

UNIVERZITET U BEOGRADU
FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE
Katedra za parazitologiju



Bojan S. Gajić

ISPITIVANJE GENETIČKE
VARIJABILNOSTI I KORELACIJE
HAPLOTIPOVA MEDONOSNE PČELE
APIS MELLIFERA I PČELINJEG
KRPELJA *VARROA DESTRUCTOR*

-doktorska disertacija-

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE
Department of Parasitology



Bojan S. Gajić

ANALYSIS OF GENETIC VARIABILITY
AND HAPLOTYPE CORRELATION
BETWEEN HONEY BEE
APIS MELLIFERA AND HONEY
BEE MITE *VARROA DESTRUCTOR*

-Doctoral Dissertation-

Belgrade, 2016

Mentor 1:

Dr Zoran Kulišić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Mentor 2:

Dr Željko Radulović, naučni saradnik

Institut za medicinska istraživanja Univerziteta u Beogradu

Članovi Komisije:

Dr Jevrosima Stevanović, vanredni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Zoran Stanimirović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Datum odbrane: _____2016.

Beograd

Mojoj porodici

Doktorska disertacija urađena je u okviru realizacije projekta „Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane” koji finansira Ministarstvo prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (ev. br. 46002).

ISPITIVANJE GENETIČKE VARIJABILNOSTI I KORELACIJE HAPLOTIPOVA MEDONOSNE PČELE *APIS MELLIFERA* I PČELINJEG KRPELJA *VARROA DESTRUCTOR*

REZIME

U ovom radu ispitivana je genetička varijabilnost medonosne pčele *Apis mellifera* i pčelinjeg krpelja *Varroa destructor*, uz praćenje korelacije u distribuciji haplotipova domaćina i parazita. Za identifikaciju haplotipova pčela korišćeni su uzorci iz 48 pčelinjih društava sa osam lokaliteta na teritoriji Srbije, dok je za tipizaciju varoa i praćenje korelacije haplotipova domaćina i parazita analizirano 245 uzoraka varoe iz 29 košnica.

Sekvencioniranjem tRNA^{leu}-cox2 regiona definisano je šest haplotipova *A. mellifera*, pri čemu je haplotip C2aa opisan po prvi put. Zastupljenost identifikovanih haplotipova pčela razlikovala se u ukupnom uzorku, pri čemu je najzastupljeniji bio haplotip C2d, dok su najmanje prisutni bili haplotipovi C2aa i C2i. Distribucija haplotipova *A. mellifera* razlikovala se u zavisnosti od lokaliteta, pri čemu je na tri posmatrana lokaliteta utvrđen po jedan haplotip, na jednom lokalitetu dva i na četiri lokaliteta utvrđeno je prisustvo tri haplotipa pčela.

Rezultati sekvencioniranja delova mitohondrijalnih gena *V. destructor* otkrili su prisustvo tačkastih mutacija na pozicijama 1932 i 10133 mtDNK unutar *cox1* i *cytb* sekvenci. Na osnovu tih polimorfnih mesta, definisana su dva nova haplotipa varoe koji su nazvani Srbija 1 (S1) i Pešter 1 (P1). Obe otkrivene mutacije po svojoj prirodi spadaju u „tihe“ mutacije koje ne dovode do promene proteinskog lanca. Na hromatogramima pojedinih uzoraka otkriveni su dupli pikovi na haplotip definišućim mestima unutar *cox1* i *cytb*, čime je po prvi put utvrđena nukleotidna heteroplazmija kod vrste *V. destructor*.

Nakon utvrđivanja polimorfnih mesta metodom sekvencioniranja, za identifikaciju haplotipova varoe i otkrivanje jedinki sa heteroplazmijom korišćene su ARMS i RFLP metode. Analizom *cox1* sekvence ARMS metodom utvrđeno je 48,2% jedinki K haplotipa, 31,8% jedinki S1 haplotipa i 20,0% jedinki sa heteroplazmijom.

Analiza *cytb* sekvence RFLP metodom pokazala je prisustvo 83,7% jedinki K haplotipa, 4,5% jedinki P1 haplotipa, dok je 11,8% varoa bilo sa heteroplazmijom. Nisu utvrđene jedinke sa istovremenim mutacijama u *cox1* i *cytb* sekvenci. Rezultati istraživanja takođe pokazuju postojanje unutar- i međupopulacijske varijabilnosti *V. destructor*.

Analizom na nivou ukupnog uzorka nije utvrđena korelacija u distribuciji haplotipova medonosne pčele i varoe. Međutim, rezultati su u pojedinim slučajevima pokazali razlike u strukturi haplotipova *V. destructor* na pčelama različitog haplotipa sa istog lokaliteta, kao i na pčelama istog haplotipa sa različitih lokaliteta.

Ključne reči: *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, ARMS, RFLP, haplotipovi, mtDNK heteroplazmija, korelacija

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Parazitologija

UDK broj: 619:595.799:576.89

**ANALYSIS OF GENETIC VARIABILITY AND HAPLOTYPE
CORRELATION BETWEEN HONEY BEE *APIS MELLIFERA*
AND HONEY BEE MITE *VARROA DESTRUCTOR***

SUMMARY

In this study, genetic variability of honey bee *Apis mellifera* and honey bee mite *Varroa destructor* populations was analyzed, monitoring haplotype-based distribution pattern between the host and the parasite. For the identification of honey bee haplotypes, samples from 48 honey bee colonies were used, while 245 *Varroa* mite samples originating from 29 colonies were analyzed for haplotype identification and monitoring correlation between *A. mellifera* and *V. destructor* haplotypes. Sequencing of tRNA^{leu}-cox2 region revealed six *A. mellifera* haplotypes, with C2aa haplotype observed for the first time. Different frequency of identified bee haplotypes was detected in total sample, with C2d haplotype being the most frequent, and C2aa and C2i haplotypes with the lowest frequency. Distribution of *A. mellifera* haplotypes was found to be dependent on the locality, with three sites represented by only one haplotype, one locality represented by two haplotypes and four localities represented by three honey bee haplotypes.

Sequencing results of *V. destructor* mitochondrial fragments revealed the point mutations at position 1932 and 10133 mtDNA within *cox1* and *cytb* sequences, respectively. Based on these polymorphic sites, two novel *Varroa* haplotypes were defined and named as Serbia 1 (S1) and Peshter 1 (P1). Both detected mutations were the silent ones and did not affect the protein sequence. At the sequence chromatograms in some of the analyzed samples, double peaks were detected at haplotype-defining sites within *cox1* and *cytb*, observing the phenomenon of nucleotide heteroplasmy for the first time in *V. destructor*.

After the polymorphic sites had been observed using the sequencing method, ARMS and RFLP assays were performed for identification of *Varroa* haplotypes and detection of heteroplasmic individuals. Results of the *cox1* sequence analysis showed that 48,2% of individuals belonged to the K haplotype, 31,8% belonged to the S1

haplotype and 20,0% *Varroa* samples was found to be heteroplasmic. In addition, *cytb* analysis using RFLP revealed 83,7% mites identical to the K haplotype, 4,5% belonging to the P1 haplotype and 11,8% of heteroplasmic individuals. There were no samples with simultaneous nucleotide variability in *cox1* and *cytb*. Results of our study also show the presence of intra- and interpopulation variations of *V. destructor* mites.

Based on the analysis of the total sample, there was no correlation observed in haplotype distribution pattern between honey bees and *Varroa* mites. However, in some cases there were differences in the structure of *V. destructor* haplotypes parasitizing the bees of distinct haplotypes originating from the same localities, as well as the bees of the same haplotypes from different localities.

Keywords: *Apis mellifera*, *Varroa destructor*, ARMS, RFLP, haplotypes, mtDNA heteroplasmy, correlation

Major field of study: Veterinary Medicine

Special field of study: Parasitology

UDK number: 619:595.799:576.89

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Medonosna pčela <i>Apis mellifera</i>	3
2.1.1. Značaj gajenja medonosne pčele i očuvanja njenog diverziteta	3
2.1.2. Biogeografija i diverzitet medonosne pčele	4
2.1.3. Varijabilnost medonosne pčele	7
2.1.3.1. Morfometrijska varijabilnost <i>A. mellifera</i>	7
2.1.3.2. Genetička varijabilnost <i>A. mellifera</i>	8
2.1.3.2.1. Alozimska varijabilnost <i>A. mellifera</i>	8
2.1.3.2.2. Mikrosatelitska varijabilnost <i>A. mellifera</i>	10
2.1.3.2.3. Varijabilnost mitohondrijalne DNK <i>A. mellifera</i>	11
2.1.4. Varijabilnost <i>A. mellifera</i> na teritoriji Srbije i zemalja u okruženju	14
2.2. <i>Varroa destructor</i>	27
2.2.1. Morfologija <i>Varroa destructor</i>	28
2.2.2. Biologija <i>Varroa destructor</i> i specifičnosti međuodnosa domaćin-parazit ..	30
2.2.3. Patogeno delovanje <i>Varroa destructor</i>	35
2.2.3.1. Direktno patogeno delovanje	35
2.2.3.2. Indirektno patogeno delovanje	36
2.2.4. Varijabilnost <i>Varroa destructor</i>	37
2.2.5. Kompleksnost interakcije domaćin-parazit	41
3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA	45
4. MATERIJAL I METODE	46
4.1. Uzorkovanje materijala	46
4.2. Izolacija DNK	49
4.3. Amplifikacija DNK sekvenci	50
4.4. Purifikacija amplifikovanih sekvenci	52
4.5. Sekvencioniranje purifikovanih sekvenci	54
4.6. Detekcija varijabilnosti unutar <i>cox1</i> i <i>cytb</i> sekvenci <i>V. destructor</i>	54
4.7. Statistička obrada rezultata	57
5. REZULTATI	58

5.1. Varijabilnost mtDNK <i>A. mellifera</i> na osnovu analize tRNA ^{leu} -cox2 sekvence...	58
5.1.1. Identifikacija haplotipova <i>A. mellifera</i> metodom sekvencioniranja.....	58
5.2. Zastupljenost haplotipova <i>A. mellifera</i> u zavisnosti od nadmorske visine posmatranih lokaliteta.....	64
5.3. Varijabilnost mtDNK <i>V. destructor</i> na osnovu analize <i>cox1</i> i <i>cytb</i> sekvenci.....	67
5.3.1. Identifikacija haplotipova <i>V. destructor</i> metodom sekvencioniranja.....	67
5.3.2. Identifikacija haplotipova <i>V. destructor</i> na osnovu analize <i>cox1</i> sekvence primenom ARMS metode	70
5.3.3. Identifikacija haplotipova <i>V. destructor</i> na osnovu analize <i>cytb</i> sekvence primenom RFLP metode	71
5.4. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom odvojenih <i>cox1</i> i <i>cytb</i> sekvenci	74
5.4.1. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih na posmatranim lokalitetima analizom <i>cox1</i> sekvence.....	74
5.4.2. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih na posmatranim lokalitetima analizom <i>cytb</i> sekvence.....	76
5.4.3. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih u košnicama sa posmatranih lokaliteta analizom <i>cox1</i> sekvence	79
5.4.4. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih u košnicama sa posmatranih lokaliteta analizom <i>cytb</i> sekvence	85
5.4.5. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> u zavisnosti od nadmorske visine posmatranih lokaliteta	92
5.4.5.1. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cox1</i> sekvence.....	92
5.4.5.2. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cytb</i> sekvence.....	94
5.4.6. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> u zavisnosti od tehnike pčelarenja	96
5.4.6.1. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cox1</i> sekvence.....	96
5.4.6.2. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cytb</i> sekvence.....	96

5.5. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom spojenih <i>cox1</i> i <i>cytb</i> sekvenci	97
5.5.1. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> na posmatranim lokalitetima.....	98
5.5.2. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> u košnicama sa posmatranih lokaliteta	100
5.5.3. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> u zavisnosti od nadmorske visine posmatranih lokaliteta	107
5.5.4. Zastupljenost haplotipova <i>V. destructor</i> u zavisnosti od tehnike pčelarenja	109
5.6. Korelacija u distribuciji haplotipova <i>Apis mellifera</i> i <i>Varroa destructor</i> u funkciji analize odnosa domaćin-parazit.....	110
5.6.1. Distribucija haplotipova <i>Varroa destructor</i> na haplotipovima <i>Apis mellifera</i> u ukupnom uzorku.....	110
5.6.1.1. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cox1</i> sekvence	110
5.6.1.2. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cytb</i> sekvence	111
5.6.1.3. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom spojenih <i>cox1</i> i <i>cytb</i> sekvenci	113
5.6.2. Distribucija haplotipova <i>Varroa destructor</i> na haplotipovima <i>Apis mellifera</i> sa posmatranih lokaliteta.....	114
5.6.2.1. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cox1</i> sekvence	114
5.6.2.2. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cytb</i> sekvence	117
5.6.2.3. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom spojenih <i>cox1</i> i <i>cytb</i> sekvenci	121
5.6.3. Distribucija haplotipova <i>Varroa destructor</i> na istom haplotipu <i>Apis mellifera</i> sa različitim lokaliteta	124
5.6.3.1. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> na C2d haplotipu <i>A. mellifera</i> .	124
5.6.3.1.1. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cox1</i> sekvence.....	124

5.6.3.1.2. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cytb</i> sekvence	126
5.6.3.1.3. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom spojenih <i>cox1</i> i <i>cytb</i> sekvenci	128
5.6.3.2. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> na C2e haplotipu <i>A. mellifera</i> .	130
5.6.3.2.1. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cox1</i> sekvence	130
5.6.3.2.2. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cytb</i> sekvence	131
5.6.3.2.3. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom spojenih <i>cox1</i> i <i>cytb</i> sekvenci	133
5.6.3.3. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> na C2c haplotipu <i>A. mellifera</i> .	134
5.6.3.3.1. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cox1</i> sekvence	134
5.6.3.3.2. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom <i>cytb</i> sekvence	135
5.6.3.3.3. Distribucija haplotipova <i>V. destructor</i> utvrđenih analizom spojenih <i>cox1</i> i <i>cytb</i> sekvenci	136
6. DISKUSIJA	137
7. ZAKLJUČCI.....	153
8. LITERATURA	155

1. UVOD

Medonosna pčela *Apis mellifera* predstavlja vrstu koja ima ulogu najvažnijeg oprašivača u prirodi i koja u velikoj meri doprinosi proizvodnji hrane u svetu i očuvanju ekosistemskog diverziteta. Prvobitna ispitivanja varijabilnosti vrste *A. mellifera* zasnivala su se isključivo na metodama morfometrije i bila su namenjena rasvetljavanju taksonomskih odnosa. Iako su morfometrijske metode pokazale visoku osetljivost zahvaljujući upotrebi velikog broja ispitivanih parametara, one su istovremeno bile i dosta spore za izvođenje. Za potrebe ispitivanja genetičkih specifičnosti podvrsta medonosne pčele i boljeg uvida u njihove taksonomske odnose, razvijene su molekularne metode koje su znatno brže i preciznije od onih zasnovanih na morfometriji. Mitohondrijalnu DNK karakteriše materinsko nasleđivanje, što sekvence u okviru mitohondrijalnih gena čini pogodnim markerima za ispitivanje genetičkih razlika i njihovo praćenje kroz više generacija. Najčešće korišćeni mtDNK marker kod medonosne pčele je tRNA^{leu}-cox2, koji je poznat i pod nazivom COI-COII. Na osnovu razlika u dužini sekvenci ovog intergenskog regiona određeno je postojanje pet evolutivnih linija pčela. Ispitivanje varijabilnosti *A. mellifera* u Srbiji započeto je morfometrijskim i citogenetičkim analizama koje su otkrile postojanje tri ekotipa medonosne pčele: banatski (B), timočki (T) i sjeničko-peštarski (S). Daljim istraživanjima u kojima je kao molekularni marker korišćena tRNA^{leu}-cox2 sekvenca, otkriveno je sedam haplotipova *A. mellifera* u Srbiji.

Varroa destructor je obligatni ektoparazit medonosne pčele koji je polovinom prošlog veka prešao sa svog originalnog domaćina, azijske pčele *Apis cerana*, na evropsku vrstu *A. mellifera*. Osim što se hrani hemolimfom larvi, lutki i odraslih pčela, ovaj parazit indukuje imunosupresiju, smanjuje sadržaj vode i koncentraciju proteina i ugljenih hidrata u njihovom telu, a može služiti i kao mehanički i/ili biološki vektor za viruse pčela. Danas se varoa smatra jednim od glavnih uzročnika zimskih gubitaka pčelinjih društava *A. mellifera* u različitim delovima sveta i parazitom koji je ostvario najveći negativan uticaj na razvoj pčelarstva u njegovoj dugoj istoriji. Istraživanja razlika između jedinki varoe sa različitih geografskih područja započete su metodama morfometrije, koje su kasnije u potpunosti zamenjene molekularnim metodama. Parazit *V. destructor* je kao posebna vrsta opisana tek 2000. godine, nakon što su molekularnim

metodama dokazane razlike u odnosu na vrstu *V. jacobsoni*. Na osnovu razlika u sekvenci citohrom oksidaza 1 (*cox1*) gena, definisano je 18 različitih haplotipova varoe, od kojih je šest pripadalo vrsti *V. destructor*. Međutim, samo su dva od ovih šest, japanski (J) i korejski (K) haplotip, uspela da pređu sa *A. cerana* i prilagode se parazitiranju na *A. mellifera*. Osim toga, K haplotip je kosmopolitski rasprostranjen, dok se J haplotip javlja u Japanu, Tajlandu, Severnoj i Južnoj Americi. U istraživanjima koja pokazuju da se izvan azijskog kontinenta mogu naći samo haplotipovi K i J, zaključuje se da su pomenuti haplotipovi dva delimično izolovana klona između kojih postoje veoma male genetičke razlike. Ovakav zaključak tumači se kao posledica postojanja genetičkog „uskog grla“ u vreme prelaska parazita sa *A. cerana* na *A. mellifera*. Nedavno je na *A. mellifera* u Aziji, analizom sekvenci *cox1*, ATP sintaza 6 (*atp6*), citohrom oksidaza 3 (*cox3*) i citohrom b (*cytb*) gena, otkriveno postojanje nekoliko novih haplotipova *V. destructor* koji predstavljaju potencijalni rizik za pčelinja društva izvan azijskog kontinenta.

Zbog još uvek neuravnoteženog odnosa domaćin-parazit između *A. mellifera* i *V. destructor*, koji je posledica njihove kratkotrajne koegzistencije, pčelinja društva u kojima se ne primenjuje tretman protiv varoe propadaju nakon par godina od početne infestacije. Međutim, nekoliko istraživanja je pokazalo da postoje pčelinja društva koja nakon selekcije mogu postati tolerantna na varou. Iz tog razloga, ispitivanje odnosa domaćin-parazit je od velikog značaja, posebno na nivou genetičke varijabilnosti ovih organizama.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Medonosna pčela *Apis mellifera*

2.1.1. Značaj gajenja medonosne pčele i očuvanja njenog diverziteta

Medonosna pčela *A. mellifera* nije značajna samo zbog proizvodnje meda koji svakako zauzima posebno mesto u ljudskoj ishrani, već prvenstveno zbog uloge u oprašivanju velikog broja divljih i gajenih biljnih kultura, čime ova vrsta doprinosi očuvanju ukupnog biodiverziteta. Iako aktivnost medonosne pčele ne utiče na prinose glavnih namirnica u ishrani ljudi (pšenica, kukuruz, pirinač, krompir) zbog njihovog oprašivanja uz pomoć vetra, samooprašivanja ili vegetativnog načina razmnožavanja, ova životinjska vrsta predstavlja ekonomski najznačajnijeg oprašivača biljnih monokultura širom sveta (**McGregor, 1976; Watanabe, 1994; Moritz i sar., 2010**). Podaci prikupljeni iz oko 200 zemalja sveta ukazuju da prinosi 87 vrsta biljaka zavise od životinja koje učestvuju u oprašivanju, što iznosi oko 35% svetske proizvodnje hrane (**Klein i sar., 2007**), dok udeo gajenih pčela vrste *A. mellifera* u komercijalnom oprašivanju iznosi više od 90%. Osim toga, bez učešća pčela u oprašivanju, prinosi različitih vrsta voća i koštunjavih plodova bili bi manji i do 90% (**Southwick i Southwick, 1992**). Iako bi u krajnjoj liniji čovečanstvo preživelo bez medonosne pčele, ona svakako predstavlja najznačajniju vrstu oprašivača koja ljudima omogućava raznovrsnu i uravnoteženu ishranu (**Steffan-Dewenter i sar., 2005**). Procenjuje se da na tlu Evrope čak 264 biljne vrste zavise od oprašivanja od strane životinja, među kojima su najznačajnije pčele (**Williams, 1994**). U vreme konstantnog povećanja broja ljudi na planeti i ograničene površine obradivog zemljišta, zahtevi za oprašivanjem biljnih kultura u svetu neprekidno rastu, što predstavlja stresogeni činiac za populacije medonosne pčele (**Aizen i sar., 2008**). Iako se broj košnica u svetu za poslednjih pola veka povećao za oko 45%, zastupljenost biljnih kultura u čijem oprašivanju učestvuju pčele porasla je za 300%, čime daleko prevazilazi polinatorski potencijal postojećeg broja pčelinjih društava (**Aizen i Harder, 2009**). Osim toga, dodatno smanjenje broja pčelinjih društava u pojedinim zemljama Evrope i SAD predstavlja značajan problem (**Pettis i Delaplane, 2010; Moritz i sar., 2010**). Ispitivanjem biodiverziteta u Velikoj Britaniji i Holandiji utvrđeno je da smanjenje broja i genetičkog diverziteta pčela direktno utiče na smanjenje broja biljnih vrsta koje isključivo zavise od oprašivanja uz

pomoć insekata (**Biesmeijer i sar., 2006**). Smanjenjem broja pčela kao glavnih oprašivača biljnih kultura može se očekivati i postepeno smanjenje biodiverziteta onih biljaka koje direktno zavise od oprašivanja putem insekata. Interesantni su rezultati **Jaffè i sar.** (2010) koji su poredili zastupljenost pčelinjih društava i genetički diverzitet pčela na više lokaliteta širom Afrike, Azije i Evrope. Oni su utvrdili da je brojnost pčelinjih društava i genetički diverzitet pčela najmanji u Severnoj Evropi, kao i da negativan uticaj na pomenute parametre ima visoka zastupljenost obradivih površina. Osim toga, isti autori su pokazali veliku sličnost između brojnosti pčelinjih društava i genetičkog diverziteta pčela u rezervatima prirode i područjima sa intenzivnom zemljoradnjom i zaključili da većina pčela u ovom region vodi poreklo od gajenih pčela. Gledano sa ekonomskog aspekta, vrednost biljnih proizvoda u Evropi nastalih oprašivanjem od strane insekata iznosi 22 milijarde evra godišnje, odnosno 153 milijarde evra na globalnom nivou, što predstavlja 9,5% ukupne svetske poljoprivredne proizvodnje (**Gallai i sar., 2009**). Komercijalno gajena pčelinja društva vrše i oprašivanje divljih vrsta biljaka, što doprinosi očuvanju biodiverziteta prirodnih i veštačkih ekosistema, mada značajnu ulogu u ovom procesu imaju i divlje vrste oprašivača (**Klein i sar., 2007**).

2.1.2. Biogeografija i diverzitet medonosne pčele

Vrsta *A. mellifera* prirodno je zastupljena na ogromnoj teritoriji koja se prostire od Skandinavije i Rusije na severu do Rta dobre nade na jugu i od Kaspijskog mora i planine Urala na istoku do obala Irske na zapadu (**Crane, 1999**). Na ovom području čiji se delovi odlikuju različitim klimatskim uslovima, nadmorskom visinom i zastupljenim biljnim kulturama, tokom dužeg vremenskog perioda formirale su se podvrste *A. mellifera* koje su najbolje prilagođene specifičnim uslovima u geografskom području koje naseljavaju. Pored toga, prirodno širenje areala *A. mellifera* bilo je onemogućeno velikim okeanskim basenima na zapadu i jugu, arktičkom hladnom klimom na severu i velikim planinskim vencima i pustinjama na istoku (**Crane, 1999**). Međutim, usled potrebe za proizvodnjom meda i oprašivanjem gajenih biljnih kultura, *A. mellifera* je iz svoje prirodne postojbine transportovana širom sveta (**Moritz i sar., 2005**). Intenzivna razmena matica i rojeva, a samim tim i genetičkog materijala ove vrste dodatno je unapređena otkrićem košnica sa pokretnim ramovima, kao i tehnološkim dostignućima

koja su omogućila bezbedan transport između kontinenata i unošenje medonosne pčele u delove sveta gde ranije nije bila prisutna. Zahvaljujući aktivnostima čoveka, medonosna pčela *A. mellifera* je danas prisutna na svim kontinentima izuzev Antarktika. Ipak, antropogeni uticaj je, osim pozitivnih strana, kao posledicu imao i narušavanje prirodnih granica zastupljenosti određenih podvrsta i njihove međusobne hibridizacije, kao i širenje pčelinjih štetočina i parazita (**Morse i Flottum, 1997**).

Veliki uticaj na prirodnu geografsku distribuciju podvrsta medonosne pčele u Evropi imao je period poslednjeg glacijalnog maksimuma, nakon koga su planinski venci Alpa, Pirineja i planina na Balkanskom poluostrvu imali ulogu prirodnih barijera u izolaciji različitih populacija (**Ruttner, 1988**). Danas su na tlu Evrope zastupljene podvrste *A. mellifera* koje su svrstane u četiri evolutivne linije definisane na osnovu morfometrijskih parametara. Predstavnici M linije (*A. mellifera mellifera* i *A. m. iberiensis*) nastanjuju uglavnom delove zapadnog Mediterana, zapadne i severne Evrope, dok su podvrste iz C linije (*A. m. ligustica*, *A. m. carnica*, *A. m. macedonica* i *A. m. cecropia*) ograničene na delove istočnog Mediterana i jugoistočne Evrope. Pojedina mediteranska ostrva, kao i jugozapadni deo Pirinejskog poluostrva naseljavaju populacije svrstane u A evolutivnu liniju (*A. m. intermissa*, *A. m. siciliana*, *A. m. ruttneri*), dok podvrste koje naseljavaju delove Bliskog Istoka (*A. m. anatoliaca*, *A. m. adami*, *A. m. cypria*) pripadaju liniji O (**De la Rúa i sar., 2009**; Slika 1).

Nemačka crna pčela (*A. m. mellifera*) je najzastupljenija podvrsta u Evropi, čiji se areal prostire u zapadnim, severnim i centralnim delovima Evrope, kao i u centralnim i zapadnim delovima Rusije. Ovu podvrstu karakteriše dobro prezimljavanje, ali i slab rast društva u proleće, kao i prilično velika agresivnost. Nemačka crna pčela je bila prva evropska podvrsta koju su 1622. godine evropski iseljenici doneli na američki kontinent (**Whitfield i sar., 2006**). Italijanska pčela (*A. m. ligustica*) prirodno je bila zastupljena na Apeninskom poluostrvu, ali je zbog svojih pozitivnih osobina izvožena u različite delove sveta. Iako je odlikuju velika vrednoća, mirnoća i izuzetno brzo povećanje broja pčela u proleće, pri čemu društvo održava punu jačinu tokom letnje sezone, nije umerena u trošenju zaliha hrane i sklonija je grabeži od drugih podvrsta. Na osnovu boje prva tri segmenta abdomena poznata je i pod nazivom „žuta pčela“.



Slika 1. Distribucija evolutivnih linija i podvrsta *A. mellifera* u Evropi
(Preuzeto iz De la Rúa i sar., 2009)

Kranjska medonosna pčela (*A. m. carnica*) naseljava predele južno od Alpa, zemlje centralne i istočne Evrope. Jako je popularna među pčelarima zbog svog miroljubivog ponašanja. Njena pozitivna osobina je što prezimljava u malim društvima koja svoju jačinu povećavaju veoma rano u proleće i održavaju je tokom celog leta. Vrlo je štedljiva sa zimskim zalihama hrane. Ipak, roji se ređe od ostalih srodnih podvrsta i spora je u izgradnji novog saća. Na osnovu morfoloških razlika, u okviru ove podvrste opisani su alpski, panonski i pontijski ekotip (**Ruttner, 1988**). U graničnim zonama areala, na populacije kranjske medonosne pčele veliki uticaj imaju *A. m. ligustica* na zapadu, *A. m. mellifera* na severu i severo-istoku i *A. m. macedonica* na jugu i jugo-istoku. Delove Srbije, Bugarske, Rumunije, Grčke, Ukrajine i Turske nastanjuje *A. m. macedonica*. Odlikuje se velikom prilagodljivošću na različite temperaturne uslove tokom godine, slabo izraženim odbrambenim ponašanjem, retkim rojenjem i niskom otpornošću prema bolestima. Areal podvrste *A. m. cecropia* prostire se u južnim delovima Grčke i na Peloponezu.

Srbija se zahvaljujući svom geografskom položaju nalazi u središnjem delu zone distribucije C evolutivne linije medonosne pčele koja je zastupljena sa dve podvrste. U severnim delovima Srbije zastupljena je *A. m. carnica*, dok je u istočnim, jugo-istočnim

i južnim delovima prisutna *A. m. macedonica*, čija je zona distribucije znatno veća nego što se ranije pretpostavljalo (**Stevanovic i sar., 2010**).

2.1.3. Varijabilnost medonosne pčele

2.1.3.1. Morfometrijska varijabilnost A. mellifera

Uzimajući u obzir ogromnu teritoriju koju prirodno nastanjuje vrsta *A. mellifera*, postojala je potreba za definisanjem rasa pčela sa različitih geografskih područja. Prvobitni pokušaji determinacije zasnivali su se uglavnom na razlikama u boji i veličini koje su davale prilično neprecizne rezultate, jer se za jedinke koje su imale istu boju i poticale sa različitih lokaliteta smatralo da pripadaju istoj rasi. Veliki napredak u oblasti taksonomije medonosne pčele omogućili su **Alpatov (1929)** i **Goetze (1940)** uvodeći biometrijski pristup i nove morfološke parametre, uglavnom veličinu pojedinih delova tela, boju, nervaturu krila i zastupljenost hitinskih dlačica. Osnivač „klasične“ morfometrije koja je bila presudna za taksonomsko grupisanje podvrsta, odnosno rasa medonosne pčele bio je istraživač Ruttner. On je na osnovu 33 morfološka parametra koji su obrađeni biometrijsko-statističkom analizom utvrdio razlike pčela *A. mellifera* sa različitih geografskih lokaliteta (**Ruttner i sar., 1978**), dok je nešto kasnije ustanovio 36 morfoloških parametara koji se odnose na dimenzije hitinskih dlačica, veličinu proboscisa, delove ekstremiteta, pigmentaciju, dimenzije krila, nervaturu i uglove krila (**Ruttner, 1988**). Ovi parametri koji se i danas koriste u morfometrijskim analizama, zajedno sa ekološkim karakteristikama, omogućili su determinaciju 27 podvrsta *A. mellifera* (**Sheppard i sar., 1997; Meixner i sar., 2013**). Sve opisane podvrste koje su pronađene na jasno ograničenim geografskim područjima svrstane su na osnovu morfometrijskih parametara u četiri linije (grupe ili grane): zapadno-mediteransku i severno-evropsku (M), centralno- i istočno-evropsku (C), afričku (A) i bliskoistočnu ili orijentalnu (O) liniju (**Ruttner, 1988**). U novije vreme, morfometrijske metode su, osim u taksonomske svrhe i identifikaciju novih podvrsta (**Sheppard i sar., 1997**) korišćene i za utvrđivanje granične zone hibridizacije određenih podvrsta *A. mellifera* (**Dedej i sar., 1996**). Osim toga, pomoću morfometrijskih metoda moguće je utvrditi prirodne granice zastupljenosti određene podvrste medonosne pčele i ispitati njen odnos sa drugim podvrstama sa čijim se arealima ona graniči (**Meixner i sar., 2007**). Iako se metoda „klasične“ morfometrije odlikuje veoma visokom senzitivnošću i pouzdanošću usled

korišćenja velikog broja parametara za poređenje, ona je istovremeno i veoma spora za izvođenje zbog veličine uzorka koji se za ovu metodu preporučuje (**Meixner i sar., 2013**). Zbog toga su razvijane i modifikovane morfometrijske metode koje koriste manji broj parametara za poređenje (**Dedej i Nazzi, 1994; Cermak i Kaspar, 2000**) sa istovremeno manjim brojem pčela (**Francoy i sar., 2006**) ili računarske softvere za merenje (**Schroder i sar., 2002; Tofilski, 2004**). Jedna od unapređenih morfometrijskih metoda je i DAWINO metoda (Discriminant Analysis With Numerical Output) koja je pogodna za razlikovanje pčela unutar iste linije (**Uzunov i sar., 2009**).

2.1.3.2. Genetička varijabilnost *A. mellifera*

2.1.3.2.1. Alozimska varijabilnost *A. mellifera*

Prve analize genetičke varijabilnosti medonosne pčele bile su zasnovane na ispitivanju alozimskih varijanti (**Mestriner, 1969**). Alozimi predstavljaju različite forme enzima sa istom funkcijom koji su kodirani različitim alelima istog genskog lokusa. Prvi korak u ispitivanju alelskih varijanti predstavlja ekstrakcija enzima maceriranjem toraksa uzorkovanih pčela u puferima koji omogućavaju enzimima da zadrže funkcionalnost. Razdvajanje proteina prisutnih u homogenatu vrši se elektroforezom na poliakrilamidnom, skrobnom ili celulozno-acetatnom gelu. Migracija i razdvajanje alozima u električnom polju zavisi od njihove veličine i naelektrisanja. Različite alozimske varijante migriraju na različitoj udaljenosti, a vizuelizacija njihovog položaja, odnosno obrazaca dobijenih traka, vrši se potapanjem gela u odgovarajući pufer sa supstratom za ispitivani enzim, nakon čega sledi bojenje produkata enzimske reakcije. Po pravilu, najčešća traka (odnosno alozim) obeležava se u formi „lokus^{100c}“, pri čemu se sve ostale trake označavaju u zavisnosti od pokretljivosti u odnosu na ovu referentnu traku (npr. lokus⁶⁵, lokus¹²⁰).

