiated from the first closest haplotype LD62 found in Greece. Maximum likelihood phylogenetic reconstruction resulted in tree with clearly differentiated monophyletic clades of Georgian and other European haplotypes while further reconstruction of relationships among „narrow European“ haplotypes was consistent with parsimony network reconstruction. Parsimony network exhibits strong star shaped pattern in four major clades (LD4, LD6, LD7 and LD13) which is characteristic for populations that have experienced demographic and spatial expansion. Haplotype LD4 was also found in Georgia even though it was connected to LD7 on opposite side of maximum likelihood phylogenetic tree.

P-distance matrix shows average 1,5% differentiation between Georgian and narrow European haplotypes, while differentiation among European haplotypes varied between 0,1%

and 1,2% with average of 0,5%. The most divergent were haplotypes LD5 and LD35. All p-distances are within intraspecific values from 0% - 3,38%. Using molecular clock for Lepidoptera of 2,3% divergence between two sequences, or 1,15% per sequence in million years, estimated time of separation between Georgian and European lines was 0,67 to 1,3 million years ago, and among European haplotypes sequences diverged between 0,07 and 0,8 million years ago. Analysis of the map of geographic haplotype distribution can lead us to conclusion that certain haplotype groups are correlated to certain geographic regions and that the butterfly pattern of recolonization can be inferred for the gypsy moth.

Population genetic indices demonstrate evident differences in observed genetic diversity among investigated populations. The lowest genetic diversity was found in populations inhabiting continental basin of Balkan Peninsula between Dinaric Alps, Alps and Carpathian Alps and one population from Greece. On the other hand, the highest genetic diversity was found in populations 3 ($r = 2,555$), 7 ($r = 2,815$) and 45 ($r = 2,381$) inhabiting Illyric coast of Balkan Peninsula, and then populations 35 ($r = 2,245$) from Italy and 13 ($r = 2,038$) and 59 ($r = 2,500$) from central France. Accumulation of diversity in coastal populations of Croatia are an intriguing finding, while populations from Greece shown unexpectedly low diversity. Population 45 from Macedonia is interesting example of impact of Illyric haplotypes in level of genetic diversity. Low genetic diversity of populations inhabiting continental basin of Balkan peninsula are indicating that different forces have shaped the genetic pool of these populations lowering the genetic diversity either through process of genetic drift or selection. Profound oscillations in population density observed in populations inhabiting continental basin of Balkan Peninsula could be the cause of decrease in genetic diversity leading to, due to phenomenon of Allee effect, amplified impact of genetic drift. Another factor that could have caused decrease in genetic diversity of these populations is the fact that they damage highly valued forests of pedunculate oak, triggering intensive control measures during last century when chemical biocides like DDT were extensively used. It could also be assumed that ecological conditions in Mediterranean regions, despite the absence of pedunculate oak as the most preferred species, have acted beneficially on the biological development of gypsy moth enabling milder oscillations and more stable population densities without profound degradations that would lead to effect of genetic drift. Consequently, higher genetic diversity could also account for greater adaptive fitness of these populations. Increased diversity observed in population 59 in France is consequence of hybridization and secondary contact of haplotypes from Italian and continental basin of Balkan refugia.

Genetic diversity indices shown considerably high values, total genetic diversity was H_T (se) 0,814 (0,035) and intrapopulation diversity H_S (se) 0,437 (0,047). Fixation index G_{ST} (se) 0,463 (0,056) was significantly smaller than observed fixation index $N_{ST(ob.)}$ (se) 0,521 (0,059) which was significantly greater than theoretical fixation index $N_{ST(theor.)}$ (se) 0,456 (0,001) ($p = 0,010$). Consequently, we reject hypothesis that there is no significant structuration between investigated populations, and we can conclude that structuration is appropriately greater as mutually similar haplotypes are grouped together. Determination of phylogeographic groups by spatial analysis of molecular variance failed to reach plateau, most probably due to observed high level of intrapopulation genetic variability, and the influence of certain populations which significantly differ from contiguous geographic group, e.g. population 16 from Greece. Thus, genetic structure was assessed by analysis of molecular variance on three hierarchical levels of 8 objective geographic groups of populations, and by segregation of populations 1, 16 and 30 from logical geographic groups. Resulting variance among groups contributed 49,17% to total observed variation, while variation among populations within groups contributed with only 3,94%. High intrapopulation variability contributed with 46,89%, confirming the finding of generally high genetic variability. Reasons of differentiation of segregated populations from logical geographic groups could be the effect of sampling, but also the effect of migration induced by anthropogenic activity, and these assumptions should be further investigated by additional sampling.

Slatkin in his 1981 paper gave proof that average allele frequency in certain population is approximately independent to processes of mutation and selection, but are highly dependent to process of gene flow, and he formulated the index M that reflects pairwise migration rate between populations. The most interesting result in this analysis is the fact that shows almost complete absence of migration between Illyric populations and other populations that inhabit continental basin of Balkan Peninsula indicating that Dinaric Alps have acted as efficient barrier to gene flow. Though, occurrence of haplotype LD6 in population 65 may indicate that some rate of exchange have is being established, either due to the anthropogenic movement or even more intriguing, it may indicate that the role of barrier of Dinaric Alps is weakening due to ongoing global climate change and altitudinal shift of gypsy moth range.

Use of nuclear markers are suggested in order to verify the results of this study, and further sampling in areas of Illyric coast, Dinaric Alps, Aegean coast and Asia Minor in the future investigations should contribute to clarification of some uncertainties of phylogenetic reconstruction. Moreover, accumulation of such phylogeographic data would result in

generation of robust base for efficient monitoring and detection of migration pathways of this dangerous forest pest.

KEY WORDS: *Lymantria dispar*, outbreaks, genetic diversity, phylogeographic structure, climate change, range shift, forests of Europe

SADRŽAJ

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA	I
BASIC DOCUMENTATION CARD	II
POPIS TABLICA	III
POPIS SLIKA.....	V
SAŽETAK.....	VIII
EXTENDED ABSTRACT	IX
1 UVOD	1
1.1 Gubar - <i>Lymantria dispar</i> (Linneaus, 1785)	1
1.1.1 Taksonomija	2
1.1.2 Rasprostranjenost	3
1.1.3 Biologija	5
1.1.4 Biljke domaćini	10
1.1.5 Štetnost i gradacije.....	13
1.1.6 Prirodni neprijatelji.....	17
1.1.7 Migracija i širenje	18
1.1.8 Unutarvrсна varijabilnost	20
1.2 Šume Europe	22
1.3 Evolucija, filogeografija i molekularna ekologija	24
1.4 Molekularni pristupi u filogeografiji.....	27
1.4.1 Genetički biljezi	27
1.4.2 Mitohondrijska DNA	28

1.5 Postglacijalna rekolonizacija i biogeografija Europe.....	29
1.5.1 Paradigme obrazaca rekolonizacije	32
1.5.2 Biogeografska klasifikacija Europe	33
1.6 Hipoteze, implikacije na zaštitu šuma i ciljevi istraživanja.....	34
2 MATERIJALI I METODE	37
2.1 Institucije u kojima je provedeno istraživanje.....	37
2.2 Sakupljanje uzoraka.....	37
2.2.1 Lokaliteti sakupljanja	37
2.2.2 Metoda sakupljanja i čuvanja uzoraka	38
2.3 Laboratorijske analize metodama molekularne biologije.....	39
2.3.1 Ekstrakcija DNA i kodiranje uzoraka.....	39
2.3.2 Lančana reakcija polimerazom – PCR.....	42
2.3.3 Elektroforeza u agaroznom gelu, pročišćavanje i sekvenciranje.....	42
2.4 Analiza sekvenci i obrada podataka.....	43
2.4.1 Molekularno filogenetička analiza	44
2.4.2 Populacijsko genetički parametri i analiza geografske strukture.....	45
2.4.3 GIS, objektivno grupiranje i vizualizacija rezultata.....	46
3 REZULTATI I RASPRAVA.....	47
3.1 Obrada DNA sekvenci, molekularno filogenetička rekonstrukcija i genska raznolikost.....	47
3.1.1 Pridobivanje, verifikacija i sravnjivanje sekvenci.....	47
3.1.2 Populacijsko genetički pokazatelji i vizualizacija raznolikosti gena.....	59
3.1.3 Analiza filogeografske strukture i AMOVA	64
3.1.4 Analiza indeksa M, relativnog pokazatelja migracije između populacija	69

4	ZAKLJUČCI	77
5	LITERATURA	80
6	PRILOZI	95
6.1	<i>Prilog 1: Novi Europski tipovi šuma (eng. New European Forest Types) prema izvješću Forest Europe (2011).....</i>	<i>95</i>
6.2	<i>Prilog 2. Karta rasprostranjenosti hrasta lužnjaka na području Europe</i>	<i>96</i>
6.3	<i>Prilog 3. Primjer vizualizacije produkata amplifikacije elektroforezom u agaroznom gelu.....</i>	<i>98</i>
6.4	<i>Prilog 4. Nukleotidni nizovi haplotipskih sekvenci determiniranih u istraživanju...</i>	<i>99</i>
6.5	<i>Prilog 5. Rezultati testiranja najboljeg supstitucijskog modela nukleotidne supstitucije u programu jModeltest.....</i>	<i>129</i>
6.6	<i>Prilog 6. Matrica p-udaljenosti između parova haplotipova.....</i>	<i>130</i>

1 UVOD

1.1 Gubar - *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1785)

Gubar je leptir taksonomski smješten u porodicu Erebidae (do 2006. godine bio je smješten u Lymantriidae; prelcu gubari). Naziv vrste „dispar“ koji u prijevodu znači „različit“ dobio je zbog izraženog spolnog dimorfizma u stadiju imaga, a hrvatski naziv „gubar“ dobio je po karakterističnom izgledu jajnih legala koja na površini debala podsjećaju na gube (Kovačević 1956, Klein 1994).

Kao polifagni leptir sposoban obrstiti velike površine šuma, gubar je u Hrvatskoj, a i drugim zemljama Balkanskog poluotoka, od 20-ih godina prošlog stoljeća izazivao veliku pozornost jer je uz pepelnicu (*Erysiphe alphitoides* Griffon i Maublanc) smatran jednim od glavnih čimbenika propadanja hrastovih šuma (Pernek i Pilaš 2005). Štete se izravno očituju kroz gubitak prirasta zbog defolijacije mladog lista, nakon čega drugi list gotovo redovito biva upropašten napadom pepelnice (*E. alphitoides*). Nakon takvog razvoja događaja fiziološki oslabljenja hrastova stabla počinju napadati sekundarni štetnici (npr. *Agrilus biguttatus*) i bolesti koji ubrzavaju proces njihova sušenja (Kovačević 1956, Klein 1994).

Defolijacija, kao posljedica hranjenja gusjenica gubara, dovodi do gubitka prirasta od 30% (čak i 40%) (Klepac i Spaić 1965, Klepac 1966). Poznato je da defolijacija od 25-40% dovodi iste godine do gubitka prirasta od 12 do 20% dok je pri defolijaciji od 50-90% gubitak prirasta 35-70%, a slični su gubici i pri totalnoj defolijaciji. Relativno velike diskrepancije u gubicima prirasta nastaju zbog razlika u razini kompenzacijskih reakcija na defolijaciju kao rezultat općeg fiziološkog stanja stabala i kvaliteti stanišnih uvijeta (Klein 1994). Najizraženija i najopasnija šteta nastaje pri uzastopnim defolijacijama pa tako defolijacija u dvije uzastopne godine može dovesti do sušenja 27% stabala (Klein 1994).

Posljedice defolijacija stoga uzrokuju izravne ekonomske štete bilo da se radi o smanjenju prirasta ili sušenju šuma, a ne manje važni su i troškovi koji nastaju pri organizaciji i provedbi suzbijanja gradacija gubara koji su redovito u milijunskim iznosima (Margaletić i dr. 2007, McManus i Csóka 2007, Wallner 1997). Osim izravnih ekonomskih šteta nastalih gubicima drvne mase i troškovima tretiranja koje se relativno lako kvantificiraju, značajne štetne posljedice gradacija su i ekološki utjecaji na šumski ekosustav pa i čovjeka. U doba gradacija povećana je opasnost utjecaja otrovnih dlačica sa mladih gusjenica koje uzrokuju alergijske reakcije na koži i dišnim organima životinja i ljudi. Upravo zbog te opasnosti napadnute šume

ponekad su zatvarane za rekreacijske aktivnosti (McManus i Csóka 2007). Nadalje, prisutnost velikog broj kukuljica pospješuje razvoj sitnih glodavaca kao prirodnih neprijatelja koji na taj način barem djelomično reguliraju gradacije, međutim rezultirajuće velike populacije sitnih glodavaca povećavaju pojavnost Limske borelioze (Jones i dr. 1998). Mnogi stručnjaci smatraju da bi djelovanje gradacija na ekološke odnose moglo imati još dalekosežnije posljedice na šumske ekosustave od izravnih ekonomskih šteta, no zbog kompleksnosti ekoloških odnosa u šumskim ekosustavima takve je utjecaje teško kvantificirati.

1.1.1 Taksonomija

Pod nazivom *Phalaena dispar*, gubara kao vrstu prvi je opisao Linnaeus 1758 godine. Uslijedila je komplicirana sistematika obilježena opisima pod raznim imenima i taksonomskim klasifikacijama kroz povijest i geografsko područje pronalaska. U početku uglavnom na temelju morfoloških karakteristika, a kasnije i primjećениh razlika u letačkim sposobnostima ženki, sistematičari su kroz povijest, uglavnom na temelju geografske pripadnosti, predlagali raščlambe u razne rase i podvrste, od kojih je najupečatljivija raščlamba na Europski (*L. dispar dispar*), Azijski (*L. dispar asiatica*) i Japanski (*L. dispar japonica*) te Indijski gubar (*L. obfuscata*) (Pogue i Schaefer 2007, Schintlmeister 2004). Neke dileme varijabilnosti unutar vrste pa i roda razriješene su istraživanjima metodama molekularne biologije. Upotrebom mitohondrijske DNA (mtDNA) rezriješene su nedoumice oko konspecifičnosti Indijskog gubara (*L. obfuscata*) te je dokazano da se radi o posebnoj vrsti (Ball i Armstrong 2006). Razlučivanje na Europske i Azijske podvrste posebno je potaknuto uočenim razlikama u letačkim sposobnostima ženki, pri čemu jedinke iz Azijske podvrste imaju sposobnost leta dok Europske nemaju (Keena i dr. 2008). To je etološki značajna razlikovna osobina i molekularno genetičkim metodama pokušava se razviti pouzdan dijagnostički alat kojim bi se moglo delimitirati jedinke na temelju korelacije između molekularnog biljega i etološke osobine (deWaard i dr. 2010).

Na temelju unutarvrstne varijabilnosti na genskoj razini, kontemporalna geografska struktura na globalnoj razini upotrebom mtDNA barkod biljega razlučena je u tri osnovne grupe: Istočnoazijsku, Europsku sa zapadnoazijskom te Sjeverno Američku (deWaard i dr. 2010), što je u skladu sa dosadašnjom sistematskom podjelom (Pogue and Schaefer 2007). Spoznaje o filogeniji baziranoj na molekularnim biljezima, u kombinaciji sa klasičnim morfološkim karakteristikama dovele su i do preslagivanja na višim taksonomskim razinama pa je tako u

reviziji nadporodice Noctuoidea, podporodica Lymantriinae, u koju spada i rod *Lymantria*, pripojena u porodicu Erebidae (Lafontaine i Fibiger 2006). Diskusija o sistematici na svim taksonomskim razinama posebno se intenzivirala povećanjem spoznaja proizašlih iz modernih molekularno filogenetičkih istraživanja i nastavlja biti vrlo dinamična za sve istraživane organizme pa tako i za gubara.

Današnja taksonomska klasifikacija gubara od razine reda je slijedeća:

Red: Lepidoptera

Porodica: Erebidae (do 2006 Lymantriidae)

Podporodica: Limantriinae

Rod: *Lymantria*

Vrsta: *Lymantria dispar* (Linnaeus 1785)

1.1.2 Rasprostranjenost

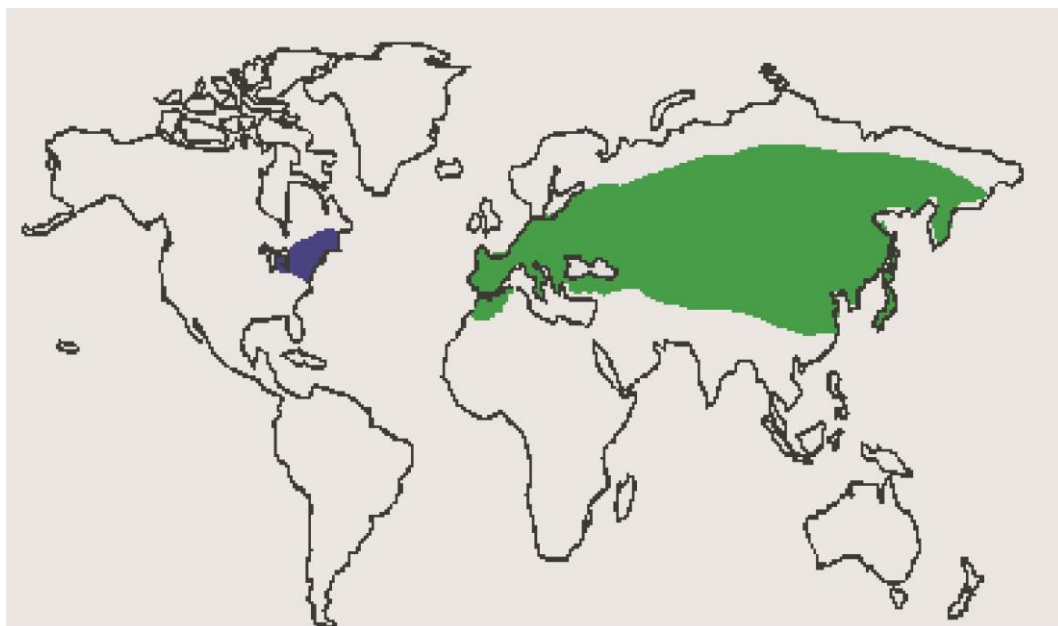
Gubar (*Lymantria dispar* Linnaeus 1758) je jedan od najznačajnijih šumskih defolijatora sposoban za epidemijske gradacije na čitavom području umjerene holarktičke zone. Prirodno je rasprostranjen u Europi, Aziji i sjevernim dijelovima Afrike, između 30° i 60° sjeverne geografske širine (Keena i dr. 2008, Kovačević 1956, Pogue i Schaefer 2007) (Slika 1). Sjevernom granicom areala u Europi smatra se Litva (Zolubas i dr. 2001) iako Klein (1994) navodi da se sjeverna granica prostire od središnje Švedske prema Moskvi te da se areal gubara u posljednjim godinama proširio prema sjeveru. Vertikalno rasprostranjenje na sjevernim dijelovima Balkanskog poluotoka seže do 1600 m nadmorske visine, pri čemu se iznad 1000 m n.v. ne pojavljuje masovno, dok je u Njemačkoj prisutan samo u područjima do 500 m n.v. (Klein 1994).

Iako je još 1868. godine ljudskom nepažnjom dospio u šumske sastojine, i danas se u Sjevernoj Americi smatra invazivnom karantenskom vrstom jer se kontinuirano širi prema zapadu i jugu, invadirajući tako konstantno u nova područja (Forbush i Fernald 1896, McManus i Csóka 2007, Pogue i Schaefer 2007). Specifična biologija gubara čini ga

pogodnim za antropogena širenja globalnim tokovima robne razmjene pa je tako introducirani teretnim brodovima na zapadnu obalu Sjeverne Amerike, no ta introdukcija za koju se upotrebom molekularnih biljega dokazalo da se radi o azijskim haplotipovima, uspješno je iskorijenjena aviotretiranjima (Bogdanowicz i dr. 1993, Nealis i Erb 1993).

Nadalje, fitosanitarnim pregledima potvrđena je introdukcija jajnih legala gubara na uvezenim vozilima u Novi Zeland (Armstrong i dr. 2003), gdje je zaraza također uspješno iskorijenjena, a i dalje se provode intenzivne mjere nadzora na brodovima iz rizičnih i visoko rizičnih polazišta (Ministry of Primary Industries, online 13.01.2015).

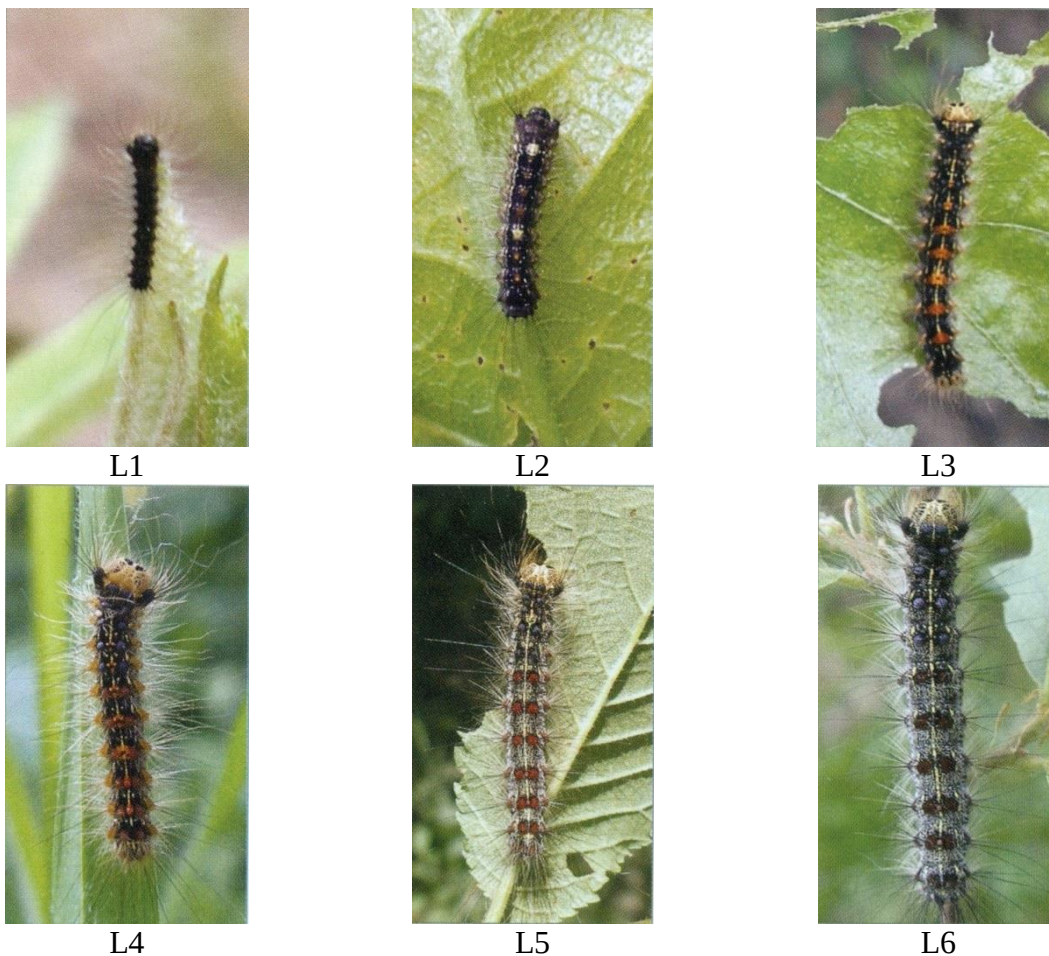
Imajući u vidu polifagni karakter ovog štetnika, areal gubara uglavnom je određen klimatskim faktorima što se ponajprije odnosi na temperaturne zahtjeve (Karolewski i dr 2007). Modeliranjem rasta temperatura na području Europe u skladu sa globalnim klimatskim promjenama ustanovljeno je da će doći do pomicanja granica za gubara pogodnih temperaturnih uvijeta prema sjeveru, dok će istovremeno doći do pomicanja južnih granica areala zbog porasta temperature iznad granica gubarove ekološke valence (Hlásny i Turcány 2008, Vanhanen i dr. 2007). To bi za posljedicu imalo pomicanje areala gubara od 100 do 900 km na sjever što bi moglo dovesti do migracije južnih populacija prema sjeveru. Priritom je važno uvidjeti i da bi, osim horizontalnih, istodobno došlo i do pomicanja visinskih granica koje posljedično mogu ukinuti ulogu planinskih lanaca (ili dijelova lanaca) kao migratornih barijera.



Slika 1. Prikaz današnjeg geografskog rasprostranjenja gubara. Zelenom bojom prikazana su područja autohtonog areala, a plavom invadirano područje u sjevernoj americi. Preuzeto od sa www.na.fs.fed.us (US Forest Service).

1.1.3 *Biologija*

Gubar je striktno univoltina vrsta sa obligatnom zimskom diapauzom u stadiju jaja, u kojem po završetku embrionalnog razvoja ličinka do eklozije hibernira unutar jajne ovojnice (Pogue i Schaefer 2007). Eklozija mladih gusjenica događa se tijekom proljeća (najčešće tijekom travnja i svibnja) kada se kratko zadržavaju na jajnom leglu (tzv. „gubar na ogledalu“) pri čemu često pojedu jajnu ovojnicu iz koje su netom izišle. Zatim se penju u krošnju u potrazi za hranom i često šire nošene vjetrom (tzv. „balooning“) u potrazi za pogodnim domaćinom (Deml i Dettner 1995; Mason i McManus 1981). Tijekom razvoja u trajanju od oko 70 dana gusjenice prolaze kroz četiri do pet, a ženke i do sedam razvojnih stadija, pri čemu morfološki prilično variraju (Grijpma 1989, Kovačević 1956, Lukić 2012, Mihajlović 2008) (Slika 2).



Slika 2. Gusjenice gubara u različitim razvojnim stadijima (iz Mihajlović 2008).

Mlade gusjenice (L1) su jednobožno crne sa crnom sjajnom glavom i na svakom segmentu imaju bradavice sa dugačkim crnim aerostatičkim dlačicama, a na leđnim bradavicama osim aerostatičnih imaju i kratke žarne dlačice povezane sa otrovnom žlijezdom (Kovačević 1956, Mihajlović 2008). Duge aerostatične dlačice omogućuju gusjenicama da se održavaju u zraku pri čemu ih vjetar može raznositi i nekoliko desetaka kilometara od mjesta izlijezanja. Otrovnne dlačice se već kod samog kretanja gusjenice i kod dodira otkidaju i ako padnu na kožu životinja ili čovjeka mogu izazvati kratkotrajnu upalu kože i svrbež (Kovačević 1956, Mihajlović 2008). Prosječna širina kapsule glave iznosi 0,6 mm, a srednja dužina prije presvlačenja 6,8 mm (Mihajlović 2008).

Gusjenice drugog stadija (L2) imaju kapsulu glave crne boje no ona više nije sjajna, a na tijelu nestaju žarne dlačice. Na prva četiri trbušna segmenta javljaju se parne bradavice, na petom ih nema, a na šestom i sedmom su neparne i krupnije. Sve su bradavice iste boje. Na

petom trbušnom segmentu javlja se zvjezdasta žuta pjega. Prosječna širina kapsule glave iznosi 1,2 mm, a srednja dužina prije presvlačenja 10,5 mm (Mihajlović 2008).

Karakteristične morfološke osobine gusjenice poprimaju od trećeg stadija (L3). Kapsula glave dobiva žučkastu boju, prvih pet pari leđnih bradavica dobiva plavu boju, a ostalih šest pari crvenu izuzev preanalnog segmenta na kojem su bradavice plave boje. Na leđima i bokovima javljaju se uzdužne svijetle pruge, a sama koža ostaje pretežno crna. Prosječna širina kapsule glave iznosi 2,0 mm, a srednja dužina tijela prije presvlačenja 16,8 mm (Mihajlović 2008).

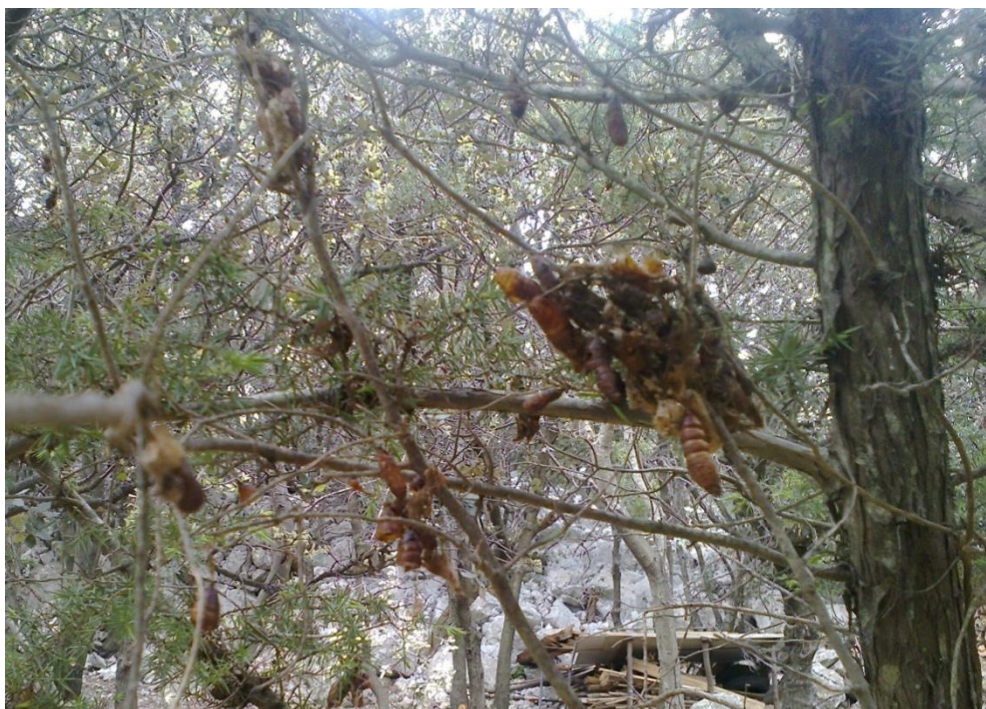
U četvrtom stadiju (L4) kapsula glave ostaje pretežno žuta sa izraženim karakterističnim linijama u obliku obrnutog slova V. Koža postaje svjetlija zbog pojave mnogobrojnih uskih sivih pjega. Prosječna širina kapsule glave iznosi 3,3 mm, a srednja dužina tijela prije presvlačenja 23,7 mm (Mihajlović 2008).

U petom stadiju (L5) kapsula glave postaje tamnija zbog pojave mnogobrojnih grupica tamnih pjega na tjemenu i obrazima. Koža postaje svjetlija jer se spomenute svjetlosive pjegice sve više javljaju i na prednjem dijelu tijela. Kapsula glave postaje šira od torakalnih segmenata i prosječno iznosi 4,5 mm, a srednja dužina tijela prije presvlačenja 43 mm (Mihajlović 2008).

Gusjenice šestog stadija (L6) gotovo isključivo su ženke. Kapsula glave postaje još tamnija zbog sve više grupica tamnih pjega. Prosječna širina kapsule glave iznosi 6 mm, a srednja dužina tijela prije presvlačenja odnosno kukuljenja iznosi 70 mm (Mihajlović 2008).

Opisani broj stadija predstavlja najčešći razvojni ciklus gusjenica gubara uz postojanje rijetkih odstupanja pa tako ženke ponekad mogu imati i sedmi ili čak osmi stadij (Kovačević 1956, Lukić 2012, Mihajlović 2008). Gusjenice su aktivne uglavnom noću dok se preko dana spuštaju u sjenovite i skrovite dijelove krošnje, kao što su naličja lišća i pazuši izbojaka ili grana, gdje se često skupljaju u grupe, a pojava diurnalnog hranjenja gusjenica smatra se pokazateljem progradacijske faze (Pogue i Schaefer 2007, Vasić 1981).

Po završetku razvoja gusjenice kratko ulaze u stadij pretkukuljice te se nakon dan ili dva kukulje (i to često u grupama) na mjestima koja su tijekom stadija gusjenica korištena kao dnevna skrovišta (Slika 3). Kukuljice mužjaka prosječno su duge oko 20 mm, a ženki oko 30 mm i značajno krupnije, a veličina im ovisno o fazi gradacije značajno varira na način da su u fazi latencije i progradacije krupnije a u fazi retrogradacije značajno manje. Kukuljica je tamnosmeđe boje i pokrivena pravilno raspoređenim čupercima žutih dlačica (Kovačević 1956, Mihajlović 2008).



Slika 3. Grupe kukuljica u prilično obrštenoj krošnji šmrike (*Juniperus oxycedrus*) u sastojini hrasta crnike na Cresu.

Leptiri se roje sredinom ljeta pri čemu redovito dolazi do protandrije, a u stadiju imaga uočljiv je spolni dimorfizam (Slika 4).



ženka



mužjak

Slika 4. Gubar u razvojnem stadiju imaga sa izraženim spolnim dimorfizmom (iz Mihajlović 2008). Ženka je znatno krupnija od mužjaka.

Ženke imaju blijedožuto, gotovo bijelo zdepasto tijelo dužne oko 3 cm. Krila su im raspona 5 – 8 cm, žućkasto-bijela sa tamnim valovitim linijama koje su katkad razvijene samo do pola. Na vanjskom rubu oba para krila nalaze se tamne crtičave točke. Ticala su im kratko

nazubljena i crna. Na kraju zatka nalazi se čuperak blijedosmeđih dlačica kojima ženke prekrivaju jajna legla.

Mužjaci su sivo-smeđi, vitkijeg tijela dužine oko 1,5 cm. Prednja krila su raspona 3,5 – 5 cm, tamnije smeđo-siva i na njima se nalaze tri uske tamne valovite linije od kojih je prva vanjska linija dvostruka sa svjetlijim dijelom između njih. Stražnja krila su na vanjskom rubu nešto tamnije obrubljena. Ticala su mu široko dvostruko češljasta i boje tijela.

Gubar se u stadiju imaga ne hrani, a usni aparat za sisanje inače tipičan za leptire kod gubara je jako zakržljao (Klein 1994).

Rojenje traje do sredine ljeta nakon čega ženke odlažu jaja formirajući karakteristična ovalna jajna legla prekrivena abdominalnim dlačicama (Slika 5).



Slika 5. Ženke polažu jaja i pokrivaju ih zatkalnim dlačicama formirajući tako karakteristična jajna legla, lijevo: grupimično jajno leglo na deblu hrasta crnike (*Q. ilex*) na Cresu; desno: ženke polažu grupimično jajno leglo (iz Mihajlović 2008).

Jaja su smeđe-siva i okrugla, a ženka ih nakon oplodnje odlaže u gomilici koju prekrije sa zatkalnim dlačicama formirajući tako karakteristična jajna legla u kojima obično ima 300 – 600 jaja, ali ih u doba progradacije može biti i preko 1000, dok ih u doba degradacije može biti 20 – 200 (Kovačević 1956, Klein 1994, Mihajlović 2008). Kovačević (1956) također navodi da je kod gubara zabilježena partenogeneza iako ta pojava kod gubara nije značajna jer

obično dolazi do protandije, a jedan užjak može oploditi više ženki. Jajna legla često su formirana u blizini mjesta gdje su ženke izišle iz kukuljice i nagomilana jedna do drugih te je zbog karakterističnog izgleda po njima ova vrsta dobila narodni naziv u mnogim zemljama. Embrionalni razvoj traje oko 3-4 tjedna i završava uglavnom sredinom listopada, no gusjenice ulaze u dijavauzu još unutar jajne ovojnice i tako prezimljuju do slijedećeg proljeća (Kovačević 1956, Pogue i Schaefer 2007). Za normalan postembrionalni razvoj gubara nužan je period hladnoće, a za vrijeme zimske dijavauze u stadiju jaja gubar može izdržati i kratkotrajne temperature do -70°C (Klein 1994).

1.1.4 Biljke domaćini

Gubar je visoko polifagan defolijator koji čini štetu u stadiju gusjenice kada se gregariosno hrani na više od 300 vrsta biljaka domaćina, uglavnom listača ali i četinjača (Alalouni i dr. 2013, Elkinton i Liebhold 1990, Grijpma 1989). Unatoč visokom stupnju polifagnosti, dokazano je postojanje preferencija u izboru domaćina koja znatno varira ovisno o regionalnoj i lokalnoj kompoziciji vegetacije (Alalouni i dr. 2013, Lechowicz i Mauffette 1986).



Slika 6. Gusjenice tijekom razvoja koji traje oko 70 dana pojedu veliku količinu lista te su u vrijeme gradacije sposobne uzrokovati golobrst na velikim površinama šuma.

Lechowicz i Mauffette (1986) u istraživanju preferencija ličinaka gubara pri izboru domaćina navode vrste iz rodova *Larix*, *Salix*, *Populus*, *Betula*, *Alnus*, *Ostrya*, *Fagus*, *Quercus*, *Castanea*, *Amelanchier*, *Crataegus*, *Prunus*, *Sorbus*, *Malus* i *Tilia* kao očito preferirane vrste u Europi i Sjevernoj Americi. Nadalje navode Sjevernoameričke vrste iz rodova *Maclura*, *Morus*, *Liriodendron*, *Platanus*, *Gleditsia*, *Robinia*, *Gymnocladus*, *Ilex*, *Diospyros* i *Catalpa* kao izbjegavane. Konačno za vrste iz rodova *Pinus*, *Abies*, *Picea*, *Juniperus*, *Acer*, *Juglans*, *Fraxinus*, *Carpinus*, *Celtis*, *Cornus*, *Ulmus* i *Thuja* navode da preferencija može varirati od prihvatljivih do izbjegvanih unutar roda.

Liebhold i dr. (1995) navode preko 400 vrsta biljaka potencijalnih domaćina, od čega 148 visoko osjetljivih. Generalno se rod *Quercus* (Fagaceae) čini najpogodnijom skupinom domaćina, a slijede ga *Salix* (Salicaceae) i *Crataegus* (Rosaceae) (Pogue i Schaefer 2007).

Lista domaćina u Europi donekle ovisi o tome kako distribucija gubara korespondira sa dominirajućom vegetacijom. U Španjolskoj, Portugalu i na Sardiniji najzastupljeniji pogodni domaćin je hrast plutnjak (*Q. suber*), a u južnim dijelovima Francuske i u mediteranskim sastojinama Balkanskog poluotoka najčešći domaćini su hrast plutnjak (*Q. suber*), hrast medunac (*Q. pubescens*) i hrast crnika (*Q. ilex*). U sjevernim dijelovima Europe najčešći domaćini su breze (*Betula*) i johe (*Alnus*), dok se u ostatku Europe distribucija gubara uglavnom povezuje sa do sedam vrsta hrastova, posebno lužnjakom (*Q. robur*), cerom (*Q. cerris*) i kitnjakom (*Q. petraea*), od kojih je kitnjak najmanje preferiran. U centralnoj Europi obični grab (*Carpinus betulus*) često čini visok udio u smjesi hrastovih sastojina i smatran je jednako preferiranim domaćinom kao i vrste iz rodova topola (*Populus*), joha (*Alnus*) i vrba (*Salix*). U Mađarskoj i Slovačkoj gubar često defolira sastojine bagrema (*Robinia pseudoacacia*), iako u SAD-u ova vrsta nije smatrana pogodnim domaćinom. Iznimka uske povezanosti gubara i hrastovih sastojina u Europi javlja se u delti Dunava u Rumunjskoj gdje sastojine vrba (*Salix* spp.) i topola (*Populus* spp.) služe kao povoljan domaćin za gusjenice gubara (Alalouni i dr. 2013, McManus i Csóka 2007). Detaljnije karte areala važnijih vrsta šumskog drveća na području Europe mogu se preuzeti na mrežnim stranicama EUFORGEN (European Forest Genetic Resources Programme; <http://www.euforgen.org>), a u sklopu ovog rada prikazana je karta distribucije hrasta lužnjaka (Prilog 2) kao jedne od najvrijednijih europskih vrsta šumskog drveća na listi za gubara vrlo pogodnih domaćina (Alalouni i dr. 2013).

Podobnost domaćinina dodatno je uvjetovana folijarnom fenologijom biljke i dostignutim razvojnim stadijem gusjenica, budući da se eklozija gusjenica može predvidjeti na temelju sume temperatura dok se listanje biljaka predviđa kombinacijom sume temperatura i duljine fotoperioda (Alalouni i dr. 2013, Lechowicz i Mauffette 1986). Važnost poklapanja eklozije i prolistavanja dolazi do izražaja zbog činjenice da različite vrste prolistavaju u različito vrijeme te zbog činjenice da nutritivna vrijednost mladog lišća rapidno opada u prvih nekoliko tjedana ontogenije lista (Hough i Pimentel 1978). Nadalje, odnedavno je poznato i da je za grizenje tvrdog višegodišnjeg lišća potrebna veća izdržljivost mandibula (Acevedo i dr. 2014), što bi moglo biti od značaja kod domaćina sa zimzelenim i višegodišnjim lišćem, kao što je to bio slučaj u pokusu hranjenja gusjenica gubara mladim i višegodišnjim lišćem hrasta crnike (Slika 7) u Hrvatskoj (*Q. ilex*) (Lukić 2012). Lechowicz i Mauffette (1986) diskutiraju da bi problem poklapanja i nepoklapanja eklozije gusjenica sa folijarnom fenologijom biljaka moglo djelovati stimulirajuće na održanje polifagnog karaktera gubara,

rezonirajući da, zbog mogućih varijacija u nastupanju eklozije i prolistavanja te uz visoko stohastičan karakter disperzije vjetrom, gusjenice koje ne bi tolerirale širok spektar domaćina vjerojatno ne bi preživjele.



Slika 7. Mladi list hrasta crnike (*Q. ilex*) u prolistavanju znatno je mekša i kvalitetnija hrana za mlade gusjenice gubara od kožastog višegodišnjeg lista na kojem se mlade gusjenice uglavnom nemogu uspješno razviti (Lukić 2012).

1.1.5 Štetnost i gradacije

Tijekom gradacije, gusjenice gubara sposobne su defolirati velike površine šuma, ali i urbano zelenilo i poljoprivredne (uglavnom voćarske) kulture, uzrokujući pritom velike ekološke i socio-ekonomske štete.

Štete se očituju kroz izravni gubitak prirasta koji ovisno o intenzitetu defolijacije može biti od 30 do 70% (Klepac i Spaić 1965, Klein 1994). Najštetnije posljedice napada gubara javljaju se pri uzastopnim defolijacijama pa tako nakon dva uzastopna golobresta u hrastovim sastojinama dolazi do sušenja 27% stabala (Klein 1994).

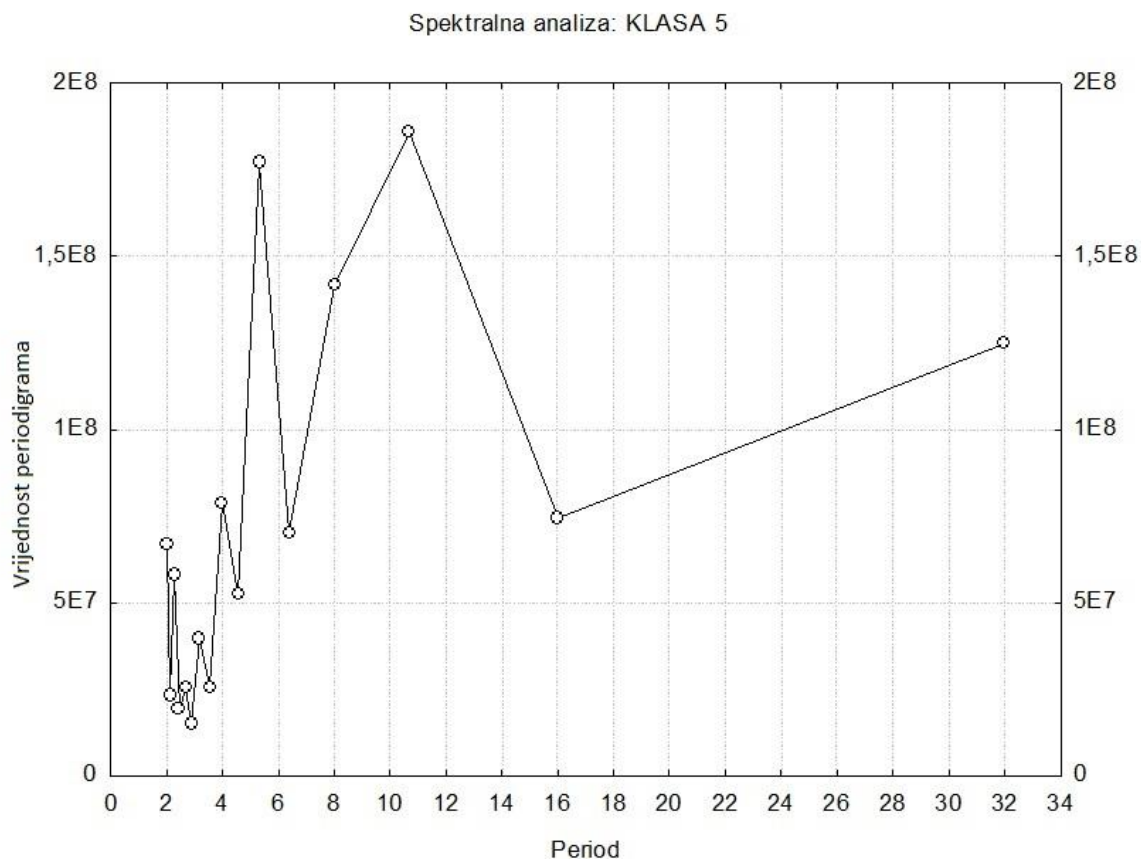
Ekonomske štete očituju se i kroz troškove koji nastaju pri organizaciji i provedbi mjera suzbijanja koji su redovito u milijunskim iznosima (Margaletić i dr. 2007, Mcmanus i Csóka

2007). U svrhu odlučivanja o potrebi provođenja mjera suzbijanja razvijen je sustav određivanja kritičnih brojeva. Metoda se provodi brojanjem stabala i grmova na transektu kroz sastojinu na kojima je pronađeno barem jedno jajno lego, a zatim se broj „pozitivnih“ stabala podijeli sa ukupnim brojem stabala u sastojini te se na temelju toga dobivaju intenziteti zaraze (Vasić 1981). Ti su intenziteti (klase napada) poredani u 5 klasa: < 1% (klasa 1); 1-5% (klasa 2); 5-20% (klasa 3), 20-50% (klasa 4), >50% (klasa 5). Također se Dodatno se iz sastojine uzimaju uzorci jajnih legala u kojima se određuje broj jaja po leglu i njihova parazitiranost te se na temelju svih tih podataka određuje se prelazi li broj jaja po stablu kritični broj, odnosno minimalni broj jedinki potreban za golobrst te se postavlja konačna prognoza napada i donosi odluka o provedbi suzbijanja (Pernek i Pilaš 2005). Kritični brojevi variraju ovisno o starosti sastojine i ukupnoj količini lišća u krošnji pa su za potrebe prognoza predloženi kritični brojevi u odnosu na starost stabala (sastojine) i u odnosu na prsni promjer stabala (Vasić 1981).

Nadalje, prilikom prenamnoženja povećana je opasnost da otrovne dlačice mladih gusjenica uzrokuju alergijske reakcije na koži i dišnim organima životinja i ljudi, a povećanjem broja sitnih glodavaca kao posljedice obilja kukuljica koje su im prikladna hrana, povećava se opasnost od širenja zoonoza kao što je npr. Limska borelioza (Kovačević 1956, Klein 1994, Jones i dr. 1998).

Neki od najranijih izvještaja o štetama od gubara datiraju još od 17. stoljeća, u Španjolskoj 1600-ih, u Njemačkoj 1750-ih, u Mađarskoj 1840-ih i u Francuskoj 1880-ih (McManus i Csóka 2007). No štetnost gubara nije jednako kvalificirana na cijelom području Europe, a generalno se štete od gubara u Europi povećavaju od zapada prema istoku i od sjevera prema jugu (McNamara 1996). Tako se, bez obzira na dugovječnu prisutnost i pojave gradacija na području centralne Europe (Bogenschutz i dr. 1989, Grijsma 1989), u Njemačkoj kao centralnoeuropskoj zemlji gubar ne smatra značajnim šumskim štetnikom (McManus i Csóka 2007). Isti autori navode da se najveće štete javljaju na području Balkanskog poluotoka što objašnjavaju kao posljedicu veće prisutnosti hrastovih sastojina te višim temperaturama i manjoj vlažnosti kao klimatskim faktorima koji pozitivno utječu na larvalni razvoj gubara. Slično su zaključili i Pernek i Pilaš (2005) koji su dokazali korelaciju između pojave gradacije i povećane temperature u proljetnim mjesecima na području kontinentalnih šuma u Republici Hrvatskoj.

O štetnosti gubara na području Balkanskog poluotoka govore mnogobrojni zapisi iz raznih zemalja. U Grčkoj se navodi podatak o defolijaciji gotovo 1,5 milijuna ha hrastovih šuma i 3,1 milijuna ha vazdazelenih ekosustava (Avtzis 2001). U Rumunjskoj je 1988. godine 600.000 ha tretirano za kontrolu gubara. U Srbiji je od 1862. do 1998. zabilježeno 16 gradacija a 1997. tretirana je površina od 500.000 ha šuma, dok je u Mađarskoj od 1843. do 2007. zabilježeno 22 gradacije sa maksimumom od 212.000 ha napadnutih šuma 2005. godine (McManus i Csóka 2007). U Hrvatskoj se u periodu od 1970. do 2004. pojava jakih gradacija gubara događala u prosjeku svakih 10-11 godina (Slika 8), a najveća gradacija zabilježena je 1973. na površini većoj od 35.000 ha (Kovačević 1956, Pernek i Pilaš 2005). U analizi gradacije gubara 2005. na području Hrvatske ustanovljeno je da su samo troškovi suzbijanja bili veći od 6 milijuna kuna (Margaletić i dr. 2007), a na suzbijanje posljednje jake gradacije koja je počela 2013. i nastavila se kroz 2014. godinu na površini od oko 30.000 ha također su utrošena značajna sredstva (IPP 2013). Ne treba izostaviti ni potencijalno negativan utjecaj gubara na zdravlje ljudi u smislu urtikarijskih reakcija u kontaktu sa otrovnim dlačicama mladih gusjenica, zbog kojih je na primjer u Bugarskoj tijekom gradacije 1996-1997. nekoliko šumskih područja bilo zatvoreno za rekreacijske aktivnosti (BIO Intelligence Service 2012).



Slika 8. Rezultati analize periodiciteta gradacija Klase 5 (>50% intenziteta zaraze šumskih sastojina) prikazuju maksimum pri periodu 10,6 godina (prema Pernek i Pilaš 2005).

U Europi kao autohtonom području rasprostranjenja, za gubara su karakteristične periodičke gradacije populacija tijekom kojih gusjenice uzrokuju golobrst na velikim površinama šuma, plantažama pa i poljoprivrednim kulturama i urbanom zelenilu (Alalouni i dr. 2013, Hrašovec i Harapin 1999, Kovačević 1956, McManus i Csóka 2007, Pernek i dr. 2008). Gradacije se u Europi javljaju sinkronizirano na velikim površinama, što se može interpretirati kao primjer Moranovog efekta (Hudson i Cattadori 1999, Myers 1998). Tako su gradacije u razdoblju od 1990 do 1995 zabilježene u 16 europskih zemalja, a u istom su razdoblju slabije gradacije zabilježene čak i u Engleskoj gdje su klimatski uvjeti razmjerno nepovoljni za razvoj gubara (Alalouni i dr. 2013). Bez obzira na otkrivene sinkronizacije na području Europe, značajne regionalne razlike očituju se u periodicitetu gradacija. Na području centralne Europe vrijeme između dviju gradacija varira između sedam i 10 godina, dok se gradacije u mediteranskom području javljaju u period od tri do četiri godine (Alalouni i dr. 2013). Ti su podaci u skladu sa nalazima iz Hrvatske gdje su primjećene razlike u fluktuacijama gradacija gubara između

kontinentalnih i mediteranskih šuma, na način da gradacije nisu bile sinkronizirane te su se u mediteranskom dijelu događale češće (Lacković i dr. 2015, Pernek i Pilaš 2005).

Globalno najveće štete od gubara zabilježene su na području Sjeverne Amerike gdje se gubar smatra naročito razornom invazivnom vrstom kukca koji devastira šumske sastojine i ornamentalna stabla, pogotovo hrastova. Prosječna godišnja površina defoliranih šuma u Sjedinjenim Američkim državama tijekom 25 godina, u periodu od 1970 do 1995, prelazila je 500.000 ha, uz najveće zabilježene defolijacije na 5,2 milijuna ha 1981. i 3 milijuna ha 1990. godine (McManus i Csóka 2007). Shodno tome, Šumarska služba Sjedinjenih Država (eng. US Forest Service) na kontrolu gubara godišnje troši prosječno oko 11 milijuna dolara, što ga čini najskupljim šumskim defolijatorom svih vremena (Johnson i dr. 2005, Mayo i dr. 2003, Pimentel i dr. 2000). Izvještaj Wallnera (1997) detaljno obrađuje troškove borbe Američke šumarske službe (eng. USDA Forest Service) sa invazijom gubara te navodi da u godišnji troškovi uzrokovani ovim štetnikom u razdoblju od 1980. do 1996. prelazili 30 milijuna dolara. Praćenje i analiza gradacija gubara u Sjevernoj Americi tijekom 20-og stoljeća potaknula su pretpostavke o gradacijama kao klimatski pokretanom fenomenu dovodeći na poslijetku, bez obzira na općenitu nisku do nikakvu stopu periodiciteta, do zaključaka da razdvojene populacije ponekad mogu postati sinkronizirane ovisno o regionalnoj stohastičnosti što je najvjerojatnije povezano sa klimatološkom varijabilnošću (Liebhold i Kamata 2000, McManus i Csóka 2007, Williams i Liebhold 1995).

1.1.6 Prirodni neprijatelji

Pored klimatoloških prilika i pogodnosti domaćina, utjecaj prirodnih neprijatelja također se smatra jednim od značajnih čimbenika koji utječu na populacijsku dinamiku gubara, pojave gradacija i sinkronizacije na velikim površinama. Mihajlović (2008) navodi oko 70 različitih vrsta koje su zabilježene kao prirodni neprijatelji gubara, dok Klein (1994) sumarno u tablici navodi preko 230 različitih vrsta prirodnih neprijatelja. Mihajlović (2008) među parazitoidima navodi vrste iz porodica Tachinidae (Diptera), Ichneumonidae i Braconidae (Hymenoptera). Lista predatora nešto je kraća, a na njoj se nalaze neki kukci iz porodica Carabidae, Dermestidae, Cantharidae i Silphidae, zatim predatorske grinje iz porodice Trombididae, od ptica poznata je samo kukavica (*Cuculus canorus* L.), te sitni glodavci koji se često hrane kukuljicama.

Od patogena poznati su bakulovirus uzročnik poliedrije, bakterije iz roda *Streptococcus*, mikrosporidije iz rodova *Nosema* i *Vairimorpha*, a među entomopatogenim gljivama poznato je da gubara napada *Beauveria* spp. te *Entomophaga maimaiga*. Gljiva *Entomophaga maimaiga* endemska je vrsta sjeveroistočne Azije gdje je poznati patogen gubara (Maimaiga je japanski naziv za gubara). Kao prirodni neprijatelj introducirana je prvo u Sjevernu Ameriku 1910 (Speare i Colley 1912), a od 1999. i u Europu u hrastove sastojine na području Bugarske (Plarska i dr. 2006). Introdukcija je bila uspješna na oba kontinenta, a na području Europe uspješno se raširila iz inicijalnih introdukcija pri čemu rezultati uspostave patogenetskog odnosa na gubaru indiciraju da bi ova gljiva mogla imati snažan utjecaj na kontrolu brojnosti populacije gubara (Pilarska i dr. 2006, Hrašovec i dr. 2013).

Detaljan pregled utjecaja parazitoida, predatora i patogena na populacijsku dinamiku gubara obradili su Alalouni i dr. (2013), koji zaključuju da, uprkos nekoliko desetljeća istraživanja, i dalje raspoložemo sa premalo kvantitativnih informacija potrebnih za predviđanje populacijske dinamike ovog štetnika i kontrolu njegova utjecaja.

1.1.7 Migracija i širenje

Spektar migratornih sposobnosti gubara omogućuje ostvarivanje stratificirane disperzije kao kombinacije aktivnog leta imaga, pasivne disperzije vjetrom te nehotične antropogene disperzije (Liebhold i dr. 2007, Mason i McManus 1981, Tobin i Blackburn 2008). U stadiju imaga oba spola imaju razvijena krila, no u ženki je na globalnoj razini primjećeno da postoje razlike u sposobnosti letenja pri čemu ženke iz europskih populacija vrlo slabo lete ili uopće ne lete (Keena i dr. 2008). Stoga se aktivna migracija i širenje ove vrste u stadiju imaga generalno ostvaruje letom mužjaka, dok je kod ženki uvjetovana sposobnošću leta i u skladu s time u Europi smanjena. Prema Kovačević (1956) i Mihajlović (2008) let mužjaka je nokturnalni dok Pogue i Schaefer (2007) navode da je let mužjaka diurnalni, što bi trebalo ispitati kako bi se ustanovilo radi li se o možebitnoj modifikaciji fenoloških osobina gubara na području Sjeverne Amerike. Činjenica da je Trouvelot u Massachusetts unio ličinke europskog gubara (ženke ne mogu aktivno letjeti) smatra se razlogom usporenog širenja invazije u sjeveroistočnoj Sjevernoj Americi, što je pružilo dovoljno vremena za iscrpno praćenje širenja i dinamike ekspanzije vodećeg fronta (eng. leading front) populacije (Liebhold i dr. 2007).

Drugi način disperzije gubara je širenje mladih gusjenica nošenih vjetrom, tzv. „ballooning“ (Deml i Dettner 1995). Bez obzira da li okidač „ballooninga“ bilo gladovanje, kompetencija s drugim gusjenicama ili početna potraga za podobnim domaćinom, vrlo je zanimljiva činjenica da se gusjenice samoinicijativno ovješavaju o svilene niti čekajući nalet vjetra, što potiče na razmišljanje kako ovaj oblik disperzije nije u potpunosti spontan i pasivan. U ranim razvojnim stadijima gusjenice mogu proći i kroz nekoliko širenja nošene vjetrom, no iako pojedine gusjenice mogu biti nošene i na veće udaljenosti, većina takvih širenja rezultira masovnom redistribucijom populacija na relativno lokalnoj razini (McManus i dr. 1979).

Liebhold i dr. (1992) u analizi invazije gubara na Sjevernu Ameriku u periodu od 1966. do 1989., ustanovili su da predviđena duljina disperzije koja se u šumskim staništima može ostvariti vjetrom iznosi oko 2,5 km godišnje, što je višestruko manje od zabilježene stope širenja koja je u istom periodu iznosila oko 21km godišnje. Stoga je zaključeno da veća stopa širenja mora biti rezultat antropogenog premještanja životnih stadija gubara, što je i dokazano jer zbog specifičnog ponašanja ličinki kasnijeg stadija da traže skrivene prostore često dolazi do nehotičnog transporta razvojnih stadija na vozilima i drugim ljudskim tvorevinama (Liebhold i dr. 1994, 2007, McFadden i McManus 1991, McManus i Csóka 2007). Iz navedenoga je vidljivo kako je nehotična antropogena disperzija naročito značajan čimbenik u pogledu stvaranja novih i osnaživanja postojećih migracijskih puteva gubara. Postojeća invazija gubara u sjeveroistočnoj Sjevernoj Americi zoran je primjer posljedica antropogene migracije gubara i štetnosti za novoinvadirano stanište. Osim same činjenice da je ljudskom aktivnošću unesen na područje Massachusettsa, kasnije je dokazano da je nehotično antropogeno širenje imalo ključnu ulogu u uspostavi jezgri za uspješno ostvarivanje stratificirane disperzije (Liebhold i dr. 2007, Tobin i Blackburn 2008).

Pojavljivanje gubara azijskog porijekla 1991. na zapadnoj obali Sjeverne Amerike (Nealis i Erb 1993), introdukcija preko jajnih legala na uvezenim automobilima u Novi Zeland (Armstrong i dr. 2003), kao i drugi izvori koji izvještavaju o pronalasku jajnih legala na raznim dijelovima vozila i drugih ljudskih tvorevina (Advanced Systems 2007, Minnesota DNR 2014), ukazuju na konstantan rizik od antropogenog širenja ovog opasnog šumskog štetnika.

1.1.8 Unutarvrсна varijabilnost

Pogledom u taksonomsku povijest gubara očigledno je da je od prvog opisa 1758. godine ova vrsta ovisno o geografskom porijeklu i vremenu naknadnih opisivanja prošla kroz razne klasifikacije, od kojih je danas najprihvaćenija i najviše korištena klasifikacija na europski i azijski (eng. European Gypsy Moth - EGM odnosno Asian Gypsy Moth - AGM), dok je indijski gubar (eng. Indian Gypsy Moth - IGM) naknadno izdvojen u drugu vrstu (Ball i Armstrong 2006, Pogue i Schaefer 2007, Schintlmeister 2004). Već iz same te činjenice može se naslutiti postojanje svojevrsnih razlika koje su sistematičare navodile na svrstavanje onoga što se danas smatra jednom vrstom u spektar taksonomski klasifikacija. Pojavom gubara kao izuzetno štetne invazivne vrste u Sjevernoj Americi pokreću se istraživanja iz raznih aspekata, a mnoga se većim ili manjim dijelom bave unutarvršnom varijabilnošću. Istraživanja temeljena na morfološkim, etološkim, fiziološkim pa i patološkim osobinama sve su jasnije dokazivala postojanje varijabilnosti čak i na užem geografskom području, a rezultati su se u više navrata objašnjavali postojanjem genetičkih inkompatibilnosti (Clarke i Ford 1982, Goldschmidt 1934, Higashiura i dr. 1999, 2011, Mosbacher 1975).

Jedan od najjasnijih primjera unutarvršne varijabilnosti gubara je postojanje globalne varijacije u letačkim sposobnostima ženki (Keena i dr. 2008). Pored toga, razlike u fluktuacijama gradacija na području Europe također predstavljaju svojevrsnu varijabilnost, bez obzira koji je čimbenik ili splet čimbenika uzrok tih varijabilnosti. Uzmemo li u obzir samo te dvije osobine (sposobnost leta i varijabilnost populacijskih dinamika), u uzajamno regulirajućem odnosu genotip – okolina – fenotip možemo pretpostaviti da su uočene fiziološke i fenološke razlike zasigurno mogle utjecati na varijabilnost gena i stimulirati strukturiranje geografski razdvojenih populacija gubara, ne samo na globalnoj već i kontinentalnoj Europskoj, a vjerojatno i nižoj regionalnoj razini.

Čak i danas širom prihvaćena klasifikacija na europski i azijski gubar često nije imala jasno određene granice sve dok se molekularno biološkim metodama nije dokazala jasna genska diferencijacija između tih dviju grupa (Bogdanowicz i dr. 1993, deWaard i dr. 2010, Keena i dr. 2008). Pitanje postojanja unutarvršne genske varijabilnosti na globalnoj razini jasnije se počelo dokazivati upotrebom molekularnih biljega. Bogdanowicz i dr. (2000) upotrebom mtDNA biljega grupirali su gubara na četiri globalne skupine; (1) Okinawa, Japan, (2) Hokkaido, Japan, (3) Honshu i Kyushu, Japan i kontinentalna Azija, te (4) Europa, Tunis i Sjeverna Amerika. Keena i dr. (2008) u analizi globalne varijabilnosti u sposobnosti leta

ženki, upotrijebili su RFLP mitohondrijski marker (tzv. AB biljeg koji su razvili Bogdanowicz i dr. (1993)), AFLP jezgrin biljeg i mikrosatelitne biljege. Svi biljezi pokazivali su porast varijabilnosti od zapada prema istoku sa najvećom varijabilnosti u Aziji, no jedino su na temelju mitohondrijskog biljega uspjeli razlučiti globalnu strukturu na tri osnovne grupe: (a) Sjeverna Amerika, (b) Europa i Sibir te (c) Azija, dok druga dva biljega nisu bila dovoljno polimorfna. Upotrebom istih biljega uspjeli su s 94% točnošću dodjeljivanje jedinki odgovarajućoj geografskoj grupi, dok se na temelju istih nije moglo točno odrediti sposobnost leta. Autori na kraju zaključuju da tok gena i barijere u toku gena igraju važnu ulogu u distribuciji za let sposobnih ženki, no da su potrebni dodatni biljezi kako bi se moglo točno korelirati genotip sa sposobnošću leta ženki.

Nedavno su deWaard i dr. (2010) istražili mogućnosti mitohondrijskog barkod biljega za inter i intraspecifičnu diferencijaciju 36 vrsta iz roda *Lymantria*. Intraspecifičnom analizom gubara na temelju 244 sekvence barkod biljega ustanovili su tri osnovne filogeografske skupine: (I) Sjeverna Amerika + Francuska, (II) Europa i zapadna Azija te (III) istočna Azija. Jasno su ustanovili razgraničenje između podvrsta *L. dispar dispar* i dvije azijske podvrste *L. dispar asiatica* i *L. dispar japonica*, bez detaljnije analize po grupama odnosno kontinentima. Autori zaključuju da sekvence COI regije mitohondrijske DNA mogu pružiti dovoljnu intraspecifičnu rezoluciju za definiranje regionalnih geografskih strukturiranja i identifikaciju izvornih populacija, a što bi uz povećanje uzorkovanja i dostupnosti molekularno genetičkih podataka stvorilo osnovu potrebnih informacija za kvalitetnije provođenje regulatorno/monitornih programa. No ujedno se ističe i da bi utjecaj antropogene migracije, čimbenika koji utječe na sve organizme, a na poseban efikasan način i na gubara, mogao zamutiti jasnoću klasteriranja i time otežati ostvarenje tog cilja.

Koncept DNA barkodiranja zasniva se na aksiomu da je moguće brzo i precizno identificiranje vrste amplifikacijom i sekvenciranjem kratke, standardizirane regije njenog genoma (Arnot i dr. 1993; Floyd i dr. 2002; Hebert i dr. 2003). Hebert i dr. (2003) za životinje kao DNA barkod biljeg predlažu mitohondrijski gen citokrom c oksidazu (eng. Cytochrome c oxidase subunit 1 – COI). Takva sekvenca može biti uspoređena sa podatkovnim bazama (eng. database) poznatih sekvenci već identificiranih jedinki kako bi se provela identifikacija. Budući da ova metoda ovisi o DNA biljegu, a ne o morfološkim obilježjima, primjenjiva je u bilo kojem razvojnem stadiju, od jaja do imaga. Metoda barkodiranja također teži primjeni standardiziranih protokola koji mogu biti primjenjeni na velikom broju organizama uz

osnovnu tehničku ekspertizu i bez potrebe za ekstenzivnim znanjem tradicionalne morfološke taksonomije (Floyd i dr. 2010).

Ponukani uočenim razlikama u dinamici gradacija između kontinentalnih i obalnih populacija gubara, razdvojenih lancem Dinarskih Alpa, Lacković i dr. (2015) analizirali su razlike među populacijama u Hrvatskoj upotrebom COI mtDNA biljega te ustanovili značajnu gensku diferencijaciju i zaključili kako je to vrlo zanimljiv rezultat u kontekstu predviđenog pomicanja areala (eng. range shift) gubara na području Europe od juga prema sjeveru kao posljedice globalnih klimatskih promjena (Vanhanen i dr. 2007). Također je istaknuta potreba analize većeg broja populacija na području Europe kako bi se stvorila jasnija filogeografska slika i dobiveni rezultati stavili u širi Europski kontekst.

1.2 Šume Europe

Prema izvješću Forest Europe (2011) šume u Europi (uključujući i dio Ruske Federacije) obrastaju gotovo 1,02 milijarde hektara (sa tendencijom rasta 0,8 milijuna ha godišnje), što je 44,5% ukupne površine Europe i oko 25% od ukupne svjetske površine obrasle šumama. Totalna drvena zaliha europskih šuma procijenjena je na 114,2 milijarde m³ (uz prosječno godišnje povećanje od 432 milijuna m³) po čemu je druga na svijetu iza Južne Amerike, odnosno treća na svijetu iza Sjeverne Amerike prema relativnom iznosu drvene zalihe koja je 2010. godine iznosila 105 m³/ha. Ta impozantna masa šumskih ekosustava predstavlja nezamjenjiv resurs višestruko korisnih ekoloških, zaštitnih i socio-ekonomskih funkcija.

Jedna od značajnih ekoloških funkcija šuma je doprinos globalnom ciklusu ugljika kroz sekvestraciju atmosferskog CO₂. Procijenjeno je da je u razdoblju od 2005. do 2010. kroz fotosintezu i prirast drvene biomase europskih šuma iz zraka uklonjeno oko 870 milijuna tona CO₂ što odgovara oko 10% godišnje proizvodnje tog stakleničkog plina u zemljama Europe. Doprinos šumskih ekosustava krajobraznoj, biološkoj i genskoj raznolikosti neizmjeran je i nezamjenjiv, i stoga se u svrhu očuvanja te funkcije na području Europe promoviraju suvremene metode održivog gospodarenja šumama.

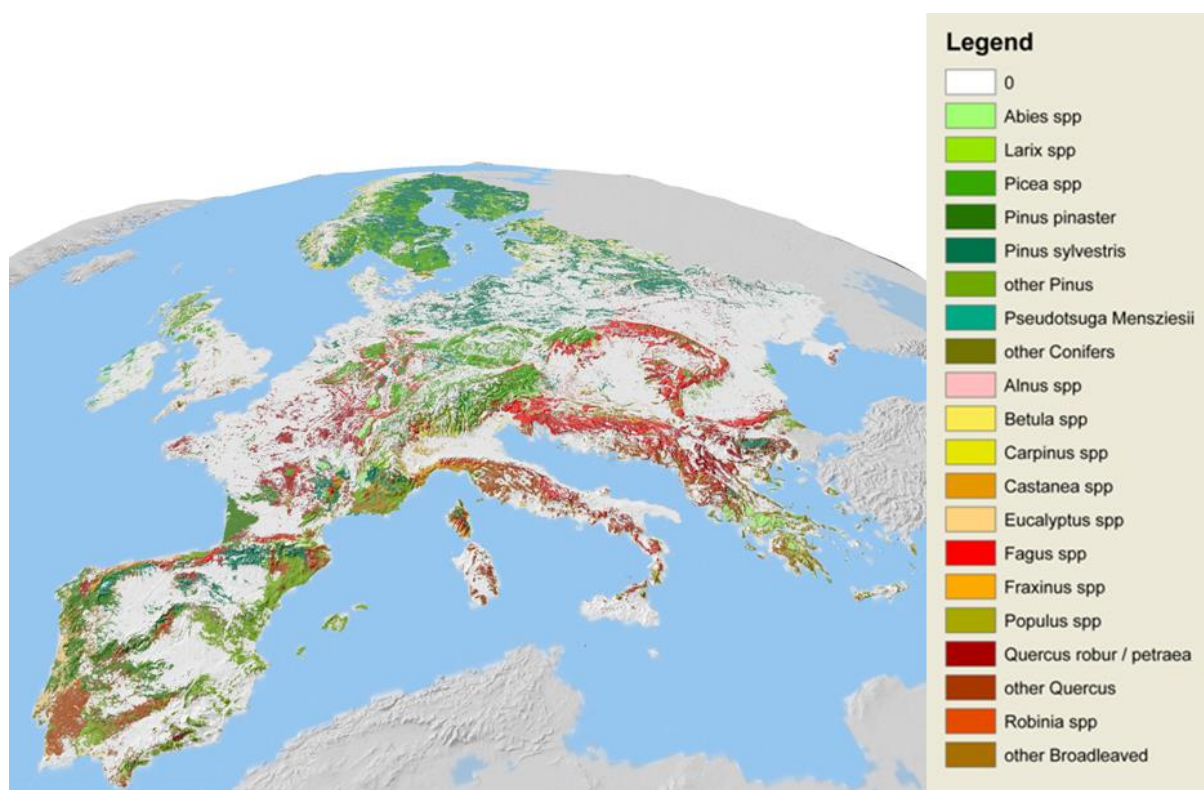
Zaštitna funkcija šuma također je široko prepoznata te je za više od 20% europskih šuma ustanovljeno da ispunjavanju ulogu zaštite tla, vode i drugih usluga ekosustava, kao i zaštite infrastrukture drugih prirodnih resursa.

Socio-ekonomske funkcije europskih šuma očituju se kroz nekoliko pokazatelja. U šumarskom sektoru u Europi zaposleno je oko 4 milijuna ljudi, što uključuje i drveno prerađivačku industriju, a najbolji pokazatelj produktivnost sektora je činjenica da Europa uprkos globalizaciji ostaje jedan od najvećih proizvođača oblovine na svijetu. Prijavljeni neto prirast drvene mase 2010. godine iznosio je 1.5 milijarde m³ dok je etat iznosio 683 milijuna m³ (oko 44% prirasta), od čega je proizvedeno više od 578 milijuna m³ oblovine. Ukupna tržišna vrijednost europske oblovine konstantno raste, a 2010 godine dosegla je 21,1 milijardu eura. Osim oblovine, ne-drveni produkti europskih šuma također su značajan izvor lokalnih prihoda, ta vrijednost varira ovisno o državi, a prijavljena tržišna vrijednost ne-drvnih proizvoda na području Europe 2010. godine iznosila je 2,7 milijardi eura (od čega je najviše otpadalo na božićna drvca, plodove šumskog bilja i pluto). Nadalje, druge vrste prihoda također mogu biti značajan izvor prihoda, kao na primjer prihod od lovnog turizma od kojega je 2010. uprihodoeno 818 milijuna eura.