Postojanje alozimskih varijanti omogućavalo je istraživačima da sprovedu filogeografske studije, saznaju više o protoku gena između populacija i postojanju hibridizacije ili da ostvare uvid u strukturu populacija. Ispitivanje varijabilnosti populacija medonosne pčele u Grčkoj na osnovu 15 posmatranih lokusa koji su kodirali devet enzima, pokazalo je polimorfizam kod samo dva enzima: malat dehidrogenazu (*Mdh*) i esterazu (*Est*) (**Badino i sar., 1988**). Razlike u elektroforetskoj pokretljivosti alozima koristile su se i u diferencijaciji vrsta unutar roda *Apis*. U istraživanju koje su

sproveli **Sheppard i Berlocher** (1989), sedam od 15 posmatranih lokusa pokazalo je polimorfizam između vrsta *A. mellifera*, *A. cerana*, *A. dorsata* i *A. florea*, pri čemu je najmanje polimorfni lokus utvrđeno za *A. dorsata*, a najviše za *A. mellifera*. Osim toga, za sedam lokusa postojale su alozimske varijante koje su se pojavljivale samo kod određene vrste pčela, dok je za tri lokusa enzim u identičnoj formi bio prisutan kod sve četiri ispitivane vrste. Ovakvi rezultati ukazivali su na postojanje značajnih alozimskih razlika unutar *Apis* spp, ali i na nemogućnost rešavanja filogenetskih odnosa isključivo na osnovu njihovog korišćenja. Alozimski markeri korišćeni su i za determinaciju različitih podvrsta roda *Apis* i njihovih hibrida, pri čemu je u metodologiji korišćen i novi lokus *Est-6*. Statističkom obradom rezultata dobijene su tri grupe pčela koje su odgovarale geografskoj zastupljenosti čistih podvrsta i njihovih hibrida u graničnom području, čime je potvrđena pouzdanost alozimskih markera u determinaciji (**Comparini i Biasiolo, 1991**). Postojanje alozimskih varijanti, od kojih su najviše korišćeni lokusi za *Mdh* i heksokinazu (*Hk*), omogućilo je korišćenje ove metodologije u cilju determinacije pčela iz različitih evropskih država (**Cornuet i sar., 1986; Smith i Glenn, 1995; Kandemir i sar., 2000; Ivanova i sar., 2007**). U nekim slučajevima, analize alozima bile su u saglasnosti sa rezultatima morfometrijskih analiza kada su u pitanju bile izolovane ostrvske populacije *A. mellifera*, dok ista metodologija nije bila efikasna u determinaciji pčela uzorkovanih iz populacija u kontinentalnom delu (**Bouga i sar., 2005**). Na osnovu učestalosti određenog alela na *Mdh* lokusu moguće je proceniti „genetičku čistoću“, odnosno „genetičko zagađenje“ lokalnih populacija pčela kod kojih se javlja samo jedan alel, a dobijena vrednost može se koristiti za procenu broja trutova koji su oplodili određenu maticu (**Cornuet i sar., 1986**). Ipak, metoda analize alozimskih varijanti ima i svojih ograničenja. Iako mnogi autori smatraju da je *Mdh* lokus najkorisniji marker za populaciono-genetičke analize medonosne pčele *A. mellifera* (**Cornuet i sar., 1995**), neki autori ipak nisu saglasni sa ovakvim stavom. U prilog ovome idu nalazi **Coelho i Mitton** (1988) koji su utvrdili funkcionalne razlike istih formi ovog enzima kod radilica i trutova koje odlikuje različita temperatura toraksa, što sugerise da mogu postojati razlike u pokretljivosti između alelskih formi *Mdh*. Osim toga, ova metoda nije najpogodnija za mali broj uzoraka ili za potrebe determinacije pčela iz jedne košnice, jer kod konkretne podvrste *A. mellifera* ne postoji specifična zastupljenost pojedinih alelskih formi. Kao mnogo pouzdaniji pristup

preporučuje se posmatranje učestalosti alozimskih varijanti u ispitivanim populacijama (**Meixner i sar., 2013**).

2.1.3.2.2. Mikrosatelitska varijabilnost *A. mellifera*

Mikrosateliti predstavljaju delove molekula jedarne DNK koje čine nizovi od dva do šest baznih parova (bp), a koji se u kontinuitetu ponavljaju od pet do 100 i više puta po jednom genskom lokusu (**Tautz, 1993**). Ovi molekularni markeri prisutni su u genomu eukariota i u hloroplastima biljnih ćelija, a zahvaljujući kodominantnom načinu nasleđivanja jako su pogodni za populaciono-genetička istraživanja, mapiranje genoma, kao i za utvrđivanje roditeljstva kod ljudi i životinja. Iako se pretpostavljalo da imaju ulogu u određivanju pola kod životinja, regulaciji genske ekspresije ili rekombinaciji gena, njihova tačna uloga je još uvek nepoznata. Na osnovu izgleda sekvence, mikrosateliti se mogu podeliti u tri grupe: čisti ili neprekinuti, koji se sastoje samo od osnovnih ponavljajućih sekvenci u određenom broju kopija; mešoviti, kod kojih se smenjuju nizovi dve ponavljajuće sekvence u kontinuitetu i isprekidani, kod kojih je niz osnovnog ponovka povremeno isprekidan pojedinačnim nizom drugog ponovka (**Jarne i Lagoda, 1996**). Na osnovu preciznosti informacija koje nam pružaju, mikrosateliti se nalaze između manje osetljive metode analize alozima i informativnije metode sekvencioniranja.

Karakterizaciju prvih mikrosatelitskih markera kod pčela uradili su **Estoup i sar.** (1993). Istraživanjima koja su sprovedena na 75 dinukleotidnih mikrosatelita utvrđena je njihova prosečna zastupljenost u genomu medonosne pčele, kao i velika sličnost kvantitativnih i kvalitativnih osobina sa već opisanim markerima kod kičmenjaka, što je ukazivalo na koncept evolutivne konzervacije mikrosatelita. Mikrosatelitski markeri pokazali su se veoma pogodnim za razlikovanje populacija medonosne pčele. Tako je determinacija podvrsta *A. mellifera* poreklom iz Afrike i Evrope izvršena na osnovu polimorfizama sedam mikrosatelita koji su po lokusu imali 7-30 alela, čime su potvrđene ranije tvrdnje o postojanju tri evolutivne linije pčela, prethodno dobijene metodama morfometrije i analizom mitohondrijalne DNK (**Estoup i sar., 1995**). Genetičku varijabilnost podvrsta unutar iste evolutivne linije ispitivali su **Garnery i sar.** (1998) korišćenjem 11 lokusa. Njihovi rezultati pokazali su vrlo nisku varijabilnost između *A. m. mellifera* i *A. m. iberica*, kao i znatnu zastupljenost hibrida

kod pčela u Francuskoj usled upliva gena iz C linije. Pored toga, ovi rezultati bili su u saglasnosti sa analizama mitohondrijalne DNK (mtDNK) pčela uzorkovanih iz istih populacija. Značajan doprinos molekularnim istraživanjima varijabilnosti *A. mellifera* dali su **Solignac i sar.** (2003a) definisanjem više od 550 mikrosatelitskih markera koji, osim što su bili polimorfni, mogli su da budu primenjeni i u istraživanjima ostalih vrsta roda *Apis*. Primena mikrosatelita na izolovanim ostrvskim populacijama pčela u Španiji pokazala je očekivano nizak nivo varijabilnosti unutar populacija, ali i ukazala na opasnost od narušavanja genetskih specifičnosti lokalnih populacija unošenjem matice iz drugih područja (**De la Rúa i sar., 2003**). S obzirom da medonosna pčela predstavlja idealan model za proučavanje ponašanja svih socijalnih insekata, od izuzetne važnosti je upoznavanje celokupnog genoma ove vrste. Mapiranje genoma medonosne pčele korišćenjem više od 2008 različitih markera pokazalo je postojanje relativno homogene stope rekombinacija tokom mejoze, kako na nivou hromozoma, tako i na nivou jedinki (**Solignac i sar., 2007**). Polimorfizam mikrosatelita našao je svoju primenu i u proveru hipoteze o genetičkoj različitosti zasnovanoj na poliandriji matice (**Palmer i Oldroyd, 2000**), ali i u mnogim nacionalnim programima ispitivanja genetičke strukture i varijabilnosti autohtonih populacija pčela, određivanja stepena hibridizacije i programima zaštite genetičnog diverziteta endemskih populacija (**De la Rúa i sar., 2002; Sušnik i sar., 2004; Bodur i sar., 2007; Dall'Olio i sar., 2007**).

2.1.3.2.3. Varijabilnost mitohondrijalne DNK *A. mellifera*

Mitohondrijalna DNK pčela je cirkularni molekul dužine 16 343 bp koga čini 13 protein-kodirajućih gena, 22 gena za transportne RNK i dva gena za ribozomalnu RNK (**Crozier i Crozier, 1993**). Iako se neposredno nakon oplodjenja u jajetu pčele mogu detektovati molekuli i mtDNK poreklom od oca, merljiva količina mtDNK u adultnom stadijumu potiče samo od majke (**Meusel i Moritz, 1993**). Na osnovu maternalnog nasleđivanja može se smatrati da svi potomci iste matice (radilice i trutovi) imaju identične mtDNK molekule, što ide u prilog stanovištu da je za analize maternalnog porekla pčelinjeg društva korišćenjem mtDNK markera dovoljno uzorkovati samo jednu pčelu po košnici (**De la Rúa i sar., 2009; Evans i sar., 2013**). Molekul mtDNK ima nekoliko specifičnosti u odnosu na DNK iz jedra. S obzirom da su mitohondrije membranozne organele sa dva omotača, njihova DNK je znatno bolje zaštićena od

degradacije nego jedarna, što omogućava uspješne analize jako starih i nedovoljno očuvanih uzoraka. Osim toga, u jednoj ćeliji postoji više desetina mitohondrija, a u svakoj od njih nalazi se stotine cirkularnih mtDNK molekula. Haploidni genom mitohondrija ne sadrži introne, ne podleže rekombinaciji i ima oko 10 puta veću stopu mutacija od jedarne DNK zbog postojanja manje efikasnih mehanizama reparacije. Zbog svega navedenog, mtDNK markeri su veoma pogodni za proučavanje genetičke strukture i varijabilnosti populacija, određivanje maternalnog porekla ispitivanih uzoraka, kao i za ispitivanje stepena introgresije u populacijama između kojih dolazi do hibridizacije.

Prvobitna ispitivanja varijabilnosti mtDNA pčela obuhvatila su tri evropske rase *A. mellifera*: *A. m. carnica*, *A. m. ligustica* i *A. m. caucasica* (Moritz i sar., 1986). Korišćenjem tehnike polimorfizama dužine restrikcionih fragmenata (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP), čitav mitohondrijalni genom podvrgnut je dejstvu sedam restrikcionih endonukleaza, od kojih je samo *BglIII* pokazao specifične razlike između ispitivanih podvrsta. Iako je ova metoda pokazala nizak nivo polimorfizama u mtDNK, njome je ipak bilo moguće razlikovati obrazac restrikcionih fragmenata karakterističan za *A. m. carnica* i *A. m. ligustica* sa jedne i *A. m. caucasica* sa druge strane. Ista metoda, ali sa drugim restrikcionim enzimima pokazala je asimetričnu distribuciju polimorfizama između *A. m. carnica* i *A. m. ligustica*, pri čemu je veća varijabilnost uočena u populaciji kranjske medonosne pčele (Meixner i sar., 1993). Ovakvi rezultati mogli su da se koriste za praćenje introgresije (protoka gena iz jedne populacije u drugu ponovljenim ukrštanjem nastalih hibrida sa jedinkama iz čistih linija) između dve ispitivane podvrste pčela (Meixner i sar., 1993). Ispitivanje razlika u populacijama evropskih i afričkih endemskih podvrsta medonosne pčele u okviru njihovih prirodnih staništa vršeno je RFLP metodom celokupne mtDNK primenom *HinfI* restrikcionog enzima (Sheppard i sar., 1996). Ovo istraživanje utvrdilo je prisustvo 20 različitih haplotipova, kao i njihovu distribuciju unutar i između podvrsta, čime su u znatnoj meri razjašnjeni taksonomski odnosi.

Značajan napredak u analizama mtDNK ostvaren je primenom RFLP metode na ograničene fragmente mitohondrijalnog genoma koji su prethodno umnoženi metodom lančane reakcije polimeraze (Polymerase Chain Reaction, PCR), a ne na celokupni molekul mtDNK kao što je do tada bio slučaj. Osim toga, PCR-RFLP metoda prevazišla

je probleme u odabiru najpogodnijeg tkiva za izolaciju mitohondrija, male količine izolovane mtDNK i zavisnost kvaliteta prinosa izolovane DNK od razvojnog stadijuma jedinke (**Moritz i sar., 1986**). Posebnu pažnju istraživača privukla je specifičnost intergenskog regiona *A. mellifera* između citohrom oksidaza I (COI) i citohrom oksidaza II (COII) gena (poznat i pod nazivom tRNA^{leu}-cox2 region), a koji se kvantitativno i kvalitativno razlikuje od istog regiona kod drugih vrsta insekata (**Crozier i sar., 1989**). Detaljnom analizom ovog regiona u populacijama istih i različitih podvrsta medonosne pčele utvrđeno je postojanje četiri grupe sekvenci čija se dužina kretala od 200 do 650 bp (**Cornuet i sar., 1991**). Upravo ove razlike u dužini tRNA^{leu}-cox2 regiona razlog su što dužina mitohondrijalnog genoma *A. mellifera* nije konstantna, već se u zavisnosti od podvrste kreće u rasponu od 16 500 do 17 000 bp (**Cornuet i Garnery, 1991**). Ovaj region čine sekvence P i Q čije dužine iznose 54 i 194-196 bp, pri čemu sekvenca P može i da nedostaje. Ukoliko je ipak prisutna, može postojati u dva oblika – P i P₀, koje se razlikuju na osnovu 15 bp duge delecije u središnjem delu P sekvence. Dužina tRNA^{leu}-cox2 regiona (od 200 do 650 bp) zavisi od prisustva, odnosno odsustva P (P₀) sekvence i broja Q sekvenci. Sekvenca Q sastoji se od tri subjedinice (Q₁, Q₂ i Q₃) čije su primarne i sekundarne strukture veoma slične 3' kraju COI gena, sekvenci tRNA^{leu} gena, odnosno sekvenci P₀ (**Cornuet i Garnery, 1991**). S obzirom da za intergensku sekvencu *A. mellifera* ne postoji pandan kod vrste *Drosophila yakuba*, kao i da je ona znatno kraća kod drugih vrsta roda *Apis*, došlo se do zaključka da je ona nastala tandem duplikacijama. Takođe, nalaz da je P sekvenca u potpunosti izgrađena od A i T nukleotida kao i veoma visok procenat A i T baznih parova unutar Q sekvence ukazali su na mogućnost da se u okviru ovog intergenskog regiona nalazi mesto za otpočinjanje replikacije mtDNK (**Cornuet i sar., 1991**).

Najpreciznija karakterizacija mtDNK haplotipova *A. mellifera* dobijena je amplifikacijom COI-COII intergenskog regiona i posledičnim tretiranjem amplifikovane sekvence *DraI* restrikcionim enzimom (**Garnery i sar., 1993**). Prisustvo, odnosno odsustvo P (P₀) sekvence u intergenskom regionu određivalo je pripadnost određenoj evolutivnoj liniji, pa su tako pčele bez P sekvence svrstane u filogenetsku liniju C, sekvenca P₀ bila je karakteristična za liniju A, dok je P sekvenca bila odlika M linije. Tri do tada utvrđene filogenetske linije *A. mellifera* koje su bile u saglasnosti sa istoimenim morfometrijskim grupama (**Ruttner, 1988**), dopunjene su filogenetskom

linijom pčela pronađenih na Bliskom Istoku (O) i novoopisanom linijom pčela iz Etiopije (Y), čime je broj mitohondrijalnih linija *A. mellifera* narastao na pet (**Franck i sar., 2000b; Franck i sar., 2001**). Broj i dužina restrikcionih fragmenata Q sekvence koja u tRNA^{leu}-cox2 regionu može da postoji u jednoj, dve ili tri kopije, određuje haplotip u okviru evolutivne linije definisane P sekvencom. **Garnery i sar.** (1993) su u okviru 12 ispitanih podvrsta medonosne pčele utvrdili 21 različiti haplotip koji su svrstali u tri mitohondrijalne linije, pri čemu se C evolutivna linija odlikovala prisustvom samo jednog haplotipa, za razliku od veoma polimorfnih A i M linija. Konstituisanjem brze, jednostavne i precizne metode kakav je bio *DraI* test, stvorili su se uslovi za opširne populaciono-genetičke analize autohtonih populacija pčela u mnogim zemljama (**Garnery i sar., 1995, 1998; Franck i sar., 1998, 2000a; De la Rúa i sar., 1998, 2001, 2002a,b, 2005, 2006; Sušnik i sar., 2004; Arias i sar., 2006; Kozmus i sar., 2007; Özdil i sar., 2009; Stevanovic i sar., 2010; Muñoz i sar., 2012**).

2.1.4. Varijabilnost *A. mellifera* na teritoriji Srbije i zemalja u okruženju

Teritoriju Srbije prirodno nastanjuju dve podvrste *A. mellifera*: *A. m. carnica* i *A. m. macedonica* (**Stevanovic i sar., 2010**) koje su na osnovu morfometrijskih parametara svrstane u evolutivnu grupu C (**Ruttner, 1988**). Međutim, sve do 2010. godine, vladalo je ubeđenje da u Srbiji, kao i u svim ostalim republikama bivše Socijalističke Federativne Republike Jugoslavije (SFRJ), postoji samo podvrsta *A. m. carnica* (**Ruttner, 1988**), zbog čega se u svim radovima do 2010. godine pominje kao jedina podvrsta. Varijabilnost te podvrste, odnosno kranjske medonosne pčele *A. m. carnica*, ispitivali su mnogi autori. **Grozdanić** (1926) je žute forme pčela Panonske nizije izdvojio kao posebnu rasu *A. m. banatica*, dok su **Asen i Lazarov** (1960, cit. iz **Krunić, 1967**) izdvojili pčele Karpata takođe u posebnu rasu *A. m. carpatica*. Iako se iz priloženih podataka vidi da se još tada podvrsta izjednačavala sa rasom, **Goetze** (1964) je u sistematici pčela pravio razliku između pojmova podvrsta i rasa tj. u okviru vrste razlikovao je podvrste (koje naseljavaju velike geografske ili istorijski dobro odvojene areale), a okviru njih geografske rase (koje naseljavaju manje, geografski dobro izolovane oblasti i imaju posebne morfološke i biološke osobine) i „abracije“ pod kojima pomenuti autor podrazumeva veće ili manje prolazne populacije, koje pri slobodnom parenju bivaju lako asimilovane od rase u kojoj su postale, a gajenjem se

lako održavaju. Po njemu, kranjska medonosna pčela *A. m. carnica* je rasa podvrste *A. mellifica mellifica* koja sadrži mnogobrojne obojene „aberacije“ i odgajene linije. Termin „rasa“ iz populacione biologije je u zoološkoj taksonomiji zamenjen terminom „podvrste“. Kao što su srodne individue, koje obično imaju zajedničko poreklo, grupisane u lokalne populacije, tako i prostorno bliske populacije, koje takođe imaju zajedničko poreklo, mogu biti grupisane u jedinice višeg reda koje se označavaju kao podvrste. To su najčešće grupe srodnih, genetički bliskih i morfološki sličnih populacija iste vrste koji se sistematski razlikuju od drugih podvrsta. Podvrsta je najniža taksonomska kategorija koja je prihvaćena po kodeksu zoološke nomenklature (**Mayr i sar., 1953; Simpson, 1961**). **Radoman** (1974) je dao sledeću definiciju podvrste: „jedna podvrsta obuhvata grupu sličnih populacija koje naseljavaju teritorijalno bliska i po ekološkim uslovima slična staništa, a razlikuju se po svojim genotipskim i fenotipskim svojstvima od drugih populacija te vrste.“ U skladu sa tim, u savremenoj literaturi se ne pravi razlika između pojmova rasa i podvrsta (tj. oba pojma označavaju istu kategoriju), a samim tim se i kranjska medonosna pčela *A. m. carnica* označava kao podvrsta tj. rasa.

Razlike između pčela Panonske nizije, nazvane *A. m. banatica* (**Grozdanić, 1926**) i pčela planinskih predela na zapadu SFRJ koje su smatrane tipičnom kranjskom medonosnom pčelom *A. m. carnica*, pominju se u literaturi još od druge polovine XIX veka. Tada su nove rase izdvajane uglavnom prema obojenosti, karakteru koji je, uzet pojedinačno, prilično nepouzdan. Takođe, tadašnja metodologija se zasnivala na obradi malog broja primeraka i nije primenjivana varijaciono-statistička analiza. Tako je **Gerstächer** (1862, cit. iz **Krunić, 1967**) samo na osnovu jednog jedinog primerka radilice iz Banata izveo zaključak da u Banatu postoji varijetet pčela koji se od italijanske pčele *A. m. ligustica* razlikuje po žutom scutellum-u, a koji se može naći i u južnoj Francuskoj, Dalmaciji, Siciliji, Krimu, ostrvima male Azije i na Kavkazu. **Živanović** je 1893. godine saopštio da u Sremu postoje dva varijeteta pčela – jedne su crnkaste, a druge sa tri žuta koluta na abdomenu (nalik na italijansku pčelu), da bi **Grozdanić** (1926), nakon upoređivanja banatskih pčela sa pčelama *A. m. carnica*, *A. m. ligustica*, *A. m. cypria* i *A. m. syriaca*, samo po boji izdvojio žute pčele Banata čak kao posebnu rasu (podvrstu) koju je nazvao *A. m. banatica*, što su prihvatili mnogi autori (**Goetze, 1940; Beldame, 1951; Bornus i sar., 1957; Asen i Lazarov, 1960 cit. iz**

Krunić, 1967). Međutim, **Goetze** (1964) godine više ne izdvaja banatsku pčelu kao posebnu rasu. Ipak, **Ruttner** (1967, cit. iz **Stojanović, 1992**) navodi četiri glavna područja rasprostranjenosti kranjske medonosne pčele, a prema njima i četiri ekološka tipa ove podvrste: alpski, karpatski, banatski i makedonski. Ovako različita mišljenja o taksonomskom položaju pčela Panonske nizije, u prvom redu žute forme označene kao *A. m. banatica*, bila su posledica nedovoljne proučenosti pčela sa teritorije jugoslovenskog dela Panonske nizije tj. Vojvodine i Slavonije. Pored toga, populacije pčela Panonske nizije ne sastoje se samo od društava sa pretežno žutim pčelama, nego i od takvih kod kojih preovladavaju sive jedinke, a postoje i homogena društva koja čine isključivo sive pčele. Zbog toga je **Krunić** (1967) pristupio detaljnom proučavanju varijabilnosti kranjske medonosne pčele na području Panonske nizije, pri čemu je prvo obavio upoređivanje populacija pretežno žutih pčela iz oblasti Vojvodine i Slavonije sa populacijama tipične *A. m. carnica* iz planinskih predela (Alpi i njihovi venci u Sloveniji i Austriji). Rezultati su pokazali da osim razlike u boji, između žutih pčela Vojvodine i Slavonije i tipične kranjske pčele iz planinskih predela postoje i značajne razlike u nizu morfoloških karakteristika. Isti autor je zatim obavio upoređivanje pčela Vojvodine i Slavonije iz društava u kojima preovladavaju sive jedinke sa tipičnim kranjskim pčelama planinskih oblasti nakon čega je, kao i u prethodnom slučaju, utvrdio razlike u mnogim morfološkim karakterima bez obzira na istu (sivu) obojenost hitina. S obzirom da su i žute i sive pčele Vojvodine i Slavonije pokazale isti stepen morfoloških razlika prema tipičnoj *A. m. carnica*, zaključeno je da te pčele, iako različito obojene, pripadaju istoj rasi. Potvrdu ovoj tvrdnji dali su i rezultati upoređivanja sivih i žutih jedinki Vojvodine i Slavonije koji su pokazali da se te pčele (osim po boji) međusobno ne razlikuju ni u jednom morfološkom karakteru. Čak i u pogledu obojenosti, **Krunić** (1967) smatra da ne postoje dve oštro ograničene grupe (siva i žuta), već je u pitanju jedan gradijent obojenosti od čisto sivih, preko jedinki sa žutim mrljama, do takvih kod kojih su jedan, dva, pa i tri tergita žute boje, a vrlo često je žuto obojen i scutellum. U stvari, ovo prisustvo sivih i žutih jedinki u istom društvu po **Kruniću** (1967) predstavlja jednu od karakteristika populacija pčela iz Panonske nizije. Iz svega navedenog, **Krunić** (1967) zaključuje da pčele Panonske nizije po svojim morfološkim karakteristikama predstavljaju jednu homogenu celinu, koja se zbog toga može izdvojiti kao posebna rasa za koju uvodi naziv *A. m. panonica*. Isti autor saopštava da areal te rase obuhvata

Panonsku niziju, čije granice na istoku, jugu i zapadu predstavljaju brdski i planinski predeli po obodu Panonske nizije, a severna granica ove rase se uglavnom poklapa sa južnom granicom *A. m. mellifera*.

Ruttner (1988) je objavio da se u okviru kranjske medonosne pčele, kao jedne od najvažnijih rasa u pčelarstvu, različiti ekotipovi mogu prepoznati preciznim morfometrijskim istraživanjima. Ipak, među istraživanjima sa područja bivše SFRJ ispitivane su i mnoge druge fenotipske osobine medonosne pčele. **Stojanović** (1992) je analizirala medonosne pčele sa tri područja bivše SFRJ: Sjeničko-Pešterske visoravni, područja Lazarevca i Mariovske visoravni u Makedoniji prateći osam parametara spoljašnje morfologije (dužinu rilice, dužinu prednjeg krila, širinu prednjeg krila, kubitalni indeks, broj kukica na zadnjem krilu, dužinu femura, tibije i bazitarzusa zadnjeg ekstremiteta). **Bubalo i sar.** (1994b, 1995) izučavali su varijabilnost alpskog, subalpskog i panonskog ekotipa sive pčele *A. m. carnica* u uslovima severozapadne Hrvatske (alpskom ekotipu pripadaju pčele iz Austrije, subalpskom iz Slovenije, a panonskom iz Hrvatske). Pčele sva tri ekotipa gajene su na istom pčelinjaku, pri čemu su prethodno u 12 košnica uvedene matice iz Austrije, u drugih 12 košnica matice iz Slovenije i u preostalih 12 košnica zadržane su autohtone matice iz Hrvatske. Praćene su biološke i ekonomske karakteristike pčela, kao i ponašanje sva tri ekotipa. Posebna pažnja bila je usmerena na dinamiku razvoja legla u cilju utvrđivanja uticaja klimatskih prilika i uslova paše, kao i postojanja adaptiranosti na lokalne uslove sredine. Najveći intenzitet zaleganja jaja zabeležen je kod matica iz Hrvatske, što je i očekivano, s obzirom da su se razvijale „na domaćem terenu“. Matice iz Austrije su zalegle manji broj jaja od matica iz Hrvatske, ali veći broj u odnosu na matice iz Slovenije, iako su ekotipski matice iz Slovenije sličnije maticama iz Hrvatske. Ovakav rezultat posledica je visoke selekcioniranosti matica iz Austrije kod kojih je zabeležen i najveći prinos meda. Međutim, standardna devijacija je kod svih praćenih karakteristika austrijskih pčela bila veća nego kod pčela panonskog i subalpskog ekotipa (najveće su bile razlike između košnica i u zaleganju jaja i u prinosu meda), što ukazuje na najslabiju prilagođenost pčela iz Austrije ekološkim uslovima severozapadne Hrvatske. **Bubalo i sar.** (1994a, 1995) pratili su prezimljavanje i prolećni razvoj alpskog, subalpskog i panonskog ekotipa *A. m. carnica*. Merena je potrošnja hrane, snaga zajednice i broj okvira sa leglom pre i posle zime. Sve pčele gajene su na istom pčelinjaku (u okolini

Grubišnog polja – gde su inače autohtone pčele panonskog ekotipa) i pod istim uslovima. Ispitivani ekotipovi su pokazali izrazite razlike u prolećnom periodu. Naime, u toku hladnog i kišovito aprila najveću količinu hrane potrošile su pčele alpskog ekotipa (8,59 kg), dok su pčele subalpskog ekotipa potrošile znatno manju količinu (2,13 kg), a pčele panonskog ekotipa su čak povećale zalihe hrane za 0,84 kg. Što se tiče jačine društva i intenziteta zaleganja jaja, hrvatske pčele (panonski ekotip) su takođe pokazale najbolje rezultate, jer je krajem aprila konstantovano da su brojčano najjače i da imaju najveću površinu legla.

Kezić i sar. (1994) upoređivali su površine poklopljenog i nepoklopljenog legla, količinu sakupljenog polena i produkciju meda kod alpskog, subalpskog i panonskog ekotipa kranjske medonosne pčele. Značajne razlike između ispitivanih ekotipova uočili su u površini nepoklopljenog legla i u broju ćelija trutovskog legla. **Plužnikov** (1995) je proučavao morfološke i proizvodne karakteristike medonosnih pčela sa područja Slovenije, Dalmacije, Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Srbije i Makedonije i utvrdio značajno variranje svih merenih parametara, što jasno govori o raznovrsnosti kranjske medonosne pčele u analiziranim oblastima. Na teritoriji Srbije obrađen je najveći broj lokaliteta (Alibunar, Despotovac, Mačva, Sjenica, Banja Koviljača I, Banja Koviljača II i Crna Trava). Rezultati analize svih karakteristika (morfoloških, reproduktivnih i produktivnih karakteristika) govore o diverzitetu *A. m. carnica* u našoj zemlji. **Dražić i sar.** (1999) istraživali su diverzitet autohtone kranjske medonosne pčele u Hrvatskoj na osnovu morfometrijskih analiza tri ekotipa: subalpskog, panonskog i mediteranskog. Najveće vrednosti svih merenih karakteristika zadnjeg ekstremiteta (dužine i površine femura, tibije i metatarzusa, širine tibije i metatarzusa) zabeležene su kod mediteranskog ekotipa, a najmanje kod subalpskog. Međutim, parametri prednjeg krila (dužina, širina i površina) su kod mediteranskog ekotipa imali najmanje vrednosti. Nakon klaster analize uočeno je jasno izdvajanje mediteranskog ekotipa sa jedne strane, od panonskog i subalpskog sa druge. **Zdešar** (2000, cit. iz **Stevanović**, 2002) je naveo četiri ekotipa kranjske medonosne pčele na području Slovenije. To su alpski ekotip (na severozapadu Slovenije i u Austriji), mediteranski ekotip (u blizini Jadranskog mora), dinarsko-karstni (na jugoistoku Slovenije) i panonski (na severoistoku Slovenije). Prisustvo ova četiri ekotipa na području Slovenije je izuzetno značajan podatak, jer ukazuje na činjenicu da i na tako malom prostoru postoje razlike u okviru *A. m. carnica*.