Uzimajući u obzir klimatološke, geografske, orografske, pedološke i vegetacijske čimbenike, šume u Europi klasificirane su u 14 različitih kategorija (Forest Europe 2011) (Prilog 1), a prema sastavu oko 70% površine je obraslo heterogenim dok je preostalih 30% obraslo homogenim šumama. U europskim šumama dominira nešto više od 20 vrsta drveća (

Slika 9) (Brus i dr. 2011) od kojih su *Abies alba*, *Picea abies*, *Pinus sylvestris*, *Fagus sylvatica*, *Quercus robur* i *Quercus petraea* ekonomski najznačajnije (Forest Europe 2011).

Šume Europe su pod desetljećima opterećivanja imisijama, prekomjernim sječama, ispresjecanjem prometnom infrastrukturom te previsokim populacijama papkara u velikom dijelu destabilizirane. Jedan od simptoma koji se javljaju kao posljedica tih preopterećenja su sve veće masovne pojave različitih vrsta kukaca među koje spada i gubar (Klein 1994). U europskim šumama 2005. godine zabilježene su štete na gotovo 16 milijuna hektara, od čega je 7,9 milijuna ha pripisano štetama od bolesti i kukaca, dok se preostali dio odnosio na štete od divljači, štete od požara te štete od nevremena, vjetra i snijega (Forest Europe 2011). Među kukcima, gubar *Lymantria dispar* (Linnaeus, 1785) kao štetnik rasprostranjen je većim dijelom Europe (sjeverna granica areala u Europi nalazi se na području Litve ili čak središnje Švedske (Klein 1994)) te spada među značajnije biotske čimbenike koji uzrokuju poremećaje i štete u šumama Europe, a zbog svoje polifagnosti i sposobnosti za longitudinalne i latitudinalne ekspanzije za pretpostaviti je da će u tom svojstvu i ostati (BIO Intelligence Service 2012).



Slika 9. Karta distribucije 20 dominantnih vrsta drveća u šumama Europe (Brus i dr. 2011). preuzeto sa www.efi.int

1.3 Evolucija, filogeografija i molekularna ekologija

Sama riječ evolucija i koncept evolucije primjenjuje se u objašnjavanju razvojnih pojava u širokom spektru prirodnih pojava i ljudskih aktivnosti (npr. evolucija života, evolucija argumenta, evolucija računala, evolucija srčanih zalisaka, i dr.) (Hall i Hallgrimsson 2011). U biologiji, evolucija je znanstvena teorija kojom se objašnjavaju promjene u nasljednim svojstvima populacija tijekom sukcesivnih generacija. Promjene u nasljednim svojstvima posljedica su evolucijskih procesa koji dovode do pojave raznolikosti na svakoj razini biološke organizacije. Promjene su pokretane mikroevolucijskim procesima (mutacije, genetički drift, tok gena i selekcija) koji kroz određeni broj generacija (kroz određeno vrijeme) rezultiraju makroevolucijskim procesima (odnosno evolucijskim ishodima) adaptacije, specijacije i izumiranja (Hall i Hallgrimsson 2011).

Raznolikost na svakoj razini biološke organizacije stoga je jedan od osnovnih rezultata evolucijskih procesa. Poznato je da je fenotip organizma rezultat genotipa i utjecaja okoline u kojem živi, no značajan dio fenotipske varijacije u populaciji uzrokovan je razlikama u

genotipu jedinki (Wu i Lin 2006). Genetička raznolikost populacije predstavljena je frekvencijom različitih alela prisutnih u populaciji. Frekvencija alela u prirodnim populacijama održava se prema principima Hardy-Weinberg ravnoteže (Stern 1943), a postojeće stanje rezultat je povijesnog utjecaja mikroevolucijskih procesa. Postojanje raznolikosti osnovni je preduvjet za evoluciju pod utjecajem selekcije i isključenje izumiranja (u granicama okolišnih uvijeta koji podržavaju život) kao jednog od evolucijskih ishoda (Hartl i Clark 2006).

Prema teoriji neutralne molekularne evolucije većina unutarvrzne molekularne raznolikosti rezultat je efektivno neutralnih mutacija koje bivaju fiksirane pod utjecajem genetičkog drifta te proširene kroz populaciju mehanizmima toka gena (Kimura 1983). Kimura (1983) je u svom radu pokazao da se u prirodnim populacijama mutacije koje su pogubne za organizam brzo isključuju pod utjecajem prirodne selekcije, dok je vjerojatnost da mutacije koje pozitivno doprinose sposobnostima organizma postanu fiksirane u populaciji samo oko 2%. Stoga je većina nakupljene raznolikosti rezultat efektivno neutralnih mutacija koje opstaju u populaciji. Procesi evolucije mogu dovesti do pojave osobine koja organizmu u datom okolišu ne daje nikakvu selektivnu prednost dok s druge strane može dovesti do gubitka određene osobine ako to za organizam ne predstavlja izravni selektivni nedostatak (npr. Maughan i dr. 2007). Drugim riječima, smjer evolucije može biti progresivan i regresivan u kontekstu raznolikosti i kompleksnosti organizama, a nove linije će postajati jednostavnije ili kompleksnije ovisno o selektivnoj prednosti date forme.

Biološki koncept vrste definira vrstu kao grupu međusobno razmnožavajućih jedinki reproduktivno izoliranu od drugih grupa (Wu 2001). Diferencijacija populacija na početku se događa na manjem broju lokusa, a ako nema vanjskih barijera toku gena postojat će intermedijalni oblici. Kako se divergencija povećava, hibridi bivaju slabijih sposobnosti i fertilnosti. U ovom periodu velika većina genomskih regija među populacijama još nije diferencirana. Daljnjom diferencijacijom razlike u biologiji i reproduktivnom ponašanju među populacijama postaju toliko velike da među njima više ne može doći do spajanja čak i u uvjetima koji omogućuju masovnu hibridizaciju, a nastale grupe u simpatriji će ili koegzistirati ili će doći do kompeticijskog isključenja (Arthofer 2005).

Potpuni tok gena u populaciji bi ultimativno održavao uniformnu ravnotežu i homogenost raznolikosti. Međutim kod organizama koji su rasprostranjeni na velikim površinama i stoga u

područjima različitih ekoloških uvijeta, zbog adaptacije na različite uvijete te reproduktivne izolacije (prekid toka gena) gotovo redovito dolazi do specijacije (Hartl i Clark 2006).

S obzirom na oblik i mjeru izoliranosti razdvojenih populacija specijacija može imati četiri osnovna geografska modela: alopatrijski, peripatrijski, parapatriski i simpatrijski.

Alopatrijska specijacija događa se kada populacije iste vrste bivaju razdvojene u geografski izolirane niše, npr. izdizanjem planinskih lanaca ili formiranjem vodenih površina. Tako izolirane populacije dolaze pod utjecaj različitih selektivnih pritisaka, neovisno prolaze kroz genetički drift i u svakoj se pojavljuju različite mutacije, a onemogućen tok gena sprječava homogenizaciju.

Peripatrijska specijacija događa se kada manja populacija biva izolirana od matične populacije. Takve populacije su redovito vrlo male veličine te u njima dolazi do efekta osnivača (eng. founder effect) koji uzrokuje drastično smanjenje genske varijabilnosti budući da male populacije redovito doživljavaju efekt uskog grla (eng. bottleneck) kao posljedice genetičkog drifta. Za peripatrijsku specijaciju genetički drift se smatra najznačajnijim čimbenikom specijacije. Unos gubara na područje Sjeverne Amerike klasičan je primjer takvog događaja, koji bi bez eventualnog sekundarnog kontakta zasigurno doveo do peripatrijske specijacije.

Kod parapatriske specijacije nema fizičke barijere između populacija već se specijacija događa kao rezultat adaptacije na promjenjene ekološke uvijete koji se iznenada pojave u staništu na kojem obitava jedna od populacija. Za pojavu parapatriske specijacije nužno je postojanje genske raznolikosti vrste i adaptacija dijela populacije koja nosi svojstva prikladna za novonastale ekološke uvijete dok ostatak izvorne populacije opstaje na dijelovima staništa na kojima nije došlo do promjene ekoloških uvijeta.

Simpatrijska specijacija je proces razdvajanja unutar populacije bez utjecaja geografskih barijera ili promjene ekoloških uvijeta u dijelu staništa. Takav je proces općenito vrlo rijedak budući da tok gena može brzo homogenizirati gensku raznolikost između dijelova populacije. Stoga se smatra da se proces simpatrijske specijacije događa kao rezultat izostanka toka gena kao artefakta razmnožavanja. Naime da bi se u populaciji održao tok gena etologija razmnožavanja mora biti nasumična (eng. random mating), a ako to nije slučaj unutar populacije postupno dolazi do nakupljanja genetičkih razlika između dijelova populacija koje se međusobno ne križaju. Molekularno filogenetičkim metodama dokazan je početak

simpatrijske specijacije borovog četnjaka (*Thaumatococcus pinnatifidus*) na području Portugala gdje se razvila alohronost u razvojnem ciklusu zbog čega je prekinut tok gena između dijelova populacija kod kojih se imaga javljaju u različito doba godine (Santos i dr. 2011).

Vrijeme potrebno da dođe do specijacije teško je odrediti zbog mnogih čimbenika koji utječu na prirodne populacije, no taj se proces kontinuirano odvija te se uslijed utjecaja evolucijskih procesa (mutacija, tok gena, genetički drift i selekcija) među populacijama postupno nakupljaju razlike u skupu gena (gene pool), a to nakupljanje razlika odražava se kroz geografsku distribuciju genealoških linija (Avice 2006).

Disciplina koja se bavi prostornim i vremenskim dimenzijama genealogije gena naziva se filogeografija (Avice 2009, Avice i dr. 1987) i objedinjuje principe i procese koji su oblikovali kontemporalnu geografsku distribuciju genealoških linija, posebno unutar i između blisko srodnih vrsta (Beebe i Rowe 2008). Avice i dr. (1987) opisali su filografiju kao most između populacijske genetike i sistematike, pri čemu mikroevolucijski procesi (npr. mutacija, rekombinacija i dr.) koji djeluju unutar vrste mogu biti ekstrapolirani kako bi se objasnile makroevolucijske razlike među vrstama i višim taksonima. Za razvoj filogeografije ključan je bio razvoj molekularno bioloških metoda i otkriće 1970-ih da geni na mitohondrijskoj DNA predstavljaju izvrsne molekularno filogenetičke biljege, od kada se filogeografija kao disciplina ubrzano razvijala tijekom posljednjih 30 godina (Avice 2009).

1.4 Molekularni pristupi u filogeografiji

1.4.1 Genetički biljezi

Genetički biljezi generalno mogu biti definirani kao bilo koja osobina organizma koja može biti povezana s njegovim genomom. Sukladno tome, prepoznatljivi dijelovi DNA, ali i drugih biomolekula kao što su RNA i proteini, predstavljaju genetičke biljege budući da potječu iz genoma i njegovi su reprezentanti. S obzirom da dijelovi DNA i drugih biomolekula koje su kodirane od strane DNA, a koriste u molekularno filogenetičkim istraživanjima, uglavnom predstavljaju gene i produkte transkripcije i translacije gena, takvi se biljezi nazivaju genskim biljezima. Prije pojave elektroforetskih i molekularno genetičkih tehnika, bilo je dostupno samo nekoliko biljega za Mendelijanske osobine kao što je pigmentacija dijelova tijela (True 2003). U zadnjim desetljećima, brz razvoj metoda molekularne biologije rezultirao je produkcijom nekoliko klasa biljega koji se mogu koristiti u populacijskoj biologiji (Sunnucks

2000), a koji se razlikuju po rezoluciji, preciznosti, reproduktibilnosti, ali i tehničkoj zahtjevnosti i analitičkom trudu (Arthofer 2005). Stoga izbor odgovarajućeg genskog biljega ne ovisi samo o inicijalno postavljenom pitanju već i o dostupnosti biljega za određenu vrstu (Nève i Megléc 2000), kvaliteti i kvantiteti jedinki (Dean i Ballard 2001) te o dostupnom vremenu i opremi koja može biti upotrebljena za istraživanje. Idealni biljezi (ako postoje) trebali bi kombinirati prikladne stope nukleotidne supstitucije, reproducibilne sekvence i lagano sravnjivanje sa dobro opisanim i dostupnim univerzalnim početnicama (eng. primers) (Cruickshank 2002).

1.4.2 Mitohondrijska DNA

Životinjske stanice sadrže dva zasebna genoma: jezgrin (nDNA) i mitohondrijski (mtDNA). Jezgrin genom je velik (npr. $1,4 \times 10^8$ parova baza kod vrste *Drosophila melanogaster*; Hoskins i dr. 2002), kodira nekoliko tisuća proteina i egzistira u dvije kopije (u diploidnim stanicama). Stope mutacije i distribucija polimorfnih pozicija nisu nasumični kroz jezgrin genom, a osobine poput rekombinacije, duplikacije gena, formacija pseudogena ili klizanje introna otežavaju potragu i definiranje univerzalnih početnica poput onih koje su dostupne za mitohondrijske gene (Zhang i Hewitt 2003). Stoga je *de novo* razvijanje početnica velika zapreka za upotrebu jezgrinog genoma u filogeografskim istraživanjima (Wan i dr. 2004).

Prepoznavanje mitohondrijskih gena u kasnim 1970-im kao upotrebljivog molekularnog biljega rapidno je povećalo analize vezane uz evolucijske procese (Avice 2009, Behura 2006, Zhang i Hewitt 1996, 2003). Mitohondrijska DNA je još uvijek najpopularniji genski biljeg korišten u molekularnoj ekologiji, t.j. za filogeografske analize, i naširoko je primjenjen u znanstvenim publikacijama (Avice 2000).

Generalno visoka stopa mutacija mtDNA rezultira u do 10 puta većoj genetičkoj varijaciji u usporedbi sa pojedinačnim (eng: single-copy) frakcijama nDNA (Avice i dr. 1987, Behura 2006). Nekoliko je hipoteza izneseno za objašnjenje tako brze akumulacije nukleotidne raznolikosti u životinjskoj mtDNA (Li 1997, Nebdal i Flynn 1998, Richter 1992). Jedno od objašnjenja moglo bi biti relaksacija funkcionalnih ograničenja budući da mtDNA ne kodira za proteine direktno uključene u vlastitu replikaciju ili transkripciju. Nadalje, mitohondrijske molekule produciraju samo 13 vrsta proteina i mogu tolerirati manju točnost u translaciji (Duran 2003). Visoka stopa mutacija također bi mogla biti posljedica neefikasnog mehanizma

popravka DNA, što predvidivo uzrokuje više polimorfizama (Clayton 1982, Wilson i dr. 1985). Nastavno, nukleotidni polimorfizmi u mtDNA smatraju se efektivno neutralnima. Pojednostavljeno, distribucija hapotipova, t.j. mitohondrijskih genotipova, vjerojatnije je posljedica demografskih događaja (genetički drift, tok gena) nego selekcije (Beebee i Rowe 2008). Mutacijska dinamika sekvenci mtDNA, koja je uniparentalno naslijeđena i ne prolazi kroz mehanizme rekombinacije, producira trag genetičkih odnosa među haplotipovima, a kako je efektivna populacija mtDNA četiri puta manja od diploidne nDNA, frekvencije haplotipova mogu brzo prolaziti kroz drift kreirajući genske diferencijacije među populacijama u relativno kratkom vremenu (Beebee i Rowe 2008). Pored toga, univerzalne PCR početnice, često dizajnirane za visoko očuvane gene kao što je COI, omogućuju jednostavnu i konvencionalnu amplifikaciju i uspješan PCR čak i iz muzejskog materijala ili arheoloških ostataka (Beebee i Rowe 2008).

Neke od uočenih zamki vezanih uz mtDNA je pojava mitohondrijskih gena u jezgrinoj DNA (NUMT – nuclear mitochondrial DNA) i heteroplazmija odnosno pojava različite mtDNA u različitim mitohondrijima (Berthier i dr. 2011, White i dr. 2008). Takve različite kopije, bilo jezgrine ili heteroplazmijske, mogu evoluirati zasebnom stopom i doživljavati drugačije mutacijske promjene što treba imati na umu kako ne bi došlo do zastranjivanja u filogenetičkoj i filogeografskoj interpretaciji podataka dobivenih analizom mtDNA biljega.

Bez obzira na svojevrsan gubitak superiornosti zbog sve veće primjene mikrosatelitnih i drugih nDNA biljega, izbor primjenjenog biljega ovisi o ciljevima studije, i dostupnim resursima, te u tom pogledu mtDNA još uvijek ima nekoliko prednosti pri izboru za filogeografska istraživanja (Behura 2006, Zhang i Hewitt 2003).

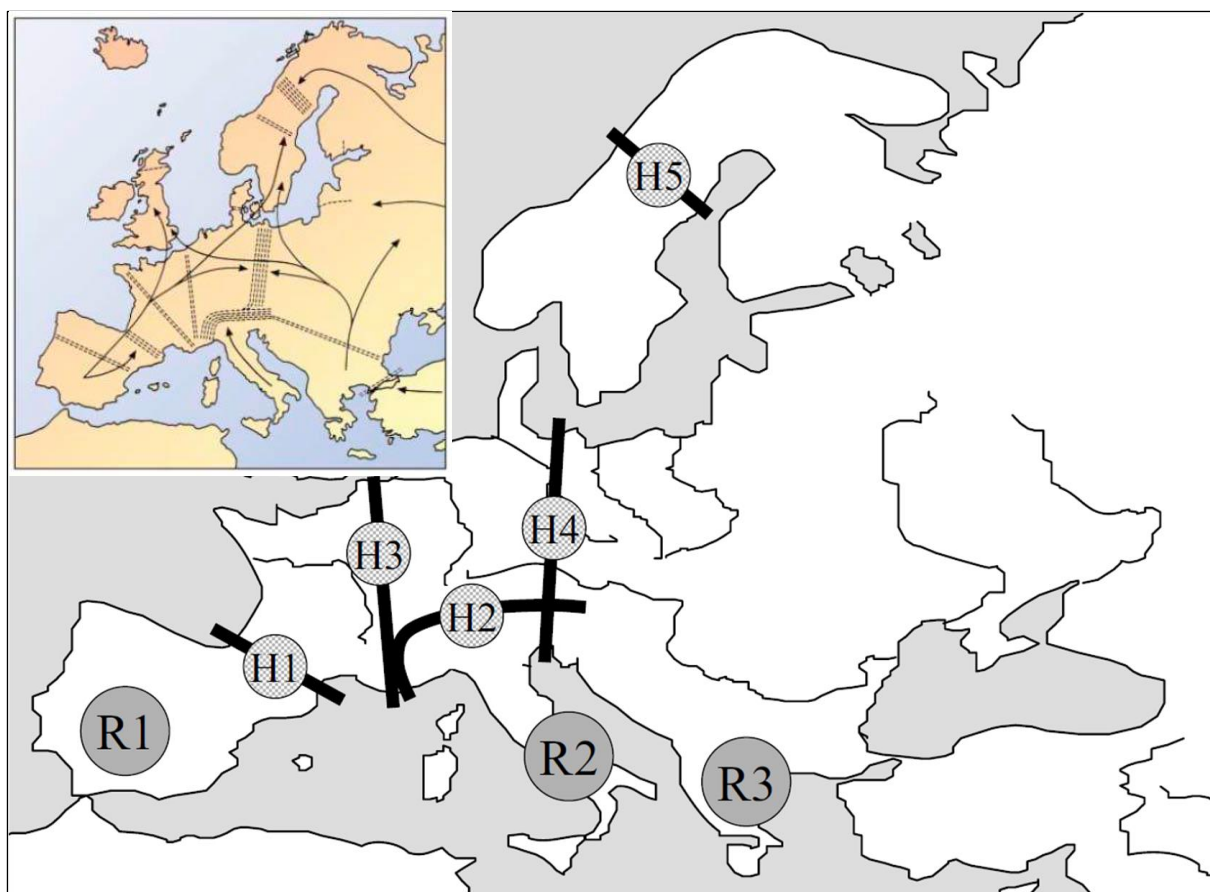
1.5 Postglacijalna rekolonizacija i biogeografija Europe

Specifičan geografski položaj, geomorfološka obilježja i glacijalna povijest Europe uzroci su kompleksne biogeografije zbog čega je mnogim istraživačima Europa zanimljiva za filogeografska istraživanja.

Prije oko 2,5 milijuna godina klimatske prilike na Zemlji dovele su do formiranja arktičke ledene ploče, a kvartarne klimatske oscilacije bilježile su enormne temperaturne skokove od 7 - 14°C u samo nekoliko desetljeća. Posebno su tijekom zadnjih 700 000 godina dominirala velika ledena doba sa ciklusima od oko 100 000 godina isprekidanim relativno kratkim toplim

interglacijalnim razdobljima kao što je današnje. Klimatska stabilnost zadnjih 8000 godina čini se iznimkom više nego pravilom (Hewitt 2000, 2004, Taberlet i dr. 1998). Europom dominiraju strukture Alpskih planinskih lanaca i Sredozemnog mora koji zajedno formiraju jake zapad-istok orijentirane barijere. Stoga je ekspanzija vrsta otpornih na hladnoću tijekom toplih perioda, kao i zaposjedanje toplijih južnih predjela tijekom glacijacije bilo ometano i ograničeno. Sa svakom oscilacijom vrste su izumirale na velikim dijelovima areala, bivale su raspršene u nove predjele ili razdjeljene u refugije. Ponavljajuće ekspanzije i kontrakcije areala vrsta trebalo bi podrazumijevati uzastopne pojave efekta uskog grla (eng. bottleneck), gubitak raznolikosti gena u sjevernim populacijama i specijacijske manifestacije zbog egzistiranja u različitim refugijama i adaptacije na nove ekološke uvijete (Hewitt 2000).

Gotovo sve europske vrste mediteranskih korijena imale su glacijalne refugije u jednom od tri najveća europska poluotoka mediteranske regije; Pirenejski, Apeninski i Balkanski poluotok. Većina širom rasprostranjenih vrsta imale su refugije u sve tri refugije. U većini slučajeva, populacije iz tih triju poluotoka nisu imale ili su imale ograničenu razmjenu jedinki i stoga su populacije na tim razdvojenim područjima evoluirale neovisno, često rezultirajući u tri glavne genetičke grupe vezane pojedinačno za svaki od poluotoka (Hewitt 2000, Schmitt 2007) (Slika 10).



Slika 10. Tri glavna mediteranska refugija i diferencijacijska centra južne Europe tijekom zadnje ledenog doba; R1: Atlanski-mediteranski, R2: Jadranski-mediteranski, R3: Pontski-mediteranski. Geografska lokacije pet najznačajnijih kontrakcijskih i hibridizacijskih područja gdje su razne vrste došle u sekundarni kontakt tijekom postglacijalnog ekspanzijskog procesa; H1: Pireneji, H2: Alpe, H3: zapadna centralna Europa, H4: istočna centralna Europa i H5: središnja Skandinavija (prema Schmitt 2007). Umetak: karta sa detaljnijim prikazom barijernih i dodirnih zona (crtkane linije) i generaliziranom paradigmom smjerova postglacijalne rekolonizacije europskih biota (prema Hewitt 2000).

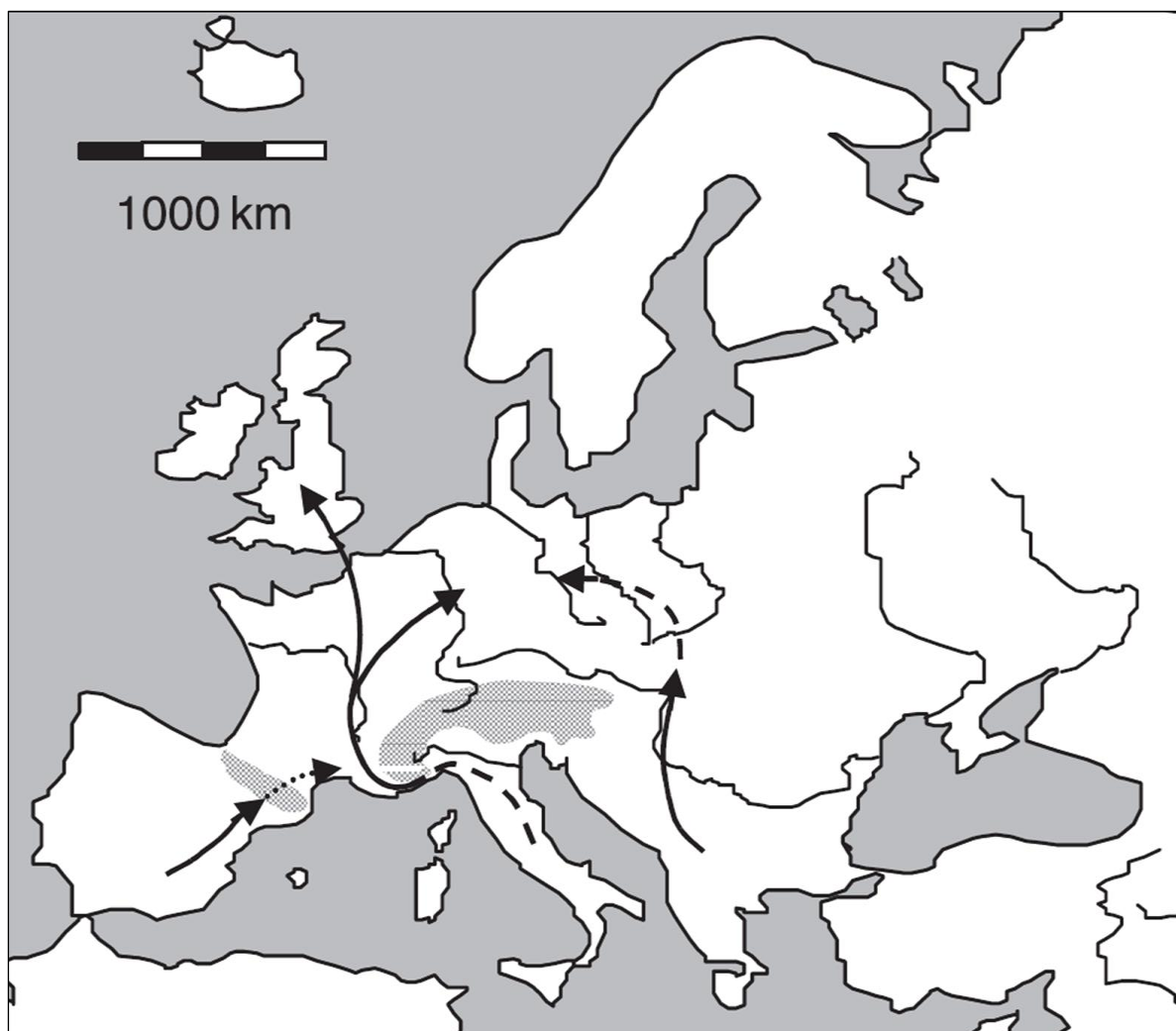
U postojećim glavnim refugijima južnih područja Europe predložena je i daljnja podjela unutar samih refugija budući da su genetičke analize mnogih taksona pokazale jako podstrukturiranje unutar mediteranskih refugija kao što su Pirenejski, Apeninski i Balkanski poluotok ali i Mala Azija. Od tri glavna refugija Jadransko-mediteranski (Apeninski) ne pokazuje podstrukture, u Atlansko-mediteranskom (Pirenejski) se naziru afrička i europska podstruktura, a najraznovrsniji je Pontsko-mediteranski (Balkanski) refugij.

Pontsko-mediteranski refugij u smislu riječi obuhvaća Balkanski poluotok, Malu Aziju i istočnu obalu mediterana južno do Palestine (Schmitt 2007). Za to područje se još od 1950 spominje daljnje strukturiranje na više podcentara, a često duboke genetičke raznolikosti između Balkana i Male Azije podržavaju dugotrajnu biogeografsku izolaciju tih dviju regija kako je ustanovljeno filogenetičkim analizama bjeloprskog ježa (*Erinaceus concolor*), skakavca (*Chorthippus parallelus*) i primorskog borovog srčikara (*Tomicus destruens*) (Cooper i dr. 1995, Horn i dr. 2006, Seddon i dr. 2002).

Filogenetičkim istraživanjima na nekoliko vrsta životinja ustanovljena je i podržana ideja nekoliko podcentara unutar Balkanskog poluotoka. Generalno je podržana ideja zapad-istok rascjepa unutar Balkanskog poluotoka sa zapadnim Ilirskim i istočnim Egejskim filogrupama (Schmitt 2007). Slična je situacija ustanovljena za leptir šahovnica (*Melangaria galathea*) gdje su rezultati alozimske analize jedinki iz jugoistočne Europe podržali postojanje barem tri centra duž mediteranske obale Balkanskog poluotoka: Ilirska obala, Egejska obala i jugozapadna obala Crnog mora s time da se nije uspjelo ustanoviti je li postojala veza između tih centara tijekom zadnjeg ledenog doba (Schmitt i dr. 2006).

1.5.1 Paradigme obrazaca rekolonizacije

U procesu ekspanzije iz refugijskih centara tijekom procesa amelioracije i rekolonizacije centralne i sjeverne Europe, organizmi su slijedili obrasce ovisno o refugijama u koja su pribjegli i obitavali tijekom ledenog doba, geografskim faktorima koji su modificirali tokove migracije te samim migratornim sposobnostima organizama. U tom su procesu rekolonizacijske rute pratile generalno četiri obrasca temeljem kojih su predložene četiri paradigme: (1) „jež“ (eng. hedgehog) - ekspanzija iz sve tri refugije; (2) „medvjed“ (eng. bear) - ekspanzija zapadnih i istočnih linija, ali zatočenje Jadransko-mediteranskih linija planinskim lancem Alpa; (3) „leptir“ (eng. butterfly) – ekspanzija Jadransko- i Ponsko-mediteranskih linija dok su Atlansko-mediteranske linije zatočene lancem Pireneja (Slika 11); i (4) „skakavac“ (eng. grasshopper) – glavna ekspanzija u centralnu Europu samo iz Balkana uz zatočenje Atlansko- i Jadransko- mediteranskih linija planinskim lancima Pireneja i Alpi (Schmitt 2007). Paradigme obrazaca rekolonizacije „jež“, „medvijed“ i „skakavac“ pratile su mnoge životinjske ali i biljne vrste dok je za paradigmatu „leptir“ za sada poznato da su pratile samo tri vrste leptira (Habel i dr. 2005, Schmitt i Seitz 2001, Schmitt i dr. 2005) (Slika 11).

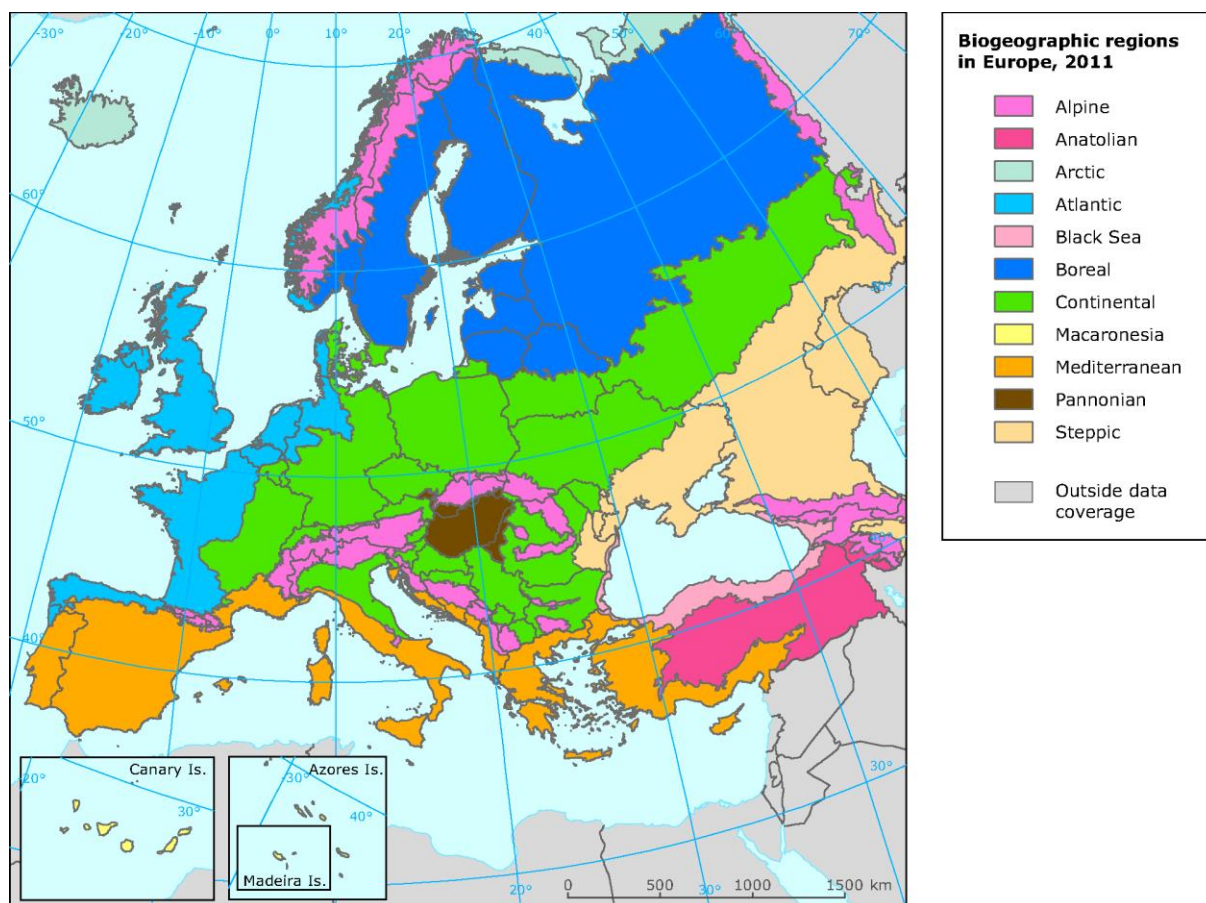


Slika 11. Obrazac „leptir“ paradigme postglacijalnog rekolonizacijskog obrazasca na temelju filogeografske analize leptira šahovnice (*Melanargia galathea*) kao brzo ekspanirajuće vrste. Rekolonizacija centralne europe mahom je nastupila iz Jadransko-mediteranskog i Ponsko-mediteranskog refugija, dok je rekolonizacija iz Atlansko-mediteranskog refugija sputana pirenejskim lancem i slabo prodire u već kolonizirano područje jugozapadne Francuske (prema Habel i dr. 2005)

1.5.2 Biogeografska klasifikacija Europe

U trajnom procesu mijene okoliša i evolucije života razvila se kontemporalna geografska distribucija europskih biota (u koje spadaju i biljke koje čine šumsku vegetaciju), a temeljem koje je u kombinaciji sa drugim značajno određujućim obilježjima staništa izvršena klasifikacija na 11 biogeografskih regija Europe (EEA 2011) (Slika 12). S druge strane, uzimajući u obzir

razne klimatološke, geografske, orografske, pedološke i vegetacijske čimbenike, šume u Europi klasificirane su u 14 različitih kategorija koje više ili manje prate granice biogeografske klasifikacije, nešto su raznovrsnije i često geografski disjunktne (Prilog 1).



Slika 12. Prikaz biogeografskih regija Europe prema klasifikaciji Europske agencije za okoliš. Preuzeto sa <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/figures/biogeographical-regions-in-europe-1> (EEA 2011)

1.6 Hipoteze, implikacije na zaštitu šuma i ciljevi istraživanja

Sve je više dokaza da je genska raznolikost populacije vrlo važna za individualnu sposobnost preživljavanja (Frankham i dr. 2002, Hansson i Westerberg 2002, Reed i Frankham 2003). Meta analize pokazale su da je osjetljivost populacija na eksinkciju negativno korelirana sa pripadajućom regionalnom raznolikosti gena proizašlom iz njene biogeografske povijesti. U skladu s time, kontinentalne populacije su generalno više ugrožene u zapadnim dijelovima

Europe nego u istočnim, dok su mediteranske populacije vitalnije i otpornije na „genski bogatijem“ jugu nego na sjeveru (Schmitt i Hewitt 2004).

Filogeografija opisuje geografsku distribuciju genealoških linija, koristeći informacije iz molekularne i populacijske genetike, demografije, povijesne geografije i filogenetike (Avice 1998) te tako omogućava bolji uvid u distribuciju gena u prostoru i vremenu (Hewitt 2001).

Promatrajući raznolikost gena kao osnovu bioraznolikosti i evolucije organizama (Ramel 1998), razlike u stopi varijabilnosti mogu nam dati suptilne informacije o potencijalnom fitnessu istraživanih populacija, odnosno razlika u potencijalnom fitnessu između populacija (Barett i Schluter 2008, Lande 1998). Nadalje, informacije o raznolikosti gena i geografskoj distribuciji genealoških linija (odnosno njihove geografske strukture) u istraživanim populacijama, mogu poslužiti za naknadne testove korelacije sa drugim osobinama koje istraživačima mogu biti od interesa. Povrh toga, utvrđivanjem temporalne distribucije genealoških linija (distribucije i frekvencije haplotipova) može se stvoriti osnova za naknadna praćenja migracijskih tokova između populacija od interesa. Shodno tome, podaci dobiveni iz filogeografskih istraživanja predstavljaju vrijedan izvor informacija za unapređenje metoda i donošenje odluka ne samo u šumarstvu već i u drugim biotehničkim disciplinama u svrhu provođenja biosigurnosnih mjera (Meyerson i Reaser 2002). U šumarstvu kao disciplini od posebnog interesa u sklopu ovog istraživanja, takve informacije mogu doprinjeti kvalitetnijoj i racionalnijoj provedbi mjera monitoringa šumskih štetnika i donošenju odluka za uspješno provođenje integralne zaštite šuma u svijetlu globalnih klimatskih promjena (Boykin i dr. 2012, deWaard i dr. 2010, Vanhanen i dr. 2007).

Na temelju izvještaja o postojanju varijabilnosti u populacijskoj dinamici između geografski razdvojenih populacija gubara u Europi (Alalouni i dr. 2013, Bogenschutz i dr. 1989, Grijpma 1989, Hrašovec i Harapin 1999, Pernek i Pilaš 2005) postavlja se logično pitanje mogućeg postojanja genetičkih razlika između populacija gubara na regionalnoj i lokalnoj razini. Geomorfološke karakteristike Europskog kontinenta i povijesni proces postglacijalne rekolonizacije europskih biota potkrepljuju te pretpostavke (Hewitt 1999).

Uvidom u dosadašnja istraživanja utvrđeno je nedostatan poznavanje raznolikosti gena i filogeografije gubara u Europi. Stoga je ova doktorska disertacija prvo istraživanje koje traži odgovore na ta pitanja. Istraživanje provedeno u sklopu ove doktorske disertacije rezultiralo je utvrđivanjem značajnih genetičkih razlika između populacija gubara u Hrvatskoj, razdvojenih planinskim lancem Dinarida (Lacković i dr. 2015).

Ciljevi doktorske disertacije su slijedeći:

1. pokušati utvrditi gensku raznolikost populacija sa većeg broja lokaliteta u Europi,
2. pokušati utvrditi postoji li strukturiranje u distribuciji genealoških linija,
3. pokušati utvrditi postojanje i stupanj migracijskih procesa između populacija,
4. pokušati detektirati indikacije demografskih procesa i eventualne razlike među populacijama,
5. pokušati utvrditi implikacije dobivenih rezultata na aspekte zaštite šuma u svjetlu globalnih klimatskih promjena.

Uzimajući u obzir polifagni karakter gubara, za pretpostaviti su vrlo male vjerojatnosti strukturiranja striktno po biogeografskim regijama ili kategorijama šuma. Sukladno tome za testiranje geografske strukturiranosti, zbog jasnije određenih geografskih granica, u obzir će se uzeti biogeografske regije u kombinaciji sa postojećim paradigmama postglacijalne rekolonizacije europskih biota i poznatih podstruktura unutar refugija (Habel i dr. 2005, Hewitt 1999, Schmitt 2007). U svrhu identificiranja pripadnosti populacije određenoj biogeografskoj regiji iznimnu primjenjivost i svrhu imaju alati daljinjskih istraživanja i geografskog informacijskog sustava (GIS) kao sustava koji omogućuje povezivanje podataka korištenjem geografske lokacije kao zajedničke varijable (Foote i Lynch 2011, Maliene i dr. 2011).

Zbog nedostatne polimorfnosti i malobrojnosti poznatih nDNA biljega gubara, njihova primjena najvjerojatnije ne bi polučila dovoljnu rezoluciju za filogeografska istraživanja na razini Europe, dok su s druge strane mtDNA biljezi uspješno korišteni u svim dosadašnjim globalnim istraživanjima gubara koja su proveli Bogdanowicz i dr. (1997), Keena i dr. (2008) te deWaard i dr. (2010), indicirali potencijalnu primjenjivost za filogeografska istraživanja na nižim razinama (kao što je unutarvrsta i međupopulacijska raznolikost). U skladu s time, ali i s drugim komparativnim prednostima mtDNA biljega i dostupnim resursima, za ovo je istraživanje odabrana sekvenca visoko polimorfne 3' regije COI (Cytochrome oxidase subunit one) gena, determinirane i okarakterizirane kao pogodnog biljega za intraspecifična i interpopulacijska istraživanja na kukcima (Lunt i dr. 1996).

2 MATERIJALI I METODE

2.1 *Institucije u kojima je provedeno istraživanje*

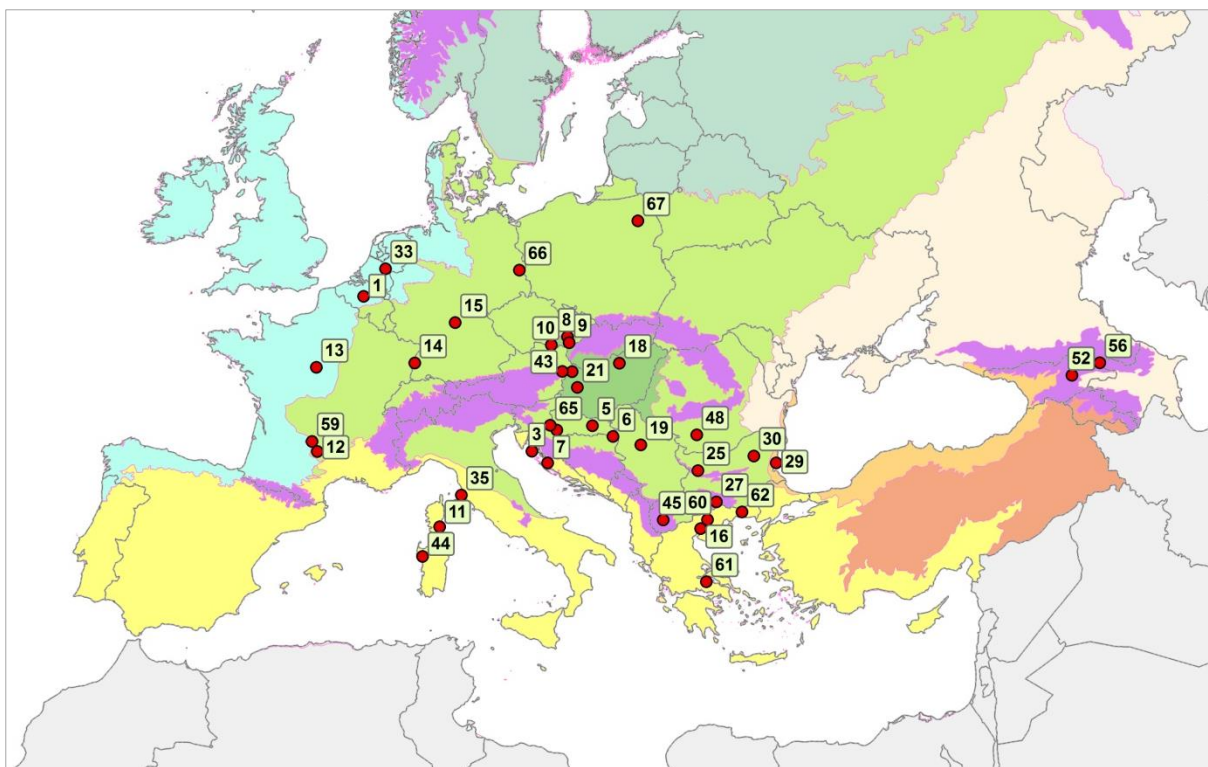
Sve analize, segmenti istraživanja, korištena oprema, materijali i literatura te naobrazba i konzultacije koje su prethodile izradi ove doktorske disertacije provedeni su u slijedećim institucijama:

- Hrvatski šumarski institut u Jastrebarskom, Zavod za zaštitu šuma i lovno gospodarstvo
- Institut für Forstentomologie, Forstpatologie und Forstschutz (IFFF) pri Sveučilištu BOKU (Bodenkultur Universität) u Beču,
- Šumarski Fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za zaštitu šuma i lovstvo.

2.2 *Sakupljanje uzoraka*

2.2.1 *Lokaliteti sakupljanja*

Uzorci su ovisno o dostupnosti populacija sakupljeni u razdoblju od 2010. do 2014. godine na širem području Europe (Slika 13). Uzorci su sakupljeni djelom samostalno, a djelom u međunarodnoj suradnji sa kolegama istraživačima koji su imali bolji uvid u prisutnost populacija. Ukupno je sakupljeno 635 jedinki sa 38 lokaliteta u 16 zemalja, uključujući i Gruziju kao najistočniju zemlju na granici Europe i Azije. Prilikom sakupljanja za svaki su uzorak zabilježeni podaci o sakupljaču, vrsti domaćina i geografske koordinate (Tablica 1).



Slika 13. Lokaliteti sa kojih su prikupljeni uzorci. Crvene točke predstavljaju kotu, a uokvireni brojevi kod lokaliteta sukladno Tablica 1.

2.2.2 Metoda sakupljanja i čuvanja uzoraka

Uzorci su sakupljeni u svim razvojnim stadijima osim kukuljica ovisno o dostupnosti i pojavnosti na određenom lokalitetu pazeći pritom da se sakupljaju sa razmjerno udaljenih stabala kako bi se izbjeglo uzorkovanje iste linije mtDNA.

Uzorci jajnih legala sakupljeni su sa kore stabala tako da su jajna legla pojedinačno stavljana u zatvorene posudice i bez dodavanja ikakvih sredstava dopremljene u entomološki laboratorij Zavoda za zaštitu šuma i lovno gospodarenje pri Hrvatskom šumarskom institutu, Jastrebarsko. Jajna legla su zatim držana u laboratoriju do eklozije te je tjedan dana nakon eklozije iz svakog pojedinačnog uzorka uzimana po jedna ličinka koja je konzervirana u 99% etanolu i čuvana do analize u hladnjaku na -20°C.

Uzorci ličinaka i imaga već pri skupljanju pojedinačno su stavljani u posudice i konzervirani u 99% etanolu te su po dopremanju u laboratorij spremni u hladnjak na -20°C i tako čuvani do analize.

Za svaki je lokalitet zabilježen lokalni naziv područja na kojem je obaljeno sakupljanje, geografske koordinate, dominantna vrsta drveća, datum sakupljanja te ime i prezime sakupljača.

Uzorcima je dodjeljivan jedinstven kod koji se sastojao od koda lokaliteta i rednog broja jedinke sa navedenog lokaliteta, međusobno razdvojenih znakom minus. Konačan kod uzorka imao je oblik > kod lokaliteta – broj jedinke < (npr. 1-1, 1-2, .., 13-4, itd.) te je svaka tako kodirana jedinka unesena u tablicu. U istraživanje su uključeni i podaci koje su objavili Lacković i dr. (2015).

2.3 Laboratorijske analize metodama molekularne biologije

2.3.1 Ekstrakcija DNA i kodiranje uzoraka

Prije same ekstrakcije svaki je uzorak vizualno provjeren te su eventualno degradirani uzorci odbačeni. Ekstrakcija DNA je provedena iz ukupno 563 uzoraka (Tablica 1).

Sukladno razvojnem stadiju jedinke pojedinog uzorka, za ekstrakciju je korišten cijeli organizam (novoizlegle ličinke), dvije abdominalne noge (odrasle ličinke) ili mišićno tkivo iz polovice toraksa (imaga). Za disekciju dijelova korištene su pincete i skalpel koji su prije prve i između disekcije svakog pojedinog uzorka isprani u 96% etanolu i spaljeni na plameniku te je za svaki uzorak korištena nova podloga od staničevine kako bi se spriječila među-kontaminacija uzoraka.

Ekstrakcija je iz svih uzoraka obavljena korištenjem Mammalian Genomic DNA miniprep kita (Sigma Aldrich, SAD). Svi puferi i otopine snabdjeveni su sa kitom. DNA ekstrakcija obavljena je prema protokolu proizvođača; svaka jedinka stavljena je u 1,5 ml Eppendorf epruvetu i homogenizirana u 180 µl otopine za liziranje T (B-6678). Sigma proteinaza K dodana je u smjesu koja je inkubirana u termotresilici (eng. termosaker) na 55°C i 450 okretaja u minuti u trajanju od 2,5 sata. Nakon inkubacije u smjesu je dodana RNaza A snabdjevena sa kompletom reagensa i ostavljena 2 minute na sobnoj temperaturi. Zatim je u smjesu dodano 200 µl otopine za liziranje C (B-8803) i inkubirana 10 minuta na 70°C. DNA u epruveti je precipitirana dodavajući 200 µl apsolutnog etanola i takva je smjesa prenesana na kolonu sa silika-membranom za vezanje. Kolone su dva puta isprane sa 500 µl otopine za ispiranje a genomska DNA eluirana je u 50µl puferske otopine.

Tablica 1. Popis i naziv lokaliteta, geografske koordinate, vrsta domaćina sa kojega su skupljeni uzorci, ime sakupljača na lokalitetima na kojima nije obavljeno samostalno sakupljanje, datum sakupljanja, broj sakupljenih jedinki i broj jedinki iz kojih je izolirana genomska DNA. Kod lokaliteta korišteno je tijekom analiza za označavanje uzoraka kako bi se olakšala obrada u specifičnim programima.

Br.	Kod	Država	Lokalni naziv	GPS koordinate		Domaćin (vrsta drveća)	Sakupljač	Datum sakupljanja	Boj jedinki	Ekstr. DNA
				Širina (S)	Dužina (I)					
1	1	Belgija	Auderghem	50°49'15"	4°24'34"	Fagus sylvatica	Nicolas Meurisse	06.07.2010.	12	11
2	3	Hrvatska	Cres	44°39'04"	14°28'08"	Quercus ilex	Lacković i dr. (2015)	05.10.2010.	37	36
3	5	Hrvatska	Našice	45°28'07"	17°59'13"	Quercus robur	Lacković i dr. (2015)	23.02.2010.	16	16
4	6	Hrvatska	Strošinci	44°56'54"	19°04'29"	Quercus robur	Lacković i dr. (2015)	23.02.2010.	5	5
5	7	Hrvatska	Zadar	44°08'45"	15°18'07"	Quercus pubescens	Lacković i dr. (2015)	09.06.2010.	19	19
6	8	Češka	Bučovice	49°06'50"	17°02'28"	Quercus petraea	Jaroslav Holuša	20.08.2010.	11	11
7	9	Češka	Hodonin	48°52'45"	17°05'50"	Quercus robur		20.08.2010.	7	7
8	10	Češka	Znojmo	48°50'47"	16°00'44"	Quercus petraea		20.08.2010.	7	7
9	11	Francuska	Korzika, Conca	41°42'40"	09°20'03"	Quercus suber	Alain Roques	26.07.2010.	13	13
10	12	Francuska	Marcillac Vallon	44°28'06"	02°28'02"	Quercus pubescens		03.08.2010.	7	7
11	13	Francuska	Orleans la Source	47°48'56"	01°55'09"	Quercus petraea		20.07.2010.	74	28
12	14	Njemačka	Freiburg	48°15'53"	07°45'43"	Quercus robur	Horst Delb	15.07.2010.	36	23
13	15	Njemačka	Kitzingen	49°54'21"	10°11'36"	Quercus petraea	Gabriela Lobinger	03.08.2010.	29	29
14	16	Grč	Thessaloniki	40°46'21"	23°06'18"	Quercus coccifera	Dimitrios Avtzis	13.05.2010.	34	32
15	18	Mađarska	Mátrafüred	47°49'42"	19°57'48"	Quercus petraea	György Csoka	04.10.2010.	10	10
16	19	Srbija	Kosmaj	44°28'04"	20°34'00"	Quercus cerris	Milka Glavendekić	04.06.2010.	10	10
17	20	Mađarska	Hanság/Kapuvár	47°42'25"	17°07'16"	Salix sp. i Populus sp.	Ferenc Lakatos	15.11.2010.	13	13
18	21	Mađarska	Kaptalanfa	47°03'56"	17°20'28"	Quercus rubra		15.11.2010.	12	12
19	25	Bugarska	Gabrovnitza	43°05'19"	23°27'37"	Quercus robur	Daniela Kirilova Pilarski	10.05.2011.	5	5
20	27	Bugarska	Perperikon	41°42'53"	24°09'21"	Quercus robur	Daniela Kirilova Pilarski	10.05.2011.	10	10

Br.	Kod	Država	Lokalni naziv	GPS koordinate		Domaćin (vrsta drveća)	Sakupljač	Datum sakupljanja	Boj jedinki	Ekstr. DNA
				Širina (S)	Dužina (I)					
21	29	Bugarska	Slunchev bryag resort	42°44'07"	27°44'06"	Quercus robur	Daniela Kirilova Pilarski	10.05.2011.	5	5
22	30	Bugarska	Ruetz	43°12'43"	26°37'23"	Quercus robur	Daniela Kirilova Pilarski	10.05.2011.	12	12
23	33	Nizozemska	Wageningen	51°58'37"	05°40'46"	Quercus robur	Leen Moraal	30.05.2011.	10	10
24	35	Italija	Piombino	42°59'23"	10°30'11"	Quercus ilex	Pio Federico Roversi, Michele Squarcini	19.5.2011	27	27
25	43	Austrija	Klingenbach	47°45'12"	16°32'19"	Quercus petraea	Gernot Hoch	03.05.2011.	28	28
26	44	Italija	Sardinia, Villanova Monteleone	40°30'37"	08°27'28"	Quercus suber	Mario Contarini	21.02.2011.	14	14
27	45	Makedonija	Kruševo	41°21'43"	21°12'45"	N/A	Irena Papazova, Sterja Načeski	20.05.2011.	10	10
28	48	Rumunjska	Goiesti	44°30'11"	23°44'29"	N/A	Constantin Netoiu	25.05.2011.	20	20
29	52	Gruzija	Kaspi	41°56'30"	44°28'53"	Malus sp.	Medea Burjanadze	30.05.2011.	22	22
30	56	Gruzija	Khechili	41°52'39"	46°07'40"	N/A	Medea Burjanadze	09.06.2011.	7	7
31	59	Francuska	Latronquière	44°50'55"	02°07'01"	Quercus petraea	Alain Roques	26.08.2011.	14	14
32	60	Grčka	Paleokomi/Paggaios-Serres	41°04'47"	23°32'29"	Quercus coccifera	Dimitrios Avtzis	29.05.2012.	18	18
33	61	Grčka	Sperechiada-Fthiotida	38°37'41"	22°58'08"	Quercus coccifera	Dimitrios Avtzis	29.05.2012.	6	6
34	62	Grčka	Xylagani-Komotini	41°07'07"	25°24'19"	Quercus coccifera	Dimitrios Avtzis	29.05.2012.	12	12
35	64	Hrvatska	Sisak	45°13'21"	16°16'33"	Fagus sylvatica	Lacković i dr. (2015)	30.06.2012.	25	25
36	65	Hrvatska	Jastrebarsko	45°38'50"	15°35'12"	Quercus petraea	Lacković i dr. (2015)	30.06.2012.	6	6
37	66	Njemačka	Lieberose	51°54'35"	14°21'09"	Quercus petraea	Andreas Linde	10.09.2013.	12	8
38	67	Poljska	Biebrza Park Narodny	53°17'13"	22°36'39"	Salix sp. i Populus sp.		02.06.2014.	20	15
UKUPNO		16	38						635	563

2.3.2 Lančana reakcija polimerazom – PCR

Umnažanje DNA je obavljeno metodom lančane reakcije polimerazom (eng. Polymerase Chain Reaction) upotrebom početnica UEA5 (5' AGTTTTAGCAGGAGCAATTACTAT 3') i UEA10 (5' TCCAATGCACTAATCTGCCATATTA 3') (Lunt i dr. 1996) čime su dobiveni amplikoni zadnje (3') polovice COI gena duljine oko 800 baza. PCR je proveden u 20 µl reakcijama sastavljenima od 2 mM MgCl₂, 100 µM dNTPs (Fermentas, Litva), 0,5 µM svake početnice (UEA5 i UEA10) i 1U Taq polimeraze (Fermentas, Litva). U tako pripremljenu smjesu dodavano je 2 µl izolirane DNA iz uzoraka. Lančana reakcija polimerazom je provedena upotrebom Primus 25 Thermal Cyclera (Peqlab, Njemačka) u 200 µl epruveticama (Biozym, Njemačka). Lančana reakcija polimerazom sastojala se od početne denaturacije na 94°C u trajanju od 2 minute, nakon kojeg slijedi 33 ciklusa denaturacije na 94°C u trajanju od 30 sekundi, sljepljivanja početnica i kalupa DNA na 48°C u trajanju od 60 sekundi te elongacije na 68°C u trajanju od 60 sekundi. Završeno je provedena elongacija na 68°C u trajanju od 10 min.

U svakom postupku lančanih reakcija polimerazom korištena je negativna kontrola, epruveta u koju je dodavana H₂O_{dd} umjesto DNA uzorka.

2.3.3 Elektroforeza u agaroznom gelu, pročišćavanje i sekvenciranje

Provjera uspješnosti PCR reakcija obavljana je elektroforezom u agaroznom gelu. Od svakog uzorka 4 µl PCR produkta je pomješano sa nosećim puferom (Fermentas, Litva) i umetnuto u zasebnu jažicu u 2% agaroznom gelu sa 0,5µg/ml bojila GelRed Nucleic Acid Stain (Biotium, USA). U svakoj liniji jažica u zadnju jažicu dodana je 100pb ljestvica (Fermentas, Litva) te je tako pripremljen gel uronjen u kadu sa 1 x TAE puferom za elektroforezu.

Po završetku elektroforeze produkti su vizualizirani na UV transiluminatoru i fotografirani, te su na temelju postojanja ili ne postojanja produkta lančane reakcije polimerazom uzorci prihvaćani ili odbacivani za daljnju analizu, a cijeli je proces zabilježen u pratećoj Excel tablici istraživanja (primjer prikazan u Prilogu 3).

Tijekom cijelog istraživanja nije zabilježen niti jedan slučaj onečišćenja negativne kontrole.

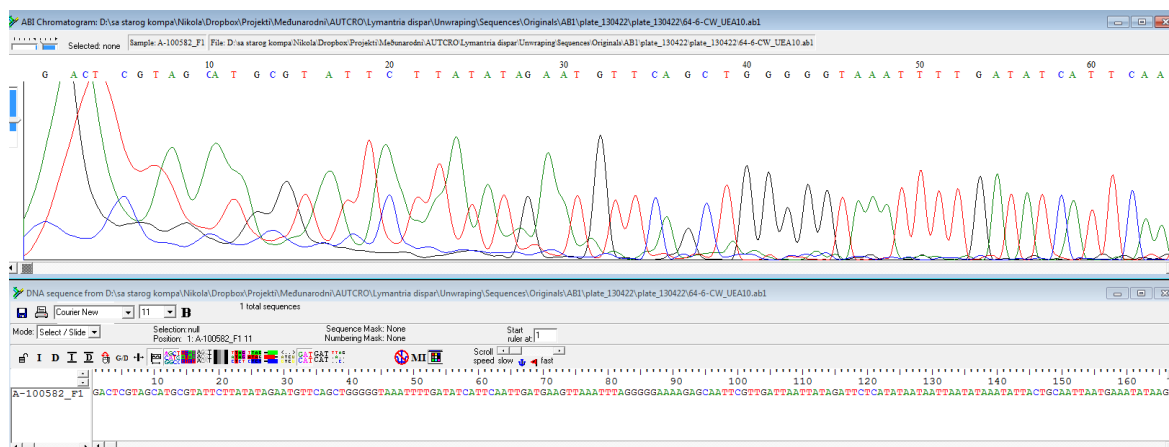
Pročišćavanje pozitivnih produktata i sekvenciranje sa UEA10 početnicom obavljeno je kod komercijalnog pružatelja usluga sekvenciranja Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Njemačka). Kromatogrami i liste sekvenci isporučene su elektronički.

2.4 Analiza sekvenci i obrada podataka

Svaka je sekvenca detaljno provjerena vizualnim pregledom kromatograma (Slika 14) i optimizirana izrezivanjem nejasnih krajnjih dijelova u programu BioEdit (Hall 1999). Sekvence u kojima bi se pojavile dvosmislene baze kao moguća pojava NUMT ili heteroplazmije odbačivane su. Konačan skup sekvenci sravnjen je programom ClustalW implementiranim u program BioEdit bez promjene zadanih postavki te su nepotpuno preklapljeni krajevi izrezani. Dobivene sekvence grupirane su u haplotipove na temelju podudarnosti nukleotidnih slijedova upotrebom programa TCS1.21 (Clement i dr. 2000).

Svaki haplotip predstavljen samo jednom sekvencom (tzv. samotnjak; eng. singleton) provjeren je ponavljanjem lančane reakcije polimerazom (PCR) i sekvenciran sa drugog kraja kako bi se isključile moguće pogreške Taq polimeraze u polimerizaciji lanca DNA.

Upotrebom sekvence jednog haplotipa provedena je pretraga banke gena (GenBank) pri nacionalnom centru za biotehnološke informacije (National Center for Biotechnology Information – NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) korištenjem alata za lokalno sravnjivanje nukleotidnih sekvenci (Basic Local Alignment Tool – nucleotide BLAST). Potraga je rezultirala pronalaskom 29 dodatnih sekvenci gubara, no nije bilo moguće doći do informacija o njihovom mjestu uzorkovanja i stoga nisu mogle biti uključene u ovo istraživanje. Međutim, pronađene su dvije kompletne sekvence mitohondrijskog genoma gubara na temelju kojih je određen točan položaj pridobivenih haplotipnih sekvenci u COI kodirajućoj regiji mtDNA gubara (Slika 15).



Slika 14. Primjer kromatograma i pripadajuće sekvence prilikom vizualne provjere i optimizacije. U primjeru ove sekvence dio do pozicije 40 bio je izbrisan, isto je učinjeno i sa drugog kraja sekvence. U slučaju da se u ostatku sekvence pojavilo dvosmislenih baza cijela bi sekvenca bila odbačena.

2.4.1 Molekularno filogenetička analiza

Rekonstrukcija filogenetičkog stabla metodom najveće vjerojatnosti (Maximum Likelihood - ML) provedena je programom jModeltest 2.1.7 (Darriba i dr. 2012, Guindon i Gascuel 2003) upotrebljavajući, od 88 testiranih, srednji model filogenije (Average model phylogeny) između samo onih modela koji su unutar 95% rezultata prikladnosti podacima prema korigiranom Akaike informacijskom kriteriju (corrected Akaike Information Criterion – AICc). Robusnost stabla procijenjena je sa 500 replikacija samoučitavanja (eng. bootstrap) u programu MEGA 6 (Tamura i dr. 2013). Genetičke udaljenosti između haplotipova izračunate su u programu MEGA 6 korištenjem Tamura Nei supstitucijskog modela (Tamura i Nei 1993) identificiranog programom jModeltest 2.7.1.

Parsimonska mreža rekonstruirana je korištenjem programa TCS1.21 (Clement i dr. 2000), a za razrješavanje kladogramskih neodređenosti između pojedinih haplotipova korišteni su topološki, geografski i frekvencijski kriterij (Crandall i Templeton 1993).

2.4.2 *Populacijsko genetički parametri i analiza geografske strukture*

Populacijsko genetički indeksi haplotipske raznolikosti H_d (sredina $\pm$ SD), nukleotidne raznolikosti π (sredina $\pm$ SD) i srednji broj razlika među parovima MNPD (sredina $\pm$ SD) za svaku populaciju izračunati su pomoću programa ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier i Lischer 2010). Indeks bogatstva alela (Allelic richness r) izračunat je za sve populacije nakon rarefakcije na 5, metodom koju su predložili Petit i dr. (1998) u programu CONTRIB. Bogatstvo alela je mjera genske raznolikosti koja određuje broj alela po lokusu ovisno o efektivnoj veličini populacije i stoga se smatra da je bolji indikator demografskih promjena u prošlosti od heterozigotnosti. Budući da je u ovom istraživanju korišten samo jedan biljeg jedna jedinka predstavlja jedan lokus, a broj haplotipova predstavlja broj alela pronađenih u istraživanoj populaciji. Kako je u većini filogenetičkih istraživanja broj uzorkovanih jedinki po populaciji različit, ovu mjeru genske raznolikosti treba standardizirati na fiksiranu veličinu uzorka. Kao metodu standardizacije autori su odabrali metodu rarefakcije koju je predložio Hurlbert (1971) za standardizaciju ekološke mjere raznolikosti vrsta između različitih staništa, čime se mjera raznolikosti standardizira na razinu populacije sa najmanjim uzorkom.

Test značajnosti filogeografske strukture procijenjen je testirajući da li je G_{ST} (koeficijent raznolikosti gena svih populacija) signifikantno manji od N_{ST} (ekvivalentni koeficijent koji u obzir uzima i sličnosti između haplotipova), koristeći 1000 permutacija u programu PERMUT (Pons i Petit 1996) (https://www6.bordeaux-aquitaine.inra.fr/biogeco_eng/Scientific-Production/Computer-software/Contrib-Permut).

Kako bi se utvrdilo geografsko strukturiranje, testiran je izvor molekularne varijance na tri hierarhijska nivoa: varijanca između grupa populacija (F_{CT}), varijanca između populacija unutar grupa (F_{ST}) i varijanca unutar populacija (F_{SC}), prostornom analizom molekularne varijance. Odabir grupiranja populacija proveden je testom prostorne analize molekularne varijance (Spatial Analysis of Molecular Variance) upotrebom programa SAMOVA 2 (Dupanloup i dr. 2002), koji metodom simuliranog naližeganja teži prema maksimiziranju udjela genske varijance kao rezultata razlika među grupama. Dodatno, u programu ARLEQUIN proveden je test strukturiranosti analizom molekularne varijance (AMOVA, Excoffier i dr. 1992) za grupe određene na temelju objektivnog geografskog grupiranja uzimajući u obzir pripadnost biogeografskoj regiji, pretpostavku modela ekspanzije prema paradigmi „leptir“ i izdvajanjem pojedininih populacija iz logičnih grupa s ciljem minimiziranja udjela varijance kao rezultata razlika unutar grupa. U oba je testa statistička

značajnost hijerarhijskih indeksa fiksacije haplotipske raznolikosti (F_{CT} , F_{ST} , F_{SC}) procijenjena heurističkom metodom ne-parametrijskih permutacija u 1000 nasumičnih razvrstavanja.

Osim kvantificiranja stupnja genske diferencijacije hijerarhijskim fiksacijskim indeksima (F_{ST} , F_{CT} , F_{SC}), provedena je među-parovna (eng. pairwise) analiza fiksacije haplotipske raznolikosti F_{ST} između populacija (pandan indeksu fiksacije homozigotnosti). Među parovni fiksacijski indeksi su kvantificirana mjera fiksacije populacijsko specifične genske raznolikosti između svakog para populacija. Pod pretpostavkom postojanja toka gena između populacija, daljnjom derivacijom fiksacijskih indeksa ustanovljen je indeks M , koji predstavlja kvantifikaciju toka gena, a koji u teoretskom smislu pokazuje broj jedinki koji u jednoj generaciji migrira između dviju populacija (Slatkin 1995). No iako kvantitetu tog podatka ne možemo uzimati kao apsolutnu (Holsinger i Weir 2009), ona nam ipak pokazuje relativnu sliku toka gena (odnosno migracija) između populacija. Analiza je provedena u programu ARLEQUIN.

2.4.3 GIS, objektivno grupiranje i vizualizacija rezultata

Za potrebe kartografskih delimitacija daljnjim istraživanjem korišten je program ArcMap 9.3 (ESRI, SAD). Delimitacija i utvrđivanje pripadnosti pojedinih populacija određenoj biogeografskoj regiji provedena je korištenjem prostornih vektorskih poligona biogeografskih regija Europe u shapefile obliku datoteka preuzetih od Europske agencije za okoliš (BiogeoRegions2011_shapefile, CoE i DG ENV; <http://www.eea.europa.eu/legal/copyright>), smješten u koordinatni referentni sustav ETRS_1989_LAEA_L52_M10 (EEA, 2011). Osim određivanja pripadnosti određenoj biogeografskoj regiji, za objektivna grupiranja populacija u obzir je uzeta i pretpostavljen model postglacijalne rekolonizacije prema paradigmi „leptir“ (Habel i dr. 2005).

Karta lokaliteta uzoraka (populacija), karta distribucije haplotipova po populacijama te vizualizacija grupa populacija prema rezultatima AMOVA-e konstruirane su u programu ArcMap 9.3.

Vizualizacija distribucije genske raznolikosti provedena je u programu ArcMap 9.3 korištenjem genetičkog krajobraznog alata za raznolikost jedne vrste prema predloženim uputama programera (Genetic Landscape Toolbox; Vandergast i dr. 2011).

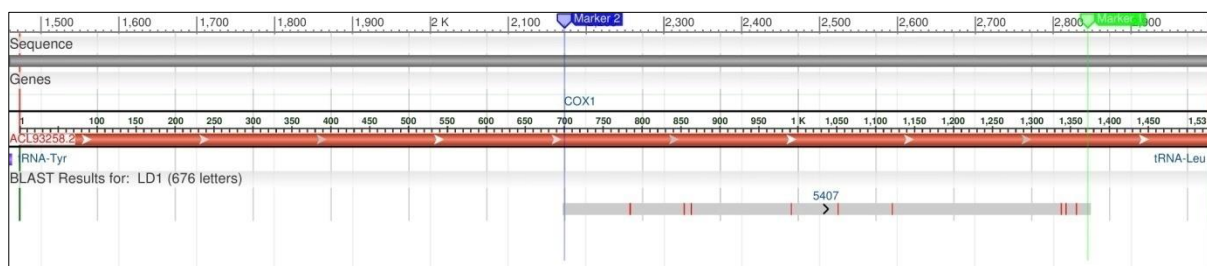
3 REZULTATI I RASPRAVA

3.1 Obrada DNA sekvenci, molekularno filogenetička rekonstrukcija i genska raznolikost

3.1.1 Pridobivanje, verifikacija i sravnjivanje sekvenci

Od 563 ekstrahiranih uzoraka, elektroforezom u agaroznom gelu potvrđena je uspješna amplifikacija 505 uzoraka koji su odaslani na sekvenciranje. Vizualnom verifikacijom i optimizacijom sekvenci na temelju pridobivenih kromatograma potvrđeno je ukupno **497** valjanih sekvenci za molekularno filogenetičke analize iz 38 različitih populacija s područja 16 Europskih država uključujući i Gruziju. Sravnjivanjem su definirane sekvence potpuno preklapljene u duljini od 676 pb. Grupiranjem sekvecni na temelju podudarnosti nukleotidnih slijedova determinirano je ukupno 60 haplotipskih sekvenci (Prilog 4) na temelju 46 mutacija opaženih na 25 samotnjačkih (singletone) i 19 parsimonski informativnih pozicija (ukupno 44 polimorfne pozicije). Frekvencija haplotipova u ukupnom skupu podataka i distribucija po populacijama prikazana je u Tablica 2.

Sravnjivanjem sekvence haplotipa LD1 sa poznatom sekvencom kompletnog mtDNA genoma gubara deponiranoj u bazi GenBank (NCBI, SAD) utvrđeno je da sekvence haplotipova duljine 676 pb sa preko 99% podudarnosti pripadaju vrsti *Lymantria dispar*, a položajem odgovaraju rasponu između 700 do 1376 baze kodirajuće regije COI gena gubara (Slika 15).



Slika 15. Haplotipske sekvence nalaze se u zadnjoj polovici COI gena u rasponu od 700 do 1376 baze u odnosu na poznatu sekvencu COI gena gubara kako je utvrđeno alatom za lokalno sravnjivanje (BLAST) na Banci Gena pri NCBI.

Najčešći pronađeni haplotip je LD13 sa 134 sekvenci, zatim LD4 sa 117 pa LD7 sa 57 sekvenci (Slika 16). Slijedi Haplotip LD61 sa 29 sekvenci no sve su porijeklom iz iste populacije. Zatim slijede haplotip LD20 sa 21, LD6 sa 15 te LD1 10 sekvenci te još 13 haplotipova sa po 3 do 9 sekvenci i 14 sa po dvije sekvence, dok je 26 haplotipova zastupljenih samo sa jednom sekvencom i potvrđeno dvostrukim umnažanjem lančanom reakcijom polimerazom i sekvenciranjem (Tablica 2).