Opsežnija ispitivanja diverziteta autohtonih ekotipova pčela iz Srbije započeta su 1997. godine citogenetičkim analizama, odnosno analizom hromozomskog polimorfizma (Stanimirović i sar., 1997b; 1998a,b; 1999a,b,d), a nastavljena morfometrijskim analizama (Stevanovic, 2002). Najpre su obavljena biometrijska i ultrastrukturalna proučavanja hromozoma pčela banatskog ekotipa (iz okoline Beograda) i rasinskog ekotipa (oblast Sjeničko-Peštarske visoravni). Rezultati ovih istraživanja ukazali su na hromozomske razlike *A. m. carnica* između ispitivanih ekotipova (Stanimirović i sar., 1997b; 1998a,b; 1999a,b,d). Između hromozoma pčela sjeničko-peštarskog i banatskog ekotipa uočena je razlika u vrednostima relativne dužine hromozoma i centromernog indeksa (odnosa krakova), pri čemu razlike u relativnim dužinama nisu tako izražene kao što je to slučaj sa razlikama vrednosti centromernog indeksa. Ovi rezultati su naveli autore na pretpostavku da su istaknute biometrijske razlike hromozoma možda posledica hromozomskih rearanžmana i amplifikacija hromozomskih regiona sjeničko-peštarskog ekotipa medonosne pčele, što je verovatno rezultat specifičnih ekoklimatskih uslova Sjeničko-Peštarske visoravni, koji se drastično razlikuju od onih na područjima koja naseljavaju pčele banatskog ekotipa (Stevanović i sar., 1999). Da bi se proverila postavljena hipoteza obavljene su G-banding analize hromozoma banatskog i sjeničko-peštarskog ekotipa medonosne pčele (Stanimirović i sar., 1999a,d). Kod sjeničko-peštarskog ekotipa uočen je drugačiji broj i uređenje (preraspodela) euhromatskih i heterohromatskih traka na hromozomima u odnosu na broj i raspored koji je utvrđen na hromozomima pčela banatskog ekotipa. S obzirom da su ultrahromozomske strukturne analize pokazale da postoje jasne razlike u distribuciji G-traka na osam hromozoma (što predstavlja polovinu hromozomskog seta medonosne pčele) sjeničko-peštarskog ekotipa medonosne pčele u odnosu na banatski, potvrđena je ranije postavljena hipoteza da su amplifikacije i rearanžmani hromozomskih regiona mogući uzrok biometrijskih hromozomskih razlika istraživanih ekotipova medonosne pčele. Na osnovu biometrijskog, kao i G-band polimorfizma hromozoma, autori su zaključili da sjeničko-peštarski ekotip medonosne pčele predstavlja naš autohtoni ekogenotip iz Sjeničko-Peštarske oblasti (Stanimirović i sar., 1998a,b; 1999a,d). Ovaj ekogenotip poseduje svoje specifične citogenetičke karakteristike, ali, takođe ima neke impresivne adaptivne i produktivne karakteristike (Stanimirović i sar., 1997a,b,c; 1999a,b,c,d) stečene pod „surovim“ uslovima koji vladaju na visoravni, što je zapaženo

i prilikom istraživanja higijenskog ponašanja i reproduktivno-produktivnih karakteristika sjeničko-peštorskog ekotipa (**Stanimirović i sar., 2001a,b**). U nastavku istraživanja biodiverziteta medonosne pčele na području Balkanskog poluostrva primenom citogenetičkih metoda, **Stanimirović i Stevanović** (2000) obavili su analizu biometrijskih i ultrastrukturnih karakteristika hromozoma pčela Timočkog regiona, a zatim rezultate uporedili sa istim kod banatskog i sjeničko-peštorskog ekotipa. Hromozomi pčela Timočkog regiona su po svim praćenim parametrima (relativna dužina hromozoma i međusobni odnos krakova tj. centromerni indeks) bili sličniji hromozomima pčela banatskog ekotipa o čemu govori i numerička kvantifikacija ovih parametara za svih 16 hromozoma. Po broju i rasporedu eu- i heterohromatinskih traka, samo tri hromozoma timočkih pčela razlikovalo se od odgovarajućih hromozoma pčela banatskog ekotipa, ali pri poređenju sa hromozomima sjeničko-peštorskog ekotipa uočena je razlika na polovini od ukupnog broja hromozoma. Uočene razlike dale su za osnovu autorima da pčele Timočkog regiona nazovu timočkim ekotipom (**Stevanovic i Stanimirovic, 2001a,b**). U nastavku istraživanja (**Stevanović, 2002**), morfometrijskim analizama ispitana je varijabilnost pčela sva tri ekotipa na teritoriji Srbije (sjeničko-peštorskog, banatskog i timočkog). Analiza je obuhvatila 30 morfometrijskih parametara i rezultati su pokazali da na teritoriji Srbije postoji izrazita inter- i intraekotipska varijabilnost medonosne pčele, kao i da je intraekotipska varijabilnost najveća unutar sjeničko-peštorskog ekotipa, nešto manja unutar timočkog, a najmanja unutar banatskog ekotipa. Međutim, intraekotipska varijabilnost bila je manja u odnosu na interekotipsku, jer su među lokalitetima unutar svakog ekotipa zabeležene manje razlike nego između ekotipova. Rezultati analize varijanse za svaki pojedinačni karakter između pojedinačnih ekotipova pokazali su da od tri ispitivana ekotipa najveće razlike postoje između sjeničko-peštorskog i banatskog ekotipa, nešto manje između timočkog i banatskog, a najmanje između sjeničko-peštorskog i timočkog ekotipa. Rezultati kanonične diskriminacione analize potvrdili su rezultate analize varijanse, kako u pogledu intraekotipske varijabilnosti, tako i kada je reč o diskriminaciji tri ekotipa, ukazujući da se banatski i sjeničko-peštorski ekotip razdvajaju na prvoj kanoničnoj osi i to na osnovu razlika u vrednosti uglova G18, E9 i B4, dok je druga kanonična osa odvojila timočki ekotip sa jedne strane, a banatski i sjeničko-peštorski ekotip sa druge i to zahvaljujući razlikama u dužini prednjeg krila (FWLN), dužini femura zadnjeg

ekstremiteta (FELN) i veličini ugla G18. Parametri koji najviše utiču na diskriminaciju ekotipova su: uglovi prednjeg krila G18, E9 i B4, dužina prednjeg krila (FWLN) i dužina femura zadnjeg ekstremiteta (FELN). Od ukupno 30 ispitivanih karaktera spoljašnje morfologije, za 10 karaktera se može reći da ne doprinose intraekotipskoj varijabilnosti, jer je utvrđeno da njihove vrednosti nisu statistički značajno različite između lokaliteta unutar svakog od ispitivanih ekotipova. Reč je o sledećim karakterima: širina prednjeg krila (FWWD), dužina kubitalnog nerva „a“ (CUBA), dužina kubitalnog nerva „b“ (CUBB), dužina femura zadnjeg ekstremiteta (FELN), dužina tibie zadnjeg ekstremiteta (TBLN), dužina bazitarzusa zadnjeg ekstremiteta (TRLN), uglovi W1 i W2 na zadnjem krilu i uglovi K19 i N23 na prednjem krilu (Stevanović, 2002). Dalje analize otkrile su postojanje do tada neopisanog nerva na zadnjem krilu koji se pruža od sredine sekcije L6 do prednje ivice krila. Uočeni nerv (L6a) zabeležen je samo na krilima pčela sa lokaliteta Vranovina (iz Sjeničko-Peštarske oblasti). Pomenuti nerv nije uočen na zadnjim krilima pčela istog ekotipa uzorkovanih sa ostalih devet lokaliteta Sjeničko-Peštarske oblasti, kao ni na pčelama timočkog ekotipa (uzorkovanih u Timočkoj krajini) i banatskog ekotipa (uzorkovanih u regionu Mačve i Srema). Bez obzira na uzrok otkrivene abnormalnosti (inbriding ili mutacije podstaknute ekstremnim temperaturnim variranjima specifičnim za Sjeničko-Peštarsku visoravan), prisustvo dopunskog nerva (L6a) na zadnjem krilu predstavlja još jedan dokaz specifičnog diverziteta kranjske medonosne pčele na teritoriji Srbije (**Stevanović i sar., 2001a,b**). U nastavku istraživanja, analiza hromozoma banatskog, timočkog i sjeničko-peštarskog ekotipa potvrdila je postojanje interekotipske hromozomske varijabilnosti pčela na teritoriji Srbije. Naime, komparativne analize hromozoma sva tri ekotipa sa teritorije Srbije ukazala su na postojanje G-bend polimorfizma, odnosno razlika u broju i rasporedu G-traka (**Stanimirović i sar., 2005a**). Analize distribucije euhromatinskih i heterohromatinskih regiona na hromozomima timočkog i banatskog ekotipa pokazale su da postoje razlike u slučaju hromozoma 2, 4, 11 i 13. Naime, na p kraku hromozoma br. 2 kod pčela timočkog ekotipa postoji jedan svetliji euhromatinski blok (B_{1a}) više nego na istom hromozomu kod pčela banatskog ekotipa. Hromozom br. 4 kod pčela timočkog ekotipa u poređenju sa istim hromozomom kod pčela banatskog ekotipa poseduje na q kraku dve trake više: jednu heterohromatinsku (C₂) i jednu euhromatinsku (C₃). Hromozomi br. 11 i 13 kod pčela timočkog ekotipa poseduju čak

tri trake više u odnosu na odgovarajuće hromosome kod pčela banatskog ekotipa. Te trake se nalaze na q kraku pri čemu su na hromozomu br. 11 u višku dve heterohromatinske (A_{1a} , A_{1c}) i jedna euhromatinska traka (A_{1b}), a na hromozomu 13 jedna heterohromatinska (A_2) i dve euhromatinske trake (A_1 , A_3). Analiza kariotipa pčela sjeničko-peštarskog i banatskog ekotipa pokazala je da između hromozoma br. 1, 2, 4, 11, 12, 13, 15 i 16 postoje razlike u distribuciji G-traka. Hromozomi prvog para sjeničko-peštarskog ekotipa medonosne pčele na p-kraku poseduju jedan heterohromatinski (D_2) i jedan euhromatinski blok (D_3) više u poređenju sa hromozomima istog autozomalnog para kod pčela banatskog ekotipa. Hromozomi drugog para sjeničko-peštarskog ekotipa na istom kraku imaju jednu svetliju euhromatinsku traku više (B_{1a}). Međutim, na hromozomima 4 [u višku dve trake: jedna heterohromatinska (C_2) i jedna euhromatinska (C_3)], 11 [u višku tri trake: dve heterohromatinske (A_{1a} , A_{1c}) i jedna euhromatinska (A_{1b})], 12 [u višku jedna heterohromatinska traka (A_1)], 13 [u višku tri trake: jedna heterohromatinska (A_2) i dve euhromatinske (A_1 , A_3)], 15 [u višku je jedna heterohromatinska traka (A_1)] i 16 (u višku je jedna heterohromatinska traka (A_{1a})] sjeničko-peštarskog ekotipa, amplifikacije euhromatinskih/heterohromatinskih blokova obavljene su na q-kraku.

Između timočkog i sjeničko-peštarskog ekotipa pčela uočeno je da postoje razlike u distribuciji traka na hromozomima 1, 12, 15 i 16. Hromozomi prvog para sjeničko-peštarskog ekotipa medonosne pčele na p-kraku poseduju jedan heterohromatinski (D_2) i jedan euhromatinski blok (D_3) više u poređenju sa hromozomima istog autozomalnog para kod pčela timočkog ekotipa. Hromozomi 12, 15 i 16 razlikuju se između pomenutih ekotipova po broju i rasporedu traka na q-kraku, pri čemu hromozomi sjeničko-peštarskog ekotipa imaju veći broj traka i to: jednu heterohromatinsku traku (A_1) na hromozomu 12; jednu heterohromatinsku traku (A_1) na hromozomu 15; jednu heterohromatinsku traku (A_{1a}) na hromozomu 16 (**Stanimirovic i sar., 2005a**). Navedeni rezultati su u potpunoj saglasnosti sa svim rezultatima morfometrijske analize istih pčela kada su u pitanju interekotipske razlike (**Stevanović, 2002**), jer su i među hromozomima najveće razlike uočene između banatskog i sjeničko-peštarskog ekotipa, a najmanje između timočkog i sjeničko-peštarskog ekotipa (**Stanimirovic i sar., 2005a**).

Uvođenjem savremenih molekularno genetičkih analiza, nastavljeno je ispitivanje diverziteta pčela sa teritorije Srbije i zemalja u okruženju (Bosne i Hercegovine i Republike Makedonije). Prvo istraživanje obuhvatilo je analizu tRNA^{leu}-cox2 sekvence mtDNK pčela iz Srbije, koje je potvrdilo pripadnost analiziranih pčela C evolutivnoj liniji i postojanje C2d haplotipa (**Kozmus i sar., 2007; Stevanovic i sar., 2010**). Dalje molekularno genetičke analize obuhvatile su pčele sa šireg područja, odnosno iz Srbije, Bosne i Hercegovine i Republike Makedonije. Obavljeno je sekvencioniranje tRNA^{leu}-cox2 (COI-COII) intergenskog regiona mtDNK, a kasnije i dodatnog CO-I gena radi utvrđivanja polimorfizma pojedinačnih nukleotida (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNPs). Na osnovu dobijenih polimorfizama odabrani su restrikcioni enzimi koji omogućavaju razlikovanje podvrste *A. m. macedonica* od *A. m. carnica* putem PCR-RFLP metode (**Stevanovic i sar., 2010**). Primenom te metode, obavljeno je istraživanje diverziteta i biogeografije pčela na molekularnom nivou i utvrđeno drugačije rasprostranjenje podvrsta *A. mellifera* u odnosu na ranije važeće stavove, jer su rezultati pokazali da na analiziranom području Balkana egzistiraju dve podvrste *A. m. carnica* i *A. m. macedonica*, pri čemu je rasprostranjenje *A. m. macedonica* daleko veće nego što se ranije smatralo. Naime, granica rasprostranjenja *A. m. macedonica* na teritoriji Balkana pruža se mnogo severnije od ranije postavljene, jer su pčele ove podvrste utvrđene na čitavoj teritoriji Republike Makedonije, ali i u velikom delu Srbije-istočnom, južnom i jugozapadnom (**Stevanovic i sar., 2010**). Kasnija, opsežnija istraživanja molekularnog diverziteta (**Muñoz i sar., 2012**) analizom polimorfizma pojedinačnih nukleotida otkrila su čak sedam haplotipova (C1a, C2c, C2d, C2e, C2i, C2o i C2p) kod pčela iz Srbije. Dobijeni rezultati ukazuju da je molekularni diverzitet pčela iz Srbije znatno veći u odnosu na zemlje iz okruženja u kojima su obavljane ovakve analize - jedan haplotip u Makedoniji, dva u Albaniji i četiri u Hrvatskoj (**Muñoz i sar., 2009; Stevanovic i sar., 2010; Muñoz i sar., 2012**).

Od sedam haplotipova *A. mellifera* u Srbiji, dva su prvi put opisana: C2o (GenBank identifikacioni broj JQ977704) i C2p (GenBank identifikacioni broj JQ977705). Oba novoopisana haplotipa imaju ograničeno rasprostranjenje (C2o u Banatskom regionu, a C2p u Sjeničko-Peštarskom regionu), odnosno autohtoni su za banatski i sjeničko-peštarski ekotip pčela (**Muñoz i sar., 2012**). U svim analiziranim regionima Srbije utvrđena je koegzistencija haplotipova *A. mellifera* u različitim

kombinacijama i sa različitom učestalošću: u Banatskom regionu četiri haplotipa, C2d (0,615), C2e (0,231), C2i (0,077) i C2o (0,077); u Timočkom takođe četiri haplotipa, C1a (0,167), C2c (0,167), C2d (0,500) i C2i (0,167); u Sjeničko-Peštarskom tri haplotipa, C2d (0,400), C2e (0,400) i C2p (0,200); u jugoistočnom regionu samo dva haplotipa C2d (0,750), C2e (0,250). Najrasprostranjeniji haplotip u Srbiji je C2d. Visoka učestalost haplotipa C2d u svim analiziranim regionima Srbije, kao i nalaz haplotipa C2i, ukazuju na prirodnu migraciju podvrste *A. m. macedonica* iz južnih zemalja (Grčke, Makedonije i Albanije) za koje su ti haplotipovi karakteristični. Drugi po zastupljenosti u Srbiji je haplotip C2e, karakterističan za podvrstu *A. m. carnica* u Hrvatskoj. Nalaz haplotipa C1a u Timočkom regionu ukazuje na introgresiju pčela *A. m. ligustica* iz Italije, najverovatnije putem komercijalne trgovine maticama.

Kada je reč o genetičkoj varijabilnosti autohtonih medonosnih pčela u zemljama u okruženju, **Sušnik i sar.** (2004) su analizom COI-COII regiona mtDNK utvrdili veoma homogenu strukturu pčela u Sloveniji, jer su sve analizirane jedinke pripadale novoopisanom haplotipu nazvanom C2c, koji je pripadao C evolutivnoj liniji. Veoma nizak nivo varijabilnosti dobijen je i analizom šest mikrosatelitskih lokusa, iako su u istraživanju korišćeni visoko polimorfni markeri. Pčele iz susednih delova Hrvatske, koje su **Sušnik i sar.** (2004) takođe analizirali, nisu se mogle razlikovati od jedinki iz Slovenije na osnovu mtDNK i mikrosatelitnih markera. Autori navode da je glavni razlog ovakvog stanja velika granična zona između dve zemlje, kao i intenzivna trgovina maticama. U Hrvatskoj je rađeno ispitivanje genetičke strukture i molekularnog diverziteta *A. m. carnica* iz priobalnih delova te zemlje analizom mtDNK i mikrosatelita (**Muñoz i sar., 2009**). U ovom istraživanju je ustanovljeno četiri haplotipa pčela koji su pripadali C evolutivnoj liniji, od kojih je C2e haplotip bio prvi put opisan. U populaciji *A. m. macedonica* iz Grčke, koja je bila uključena u analizu radi poređenja, po prvi put je ustanovljen haplotip C2i. Analizom mikrosatelitskih markera ustanovljene su dve subpopulacije *A. m. carnica*, od kojih je jedna zastupljena u severnom, a druga u južnom priobalnom delu Hrvatske. Genetičku varijabilnost *A. mellifera* na području Albanije, Republike Makedonije, Grčke i Bugarske ispitivali su **Uzunov i sar.** (2014b). Oni su na osnovu analize mikrosatelita pokazali postojanje jasnih razlika između pčela iz pomenutih država jugoistočne Evrope (*A. mellifera macedonica*) i pčela iz Slovenije (*A. mellifera carnica*) koje su koristili za poređenje.

Osim toga, uočena je i varijabilnost unutar same podvrste *A. m. macedonica*, s obzirom da su se populacije iz Bugarske u određenom stepenu razlikovale od populacija iz ostalih regiona.

Genetička varijabilnost pčela za posledicu može imati bihevioralnu varijabilnost. Jedan od bihevioralnih mehanizama odbrane od ektoparazita *V. destructor* predstavlja higijensko ponašanje, koje podrazumeva sposobnost pčela da otkriju satne ćelije sa infestiranim leglom, uklone voštane poklopce, a zatim i obolele pčelinje larve i lutke (**Peng i sar., 1987a,b; Boecking i Spivak, 1999**). Kod društava *A. mellifera* analiziranih u Srbiji (u regionu Šumadije) koeficijent heritabilnosti kretao se od 0,63 do 0,44, u zavisnosti od posmatrane generacije pčela (**Stanimirović i sar., 2008**). Drugi odbrambeni mehanizam koji vrsti *A. mellifera* služi za borbu protiv varoe jeste negovateljsko ponašanje (**Boecking i Spivak, 1999**) koje podrazumeva aktivnosti odraslih radilica u cilju uklanjanja varoa sa površine svog tela, odnosno okolnih pčela u košnici, pri čemu dolazi i do oštećenja parazita. Ispitivanja u našoj zemlji (područje Mačve, Šumadije - Rudnik, Sjeničko-Pešterske visoravni, Podepešterja, Golije i Rogozne) dokazala su veliku unutar- i međupopulacijsku varijabilnost u ispoljenosti oba pomenuta bihevioralna mehanizama odbrane pčelinjih zajednica i njihovu zavisnost od brojnih faktora. Na stepen ispoljenosti higijenskog i negovateljskog ponašanja znatno utiče jačina pčelinje zajednice, u smislu da jača društva imaju više izraženo higijensko ponašanje (**Pejović, 2001; Pejovic i sar., 2002; Stanimirović i sar, 2001a,b, 2002a,b, 2003b, 2005c**). Dodatna istraživanja **Pejovića** (2008), koja su sprovedena u tri generacije matica, utvrdila su da u pčelinjim društvima pored značajne unutarpopulacijske i međupopulacijske varijabilnosti, postoji i međugeneracijska varijabilnost u ispoljenosti higijenskog i negovateljskog ponašanja, pri čemu viši stepen izraženosti ovih osobina doprinosi značajnom povećanju otpornosti na *V. destructor*. Slične rezultate dobili su **Stanimirović i sar. (2010)** koji su izraženo negovateljsko ponašanje u društvima sa neselekcionisanim maticama registrovali samo u F1 generaciji, dok je kod selekcionisanih linija ono uočeno u sve tri generacije. Međutim, usled relativno niske heritabilnosti negovateljskog ponašanja kod selekcionisanih matica, pčelarima koji se bave proizvodnjom pčela tolerantnih na varou se ne savetuje selekcija isključivo na ovu osobinu (**Stanimirović i sar., 2010**). Osim toga, ispoljenost oba mehanizma, higijenskog i negovateljskog, menja se pod dejstvom pčelarskih

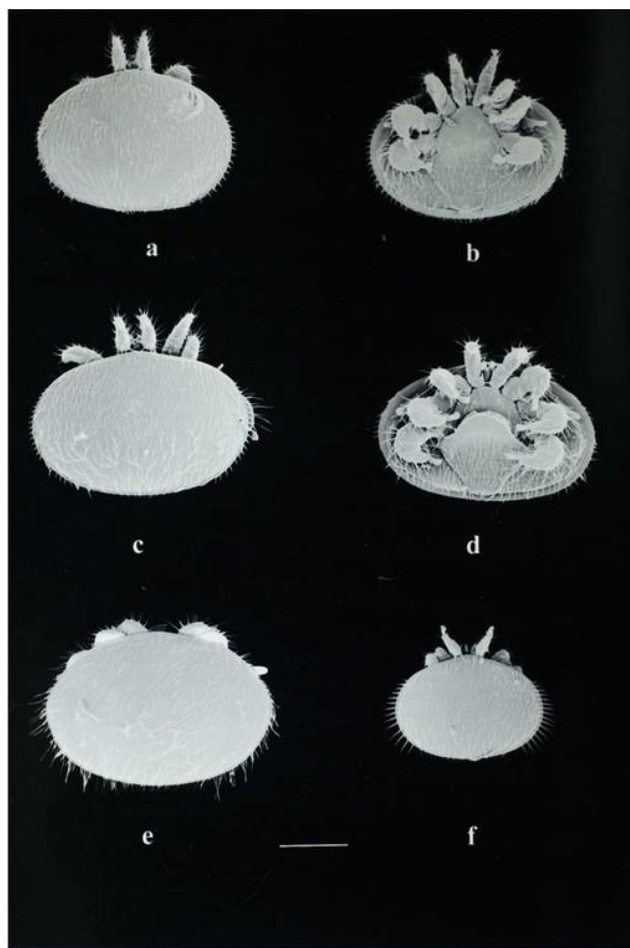
tretmana protiv ekto parazita (Stevanović, 2007; 2011b, 2012; Ćirković, 2011), što je razumljivo obzirom na vrednost i varijabilnost njihovog stepena heritabilnosti (Stanimirović i sar., 2008, 2010).

U mnogim istraživanjima praćen je međusobni odnos genetičke osnove pčela i faktora sredine, kao i njihov uticaj na ispoljenost pojedinih osobina pčelinjih društava. Dražić i sar. (2014) su pratili razvoj pčelinjih društava dva različita genotipa kranjske medosne pčele u uslovima alpske i kontinentalne klime. Na lokalitetima u Austriji i Hrvatskoj posmatrane su dve grupe od po 12 društava, pri čemu je jedna grupa bila autohtona, a druga grupa je poticala iz drugačijeg klimatskog područja. Tom prilikom je uočeno da su društva kranjske pčele poreklom iz Hrvatske imala brži prolećni razvoj legla u oba klimatska područja, dok su pčele iz Austrije u povoljnijim uslovima klime održavale broj ćelija sa poklopljenim leglom na konstantnom nivou, ali sa najvećim brojem ćelija nepoklopljenog legla početkom juna. Takođe, faktori sredine uticali su na razvoj društva, zalihe hrane i jačinu društva, pri čemu su interakcije između genotipa pčela i sredine bile značajne u odnosu na broj zatvorenih ćelija legla. Efekat genotipa i faktora sredine (godina, lokacija, poreklo, godišnje doba) na ekspresiju rojidbenog, odbrambenog i higijenskog ponašanja ispitivali su Uzunov i sar. (2014a). Oni su utvrdili da genotip i lokalitet imaju značajan uticaj na ispoljavanje ispitivanih oblika ponašanja. Pritom, razlike između lokaliteta bile su izraženije od razlika između genotipova pčela kada su u pitanju posmatrane bihevioralne osobine. Rojidbeno i odbrambeno ponašanje bili su u pozitivnoj korelaciji tokom dvogodišnjeg trajanja eksperimenta, potvrđujući genetičku kontrolu ovih osobina. Međutim, odbrambeno ponašanje bilo je slabije izraženo u lokalnim društvima i u negativnoj korelaciji sa higijenskim ponašanjem, koje je u značajnoj meri bilo uslovljeno godišnjim dobom. Genetička varijabilnost pčela, kao i interakcije genotipa i faktora sredine, značajno utiču na preživljavanje društava *A. mellifera* u Evropi (Büchler i sar., 2014). Tokom trogodišnjeg trajanja eksperimenta, 15,7% društava je preživelo bez primene bilo kakvog tretmana protiv pčelinjih bolesti, pri čemu je dužina preživljavanja u najvećoj meri bila uslovljena faktorima sredine, a manje genotipom i poreklom matica.

2.2. *Varroa destructor*

Varroa destructor je obligatni ektoparazit medonosne pčele koji se hrani isključivo hemolimfom larvi, lutki i odraslih pčela. Ova vrsta prvobitno je bila parazit azijske medonosne pčele *A. cerana*, ali je polovinom 20. veka uspešno prešla na novog domaćina, evropsku medonosnu pčelu *A. mellifera*. Uporedo sa razvojem pčelarstva i unošenjem vrste *A. mellifera* u različite delove sveta radi povećane proizvodnje meda i oprašivanja biljnih kultura, došlo je i do širenja varoe. Danas je *V. destructor* kosmopolitski rasprostranjen parazit prisutan na svim kontinentima izuzev Australije.

Rod *Varroa* se sastoji od četiri morfološki veoma slične vrste koje su izvorno parazitirale na pčelama roda *Apis* u Aziji (Slika 2).



Slika 2. Vrste roda *Varroa*: a) *V. jacobsoni* (dorzalna strana); b) *V. jacobsoni* (ventralna strana); c) *V. destructor* (dorzalna strana); d) *V. destructor* (ventralna strana); e) *V. rindereri* (dorzalna strana); f) *V. underwoodi* (dorzalna strana); (Preuzeto iz Anderson i Trueman, 2000)

Varroa jacobsoni prvi put je opisana 1904. godine na indonežanskom ostrvu Java kao parazit *A. cerana* (**Oudemans, 1904**). Ova vrsta se danas može naći širom Azije, kao i u društvima *A. nigrocincta* u Indoneziji (**Anderson i Trueman, 2000**). *Varroa underwoodi* opisana je na *A. cerana* u Nepal (b>Delfinado-Baker i Aggarwal, 1987), dok je *V. rindereri* pronađena na *A. koschevnikovi* na ostrvu Borneo (**De Guzman i Delfinado-Baker, 1996**). *Varroa destructor* je kao posebna vrsta opisana tek 2000. godine (**Anderson i Trueman, 2000**). Ona parazitira na *A. cerana* u Aziji, kao i na *A. mellifera* širom sveta i dugo vremena je pogrešno smatrana za *V. jacobsoni* zbog velike morfološke sličnosti između ove dve vrste. Zbog toga, većina naučnih radova pre 2000. godine koji su se bavili parazitizmom varoe u društvima *A. mellifera* odnosila se na *V. destructor*, a ne na *V. jacobsoni*.

2.2.1. Morfologija *Varroa destructor*

Između mužjaka i ženki *V. destructor* postoji veoma izraženi polni dimorfizam koji se ispoljava razlikama u obliku, veličini i boji tela adultnih oblika (**Ifantidis, 1983**; Slika 3). Telo odrasle ženke varoe je dorzoventralno spljošteno, elipsoidnog oblika, dužine oko 1167 μm i širine oko 1709 μm (**Anderson i Trueman, 2000**). Tokom razvoja, ženke postepeno menjaju oblik svog tela iz okruglastog u poprečno eliptičan, dok je konačni oblik mužjaka više kruškolik. Mužjaci su manjih dimenzija od ženki u svim fazama razvojnog ciklusa. Polovi se po boji mogu razlikovati samo u adultnom stadijumu, pri čemu je telo ženke crvenobraon, a mužjaka svetlo žućkaste boje. Obojavanje ženki počinje na periferiji tela u vidu tankog ružičastog prstena (**Ifantidis, 1997**). Na telu jedinki oba pola mogu se razlikovati dve jasno odvojene morfološke celine - gnatosoma i idiosoma. Gnatosoma se nalazi na ventralnoj strani prednjeg dela tela i predstavlja usni aparat kojim parazit buši kutikulu domaćina radi uzimanja hemolimfe. Ona se sastoji od dve pedipalpe koje imaju senzornu ulogu i dve helicere. Helicere su građene od tri segmenta: bazalnog, srednjeg i distalnog, koji je pokretan i kod ženki poseduje dva izraštaja u obliku zuba. Distalni članak helicera je kod mužjaka pretvoren u cevastu strukturu pod imenom spermatodaktil koja ima ulogu u prenošenju sperme mužjaka u genitalni trakt ženke. Idiosoma obuhvata veći deo tela varoe koji se

nalazi iza gnatosome i sastoji se od jednog dorzalnog i nekoliko ventralnih štitića koji su kod ženki jako sklerotizovani (očvrsnuli) i imaju ulogu u mehaničkoj zaštiti.



Slika 3. Polni dimorfizam *Varroa destructor*: A - ženka; B – mužjak
(http://www.scienceimage.csiro.au/mediarelease/images/m&f_varroa.jpg)

Dorzalna površina idiosome je konveksna, dok je ventralna strana konkavna i na njoj se nalaze neparni (sternalni, genito-ventralni i analni) i parni (podalni i metapodalni) štitići (Akranakul, 1976). Između ventralnih štitića nalaze se elastične membranozne tvorevine koje ženka omogućavaju da nesmetano uvećaju svoju zapreminu prilikom uzimanja hrane i formiranja jaja. Kutikula mužjaka ne očvrstne u potpunosti, već ostaje mekana tokom čitavog života. Sa ventralne strane tela kod jedinki oba pola nalazi se četiri para člankovitih eksremiteta za kretanje koje završavaju specijalizovanim čašastim strukturama nazvanim apotele, odnosno ambulakre (Akranakul, 1976), čija je uloga da omogućе efikasno pričvršćivanje za telo domaćina (De Ruijter i Kaas, 1983). Ekstremiteti ženke su veoma snažni, a njihova dužina u odnosu na veličinu tela manja je nego kod mužjaka.

Polni organi ženke podeljeni su u dve celine. Prvu celinu čine genitalni organi koji služe za prijem spermatozoida mužjaka i njihovo sazrevanje. Ta celina započinje sa dva otvora pod nazivom solenostome koje su smeštene sa ventralne strane tela u visini koksi trećeg i četvrtog para nogu. Od njih polaze parni tubuli koji se u nastavku granaju

i ulivaju u neparni kanalić za transport sperme, a zatim dalje u spermateku, kesasti organ koji služi za čuvanje spermatozoida do momenta oplodjenja (**Alberti i Hänel, 1986**). Drugu celinu genitalnog trakta čine organi zaduženi za proizvodnju jajnih ćelija i polaganje jaja. Neparni ovarijum u kome se vrši sazrevanje ovocita okružen je reznjevitim lirastim organom koji ima nutritivnu ulogu, a sastoji se od potpornih ćelija i nutritivnog tkiva. Ovo tkivo je sincicijalne građe i povezano je sa ovocitima interćelijskim mostovima (takozvanim nutritivnim nitima) preko kojih se tokom ovogeneze u ovocite transportuje veliki broj ribozoma i mitohondrija (**Alberti i Zeck-Kapp, 1986**). Na ovarijum se nastavljaju uterus i vagina koja na ventralnoj strani tela završava genitalnim otvorom u visini drugog para nogu. Kroz genitalni otvor vrši se polaganje jaja.

Genitalni aparat mužjaka počinje neparnim semenikom koji je smešten u zadnjem delu tela. Od njega polaze dva semevoda koji se spajaju u neparni *ductus ejaculatorius*. Akcesorne polne žlezde izlučuju svoj proteinski sekret u ejakulatorni kanal koji završava polnim otvorom na ivici sternalnog štita između drugog para nogu. Spermatozoidi pripadaju tzv. „trakastom“ tipu čiji se određeni stadijumi maturacije odvijaju u spermateci ženke nakon oplodjenja (**Alberti i Hänel, 1986**).

2.2.2. Biologija *Varroa destructor* i specifičnosti međuodnosa domaćin-parazit

Biološke karakteristike i razvojni ciklus *V. destructor* u potpunosti su usaglašeni sa razvojnim ciklusom *A. mellifera*, što ovog parazita čini veoma patogenim po domaćina. Čitav razvojni ciklus varoe odvija se unutar košnice, pri čemu se svi razvojni stadijumi hrane isključivo hemolimfom adultnih pčela i pčelinjeg legla (**Donzé i Guerin, 1994**). Međutim, iako se velika zavisnost parazita od hemolimfe domaćina ogleda u nepostojanju slobodnoživećeg stadijuma, dokazano je da varoa može da preživi na uginulim pčelama radilicama oko 70 časova, što je izuzetno značajno sa stanovišta infestacije okolnih pčelinjih društava (**De Guzman i sar., 1993**). Životni ciklus adultnih ženki varoe može se podeliti na dve faze koje se odvijaju sukcesivno: foretsku, kada se paraziti nalaze na odraslim pčelama i reproduktivnu, koja se odvija u poklopljenom radiličkom i trutovskom leglu domaćina (**Rosenkranz i sar., 2010**). Foretska faza podrazumeva boravak i ishranu ženki parazita na odraslim pčelama koje im služe za transport do ćelija saća sa otvorenim leglom. Tokom ove faze, ženke varoe

pokazuju izraziti afinitet za pričvršćivanje na levoj strani abdomena pčele između trećeg i četvrtog ventrolateralnog tergita. Ova pozicija omogućava parazitu da sa lakoćom dođe do najveće koncentracije hranljivih materija iz hemolimfe usled neposredne blizine pčelinjeg ventrikulusa (**Bowen-Walker i sar., 1997**). U pčelinjim društvima u kojima postoji leglo, ženke varoe na adultnim pčelama provode u proseku 1-3 nedelje u zavisnosti od količine ćelija saća dostupnih za infestaciju (**Boot i sar., 1993, 1994**), pri čemu maksimalno trajanje ovog perioda može iznositi 23 dana (**Boot i sar., 1995**). Iako reproduktivni uspeh varoe ne zavisi od vremena koje jedinka provede na odrasloj pčeli pre ulaska u ćeliju saća (**Boot i sar., 1995**), mlade ženke varoe koje uopšte nisu prošle kroz foretsku fazu započinju kasnije sa polaganjem jaja i imaju manji broj potomaka (**Beetsma i Zonneveld, 1992**).

Zahvaljujući svojim hemoreceptorima, varoa je u stanju da razlikuje starost i funkciju pčela u košnici. Veći afinitet koji parazit pokazuje prema starijim pčelama u odnosu na tek izlegle, kao i prema pčelama negovateljicama u odnosu na izletnice (**Kuenen i Calderone, 1997**), može se smatrati svojevrsnom strategijom za povećanje reproduktivnog uspeha parazita, s obzirom da uz pomoć pčela negovateljica veoma lako mogu dospeti do otvorenih satnih ćelija sa leglom. Razmnožavanje varoe moguće je jedino u reproduktivnoj fazi koja se odvija isključivo u zatvorenom radiličkom ili trutovskom leglu (**De Jong i sar., 1982**). Odrasla i oplodena ženka varoe ulazi u satnu ćeliju radiličkog legla 15-20 časova pre, a u ćeliju trutovskog legla 40-50 časova pre poklapanja (**Boot i sar., 1992**). Iako se u tom periodu u oba tipa satnih ćelija nalazi larva petog razvojnog stadijuma, trutovske ćelije pokazuju oko osam puta veći stepen infestacije varoom od radiličkih, što se može tumačiti dužim vremenom u kome je trutovska larva bila dostupna za ulazak ženki parazita (**Fuchs, 1990**). Takođe, za negu trutovskog legla pre poklapanja potrebno je uložiti oko tri puta više vremena nego za radiličko, pa je veća i verovatnoća da u tom periodu foretske ženke pređu sa pčela negovateljica u leglo (**Calderone i Kuenen, 2003**). Trutovske larve petog razvojnog stadijuma proizvode maksimalnu količinu metil- i etil-estara viših masnih kiselina koje osim kao feromoni i hemijski signali za poklapanje legla imaju i efekat kairomona (**Le Conte i sar., 1989, 1990**).

Nakon što uđe u otvorenu ćeliju sa leglom, ženka parazita prolazi između larve i zida satne ćelije i odmah odlazi na dno gde se u dorzalnom položaju potopi u larvinu

hranu (**Ifantidis, 1988**). Ovakav položaj varoi omogućava nesmetano disanje preko peritrema koje se nalaze na ventralnoj strani tela, ali i povećava šanse da prilikom poklapanja ćelije ne bude otkrivena i uklonjena od strane pčela negovateljica. Oko pet časova nakon poklapanja, larva pčele uzima ostatak hrane sa dna satne ćelije i započinje stvaranje kokona, oslobađajući pritom ženku varoe koja se penje na larvu i uzima svoj prvi obrok hemolimfe (**Donzé i Guerin, 1994**). Pod uticajem hemijskih materija iz sveže poklopljenog legla dolazi do aktivacije ovogeneze koja je u foretskoj fazi bila zaustavljena u stadijumu previtelogeneze (**Garrido i sar., 2000**) i polaganja prvog jajeta oko 70 časova nakon poklapanja satne ćelije (**Ifantidis, 1983; Steiner i sar., 1994**). Zbog haplo-diploidnog sistema određivanja pola, iz prvog jajeta koje je neoplođeno razvija se haploidni mužjak ($n=7$), a iz narednih oplodjenih jaja koja se polažu u pravilnim intervalima od 30 časova razvijaju se diploidne ženke ($n=14$) (**Rehm i Ritter, 1989; Ifantidis, 1990; Martin, 1994**). S obzirom da mlade neoplođene ženke nisu u mogućnosti da ostave čak ni vijabilno muško potomstvo, smatra se da je kao način reprodukcije kod vrste *V. destructor* prisutna pseudo-arenotokija (**Martin i sar., 1997**). Osim za započinjanje reproduktivnog programa, stimulus poreklom od domaćina za koga se pretpostavlja da je hemijska materija isparljive prirode, odgovoran je i za tačan redosled polova prilikom izleganja potomaka varoe (**Garrido i Rosenkranz, 2003**). Nakon stadijuma larve koja se formira par časova nakon polaganja jajeta, jedinke varoe prolaze kroz stadijume proto- i deutonimfe. Svaki od ova dva stadijuma može se podeliti na pokretnu i nepokretnu (faratnu) fazu (**Ifantidis, 1983; Donzé i Guerin, 1994**). Faratni oblici koji se nazivaju proto- i deutohrizali prelaze u naredni razvojni stadijum presvlačenjem i odbacivanjem telesnog omotača (egzuvijuma). Presvlačenjem faratne deutonimfe nastaju adultni oblici, pri čemu ukupan razvoj od jajeta do adulta iznosi oko 5,8 dana za ženku i oko 6,6 dana za mužjaka varoe (**Rehm i Ritter, 1989; Ifantidis, 1990; Donzé i Guerin, 1994; Martin, 1994**). Razlike u dužini trajanja ontogeneze mužjaka i ženke proizilaze iz različite dužine trajanja faza pokretnih i faratnih stadijuma. Iako je faza muškog deutohrizala 10-15 časova kraća od odgovarajućeg stadijuma ženke, faza pokretne protonimfe mužjaka je dva puta duža nego kod ženke (**Donzé i Guerin, 1994; Martin, 1994**).

S obzirom da je razmnožavanje varoe moguće jedino u poklopljenom leglu pčela (**De Jong i sar 1982; Ifantidis i Rosenkranz, 1988**), jasno je da broj položenih jaja od

strane varoe zavisi od dužine perioda u kome je pčelinje leglo poklopljeno. Ovaj vremenski period predstavlja genetski determinisanu osobinu koji za radiličko leglo evropskih podvrsta *A. mellifera* u proseku traje 12 dana (**Jay, 1963; Donzé i Guerin, 1994**), dok je za podvrste sa afričkog kontinenta kraći i iznosi 11 dana (**Moritz i Jordan, 1992**). Razvoj zatvorenog trutovskog legla evropskih podvrsta *A. mellifera* traje 14 dana (**Donze i Guerin, 1994; Martin, 1995**). Na osnovu ovoga, ženka varoe u radiličkom leglu ima dovoljno vremena da položi do 5, a u trutovskom leglu do 6 jaja, što se smatra normalnim reproduktivnim programom (**Martin, 1994, 1995**). Dužina perioda u kome je leglo poklopljeno predstavlja jednu vrstu selekcionog pritiska na varou, jer je ona prinuđena da svoj čitav reproduktivni program obavi u tom fiksnom vremenskom intervalu. Međutim, prednost u odnosu domaćin-parazit nalazi se ipak na strani parazita zbog njegovog kraćeg generacijskog vremena (**Fries i Camazine, 2001**). Svojevrsni odgovor na selekcionu pritisak domaćina tokom relativno kratke faze poklopljenog legla domaćina predstavlja brza ontogeneza parazita koja se postiže uz pomoć nekoliko specifičnosti. Ispitivanjem ovocita varoe pod elektronskim mikroskopom utvrđeno je da on tokom vitelogeneze poveća svoju zapreminu više od 25 puta za samo 15 časova (**Steiner i sar., 1995**). Ovoj izuzetnoj sposobnosti doprinosi postojanje tzv. „nutrimentarne ovogeneze“, odnosno pojave da se hranljive materije iz hemolimfe domaćina dopremaju direktno preko nutritivnih niti iz lirastog organa do ovocita (**Alberti i Zeck-Kapp, 1986**).

Ženka varoe unutar zatvorene ćelije sa leglom pokazuje specifično „hraniteljsko ponašanje“, koje se ogleda u bušenju kutikule mlade pčele i konstantnog uzimanja hemolimfe na tzv. „mestu za hranjenje“ koje se nalazi na petom segmentu abdomena pčelinje lutke (**Donzé i Guerin, 1994**). Obrazovanje ovakvog mesta deo je „roditeljske brige“ i ima poseban značaj za proto- i deutonimfe čiji su usni aparati nedovoljno čvrsti za probijanje čak i relativno mekane kutikule larve, ali i za odrasle mužjake čije su helicere modifikovane u spermatodaktele. Ukoliko bi izostalo formiranje mesta za hranjenje, svi potomci varoe uginuli bi od gladi. Na zidu pri dnu satne ćelije, a u blizini mesta za hranjenje, majka varoa konstantno odlaže feces koji sadrži znatnu količinu guanidina. Oformljeno mesto za akumulaciju fecesa, koje je uočljivo 44-48 časova nakon poklapanja satne ćelije, služi za okupljanje mladih nezrelih stadijuma, ali i polno zrelih potomaka za vreme parenja. Reproductivni ciklus varoe specifičan je i po tome

što se parenje odvija u najbližem srodstvu, odnosno između jednog muškog i više ženskih potomaka poreklom od iste majke.

Svi potomci varoe dostižu polnu zrelost odmah nakon poslednjeg presvlačenja. S obzirom da se razvija iz prvog položenog jajeta, mužjak dostiže polnu zrelost oko 20 časova pre prve sestre. Parenje se odvija na mestu za akumulaciju fecesa tako što u ventralnom položaju mužjak spermatodaktilima prebacuje spermatofore iz svog genitalnog otvora u parne solenostome ženke koje se nalaze u visini trećeg i četvrtog para ekstremiteta (**De Ruijter i Kaas, 1983; Alberti i Hänel, 1986**). Ovakav vid parenja koji je karakterističan za vrste iz grupe *Dermanyssina* naziva se podospermija (**Alberti i Hänel, 1986**). Mužjak se sa istom ženkom može pariti sve dok se naredna, sveže presvučena ženka ne pojavi na mestu za akumulaciju fecesa. Kao posledica višestrukog parenja, u spermateci ženke može se naći i do 35 spermatozoida (**Donzé i Guerin, 1994; Donzé i sar., 1996**). Kako bi se izbeglo da mužjak oplodi samo jednu ženku (prvu ženku koja je dostigla polnu zrelost), varoa je razvila obrazac reproduktivnog ponašanja koji se zasniva na delovanju seksualnih feromona. Zahvaljujući ovim hemijskim materijama čije se maksimalno delovanje ispoljava tokom 24 časa nakon poslednjeg presvlačenja, mlade polno zrele ženke su mnogo privlačnije za mužjake od starijih ženki koje su već oplodene (**Ziegelman i sar., 2013**). Ovakav maksimalni učinak reproduktivnog ponašanja parazita predstavlja još jednu specifičnost kojom se on suprotstavlja selekcionom pritisku domaćina.

Broj mladih oplodjenih ženki varoe koje tokom jednog reproduktivnog ciklusa proizvede majka varoa od presudnog je značaja za populacionu dinamiku parazita. Mlade ženke izlaze iz legla zajedno sa majkom pričvršćene za mladu pčelu, dok su mužjaci i svi nezreli oblici kratkoživeći i uginu u ćeliji saća nekoliko dana nakon izlaska mlade pčele (**Donzé i Guerin, 1994**). Dužina perioda u kome je pčelinje leglo poklopljeno omogućava kompletan razvoj tri ženska potomka u radiličkom i do pet ženskih potomaka u trutovskom leglu (**Martin, 1994; 1995**). Međutim, usled juvenilnog mortaliteta koji se javlja u prirodnim uslovima, prosečan broj ženskih potomaka koji dostignu zrelost u radiličkom leglu iznosi 1,45 (**Martin, 1994**), dok se usled nižeg mortaliteta mladih oblika u trutovskom leglu taj broj kreće od 2,0 do 2,2 po jednom reproduktivnom ciklusu (**Martin, 1995**). Navedeni podaci važe u slučaju da je u satnu ćeliju pre poklapanja ušla samo jedna majka varoe, dok je reproduktivna stopa ženki

prilikom multipne infestacije znatno drugačija. **Fuchs i Langenbach** (1989) su utvrdili da, ukoliko se tokom reproduktivne faze u istoj satnoj ćeliji nađe više od jedne majke varoe, dolazi do smanjenja broja ženskih potomaka kako u radiličkom, tako i u trutovskom leglu. Ipak, smanjena reproduktivna stopa posledica je manjeg broja potomaka, a ne potpunog izostanka reprodukcije pojedinih ženki. Istovremeno prisustvo više od 4 ženke može dovesti čak do ovocitne degradacije i resorpcije koji su uzrokovani stresom usled prenaseljenosti satne ćelije (**Steiner i sar., 1995**).

U prirodnim uslovima, ženka varoe tokom leta može da preživi 75-100 dana (**de Ruijter, 1987; Calatayud i Verdu, 1994**). U eksperimentalnim uslovima ženka je u stanju da obavi do sedam reproduktivnih ciklusa i položi do 30 jaja (**de Ruijter, 1987**), dok u pčelinjem društvu prosečan broj ciklusa iznosi 1,5-2 (**Fries i Rosenkranz, 1996**), odnosno 2-3 (**Martin i Kemp, 1997**). Osim toga, broj prethodno obavljenih reproduktivnih ciklusa ne utiče na stopu reprodukcije u narednoj reproduktivnoj fazi parazita (**Fries i Rosenkranz, 1996**).

2.2.3. Patogeno delovanje *Varroa destructor*

Štetno delovanje varoe na domaćina može biti direktno, što je posledica uzimanja značajnih količina hemolimfe od preimaginalnih stadijuma i odraslih pčela, ili indirektno koje se postiže prenošenjem pčelinjih virusa. Negativne posledice parazitizma mogu se uočiti na nivou pojedinačnih pčela ili na nivou pčelinjeg društva u celini.

2.2.3.1. Direktno patogeno delovanje

Ukoliko su mlade pčele radilice tokom svog razvića bile infestirane varoom, njihova masa pri izleganju može biti i za četvrtinu manja od mase neinfestiranih pčela (**De Jong i sar., 1982**). Uzimanjem hemolimfe, grinje smanjuju sadržaj vode, koncentraciju proteina i ugljenih hidrata u telu mlade radilice (**Bowen-Walker i Gunn, 2001**). Trutovi koji su infestirani u nekom od preimaginalnih stadijuma razvoja imaju za 10% manju telesnu masu od neinfestiranih, pri čemu gubitak telesne mase direktno zavisi od broja varoa u infestiranoj satnoj ćeliji (**Duay i sar., 2003**). Ovakvi trutovi kasnije pokazuju znatno slabije letačke sposobnosti i imaju do 45% manju produkciju spermatozoida (**Duay i sar., 2002**). Uzimanje hemolimfe sa radiličke larve i lutke nema

samo negativne posledice na leglo, već i na bihevioralne karakteristike odraslih oblika. Izletnice koje su tokom ontogeneze bile infestirane varoom pokazuju smanjenu sposobnost neasocijativnog učenja (**Kralj i sar., 2007**), duže borave van košnice, a znatan broj njih se uopšte i ne vrati (**Kralj, 2004**). Iako pčele sa varoom pokazuju poremećaje u orijentaciji, duže trajanje leta i manji procenat onih koje se vrate u košnicu, ovakvo ponašanje se može tumačiti i kao tip adaptivne strategije u cilju uklanjanja parazita iz teško infestiranog pčelinjeg društva (**Kralj i Fuchs, 2006**). Negativan uticaj varoe može se ogledati i u imunosupresiji domaćina usled značajno smanjene ekspresije gena odgovornih za sintezu antimikrobnih peptida i enzima koji imaju ulogu u imunskom odgovoru (**Yang i Cox-Foster, 2005**). Kod ovako imunosuprimiranih pčela koje su u eksperimentalnim uslovima izložene inaktivisanim bakterijama uočeno je značajno povećanje titra pčelinjih virusa (**Yang i Cox-Foster, 2005**). Osim gubitka hemolimfe, konačnom uginuću pčele infestirane varoom značajno doprinosi i povećani gubitak vode koji je posledica izmenjene propustljivosti ugljenih hidrata u površinskom sloju pčelinje kutikule (**Annoscia i sar., 2012**).

Kada brojnost populacije varoe dostigne kritičnu vrednost, dolazi do ispoljavanja vidljivih kliničkih simptoma i razvoja bolesti koja se naziva varooza. Ukoliko se brojnost parazita ne kontroliše povremenom primenom akaricida, pčelinja društva sa varoom propadaju za jednu do tri godine (**De Jong i sar., 1982; Boecking i Genersch, 2008**). Zbog smanjenih letačkih sposobnosti, infestirani trutovi uglavnom nisu u stanju da se okupe na kongregacionim mestima i uspešno oplode maticu (**Duay i sar., 2002**), čime se smanjuje reproduktivni kapacitet pčelinjeg društva i genetički diverzitet potomstva. Osim toga, infestirana društva obično proizvode manje rojeva (**Fries i sar., 2003; Villa i sar., 2008**).

2.2.3.2. Indirektno patogeno delovanje

Pre pojave varoe, pčelinji virusi su dovodili samo do latentnih infekcija i nisu predstavljali značajan problem po zdravstveno stanje pčela (**Hails i sar., 2007**). Međutim, delovanje varoe u ovakvim latentno inficiranim pčelinjim društvima dovodi do povećane virulencije prisutnih pčelinjih virusa i klinički ispoljenih simptoma karakterističnih za virusne infekcije (**Ball, 1983, 1996; Allen i sar., 1986; Bailey i Ball, 1991; Bowen-Walker i sar., 1999**). Do sada je opisano 18 različitih pčelinjih virusa

(Chen i Siede, 2007), pri čemu je za kašmirski virus pčela (KBV), virus mešinastog legla (SBV), virus akutne paralize (ABPV), izraelski virus akutne paralize (IAPV) i virus deformisanih krila (DWV) nedvosmisleno utvrđena uloga varoe kao mehaničkog vektora (Boecking i Genersch, 2008). S obzirom da se u foretskoj fazi hrani hemolimfom različitih jedinki, varoa predstavlja idealni model prenosioca pčelinjih virusa. Posebna vrsta sinergizma vremenom je uspostavljena između DWV i varoe, koja za ovaj virus ima i ulogu biološkog vektora (Boecking i Genersch, 2008). Istovremeno prisustvo varoe i DWV za posledicu ima pojavu pčela sa deformisanim krilima, naduvenim i skraćenim abdomenom, koje nisu u stanju da lete (Ball i Allen, 1988; Bowen-Walker i sar., 1999). Pčele sa deformisanim krilima nisu sposobne da prežive i uginu u roku od jednog dana od izleganja, što je u direktnoj vezi sa nedostatkom enzima fenol-oksidge koji ima važnu ulogu u imunskom odgovoru insekata (Yang i Cox-Foster, 2007). Osim toga, *V. destructor* svojim imunosupresivnim delovanjem može doprineti da već postojeća latentna virusna infekcija domaćina postane klinički manifestna (Yang i Cox-Foster, 2005). Visoka zastupljenost virusa DWV i ABPV utvrđena je real-time RT-PCR metodom kod 76,4%, odnosno 61,8% ispitanih pčelinjih društava iz različitih delova Srbije koja nisu pokazivala kliničke simptome virusne infekcije (Simeunović i sar., 2014). U istraživanju Glavinić i sar. (2014), kod 61,36% varoa i u 68,18% uzoraka hemolimfe pčela utvrđeno je prisustvo DNK mikrosporidije *Nosema ceranae*. Autori navode da ovakvi rezultati mogu biti posledica ishrane varoa hemolimfom pčela koje su inficirane nozemom, dok je za potvrdu vektorske uloge *V. destructor* u slučaju *N. ceranae* neophodno sprovesti dodatne analize.

Danas varoa predstavlja jednog od glavnih uzročnika zimskih gubitaka pčelinjih društava *A. mellifera* u različitim delovima sveta (Genersch i sar., 2010; Guzmán-Novoa i sar., 2010) i smatra se parazitom koji je ispoljio najveći negativni uticaj na pčelarstvo u njegovoj dugoj istoriji (Rosenkranz i sar., 2010).

2.2.4. Varijabilnost *Varroa destructor*

Različita sposobnost reprodukcije varoe u zatvorenom leglu *A. mellifera* i *A. cerana*, kao i razlike u stepenu patogenosti prema društvima ove dve vrste pčela (Anderson, 1994; Anderson i Sukarsih, 1996), ukazivale su na mogućnost da je *V. jacobsoni* zapravo kompleks više različitih vrsta, što je čest slučaj u svetu akarina

(**Griffiths i sar., 1983**). Prve analize varijabilnosti ove parazitske grinje, koja se u to vreme velikom brzinom proširila na različite kontinente, zasnivale su se na morfološkim razlikama između ispitivanih jedinki. **Grobov i sar.** (1980) su na osnovu oblika dorzalnog štita ženki varoe, koji se u zavisnosti od varijacija u dužini i širini kretao od okruglog do elipsoidnog, klasifikovali ispitivane uzorke u četiri grupe. Nakon što je uočeno da na azijskoj pčeli *A. cerana*, čije su radilice nešto manjih dimenzija u odnosu na evropsku pčelu *A. mellifera*, parazitiraju varoe manjih dimenzija nego na *A. mellifera*, **Delfinado-Baker** (1988) je opisao tri biotipa varoe u zavisnosti od vrste domaćina i virulencije parazita. Međutim, iako su uočene statistički značajne razlike u srednjim vrednostima dužine tela varoa uzorkovanih sa *A. mellifera* i *A. cerana*, primena multivarijantnih morfometrijskih tehnika na istim uzorcima pokazala je slabu korelaciju između veličine tela domaćina i parazita (**Delfinado-Baker i Houck, 1989**). Takođe, ovo istraživanje utvrdilo je da populacije parazita pokazuju izuzetno male varijacije morfoloških parametara, uprkos udaljenosti geografskih područja sa kojih su sakupljeni. U cilju ispitivanja varijabilnosti varoa, rađene su i analize sastava ugljenih hidrata kutikule parazita i domaćina. Ove analize pokazale su nepostojanje karakterističnih kvalitativnih razlika između grinja poreklom iz Italije i Floride, ali i sličnosti u ugljenohidratnom sastavu kutikule parazita i domaćina (**Nation i sar., 1992**). S obzirom da nisu dale očekivane rezultate koji bi omogućili nedvosmisleno utvrđivanje taksonomskog statusa uzorkovanih varoa, morfološke metode su vremenom u potpunosti zamenjene znatno preciznijim molekularnim metodama koje su se zasnivale na analizama polimorfizma jedarne i mitohondrijalne DNK.

Metodom nasumične amplifikacije polimorfne DNK (Random Amplification of Polymorphic DNA, RAPD) **Kraus i Hunt** (1995) su pokušali da razlikuju varoe koje su uzorkovali sa *A. mellifera* iz SAD i Nemačke (današnja vrsta *V. destructor*) od onih sa *A. cerana* iz Malezije (današnja vrsta *V. jacobsoni*). Ovo istraživanje je pokazalo visok procenat monomorfnih traka nakon elektroforetskog razdvajanja produkata amplifikacije, odnosno postojanje niske unutar- i međupopulacijske varijabilnosti. Ovom metodom nije bilo moguće međusobno razlikovati grinje iz Kalifornije i Teksasa, ali su se one razlikovale od onih iz Nemačke u svega tri specifična markera. Međutim, veća varijabilnost uočena je kod varoa koje su parazitirale na različitim vrstama domaćina. Grinje sa *A. mellifera* iz SAD i Nemačke razlikovale su se od onih sa *A.*

cerana u 27, odnosno 24 specifična markera (**Kraus i Hunt, 1995**). Istom metodom, **de Guzman i sar.** (1997) analizirali su uzorke varoe iz nekoliko zemalja sa različitim kontinenta. Svi uzorci iz SAD, Rusije, Maroka, Nemačke, Italije, Španije i Portugalije imali su identičan elektroforetski profil koji je nazvan ruski obrazac. Uzorci iz Japana, Brazila i Portorika pokazali su specifičan raspored traka koji se razlikovao od ruskog i koji je nazvan japanski obrazac. Na osnovu dobijenih rezultata, sugerisano je da su populacije varoe sa teritorije SAD poreklom iz Rusije, dok populacije u Brazilu i Portoriku verovatno potiču iz Japana.

Opsežne analize varijabilnosti mtDNK varoa koje su imale različitu sposobnost razmnožavanja u društvima *A. mellifera* najpre su sprovedi **Anderson i Fuchs** (1998). Koristeći PCR-RFLP metodu i sekvencioniranje fragmenta *cox1* gena, oni su uspeli da razlikuju varoe iz Nemačke (GER genotip) od onih sa Papua Nove Gvineje (PNG genotip). Između *cox1* sekvenci ova dva genotipa sekvencioniranjem je utvrđena razlika na 31 (6,8%) nukleotidnoj poziciji i mogla je da objasni do tada uočljive, ali neobjašnjive razlike u patogenosti parazita prema *A. mellifera* (**Anderson, 1994; Anderson i Sukarsih, 1996**). PCR-RFLP metoda podrazumevala je najpre amplifikaciju kodirajućeg dela *cox1* gena, nakon čega su dobijeni PCR produkti tretirani restrikcionim enzimima. Različiti obrazac restrikcionih fragmenata bio je posledica postojanja restrikcionog mesta za *XhoI* enzim samo kod uzoraka GER genotipa, dok je *SacI* restrikciono mesto postojalo samo kod uzoraka PNG genotipa.

Konačno razjašnjenje problematike u vezi taksonomskog statusa varoe omogućila su istraživanja **Anderson i Trueman** (2000). Oni su na osnovu uočenih morfoloških, genotipskih i reproduktivnih razlika varoa sakupljenih sa različitim kontinenta i sa različitim vrsta pčela, utvrdili da je *V. jacobsoni* u stvari kompleks koji se sastoji od dve različite vrste. Na osnovu razlika u 458 bp dugoj sekvenci *cox1* gena definisano je 18 haplotipova varoe koji su parazitirali na azijskoj medonosnoj pčeli. Devet haplotipova koji su pronađeni na *A. cerana* u malezijsko-indonežanskom regionu pripadalo je vrsti *V. jacobsoni*, šest haplotipova iz kontinentalnog dela Azije pripadalo je novoopisanoj vrsti *V. destructor*, dok su tri haplotipa sa Filipina ostala taksonomski neraspoređena (**Anderson i Trueman, 2000**). Ove analize su pokazale da su na *A. mellifera* sa *A. cerana* prešla samo dva haplotipa *V. destructor*, koji su na osnovu zemalja gde su prvi put otkriveni nazvani korejski (K) i japanski (J) haplotip. Ostali

haplotipovi *V. destructor* kao i vrsta *V. jacobsoni* parazitirali su isključivo na *A. cerana*. Haplotip K je kosmopolitski rasprostranjen (**Anderson, 2000; Anderson i Trueman, 2000; Solignac i sar., 2005**), dok se J haplotip javlja u Japanu, Tajlandu i Severnoj i Južnoj Americi (**de Guzman i sar., 1999; Anderson i Trueman, 2000**). Sekvence *coxI* gena na osnovu kojih je izvršena determinacija dva pomenuta haplotipa odlikuje izuzetno visoka konzerviranost i one se razlikuju u samo dve nukleotidne pozicije koje ulaze u sastav restrikcionih mesta za *XhoI* i *SacI* restrikcione enzime (**Anderson i Fuchs, 1998**). Sekvencioniranje celokupnog mitohondrijalnog genoma *V. destructor* koje je obavljeno neposredno nakon opisivanja same vrste bilo je od velikog značaja za dalja istraživanja genetičke varijabilnosti parazita (**Evans i Lopez, 2002; Navajas i sar., 2002**). Nešto kasnije, na *A. cerana* u Kini opisan je novi haplotip *V. destructor* koji se od prethodno opisanog Kina 1 haplotipa razlikovao u četiri bazna para i pokazivao karakterističan obrazac traka nakon delovanja restrikcionih enzima (**Zhou i sar., 2004**). Ispitivanja genetičkog profila *V. destructor* metodom PCR-RFLP *coxI* sekvence obavljena su i na Iberijskom poluostrvu, Kanarskim i Balearskim ostrvima (**Muñoz i sar., 2008**). Ova istraživanja utvrdila su dominantno prisustvo K haplotipa na *A. m. iberiensis*, ali i po prvi put otkrila jedan uzorak J haplotipa na tlu Evrope, za koji se pretpostavljalo da je posledica uvoza matica iz zemalja sa američkog kontinenta. Nedavne analize *coxI* sekvence na tlu Argentine koje su obuhvatile populacije dva prethodno opisana morfotipa varoe pokazale su kosmopolitsku zastupljenost K haplotipa parazita u ovoj južnoameričkoj državi (**Maggi i sar., 2012**).

Kako bi se povećala osetljivost mtDNK markera, **Navajas i sar.** (2010) su istovremeno ispitivali razlike u okviru sekvenci *cox1*, *atp6*, *cox3* i *cytb* gena varoe. Ovo ispitivanje utvrdilo je 18 haplotipova *V. destructor* u Aziji, od kojih je 11 pronađeno na *A. cerana* i sedam na *A. mellifera*. Otkriće po dve nove varijante K i J haplotipa na *A. mellifera* pokazalo je opravdanost korišćenja novih molekularnih markera i ukazalo na potencijalni rizik po društva *A. mellifera* izvan Azije, ukoliko se novootkriveni haplotipovi prošire van granica njihove prirodne distribucije. U cilju ispitivanja populacione strukture varoa koje parazitiraju na *A. mellifera*, **Solignac i sar.** (2003b) izvršili su karakterizaciju 16 mikrosatelitskih markera. Iako je bilo moguće razlikovati jedinke K i J haplotipova na osnovu razlike u dužini samih alela, dobijena heterozigotnost između jedinki unutar istog haplotipa bila je jednaka nuli. Ovako nizak

nivo polimorfizama mikrosatelitskih markera sugeriraju da se K i J haplotipovi mogu posmatrati kao dva delimično izolovana klona, što je posledica jakog „uskog grla“ (engl. bottleneck) koje je postojalo u vreme prelaska parazita sa *A. cerana* na *A. mellifera* (Solignac i sar., 2005). Pretpostavlja se da su se prelasci pomenutih haplotipova na *A. mellifera* dogodili u različito vreme i nezavisno jedan od drugog, pri čemu su paraziti poticali iz različitih populacija sa ograničenog područja Azije. U zemljama gde su istovremeno prisutna oba haplotipa, osim jedinki „čistih“ K i J haplotipova, utvrđene su i rekombinantne jedinke koje su posledica višestruke infestacije satnih ćelija. Međutim, postojanje „čistih“ haplotipova u visokom procentu sugeriraju postojanje post-zigotične izolacije između jedinki dva klona (Solignac i sar., 2005).

Prisustvo varoe u Srbiji prvi put je uvrđeno 1976. godine blizu srpsko-bugarske granice, gde je odmah nakon pojavljivanja izazvala velike gubitke pčelinjih društava (Lolin, 1977). Zahvaljujući ustaljenoj praksi selidbenog pčelarenja, varoa se za samo godinu dana iz regiona istočne Srbije proširila oko 500 km na zapad i dospela do obale Jadranskog mora (Ruttner, 1983). Morfološke i molekularne analize koje su obuhvatile nekoliko uzoraka varoe sa teritorije tadašnje Jugoslavije pokazale su prisustvo K haplotipa *V. destructor*, koji je jedini bio detektovan i u ostatku Evrope (Anderson i Trueman, 2000). Međutim, preliminarna molekularno-genetička istraživanja varoe novijeg datuma utvrdila su postojanje nukleotidnih polimorfizama unutar mtDNK ovog parazita na teritoriji Srbije i ukazala na potrebu daljeg istraživanja u ovoj oblasti u cilju boljeg sagledavanja odnosa domaćin-parazit (Gajić i sar., 2011).

2.2.5. Kompleksnost interakcije domaćin-parazit

Dugotrajna koegzistencija između *A. cerana* i *V. destructor* uslovljava nastanak niza specifičnosti domaćina koje mu omogućavaju nesmetan opstanak i kontrolu brojnosti populacije parazita. Međutim, usled relativno kratkog perioda koevolucije, između novog domaćina *A. mellifera* i *V. destructor* uspostavljen je odnos koji još uvek nije uravnotežen i u najvećem broju slučajeva dovodi do propadanja pčelinjih društava nakon par godina od početne infestacije varoom (de Jong i sar., 1982; Boecking i Genersch, 2008). Glavni razlog ovako različite patogenosti parazita prema različitim vrstama domaćina leži u činjenici da se varoa u društvima *A. mellifera* može

razmnožavati i u trutovskom i u radiličkom leglu, dok je kod *A. cerana* reproduktivna faza parazita ograničena samo na trutovsko leglo (Boot i sar., 1997, 1999; Rath, 1999). Osim toga, izraženo higijensko i negovateljsko ponašanje omogućavaju azijskoj medonosnoj pčeli otvaranje satnih ćelija i uklanjanje infestiranog legla, odnosno uklanjanje parazita sa površine tela (Peng i sar., 1987a,b; Rath, 1999). Jedinствена osobina vrste *A. cerana* jeste i „sahranjivanje“ višestruko infestiranog trutovskog legla, pri čemu se ojačavanjem poklopaca satnih ćelija onemogućava izlazak mladih trutova, a time i oslobađanje novih varoa (Rath, 1999).

U cilju boljeg uvida u odnos domaćin-parazit, pojedini autori su pratili odnos između distribucije haplotipova varoe i pčela na kojima ona parazitira. Muñoz i sar. (2008) su među 575 uzoraka parazita sakupljenih u društvima *A. m. iberiensis* širom Španije pronašli samo jedan uzorak J haplotipa, dok su svi ostali pripadali K haplotipu. Analiza haplotipova pčela sa pčelinjaka gde su pronađena oba haplotipa varoe nije pokazala nikakvu korelaciju između parazita i domaćina na nivou mtDNK markera, ali su autori saopštili da bi u cilju dobijanja objektivnijih podataka trebalo uraditi istraživanja na većem broju uzoraka. Jara i sar. (2012) ispitivali su vezu između određene evolutivne linije *A. m. iberiensis* i prevalencije parazita. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da između M i A evolutivnih linija pčela nije postojala značajna razlika u prevalenciji varoe u različitim godinama kao što je to utvrđeno za mikrosporidiju *Nosema apis*. Isti autori takođe sugerišu da eventualna adaptacija pčela na varou svakako zavisi od evolutivne linije domaćina, s obzirom na dominantnu zastupljenost K haplotipa varoe. Ispitivanja biogeografske distribucije različitih vrsta i haplotipova varoa (*V. jacobsoni* i *V. destructor*) na različitim mitohondrijalnim linijama i haplotipovima *A. cerana* sprovedena su na Tajlandu (Warrit i sar., 2006). S obzirom da je u ovom istraživanju utvrđen samo jedan haplotip *V. destructor* koji je zastupljen u ograničenom delu zemlje iznad 1000 m nadmorske visine, zaključeno je da ne postoji bilo kakva pravilnost u distribuciji određene vrste varoe i linije pčela na kojoj ona parazitira. Međutim, na svakoj genetičkoj liniji *A. cerana* uočeno je prisustvo tačno određenih haplotipova *V. jacobsoni*, što je protumačeno kao moguća adaptacija genetički različitih populacija parazita na specifične osobine lokalnih populacija domaćina. U uzorcima *V. destructor* iz Azije otkriveno je 11 haplotipova koji parazitiraju na *A. cerana* i čak sedam na *A. mellifera*, od kojih su samo dva (K i J)

ustanovljena izvan azijskog kontinenta (**Navajas i sar., 2010**). Nijedan od detektovanih haplotipova u ovom istraživanju nije bio zajednički za obe vrste pčela, iako su njihova pčelinja društva poticala sa istih lokaliteta. Takođe, iako u ovoj studiji nije utvrđena specifična geografska distribucija haplotipova parazita, uočava se njihova izrazita specifičnost za vrstu domaćina. Isti autori ukazali su na mogućnost da su u prošlosti postojali i neki drugi haplotipovi *V. destructor*, ali da su nestali kao posledica propadanja pčelinjih društava *A. mellifera* u kojima su parazitirali.

U proteklom periodu pojavile su se pretpostavke o različitoj patogenosti varoe u društvima *A. mellifera* koje su se tumačile u kontekstu genetičkih razlika između parazita. Ovaj problem delimično je rasvetljen nakon opisivanja *V. destructor* kao posebne vrste 2000. godine (**Anderson i Trueman, 2000**), kada je utvrđeno da ona parazitira u trutovskom i radiličkom leglu evropske pčele, dok *V. jacobsoni* na njoj uopšte ne parazitira. Nakon definisanja haplotipova, smatralo se da je K haplotip zbog svoje velike rasprostranjenosti virulentniji od J haplotipa (**de Guzman i Rinderer, 1999**). U prilog ovoj hipotezi išli su nalazi **Garrido i sar.** (2003) koji su ispitali promene u zastupljenosti i fertilitetu haplotipova varoe. Nalaz samo K haplotipa u Brazilu, gde je nekoliko godina ranije registrovan i J haplotip, mogao se tumačiti većom virulencijom K haplotipa. Samostalno prisustvo J haplotipa utvrđeno je u Japanu, Brazilu i Portoriku (**de Guzman i sar., 1997**), dok je nekoliko godina kasnije ovakva situacija uočena jedino na Tajlandu (**Solignac i sar., 2005**). Ovi rezultati ukazivali su na to da je K haplotip usled veće patogenosti potisnuo J haplotip u mnogim zemljama, a globalna ekspanzija virulentnijeg K haplotipa potvrđena je i analizama varoe u Španiji (**Muñoz i sar., 2008**).

Značajan doprinos proučavanju odnosa domaćin-parazit dalo je istraživanje u kome su **Fries i sar.** (2006) tokom šestogodišnjeg perioda posmatrali pčelinja društva koja su preživela bez tretmana protiv varoe. Od početnih 150 tzv. „Bond“ društava koja su bila izolovana na ostrvu Gotland u Baltičkom moru, eksperiment je preživelo svega njih pet. Adaptacije u odnosu domaćin-parazit nastale tokom ovog perioda vodile su ka preživljavanju i domaćina i parazita, sa uočljivim smanjenjem stope zimskih uginuća, povećanom pojavom rojenja i značajno manjim brojem infestiranih adultnih pčela u jesenjem periodu. U nastavku ovog istraživanja uočeno je smanjenje rasta populacije parazita od 82% kod tolerantnih „Bond“ društava u odnosu na kontrolna, što je bila

posledica manje proizvodnje radiličkog i trutovskog legla i većeg procenta parazita u foretskoj fazi u „Bond“ društvima (**Fries i Bommarco, 2007**). U Arno šumi na severoistoku SAD, **Seeley (2007)** je otkrio društva divljih pčela koja su uspela da prežive tri godine zbog toga što je izostajao rast brojnosti populacije parazita u kasno leto. Kako bi proverio da li je supresija reprodukcije parazita uslovljena adaptacijom domaćina, **Seeley (2007)** je grinje iz iste populacije preneo u društva kranjske pčele sa američkog kontinenta. S obzirom da je u komercijalnim društvima kranjske pčele utvrđen sličan broj otpalih varoa kao u društvima divljih pčela, zaključeno je da je uravnoteženi odnos domaćin-parazit u društvima iz Arno šume pre posledica manje patogenosti parazita nego rezistencije domaćina. Nešto kasnije, u Francuskoj su otkrivena pčelinja društva tolerantna na varou od kojih su neka više od 11 godina preživela bez ikakvog tretmana (**Le Conte i sar., 2007**). U poređenju sa društvima tretiranih akaricidom koja su se nalazila u blizini, tolerantna društva imala su sličan mortalitet, oko 1,7 puta manji prinos meda, ali i tri puta manju stopu infestacije varoom, što ukazuje da su ona vremenom razvila određeni mehanizam za kontrolu populacione dinamike parazita. Same osnove ovako uravnoteženog odnosa domaćin-parazit nisu poznate, ali se pretpostavlja da veliki uticaj imaju prirodna selekcija, uslovi sredine i tehnika pčelarenja koja podrazumeva minimalne aktivnosti čoveka.