Svih 60 haplotipskih sekvenci (uključujući i haplotipove iz Gruzije) spojeno je u jednu parsimonsku mrežu vjerojatnosti 95% (Slika 17). Koraci koji povezuju haplotipove (a predstavljaju mutacijske razlike) indicirani su linijama, a svaki „nedostajući haplotip“ indiciran je praznom kružnicom.

Uzimajući u obzir uže područje Europe (bez populacija iz Gruzije koje su očito divergentne), sa najzastupljenijim haplotipom LD13 u parsimonskoj mreži povezano je 24 haplotipa, a 18 haplotipova razlikuje se za samo jednu mutaciju. Sa haplotipom LD4 povezano je 13 haplotipova od kojih se devet razlikuje za po jednu mutaciju. Haplotip LD7 u parsimonskoj mreži intermedijarno je sa po jednom mutacijom povezan sa haplotipovima LD13 i LD4. Izuzev dva najveća haplotipa, sa haplotipom LD7 povezano je 12 haplotipova od kojih se 9 razlikuju samo za jednu mutaciju. Haplotip LD61 razlikuje se za jednu mutaciju od haplotipa LD4, zabilježen je u velikom broju samo u jednoj populaciji te je sa njim u mrežu spojeno 4 haplotipa od kojih tri sa po jednom mutacijom. Haplotip LD20 razlikuje se za jednu mutaciju od haplotipa LD13, a sa njim je u parsimonsku mrežu sa po jednom mutacijom spojeno 4 haplotipa. Haplotip LD6 razlikuje se za jednu mutaciju od haplotipa LD13, a sa njim je u mrežu spojeno 7 haplotipova od kojih se 6 razlikuje samo za jednu mutaciju. Najveći broj mutacijskih razlika unutar populacija iz uže Europe razvio se između haplotipova LD5 i LD31, a razlikuju se za devet mutacija. Srednji broj mutacijskih razlika između parova haplotipova za sve populacije iznosi 4,03, a bez populacija iz Gruzije 3,41.

Haplotipovi iz Gruzije sa sedam su mutacija odvojeni od ostalih haplotipova indicirajući veliki stupanj divergencije. Zanimljivo je da je u Gruziji prisutan i haplotip LD4 koji je dosta široko prisutan i u ostalim europskim populacijama osim u Panonskoj nizini. Također je zanimljivo da je haplotip LD53 sa sedam mutacijskih koraka najbliže spojen sa haplotipom LD62 koji je inače pronađen u Grčkoj. Haplotip LD62 za jednu se mutaciju razlikuje od najzastupljenijeg haplotipa LD13 (Slika 17).

Od ispitanih 88 supstitucijskih modela programom jModeltest 2.1.7 sa potpuno otvorenim postavkama za traženje najboljeg osnovnog Maximum Likelihood stabla, utvrđeno je da prema korigiranom Akaike informacijskom kriteriju u 95% doprinosa podataka ulazi devet različitih modela supstitucije te je za konstrukciju inicijalnog stabla odabran srednji model filogenije koji kombinira jednakim udjelom informacije iz svih devet modela. Supstitucijski modeli testirani su i prema Bayesian informacijskom kriteriju te je prema oba kriterija kao najprikladniji supstitucijski model odabran Tamura-Nei (Tamura i Nei 1993) sa invariabilnim pozicijama (Prilog 5) pa je taj model korišten za test robustnosti osnovnog stabla dobivenog pomoću metode najveće vjerojatnosti (Maximum Likelihood) upotrebom programa MEGA 6 (Slika 18).

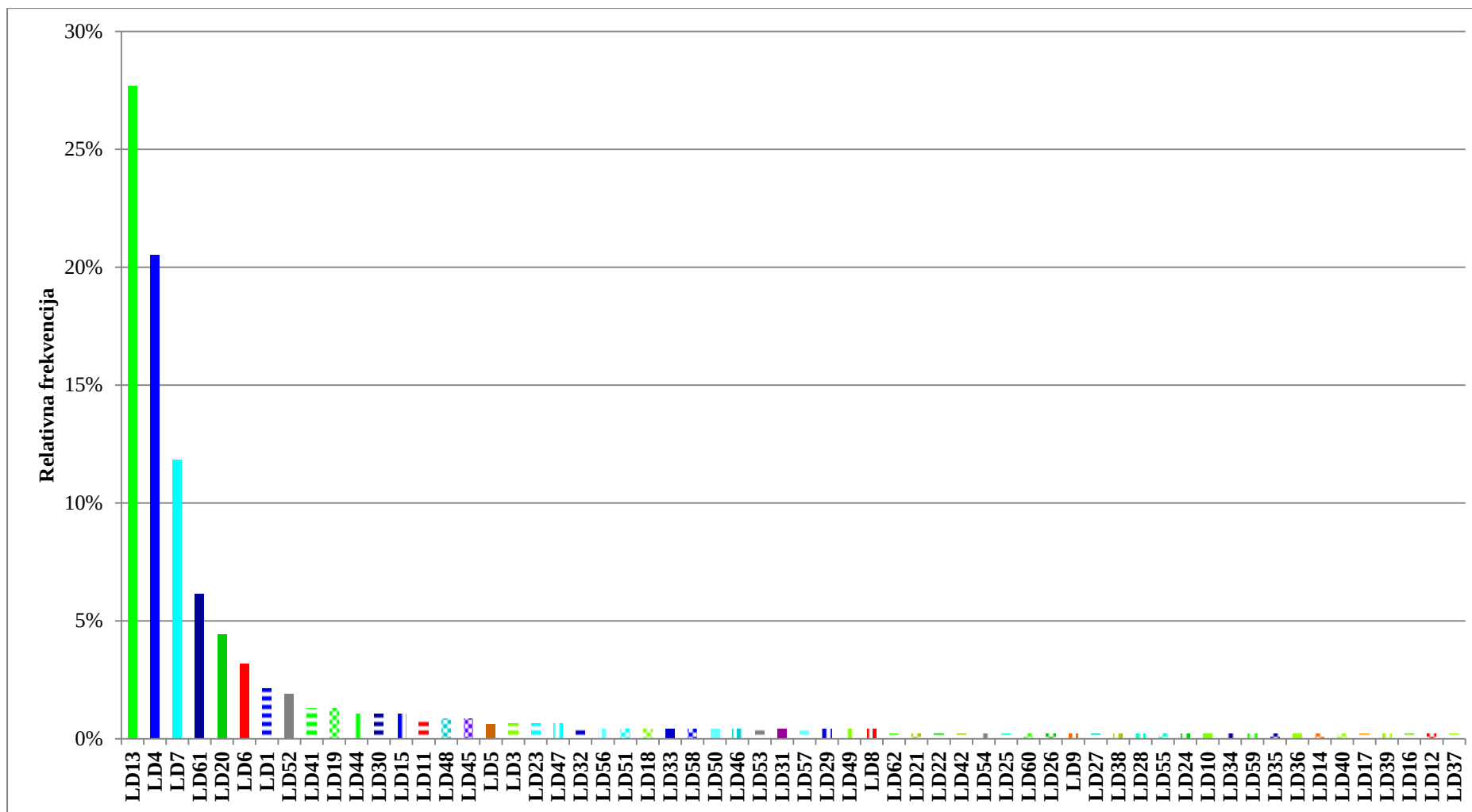
Molekularno filogenetička rekonstrukcija rezultirala je filogenetičkim stablom sa jasno razdvojenim i statistički podržanim monofiletskim grupama (kladij; eng. clade) europskih i Gruzijskih haplotipova (kladij A i kladij B), dok je daljnje grupiranje podskupina europskih haplotipova jasno izraženo i u skladu sa parsimonskom mrežom, međutim skupine su slabo statistički podržane. I ovdje je zanimljivo da je gruzijska podskupina najbliže spojena sa haplotipom LD62 iz Grčke, dok je haplotip LD4, koji je prisutan i u Gruziji, smješten na potpuno udaljenu stranu filogenetičkog stabla, a ista je situacija i u parsimonskoj mreži. Matrica p-udaljenosti između parova sekvenci (Prilog 6) pokazuje da razlike između haplotipa iz Gruzije i haplotipa iz ostatka Europe variraju između 0,01 (1%) (npr. između LD53 i LD62) i 0,019 (1,9%) (npr. između LD45 i LD52) sa prosijekom 0,015 (1,5%) dok razlike unutar Europe bez Gruzije variraju između 0,001 (0,1%) i 0,012 (1,2%) sa prosijekom 0,005 (0,5%). Najdivergentniji su haplotipovi LD31 i LD5 čija međusobna razlika i predstavlja maksimalnu između uzoraka unutar Europe bez Gruzije. Sve p-udaljenosti unutar su intraspecifičnih vrijednosti divergencije (0-3,38%) koje su u istraživanju vrsta iz roda *Lymantria* ustanovili deWaard i dr. (2010).

Tablica 2 Distribucija haplotipova po lokalitetima razvrstana silazno prema ukupnoj frekvenciji pojedinog haplotipa u cijelom skupu podataka (sumirano u zadnjoj desnoj koloni). Ukupan broj sekvenci po lokalitetu sumiran je u posljednjem redu, a suma u najdonjoj desnoj čeliji predstavlja ukupan broj sekvenci odnosno ukupan broj uzoraka na temelju kojeg je provedena filogeografska analiza.

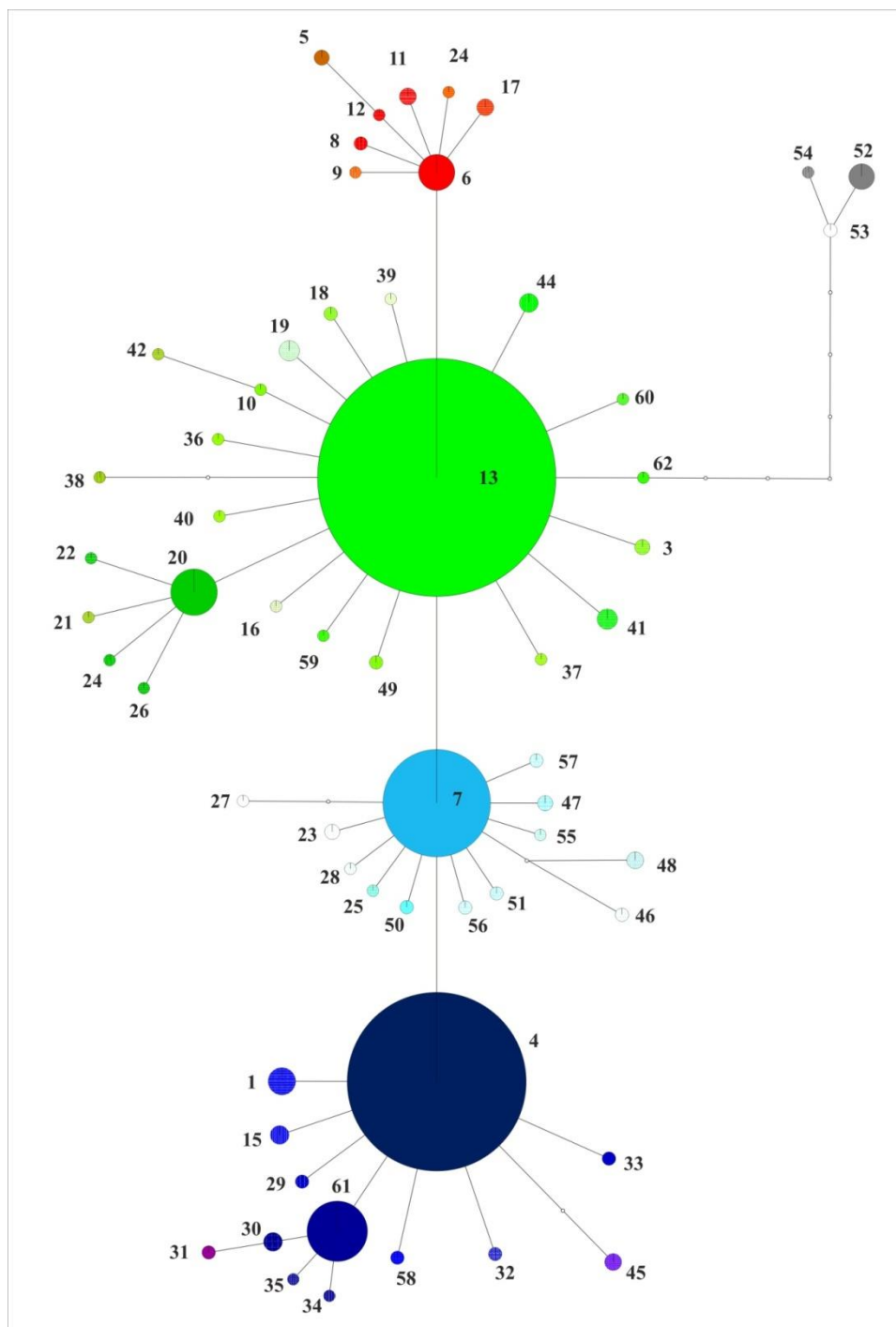
Haplotip	Kod lokaliteta																															Ukupno							
	1	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	25	27	29	30	33	35	43	44	45	48	52	56	59		60	61	62	64	65	66	67
LD13			14	5		7	6	5							7	5	5	3	5	5		4			14		3	14						6	19	5		2	134
LD4		12			6				1		2	12	17		1					2		4	6	9			2		4	1		10	5	3			8	12	117
LD7		6							9	4	11	2										1	7		10					6								1	57
LD61														29																									29
LD20	1					1	1				7	1					4								4						1				1				21
LD6		9			3																						1								2				15
LD1	10																																						10
LD52																													6	3									9
LD19						1																			3										1	1			6
LD41																		2							4														6
LD15					3																		2																5
LD30												2	3																										5
LD44																				5																		5	
LD11		1			3																																	4	
LD45																						4																4	
LD48																								4														4	
LD3		3																																				3	
LD5		2			1																																	3	
LD23										1																					2							3	
LD47																								3														3	
LD8		1			1																																	2	
LD18						1										1																						2	
LD29												2																										2	

Haplotip	Kod lokaliteta																																Ukupno								
	1	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	25	27	29	30	33	35	43	44	45	48	52	56	59	60		61	62	64	65	66	67		
LD31													2																												2
LD32													1															1													2
LD33													2																												2
LD46																									2																2
LD49																										2															2
LD50																											2														2
LD51																											2														2
LD53																															2										2
LD56																																2									2
LD57																																2									2
LD58																																	2								2
LD9		1																																							1
LD10		1																																							1
LD12		1																																							1
LD14					1																																				1
LD16								1																																	1
LD17					1																																				1
LD21												1																													1
LD22								1																																	1
LD24											1																														1
LD25											1																														1
LD26											1																														1
LD27											1																														1
LD28									1																																1
LD34												1																													1
LD35														1																											1
LD36															1																										1

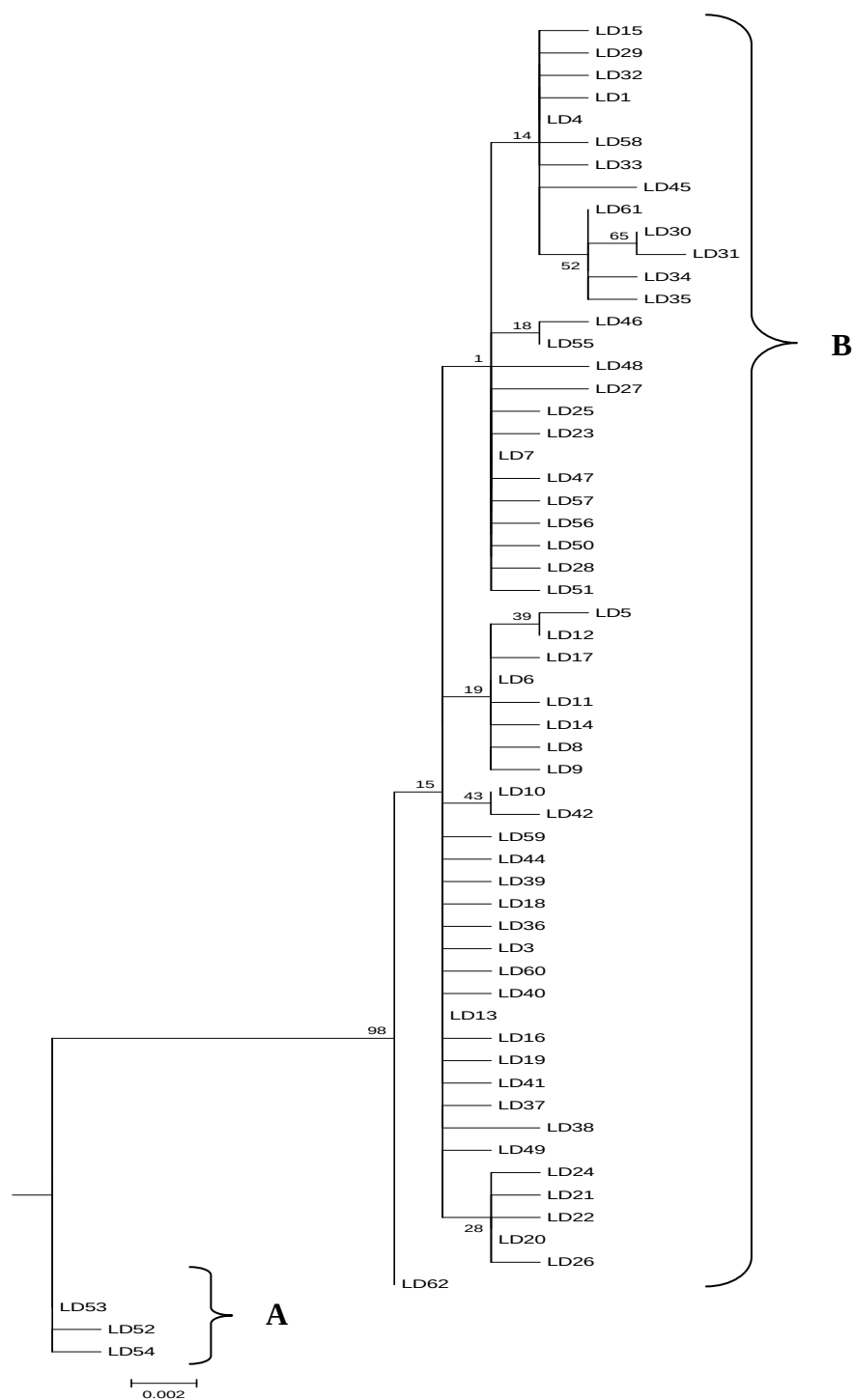
Haplotip	Kod lokaliteta																																	Ukupno																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																										
	1	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	25	27	29	30	33	35	43	44	45	48	52	56	59	60	61		62	64	65	66	67																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																					
LD37															1																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													



Slika 16. Grafički prikaz relativnih frekvencija pojedinog haplotipa u ukupnom skupu sekvenci. Najzastupljeniji su haplotipovi LD13, LD4 i LD7. Udio haplotipova LD61, LD20 i LD6 je razmjerno velik. Uočljiv je vrlo velik broj haplotipova predstavljenih sa samo dvije ili jednom sekvencom, tzv. samotnjaka (eng. singletons)



Slika 17. Parsimonska kladistička mreža 60 haplotipova pronađenih na području istraživanja sa granicom spajanja 95%. Mreža je uobličena i obojana u programu Corel na temelju mreže konstruirane porogramom TCS 1.21. Nejasnoće kladograma (kružne veze) razriježene su prema uputama Crandall i Templeton (1993), veličina kruga oslikava frekvenciju haplotipa. Uz svaki krug upisan je broj haplotipa bez prefiksa LD. Izdvojeni sivo obojeni krugovi predstavljaju haplotipove LD52 do LD54 pronađene u Gruziji, a skupina odgovara monofiletskoj grupi (kladij) A, dok ostatak haplotipova pripredstavlja monofiletsku grupu (kladij) B u rekonstruiranom filogenetičkom stablu (Slika 18). Zvezadsta rekonstrukcija veza sa najzastupljenijim haplotipovima karakteristična je za populacije koje doživljavaju demografsku ekspanziju.



Slika 18. Molekularno filogenetička analiza metodom najveće vjerojatnosti (Maksimum Likelihood). Evolucijsko stablo rekonstruirano je na temelju Tamura-Nei modela (Tamura i Nei 1993), i inicijalnog stabla definiranog u programu jModelTest. Robusnost stabla testirana je heurističkom metodom bootstrap sa 500 replikacija samoučitanja u programu MEGA6 te je podrška prikazana brojem pored svakog čvora. Jasno se razlučuje podskupina tri haplotipa iz Gruzije (A) dok se daljnje grupiranje 57 haplotipova iz užeg područja Europe (B) naznačuje, ali bez veće statističke podrške.

Korištenjem molekularnog sata za porodicu Lepidoptera od oko 2,3% divergencije između dvije sekvence odnosno 1,15% po sekvenci u milijun godina (Brower 1994), procijenjeno vrijeme razdvajanja između gruzijskih i europskih linija je 0,67 do 1,3 milijuna godina, a između linija unutar Europe 0,07 do 0,8 milijuna godina. Može se dakle zaključiti da je vrijeme razdvajanja gruzijskih i ostalih europskih populacija nastupilo u Pleistocenu, u periodu ledenih doba.

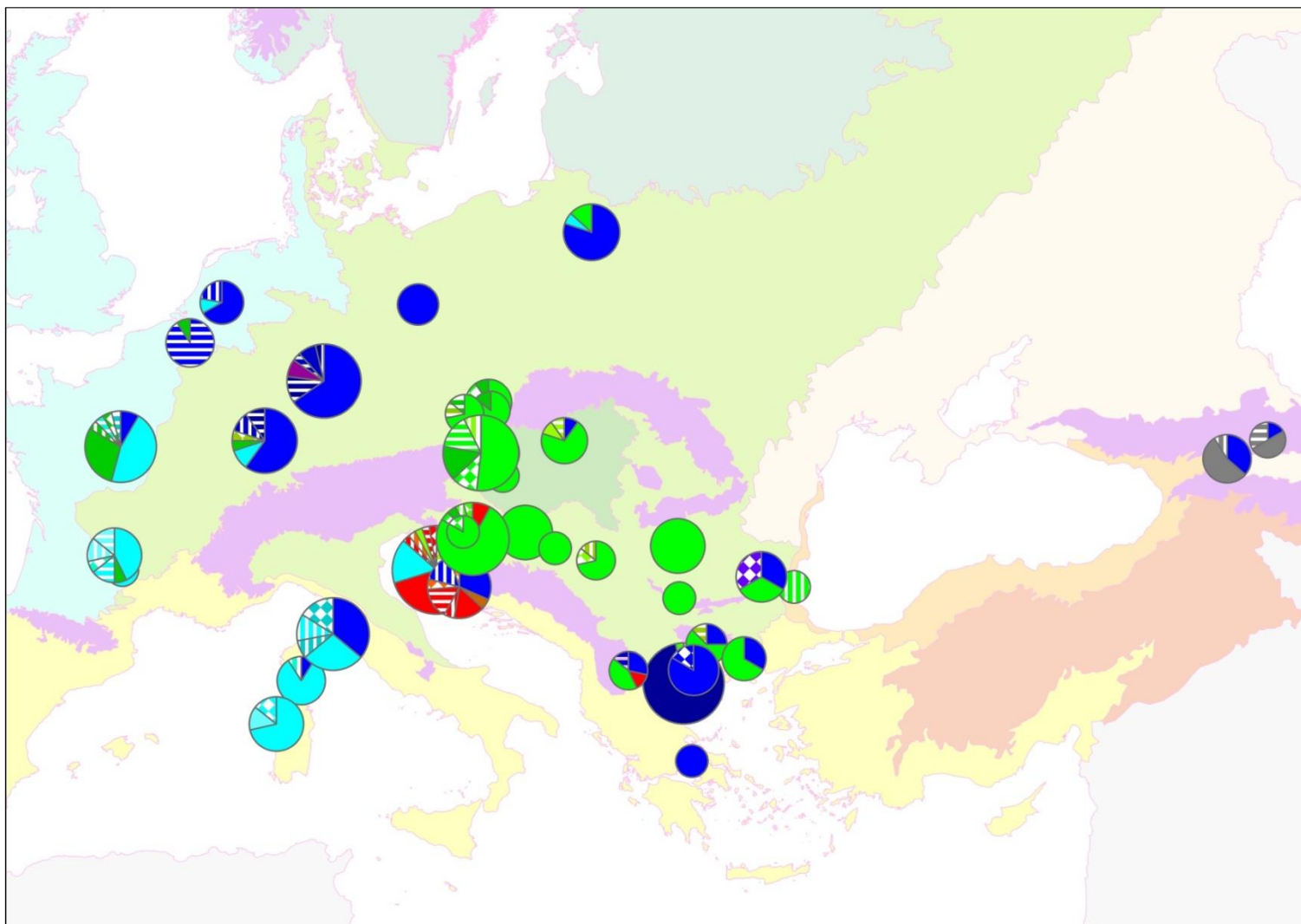
Na temelju frekvencije haplotipova po populacijama izrađena je karta geografske distribucije po istraživanim lokalitetima (Slika 19). Primjećuje se prevladavanje određenih podskupina haplotipova na određenom geografskom području. Haplotip LD13 i uz njega vezani haplotipovi potpuno su zastupljeni u području Transilvanije i Panonske nizine između planinskih lanaca Dinarida i Karpata. Pronađeno je samo nekoliko jedinki koje nose haplotip LD4 u populaciji 18 u Mađarskoj te u populaciji 27 u Bugarskoj. Također, haplotip LD20 (koji je proizišao iz haplotipa LD13) i uz njega vezani haplotipovi pojavljuju se u populacijama 8, 9 i 10 u Češkoj, 20 u Mađarskoj, 43 u Austriji te 64 u Hrvatskoj. Zanimljivo je da su pronađeni u populaciji 14 u Njemačkoj te u populacijama 13 i 59 u Francuskoj i populaciji 1 u Belgiji. Na temelju toga može se pretpostaviti da su jedinke iz Panonskog dijela Balkanskog poluotoka migrirale dalje u centralnu i zapadnu Europu kroz koridor između istočnog kraja Alpa i zapadnog kraja Karpata. Nadalje, haplotip LD7 i uz njega vezani haplotipovi najzastupljeniji su na Apeninskom poluotoku, otocima Korzici i Sardiniji te Francuskoj. Djelom su zastupljeni u populaciji 14 u Njemačkoj te u populaciji 33 u Nizozemskoj, a pronađeni su i u populacijama 2 i 7 u Hrvatskoj. U skladu s time može se pretpostaviti da je haplotip LD7 za vrijeme zadnjeg ledenog doba pribježište našao u Jadranskoj-mediteranskoj refugiji odakle se proširio u zapadnu Europu te dalje prema sjeveru i istoku.

Prisustvo haplotipa LD7 u primorskim populacijama u Hrvatskoj može se pokušati objasniti na dva osnovna načina: 1) za vrijeme zadnjeg ledenog doba razina mora spustila se više od 100 m pri čemu je presušio velik dio sjevernog Jadranskog mora čime je nastao kopneni most između sjevernog dijela Apeninskog poluotoka i današnje Istre i Kvarnera što je zasigurno omogućavalo migraciju između populacija Jadransko-mediteranskog i Ilirske obale Pontsko-mediteranskog refugija, 2) potencijalno je moguće da zbog intenzivnih vjetrova koji su prisutni na području Jadrana dolazi do redistribucije dijela populacija u stadiju imaga pa čak i gusjenica za koje je zabilježeno da zbog guste obraslosti dlačicama mogu barem neko vrijeme i plutati na vodi (Hrašovec, osobna komunikacija). Potonja je hipoteza pogotovo interesantna jer bi takva vrsta migracije značila uspostavljanje migracije i toka gena između otočnih

populacija na obalama Ilirsko-Balkanske biogeografske regije te time održavala genetičku raznolikost i onemogućavala utjecaj genetičkog drifta.

Haplotip LD6 (koji potječe iz haplotipa LD13) i uz njega vezani haplotipovi najčešće su pronađeni u primorskim populacijama Hrvatske, zatim u populaciji 64 iz Pokuplja također u Hrvatskoj te u populaciji 45 u Makedoniji. Zanimljivo je da je u populaciji iz Makedonije prisutan i haplotip LD13 dok taj haplotip nije pronađen u primorskim populacijama u Hrvatskoj već su pronađeni samo haplotipovi LD3 i LD10 koji su vezani uz haplotip LD13. Možemo pretpostaviti da je zbog evolucijskih procesa kao što su genetički drift ili možda čak i selekcija u kombinaciji sa drugačijim ekološkim uvjetima došlo do isčezavanja haplotipa LD13 u primorskim populacijama Hrvatske koje su lancem Dinarida razdvojene od kontinentalnih populacija što je kao migratorna barijera onemogućavalo razmjenu gena. S druge strane prisustvo haplotipa LD13 u populaciji 45 u Makedoniji vjerojatno se održava razmjenom gena migracijskim vezama sa Transilvanijskim i Panonskim bazenom.

Haplotip LD4 široko je prisutan na gotovo čitavom području istraživanja osim u populacijama iz Panonskog bazena i većeg dijela Transilvanije. Prema filogenetičkoj rekonstrukciji haplotip LD4 proizašao je iz haplotipa LD7, što ima uporište u prisustvu tog haplotipa na području Apeninskog poluotoka, zapadne i centralne Europe te primorskim populacijama Hrvatske. No pomutnju stvara činjenica da je jednako tako prisutan u populacijama iz Grčke, Makedonije pa čak i Gruzije. Razjašnjavanje filogenije i distribucije haplotipa LD4 ostaje kao jedno od pitanja za daljnja istraživanja uz dodatno uzorkovanje u području Male Azije, Balkanskog poluotoka, ali i sjeveroistočnih dijelova Transilvanije i oko Crnog Mora.



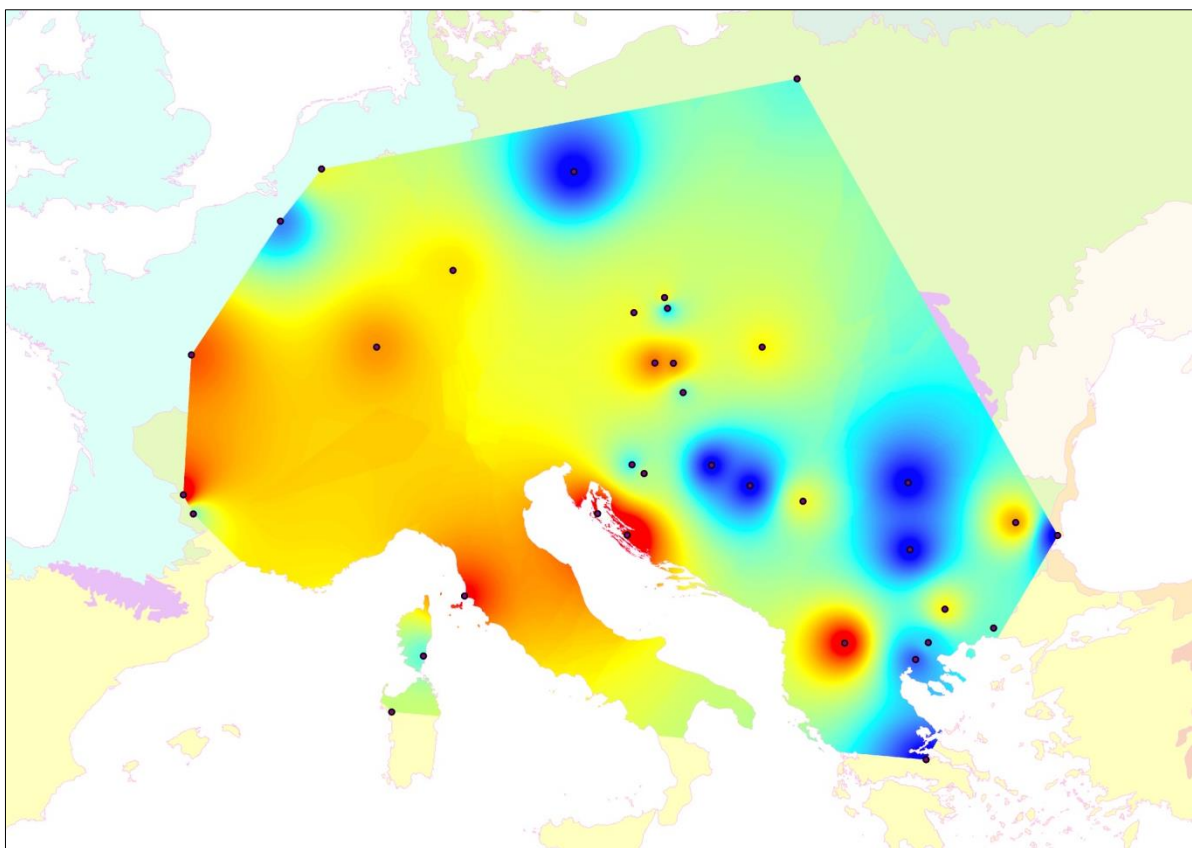
Slika 19. Karta Europe sa distribucijom haplotipova po istraživanim populacijama. Veličina dijagrama proporcionalna je broju uzoraka po populaciji, a boja haplotipa sukladna je obojenjima iz parsimonske mreže (Slika 17). U pozadini karta biogeografskih regija Europe (EEA, 2011)

Kako je na temelju molekularno filogenetičke analize ustanovljena očita diferencijacija haplotipova i populacija iz Gruzije, te su populacije u daljnjoj filogeografskoj analizi isključene kako bi se neometano mogla analizirati genska varijabilnost i njena struktura među istraživanim populacijama koje u kontekstu šumarstva i zaštite šuma u Europi mogu biti od velikog značaja, pogotovo u svijetlu predviđenih klimatskih promjena i uzročno-posljedičnih veza na pomicanje granica areala gubara sa juga prema sjeveru Europe (Vanhanen i dr. 2007). Dakle sve analize u nastavku odnose se na istraživane populacije bez populacija iz Gruzije.

3.1.2 Populacijsko genetički pokazatelji i vizualizacija raznolikosti gena

Indeksi genske (haplotipske) raznolikosti prikazuju izraženu razliku u opaženoj varijabilnosti između istraživanih populacija (Tablica 3), podatak koji nam je posebno interesantan u kontekstu prilagodljivosti populacija i izazova suvremene zaštite šuma (Barett i Schluter 2008, Boykin i dr. 2012, deWaard i dr. 2010, Lande 1998, Vanhanen i dr. 2007). Izraženi su različiti indeksi haplotipske raznolikosti, no indeks bogatstva alela nakon rarefakcije (Allelic richness - r) koji prikazuje normaliziranu haplotipsku raznolikost prema populaciji sa najmanjim brojem uzoraka, među izabranim indeksima daje najrealniju sliku (Pons i Petit 1996). Na temelju tog indeksa konstruirana karta genske raznolikosti za vizualizaciju rezultata. Najmanja genska raznolikost opažena je u populacijama 5 i 6 iz kontinentalne Hrvatske, 25 iz Bugarske i 48 iz kontinentalne Rumunjske, zatim u populaciji 29 iz crnomorske regije Bugarske te 61 iz Grčke. S druge strane, najveća genska raznolikost opažena je u populacijama 3 i 7 iz obalnog pojasa Hrvatske te populaciji 45 iz Makedonije, zatim u populaciji 35 iz Italije te populaciji 13 i 59 iz centralnog dijela Francuske.

Analizirajući ove rezultate treba napomenuti da je razlika u broju uzoraka po populacijama u nekim odnosima prilično velika te je bez obzira na primjenu normalizacije moguće da zbog manjeg broja uzoraka jednostavno nije opaženo više haplotipova što se može pripisati efektu uzorkovanja (Holsinger i Weir 2009). No to ne može opovrgnuti uočenu generalnu pojavu filogeografskog strukturiranja, a daljnjim uzorkovanjem u budućnosti utjecaj efekta uzorkovanja može se smanjiti do znemarivosti.



Slika 20. Vizualizacija distribucije genske raznolikosti po istraživanim populacijama konstruirana u programu ArcMap 9.3 (ESRI, SAD) korištenjem alata Genetic landscape (Vandergast i dr. 2011). Boje gradiraju od crvene (visoka raznolikost) do plave (niska raznolikost).