Značajan diverzitet pčela u Evropi koji se ogleda u velikom broju postojećih podvrsta i ekotipova, pruža dobru genetičku osnovu za sprovođenje selekcije pčela tolerantnih na varou (**Büchler i sar., 2010**). Međutim, problem predstavlja činjenica što se kod većine pčelinjih društava posredstvom delovanja čoveka sprovodi selekcija koja je usmerena uglavnom na poboljšanje proizvodnih sposobnosti. Osim toga, redovni tretmani protiv varoe smanjuju selekcionu pritisak na pčele i onemogućavaju prirodno uspostavljanje stabilnog odnosa između domaćina i parazita (**Fries i sar., 2006**).

3. CILJ I ZADACI ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog istraživanja bio je ispitivanje genetičke varijabilnosti *Apis mellifera* i *Varroa destructor* na teritoriji Srbije, uz praćenje korelacije u distribuciji haplotipova domaćina i parazita.

Za ostvarivanje ovog cilja, postavljeni su sledeći zadaci istraživanja:

- Identifikacija haplotipova medonosne pčele *Apis mellifera* na geografski i ekološki različitim staništima na teritoriji Srbije;
- Identifikacija haplotipova pčelinjeg krpelja *Varroa destructor* na geografski i ekološki različitim staništima na teritoriji Srbije;
- Ispitivanje korelacije u distribuciji haplotipova medonosne pčele i varoe u funkciji analize odnosa domaćin-parazit na ispitivanim lokalitetima.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Uzorkovanje materijala

Odrasle pčele radilice *Apis mellifera* i odrasle ženke pčelinjeg krpelja *Varroa destructor* uzorkovane su tokom 2011. godine sa osam lokaliteta na teritoriji Srbije (Tabela 1, Slika 4). Na svakom lokalitetu uzorkovanje je vršeno sa jednog pčelinjaka.

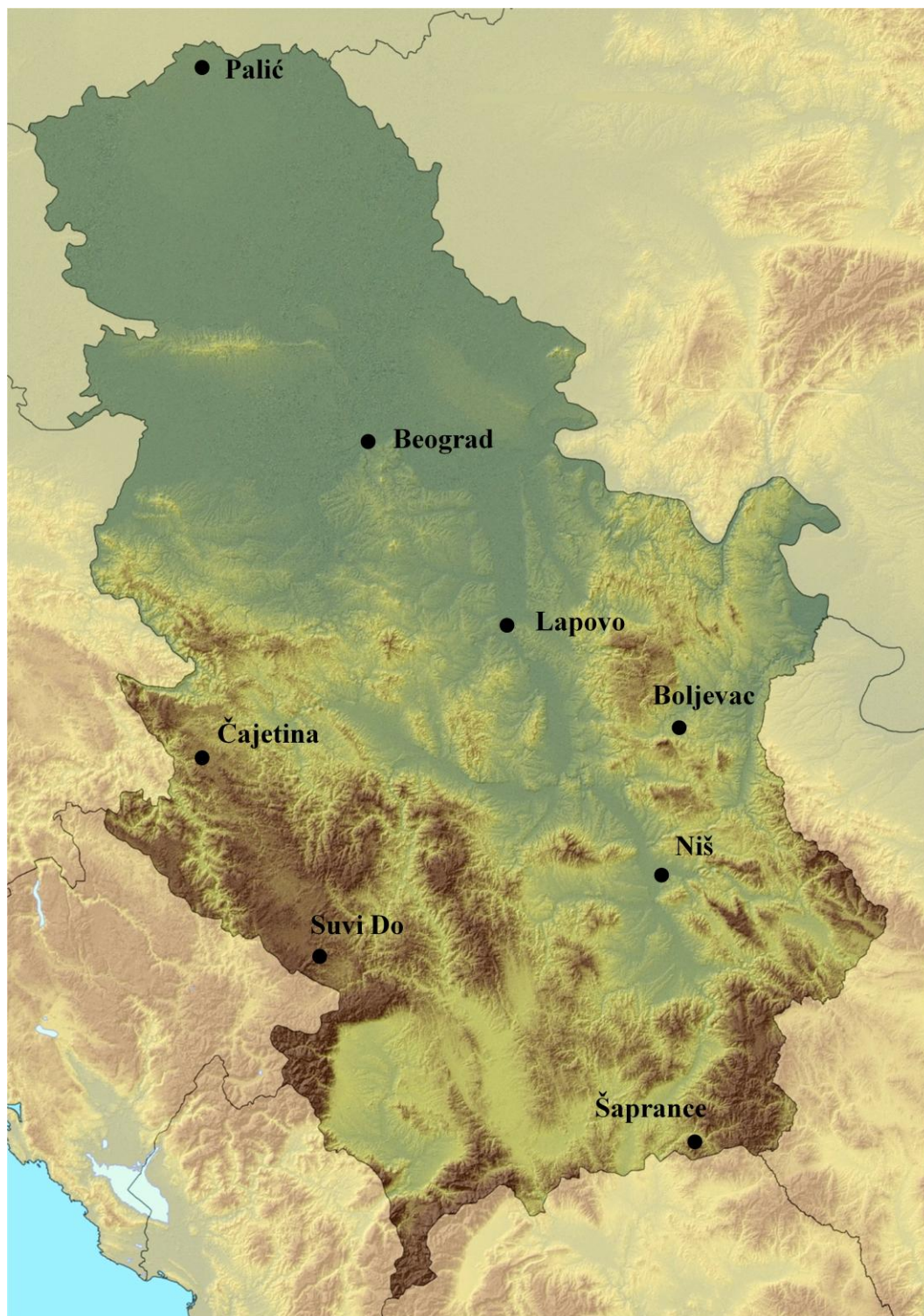
Za identifikaciju haplotipova *A. mellifera*, pčele su uzorkovane iz 48 klinički zdravih pčelinjih društava (šest pčelinjih društava po lokalitetu). Odrasle žive pčele radilice uzorkovane su sa površine ramova u plastične posude sa poklopcem, nakon čega su transportovane u laboratoriju, gde su prebačene u posude sa 70% etanolom i čuvane u zamrzivaču na -20 °C do izolacije DNK. Iz 29 košnica (dve do šest košnica po lokalitetu) iz kojih su prethodno određeni haplotipovi pčela procenjeni kao pogodni za analize korelacije haplotipova domaćina i parazita, ukupno je uzorkovano 245 varoa (dve do 14 varoa po košnici). Odrasle ženke *V. destructor* uzorkovane su sa podnjače košnica koje su bile tretirane akaricidom u prethodna 24 časa (Zhou i sar., 2004). Nakon dopremanja u laboratoriju, paraziti su čuvani u posudama sa 70% etanolom na temperaturi od -20 °C do izolacije DNK.

S obzirom da su se posmatrani lokaliteti nalazili na različitim nadmorskim visinama, oni su na osnovu ovog parametra raspoređeni u četiri kategorije (intervala): do 200, 201-500, 501-1000 i preko 1000 metara. U kategoriju do 200 m nadmorske visine svrstani su lokaliteti Palić, Beograd i Lapovo. Boljevac i Niš svrstani su u kategoriju 201-500 m, Čajetina i Šaprance 501-1000 m, dok se na nadmorskoj visini preko 1000 m nalazio samo lokalitet Suvi Do (Tabela 1).

U pčelinjim društvima iz kojih su uzorkovane pčele i varoe, primenjivale su dve tehnike pčelarenja. Selidbeno pčelarenje primenjivalo se na društva sa lokaliteta Palić, Lapovo i Boljevac, dok se na društva sa lokaliteta Beograd, Čajetina, Niš, Suvi Do i Šaprance primenjivao stacionarni tip pčelarenja (Tabela 1).

Tabela 1. Nazivi lokaliteta sa kojih su uzorkovane jedinke *A. mellifera* i *V. destructor* i njihovi osnovni geografski, ekološki i anamnestički parametri

Lokalitet	Koordinate	Nadmorska visina (m)	Srednja godišnja temperatura (°C)	Rel. vlažnost vazduha (%)	Br. analiziranih košnica/varoa	Tehnika pčelarenja
Palić	46° 06' 32" N, 19° 46' 02" E	103	11,2	72	4/40	selidbena
Beograd	44° 47' 37" N, 20° 27' 50" E	97	12,5	68	5/50	stacionarna
Lapovo	44° 11' 10" N, 21° 04' 59" E	133	12,1	86	2/20	selidbena
Boljevac	43° 49' 49" N, 21° 57' 11" E	283	11,0	73	3/23	selidbena
Čajetina	43° 43' 24" N, 19° 42' 15" E	977	7,7	76	4/33	stacionarna
Niš	43° 18' 33" N, 21° 54' 31" E	222	11,9	70	2/20	stacionarna
Suvi Do	43° 02' 43" N, 20° 07' 15" E	1179	6,2	82	6/43	stacionarna
Šaprance	42° 23' 21" N, 22° 00' 17" E	560	10,3	76	3/16	stacionarna



Slika 4. Lokaliteti sa kojih su poticali uzorci *Apis mellifera* i *Varroa destructor*

4.2. Izolacija DNK

Za molekularne analize u cilju određivanja haplotipa *A. mellifera*, korišćena je jedna pčela radilica po košnici (Meixner i sar., 2013). Ukupna DNK izolovana je iz tri desna ekstremiteta pčele korišćenjem komercijalnog seta hemikalija KAPA Express Extract Kit (Kapa Biosystems, South Africa) prema preporučenom protokolu proizvođača. Neposredno pre izolacije DNK, pčele su izvađene iz 70% etanola, isprane destilovanom vodom i osušene na sterilnom filter papiru. Nakon toga, sterilnom pincetom odstranjena su tri desna ekstremiteta i ubačena u plastičnu tubu sa poklopcem zapremine 1,5 ml. Nakon maceracije materijala sterilnim mini tučkovima, u tubu je dodato 10 µl 10× KAPA Express Extract pufera iz kita, 88 µl „nuclease-free“ vode i 2 µl KAPA Express Extract enzima. Ovako pripremljeni uzorak inkubiran je u vodenom kupatilu Thermomixer comfort (Eppendorf, Germany) 10 minuta na 75 °C u cilju liziranja ćelija i oslobađanja DNK. Sledeći korak podrazumevao je inkubaciju materijala u trajanju od 5 minuta na 95 °C kako bi se inaktivirao enzim za ekstrakciju. Ovako inkubirani materijal vorteksovan je 2-3 sekunde na mešalici za epruvete EV-100 (Tehtnica, Slovenia), a zatim centrifugiran 1 minut pri brzini od 13000 o/min korišćenjem mikrocentrifuge Hettich Mikro 20 (Hettich, Switzerland). Od svakog uzorka uzet je supernatant sa izolovanom DNK u količini od 50 µl, koji je zatim prebačen u novu sterilnu tubu zapremine 1,5 ml i pomešan sa 1× TE puferom u odnosu 1:5. Nakon kratkog vorteksovanja i centrifugiranja, uzorci izolovane DNK čuvani su u zamrzivaču na -20 °C do korišćenja u PCR reakciji.

Ukupna DNK *V. destructor* izolovana je iz celih pojedinačnih parazita korišćenjem komercijalnog seta hemikalija KAPA Express Extract Kit (Kapa Biosystems, South Africa) prema perporučenom protokolu proizvođača. Nakon ispiranja destilovanom vodom i sušenja na sterilnom filter papiru, grinje su stavljene u plastične tube sa poklopcem zapremine 1,5 ml. Posle maceracije sterilnim mini tučkovima, u tube je dodato 10 µl 10× KAPA Express Extract pufera, 88 µl „nuclease-free“ vode i 2 µl KAPA Express Extract enzima. Ovako pripremljeni uzorci inkubirani su 10 minuta na 75 °C, zatim 5 minuta na 95 °C, nakon čega su vorteksovani 2-3 sekunde i centrifugirani 1 minut pri brzini od 13000 o/min. Od svakog uzorka uzet je supernatant sa ekstrahovanom DNK u količini od 70 µl koji je prebačen u novu sterilnu

tubu od 1,5 ml i pomešan sa TE puferom u odnosu 1:5. Izolovana DNK varoe skladištena je u zamrzivaču na -20 °C do korišćenja u PCR reakciji.

4.3. Amplifikacija DNK sekvenci

Za ispitivanje varijabilnosti mtDNK i određivanje haplotipa *A. mellifera* amplifikovana je 571-573 bp duga tRNA^{leu}-cox2 sekvenca korišćenjem KAPA *Taq* PCR kita (Kapa Biosystems, South Africa). Lančana reakcija polimeraze koja je izvedena u mikrotubama zapremine 0,2 ml sastojala se od 14,4 µl „nuclease-free“ vode, 2,5 µl 10× KAPA *Taq* pufera iz kita, 0,5 µl dNTP miksa koncentracije 10 mM, po 1,25 µl prajmera E2 (5'-GGCAGAATAAGTGCATTG-3') i H2 (5'-CAATATCATTGATGACC-3') (Garnery i sar., 1991) koncentracije 10 µM, 0,1 µl KAPA *Taq* DNA Polymerase koncentracije 0,02 U/µl i 5 µl DNK izolata. Zapremina PCR reakcije iznosila je 25 µl. Amplifikacija je izvedena u PCR aparatu Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany) po sledećem termalnom protokolu: inicijalna denaturacija u trajanju od 2 minuta na 95 °C koja je praćena sa 30 ciklusa denaturacije od 30 sekundi na 95 °C, anilingom u trajanju od 30 sekundi na 57 °C i ekstenzijom od 1 minuta na 72 °C. Finalna ekstenzija trajala je 2 minuta na 72 °C.

Za ispitivanje varijabilnosti mtDNK *V. destructor*, uz pomoć PCR metode amplifikovane su sekvence *cox1*, *atp6-cox3* i *cytb* korišćenjem KAPA *Taq* PCR kita (Kapa Biosystems, South Africa) i četiri para specifičnih prajmera (Tabela 2).

Tabela 2. Amplifikovane sekvence gena mtDNK *V. destructor* i korišćeni prajmeri

Naziv sekvence	Dužina (bp)	Naziv prajmera	Sekvenca prajmera (5'→3')
<i>cox1</i>	376	COI376bpF COI376bpR	TAC AAA GAG GGA AGA AGC AGC C GCC CCT ATT CTT AAT ACA TAG TGA AAA TG
<i>cox1</i>	929	10KbCOIF1 6,5KbCOIR	CTT GTA ATC ATA AGG ATA TTG GAA C AAT ACC AGT GGG AAC CGC
<i>atp6-cox3</i>	818	16KbATP6F 16KbCOIIR	GAC ATA TAT CAG TAA CAA TGA G GAC TCC AAG TAA TAG TAA AAC C
<i>cytb</i>	985	10KbCytbF-1 10KbCytbPRIM	GCA GCT TTA GTG GAT TTA CCT AC CTA CAG GAC ACG ATC CCA AG

Amplifikacije svih navedenih sekvenci *V. destructor* izvedene su u reakcijama ukupne zapremine 25 μ l. Kao negativna kontrola korišćena je „nuclease-free“ voda. Za sve PCR reakcije korišćen je aparat Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany).

Reakcija za amplifikaciju *cox1* (376 bp) sekvence sadržala je 14,9 μ l „nuclease-free“ vode, 2,5 μ l 10 \times KAPA *Taq* pufera iz kita, 0,5 μ l dNTP miksa koncentracije 10 mM, po 1 μ l prajmera COI376bpF i COI376bpR (Solignac i sar., 2005) koncentracije 10 μ M, 0,1 μ l KAPA *Taq* DNA Polymerase koncentracije 0,02 U/ μ l i 5 μ l izolovane DNK prema sledećem temperaturnom protokolu: inicijalna denaturacija DNK i aktivacija *Taq* DNK polimeraze u trajanju od 3 minuta na 95 °C, 35 ciklusa denaturacije 30 sekundi na 95 °C, 30 sekundi anilinga na 52 °C i 1 minut ekstenzije na 72 °C, praćene finalnom ekstenzijom u trajanju od 4 minuta na 72 °C.

Smeša za PCR reakciju *cox1* (929 bp) sekvence sastojala se od 14,9 μ l „nuclease-free“ vode, 2,5 μ l 10 \times KAPA *Taq* pufera iz kita, 0,5 μ l dNTP miksa koncentracije 10 mM, po 1 μ l prajmera 10KbCOIF1 i 6,5KbCOIR (Solignac i sar., 2005) koncentracije 10 μ M, 0,1 μ l KAPA *Taq* DNA Polymerase koncentracije 0,02 U/ μ l i 5 μ l izolovane DNK. Temperaturni protokol je podrazumevao inicijalnu denaturaciju i aktivaciju *Taq* DNK polimeraze 3 minuta na 95°C, 40 ciklusa denaturacije od 30 sekundi na 95°C, 30 sekundi anilinga na 51 °C, 1 minut ekstenzije na 72 °C i finalnu ekstenziju od 4 minuta na 72 °C.

Za amplifikaciju *atp6-cox3* sekvence korišćeno je 14,4 μ l „nuclease-free“ vode, 2,5 μ l 10 \times KAPA *Taq* pufera iz kita, 0,5 μ l dNTP miksa koncentracije 10 mM, 0,5 μ l MgCl₂ koncentracije 25 mM, po 1 μ l prajmera 16KbATP6F i 16KbCOIIR (Solignac i sar., 2005) koncentracije 10 μ M, 0,1 μ l KAPA *Taq* DNA Polymerase koncentracije 0,02 U/ μ l i 5 μ l DNK izolata. PCR reakcija je izvedena prema sledećem temperaturnom protokolu: 2 minuta denaturacije na 95 °C praćene sa 35 ciklusa denaturacije od 15 sekundi na 95 °C, 30 sekundi anilinga na 52 °C i 1 minut ekstenzije na 72 °C. Finalna ekstenzija trajala je 10 min na 72°C.

Za amplifikaciju *cytb* sekvence korišćeno je 13,9 μ l „nuclease-free“ vode, 2,5 μ l 10 \times KAPA *Taq* pufera iz kita, 0,5 μ l dNTP miksa koncentracije 10 mM, 1 μ l MgCl₂ koncentracije 25 mM, po 1 μ l prajmera 10KbCytbF-1 i 10KbCytbPRIM (Solignac i sar., 2005) koncentracije 10 μ M, 0,1 μ l KAPA *Taq* DNA Polymerase koncentracije

0.02 U/ μ l i 5 μ l DNK uzorka. Temperaturni protokol se sastojao od inicijalne denaturacije i aktivacije *Taq* DNK polimeraze 3 minuta na 95 °C, 38 ciklusa denaturacije od 30 sekundi na 95 °C, 30 sekundi anilinga na 52 °C i 1 minuta ekstenzije na 72 °C, praćene finalnom ekstenzijom u trajanju od 4 minuta na 72 °C.

Razdvajanje amplifikovanih sekvenci *A. mellifera* i *V. destructor* izvršeno je pomoću elektroforeze na 2% agaroznom gelu koji je napravljen mešanjem 1,2 g agaroze (Serva, Germany) i 60 ml 1 \times TBE pufera. Nakon zagrevanja smeše u mikrotalasnoj pećnici do tačke ključanja, odnosno potpunog rastapanja agaroze, gel je hlađen rotacijom magneteta u sudu na magnetnoj mešalici ARE Heating magnetic stirrer (VELP Scientifica, Italy) do temperature koja je prihvatljiva za držanje staklenog suda rukom. Nakon sipanja gela u kadicu i postavljanja češlja, gel je ostavljen da očvrsne na sobnoj temperaturi u narednih 10 minuta. Iz ohlađenog gela uklanjan je češalj, a čitav gel je prebačen u kadicu aparata za elektroforezu i preliven sa 360 ml 1 \times TBE pufera koji je služio kao elektrolit. PCR produkti koji su prethodno na parafilmu pomešani sa bojom (6 \times Orange DNA Loading Dye, Thermo Scientific, Lithuania) u odnosu 5:1 sipani su u količini od 3 μ l u formirane bazenčice u gelu koja su nastala uklanjanjem češlja. Pri svakoj elektroforezi, u granični bazenčić sa jedne strane nanošeno je 2.5 μ l markera (GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder, Thermo Scientific, Lithuania) koji je služio za procenu dužine dobijenih traka, dok je u granični bazenčić sa druge strane uzoraka sipano 3 μ l „nuclease-free“ vode koja je služila kao negativna kontrola. Elektroforeza je izvedena korišćenjem aparata za horizontalnu elektroforezu Mupid-One electrophoresis system (Advance Co, Japan) u trajanju od 40 minuta pri konstantnom naponu od 100 V. Nakon toga, pristupilo se bojenju PCR produkata potapanjem agaroznog gela u rastvor etidijum bromida (20 μ l etidijum bromida u 200 ml destilovane vode) u trajanju od 15 minuta, a zatim petnaestominutnom obezbojavanju gela u 200 ml destilovane vode. Vizuelizacija traka izvršena je pri UV svetlu talasne dužine 254 nm korišćenjem transiluminatora ETX-20.C (Vilber Lourmat, Germany) pri čemu je gel fotografisan za arhivu.

4.4. Purifikacija amplifikovanih sekvenci

Svih 48 uspelih PCR produkata za tRNA^{leu}-cox2 sekvencu *A. mellifera*, kao i *cox1* (376 bp), *cox1* (929 bp) i *atp6-cox3* sekvence poreklom od 44 jedinke *V.*

destructor, purifikovani su odmah nakon elektroforeze i spremljeni za sekvencioniranje, dok su PCR produkti *cytb* sekvence zbog pojave nespecifičnih traka dužine oko 325 bp prvo morali da budu isečeni i ekstrahovani iz gela, a tek nakon toga purifikovani.

Purifikacija PCR produkata izvedena je korišćenjem FastGene[®] Gel/PCR Extraction kita (Nippon Genetics Europe GmbH, Germany) prema protokolu proizvođača. Preostala količina uspešnih PCR produkata prebačena je u sterilne plastične tube zapremine 1,5 ml i pomešana sa pet puta većom zapreminom GP1 pufera. Smeša je kratko vorteksovana i u celini prebačena u plastičnu kolonicu sa membranom koja je prethodno stavljena na kolekcionu tubu i centrifugirana 30 sekundi na 13000 o/min. Tečna faza sa dna kolekcione tube je odstranjena, a u kolonicu je dodato 600 µl GP2 pufera za ispiranje i čitava smeša je ponovo centrifugirana 30 sekundi na 13000 o/min. Nakon odstranjivanja tečnog sadržaja, kolekciona tuba je centrifugirana 2 minuta na 13000 o/min kako bi se membrana kolonice osušila i odstranio sav alkohol iz GP2 pufera koji bi u narednoj fazi mogao da inhibira proces sekvencioniranja. U sledećem koraku kolonica je prebačena na sterilnu plastičnu tubu od 1,5 ml, a na njenu membranu direktno je naneto 30 µl elucionog GP3 pufera koji ima zadatak da oslobodi molekule DNK sa membrane. Uzorci su nakon toga inkubirani 2 minuta na sobnoj temperaturi kako bi membrana u potpunosti upila dodatni elucioni pufer. Plastične tube su zatim centrifugirane 2 minuta na 13000 o/min nakon čega su kolonice odbačene, a tube sa purifikovanim PCR produktom čuvane na -20 °C.

Usled pojave nespecifičnih traka koje bi otežavale sekvencioniranje, 12 PCR produkata koji su po svojoj dužini odgovarali *cytb* sekvenci, isečeni su iz gela pod UV svetlom sterilnim plastičnim sekačima za jednokratnu upotrebu i stavljeni u sterilne plastične tube zapremine 1,5 ml. Nakon toga sledila je ekstrakcija DNK iz gela korišćenjem FastGene[®] Gel/PCR Extraction kita (Nippon Genetics Europe GmbH, Germany) prema protokolu proizvođača. U tubu sa komadićem gela dodato je 500 µl GP1 pufera, a nakon kraćeg vorteksovanja, uzorak je inkubiran u vodenom kupatilu 10-15 minuta na 55 °C do potpunog otapanja gela. Zatim je u kolonicu sa filterom prebačeno maksimalno 800 µl inkubirane smeše iz prethodnog koraka i centrifugirano 30 sekundi na 13000 o/min, nakon čega je postupak nastavljen po protokolu za purifikaciju tečnih PCR produkata.

4.5. Sekvencioniranje purifikovanih sekvenci

Za sekvencioniranje purifikovanih sekvenci korišćena je komercijalna usluga firme MacroGen Europe (The Netherlands). Sekvencioniranje je vršeno u oba smera u automatskom sekvenceru tipa 3730xl (Applied Biosystems, USA) korišćenjem prethodno navedenih prajmera za amplifikaciju. Sve dobijene sekvence pčela i varoe poredene su sa sekvencama za celokupni mitohondrijalni genom *A. mellifera*, odnosno *V. destructor*, kao i sa odgovarajućim pojedinačnim sekvencama pretraživanjem GenBank baze podataka uz pomoć BLAST opcije. Za obradu i analizu dobijenih sekvenci korišćeni su softveri BioEdit (Hall, 1999) i Clustal W (Thompson i sar., 1994).

4.6. Detekcija varijabilnosti unutar *cox1* i *cytb* sekvenci *V. destructor*

Inicijalno sekvencioniranje *cox1* (376 bp i 929 bp) sekvenci poreklom od 44 uzorka varoe, kao i *cytb* sekvence poreklom od 12 jedinki, otkrilo je prisustvo polimorfizama pojedinačnih nukleotida u obe sekvence na osnovu kojih je bilo moguće izvršiti determinaciju haplotipova *V. destructor*. Nasuprot tome, *atp6-cox3* sekvence bile su identične kod svih ispitanih jedinki. Iz tog razloga, determinacija haplotipova varoe u daljem eksperimentalnom radu nastavljena je isključivo na osnovu polimorfnihih sekvenci, dok je praćenje varijabilnosti *atp6-cox3* sekvence obustavljeno.

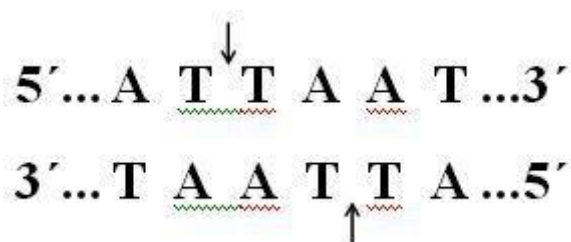
Na osnovu prirode identičnog polimorfnog mesta u *cox1* (376 bp) i *cox1* (929 bp) sekvenci, uočeno je da se determinacija haplotipova preostalih uzoraka može obaviti primenom ARMS (Amplification Refractory Mutation System) metode koja je namenjena za utvrđivanje bilo koje poznate tačkaste mutacije u DNK (Newton i sar., 1989), a koja je brža, jednostavnija i znatno ekonomičnija od metode sekvencioniranja. ARMS metoda se koristi za detekciju SNP mutacija zahvaljujući nemogućnosti ekstenzije prajmera od strane *Taq* DNK polimeraze ukoliko njihov 3' kraj nije komplementaran sa DNK ispitujućeg uzorka. U ovoj metodi neophodno je korišćenje tri prajmera, od kojih su dva „alel specifična“, a jedan konzervisan. Oligonukleotidne sekvence alel specifičnih prajmera u potpunosti su identične, osim u poslednjem nukleotidu na 3' kraju. Pri tome, jedan od prajmera u potpunosti je komplementaran sa sekvencom divljeg tipa, a drugi sa mutiranom sekvencom. Konzervisani prajmer je komplementaran sa oba tipa uzorka, jer se vezuje za deo DNK molekula koji nema

polimorfna mesta. Iz tog razloga, za determinaciju jednog uzorka neophodno je uraditi dve PCR reakcije, pri čemu se u jednu dodaje prajmer komplementaran divljem tipu, a u drugu prajmer komplementaran mutiranom tipu sekvence. U obe reakcije dodaje se isti konzervisani prajmer. U reakciji u kojoj su sekvence prajmera i ispitujućeg uzorka potpuno komplementarne, doći će do amplifikacije i nastanka PCR produkta u količini koja će biti vidljiva prilikom vizuelizacije gela. Ukoliko se sekvence prajmera i ispitujućeg uzorka razlikuju u poslednjem nukleotidu na 3' kraju prajmera, amplifikacija će izostati u potpunosti ili će količina ovako nastalog PCR produkta biti znatno manja nego u reakciji gde su sekvence prajmera i uzorka bile potpuno komplementarne.

S obzirom da ARMS metoda do sada nije bila korišćena za determinaciju haplotipova varoe, bilo je neophodno dizajnirati dva „forward“ prajmera koji su se razlikovali u poslednjem nukleotidu na 3' kraju oligonukleotidne sekvence, dok je kao konzervisani („reverse“) prajmer korišćen 6,5KbCOIR. Nakon dizajniranja prajmera usledila je optimizacija same metode.

U ovom slučaju se kao najpogodniji pokazao gradijentni PCR, koji je za determinaciju haplotipa podrazumevao hibridizaciju uzorka i prajmera na pet različitih temperatura anilinga (T_a). Usled ovakvog načina optimizacije protokola, po svakom ispitivanom uzorku rađeno je 10 PCR reakcija umesto dve, odnosno po pet reakcija za svaki „forward“ prajmer. Reakcije su izvedene u zapremini od 10 μ l, a sastojale su se od 6,36 μ l „nuclease-free“ vode, 1 μ l 10 \times KAPA *Taq* pufera iz kita (KAPA *Taq* PCR Kit, Kapa Biosystems, South Africa), 0,2 μ l dNTP miksa koncentracije 10 mM, po 0,2 μ l prajmera BG-K (5'-AAGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTA-3'), odnosno BG-S1 (5'-AAGAAGCAGCCTTTTGGAAATTTG-3') i 6,5KbCOIR koncentracije 10 μ M, 0,04 μ l KAPA *Taq* DNA Polymerase koncentracije 0,02 U/ μ l i 2 μ l DNK izolata. Uslovi za izvođenje reakcije bili su: 3 minuta denaturacije na 95 °C, 33 ciklusa denaturacije u trajanju od 30 sekundi na 95 °C, 15 sekundi anilinga na 60,0, 61,4, 62,3, 63,2, odnosno 66,0 °C i 30 sekundi ekstenzije na 72 °C. Finalna ekstenzija trajala je 4 minuta na 72 °C. Sve gradijentne PCR reakcije izvedene su u PCR uređaju MultiGene Gradient (Labnet International Inc, USA). Produkti PCR reakcije razdvajani su elektroforezom na 2% agaroznom gelu korišćenjem TBE pufera u trajanju od 40 minuta i pri konstantnom naponu od 100 V.

Analizom *cytb* sekvence uočeno je da polimorfni nukleotid u mutiranoj sekvenci obrazuje novo restrikciono mesto koje prepoznaje *AseI* (*VspI*) restrikcioni enzim (Slika 5). Zbog jednostavnosti izvođenja i ekonomičnosti, za determinaciju haplotipova *V. destructor* na osnovu razlika u *cytb* sekvenci primenjena je PCR-RFLP metoda. S obzirom da se korišćenjem prajmera 10KbCytbF-1 i 10KbCytbPRIM za amplifikaciju sekvence *cytb* (985 bp) nisu mogle izbeći nespecifične trake pri vizuelizaciji gela, pristupilo se dizajniranju novih prajmera (Cytb226For i Cytb226Rev) koji su sintetisali PCR produkt dužine 226 bp u okviru koga se nalazilo i novo restrikciono mesto. Amplifikacija je izvedena u zapremini od 25 µl koja je sadržala 17,4 µl „nuclease-free“ vode, 2,5 µl 10× KAPA *Taq* pufera iz kita (KAPA *Taq* PCR Kit, Kapa Biosystems, South Africa), 0,5 µl dNTP miksa koncentracije 10 mM, 0,5 µl MgCl₂ koncentracije 25 mM, po 1 µl prajmera Cytb226For (5'-CTCGTATTGTTTCGAGATTGTAATAGAGG-3') i Cytb226Rev (5'-CCTCAAAAAGATATTTGTCCTCAAGG-3') koncentracije 10 µM, 0,1 µl KAPA *Taq* DNA Polymerase koncentracije 0,02 U/µl i 2 µl DNK uzorka. PCR reakcije su izvedene u aparatu Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany) prema sledećem termalnom protokolu: inicijalna denaturacija od 3 minuta na 95 °C, 30 ciklusa denaturacije u trajanju od 30 sekundi na 95 °C, 30 sekundi anilinga na 50 °C i 30 sekundi ekstenzije na 72 °C, nakon čega je sledila finalna ekstenzija u trajanju od 4 minuta na 72 °C. Produkti PCR reakcije razdvajani su elektroforezom na 2% agaroznom gelu korišćenjem TBE pufera u aparatu Mupid-One electrophoresis system (Advance Co, Japan). Elektroforeza je izvedena pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 40 minuta. Nakon provere efikasnosti amplifikacije, uspeli PCR produkti su korišćeni u RFLP reakciji.



Slika 5. Restrikciono mesto enzima *AseI* (*VspI*)

Restrikciona smeša sastojala se od 10 µl „nuclease-free“ vode, 1 µl 10× FastDigest pufera, 3,5 µl PCR produkta i 0,5 µl FastDigest *AseI* (*VspI*) restrikcionog

enzima (Thermo Fisher Scientific Baltics UAB, Lithuania). Ovako pripremljena restrikciona smeša inkubirana je u PCR aparatu Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany) 40 minuta na 37 °C kako bi se omogućilo delovanje restrikcionog enzima, a zatim 5 minuta na 65 °C kako bi se enzim inaktivisao. Nakon hlađenja na 4 °C, RFLP produkti su nanošeni u bazenčiće 2%-og agaroznog gela u količini od 8 µl. Uzorci su zatim razdvajani elektroforezom u TBE puferu pri konstantnom naponu od 100 V u trajanju od 40 minuta, nakon čega je gel bojen u etidijum bromidu i vizuelizovan pod UV svetlom.

4.7. Statistička obrada rezultata

Eksperimentalni rezultati su prikazani pomoću distribucija apsolutnih i relativnih frekvencija, kao i grafički preko kartograma, strukturnih krugova, strukturnih pravougaonika i dendrograma.

U skladu sa postavljenim zadacima i karakteristikama podataka izvršen je izbor statističkih metoda.

Ravnomernost učestalosti utvrđenih haplotipova ispitivana je χ^2 testom.

Zavisnost rasporeda prisutnih haplotipova pčela, kao i varoa, od ispitivanih faktora (lokacije, nadmorske visine i tehnike pčelarenja) ispitivana je χ^2 testom nezavisnosti.

Model generalne diskriminacione analize upotrebljen je za ispitivanje značajnosti razlike u prisutnim haplotipovima kod pčela, varoa i pčela-varoa sa različitih: lokaliteta, košnica, kategorija nadmorskih visina i tehnika pčelarenja. Pri tom, bliskost između elemenata je kvantifikovana preko kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja. Testiranjem kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja F-statistikom utvrđena je značajnost ispitivanih razlika.

Na osnovu hijerarhijskog modela klaster analize, zasnovanog na kvadratnim Mahalanobis-ovim odstojanjima i Ward-ovom metodu povezivanja, dobijeni su dendrogrami, koji su ukazali na grupe sličnih elemenata.

Statistička obrada eksperimentalnih podataka je izvršena upotrebom paketa STATISTICA v. 7.0 (Statsoft, Inc., Tulsa, USA).

Za bioinformatičku analizu DNK sekvenci korišćen je računarski softver BioEdit v. 7.1.3. (Hall, 1999).

5. REZULTATI

5.1. Varijabilnost mtDNK *A. mellifera* na osnovu analize tRNA^{leu}-cox2 sekvence

5.1.1. Identifikacija haplotipova *A. mellifera* metodom sekvencioniranja

Sekvencioniranjem tRNA^{leu}-cox2 regiona poreklom od 48 pčela dobijene su sekvence dužine 571-573 bp (Slika 6). Njihovom analizom uočeno je šest polimorfničkih pozicija na osnovu kojih je identifikovano šest haplotipova *A. mellifera* (Tabela 3, Slika 6). Nakon pretraživanja GenBank baze podataka uz pomoć BLAST opcije, utvrđeno je da je jedna sekvenca bila jedinstvena i predstavljala novi haplotip koji je nazvan C2aa, dok je pet sekvenci bilo identično sa već opisanim haplotipovima pčela označenih sa C1a, C2c, C2d, C2e i C2i (GenBank identifikacioni brojevi JQ977699-JQ977703).

Tabela 3. Identifikovani haplotipovi *Apis mellifera* na osnovu utvrđenih polimorfničkih mesta unutar tRNA^{leu}-cox2 sekvence

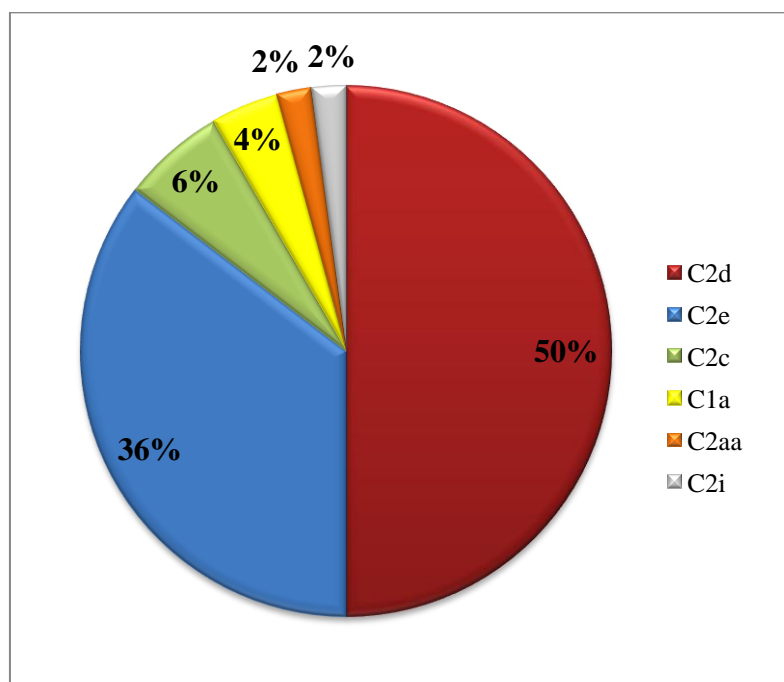
Haplotip pčele	Polimorfno mesto					
	69 (3431)	112 (3474)	213 (3575)	225 (3587)	270 (3632)	405 (3767)
C1a	C	T	C	G	T	C
C2c	-
C2aa	-	.	T	.	C	T
C2d	-	.	.	.	C	T
C2e	-	-	.	.	C	T
C2i	-	.	.	A	C	T

Brojevi izvan zagrade predstavljaju nukleotidne pozicije u dobijenim sekvencama, dok brojevi u zagradi predstavljaju nukleotidne pozicije u ukupnoj mtDNK *A. mellifera* (GenBank identifikacioni broj L06178); (-) – delecija

	10	20	30	40	50	60	70	80
C1a							
C1a	GGCAGAATAAGTGCATTGAACTTAAGATTCAAATATAAAGTATTTTAACTTTTATTAAAATTTCCCACTTAATTCAT							
C2aa							
C2c							
C2d							
C2e							
C2i							
	90	100	110	120	130	140	150	160
C1a							
C1a	ATTAATTTAAAAATAAAATTAATAACAATTTTAAATAAAAATAAATAATTTTATTTTATATTGAATTTAAATTCAA							
C2aa							
C2c							
C2d							
C2e							
C2i							
	170	180	190	200	210	220	230	240
C1a							
C1a	TCCTAAAGATTTAATCTTTTATTAAAATTAATAAATTAATATAAAAATAAAACAAAATATAACAGAATATATTTATTA							
C2aa							
C2c							
C2d							
C2e							
C2i							
	250	260	270	280	290	300	310	320
C1a							
C1a	ATTTAATTTATTAATAATTTCCACATGATTTATATTTATATTTCAAGAATCAAATTCATATTATGCTGATAATTTAATTC							
C2aa							
C2c							
C2d							
C2e							
C2i							
	330	340	350	360	370	380	390	400
C1a							
C1a	ATTTCATAATATAGTTATAATAATTATTATTATAATTTCAACATTAACGTATATATTATTTTAGATTTATTATAAACA							
C2aa							
C2c							
C2d							
C2e							
C2i							
	410	420	430	440	450	460	470	480
C1a							
C1a	AATTCCTCAAATTTATTTTATTAAAAATCATAATATTGAAATTTTGAACAATTATTCCAATTATTATTCTATTAATT							
C2aa							
C2c							
C2d							
C2e							
C2i							
	490	500	510	520	530	540	550	560
C1a							
C1a	ATTTGTTTTCCATCATTAAAAATTTATATTTAATTGATGAAATGTAAATCCTTTTTTTTCAATTAATCAATTGGTCA							
C2aa							
C2c							
C2d							
C2e							
C2i							
	570							
C1a							
C1a	TCAATGATATTGA							
C2aa							
C2c							
C2d							
C2e							
C2i							

Slika 6. Usporedni prikaz dobijenih tRNA^{leu}-cox2 sekvenci *A. mellifera*

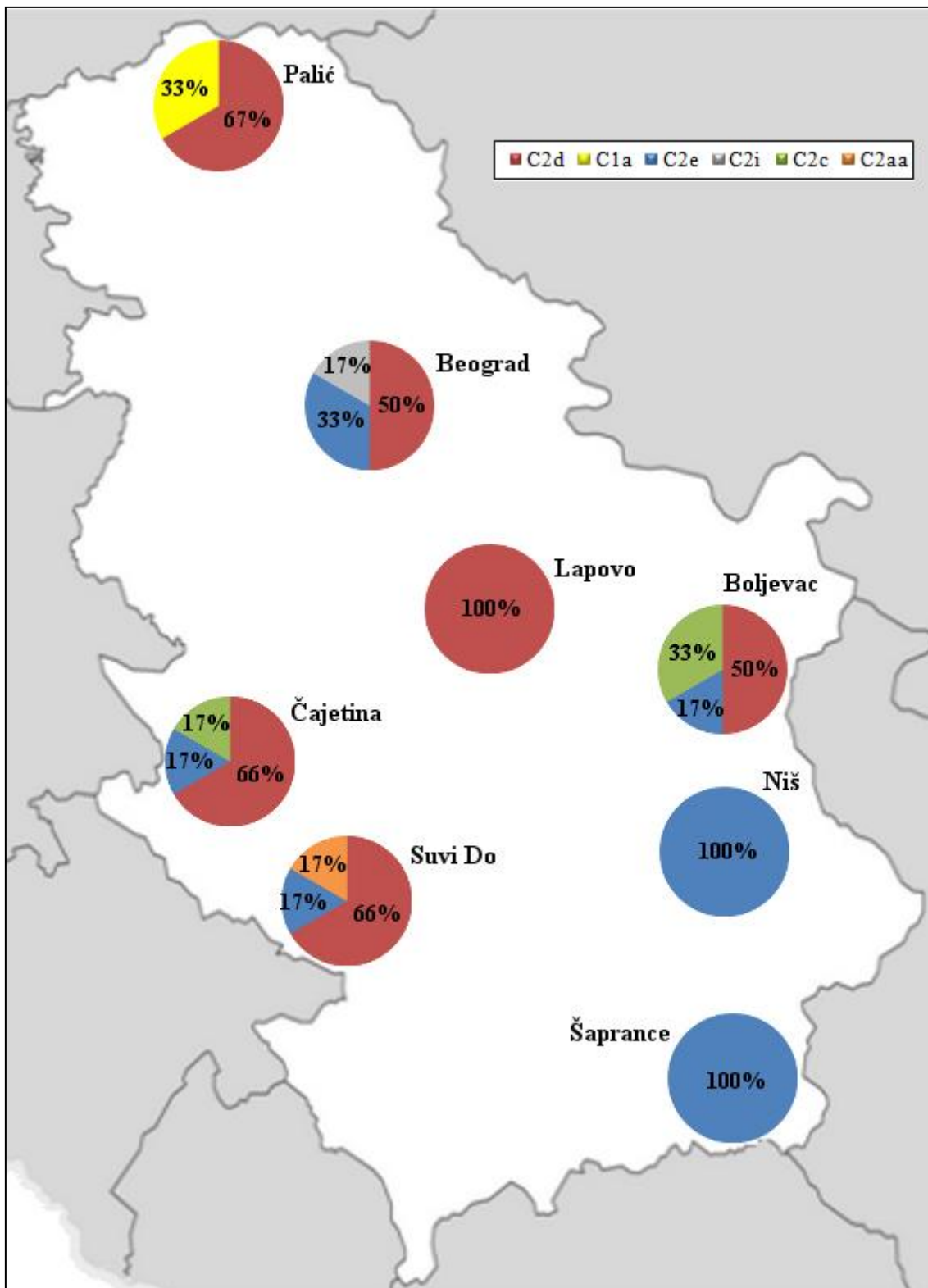
Najzastupljeniji haplotip pčela u ukupnom uzorku bio je C2d (u 50% slučajeva), dok su najmanje zastupljeni haplotipovi bili C2aa i C2i (u po 2% slučajeva; Grafikon 1). Na osnovu rezultata χ^2 -testa ($\chi^2 = 62,00$; $p < 0,001$), utvrđeno je da haplotipovi pčela nisu podjednako zastupljeni.



Grafikon 1. Zastupljenost haplotipova pčela u ukupnom uzorku

Na tri posmatrana lokaliteta utvrđen je po jedan haplotip, na jednom lokalitetu dva i na četiri lokaliteta utvrđeno je prisustvo tri haplotipa pčela (Grafikon 2). Kod pčela na lokalitetu Lapovo pronađen je samo haplotip C2d, dok je kod pčela poreklom iz Niša i Šapranca utvrđen samo haplotip C2e. Dve trećine (67%) pčela na lokalitetu Palić činio je haplotip C2d, a jednu trećinu (33%) haplotip C1a. Na lokalitetima Boljevac i Čajetina pronađeni su haplotipovi C2d, C2e i C2c u odnosu 50%:17%:33% (Boljevac), odnosno 66%:17%:17% (Čajetina). Na lokalitetima Beograd i Suvi Do utvrđeni su haplotipovi C2d (50% i 66%) i C2e (33% i 17%), pri čemu je na lokalitetu Beograd utvrđen još i haplotip C2i (17%), dok je u Suvom Dolu detektovan haplotip C2aa (17%).

Haplotip C2d bio je dominantan na svih šest lokaliteta na kojima je pronađen (Palić, Beograd, Lapovo, Boljevac, Čajetina i Suvi Do; Grafikon 2). Na šest lokaliteta bio je prisutan i haplotip pčela C2e (Beograd, Boljevac, Čajetina, Niš, Suvi Do i Šaprance). Međutim, dok je na lokalitetima Niš i Šaprance ovaj haplotip bio jedini prisutan, na lokalitetima Beograd, Boljevac, Čajetina i Suvi Do haplotip C2e bio je manje zastupljen od haplotipa C2d. Pčele sa haplotipom C2c utvrđene su na lokalitetima Boljevac i Čajetina. Na po jednom lokalitetu utvrđeni su haplotipovi C1a (Palić), C2i (Beograd) i C2aa (Suvi Do).



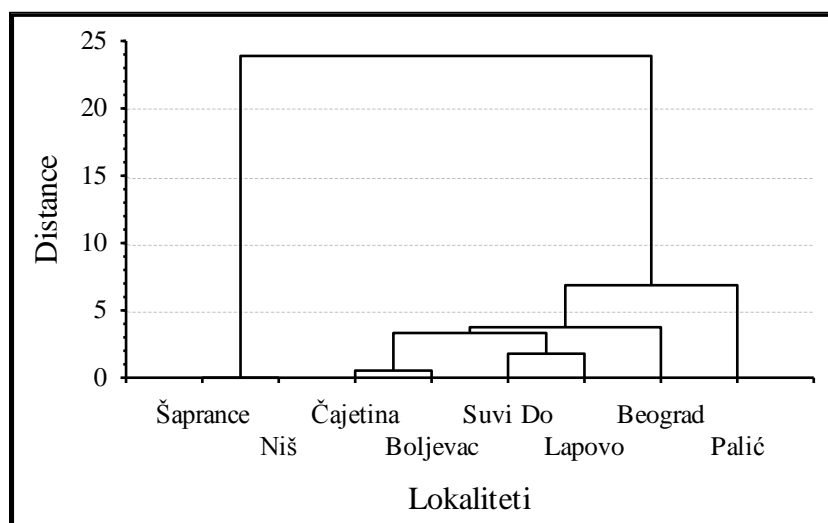
Grafikon 2. Distribucija haplotipova *A. mellifera* na posmatranim lokalitetima

Za ispitivanje značajnosti razlike u prisutnim haplotipovima pčela na posmatranim lokalitetima korišćen je model generalne diskriminacione analize. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između lokaliteta (Tabela 4) ukazuju da su pčele sa lokaliteta Niš i Šaprance imale isti haplotip. One su se po haplotipu značajno razlikovale od pčela sa lokaliteta Beograd, a vrlo značajno od pčela sa ostalih lokaliteta (Palić, Lapovo, Boljevac, Čajetina i Suvi Do). Takođe, pčele sa lokaliteta Palić su se po haplotipu značajno razlikovale od pčela sa lokaliteta Beograd, Boljevac i Suvi Do.

Tabela 4. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dva lokaliteta prema pronađenim haplotipovima pčela

Lokalitet	Beograd	Lapovo	Boljevac	Čajetina	Niš	Suvi Do	Šaprance
Palić	0,011	0,138	0,016	0,062	<0,001	0,033	<0,001
Beograd		0,161	0,106	0,316	0,026	0,164	0,026
Lapovo			0,224	0,750	<0,001	0,453	<0,001
Boljevac				0,918	0,002	0,130	0,002
Čajetina					0,005	0,433	0,005
Niš						0,002	≈1,000
Suvi Do							0,002

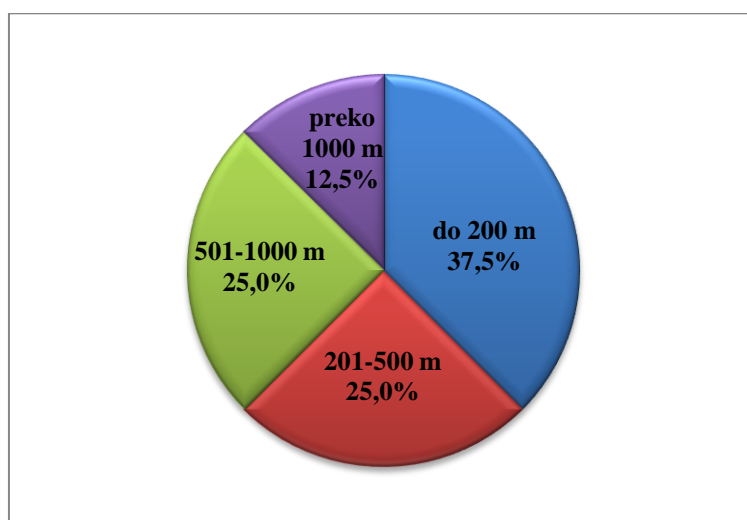
U cilju grupisanja lokaliteta po prisutnim haplotipovima pčela urađena je hijerarhijska klaster analiza zasnovana na kvadratnim Mahalanobis-ovim odstojanjima i Ward-ovom metodu povezivanja. Prema dendrogramu (Grafikon 3), između lokaliteta Niš i Šaprance postoji podudarnost i ovi lokaliteti obrazuju klaster koji se po prisutnim haplotipovima pčela razlikuje od ostalih. Sledeću grupu formirali su Čajetina i Boljevac, pa Suvi Do i Lapovo. Ove dve grupe su vrlo slične zbog čega su se udružile na sledećem nivou, a zatim im se pridružio Beograd, pa Palić.



Grafikon 3. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta po prisutnim haplotipovima pčela

5.2. Zastupljenost haplotipova *A. mellifera* u zavisnosti od nadmorske visine posmatranih lokaliteta

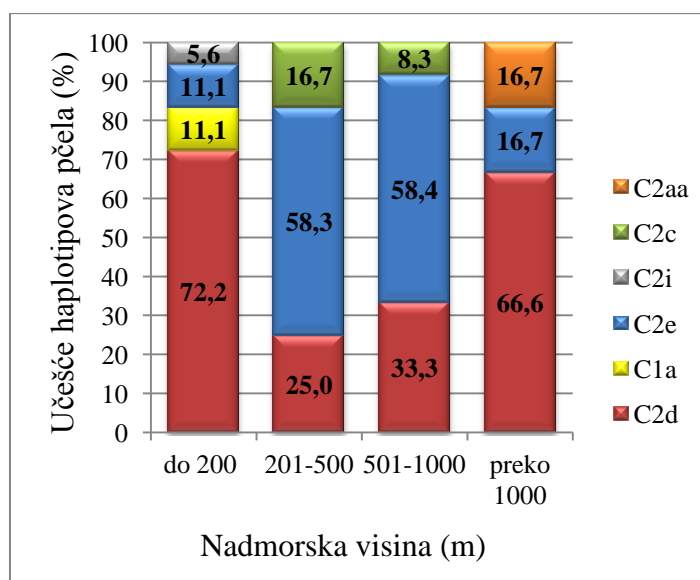
Uzimajući u obzir nadmorsku visinu posmatranih lokaliteta, utvrđeno je da je 37,5% posmatranih pčela poticalo sa nadmorske visine do 200 m, po 25,0% sa visine 201-500 m i 501-1000 m i 12,5% sa nadmorske visine preko 1000 m (Grafikon 4).



Grafikon 4. Struktura analiziranih uzoraka pčela po nadmorskoj visini

Statističkom analizom eksperimentalnih podataka utvrđeno je da nadmorska visina ne utiče statistički značajno na raspored haplotipova pčela ($\chi^2=27,101$; $p=0,128$).

Haplotip C2d bio je prisutan kod pčela na svim nadmorskim visinama (Grafikon 5). Njegovo učešće variralo je od 25,0% kod pčela na nadmorskoj visini 201-500 m, do 72,2% na lokalitetima na nadmorskoj visini ispod 200 m. Ovaj haplotip bio je dominantan i kod pčela sa lokaliteta Suvi Do, koji se nalazi na najvećoj nadmorskoj visini. Haplotip C2e takođe je utvrđen kod pčela na svim nadmorskim visinama. Međutim, za razliku od haplotipa C2d koji je bio dominantan i na nadmorskoj visini preko 1000 m, haplotip C2e bio je prisutan kod najvećeg broja pčela na nadmorskoj visini od 201 do 1000 m. Pored ova dva haplotipa, kod pčela na nadmorskoj visini do 200 m utvrđeni su haplotipovi C1a i C2i, na nadmorskoj visini od 201-1000 m bio je prisutan i haplotip C2c, a na visini preko 1000 m i haplotip C2aa (Grafikon 5).



Grafikon 5. Zastupljenost haplotipova pčela u zavisnosti od nadmorske visine

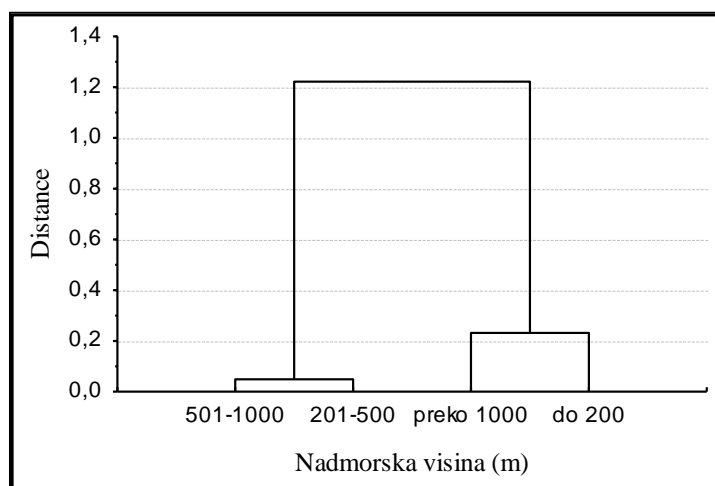
Za određivanje bliskosti strukture prisutnih haplotipova na različitim nadmorskim visinama poslužio je model generalne diskriminacione analize. Bliskost između kategorija nadmorskih visina kvantifikovana je preko kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja. Nivoi značajnosti utvrđenih distanci haplotipova pčela sa različitim nadmorskih visina (Tabela 5) ukazuju da su pčele na nadmorskoj visini 201-500 m imale istu strukturu haplotipova kao pčele na nadmorskoj visini 501-1000 m ($p=0,979$), dok se struktura utvrđenih haplotipova pčela na visini preko 1000 m nije statistički značajno razlikovala od strukture utvrđene na nadmorskoj visini do 200 m i 501-1000 m.

Tabela 5. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve kategorije nadmorske visine prema utvrđenim haplotipovima pčela

Nadmorska visina (m)	201-500	501-1000	Preko 1000
Do 200	0,007	0,027	0,176
201-500		0,979	0,046
501-1000			0,097

Struktura haplotipova pčela sa lokaliteta na visini do 200 m vrlo značajno se razlikovala od strukture utvrđene na nadmorskoj visini 201-500 m, a značajno u poređenju sa strukturom karakterističnom za nadmorsku visinu od 501-1000 m. Nadmorsku visinu preko 1000 m karakterisala je struktura haplotipova pčela značajno različita od strukture na nadmorskoj visini od 201 do 500 m.

Hijerarhijska klaster analiza zasnovana na kvadratnim Mahalanobis-ovim odstojanjima i Ward-ovom metodu povezivanja urađena je u cilju grupisanja lokaliteta sa različitih nadmorskih visina prema sličnosti haplotipova pčela. Na dendrogramu (Grafikon 6) se uočavaju dva klastera. U prvoj grupi nalaze se lokaliteti sa nadmorske visine 201-1000 m, a u drugu grupu svrstani su lokaliteti iz kategorija nadmorske visine do 200 m i preko 1000 m.



Grafikon 6. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa različitih nadmorskih visina prema sličnosti haplotipova pčela

5.3. Varijabilnost mtDNK *V. destructor* na osnovu analize *cox1* i *cytb* sekvenci

5.3.1. Identifikacija haplotipova *V. destructor* metodom sekvencioniranja

Sekvencioniranjem fragmenata *cox1* (376 bp i 929 bp) gena poreklom od 44 varoe sa šest lokaliteta, utvrđeno je da je 50% jedinki imalo identične *cox1* sekvence sa referentnom sekvencom za K haplotip *V. destructor* (GenBank identifikacioni broj GQ379056). Kod 16% sekvencioniranih jedinki, na poziciji 1932 ukupne mtDNK utvrđen je nukleotidni polimorfizam u tipu tranzicije (A→G), na osnovu čega su te jedinke svrstane u novi haplotip nazvan Srbija 1 (S1), koji je prijavljen u GenBank bazi podataka pod identifikacionim brojem JX970938 (Tabela 6, Slika 7). Utvrđena mutacija *cox1* sekvence predstavljala je „tihu“ mutaciju i nije uticala na aminokiselinski sastav proteina koji kodira.

Tabela 6. Nukleotidni polimorfizmi unutar *cox1* sekvence haplotipova *V. destructor* koji parazitiraju na *A. mellifera*

Haplotip	GenBank identif. broj	Polimorfno mesto							
		1	1	1	1	1	2	2	
		4	7	7	9	9	1	2	
		2	3	9	3	8	2	4	
		5	1	1	2	3	7	4	
K1-1 ^a	GQ379056	T	A	T	A	G	C	A	
K1-2 ^a	GQ379057	
K1-4 ^a	GQ379060	G	
J1-1 ^a	GQ379069	C	G	A	.	A	T	.	
J1-5 ^a	GQ379073	C	G	A	.	A	T	.	
J1-6 ^a	GQ379074	C	G	A	.	A	T	.	
S1 ^b	JX970938	.	.	.	G	.	- ^c	- ^c	
P1 ^b	JX970939	- ^c	- ^c	

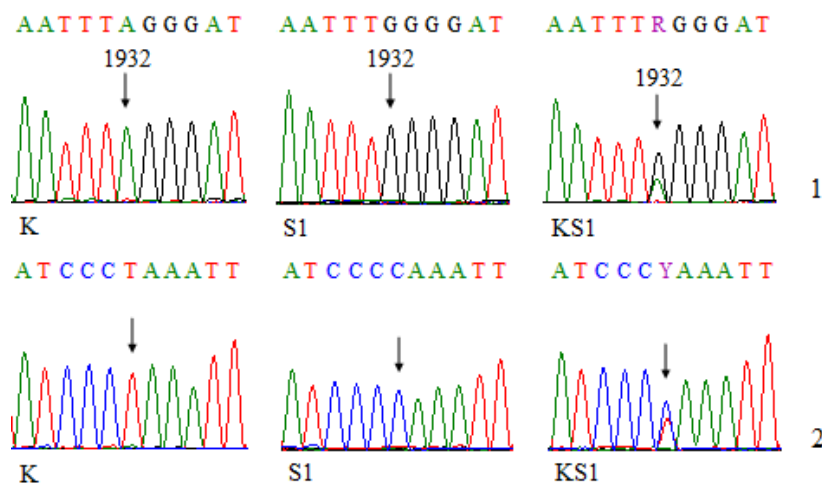
Brojevi odgovaraju nukleotidnim pozicijama u sekvenci za ukupnu mtDNK *V. destructor* (AJ493124.2; Navajas i sar., 2002)

^a Navajas i sar. (2010)

^b Naše istraživanje

^c Nukleotidna pozicija nije uključena u našu *cox1* sekvencu

Na poziciji 1932 mtDNK kod ostalih 34% jedinki, na hromatogramu su postojali pikovi karakteristični za obe purinske baze (adenin i guanin), zbog čega su ovakvi uzorci označeni kao KS1 jedinke (Slika 7). Ovakva pojava (da se u istoj jedinki nalaze različiti molekuli mtDNK) naziva se heteroplazmija i po prvi put je utvrđena kod vrste *V. destructor*.



Slika 7. Delovi hromatograma *cox1* sekvence *V. destructor* karakteristični za utvrđene haplotipove (K, S1) i jedinke sa heteroplazmijom (KS1)

1 – smer 5'→3'; 2 – smer 3'→5'; R – A/G; Y – C/T

Sekvencioniranjem fragmenta *cytb* (985 bp) gena poreklom od 12 varoa sa šest lokaliteta, utvrđeno je da je 33% sekvenci bilo identično sa referentnom *cytb* sekvencom za K haplotip *V. destructor* (GenBank identifikacioni broj GQ379094). Kod 17% jedinki uočena je tačkasta mutacija na poziciji 10133 ukupne mtDNK, gde se umesto guanina nalazio adenin. Ove jedinke svrstane su u novi haplotip nazvan Pešter 1 (P1), koji je prijavljen u GenBank bazi podataka pod identifikacionim brojem JX970945 (Tabela 7, Slika 8).

Na polimorfnoj poziciji kod 50% jedinki, na hromatogramu je utvrđeno postojanje pikova karakterističnih za obe purinske baze, pa su ovi uzorci sa heteroplazmijom označeni kao KP1 jedinke (Slika 8). Mutacija detektovana unutar *cytb* sekvence nije uticala na aminokiselinski sastav proteina koji kodira.

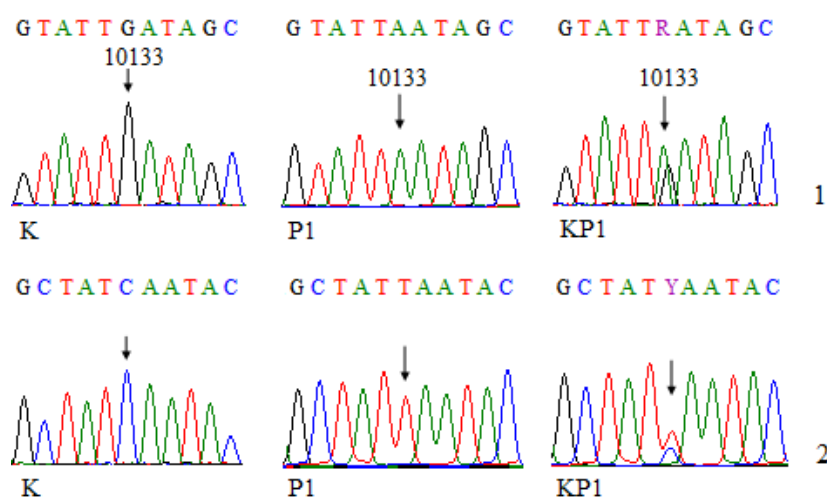
Tabela 7. Nukleotidni polimorfizmi unutar *cytb* sekvence haplotipova *V. destructor* koji parazitiraju na *A. mellifera*

Haplotip	GenBank identif. broj	Polimorfno mesto													
		9	9	9	9	0	0	1	1	4	4	5	5	6	7
		9	9	9	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		8	8	9	9	0	0	1	1	4	4	5	5	6	7
		5	6	6	9	2	4	3	5	7	9	3	9	3	1
		4	9	0	5	2	0	3	4	5	4	8	8	1	2
K1-1 ^a	GQ379094	A	C	A	G	T	C	G	G	A	T	C	C	T	T
K1-2 ^a	GQ379095
K1-4 ^a	GQ379098
J1-1 ^a	GQ379107	G	T	.	.	.	T	.	A	G	.	T	T	C	.
J1-5 ^a	GQ379111	.	T	G	A	A	T	.	A	.	C	.	T	.	C
J1-6 ^a	GQ379112	.	A	.	.	.	T	.	A	G	.	T	T	C	.
S1 ^b	JX970944
P1 ^b	JX970945	A

Brojevi odgovaraju nukleotidnim pozicijama u sekvenci za ukupnu mtDNK *V. destructor* (AJ493124.2; Navajas i sar., 2002)

^a Navajas i sar. (2010)

^b Naše istraživanje



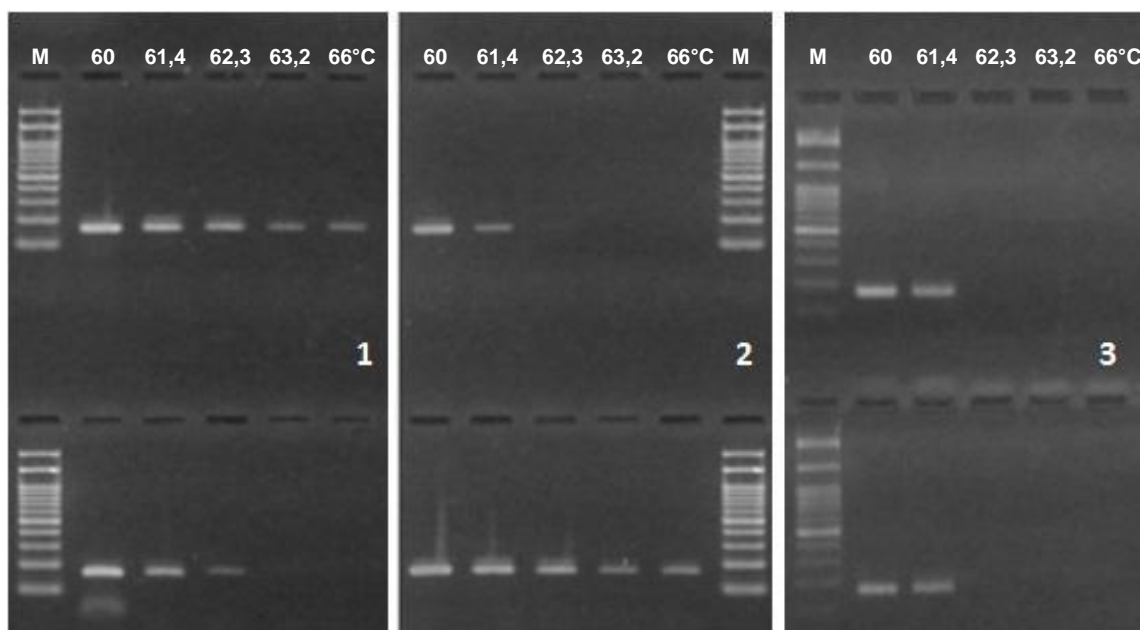
Slika 8. Delovi hromatograma *cytb* sekvence *V. destructor* karakteristični za utvrđene haplotipove (K, P1) i jedinice sa heteroplazmijom (KP1)

1 – smer 5'→3'; 2 – smer 3'→5'; R – A/G; Y – C/T

5.3.2. Identifikacija haplotipova *V. destructor* na osnovu analize *coxI* sekvence primenom ARMS metode

Nakon utvrđivanja tačkaste mutacije u fragmentu *coxI* gena metodom sekvencioniranja, za svih 245 uzoraka varoe urađena je identifikacija haplotipova primenom ARMS metode.