Zanimljiva je i intrigantna akumulacija raznolikosti u primorskim populacijama iz Hrvatske, dok je iznenađujuće niska varijabilnost u području Egejske obale, tj. Grčke. Zanimljiva je i povećana varijabilnost populacije iz Makedonije u kojoj su pronađena tri od četiri najzastupljenija haplotipa. Izražena je niska raznolikost (čak i nepostojanje raznolikosti) u kontinentalnim populacijama iz Hrvatske te kontinentalnih populacija iz Bugarske i Rumunjske što sugerira da su kroz povijest na te populacije djelovali različiti čimbenici koji su doveli do smanjenja genske raznolikosti. Još jedna populacija u centralnoj Francuskoj pokazuje povećanu raznolikost, a u ostatku centralne Europe opaženi su intermedijarni stupnjevi raznolikosti koji u određenoj mjeri variraju od populacije do populacije.

Tablica 3. Indeksi unutarpopulacijske raznolikosti za istraživane populacije (index $\pm$ SD). Kodovi populacija prema Tablica 1. N – ukupni broj sekvenci, #HT - broj haplotipova, Hd – haplotipska raznolikost, MNPD – srednji broj razlika među sekvencama (između populaciji pripadajućih haplotipova), π – nukleotidna raznolikost, r- bogatstvo alela (allelic richness) nakon rarefakcije na 5 (najmanji uzorak) prema Pons i Petit (1996)

Kod populacije	N	#HT	Hd $\pm$ SD	MNPD $\pm$ SD	$\pi\pm$ SD	r (5)
1	11	2	0,181 $\pm$ 0,143	0,727 $\pm$ 0,584	0,001 $\pm$ 0,000	0,455
3	37	10	0,818 $\pm$ 0,038	2,087 $\pm$ 1,193	0,003 $\pm$ 0,002	2,555
5	14	1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,000
6	5	1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,000
7	19	8	0,859 $\pm$ 0,052	2,666 $\pm$ 1,485	0,004 $\pm$ 0,002	2,815
8	10	4	0,533 $\pm$ 0,180	0,600 $\pm$ 0,519	0,001 $\pm$ 0,001	1,500
9	7	2	0,285 $\pm$ 0,196	0,285 $\pm$ 0,340	0,000 $\pm$ 0,000	0,714
10	7	3	0,523 $\pm$ 0,208	0,857 $\pm$ 0,681	0,001 $\pm$ 0,001	1,429
11	11	3	0,345 $\pm$ 0,172	0,363 $\pm$ 0,377	0,000 $\pm$ 0,000	0,909
12	5	2	0,400 $\pm$ 0,237	0,400 $\pm$ 0,435	0,000 $\pm$ 0,000	1,000
13	24	7	0,721 $\pm$ 0,070	1,554 $\pm$ 0,961	0,002 $\pm$ 0,001	2,038
14	20	6	0,636 $\pm$ 0,115	1,194 $\pm$ 0,797	0,001 $\pm$ 0,001	1,838
15	26	6	0,566 $\pm$ 0,108	1,141 $\pm$ 0,764	0,001 $\pm$ 0,001	1,579
16	31	3	0,127 $\pm$ 0,079	0,193 $\pm$ 0,250	0,000 $\pm$ 0,000	0,323
18	10	4	0,533 $\pm$ 0,180	0,800 $\pm$ 0,628	0,001 $\pm$ 0,001	1,500
19	7	3	0,523 $\pm$ 0,208	0,857 $\pm$ 0,681	0,001 $\pm$ 0,001	1,429
20	11	4	0,709 $\pm$ 0,099	0,872 $\pm$ 0,661	0,001 $\pm$ 0,001	1,851
21	5	2	0,600 $\pm$ 0,175	0,600 $\pm$ 0,562	0,000 $\pm$ 0,000	1,000
25	5	1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,000
27	8	3	0,607 $\pm$ 0,164	1,357 $\pm$ 0,933	0,002 $\pm$ 0,001	1,518
29	5	1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,000
30	12	3	0,727 $\pm$ 0,058	1,939 $\pm$ 1,181	0,002 $\pm$ 0,001	1,788
33	9	3	0,555 $\pm$ 0,165	0,611 $\pm$ 0,530	0,000 $\pm$ 0,000	1,389
35	25	5	0,776 $\pm$ 0,046	1,513 $\pm$ 0,941	0,002 $\pm$ 0,001	2,245
43	27	5	0,695 $\pm$ 0,078	0,871 $\pm$ 0,632	0,001 $\pm$ 0,001	1,966
44	14	3	0,483 $\pm$ 0,142	0,527 $\pm$ 0,467	0,000 $\pm$ 0,000	1,209
45	7	4	0,809 $\pm$ 0,129	1,714 $\pm$ 1,131	0,002 $\pm$ 0,001	2,381
48	14	1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,000
52	11	3	0,618 $\pm$ 0,103	5,818 $\pm$ 3,013	0,008 $\pm$ 0,005	1,407
56	6	3	0,733 $\pm$ 0,155	3,933 $\pm$ 2,290	0,005 $\pm$ 0,003	1,833
59	14	6	0,802 $\pm$ 0,090	1,219 $\pm$ 0,824	0,001 $\pm$ 0,001	2,500
60	12	2	0,303 $\pm$ 0,147	0,303 $\pm$ 0,336	0,000 $\pm$ 0,000	0,682
61	5	1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,000
62	9	2	0,500 $\pm$ 0,128	1,000 $\pm$ 0,739	0,001 $\pm$ 0,001	0,952
64	25	6	0,426 $\pm$ 0,121	0,473 $\pm$ 0,425	0,000 $\pm$ 0,000	1,167
65	6	2	0,333 $\pm$ 0,215	0,333 $\pm$ 0,380	0,000 $\pm$ 0,000	0,833
66	8	1	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	0,000
67	15	3	0,361 $\pm$ 0,144	0,590 $\pm$ 0,500	0,001 $\pm$ 0,001	0,905
Ukupno	497	60				

Iz provedenih analiza uočljiva je akumulacija genske raznolikosti u primorskim populacijama 3 i 7 u Hrvatskoj, zatim u populaciji 45 iz Makedonije, populaciji 35 iz Italije te populaciji 59 iz Francuske. Visoka raznolikost u populacijama iz Hrvatske, Italije i Makedonije podržavaju pretpostavku o formiranju refugija na tim područjima tijekom zadnjeg ledenog doba u Europi (Hewitt 2001, Schmitt 2007), pri čemu je poznato da se u refugijskim populacijama zbog dugovječnijeg razvoja u skladu sa neutralnom teorijom molekularne evolucije (Kimura 1983) mogla akumulirati genska raznolikost. Iznenađujuće je niska raznolikost populacija iz Grčke koje se zbog toga ne uklapaju u sliku glacijalne refugije. Pretpostavimo li da takva niska raznolikost nije uzrokovana efektom uzorkovanja, možemo hipotezirati da su na te populacije kroz povijest djelovali drugačiji čimbenici koji su doveli do smanjenja raznolikosti, bilo kroz genetički drift ili selekciju. Tu bi pretpostavku trebalo ispitati dodatnim uzorkovanjem.

Nadalje, povećana raznolikost uočena u populaciji 59 iz Francuske, kao i nešto viša raznolikost u populaciji 14 iz Njemačke najvjerojatnije je posljedica hibridizacije genealoških linija iz Jadransko-mediteranske (Apeninske) i Ponsko-mediteranske (Balkanske) refugije, što se vidi iz prisutnosti haplotipova iz obje refugije. Zanimljivo bi bilo istražiti druge biološke osobine gubara iz tih populacija, pogotovo iz Francuske.

Intrigantno je otkriće niske razine raznolikosti, pa čak i izostanak raznolikosti, u populacijama kontinentalnog bazena Balkanskog poluotoka između Dinarida i Karpata, iako je cijelo to područje smatrano refugijom tijekom zadnjeg glacijalnog maksimuma (Hewitt 2001, Schmitt 2007). Ta se razina niske raznolikosti proteže cijelim područjem od crnog mora do koridora između Alpa i Kaprata. U skladu sa uočenom izuzetno niskom razinom genske raznolikosti u tim područjima možemo pretpostaviti da su na te populacije djelovali čimbenici koji su doveli do smanjenja raznolikosti.

Neki od mogućih odgovora na uočene diskrepancije u raznolikosti između kontinentalnih i obalnih populacija na području Balkanskog poluotoka možda leže u činjenici o povijesno utvrđenim razlikama u dinamikama gradacija između populacija u navedenim regijama. Naime, poznato je da populacije u kontinentalnim krajevima Balkanskog poluotoka (ali i ostatka Europe) imaju izraženu populacijsku dinamiku i pojavu gradacija svakih 10-ak godina koje završavaju drastičnom degradacijom, za razliku od mediteranskih regija Balkanskog poluotoka gdje je dinamika manje izražena, a gradacije se javljaju svakih tri do četiri godine (Alalouni i dr. 2013, Hrašovec i Harapin 1999, Kovačević 1956, McManus i Csóka 2007, Pernek i dr. 2008). Takve drastične fluktuacije u dinamici populacija mogle uzrokovati

smanjenje raznolikosti dovodeći, zbog pojave Allee efekta, do pojačanog djelovanja genetičkog drifta, kao što je to bio slučaj u pulsirajućoj invaziji gubara na području Sjeverne Amerike (Johnson i dr. 2006, Tobin i dr. 2009).

Allee efekt je ekološki koncept nastao 1920-ih, koji objašnjava korelaciju između broja jedinki u populaciji i njihove pojedinačne sposobnosti. Drugim riječima Allee efekt je definiran kao pad sposobnosti jedinke pri niskoj gustoći populacije. Prema konceptu Allee efekta, kada gustoća populacije padne ispod kritičnog broja, populacija krahira i nastavlja probadati do izumiranja, zbog čega se taj efekt slikovito naziva i “vir izumiranja” (eng. extinction vortex) (Courchamp i dr. 2008). Mehanizmi koji dovode do pojave Allee efekta mogu biti razni te su podjeljeni u “komponente Allee efekta” jer često djeluju u kombinaciji, a jedan od mehanizama koji se ističu je nemogućnost pronalaženja partnera što je pokazano u slučaju pojave Allee efekta u populacijama napredujućeg fronta invazije gubara u Sjevernoj Americi (Tobin i dr. 2009). U kontekstu molekularne evolucije, pojava Allee efekta u populacijama niske gustoće (kao što je to slučaj kod gubara u fazi latence) drastično smanjuje broj jedinki koje se uspješno razmnožavaju, dovodeći tako do snažnog djelovanja genetičkog drifta. Posljedično smanjenje u genetičkoj raznolikosti dovodi do pojave depresije zbog srođivanja (eng. inbreeding depression) i tako do dodatnog pada sposobnosti potomaka čime se proces propadanja populacije lančano pojačava.

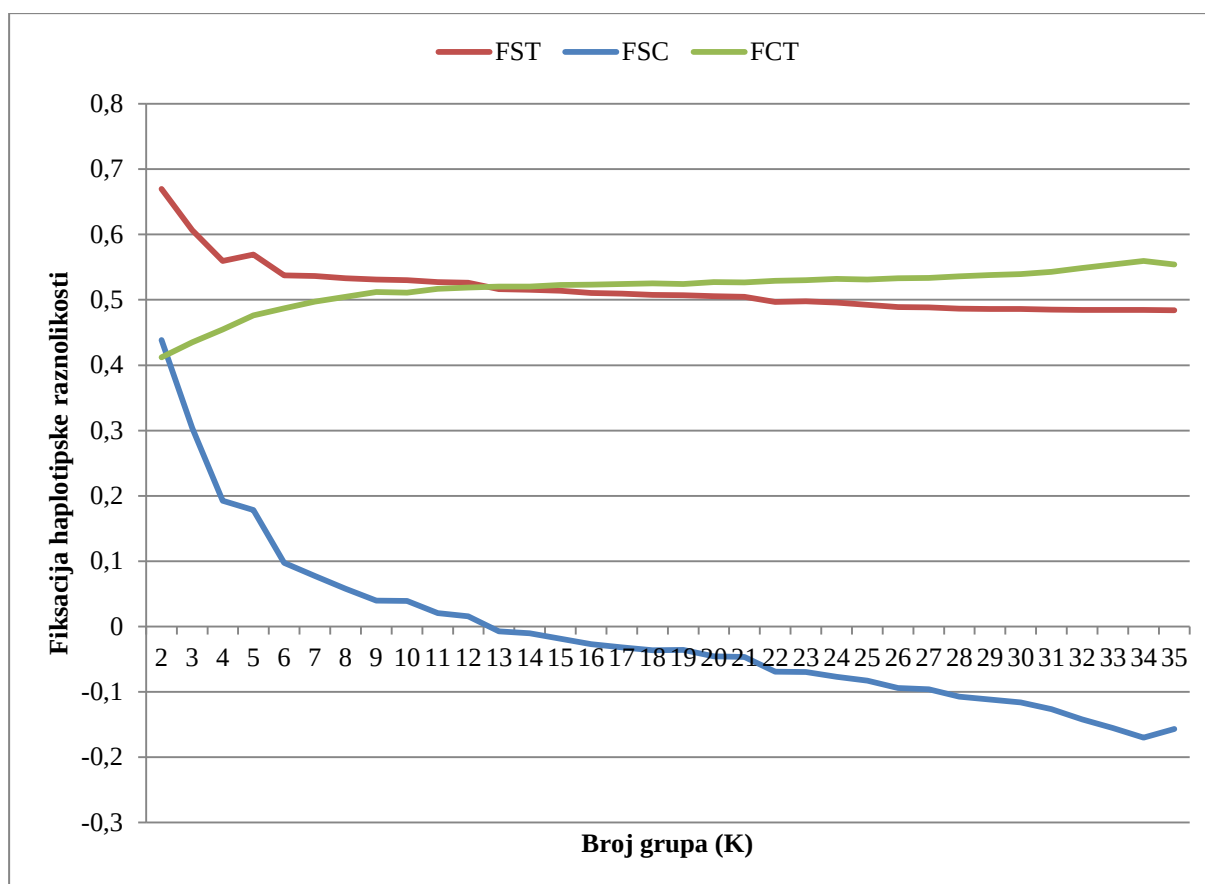
Drugi čimbenik koji je također mogao rezultirati smanjenjem genske raznolikosti je činjenica da su upravo velike i vrijedne površine mahom hrastovih šuma u kontinentalnom bazenu Balkanskog poluotoka između Dinarida i Karpatâ tijekom dvadesetog stoljeća redovito tretirane biocidnim kemijskim preparatima (kao što je DDT) koji su zasigurno rezultirali masovnom degradacijom populacija te na taj način omogućavali pojavu genetičkog drifta.

Vjerojatno su ekološki uvjeti u mediteranskim regijama Europe, uključujući i Balkanski i Apeninski poluotok, bez obzira na općenitu odsutnost hrasta lužnjaka (*Q. robur*) kao najpogodnije biljke domaćina, blagotvorno djelovali na razvoj gubara omogućujući mu mnogo umjerenije ali i stabilnije populacijske dinamike bez velikih degradacija koje bi dovodile do pojave genetičkog drifta. S druge strane, povećana genska raznolikost pozitivno doprinositi adaptacijskim sposobnostima tih populacija (Barett i Schluter 2008, Lande 1998, Ramel 1998).

3.1.3 Analiza filogeografske strukture i AMOVA

Pojava značajne mitohondrijske filogeografske strukture procijenjena je testiranjem da li je indeks fiksacije G_{ST} (koeficijent fiksacije haplotipske varijabilnosti po populacijama na temelju frekvencije haplotipova) značajno manji od indeksa N_{ST} (koeficijenta fiksacije haplotipske varijabilnosti po populacijama na temelju frekvencije i sličnosti između haplotipova) (Pons i Petit 1996). Totalna genska raznolikost je H_T (se) 0,814 (0,0347), dok je unutarpopulacijska raznolikost H_S (se) 0,437 (0,0467). Indeks strukture G_{ST} (se) je 0,463 (0,0556) dok je indeks $N_{ST(op.)}$ (se) 0,521 (0,0596). Permutacijskim testom ustanovljeno je da je opaženi indeks $N_{ST(op.)}$ značajno veći od teoretskog $N_{ST(teor.)}$ (se) 0,456 (0,001) ($p = 0,010$) čime se odbacuje hipoteza da među istraživanim populacijama nema strukturacije, a budući da je N_{ST} veći od G_{ST} zaključujemo da je strukturacija utoliko značajnija jer su geografski strukturirani međusobno sličniji haplotipovi.

Daljnja analiza filogeografske strukturiranosti s ciljem utvrđivanja geografskih grupa genetički sličnih populacija provedana programom SAMOVA, nije dovela do statistički pouzdanog rješenja iako je analizom podataka moguće uočiti prvi signal strukturiranosti za broj grupa $K=8$ (Slika 21). Razloge takvom ishodu možemo pokušati objasniti s jedne strane opserviranom visokom unutarpopulacijskom genskom varijabilnosti, no što je vjerojatno još značajnije je utjecaj populacija 16, 60, 61 iz Grčke koje su po genetičkoj strukturi najbližije populacijama 14, 15, 33, 66 i 67 iz Njemačke, Nizozemske i Poljske te su zbog toga doprinosile prevelikom udjelu varijance unutar geografski logične grupe.



Slika 21. Grafički prikaz razvoja indeksa fiksacije haplotipske raznolikosti na tri hierarhijska nivoa ovisno o predodređenom broju grupacija. Idealnim brojem grupa smatra se onaj za kojeg je indeks fiksacije između grupa (F_{CT}) najveći. Uočava se da F_{CT} za zadane podatke ne nailazi na plato sve do maksimalnog broja grupa što se vjerojatno može objasniti postojanjem velike unutarpopulacijske varijabilnosti koja proizlazi iz općenito visoke haplotipske raznolikosti utvrđene za cijeli skup podataka.

Zbog neuspješnog određivanja grupa u programu SAMOVA pristupljeno je utvrđivanju filogeografske strukture objektivnim geografskim grupiranjem populacija i analizom molekularne varijance (AMOVA) na tri hierarhijska nivoa. Objektivno grupiranje populacija u provedeno je na temelju pripadnosti populacije određenoj biogeografskoj regiji, te uzimajući u obzir opserviranu geografsku distribuciju haplotipova koja upućuje na sličnosti sa rekolonizacijskim modelom „butterfly“ (Tablica 4).

Tablica 4. Filogeografske grupe populacija za utvrđivanje filogeografske strukturiranosti populacija analizom molekularne varijance u tri hierarhijska nivoa (AMOVA). Grupe su

sastavljane objektivno na temelju pripadnosti populacije biogeografskoj regiji te uzimajući u obzir distribuciju haplotipova koja upućuje na sličnost sa rekolonizacijskim modelom „butterfly“ (Habel i dr. 2005, Schmitt 2007)

Grupa	Populacije	Razlozi
1	1, 14, 15, 33, 66, 67	Centralno europske populacije koje pripadaju kontinentalnoj i atlanskoj biogeografskoj regiji i obiluju haplotipovima iz podskupine LD4
2	11, 12, 13, 35, 44, 59	Zapadnoeuropske populacije pripadaju središnjoj mediteranskoj, kontinentalnoj i atlanskoj biogeografskoj regiji i obiluju haplotipovima iz podskupine LD7
3	5, 6, 8, 9, 10, 18, 19, 20, 21, 25, 30, 43, 48, 64, 65	Populacije koje pripadaju Panonskoj biogeografskoj regiji i balkanskoj kontinentalnoj regiji u području između Alpi, Dinarida i Karpata
4	29	Populacija iz Bugarske koja pripada crnomorskoj biogeografskoj regiji
5	16, 60, 61, 62	Populacije iz Bugarske i Grčke koje pripadaju Egejskom dijelu mediteranske biogeografske regije
6	27	Populacija iz Bugarske koja pripada Alpskoj biogeografskoj regiji na granici između balkanske kontinentalne i egejske mediteranske
7	45	Populacija iz Makedonije koja pripada Alpskoj biogeografskoj regiji na tomeđi između balkanske kontinentalne, egejske i ilirske mediteranske regije
8	3, 7	Populacije iz Hrvatske koje pripadaju ilirskom dijelu mediteranske biogeografske regije

Kada su populacije bile objektivno geografski grupirane kako je prikazano u Tablica 4, glavni izvor varijabilnosti bila je genska raznolikost unutar populacija (46,97%), a značajan udio imala je i varijabilnost između grupa (40,08%) dok je varijabilnost između populacija unutar grupa doprinosila sa 12,96% (Tablica 5). Ovi su podaci u skladu sa općenito opaženom visokom genskom varijabilnosti gubara prema svim dosadašnjim pokazateljima, te je visoka varijabilnost unutar populacija očito ometala uspješnost SAMOVA analize.

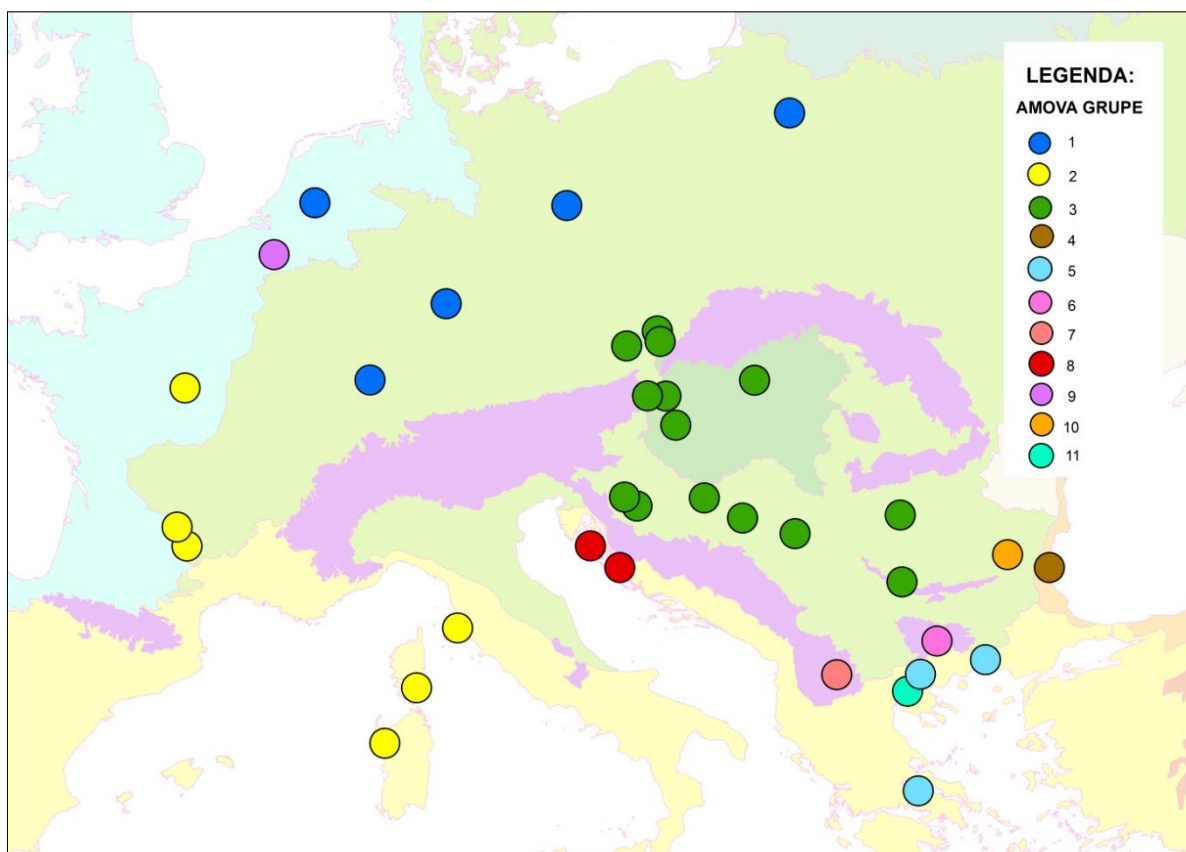
Tablica 5. Rezultati AMOVA analize za K=8 objektivno grupiranih populacija; sve su komponentne statistički značajne ($p < 0,001$)

	Izvor varijacije	d.f.	% varijacije	Komponente varijance
K = 8 objektivno	Između grupa	7	40,08	0,40791 Va
	Između populacija unutar grupa	28	12,96	0,13186 Vb
	Unutar populacija	444	46,97	0,47804 Vc

Bez obzira na potvrdu strukturiranosti koja proizlazi iz rezultata AMOVA-e, uočava se prilično velik doprinos varijacije između populacija unutar grupa, te su određene grupe daljnje raščlanjenje prema opsaženoj sličnosti/različitosti u genskoj strukturi geografski bliskih populacija kako bi se pokušalo odgonetnuti koje populacije najviše doprinose varijabilnosti unutar grupa. Izdvajanjem populacije 1 iz grupe 1, populacije 30 iz grupe 3 te populacije 16 iz grupe 5 analiza molekularne varijance pokazala je značajno dugačije rezultate (Tablica 6) te je tako određeno konačno grupiranje korišteno za izradu vizualizacije objektivnih filogeografskih grupa (Slika 22). Sa ovakvim grupiranjem izvor varijabilnosti između populacija unutar grupa doprinosio je samo 3,94%, što je smanjenje za više od tri puta. Varijabilnost između grupa preuzela je primat u doprinosu varijabilnosti sa 49,17%, a velika unutarpopulacijska varijabilnost i dalje je doprinosila sa visokih 46,89%. U skladu sa rezultatima možemo zaključiti da populacije 1, 30, i 16 značajno divergiraju u odnosu na ostale populacije u bližem geografskom okruženju. Od mogućih uzroka takve divergencije možemo sumnjati na moguće efekte uzorkovanja, ali isto tako i utjecaj migracije što se pogotovo odnosi na potencijalnu antropogenu migraciju.

Tablica 6. Rezultati AMOVA analize za K=11, sa tri izdvojene populacije radi detekcije izvora varijabilnosti između populacija unutar grupa

	Izvor varijacije	d.f.	% varijacije	Komponente varijacije
K = 11 izdvojene populacije	Između grupa	10	49,17	0,50123 Va
	Između populacija unutar grupa	25	3,94	0,04017 Vb
	Unutar populacija	444	46,89	0,47804 Vc



Slika 22. Prikaz filogeografskih grupa ustanovljenih na temelju molekularno filogenetičke analize varijance objektivno grupiranih populacija i izdvajanja divergentnih populacija. Grupa 9 predstavlja populaciju 1, grupa 10 populaciju 30, a grupa 11 populaciju 16. Ostale populacije obilježene su u skladu sa grupiranjem u Tablica 4.

Ako analiziramo haplotipsku strukturu izdvojenih populacija možemo uočiti da divergenciju u populaciji 1 uzrokuje visoka zastupljenost haplotipa LD1 koji je usko povezan sa haplotipom LD4. Budući da je haplotip LD4 visoko prisutan u ostalim populacijama u okruženju možemo zaključiti da je u slučaju ove populacije vjerojatno riječ o efektu uzorkovanja jer je razmjerno moguće da je haplotip LD1 nastao mutacijom iz haplotipa LD4.

U populaciji 30 uz prisutnost najzastupljenijih haplotipova LD13 i LD4 uočava se pojava haplotipa LD45 koji se od haplotipa LD4 razlikuje u dvije mutacije. Budući da je to jedina populacija u kojoj je pronađen divergentni haplotip teško je donositi pretpostavke o njegovoj filogeniji i filogeografiji. Moguće pretpostavke su da se događa upliv haplotipa iz sjeveroistočnih dijelova Europe za koje je poznato da je u doba zadnjeg ledenog doba postojala refugija. Stoga možemo zaključiti da se i ovdje najvjerojatnije radi o efektu

uzorkovanja te da bi za daljnje razjašnjavanje divergencije ove populacije trebalo u budućnosti uzorkovati nove populacije npr. iz Ukrajine.

Divergencija populacije 16 iz Grčke dodatno naglašava intrigantnost strukture genske raznolikosti na području egejske obale Ponsko-mediteranskog centra raznovrsnosti. Pored visoke zastupljenosti haplotipa LD4 i LD13 u ostalim populacijama iz Grčke u populaciji 16 najzastupljeniji je haplotip LD61 te jedna sekvenca haplotipa LD62. Oba ta haplotipa za po jednu se mutaciju razlikuju od matičnih haplotipova LD4 i LD13. Stoga je moguće da je i ovdje riječ o efektu uzorkovanja zbog kojega u populaciji 16 nisu uočeni osnovni haplotipovi, a što je čini divergentnom od ostalih populacija.

Pitanje divergentnosti populacija iz područja egejske obale od ostalih Ponsko-mediteranskog refugijskog centra (Balkanskog poluotoka) očito je vezano uz problematiku filogenije haplotipa LD4 koje se zbog prisutnosti u populacijama iz Gruzije čini ancestralnim iako je u filogenetičkoj rekonstrukciji označen kao produkt haplotipa LD7. Dodatnim uzorkovanjem na području Male Azije, ali i egejske obale čine se smislenim potezom s ciljem rasvjetljavanja filogenetičke povijesti haplotipa LD4, a time i čitavog filogenetičkog stabla, koje prema dosadašnjim podacima niti u najbolje procijenjenom modelu nema značajniju statističku podršku.

3.1.4 Analiza indeksa M, relativnog pokazatelja migracije između populacija

Slatkin (1981) je dokazao da je prosječna frekvencija alela, ovisno o njenoj prisutnosti u određenim dijelovima populacija, približno neovisna o procesu mutacije i intenzitetu selekcije, ali je snažno ovisna o toku gena. Stoga je, s obzirom na dokazanu filogeografsku strukturu mitohondrijske genske raznolikosti, interesantno analizirati indeks migracije M (Slatkin 1995) između parova populacija kako bi se dobila slika trenutnog stanja toka gena (Tablica 7; Slika 23).

Kako je u tablici 8 prikazana matrica svih mogućih kombinacija populacija, a indeks M bazira se na mjerenju sličnosti i razlika u haplotipskoj strukturi, pri analizi treba uzeti u obzir moguće utjecaje koje na rezultate mogu imati efekti uzorkovanja i broj uzoraka po populaciji (Holsinger i Weir 2009, Slatkin 1995). Stoga se u sklopu ovog istraživanja osvrćemo smo na odnose između interesantnih parova populacija koji mogu imati implikacija na problematiku

zaštite šuma u svijetlu predviđanja pomicanja areala kao posljedice globalnih klimatskih promjena (Vanhanen i dr. 2007).

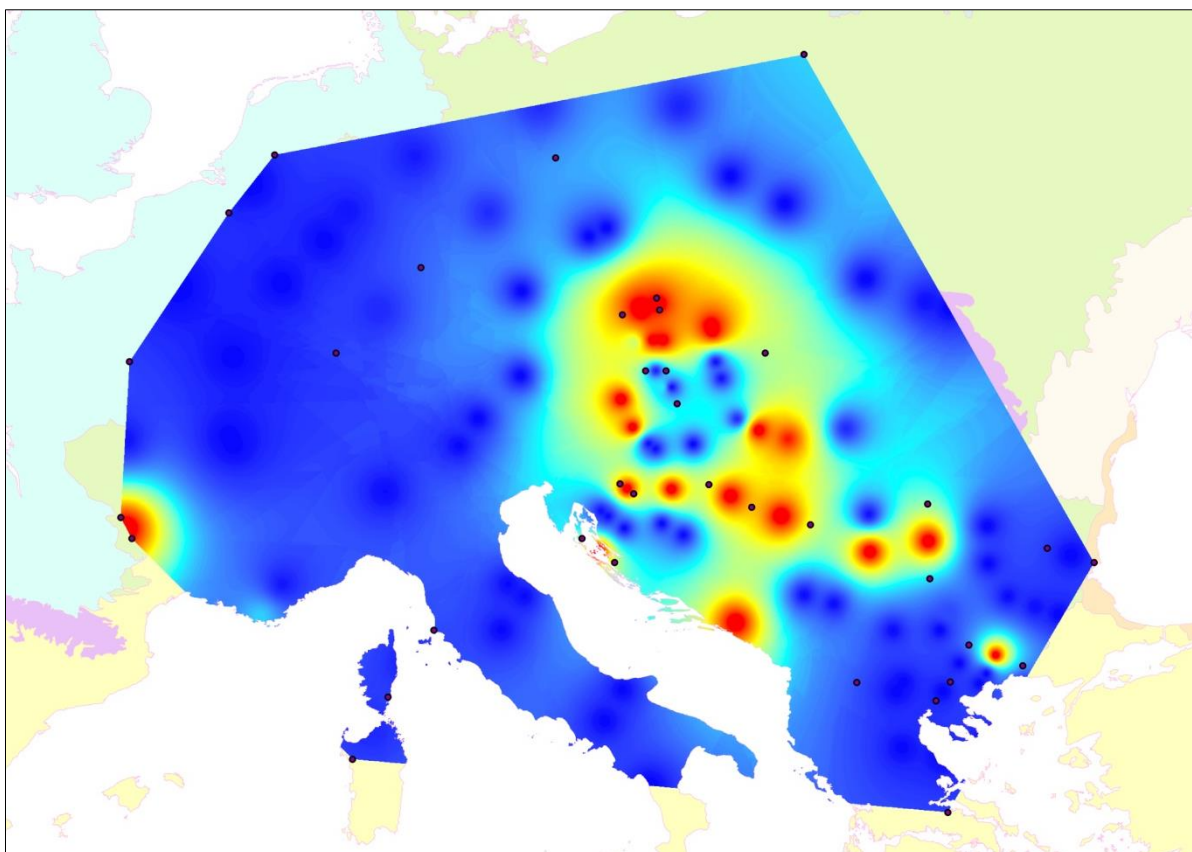
Kako je vidljivo iz distribucije haplotipova očito je da su haplotipovi iz Jadransko-mediteranskog centra raznolikosti (Apeninski poluotok) nakon amelioracije uspješno rekolonizirali dijelove zapadne Europe i dalje se proširili prema centralnoj Europi. S tim u vezi raznolikost koja proizlazi iz njihovog bazena gena već je prisutna u velikom dijelu šuma centralne Europe, a planinski lanac Alpa nije djelovao kao uspješna barijera ni u dosadašnjim klimatskim prilikama. Stoga predviđeno pomicanje areala kao posljedica globalnih klimatskih promjena (Vanhanen i dr. 2007) najvjerojatnije ne bi značajno utjecalo na povećanje genske raznolikosti populacija gubara u šumama zapadne i centralne Europe kao posljedice pritoka haplotipova iz Jadransko-mediteranskog centra raznolikosti. Dodatno se genska raznolikost na području zapadne i središnje Europe povećava miješanjem već prisutnih haplotipova koji su pristigli iz kontinentalnog bazena Balkanskog poluotoka što se očito vidi na primjeru populacije 59 iz centralnog dijela Francuske.

Situacija je daleko drugačija u Pontsko-mediteranskom centru raznolikosti. Populacije koje danas nastanjuju kontinentalni bazen Balkanskog poluotoka između Alpa, Dinarida i Karpata pokazuju izraženo nisku gensku raznolikost, a gotovo sva postojeća raznolikost proizlazi iz podskupine haplotipova vezanih uz haplotip LD13. S druge strane, populacije koje nastanjuju područje egejske obale pokazuju nisku gensku raznolikost, ali gotovo sva postojeća raznolikost proizlazi iz podskupine haplotipova vezanih uz haplotip LD4 te bi migracija populacija iz egejske obale zasigurno doprinostila povećanju genske raznolikosti sjevernijih populacija. Međutim, najintrigantnija je situacija opažena u populacijama koje nastanjuju ilirsku obalu u kojima je opažena općenito najveća genska raznolikost od svih istraživanih populacija ($r = 2,555$ za populaciju 3, $r = 2,815$ za populaciju 7), a ta raznolikost potječe iz prisustva gotovo svih podskupina haplotipova vezanih uz haplotipove LD4, LD7, LD13 i LD6. Ako usporedimo faktore migracije M između populacija 3 i 7 ($M = 338$) koje pripadaju obalnoj regiji sa faktorima između tih populacija i populacija iz kontinentalne regije sa druge strane Dinarida možemo uvidjeti da je stupanj migracije između primorskih i kontinentalnih populacija ($M = 1$ do 3) gotovo zanemariv što upućuje na zaključak da su populacije iz tih dviju regija do sada bile efektivno izolirane migratornom barijerom koju predstavlja lanac Dinarida. Pri tome je bitno naglasiti da je ustanovljenje faktora >0 posljedica u prvom redu sličnosti između određenih haplotipova koji su pronađeni u primorskim i kontinentalnim regijama, dok je povećanje faktora ($M = 3$) rezultat pojave haplotipa LD6 u populaciji 64 iz

Pokupskog bazena. Pojava tog haplotipa mogao bi biti signal koji upućuje na pretpostavku da se između tih populacija pojavljuje neka vrsta migracije. Možemo pretpostaviti da je to rezultat ili antropogene migracije ili, što bi bilo posebno intrigantno, da je uloga planinskog lanca Dinarida kao migratorne barijere počela slabiti iz fundamentalnijih razloga kao što je altitudinalno pomicanje granica areala uzrokovano globalnim porastom temperature (Bonacci 2010, Root i dr. 2003, Walther i dr. 2002). Za odgovor na ovo pitanje trebalo bi utvrditi prisutnost i bazen gena gubara u područjima Dinarida između razdvojenih regija, što bi mogao biti jedan od važnijih ciljeva budućih istraživanja.