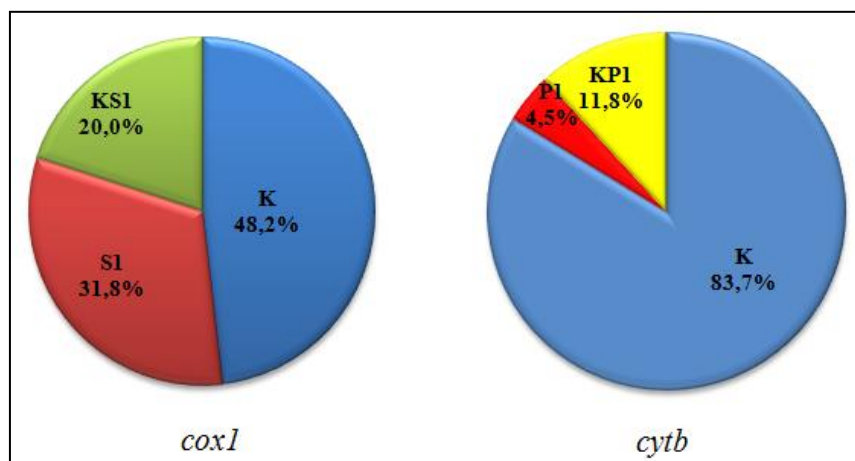
Ukoliko je ispitivani uzorak pripadao K haplotipu, amplifikacija 165 bp duge sekvence uspevala je na višoj temperaturi korišćenjem BG-K/6,5KbCOIR, nego BG-S1/6,5KbCOIR seta prajmera (Slika 9). Kod uzoraka S1 haplotipa, ARMS-PCR reakcija bila je uspešna na višoj temperaturi sa BG-S1/6,5KbCOIR nego sa BG-K/6,5KbCOIR parom prajmera, dok je kod jedinki sa heteroplazmijom (KS1 jedinke) reakcija uspevala na istoj temperaturi sa oba para prajmera (Slika 9). Korišćenjem ARMS metode dobijena je identična struktura haplotipova za sva 44 uzorka varoe čija je tipizacija prethodno izvršena metodom sekvencioniranja.



Slika 9. Rezultati gradijentne ARMS-PCR reakcije karakteristični za haplotip K (1), haplotip S1 (2) i KS1 jedinke (3) *V. destructor*

Gornji red – PCR produkti dužine 165 bp dobijeni korišćenjem BG-K/6,5KbCOIR prajmera; donji red – PCR produkti dužine 165 bp dobijeni korišćenjem BG-S1/6,5KbCOIR prajmera; M – 100 bp molekularni marker

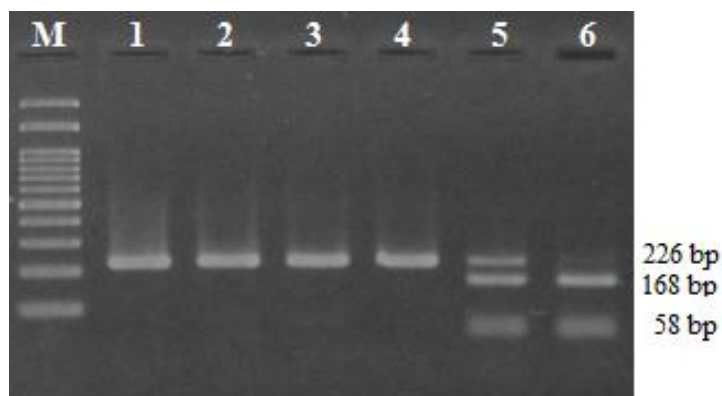
Na osnovu analize *cox1* sekvence korišćenjem ARMS metode, utvrđeno je 48,2% jedinki K haplotipa, 31,8% jedinki S1 haplotipa i 20,0% KS1 jedinki (Grafikon 7).



Grafikon 7. Struktura haplotipova (K, S1, P1) i jedinki sa heteroplazmijom (KS1, KP1) *V. destructor* dobijena primenom ARMS (*cox1* sekvenca) i RFLP (*cytb* sekvenca) metode

5.3.3. Identifikacija haplotipova *V. destructor* na osnovu analize *cytb* sekvence primenom RFLP metode

Nakon utvrđivanja tačkaste mutacije u fragmentu *cytb* gena metodom sekvencioniranja, za svih 245 uzoraka varoe urađena je identifikacija haplotipova primenom RFLP metode uz pomoć *AseI* (*VspI*) restrikcionog enzima. S obzirom da *cytb* sekvenca K haplotipa ne poseduje restrikciono mesto, PCR produkti su nakon delovanja restrikcionog enzima zadržali početnu dužinu od 226 bp. Međutim, *AseI* (*VspI*) restrikcioni enzim sekao je sekvencu P1 haplotipa na dva kraća fragmenta čije su dužine iznosile 168 bp i 58 bp (Slika 10). Kod jedinki sa heteroplazmijom (KP1 jedinke), na gelu su se nakon izvedene RFLP metode uočavale tri trake, dužine 226 bp, 168 bp i 58 bp (Slika 10). Za svih 12 varoa čija je tipizacija prethodno izvršena metodom sekvencioniranja, identična struktura haplotipova dobijena je i RFLP metodom.



Slika 10. RFLP obrasci karakteristični za haplotip K, haplotip P1 i KP1 jedinke *V. destructor*

M – 100 bp molekularni marker; 1-4 – K haplotip; 5 – KP1 jedinke; 6 – P1 haplotip

Analizom *cytb* sekvenci RFLP metodom pomoću *AseI* (*VspI*) restrikcionog enzima, utvrđeno je da je 83,7% jedinki pripadalo K haplotipu, 4,5% jedinki P1 haplotipu, dok je 11,8% varoa pripadalo KP1 jedinkama (Grafikon 7).

Od ukupnog broja jedinki koje su na osnovu *coxI* sekvence determinisane kao K haplotip, isti haplotip i na *cytb* sekvenci imalo je 66,10% jedinki, P1 haplotip 9,32%, dok je 24,58% analiziranih varoa bilo sa heteroplazmijom (Tabela 8). Sve varoe kod kojih je analizom sekvence *coxI* konstatovan haplotip S1, imale su *cytb* sekvencu koja odgovara K haplotipu. Takođe, sve jedinke sa heteroplazmijom u *coxI*, pripadale su K haplotipu na osnovu *cytb* sekvence (Tabela 8).

Od ukupnog broja analiziranih varoa koje su na osnovu *cytb* sekvence determinisane kao K haplotip, na *coxI* sekvenci je u po 38,05% slučajeva konstatovano prisustvo haplotipova K i S1, a u 23,90% slučajeva jedinki sa heteroplazmijom. Sve varoe koje su na osnovu *cytb* sekvence pripadale P1 haplotipu, odnosno KP1 jedinkama, determinisane su kao K haplotip na osnovu *coxI* sekvence (Tabela 8).

Tabela 8. Raspored haplotipova *V. destructor* (K, S1, P1) i jedinki sa heteroplazmijom (KS1, KP1) utvrđenih analizom *cox1* i *cytb* sekvenci

Haplotipovi na osnovu analize sekvence <i>cox1</i>	Haplotipovi na osnovu analize sekvence <i>cytb</i>		
	K	P1	KP1
K	78	11	29
Kolona %	38,05	100,00	100,00
Vrsta %	66,10	9,32	24,58
Ukupno %	31,84	4,49	11,84
S1	78	0	0
Kolona %	38,05	0,00	0,00
Vrsta %	100,00	0,00	0,00
Ukupno %	31,84	0,00	0,00
KS1	49	0	0
Kolona %	23,90	0,00	0,00
Vrsta %	100,00	0,00	0,00
Ukupno %	20,00	0,00	0,00

Kod 31,84% jedinki utvrđeno je prisustvo K haplotipa na osnovu analize obe sekvence. U 16,33% slučajeva utvrđeno je prisustvo K haplotipa na osnovu *cox1*, ali ne i na osnovu *cytb* sekvence, dok je 51,84% varoa odgovaralo K haplotipu na osnovu *cytb*, ali ne i na osnovu *cox1* sekvence. Rezultati χ^2 -testa sa Yates-ovom korekcijom ($\chi^2 = 67,19$; $p < 0,001$) ukazuju da pojavljivanje haplotipa K statistički vrlo značajno zavisi od analizirane sekvence (Tabela 9).

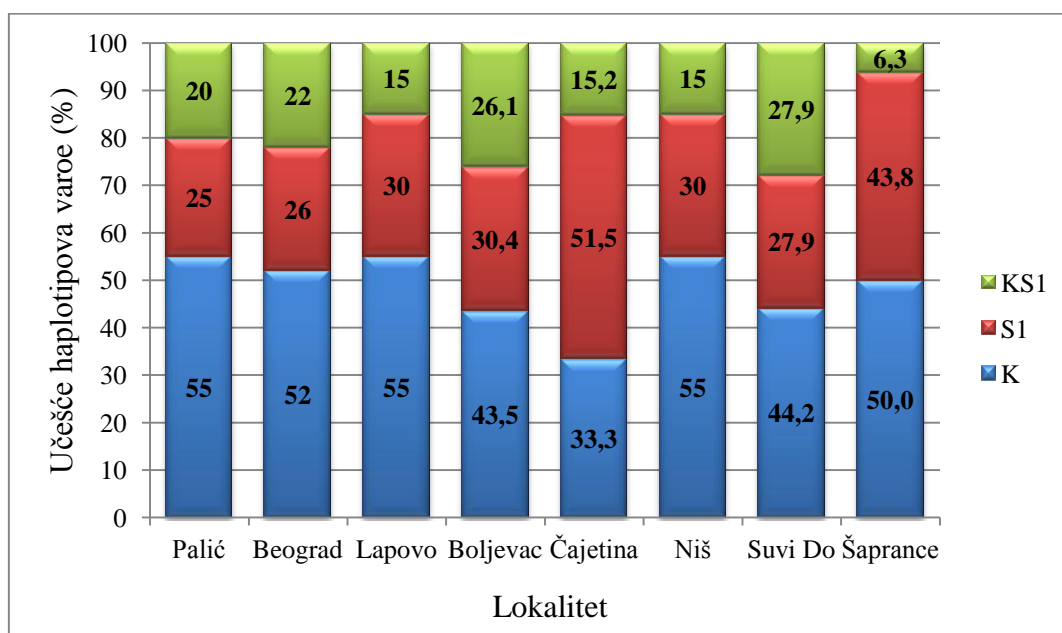
Tabela 9. Prisustvo K haplotipa *V. destructor* na osnovu analize *cox1* i *cytb* sekvenci

<i>cox1</i>		<i>cytb</i>		Ukupno
		Da	Ne	
Da	Broj	78	40	118
	% od totala	31,84	16,33	48,16
Ne	Broj	127	0	127
	% od totala	51,84	0,00	51,84
Ukupno	Broj	205	40	245
	% od totala	83,67	16,33	100,00

5.4. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom odvojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

5.4.1. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih na posmatranim lokalitetima analizom *cox1* sekvence

Analizom *cox1* sekvence, utvrđeno je prisustvo K i S1 haplotipova varoe, kao i KS1 jedinki na svim lokalitetima (Grafikon 8). Haplotip K detektovan je kod 33,3-55,0% varoa i bio je dominantan na svim lokalitetima osim na lokalitetu Čajetina, gde je najzastupljeniji bio haplotip S1 (u 51,5% slučajeva). Najmanje zastupljene bile su KS1 jedinke, čije se učešće kretalo od 6,3% na lokalitetu Šaprance do 27,9% na lokalitetu Suvi Do (Grafikon 8).



Grafikon 8. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih na posmatranim lokalitetima analizom *cox1* sekvence

Rezultati testiranja ukazuju da struktura haplotipova varoe dobijena analizom *cox1* sekvence ne zavisi od lokaliteta ($\chi^2 = 13,08$; $p = 0,520$).

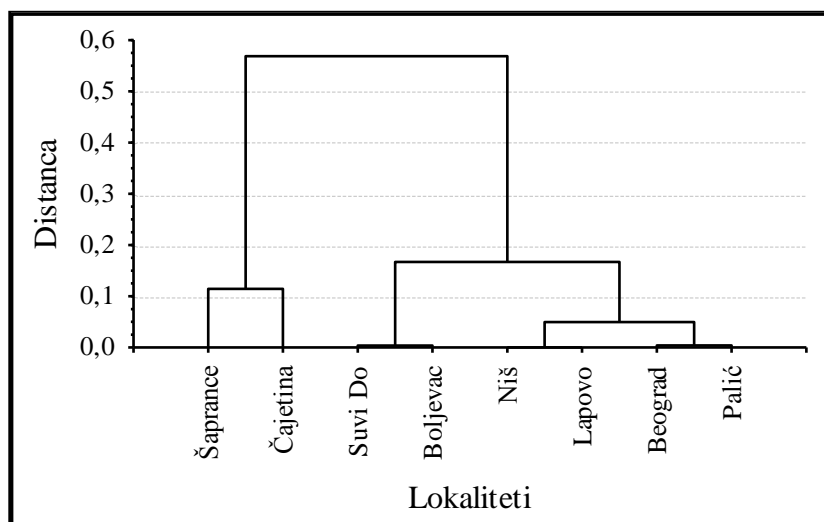
S obzirom da nisu ispunjeni uslovi za testiranje sličnosti dva lokaliteta prema prisutnim haplotipovima χ^2 -testom, primenjen je model generalne diskriminacione analize. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između lokaliteta

ukazuju da, na osnovu analize sekvence *cox1*, ne postoji statistički značajna razlika u haplotipovima kod varoa sa različitih lokaliteta (Tabela 10).

Tabela 10. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dva lokaliteta prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na osnovu analize *cox1* sekvence

Lokalitet	Beograd	Lapovo	Boljevac	Čajetina	Niš	Suvi Do	Šaprance
Palić	0,956	0,874	0,673	0,053	0,874	0,555	0,303
Beograd		0,801	0,796	0,053	0,801	0,702	0,261
Lapovo			0,628	0,224	1,000	0,483	0,634
Boljevac				0,226	0,628	0,972	0,297
Čajetina					0,224	0,075	0,542
Niš						0,483	0,634
Suvi Do							0,159

Na osnovu utvrđenih kvadratnih Mahalanobis-ovih odstojanja između dva lokaliteta i Ward-ovog metoda povezivanja, izvršeno je hijerarhijsko grupisanje lokaliteta prema sličnosti prisutnih haplotipova na osnovu sekvence *cox1*. Na dendrogramu (Grafikon 9) se jasno izdvajaju tri klastera. Prvi klaster čine lokaliteti Palić, Beograd, Lapovo i Niš. U drugi klaster su uključeni lokaliteti Boljevac i Suvi Do. Lokaliteti Čajetina i Šaprance obrazuju treći klaster. Druga grupa lokaliteta (Boljevac i Suvi Do) sličnija je lokalitetima iz prve grupe (Palić, Beograd, Lapovo i Niš).

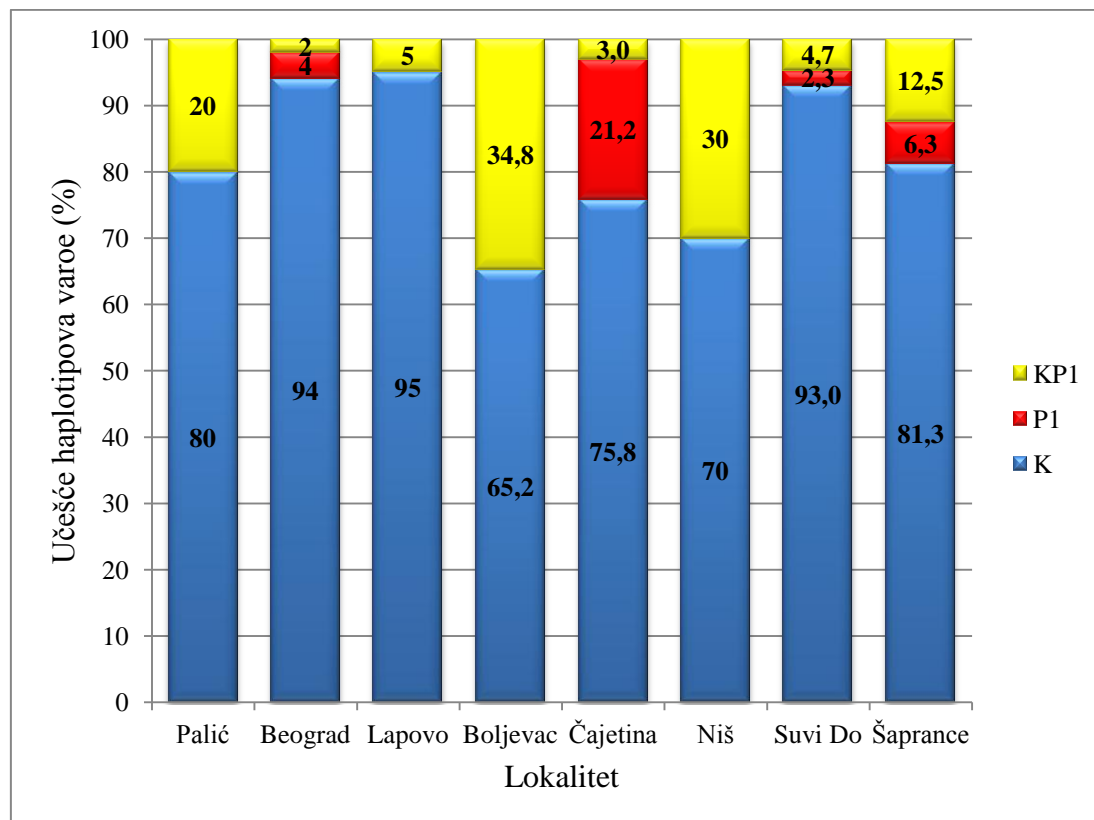


Grafikon 9. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta prema sličnosti haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence

Testiranjem kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između formiranih grupa lokaliteta, utvrđeno je da se prva i druga grupa lokaliteta statistički značajno ne razlikuju po haplotipovima varoa utvrđenih analizom sekvence *cox1* ($p=0,177$), kao i da se varoe iz treće grupe lokaliteta (Čajetina i Šaprance) vrlo značajno razlikuju od varoa iz prve ($p=0,007$) i druge ($p=0,007$) grupe lokaliteta.

5.4.2. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih na posmatranim lokalitetima analizom *cytb* sekvence

Analizom *cytb* sekvence, kod ispitivanih varoa utvrđeni su haplotipovi K, P1 i KP1 jedinke (Grafikon 10). Haplotip K utvrđen je na svim lokalitetima kod najvećeg broja jedinki, pri čemu se njegovo učešće kretalo od 65,2% (Boljevac) do 95,0% (Lapovo). Na svim lokalitetima utvrđeno je i prisustvo KP1 jedinki. Njihovo učešće variralo je od 2,0% kod varoa na lokalitetu Beograd do 34,8% kod varoa na lokalitetu Boljevac. Haplotip P1 detektovan je kod varoa na lokalitetima Beograd (4,0%), Čajetina (21,2%), Suvi Do (2,3%) i Šaprance (6,3%).



Grafikon 10. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih na posmatranim lokalitetima analizom *cytb* sekvence

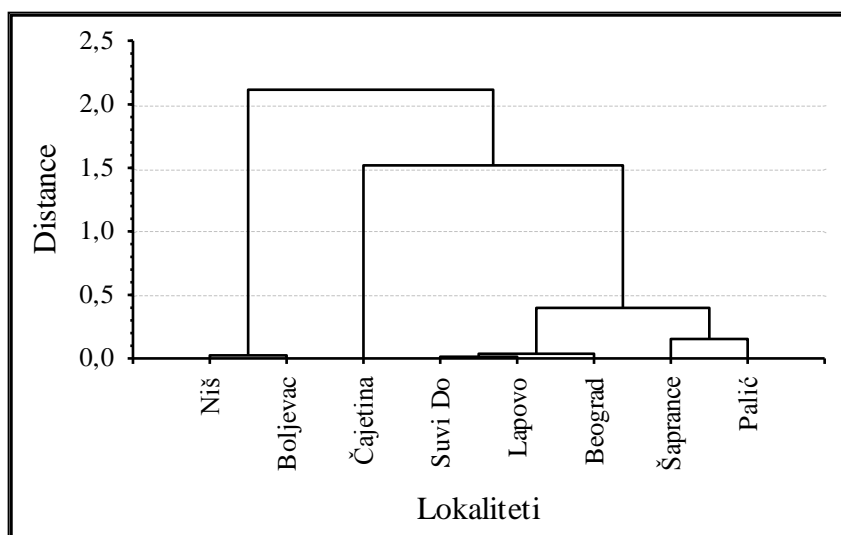
Faktor lokalitet ne utiče statistički značajno na učestalost haplotipova K, P1 i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence ($\chi^2 = 15,09$; $p = 0,372$).

Rezultati poređenja utvrđenih haplotipova varoa sa dva različita lokaliteta ukazuju da se struktura haplotipova na lokalitetu Beograd vrlo značajno razlikovala od struktura haplotipova varoe na lokalitetima Boljevac, Čajetina i Niš, a značajno od strukture karakteristične za Palić (Tabela 11). Struktura haplotipova varoe sa lokaliteta Čajetina značajno se razlikovala od strukture na lokalitetu Šaprance, a vrlo značajno u poređenju sa strukturom haplotipova sa ostalih lokaliteta. Odnos haplotipova utvrđen u Boljevcu vrlo značajno se razlikovao od njihove strukture u Lapovu i Suvom Dolu, dok je razlika između lokaliteta Niš i Suvi Do bila značajna.

Tabela 11. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dva lokaliteta prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na osnovu analize *cytb* sekvence

Lokalitet	Beograd	Lapovo	Boljevac	Čajetina	Niš	Suvi Do	Šaprance
Palić	0,017	0,207	0,188	<0,001	0,496	0,070	0,417
Beograd		0,706	<0,001	0,001	0,003	0,850	0,452
Lapovo			0,007	0,001	0,039	0,911	0,487
Boljevac				<0,001	0,879	0,001	0,058
Čajetina					<0,001	<0,001	0,032
Niš						0,0101	0,163
Suvi Do							0,537

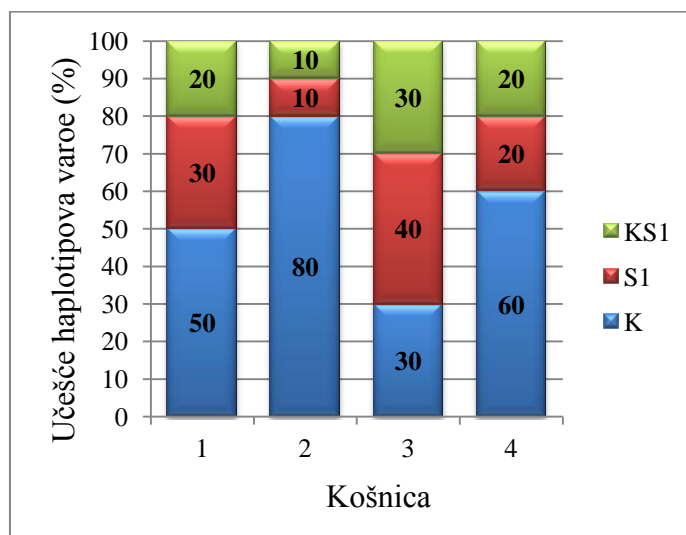
Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta prema sličnosti haplotipova varoe utvrđenih analizom sekvence *cytb*, izvršeno je na bazi utvrđenih kvadratnih Mahalanobis-ovih odstojanja između lokaliteta i Ward-ovog metoda povezivanja. Posmatrani lokaliteti su raspoređeni u četiri jasno odvojena klastera (Grafikon 11). Prvi klaster čine lokaliteti Suvi Do, Lapovo i Beograd. Druga grupa lokaliteta koju čine Šaprance i Palić slična je prvoj grupi i sa njom se udružuje na sledećem nivou. U trećoj grupi je samo Čajetina, a u četvrtoj Niš i Boljevac.



Grafikon 11. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta prema sličnosti haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence

5.4.3. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih u košnicama sa posmatranih lokaliteta analizom *coxI* sekvence

U svim analiziranim košnicama na lokalitetu Palić utvrđeni su haplotipovi K, S1 i jedinke sa heteroplazmijom. Učešće K haplotipa u košnicama kretalo se od 30% do 80%, S1 haplotipa od 10% do 40%, a KS1 jedinki od 10 do 30% (Grafikon 12).



Grafikon 12. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Palić analizom *coxI* sekvence

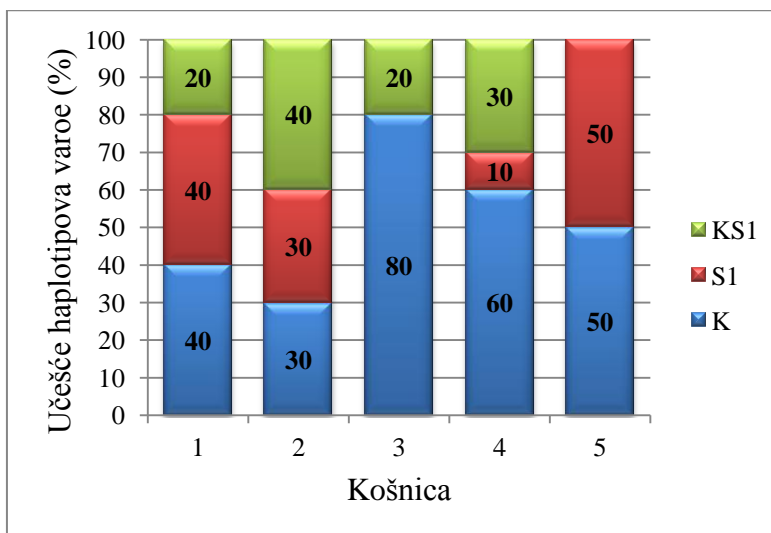
Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, između košnica sa lokaliteta Palić nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji haplotipova varoe (Tabela 12).

Tabela 12. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Palić, na osnovu analize *coxI* sekvence

Košnica	2	3	4
1	0,400	0,668	0,868
2		0,092	0,668
3			0,400

Na lokalitetu Beograd, K haplotip detektovan je u svih pet košnica, dok su haplotip S1 i KS1 jedinke bili prisutni u po četiri košnice (Grafikon 13). Učešće K

haplotipa po košnici kretalo se od 30% do 80%, S1 haplotipa 10% do 50% i KS1 jedinki od 20% do 40%.



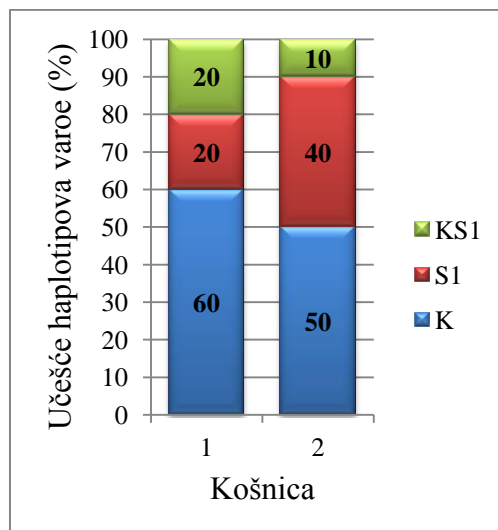
Grafikon 13. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Beograd analizom *cox1* sekvence

Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, između košnica sa lokaliteta Beograd nije utvrđena statistički značajna razlika u distribuciji haplotipova varoe (Tabela 13).

Tabela 13. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Beograd, na osnovu analize *cox1* sekvence

Košnica	2	3	4	5
1	0,555	0,099	0,295	0,295
2		0,090	0,395	0,395
3			0,673	0,673
4				0,075

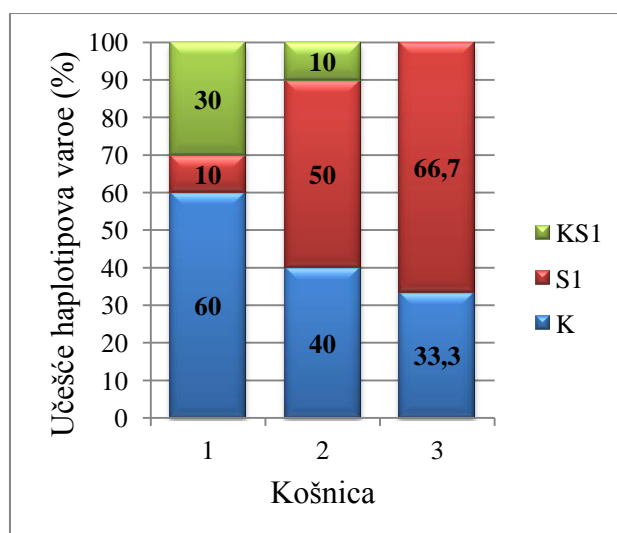
U obe posmatrane košnice na lokalitetu Lapovo uočeni su haplotipovi K, S1 i jedinke sa heteroplazmijom (Grafikon 14).



Grafikon 14. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Lapovo analizom *cox1* sekvence

Nivo značajnosti utvrđene kvadratne Mahalanobis-ove distance haplotipova varoa u košnicama na lokalitetu Lapovo ($p=0,621$), ukazuje da se košnice nisu statistički značajno razlikovale po prisutnim haplotipovima varoe.

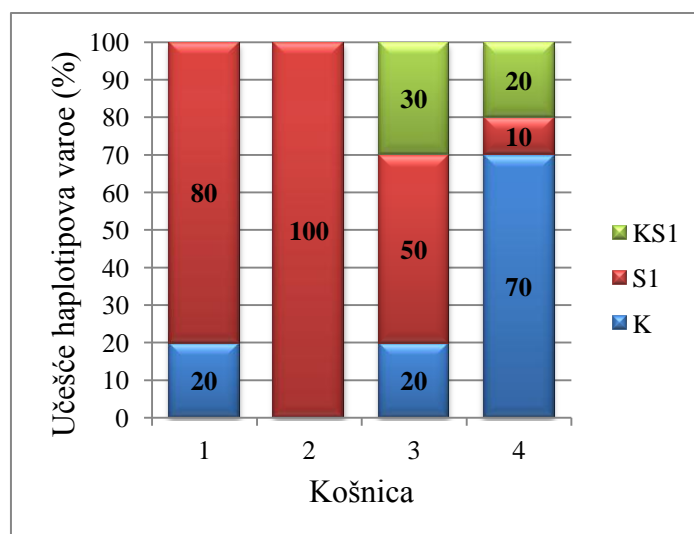
Na lokalitetu Boljevac, u svim košnicama detektovani su haplotipovi K i S1, dok su KS1 jedinke utvrđene u dve košnice (Grafikon 15). Zastupljenost K haplotipa na ovom lokalitetu kretala se od 33,3% do 60%, S1 od 10% do 66,7%, a jedinki sa heteroplazmijom od 10% do 30%.



Grafikon 15. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Boljevac analizom *cox1* sekvence

Na osnovu utvrđenih nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, zastupljenost haplotipova varoe nije se statistički značajno razlikovala u posmatranim košnicama na lokalitetu Boljevac ($p > 0,05$).

Na lokalitetu Čajetina, u svim košnicama detektovan je samo S1 haplotip, dok su K haplotip i KS1 jedinke utvrđeni u tri, odnosno dve košnice. Učešće K haplotipa kretalo se od 20% do 70%, S1 od 10% do 100%, a KS1 jedinki od 20% do 30% (Grafikon 16).



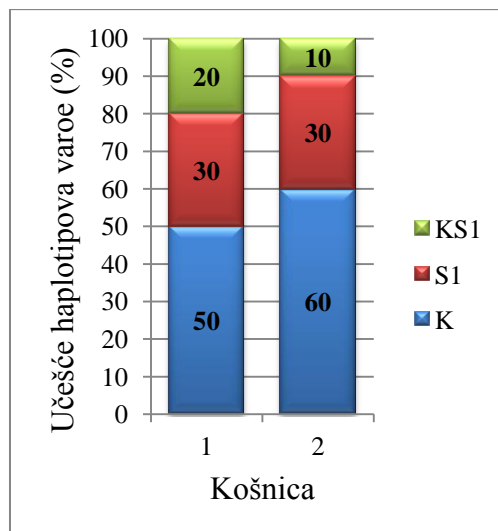
Grafikon 16. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Čajetina analizom *coxI* sekvence

Na osnovu utvrđenih nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, košnica broj 4 na lokalitetu Čajetina se po zastupljenosti haplotipova varoe statistički vrlo značajno razlikovala od košnice broj 1, a značajno od košnica broj 2 i 3 (Tabela 14).

Tabela 14. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Čajetina, na osnovu analize *coxI* sekvence

Košnica	2	3	4
1	0,739	0,137	0,004
2		0,185	0,011
3			0,044

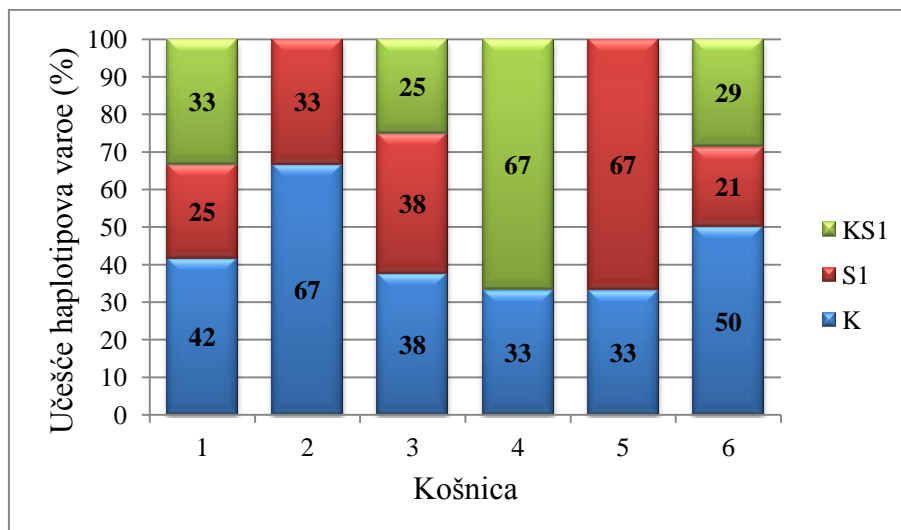
Na lokalitetu Niš, u obe posmatrane košnice bili su prisutni haplotipovi K, S1 i KS1 jedinke (Grafikon 17). Haplotip K bio je dominantan u obe košnice, dok su najmanje zastupljene bile jedinke sa heteroplazmijom.



Grafikon 17. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Niš analizom *coxI* sekvence

Nivo značajnosti utvrđene distance haplotipova varoa u košnicama na lokalitetu Niš ($p=0,833$) ukazuje da se posmatrane košnice nisu statistički značajno razlikovale na osnovu strukture haplotipova varoe.

Na lokalitetu Suvi Do, prisustvo K haplotipa utvrđeno je u svim posmatranim košnicama, dok su haplotip S1 i KS1 jedinke bili prisutni u pet, odnosno četiri košnice (Grafikon 18).