Također je zanimljivo opažanje u populaciji 45 iz Makedonije u kojoj su pronađeni haplotipovi LD13, LD4 i LD6, a što se također odražava kroz utvrđen visok stupanj genske raznolikosti ($r = 2,381$) i stupanj visoke razmjene gena sa populacijama koje nastanjuju ilirsku obalu (3 i 7 iz Hrvatskog primorja, $M = \text{inf}$), egejsku obalu (62 iz Grčke, $M = \text{inf}$) te alpsku biogeografsku regiju između egejskog mora i kontinentalne regije Balkanskog poluotoka (27 iz Bugarske, $M = \text{inf}$). Ova je populacija zoran prizor utjecaja migracije na povećanje genske raznolikosti, a pogotovo u smislu priljeva haplotipa LD6 iz područja ilirske obale jer je genska raznolikost populacije 62 u kojoj su prisutni haplotipovi LD13 i LD4, a nedostaje haplotip LD6 značajno manja ($r = 0,952$). U smislu migracije haplotip LD6 vjerojatno nije pristigao iz populacija 3 i 7 već iz drugih populacija sa područja ilirske obale, npr. iz Albanije, iz kojih tijekom ovog istraživanja nisu uspješno sakupljeni uzorci, no tu bi pretpostavku također trebalo potvrditi uzorkovanjem na području Albanije u budućim istraživanjima.

Populacije unutar kontinentalnog bazena Balkanskog poluotoka između Alpi, Dinarida i Karpata pokazuju razmjerno visok tok gena uz određene oscilacije ovisno o prostornoj bliskosti iz čega se može zaključiti da izostanak fizičkih barijera podržava homogenost genske raznolikosti populacija gubara u tom području, a relativno niži indeksi toka gena između određenih parova populacija ukazuju na lagan utjecaj izolacije daljinom.



Slika 23. Vizualizacija toka gena interpolacijom iz matrice indeksa M (Slatkin 1995) producirana u programu ArcMap 9.3 (ESRI, SAD) upotrebom alata Genetic Landscape (Vandergast i dr. 2011). Boje se kreću od crvene (visok tok gena) do plave (nizak tok gena).

Primijećuje se općenito visok tok gena uz određene varijacije između populacija koje nastanjuju kontinentalni bazen Balkanskog poluotoka, dok je između populacija odjeljenih planinskim lancem Dinarida tok gena gotovo nepostojeć. Vrlo je zanimljivo da između populacija koje nastanjuju Egejsku obalu tok gena također neznatljiv u prikazu ove vizualizacije. Isto se može primijetiti i za populacije Jadransko-mediteranske regije (Apeninski poluotok) te populacije centralne Europe, što ne znači da između tih populacija tok gena zaista ne postoji. Vjerojatno je to rezultat svojevrsnog „maskiranja“ toka gena u ovoj vizualizaciji kao posljedice izrazito visokih indeksa M ustanovljenih za populacije koje dijele velike količine istih haplotipova.

Tablica 7. Tablica indeksa M koji se interpretira kao teoretski efektivni broj jedinki koje u jednoj generaciji migriraju između uspoređenih populacija (Slatkin 1995). Crvenom je bojom obojano 5% indeksa koji pokazuju najveći stupanj migracije, a zelenom bojom 5% indeksa koji pokazuju najmanji stupanj migracije. U ćelijama između populacija za koje je derivacija stupnja migracije bila neizmjereno velika i stoga nije mogla biti prikazana brojem dodjeljena je oznaka „inf“.

	1	3	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	18	19	20	21	25	27	29	30	33	35	43	44	45	48	59	60	61	62	64	65	66		
3	0,625																																				
5	0,064	1,705																																			
6	0,108	3,010	inf																																		
7	0,699	338,426	1,116	2,123																																	
8	0,137	2,104	13,696	inf	1,503																																
9	0,116	2,345	4,200	inf	1,705	inf																															
10	0,160	2,254	4,200	inf	1,746	inf	inf																														
11	0,185	2,094	0,079	0,133	1,440	0,238	0,168	0,271																													
12	0,196	2,561	0,046	0,100	1,887	0,272	0,165	0,342	88,000																												
13	0,409	2,784	1,012	1,711	1,860	1,565	1,895	1,901	2,723	4,075																											
14	0,648	1,534	0,230	0,338	1,551	0,331	0,330	0,369	0,927	0,895	1,039																										
15	0,575	0,898	0,182	0,248	0,973	0,242	0,240	0,263	0,522	0,509	0,567	11,326																									
16	0,090	0,342	0,024	0,030	0,314	0,050	0,036	0,052	0,067	0,056	0,194	0,344	0,500																								
18	0,182	3,220	13,696	inf	2,135	inf	inf	315,000	0,364	0,435	1,963	0,448	0,314	0,067																							
19	0,158	2,254	4,200	inf	1,746	inf	inf	inf	0,271	0,342	1,475	0,362	0,263	0,052	315,000																						
20	0,160	1,609	1,608	5,366	1,278	10,604	inf	90,969	0,279	0,341	2,020	0,342	0,244	0,061	3,854	3,989																					
21	0,136	2,084	0,501	1,500	1,735	3,000	1,872	4,103	0,194	0,227	1,318	0,340	0,250	0,040	4,138	4,103	2,057																				
25	0,108	3,010	inf	inf	2,123	inf	inf	inf	0,133	0,100	1,711	0,338	0,248	0,030	inf	inf	5,366	1,500																			
27	0,303	8,223	2,167	27,143	5,037	5,714	7,056	8,454	0,710	0,948	3,726	0,820	0,511	0,102	inf	8,454	2,833	3,851	27,143																		
29	0,076	0,716	0,000	0,000	0,721	0,215	0,086	0,264	0,066	0,050	0,508	0,201	0,165	0,022	0,289	0,264	0,295	0,136	0,000	0,425																	
30	0,645	2,322	0,426	0,782	2,517	0,656	0,693	0,782	1,044	1,272	1,379	2,797	1,489	0,242	0,946	0,782	0,631	0,756	0,782	2,028	0,372																
33	0,410	1,319	0,064	0,115	1,687	0,168	0,131	0,198	0,366	0,340	0,754	29,242	5,565	0,136	0,249	0,198	0,198	0,159	0,115	0,543	0,073	2,316															
35	0,550	1,947	0,416	0,602	1,801	0,557	0,557	0,591	5,453	6,096	1,977	2,466	1,181	0,270	0,725	0,609	0,511	0,563	0,602	1,400	0,312	1,916	2,810														
43	0,168	1,522	9,620	inf	1,046	inf	inf	176,885	0,354	0,402	1,323	0,321	0,237	0,087	9,863	9,703	9,286	99,921	inf	3,506	0,389	0,540	0,220	0,479													
44	0,185	2,119	0,129	0,205	1,421	0,272	0,223	0,305	11,230	18,700	2,186	0,692	0,425	0,075	0,387	0,305	0,299	0,242	0,205	0,663	0,102	0,807	0,337	2,786	0,357												
45	0,454	inf	0,773	2,218	inf	1,850	1,750	2,250	1,122	1,535	3,940	1,815	0,929	0,141	4,312	2,250	1,421	1,809	2,218	inf	0,418	5,600	1,104	2,496	1,490	0,993											
48	0,064	1,705	inf	inf	1,116	13,696	4,200	4,200	0,079	0,046	1,012	0,230	0,182	0,024	13,696	4,200	1,608	0,501	inf	2,167	0,000	0,426	0,064	0,416	9,620	0,129	0,773										
59	0,307	2,052	0,343	0,578	1,454	0,567	0,554	0,646	17,464	inf	3,870	0,907	0,525	0,127	0,751	0,631	0,566	0,566	0,578	1,265	0,258	1,128	0,598	3,203	0,559	7,950	1,820	0,343									
60	0,302	1,017	0,034	0,056	1,128	0,108	0,074	0,123	0,199	0,161	0,536	8,276	5,611	0,109	0,163	0,123	0,135	0,090	0,056	0,321	0,037	1,480	4,562	1,201	0,172	0,205	0,635	0,034	0,384								
61	0,335	1,360	0,000	0,000	1,762	0,106	0,043	0,130	0,163	0,100	0,682	inf	inf	0,087	0,178	0,130	0,151	0,071	0,000	0,425	0,000	2,927	inf	1,812	0,192	0,205	0,994	0,000	0,491	inf							
62	0,300	12,368	1,016	2,813	5,285	2,332	2,245	2,858	0,724	0,849	3,732	1,040	0,608	0,102	12,955	2,858	1,677	1,752	2,813	inf	0,298	2,623	0,565	1,558	2,077	0,665	inf	1,016	1,311	0,347	0,425						
64	0,112	1,723	inf	inf	1,090	inf	inf	22,359	0,220	0,232	1,025	0,255	0,195	0,055	20,939	11,591	3,149	2,159	inf	2,963	0,210	0,438	0,140	0,414	12,340	0,245	1,125	inf	0,411	0,104	0,103	1,598					
65	0,122	2,718	2,763	inf	1,918	inf	248,500	inf	0,177	0,181	1,534	0,338	0,250	0,037	inf	inf	3,969	2,153	inf	9,629	0,093	0,749	0,140	0,596	inf	0,234	2,468	2,763	0,592	0,077	0,046	2,534	inf				
66	0,266	1,134	0,000	0,000	1,326	0,085	0,033	0,099	0,132	0,072	0,578	71,496	13,874	0,079	0,142	0,099	0,123	0,051	0,000	0,317	0,000	1,846	7,009	1,405	0,171	0,170	0,673	0,000	0,397	10,909	inf	0,323	0,092	0,035			
67	0,406	1,752	0,112	0,173	1,770	0,217	0,184	0,243	0,506	0,439	0,906	inf	4,168	0,156	0,323	0,243	0,239	0,201	0,173	0,668	0,099	3,096	13,648	2,321	0,274	0,424	1,696	0,112	0,684	4,571	inf	0,847	0,188	0,193	9,815		

Gubar kao naročit primjer polifagnog štetnika zbog populacijsko-dinamičkih karakteristika da se periodički pojavljuje u visokim gradacijama, kada uzrokuje golobrst na velikim površinama šuma, kroz povijest je promoviran u jednog od najznačajnijih šumskih štetnika u Europi i šire (Hrašovec i Harapin 1999, Johnson i dr. 2005, Kovačević 1956, Margaletić i dr. 2007, Mayo i dr. 2003, McManus i Csóka 2007, Pernek i dr. 2008, Pimentel i dr. 2000). Zbog široke ekološke valence prema temperaturnim zahtijevima (Karolewski i dr. 2007) uspješno opstaje u raznim nišama i ekosustavima te se prirodno rasprostranio preko velikog dijela sjeverne hemisfere između 20° i 60° sjeverne geografske širine, uspješno je kolonizirao Sjevernu Ameriku, a eradikacijskim mjerama spriječeno je njegovo etabliranje u Novom Zelandu (Armstrong i dr. 2003, Forbush i Fernald 1896, Keena i dr. 2008, Pogue i Schaefer 2007). U skladu sa opaženim i predviđenim klimatskim promjenama prema globalnom povećanju temperature i pratećim ekološkim posljedicama (Bonacci 2010, Root i dr. 2003, Walther i dr. 2002) modeliranjem razvoja temperatura na području Europe predviđa se pomicanje južnih i sjevernih granica areala gubara prema sjeveru (Hlásny i Turcány 2008, Vanhanen i dr. 2007).

Kako je kroz povijest uočena razlika u periodicitetu gradacija između kontinentalnih i mediteranskih populacija gubara na području Europe na način da su u južnim krajevima gradacije značajno učestalije (Alalouni i dr. 2013, Grijpma 1989, Hrašovec i Harapin 1999, Lacković i dr. 2015, Pernek i Pilaš 2005) interes za boljim upoznavanjem raznih aspekata biologije i ekologije ovog štetnika je opravdan.

Iako su konačne ekspresije učinka svakog biotskog čimbenika rezultat kompleksnih ekoloških interakcija i podložnosti utjecajima mnogih ekstrema u otvorenim sustavima biosfere, poznato je da skup gena (eng. gene pool) vrste kao fundamentalni izvor bioraznolikosti populacije (Ramel 1998) predstavlja osnovu adaptacijskih sposobnosti vrste što joj omogućuje da preživi u postojećim i osvaja nove ekosustave (Barett i Schluter 2008, Frankham i dr. 2002, Hansson i Westerberg 2002, Lande 1998, Reed i Frankham 2003). Klimatološka povijest u kombinaciji sa geomorfološkom konstitucijom Europe često je modificirala granice područja pogodnih za život europskih biota dovodeći tako do izumiranja i smanjenja areala mezofilnih i termofilnih vrsta u tri glavna refugijska područja (Pirenejski, Apeninski i Balkanski poluotok) te time pogodovala nastajanju genetičkih diferencijacija kao posljedice neovisne evolucije populacija u svakom centru raznolikosti (Hewitt 2001, Schmitt 2007). Stoga je opravdano pitanje postojanja eventualnih razlika u distribuciji genetičke raznolikosti među populacijama gubara koje nastanjuju različite biogeografske regije Europe, a pogotovo zbog činjenice da ta

saznanja iz dosadašnjih molekularno genetičkih istraživanja još nisu u dovoljnoj mjeri prikupljena (Lacković i dr. 2015).

Populacije iz Gruzije očito su i značajno divergentne od ostalih europskih populacija obuhvaćenih ovim istraživanjem, a zanimljivo je da je u rekonstrukciji filogenetičkog stabla najvjerojatnijom procijenjena veza između gruzijskog haplotipa LD53 i haplotipa LD62 iz Grčke. No u kontekstu razmatranja gubara kao štetnika kojem se predviđa latitudinalno pomicanje areala prema sjeveru (Vanhanen i dr. 2007), populacije iz Gruzije nisu od većeg značaja osim u kontekstu antropogene migracije.

U problematici integralne zaštite šuma veliku ulogu imaju kompleksi prirodnih neprijatelja koji imaju izraženu regulatornu ulogu na populacijsku dinamiku gubara (Alalouni i dr. 2013), a pojava entomopatogene gljive *Entomophaga maimaiga* na području Europe zasigurno će blagotvorno utjecati na sinergijsko održavanje stabilnijih i nižih populacijskih razina gubara u područjima visoko vrijednih hrastovih sastojina kontinentalnog bazena Balkanskog poluotoka (Hrašovec i dr. 2013, Pilarska i dr. 2006). Međutim, u kontekstu predviđenog pomicanja granica areala gubara na području Europe sa juga prema sjeveru (Vanhanen i dr. 2007), što bi za sobom zacijelo donijelo i altitudinalno pomicanje granica, posljedica prestanka uloge Dinarida kao fizičke migratorne barijere moglo bi biti drastično povećavanje genetičke raznolikosti populacija gubara u vrijednim kontinentalnim šumama. Takav bi razvoj situacije sa stajališta zaštite šuma bio nepoželjan jer visoka genetička raznolikost sa sobom donosi visok potencijal adaptacije na ekološke pritiske iz okoline (Barett i Schluter 2008, Frankham i dr. 2002, Hansson i Westerberg 2002, Lande 1998, Reed i Frankham 2003).

Iz istraživanja na području Sjeverne Amerike, poznato je da brzina stratificiranog širenja gubara podržanog antropogenim premještenjima može dostizati razine i do 30 km godišnje uz prosijek od 21 km i minimum od 9 km godišnje, dok je brzina migracije samostalnom i anemogenom diprezijom i iznosila svega 2,5 km godišnje (Liebhold i dr. 1992, 2007, Tobin i dr. 2009). Ako pretpostavimo da bi se slična dinamika stratificirane migracije podržane antropogenim premještanjima mogla odvijati i na području Europe, pri prosiječnoj brzini širenja od 20 km godišnje „ilirski“ haplotipovi teoretski bi za 10-ak godina mogli doprijeti do istočnih obronaka Alpa, jezera Balaton pa i Spačvanskog bazena, dospjevajući tako u najvrijednije sastojine hrasta lužnjaka u Hrvatskoj.

Imajući u vidu činjenicu da mitohondrijski biljezi pružaju informacije samo o ženskim genealoškim linijama, kao i činjenicu da nedostaju uzorci iz nekih interesantnih dijelova

Europe, dodatna uzorkovanja u zapaženim interesnim područjima te razvoj i korištenje jezgrinih biljega glavni su ciljevi za daljnja istraživanja kako bi se potvrdila i osnažila konačna slika genetičke varijabilnosti i filogeografskog strukturiranja gubara na području Europe. Takve robusne snimke postojećeg stanja filogeografske strukture i distribucije genske raznolikosti mogu davati važne informacije u kritičnoj primjeni kao što je donošenje odluka i strategija sprječavanja ili usporavanja migracije (Boykin i dr. 2012, Meyerson i Reaser 2002). Budući da je slabo širenje gubara u nepovoljnim staništima jedan od glavnih razloga sporijeg napredovanja gubara prema sjeveru Sjeverne Amerike (Sharov i dr. 1999), a implementacija barijerne zone uspješno je djelovala značajno usporavajući širenje gubara u Sjevernoj Americi u razdoblju od 1916 – 1965 (Liebhold i dr. 1992, Sharov i dr. 1998), slična strategija mogla bi se primijeniti na za gubara lošim staništima u području Dinarida kako bi se pokušalo zaustaviti prodiranje „ilirskih“ haplotipova u visoko vrijedne kontinentalne šume.

4 ZAKLJUČCI

Provedenim analizama molekularno filogenetičkih pokazatelja istraživanih populacija u ovom radu mogu se donijeti dsljedeći zaključci:

1. Na temelju molekularnog biljega, dijela COI gena mitohondrijske DNA analizirano je 38 populacija iz 16 zemalja Europe uključujući Gruziju.
2. Na temelju ustanovljenih genetičkih udaljenosti između haplotipova i molekularnog sata za porodicu Lepidoptera od oko 2,3% divergencije između svije sekvence odnosno 1,15% po sekvenci u milijun godina, procijenjeno vrijeme razdvajanja između gruzijskih i europskih linija je 0,67 do 1,3 milijuna godina, a između linija unutar Europe 0,07 do 0,8 milijuna godina. Vrijeme razdvajanja gruzijskih i ostalih europskih populaicja nastupilo je u Pleistocenu, u periodu kvartarnih glacijacijskih ciklusa.
3. Filogenetičke rekonstrukcije bazirane na metodi najveće vjerojatnosti (Maximum-Likelihood) i parsimonijske mreže sa izraženom zvjezdastom strukturom ukazuje da populacije gubara na užem području Europe doživljavaju demografsku ekspanziju iz matičnih populacija koje su nosile četiri glavna haplotipa LD13, LD4, LD7 i LD6, a geografska distribucija podskupina haplotipova upućuje da se model rekolonizacije gubara nakon amelioracije podudara sa modelom opisanim u paradigmi „leptir“
4. Podskupine prva tri glavna haplotipa zastupljene su na širim geografskim područjima dok je podskupina haplotipa LD6 prisutna samo na području Ilirske obale Pontsko-mediteranskog centra raznolikosti (refugije na Balkanskom poluotoku). Diskrepancije u distribuciji haplotipa LD4 širom Europe ali čak i prisustvo u poulacijama u Gruziji zbunjujuća su i otežavaju zaključivanja o filogenetičkom položaju, rekolonizacijskim putevima i filogeografiji ovog haplotipa, a dodatna uzorkovanja na području Male Azije te sjeverozapadno i sjeverno od Crnog mora možda bi mogla dati odgovore na neka od tih pitanja.
5. Generalno visoka razina genske raznolikosti ($H_T = 0,814$) u kombinaciji sa njenom distribucijom po istraživanim populacijama demonstriraju veliku gensku varijabilnost gubara na užem području Europe, što se odrazilo i u analizi molekularne varijance kojom je ustanovljeno da genska raznolikost unutar populacija ukupnoj varijabilnosti doprinosi sa gotovo 47%.

6. Bez obzira na visoku razinu unutarpopulacijske genske raznolikosti ($H_S = 0,437$), između istraživanih populacija ustanovljena je značajna filogeografska struktura što se vidi iz činjenice da je faktor fiksacije haplotipske raznolikosti G_{ST} manji od opserviranog faktora N_{ST} koji je pak statistički značajno manji od teoretskog N_{ST} ($p=0,010$).
7. Analizom molekularne varijance na tri hierarhijska nivoa ustanovljeno je 8 glavnih grupa populacija, a u grupama 1, 3 i 5 uočena je po jedna populacija koja značajno divergira od ostalih populacija u grupi. Uzroci divergencija mogli bi biti posljedica uzorkovanja ili antropogene migracije kojom se povećala frekvencija nekih haplotipova koji inače nisu prisutni u ostalim populacijama u grupi. Potrebno je dodatno uzorkovanje na istim i novim lokalitetima kako bi se pokušalo točno determinirati uzroke divergencije.
8. Generalna slika distribucije genske raznolikosti podudara se sa teorijom glacijalnih refugija u južnim poluotocima Europe, a uočene su neke važne činjenice. Najveća zabilježena genska raznolikost ustanovljena je u priobalnim populacijama u Hrvatskoj (3, $r = 2,555$; i 7, $r = 2,815$), zatim u kontinentalnoj Francuskoj (59, $r = 2,500$), Makedoniji (45, $r = 2,318$) i Italiji (populacija 35, $r = 2,245$ u Italiji)
9. Povećana genska raznolikost u Francuskoj posljedica je sekundarnog kontakta haplotipova iz podskupine LD7 koji su iz Apeninskog poluotoka napučili zapadnu Europu sa haplotipovima iz podskupine LD13 koji su uspješno migrirali iz područja Balkanskog poluotoka prema zapadu. Obilna zastupljenost haplotipova iz podskupine LD7 porijeklom iz Apeninskog poluotoka na području zapadne Europe smanjuje vjerojatnost povećavanja genske raznolikosti populacija u zapadnoj Europi kao posljedice migracije populacija iz jadransko-mediteranskog centra raznolikosti (Apeninskog poluotoka) u kontekstu pomicanja areala gubara sa juga prema sjeveru Europe.
10. Najveća genska raznolikost i jasna diferencijacija od ostalih populacija na području Balkanskog poluotoka podupire hipotezu o postojanju kriptičke odnosno mikro refugije (Rull 2009) gubara u primorskim populacijama u Hrvatskoj kako su pretpostavili Lacković i dr. (2015). Lanac Dinarida očito je povijesno djelovao kao fizička migratorna barijera koja je onemogućavala tok gena između populacija koje nastanjuju razdvojene regije. Dok su uvijeti u kontinentalnom dijelu Balkanskog

poluotoka doveli do smanjenja genske raznolikosti, uvjet u primorskom dijelu očito nisu bili tako pogubni na stvaranje i održavanje genske raznolikosti populacija gubara koje napućuju te krajeve.

11. Pojava haplotipa LD6 u populaciji 65 u Pokuplju mogla bi biti signal uspostavljanja mehanizama migracije i toka gena između primorskih i kontinentalnih populacija, što se očituje i kroz analizu fiksacijskih indeksa M ($3 : 65 = 3,045$; $7 : 65 = 2,153$ dok su indeksi u odnosu sa drugim kontinentalnim populacijama čak i dvostruko manji). Pitanje radi li se o rezultatu antropogene migracije (što je vjerojatnije) ili u krajnoj liniji da je zbog klimatskih promjena uloga Dinarida kao fizičke migratorne barijere počela slabiti trebalo bi biti među ciljevima budućih istraživanja za što bi trebalo točno ustanoviti postoje li i u kojoj mjeri populacije gubara u području Dinarida te njihovu gensku raznolikost.

5 LITERATURA

Acevedo, F. E., Peiffer, M., Luthe, D., Felton, G., 2014: Strong teeth are needed to eat tough food: Caterpillar mandible durability in response to plant feeding. Pennsylvania State Univ., Univ. Park, PA. U: Entomology 2014 Conference proceedings, Portland, USA.

Advanced Systems, 2007: The gypsy moth alert. [www dokument]. URL: http://www.gypsymothalert.com/experiment_suv.html.

Alalouni, U., Schädler, M., Brandl, R., 2013: Natural enemies and environmental factors affecting the population dynamics of the gypsy moth. *Journal of Applied Entomology* 137: 721-738.

Armstrong, K. F., McHugh, P., Chinn, W., Frampton, E. R., Walsh, P. J., 2003: Tussock moth species arriving on imported used vehicles determined by DNA analysis. *New Zealand Plant Protection* - SE 56: 16–20.

Anot, D. E, Roper, C., Bayoumi, R. A. L., 1993: Digital codes from hypervariable tandemly repeated DNA sequences in the *Plasmodium falciparum* circumsporozoite gene can genetically barcode isolates. *Molecular and Biochemical Parasitology* 61: 15–24.

Arthofer, W., 2005: Mitochondrial and Nuclear Markers for Analyzing the Phylogeography of *Pityogenes chalcographus* (Coleoptera, Scolytidae): Development, Applications and Pitfalls. Doktorska disertacija. Universität für Bodenkultur Wien.

Avice, J. C., 1998: The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.

Avice, J. C., 2000: *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.

Avice, J. C. 2006: *Evolutionary pathways in nature. A phylogenetic approach*. Cambridge University Press, Cambridge.

Avice, J. C., 2009: Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36, 3-15.

Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., Saunders, N. C., 1987: Intraspecific Phylogeography: The mitochondrial DNA bridge

between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

Avtzis, D. N., 2001: Control of the most dangerous Insects of Greek Forests and Plantations. U: *Proceedings: Integrated Management and Dynamics of Forest Defoliating Insects*. Liebhold, A. M., McManus, M. L., Otvos, I. S., Fosbroke, S. L. C. (Ur.): 1-6, , Victoria, British Columbia, Canada.

Ball, S. L., Armstrong, K. F., 2006: DNA barcodes for insect pest identification: A test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Canadian Journal of Forest Research* 36: 337–350.

Barett, R. D. H., Schluter, D., 2008: Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 38-44.

Beebee, T. J. C., Rowe, G., 2008: *An introduction to molecular ecology*. Oxford University Press, New York.

Behura, S. K., 2006: Molecular marker systems in insects: Current trends and future avenues. *Molecular Ecology* 15: 3087-3113.

Berthier, K., Chapuis, M. P., Moosavi, S. M., Tohidi-Esfahani, D., Sword, G. A., 2011: Nuclear insertions and heteroplasmy of mitochondrial DNA as sources of intraindividual genomic variation in grasshoppers. *Systematic Entomology* 36: 285-299.

BIO Intelligence Service 2012: Disturbances of EU forests caused by biotic agents, Final Report prepared for European Commission (DG ENV).

Bogdanowicz, S. M., Wallner, W. E., Bell, J., ODell, T. M., Harrison, R. G., 1993: Asian gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) in North America: evidence from molecular data. *Annals of the Entomological Society of America* 86: 710-715.

Bogdanowicz, S. M., Mastro, V. C., Prasher, D. C., Harrison, R. G., 1997: Microsatellite DNA Variation Among Asian and North American Gypsy Moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Annals of the Entomological Society of America* 90: 768-775.

Bogdanowicz, S. M., Schaefer, P. W., Harrison R. G., 2000: Mitochondrial DNA variation among worldwide populations of gypsy moths, *Lymantria dispar*. *Molecular phylogenetics and evolution* 15: 487-495.

- Bogenschutz, H., Maier, K., Trzebitzky, C., 1989: Gypsy moth outbreak and control in southwest Germany, 1984 – 1986. U: Wallner, W. E., McManus, K. A. (Ur.), *Lymantriidae: a comparison of features of new and old world tussock moths*, General technical report NE - 123U S Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station, 89–99, Broomall.
- Bonacci, O., 2010: Analiza nizova srednjih godišnjih temperatura zraka u Hrvatskoj. *Grđevinar* 62: 781-791.
- Boykin, L. M., Armstrong, K. F., Kubatko, L., De Barro, P., 2012: Species delimitation and global biosecurity. *Evolutionary bioinformatics* 8: 1-37.
- Brower, A. V. Z., 1994: Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 6491–6495.
- Brus, D. J., Hengeveld, G. M., Walvoort, D. J. J., Goedhart, P. W., Heidema, A. H., Nabuurs, G. J., Gunia, K., 2011: Statistical mapping of tree species over Europe. *European Journal of Forest Research* 131: 145–157.
- Carrol, S. B., 2001: Chance and necessity: the evolution of morphological complexity and diversity. *Nature* 409: 1102-1109.
- Clarke, C., Ford, E. B., 1982: Intersexuality in *Lymantria dispar* (L.). A further reassessment. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 214: 285–288.
- Clayton, D. A., 1982: Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28: 693–705.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K. A., 2000: TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9: 1657–1659.
- Cooper, S. J., Ibrahim, K. M., Hewitt, G. M., 1995: Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* 4: 49-60.
- Courchamp, F., Berec, L., Gascoigne, J., 2008: *Allee effects in ecology and conservation*. Oxford university press. New York

- Crandall, K. A., Templeton, A.R., 1993: Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 135: 959-969.
- Cruickshank, R. H., 2002: Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic and Applied Acarology* 7: 3-14.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., Posada, D., 2012: jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9: 772.
- Dean, M. D., Ballard, J. W. O., 2001: Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 98: 279-283.
- Deml, R., Dettner, K., 1995: “Balloon hairs” of gypsy moth larvae (Lep., Lymantriidae): morphology and comparative chemistry. *Comparative Biochemistry and Physiology* 112: 673-681.
- deWaard, J. R., Mitchell, A., Keena, M. A., Gopurenko, D., Boykin, L. M., Armstrong, K. F., Pogue, M. G., Lima, J., Floyd, R., Hanner, R. H., Humble, L. M., 2010: Towards a Global Barcode Library for Lymantria (Lepidoptera: Lymantriinae) Tussock Moths of Biosecurity Concern. *PLoS ONE* 5: e14280. doi:10.1371/journal.pone.0014280
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L., 2002: A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581.
- Duran, S., 2003: Phylogeography, gene flow and population structure of *Crambe crambe* (Porifera: Poecilosclerida). Dissertation, Universitat de Barcelona.
- Elkinton, J. S., Liebhold, A. M., 1990: Population dynamics of gypsy moth in North America. *Annual Review of Entomology* 35: 571–596.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., Quattro J. M., 1992: Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–491.
- Excoffier, L., Lischer, H. E. L., 2010: Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.

Floyd, R., Abebe, E., Papert, A., Blaxter, M., 2002: Molecular barcodes for soil nematode identification. *Molecular Ecology* 11: 839–850.

Floyd, R., Lima, J., deWaard, J. R., Humble, L. R., Hanner, R. H., 2010: Common goals: policy implications of DNA barcoding as a protocol for identification of arthropod pests. *Biological Invasions* 12: 2947-2954.

Foote, K. E., Lynch, M., 2011: Geographic Information Systems as an Integrating Technology: Context, Concepts, and Definitions. The Geographer's Craft Project, Department of Geography, The University of Colorado at Boulder. online: <http://www.colorado.edu/geography/gcraft/notes/intro/intro.html>

Forbush, E. H., Fernald, C. H., 1896: The gypsy moth. Wright and Potter, Boston.

Forest Europe, 2011: State of Europe's Forests 2011 – Status and Trends in Sustainable Forest Management in Europe, jointly prepared by Forest Europe Liaison Unit Oslo, the United Nations Economic Commission for Europe (UNECE) and the Food and Agricultural Organization of the United Nations (FAO).

Frankham, R., Ballou, J. D., Briscoe, D. A., 2002: Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press, Cambridge.

Goldschmidt, R., 1934: *Lymantria*. *Bibliographia Genetica* 11: 1–185.

Graur, D., Li W.-H., 2000: Fundamentals of molecular evolution. Sinauer Associates Inc.

Grijpma, P., 1989: Overview of research of *Lymantriids* in eastern and western Europe. U: Wallner, W. E., McManus, K. A., (Ur.), *Lymantriidae: a comparison of features of new and old world tussock moths*, General technical report NE -123 US Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station, 21–49, Broomall.

Guindon, S., Gascuel, O., 2003: A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood". *Systematic Biology* 52: 696-704.

Habel, J. C., Schmitt, T., Müller, P., 2005: The fourth paradigm pattern of post-glacial range expansion of European terrestrial species: the phylogeography of the Marbled White butterfly (*Satyrinae*, *Lepidoptera*). *Journal of Biogeography* 32: 1489-1497.

- Hall, T. A., 1999: BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 41: 95-98.
- Hansson, B., Westerberg, L., 2002: On the correlation between heterozygosity and fitness in natural populations. *Molecular Ecology* 11: 2467-2474.
- Hartl, D. L., Clark, A. G., 2006: *Principles of population genetics*, fourth edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., deWaard, J. R., 2003: Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B - Biological Sciences* 270: 313–321.
- Hewitt, G. M., 1999: Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.
- Hewitt, G. M., 2000: The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hewitt, G. M., 2001: Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.
- Hewitt, G. M. 2004: Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 359: 183-195.
- Higashiura, Y., Ishihara, M., Schaefer, P. W., 1999: Sex ratio distortion and severe inbreeding depression in the gypsy moth *Lymantria dispar* L. in Hokkaido, Japan. *Heredity* 83: 290–297.
- Higashiura, Y., Yamaguchi, H., Ishihara, M., Ono, N., Tsukagoshi, H., Yokobori, S., Tokishita, S., Yamagata, H., Fukatsu, T., 2011: Male death resulting from hybridization between subspecies of the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Heredity* 106: 603-613.
- Hlásny, T., Turcánym M., 2008: Insect pests as climate change driven disturbances in forest ecosystems. U: Strelcova, K., Matyas, C., Kleidon, A., Lapin, M., Matejka, F., Blazenec, M., Skvarenina, J., Holec, J. (Ur.), *Bioclimatology and Natural Hazards*. Springer, Netherlands, 165-178.
- Holsinger, K. E., Weir, B. S., 2009: "Genetics in geographically structured populations: Defining, estimating and interpreting F_{ST} ". *Nature Reviews Genetics* 10: 639–50. doi:10.1038/nrg2611

Horn, A., Roux-Morabito, G., Lieutier, F., Kerdelhue, C., 2006: Phylogeographic structure and past history of the circum-Mediterranean species *Tomicus destruens* Woll. (Coleoptera: Scolytinae). *Molecular Ecology* 15: 1603-1615.

Hoskins, R. A., Smith, C. D., Carlson, J. W., Carvalho, A. B., Halpern, A., Kaminker, J. S., Kennedy, C., Mungall, C. J., Sullivan, B. A., Sutton, G. G., Yasuhara, J. C., Wakimoto, B. T., Myers, E. W., Celniker, S. E., Rubin, G. M., Karpen, G. H., 2002: Heterochromatic sequences in a *Drosophila* whole-genome shotgun assembly. *Genome Biology* 3: 1-16.

Hough, J. A., Pimentel, D., 1978: Influence of Host Foliage on Development, Survival, and Fecundity of the Gypsy Moth. *Environmental Entomology* 7: 97-102.

Hrašovec, B., Harapin, M., 1999: Dijagnozno-prognozne metode i gradacije značajnih štetnih kukaca u šumama Hrvatske. *Šumarski list* 5–6: 183–193.

Hrašovec, B., Pernek, M., Lukić, I., Milotić, M., Diminić, D., Franjević, M., Hajek, A., Linde A., Pilarska, D., 2013: First record of the pathogenic fungus *Entomophaga maimaiga* Humber, Shimazu, and Soper (Entomophthorales: Entomophthoraceae) within an outbreak populations of *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebididae) in Croatia. *Periodicum biologorum*. 115: 379-384.

Hudson, P. J., Cattadori, I. M., 1999: The Moran effect: a cause of population synchrony. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 1-2.

Hurlbert, S. H., 1971: The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* 52: 577-586.

IPP, 2013: Gubar (*Lymantria dispar*). U: Izvještajno prognozni poslovi u šumarstvu za 2013. i 2014. godinu. Hrvatski šumarski institut i Ministarstvo poljoprivrede Republike Hrvatske, 17-23.

Johnson, M. D., Liebhold, A. M., Ottar, N. B., McManus, M. L., 2005: Circumpolar variation in periodicity and synchrony among gypsy moth populations. *Journal of Animal Ecology* 74: 882-892.

Johnson, M. D., Liebhold, A. M., Tobin, P. C., Bjørnstad, O. N., 2006: Allee effect and pulsed invasion by the gypsy moth. *Nature* 444: 361-363.

- Jones, C. G., Ostfeld, R. S., Richard, M. P., Schaubert, E. M., Wolff, J. O., 1998: Chain reactions linking acorns to gypsy moth outbreaks and Lyme disease risk. *Science* 279: 1023-1026.
- Karolewski, P., Grzebyta, J., Oleksyn, J., Giertych, M. J., 2007: Effects of temperature on larval survival rate and duration of development in *Lymantria monacha* (L.) on needles of *Pinus sylvestriy* (L.) and *L. dispar* (L.) on leaves of *Quercus robur* (L.). *Polish Journal of Ecology* 55: 595-600.
- Keena, M. A., Côte, M.-J., Grinberg, P. S., Wallner, W. E., 2008: World distribution of female flight and genetic variation in *Lymantria dispar* (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environmental Entomology* 37: 636-649.
- Kimura, M., 1983: The neutral theory of molecular evolution. Cambridge University Press, Cambridge.
- Klein, H., 1994: Der Schwammspinner, Forstschädling oder Bioindikator?. Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland, Bonn.
- Klepac, D., 1996: Rast i prirast hrasta lužnjaka. U: Klepac, D. (Ur.) *Hrast lužnjak u Hrvatskoj*. Hrvatska Akademija znanosti i umjetnosti: 213-226.
- Klepac, D., Spaić, I., 1965: Utjecaj nekih defolijatora na debljinski prirast hrasta lužnjaka. *Šumarski list* 89: 93-101.
- Kovačević, Ž., 1956: Primijenjena entomologija. 3. knjiga, Šumski štetnici. Poljoprivredni nakladni zavod, Zagreb.
- Lacković, N., Bertheau, C., Stauffer, C., Pernek, M., Avtzis, D., 2015: Genetic split between coastal and continental populations of gypsy moth separated by Dinaric Alps. *Journal of Applied Entomology*. doi: 10.1111/jen.12207
- Lafontaine, J. D., Fibiger, M., 2006: Revised higher classification of the Noctuidae (Lepidoptera). *Canadian Entomologist* 138: 610–635. doi:10.4039/N06-012
- Lande, R., 1998: Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Researches on Population Ecology* 40: 259-269.

- Lechowicz, M. J., Mauffette, Y., 1986: Host preferences of the gypsy moth in eastern North American versus European forests. *Revue d'Entomologie du Quebec* 31: 43–51.
- Li W. H., 1997: *Molecular evolution*. Sinauer, Sunderland.
- Liebhold, A. M., Halverson, J., Elmes, F., 1992: Gypsy moth invasion in North America: A Quantitative analysis. *Journal of Biogeography* 19: 513-520.
- Liebhold, A. M., Thorpe, K., Ghent, J., Lyons, D. B., 1994: Gypsy moth egg mass sampling for decision-making: a users guide. NA-TP-04-94. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Area, State and Private Forestry, Radnor.
- Liebhold, A. M., MacDonald, W. L., Bergdahl, D., Mastro, V. C., 1995: Invasion by exotic forest pests: A threat to forest ecosystems. *Forest Science Monographs* 30: 1–49.
- Liebhold, A. M., Kamata, N., 2000: Are population cycles and spatial synchrony characteristic of forest insect populations? *Population Ecology* 42: 205-209.
- Liebhold, A. M., Sharov, A. A., Tobin, P. C., 2007: *Population Biology of Gypsy Moth Spread*. U: Tobin, P. C.; Blackburn, L. M., (Ur.), *Slow the Spread: a national program to manage the gypsy moth*. Gen. Tech. Rep. NRS-6, U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northern Research Station: 15-32, Newtown Square Philadelphia.
- Lukić I., 2012: Razvoj ličinki gubara (*Lymantria dispar* l.), različitog geografskog porijekla, na lišću hrasta crnike (*Quercus ilex* l.). Diplomski rad. Šumarski Fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
- Lunt, D. H., Zhang, D.-X., Szymura, J. M., Hewitt, G. M., 1996: The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology* 5: 153-165.
- Maliene, V., Grigonis, V., Palevičius, V., Griffiths, S., 2011: Geographic information system: Old principles with new capabilities. *Urban Design International* 16: 1–6. doi:10.1057/udi.2010.25
- Margaletić, J., Jurjević, V., Glavaš, M., Hrašovec, B., Diminić, D., 2007: Analiza suzbijanja gubara (*Limantria dispar* L.) tijekom 2005. godine u državnim šumama Hrvatske. *Šumarski list* 131: 539-548.

Mason, C. J., McManus M. L., 1981: Larval dispersal of the gypsy moth. U: Doane, C. C., McManus M. L., (Ur.), The gypsy moth: research toward integrated pest management. USDA Technical Bulletins 1584, 161-202, Washington DC.

Maughan, H., Masel, J., Birky, W. C., Nicholson, W. L., 2007: The roles of mutation accumulation and selection in loss of sporulation in experimental populations of *Bacillus subtilis*. *Genetics* 177: 937–948.

Mayo, H. J., Straka, T. J., Leonard, D. S., 2003: The cost of slowing the spread of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Journal of Economic Entomology* 96: 1448-1454.

McFadden, M. W., McManus, M. L., 1991: An insect out of control? The potential for spread and establishment of the gypsy moth in new forest areas in the United States. U: Baranchikov, Y. N.; Mattson, W. J., Hain, F. P., Payne, T. L., (Ur.), Forest insect guilds: patterns of interaction with host trees. Gen. Tech. Rep. NE-153. U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Forest Experiment Station, 172-186, Radnor.

McManus, M. L., Csóka, G., 2007: History and Impact of Gypsy Moth in North America and Comparison to Recent Outbreaks in Europe. *Acta Silvatica and Lignaria Hungarica* 3: 47-64.

McManus, M. L., Houston, D. R., Wallner, W. E., 1979: Gypsy Moth Handbook - The Homeowner and the Gypsy Moth: Guidelines for Control. United States Department of Agriculture, Combined Forest Pest Research and Development Program, Home and Garden Bulletin, Washington DC.

McNamara, D. G., 1996: EPPO's perspective on the gypsy moth in Europe. U: Proceedings, 1995 Annual Gypsy Moth Review, Michigan Department of Agriculture 60-65, Traverse City.

Meyerson, L. A., Reaser, J. K., 2002: Biosecurity: moving toward a comprehensive approach. *BioScience* 52: 593–600.

Mihajlović, Lj., 2008: *Lymantria dispar* L. – gubar, Šumarska entomologija, Šumarski fakultet Beograd, 655 – 667, Beograd.

Ministry of Primary Industries, 2015: Pests and Diseases, Gypsy Moth. New Zealand Government. Online 13.01.2015. <http://www.biosecurity.govt.nz/pests/gypsy-moth>

Minnesota DNR, 2014. Gypsy moth. [www document]. URL: <http://www.dnr.state.mn.us/invasives/terrestrialanimals/gypsymoth/index.html>.

Mosbacher, G. C., 1975: Sex specific cell differentiation in different types of intersexes of *Lymantria dispar* L. U: Reinboth, R., (Ur.), *Intersexuality in the Animal Kingdom*. Springer, 146–157, Berlin.

Myers, J. H., 1998: Synchrony in outbreaks of forest lepidoptera: a possible example of the moran effect. *Ecology* 79: 1111–1117.

Nealis, V. G., Erb, S., 1993: A source book for management of the gypsy moth. For. Can., Great Lakes For. Cent., Sault Ste. Marie, Min. Suppl. and Serv, Ontario.

Nebdal, M. A., Flynn, J. J., 1998: Do the combined effects of the assymetric process of replication and DNA damage from oxygen radicals produce a mutation-rate signature in the mitochondrial genome? *Molecular Biology and Evolution* 15: 219-223.

Nève, G., Meglecz, E., 2000: Microsatellite frequencies in different taxa. *Tree* 15: 376-377.

Petit, R. J., El Mousadik, A., Pons, O., 1998: Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844–855.

Pernek, M., Pilaš, I., 2005: Gradations of Gypsy Moth - *Lymantria dispar* L. (Lep., Lymantriidae) in Croatia. *Šumarski List* 5-6: 263-270.

Pernek, M., Pilaš, I., Vrbek, B., Benko, M., Hrašovec, B., Milković, J., 2008: Forecasting the impact of the Gypsy moth on lowland hardwood forests by analyzing the cyclical pattern of population and climate data series. *Forest Ecology and Management* 255: 1740-1748.

Pilarska, D., McManus, M., Pilarski, P., Georgiev, G., Mirchev, P., Linde, A., 2006: Monitoring the establishment and prevalence of the fungal entomopathogen *Entomophaga maimaiga* in two *Lymantria dispar* L. populations in Bulgaria. *Journal of Pest Science* 79: 63-67.

Pimentel, D., Lach, L., Zuniga, R., Morrison, D., 2000: Environmental and economic costs associated with non-indigenous species in the United States. *BioScience* 50: 53–65.

Pogue, M. G., Schaefer, P. W., 2007: A Review of Selected Species of *Lymantria* Hübner [1819] (Lepidoptera: Noctuidae: Lymantriinae) from Subtropical and Temperate Regions of

Asia, Including Descriptions of Three New Species, Some Potentially Invasive to North America. US Department of Agriculture, Washington DC.

Pons, O., Petit, R. J., 1996: Measuring and testing genetic differentiation with ordered Versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237–1245.

Ramel, C., 1998: Biodiversity and intraspecific genetic variation. *Pure and Applied Chemistry* 70: 2079-2084.

Reed, D. H., Frankham, R., 2003: Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230-237.

Richter, C., 1992: Reactive oxygen and DNA damage in mitochondria. *Mutation Research* 275: 249-255.

Root, T. L., Price, J. T., Hall, K. R., Schneider, S. H., Rosenzweig, C., Pounds, J. A., 2003: Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature* 421: 57-60.

Rull, V., 2009: Microrefugia. *Journal of Biogeography* 36: 481–484. doi:10.1111/j.1365–2699.2008.02023.x

Santos, H., Burban, C., Rousselet, J., Rossi, J. P., Branco, M., Kerdelhué, C., 2011: Incipient allochronic speciation in the pine processionary moth (*Thaumetopoea pityocampa*, Lepidoptera, Notodontidae). *Journal of Evolutionary Biology* 24: 146-58.

Schintlmeister, A., 2004: The Taxonomy of the genus *Lymantria* Hübner, [1819] (Lepidoptera: Lymantriidae). *Quadriana* 7: 1-248.

Schmitt, T., 2007: Molecular biogeography of Europe: Pleistocene cycles and postglacial trends. *Frontiers in Zoology* 4: 11. doi:10.1186/1742-9994-4-11

Schmitt, T., Habel, J. C., Zimmermann, M., Müller, P., 2006: Genetic differentiation of the Marbled White butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and postglacial range expansion in southeastern Europe. *Molecular Ecology* 15: 1889-1901.

Schmitt, T., Hewitt, G., 2004: The genetic pattern of population threat and loss: a case study of butterflies. *Molecular Ecology* 13: 21-31.

Schmitt, T., Seitz, A., 2001: Influence of the ice-age on the genetics and intraspecific differentiation of butterflies. Proceedings of the International Colloquium of the European Invertebrate Survey (EIS), Macevol Priory: 16-26. France.

Schmitt, T., Varga, Z., Seitz, A., 2005: Are *Polyommatus hispana* and *Polyommatus slovacus* bivoltine *Polyommatus coridon* (Lepidoptera: Lycaenidae)? – The discriminatory value of genetics in the taxonomy. *Organisms Diversity and Evolution* 5: 297-307.

Seddon, J. M., Santucci, F., Reeve, N. J., Hewitt, G. M., 2002: Caucasus Mountains divide postulated postglacial colonization routes in the white-breasted hedgehog, *Erinaceus concolor*. *Journal of Evolutionary Biology* 15: 463-467.

Sharov, A. A., Liebhold, A. M., 1998: Model of slowing the spread of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) with a barrier zone. *Ecological Applications* 8: 1170-1179.

Sharov, A. A., Pijanowski, B. C., Liebhold, A. M., Gage, S. H., 1999: What affects the rate of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) spread: winter temperature or forest susceptibility. *Agricultural and Forest Entomology* 1: 37-45.

Slatkin, M., 1981: Estimating levels of gene flow in natural populations. *Genetics* 99: 323-335.

Slatkin, M., 1995: A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.

Speare, T., Colley, R., 1912: The artificial use of the brown-tail fungus in Massachusetts, with practical suggestions for private experiment, and a brief note on a fungous disease of the gypsy moth caterpillar. Wright and Porter, Boston, MA. Online lokacija: https://archive.org/stream/artificialuseofb00mass/artificialuseofb00mass_djvu.txt

Stern, C., 1943: The Hardy–Weinberg law. *Science* 97: 137–138.

Sunnucks, P., 2000: Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 199-203.

Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.-G., Cosson, J.-F., 1998: Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.

- Tamura, K., Nei, M., 1993: Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10: 512–526.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013: MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729.
- Tobin, P. C., Blackburn, L. M., 2008: Long-distance dispersal of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae) facilitated its initial invasion of Wisconsin. *Environmental Entomology* 37: 87-93.
- Tobin, P. C., Robinet, C., Johnson, D. M., Whitmire, S. L., Bjørnstad, O. N., Liebhold, A. M., 2009: The role of Allee effects in gypsy moth, *Lymantria dispar*(L.), invasions. *Population Ecology* 51: 373-384.
- True, J. R., 2003: Insect melanism: the molecules matter. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 640-647.
- Turelli, M., Barton, N. H., Coyne, J. A., 2001: Theory and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 330-343.
- Vandergast, A. G., Perry, W. M., Lugo, R. V., Hathaway, S. A., 2011: Genetic landscapes GIS Toolbox: tools to map patterns of genetic divergence and diversity. *Molecular Ecology Resources* 11: 158–161.
- Vanhanen, H., Veteli, T. O., Päivinen, S., Kellomäki, S., Niemelä, P., 2007: Climate Change and Range Shifts in Two Insect Defoliators: Gypsy Moth and Nun Moth – a Model Study. *Silva Fennica* 41: 621-638.
- Vasić, K., 1981: Priručnik izveštajne i dijagnostičko prognozne službe zaštite šuma. Savez inženjera i tehničara šumarstva i industrije za preradu drveta Jugoslavije, Beograd. 336 str.
- Wallner, W. E., 1997: Global Gypsy - The Moth That Gets Around. U: Britton, K. O., (Ur.), *Exotic Pests of Eastern Forests, Conference Proceedings, USDA Forest Service & TN Exotic Pest Plant Council*, Nashville.
- Walther, G.-R., Post, E., Convey, P., Menzel, A., Parmesan, C., Beebee, T. J. C., Fromentin, J. M., Hoegh-Guldberg, O., Bairlein, F., 2002: Ecological responses to recent climate change. *Nature* 416: 389-395.

- Wan, Q.-H., Wu, H., Fujihara, T., Fang, S.-G., 2004: Which genetic marker for which conservation genetics issue? *Electrophoresis* 25: 2165-2176.
- White, D. J., Wolff, J. N., Pierson, M., Gemmell, N. J., 2008: Revealing the hidden complexities of mtDNA inheritance. *Molecular Ecology* 17: 4925 – 4942.
- Williams, D. W., Liebhold, A. M., 1995: influence of weather on the synchrony of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) outbreaks in New England. *Environmental Entomology* 24: 987-995.
- Wilson, A. C., Cann, R. L., Carr, S. M., George, M., Gyllenstein, U. B., Helm-Bychowski, K. M., Higuchi, R. G., Palumbi, S. R., Prager, E. M., Sage, R. D., Stoneking, M., 1985: Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375–400.
- Wu, C. I., 2001: The genetic view of the process of speciation. *Journal of Evolutionary Biology* 14: 851-865.
- Wu, R., Lin, M., 2006: Functional mapping — how to map and study the genetic architecture of dynamic complex traits. *Nature Reviews Genetics* 7: 229–237.
- Zhang, D. X., Hewitt, G. M., 1996: Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. *Tree* 11: 247-451.
- Zhang, D. X., Hewitt, G. M., 2003: Nuclear DNA analysis in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12: 563-584.
- Zolubas, P., Gedminas, A., Shields, K., 2001: Gypsy moth parasitoids in the declining outbreak in Lithuania. *Journal of Applied Entomology* 125: 229–234.

6 PRILOZI

6.1 Prilog 1: Novi Europski tipovi šuma (eng. *New European Forest Types*) prema izvješću *Forest Europe* (2011)

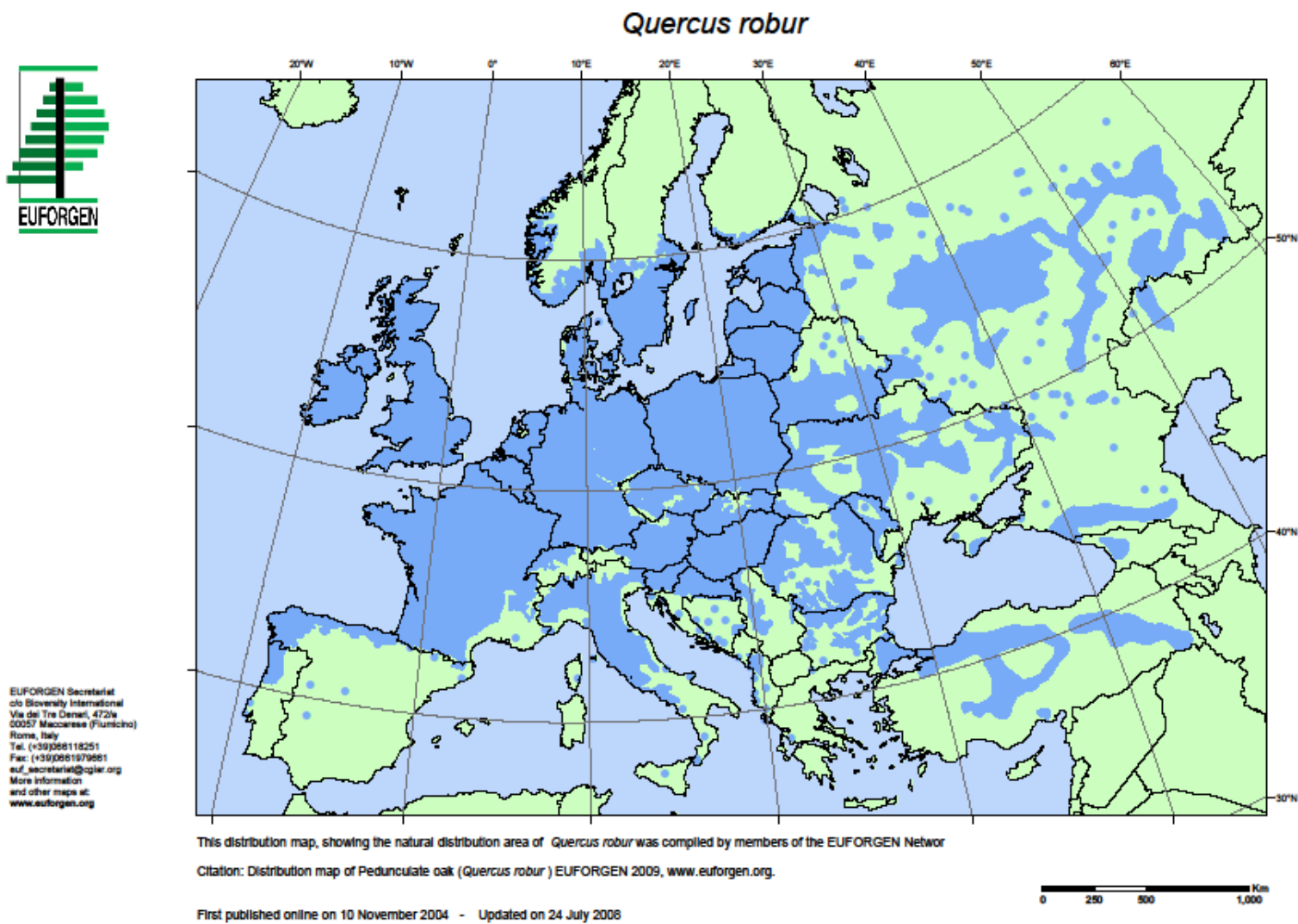
Tablica 8. Lista i opis novih Europskih tipova šuma prema izvješću *Forest Europe* (2011)

1. Borealne šume	Ekstenzivne borealne, šume siromašne vrstama, dominirane vrste <i>Picea abies</i> i <i>Pinus sylvestris</i> . Listopadno drveće uključujući breze, topole, jarebiku i vrbe nastupaju kao pionirske vrste
2. Hemiborealne i umjerene (nemoralne) šume četinjača i mješane šume listača i četinjača	Latitudne mješane šume smještene između borealnih i nemoralnih (ili umjerenih) šumskih zona sa karakteristikama sličnima borealnim šumama, ali nešto većom raznolikosti vrsta drveća kao što su <i>Tilia cordata</i> , <i>Fraxinus excelsior</i> , <i>Ulmus glabra</i> i <i>Quercus robur</i> . Uključuju također: čiste i mješane šume u umjerenj zoni dominirane autohtonim europskim vrstama četinjača kao što su <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus nigra</i> , <i>Pinus pinaster</i> , <i>Picea abies</i> i <i>Abies alba</i>
3. Alpske šume	Šume visokih pojaseva planinskih lanaca centralne i južne Europe, obrasle s <i>Picea abies</i> , <i>Abies alba</i> , <i>Pinus sylvestris</i> , <i>Pinus nigra</i> , <i>Larix decidua</i> , <i>Pinus cembra</i> and <i>Pinus mugo</i> . Uključuju također i planinske šume borealne regije dominirane brezama
4. Acidofilne hrastove i hrastovo-brezove šume	Razbacane (disjunktne) pojave vezane uz manje plodna tla umjerene šumske zone; sastav vrsta dominirana acidofilnim hrastovima (<i>Q. robur</i> , <i>Q. petraea</i>) i brezom (<i>Betula pendula</i>)
5. Mezofilne listopadne šume	Povezane uz srednje bogata tla umjerene šumske zone; sastav vrsta je mješani i sačinjen od relativno velikog broja listopadnog drveća: <i>Carpinus betulus</i> , <i>Quercus petraea</i> , <i>Quercus robur</i> , <i>Fraxinus</i> , <i>Acer</i> i <i>Tilia cordata</i>
6. Bukove šume	Široko rasprostranjene nizinske i submontanske bukove šume. Bukve, <i>Fagus sylvatica</i> i <i>F. orientalis</i> (Balkan) dominiraju, lokalno značajna može biti i <i>Betula pendula</i>
7. Planinske bukove šume	Mješani listopadni vegetacijski pojas bjelogorica i četinjača u glavnim europskim planinskim lancima. Sastav vrsta razlikuje se od bukovih šuma i uključuje <i>Picea abies</i> , <i>Abies alba</i> , <i>Betula pendula</i> i mezofilne listopadne vrste drveća. Uključuje i planinske sastojine dominirane jelom
8. Termofilne listopadne šume	Listopadne i polu-listopadne šume pretežno mediteranske regije dominirane termofilnim vrstama, uglavnom vrste iz roda <i>Quercus</i> ; a vrste iz rodova <i>Acer</i> , <i>Ostrya</i> , <i>Fraxinus</i> , <i>Carpinus</i> često su asocirane kao sekundarne vrste. Uključuje i šume dominirane vrstom <i>Castanea sativa</i>
9. Bjelogorične vazdazelene šume	Bjelogorične vazdazelene šume mediteranske i makaronezijske regije dominirane sklerofilnim i laurifilnim vrstama, uglavnom iz roda <i>Quercus</i>

10. Šume četinjača mediteranske, makaronezijske i anatolijske regije	Varijabilna grupa šuma četinjača mediteranske, makaronezijske i anatolijske regije, od obale do visokih planina. Suha i uglavnom slabo razvijena tla limitiraju rast drveća. Zastupljeno je nekoliko vrsta drveća, nekih i endemskih iz rodova Pinus, Abies i Juniperus
11. Ritske i močvarne šume	Močvarne šume na tresetnim tlima široko rasprostranjene u borealnoj regiji. Vodni režim i režim hranjiva determiniraju dominantne vrste drveća: Pinus sylvestris, Picea abies ili Alnus glutinosa
12. Poplavne šume	Šume bogate obalnim i riječnim vrstama drveća karakterizirane različitim sastavom vrsta iz rodova Alnus, Betula, Populus, Salix, Fraxinus, Ulmus
13. Šume johe, breze i topole izvan riječnih područja	Pionirske šume dominirane vrstama roda Alnus, Betula ili Populus
14. Šume introduciranih vrsta drveća	Šume dominirane introduciranim vrstama drveća. Introducirana vrsta drveća može biti indentificirana na regionalnom (preporučeno) ili nacionalnom nivou i obuhvaća: • vrste drveća koje nisu autohtone u Europi (npr. Eucalyptus spp., Robinia pseudoacacia, Acacia dealbata, Ailanthus altissima, Prunus serotina, Quercus rubra, Fraxinus alba, Picea sitkensis, Pinus contorta, Pinus banksiana, Pseudotsuga menziesii, Tsuga heterophylla); • vrste drveća autohtone u Europi koje se na javljaju prirodno unutar granica pojedinih država; • vrste drveća autohtone samo u nekim regijama pojedinih europskih država

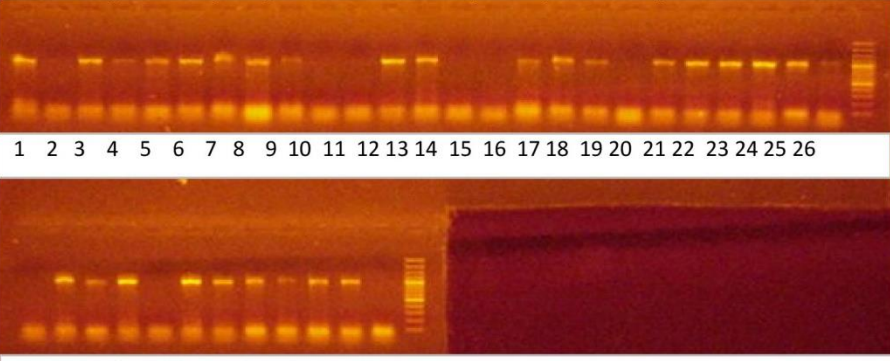
6.2 Prilog 2. Karta rasprostranjenosti hrasta lužnjaka na području Europe¹

¹ Karta je otisnuta na slijedećoj stranici



Slika 24. Prikaz rasprostranjenosti hrasta lužnjaka (*Q. robur*) na području Europe prema podacima EUFORGEN.

6.3 Prilog 3. Primjer vizualizacije produkata amplifikacije elektroforezom u agaroznom gelu.

No.	Test	#	Gel	Date	Slot	Sample	Result
72	PCR	83	GelRed	30.05.12.	1	16 32	+
					2	60 1	-
					3	60 2	+
					4	60 3	+
					5	60 4	+
					6	60 5	+
					7	60 6	+
					8	60 7	+
					9	60 8	+
					10	60 9	-
					11	60 10	-
					12	60 11	+
					13	60 12	+
					14	60 13	-
					15	60 14	-
					16	60 15	+
					17	60 16	+
					18	60 17	+
					19	60 18	-
					20	61 1	+
					21	61 2	+
					22	61 3	+
					23	61 4	+
					24	61 6	+
					25	62 1	+
					26	ladder 100bp	
					27	62 2	-
					28	62 3	+
					29	62 4	+
					30	62 5	+
					31	62 6	-
					32	62 7	+
					33	62 8	+
					34	62 9	+
					35	62 10	+
					36	62 11	+
					37	62 12	+
					38	-control	
					39	ladder 100bp	

Slika 25. Produkti uspješne amplifikacije predstavljeni su izraženom jednostrukom linijom, dok broj jažice bez linije predstavlja neuspješno amplificirani i odbačeni uzorak. Preostale svijetle zone su primer-dimer fragmenti i ostali fragmenti DNA predloška zbog kojih treba pročititi produkte prije sekvenciranja.

6.4 Prilog 4. Nukleotidni nizovi haplotipskih sekvenci determiniranih u istraživanju

U ovom istraživanju determinirano je ukupno 60 haplotipskih sekvenci.

Tablica 9. Lista haplotipskih sekvenci i pripadajućih nukleotidnih nizova u 5' - 3' smjeru

LD1

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATGTTTCACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD3

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAATAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD4

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD5

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCATGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAACCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD6

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD7

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD8

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCTGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD9

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAAGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD10

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCTAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD11

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACCCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATC
CTGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAG
AAAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATT
GAAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCT
AATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCAT
CTGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCT
CGTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAAT
AATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCT
TTCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCTAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTC
AGGATGTCCGAAAAA

LD12

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCATGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD13

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD14

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCCATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD15

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD16

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACACCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD17

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCCGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD18

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATAAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD19

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCATGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD20

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCATAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATCT
GAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTCG
TGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATAA
TCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTTT
CTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCAG
GATGTCCGAAAAA

LD21

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCATAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATCT
GAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTCG
TGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATAA
TCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTTT
CTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCAG
GATGTCCGAAAAA

LD22

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAACTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCATAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATCT
GAAAATTTTAATTCCAGTAGGAACTGCAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTCG
TGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATAA
TCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTTT
CTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCAG
GATGTCCGAAAAA

LD23

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCCA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAACTGCAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD24

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCATAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATCT
GAAAATTTTAATTCCAGTAGGAACTGCAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTCG
TGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATAA
TCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCTTTTTTTCCTCTTT
CTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCAG
GATGTCCGAAAAA

LD25

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAACTGCAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATCCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD26

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCAGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCATAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATCT
GAAAATTTTAATTCCAGTAGGAACTGCAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTCG
TGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATAA
TCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTTT
CTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCAG
GATGTCCGAAAAA

LD27

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAACCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAACTGCAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD28

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTATAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD29

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAATAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD30

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCCACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCAAAAAA

LD31

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAATGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCCACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCAAAAAA

LD32

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCATGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD33

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCCCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD34

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATTTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCAAAAAA

LD35

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTC
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCAAAAAA

LD36

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCAGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD37

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGATTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD38

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCCCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATGAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD39

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAGAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD40

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAAATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD41

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAATGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD42

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATCCCAAACATCCAAATGTTTCTTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD44

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATCCCTAAACATCCAAATGTTTCTTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD45

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACATAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTGGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD46

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCATGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD47

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATAAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD48

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCAACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD49

ATGAAATATAAGATCCTAAAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD50

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD51

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCCGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD52

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCATGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCAGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATGGAAGGTGAGTAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCCACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCAATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCAAAAA

LD53

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCATGATATAAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGGAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCAGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATGGAAGGTGAGTAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCCACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCTTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCAAAAAA

LD54

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCATGATATAAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGGAAATGAGCCACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCAGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATGGAAGGTGAGTAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCCACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCTTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCAAAAAA

LD55

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCATGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD56

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTTCACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATAGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD57

AAGAAATATAAGATCCTAAAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD58

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAACCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD59

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGAGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD60

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGTGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCGAAAAA

LD61

AAGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATATGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCAAAAAA

LD62

ATGAAATATAAGATCCTAGAGATGAGATAATATTTACGATATAAATGAATCTGGGTAAT
CAGAGTATCGTCGAGGTATACCTGCTAATCCTAAAAAATGTTGTGGGAAAAATGTTAAAT
TAACTCCAATAAATATGGTTATAAATTGGATTTTTTAATATGAAAGGATTTAAAGTTAATCC
TGAAAATAGTGGATATCAGTGAATAAATCCTCCTATAATAGCAAATACTGCTCCTATAGA
AAGAACGTAGTGAAAATGAGCTACTACATAATAAGTATCATGAAGGGTAATATCAATTG
AAGAATTAGATAAAATTACTCCGGTTAATCCTCCTACAGTGAATAAAAAATACAAATCCTA
ATCTTCAGAGAATAGAAGGTGAATAATTAATTTGAGTTCCATGTAATGTAGCTAATCATC
TGAAAATTTTAATTCCAGTAGGAAGTGAATAATTATTGTAGCAGAGGTAAAGTAAGCTC
GTGTATCAATATCTATACCTACAGTAAATATGTGGTGAGCTCAAACAATAAATCCTAATA
ATCCGATAGCTAATATTGCATAAATTATTCCTAAACATCCAAATGTTTCCTTTTTTCCTCTT
TCTTGGGAAATAATATGGGAAATTATTCCAAATCCTGGTAAAATTAAAATATAAACTTCA
GGATGTCCAAAAAA

6.5 Prilog 5. Rezultati testiranja najboljeg supstitucijskog modela nukleotidne supstitucije u programu jModeltest

Programom jModeltest 2.1.7. testirano je ukupno 88 nukleotidnih supstitucijskih modela te je određen njihov rang s obzirom na vjerodostojnost prema nekom od kriterija.

Tablica 10. Lista modela prema Akaike informacijskom kriteriju (AIC), prikazani su samo modeli čiji su doprinosi kumulativno doprinosili do 95% vjerodostojnosti za kriterij odabira modela supstitucije.

Broj	Model	-lnL	AIC	delataAIC	weight	cumWeight	uDelta
22	TrN+I	1349,6653	2947,3306	0,0000	0,2253	0,225	589,626
62	TIM2+I	1348,7789	2947,5577	0,2271	0,2011	0,426	589,854
24	TrN+I+G	1349,3204	2948,6409	1,3103	0,1170	0,543	590,937
64	TIM2+I+G	1348,4900	2948,9799	1,6493	0,0987	0,642	591,276
54	TIM1+I	1349,6369	2949,2739	1,9433	0,0852	0,727	591,570
72	TIM3+I+G	1348,9693	2949,9386	2,6080	0,0611	0,788	592,234
86	GTR+I	1348,0026	2950,0052	2,6746	0,0591	0,848	592,301
70	TIM3+I	1350,2017	2950,4034	3,0728	0,0485	0,896	592,699
56	TIM1+I+G	1349,2935	2950,5871	3,2565	0,0442	0,940	592,883

Tablica 11. Lista modela prema korigiranom Akaike informacijskom kriteriju (AICc), prikazani su samo modeli čiji su doprinosi kumulativno doprinosili do 95% vjerodostojnosti za kriterij odabira modela supstitucije.

Broj	Model	-lnL	AICc	deltaAICc	weight	cumWeight	uDelta
22	TrN+I	1349,6653	3003,5919	0,0000	0,3676	0,368	639,316
62	TIM2+I	1348,7789	3004,8305	1,2386	0,1979	0,565	640,555
24	TrN+I+G	1349,3204	3005,9136	2,3217	0,1151	0,681	641,638
54	TIM1+I	1349,6369	3006,5466	2,9547	0,0839	0,764	642,271
64	TIM2+I+G	1348,4900	3007,2750	3,6831	0,0583	0,823	642,999
70	TIM3+I	1350,2017	3007,6761	4,0842	0,0477	0,870	643,401
72	TIM3+I+G	1348,9693	3008,2337	4,6418	0,0361	0,907	643,958
56	TIM1+I+G	1349,2935	3008,8821	5,2902	0,0261	0,933	644,607
86	GTR+I	1348,0026	3009,3336	5,7417	0,0208	0,953	645,058

Tablica 12. Lista modela prema Bayesian informacijskom kriteriju (BIC), prikazani su samo modeli čiji su doprinosi kumulativno doprinosili do 95% vjerodostojnosti za kriterij odabira modela supstitucije.

Broj	Model	-lnL	BIC	deltaBIC	weight	cumWeight	uDelta
22	TrN+I	1349,6653	3507,3385	0,0000	0,6814	0,681	946,406
14	HKY+I	1354,5313	3510,5544	3,2158	0,1365	0,818	949,622
62	TIM2+I	1348,7789	3512,0819	4,7433	0,0636	0,882	951,149
24	TrN+I+G	1349,3204	3513,1650	5,8265	0,0370	0,919	952,232
54	TIM1+I	1349,6369	3513,7980	6,4595	0,0270	0,946	952,865

Tablica 13. Lista modela prema Decision theory kriteriju (DT), prikazani samo modeli čiji su doprinosi kumulativno spadali u 5% najboljih modela.

Broj	Model	-lnL	DT	deltaDT	weight	cumWeight
22	TrN+I	1349,6653	0,0061	0,0000	0,0265	0,0265
38	TPM2uf+I	1354,2408	0,0124	0,0063	0,0131	0,0396
66	TIM3ef+I	1423,2321	0,0126	0,0064	0,0129	0,0525

6.6 Prilog 6. Matrica p-udaljenosti između parova haplotipova

Matrica udaljenosti između parova haplotipskih sekvenci izračunata je u programu MEGA 6 i pripremljena za printanje u programu Excel (Microsoft Office 2007).

Tablica 14². Broj nukleotidnih supstitucija po mjestu (eng. per site) između parova haplotipskih sekvenci (ispod dijagonale) i pripadajuće standardne pogreške (iznad dijagonale)

² Tablica je otisnuta na slijedećoj stranici

Tablica 14. Broj nukleotidnih supstitucija po mjestu (eng. per site) između parova haplotipskih sekvenci (ispod dijagonale) i pripadajuće standardne pogreške (iznad dijagonale)