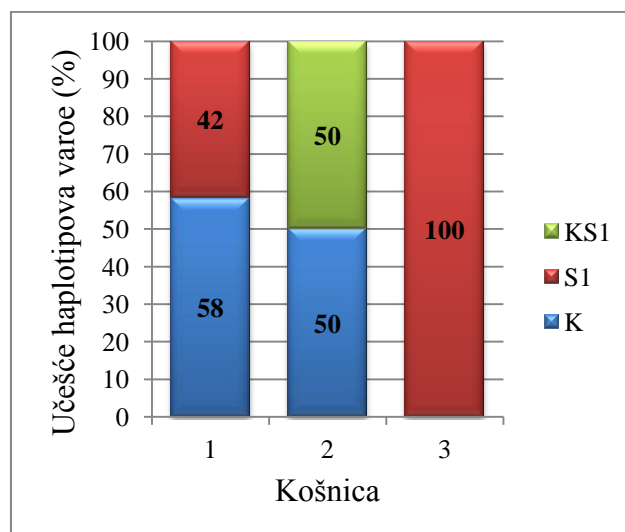
Grafikon 18. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Suvi Do analizom *coxI* sekvence

Utvrđeni nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između košnica na lokalitetu Suvi Do pokazuju da se zastupljenost haplotipova varoe između košnica nije statistički značajno razlikovala (Tabela 15).

Tabela 15. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Suvi Do, na osnovu analize *coxI* sekvence

Košnica	2	3	4	5	6
1	0,539	0,824	0,484	0,313	0,924
2		0,667	0,215	0,652	0,626
3			0,314	0,575	0,737
4				0,113	0,421
5					0,290

Na lokalitetu Šaprance, varoe K i S1 haplotipa pronađene su u po dve košnice, dok su KS1 jedinke utvrđene u samo jednoj košnici (Grafikon 19).

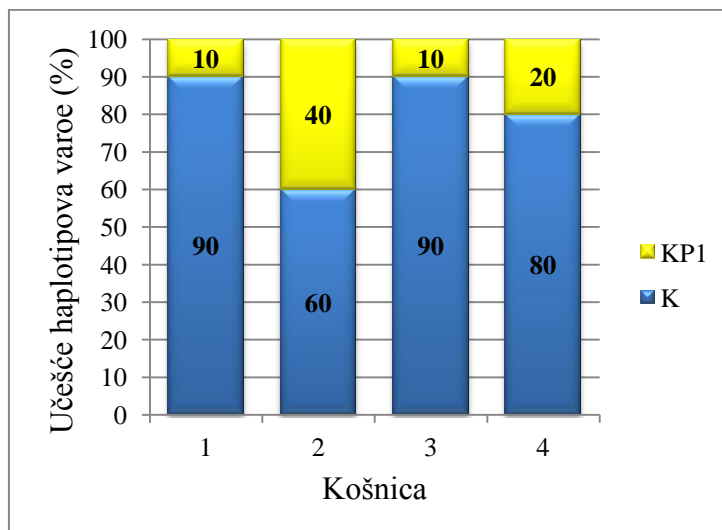


Grafikon 19. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Šaprance analizom *coxI* sekvence

Na osnovu kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, utvrđene su statistički značajne razlike u zastupljenosti haplotipova varoe između košnica 1 i 2 ($p=0,018$), odnosno košnica 2 i 3 ($p=0,026$).

5.4.4. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih u košnicama sa posmatranih lokaliteta analizom *cytb* sekvence

Na lokalitetu Palić, u svim posmatranim košnicama pronađeni su haplotip K i jedinke sa heteroplazmijom. Zastupljenost K haplotipa kretala se od 60% do 90%, dok je učešće KP1 jedinki variralo od 10% do 40% (Grafikon 20).



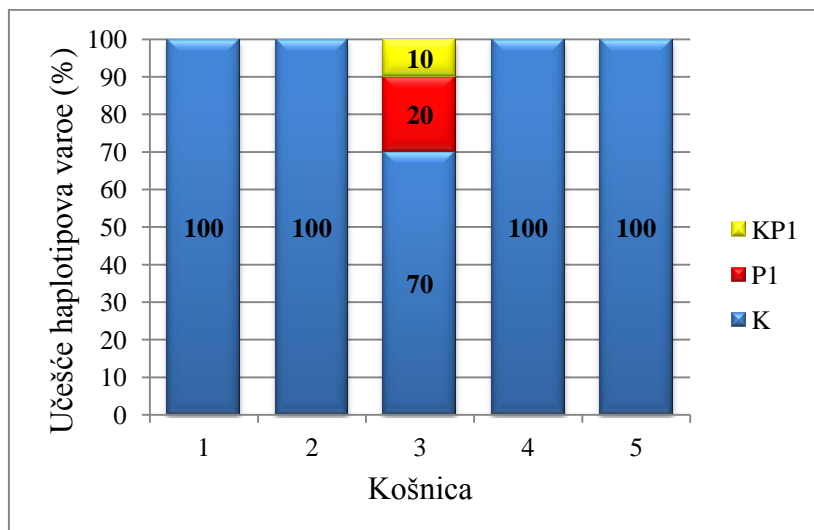
Grafikon 20. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Palić analizom *cytb* sekvence

Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, između posmatranih košnica na lokalitetu Palić nisu ustanovljene statistički značajne razlike u zastupljenosti haplotipova varoe (Tabela 16).

Tabela 16. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Palić, na osnovu analize *cytb* sekvence

Košnica	2	3	4
1	0,103	1,000	0,581
2		0,103	0,273
3			0,581

Na lokalitetu Beograd, K haplotip varoe bio je prisutan u svim posmatranim košnicama, dok su haplotip P1 i KP1 jedinke utvrđeni u jednoj košnici (Grafikon 21).



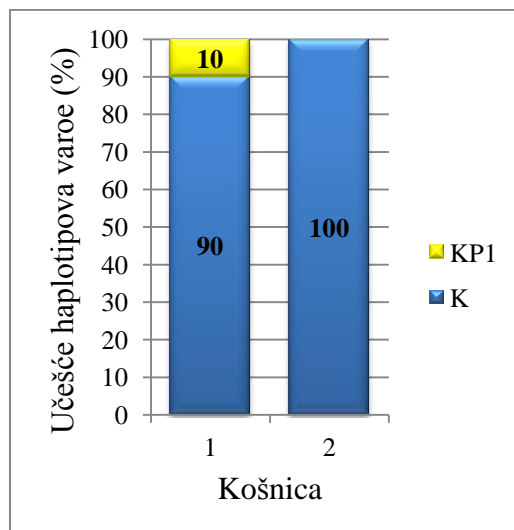
Grafikon 21. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Beograd analizom *cytb* sekvence

Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, na lokalitetu Beograd utvrđena je statistički značajna razlika samo u prisutnim haplotipovima varoe između košnice broj 3 i svih ostalih košnica (Tabela 17).

Tabela 17. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema pronađenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Beograd, na osnovu analize *cytb* sekvence

Košnica	2	3	4	5
1	1,000	0,014	1,000	1,000
2		0,014	1,000	1,000
3			0,014	0,014
4				1,000

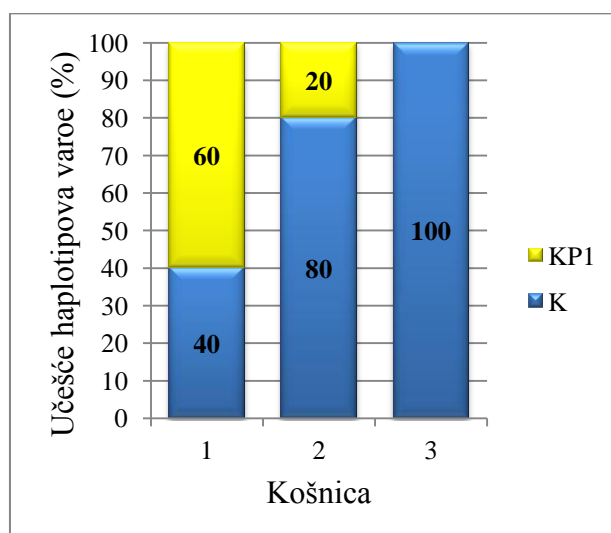
U obe posmatrane košnice na lokalitetu Lapovo bile su prisutne varoe K haplotipa, dok su KP1 jedinke pronađene u jednoj košnici (Grafikon 22).



Grafikon 22. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Lapovo analizom *cytb* sekvence

Nivo značajnosti utvrđene distance haplotipova varoa u košnicama na lokalitetu Lapovo ($p=0,331$), ukazuje da se košnice nisu statistički značajno razlikovale na osnovu prisutnih haplotipova varoe.

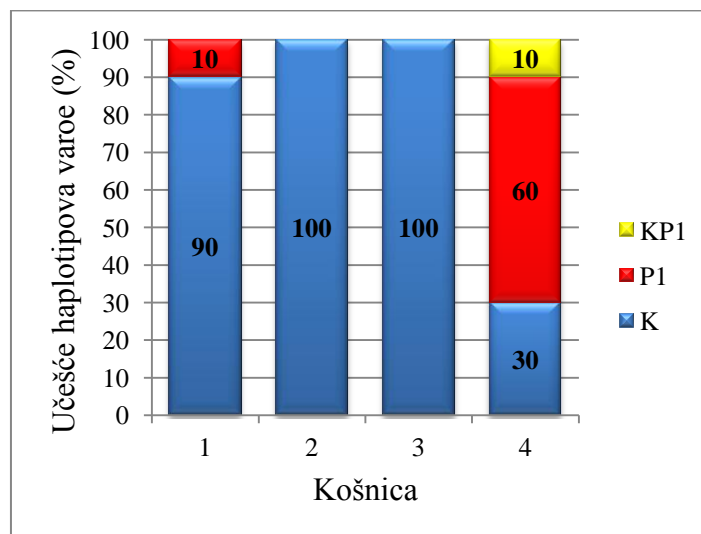
Na lokalitetu Boljevac, u sve tri košnice bio je prisutan K haplotip, dok su u dve košnice ustanovljene i KP1 jedinke (Grafikon 23).



Grafikon 23. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Boljevac analizom *cytb* sekvence

Nivoi značajnosti utvrđene distance haplotipova varoa na lokalitetu Boljevac između košnica 1 i 2 ($p=0,059$), 1 i 3 ($p=0,055$) i 2 i 3 ($p=0,505$), ukazuju da se posmatrane košnice nisu statistički značajno razlikovale po prisutnim haplotipovima varoe.

Na lokalitetu Čajetina, K haplotip varoe utvrđen je u svim posmatranim košnicama, P1 haplotip u dve, a KP1 jedinke samo u jednoj košnici (Grafikon 24).



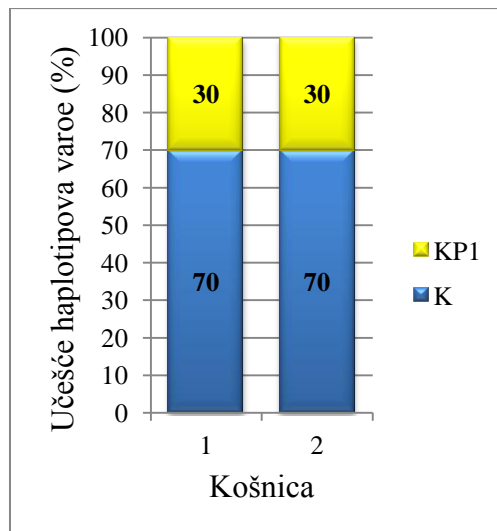
Grafikon 24. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Čajetina analizom *cytb* sekvence

Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, na lokalitetu Čajetina je utvrđeno da se po prisutnim haplotipovima varoe statistički vrlo značajno razlikovala košnica broj 4 od košnica 1 i 3, dok su se košnice 4 i 2 razlikovale statistički značajno (Tabela 18).

Tabela 18. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Čajetina, na osnovu analize *cytb* sekvence

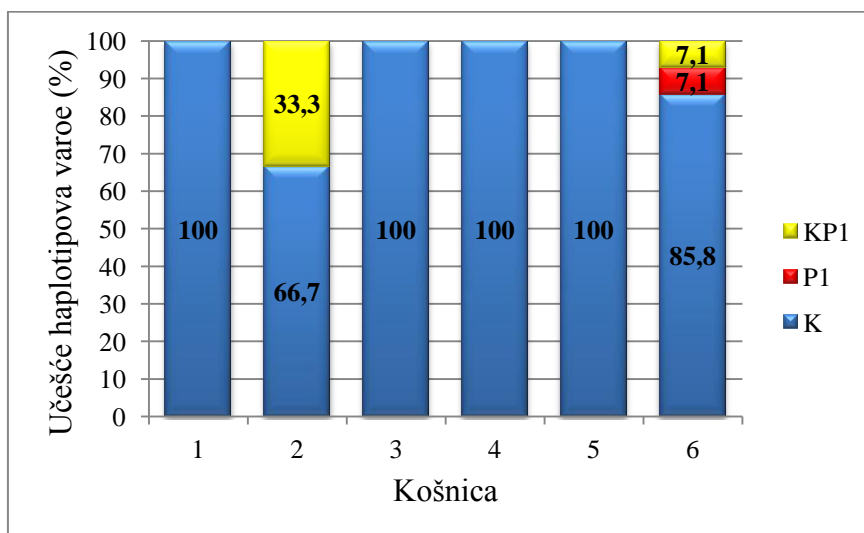
Košnica	2	3	4
1	0,895	0,787	0,001
2		1,000	0,011
3			<0,001

Na lokalitetu Niš, u dve analizirane košnice utvrđeni su haplotip K i KP1 jedinke varoe u istom procentu (Grafikon 25).



Grafikon 25. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Niš analizom *cytb* sekvence

Na lokalitetu Suvi Do, učešće K haplotipa varoe, koji je bio dominantan u svim posmatranim košnicama, kretalo se od 66,7% do 100% (Grafikon 26). Haplotip P1 bio je prisutan u jednoj košnici, dok su jedinke sa heteroplazmijom utvrđene u dve košnice.



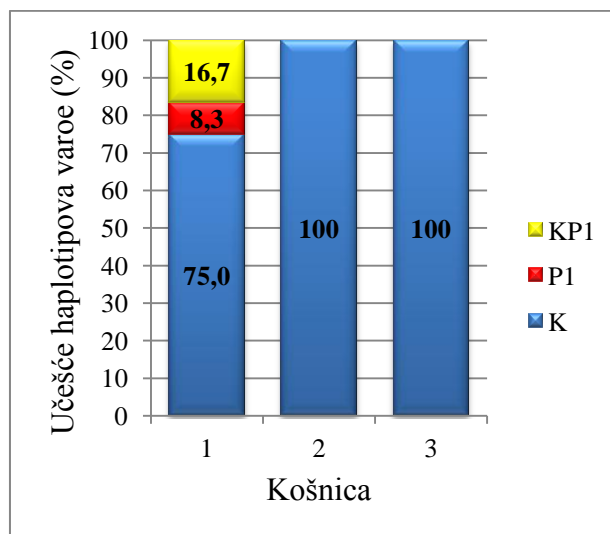
Grafikon 26. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Suvi Do analizom *cytb* sekvence

Nivoi značajnosti utvrđene distance haplotipova varoa na lokalitetu Suvi Do ukazuju da se posmatrane košnice nisu statistički značajno razlikovale na osnovu prisutnih haplotipova (Tabela 19).

Tabela 19. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Suvi Do, na osnovu analize *cytb* sekvence

Košnica	2	3	4	5	6
1	0,061	1,000	1,000	1,000	0,353
2		0,078	0,166	0,166	0,139
3			1,000	1,000	0,438
4				1,000	0,667
5					0,667

Na lokalitetu Šaprance, u svim košnicama bio je prisutan K haplotip, dok su P1 haplotip i KP1 jedinke utvrđeni samo u jednoj košnici (Grafikon 27).

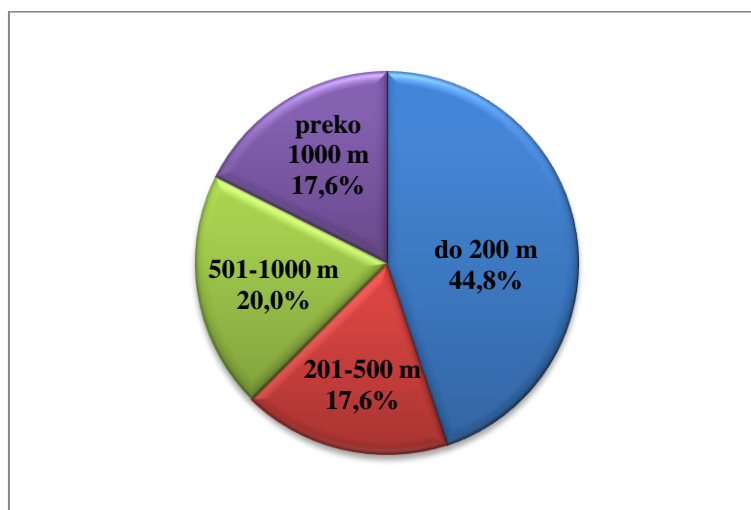


Grafikon 27. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Šaprance analizom *cytb* sekvence

Na osnovu nivoa značajnosti utvrđene distance haplotipova varoa, između košnica 1 i 2 ($p=0,756$), 1 i 3 ($p=0,756$) i 2 i 3 ($p=1,000$) sa lokaliteta Šaprance, nije postojala statistički značajna razlika u zastupljenosti haplotipova varoa.

5.4.5. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* u zavisnosti od nadmorske visine posmatranih lokaliteta

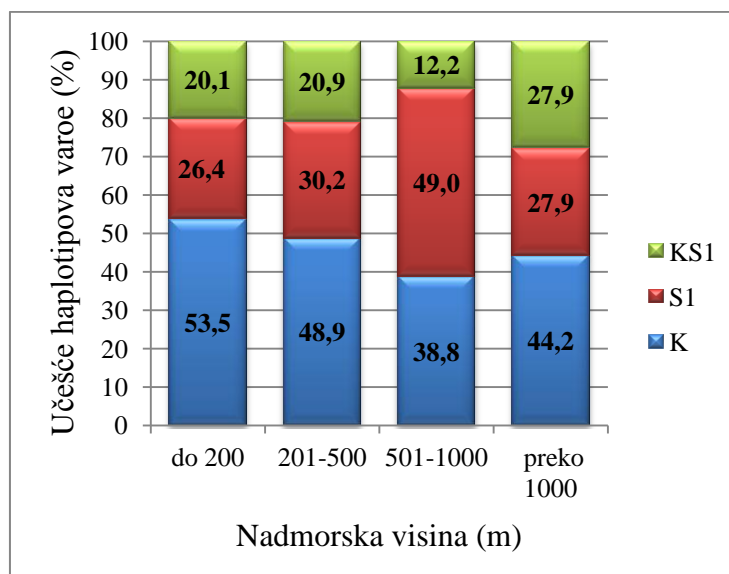
Među analiziranim varoama, najviše jedinki poticalo je sa nadmorske visine do 200 m (44,8%), zatim sa nadmorske visine 501-1000 m (20,0%) i po 17,6% sa lokaliteta na visini 201-500 m i preko 1000 m (Grafikon 28).



Grafikon 28. Struktura analiziranih uzoraka varoe prema nadmorskoj visini

*5.4.5.1. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *coxI* sekvence*

Analizom sekvence *coxI*, na svim kategorijama nadmorske visine utvrđeni su K i S1 haplotipovi, odnosno jedinke sa heteroplazmijom (Grafikon 29). Haplotip S1 bio je zastupljeniji od haplotipa K samo kod varoa sa nadmorske visine 501-1000 m, dok je na svim ostalim kategorijama nadmorske visine dominantan bio K haplotip. Rezultati χ^2 -testa ($\chi^2=10,364$; $p=0,110$) ukazuju da se, na osnovu analize *coxI* sekvence, raspored haplotipova varoe na različitim nadmorskim visinama nije statistički značajno razlikovao.



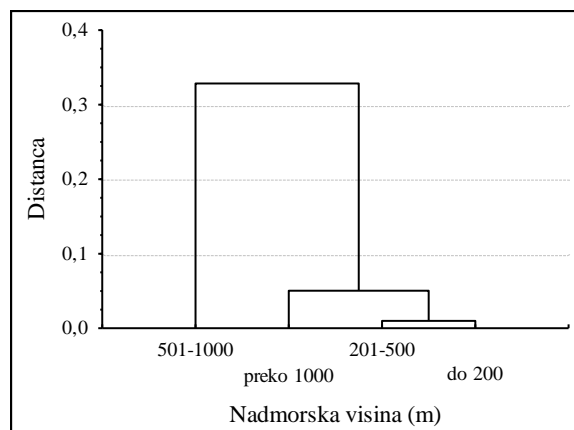
Grafikon 29. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *coxI* sekvence na različitim kategorijama nadmorske visine

Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja ukazuju da se struktura haplotipova varoa na nadmorskoj visini 501-1000 m značajno razlikovala od strukture na nadmorskoj visini do 200 m ($p=0,018$) i preko 1000 m ($p=0,046$) (Tabela 20).

Tabela 20. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve kategorije nadmorske visine prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom, na osnovu analize *coxI* sekvence

Nadmorska visina (m)	201-500	501-1000	Preko 1000
Do 200	0,858	0,018	0,464
201-500		0,142	0,722
501-1000			0,046

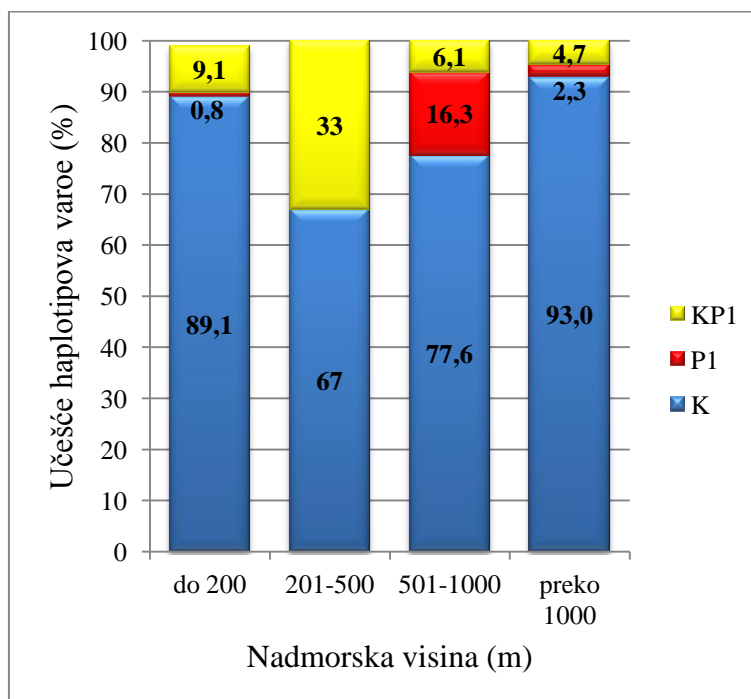
Kao što se vidi sa dendrograma i iz nivoa značajnosti odstojanja, struktura detektovanih haplotipova varoe sa nadmorske visine do 500 m bila je jako slična (Grafikon 30). Njima je bila slična i struktura varoa sa nadmorske visine preko 1000 m, dok se u odnosu na njih razlikovala struktura haplotipova sa nadmorske visine 501-1000 m.



Grafikon 30. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa različitih nadmorskih visina prema sličnosti haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence

5.4.5.2. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cytb* sekvence

Analizom sekvence *cytb*, na svim kategorijama nadmorske visine pronađene su varoe K haplotipa i KP1 jedinke, dok varoe P1 haplotipa nisu utvrđene jedino na lokalitetima 201-500 m nadmorske visine (Grafikon 31).



Grafikon 31. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na različitim kategorijama nadmorske visine

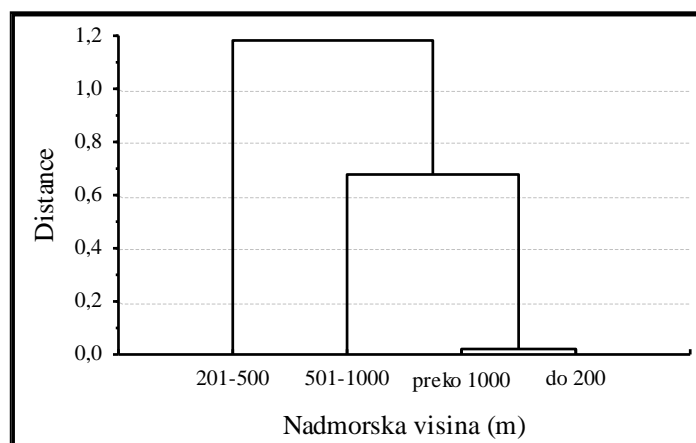
Rezultati testiranja ukazuju da je raspored haplotipova varoe utvrđenih na osnovu *cytb* sekvence statistički vrlo značajno zavisio od nadmorske visine ($\chi^2=41,354$; $p<0,001$).

Testiranjem značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja došlo se do zaključka da se statistički značajno nisu razlikovale jedino raspodele haplotipova varoa sa nadmorske visine do 200 m i preko 1000 m (Tabela 21).

Tabela 21. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve kategorije nadmorske visine prema pronađenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom, na osnovu analize *cytb* sekvence

Nadmorska visina (m)	201-500	501-1000	Preko 1000
Do 200	<0,001	<0,001	0,727
201-500		<0,001	<0,001
501-1000			0,004

Hijerarhijska klaster analiza zasnovana na kvadratnom Mahalanobis-ovom odstojanju i Ward-ovom povezivanju potvrdila je da su najbližnje strukture haplotipova varoe imali lokaliteti sa nadmorske visine do 200 m i preko 1000 m, a da je struktura na nadmorskoj visini 501-1000 m bila sličnija ovim raspodelama, nego strukturi na lokalitetima 201-500 m nadmorske visine (Grafikon 32).



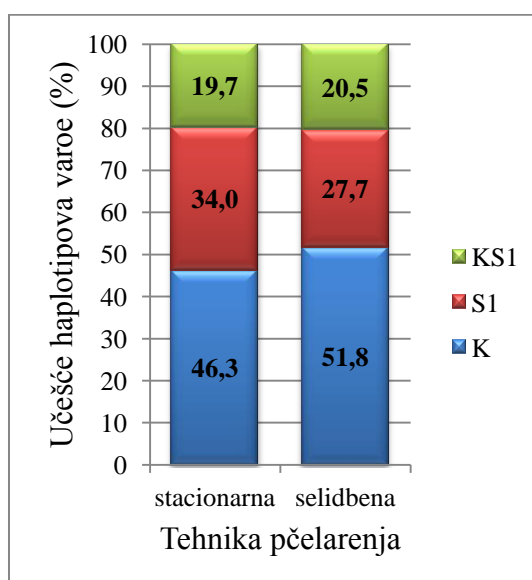
Grafikon 32. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa različitih nadmorskih visina prema sličnosti haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence

5.4.6. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* u zavisnosti od tehnike pčelarenja

Među analiziranim varoama, 33,9% jedinki poticalo je iz košnica koje su seljene, dok je 66,1% uzoraka bilo poreklom iz košnica koje nisu seljene.

5.4.6.1. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cox1* sekvence

Analizom sekvence *cox1* utvrđeno je prisustvo haplotipova K, S1 i KS1 jedinki u košnicama sa obe primenjene tehnike pčelarenja (Grafikon 33). Pri tome, raspored haplotipova nije zavisio od tehnike pčelarenja ($\chi^2=1,032$; $p=0,597$).

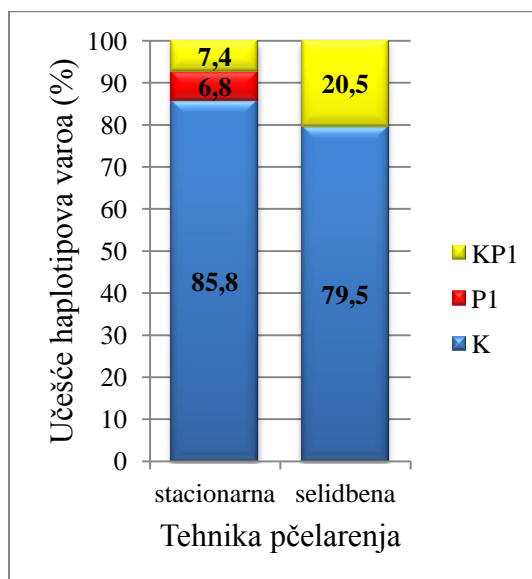


Grafikon 33. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence u zavisnosti od tehnike pčelarenja

5.4.6.2. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cytb* sekvence

Analizom sekvence *cytb* utvrđeno je prisustvo haplotipova K, P1 i KP1 jedinki u košnicama koje nisu seljene i haplotipa K, odnosno KP1 jedinki u košnicama koje su seljene (Grafikon 34). Učešće K haplotipa u posmatrane dve grupe varoa nije se statistički značajno razlikovalo ($\chi^2=1,160$; $p=0,282$). Međutim, preostale varoe iz prve grupe pripadale su P1 haplotipu ili KP1 jedinkama, a iz druge samo jedinkama sa

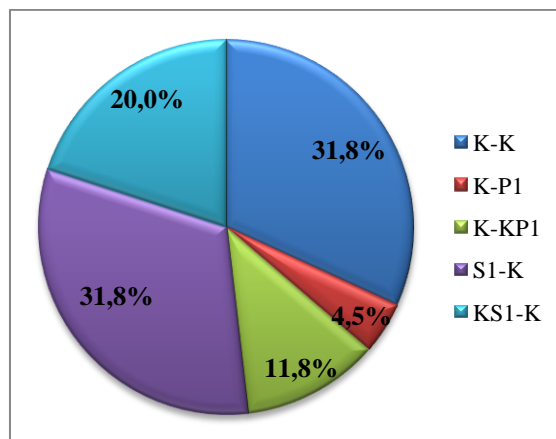
heteroplazmijom. S obzirom na to, statističkim testiranjem je utvrđeno da je raspored haplotipova zavisio od tehnike pčelarenja ($\chi^2=13,821$; $p=0,001$).



Grafikon 34. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence u zavisnosti od tehnike pčelarenja

5.5. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

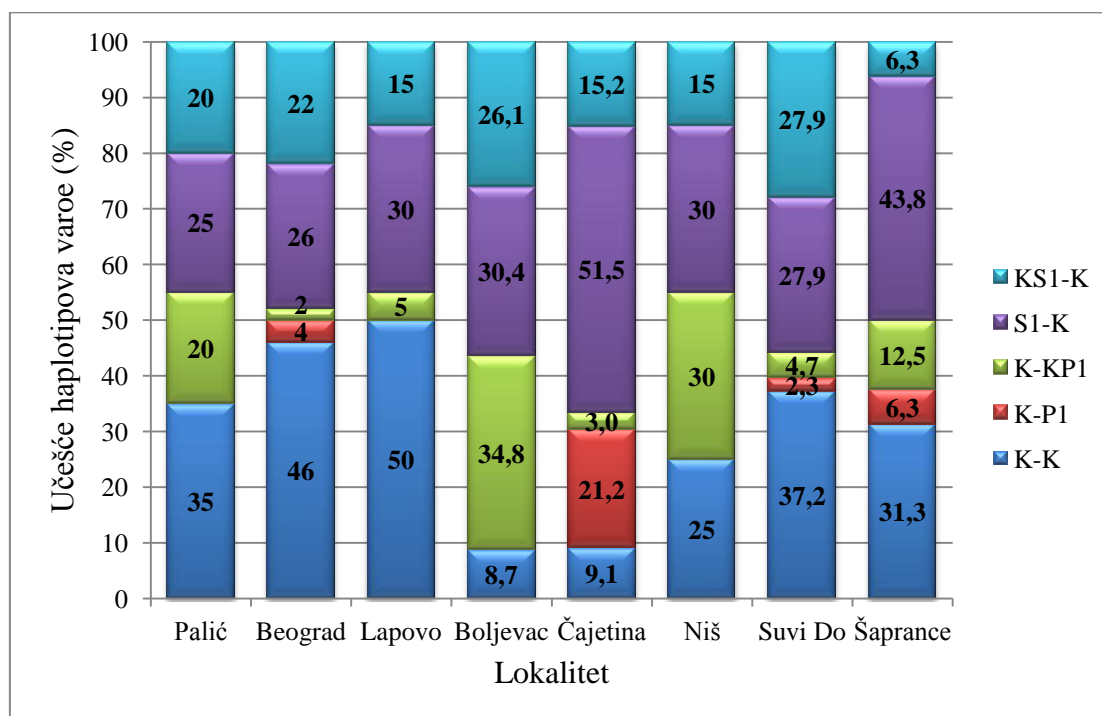
Tipizacijom varoa na osnovu analize spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci, definisani su haplotipovi K-K, K-P1, S1-K, odnosno K-KP1 i KS1-K jedinice (Grafikon 35). Najzastupljeniji haplotipovi bili su K-K i S1-K, dok je najmanje učešće imao haplotip K-P1.



Grafikon 35. Struktura haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

5.5.1. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* na posmatranim lokalitetima

Analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci, na lokalitetima Beograd, Čajetina, Suvi Do i Šaprance utvrđena su sva tri definisana haplotipa varoe i jedinke sa heteroplazmijom, dok na preostala četiri lokaliteta (Palić, Lapovo, Boljevac i Niš) nije bio prisutan haplotip K-P1 (Grafikon 36).



Grafikon 36. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih na posmatranim lokalitetima analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

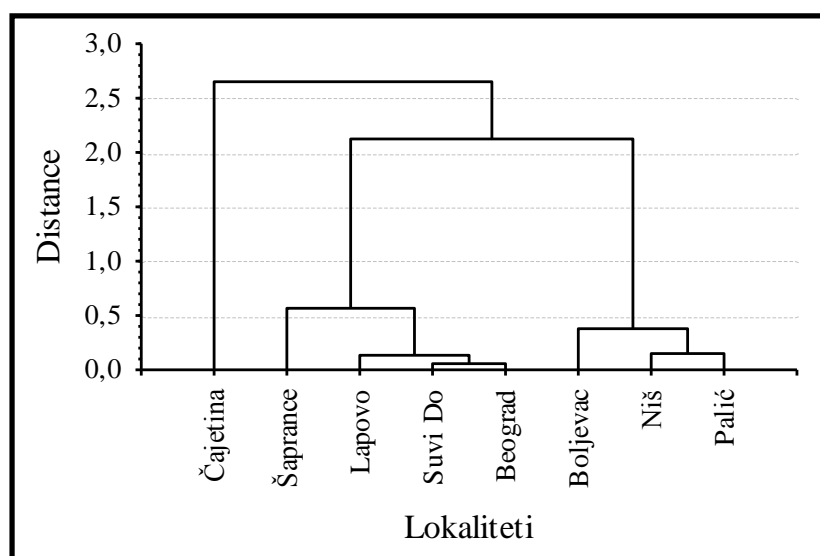
Rezultati testiranja ukazuju da su na osnovu analize spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci postojale statistički vrlo značajne razlike u strukturi haplotipova varoe na ispitivanim lokalitetima posmatranim istovremeno ($\chi^2 = 78,392$; $p < 0,001$).

Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja pokazuju da je postojala statistički vrlo značajna razlika u zastupljenosti haplotipova definisanih na osnovu spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci između lokaliteta Čajetina i lokaliteta Palić, Beograd, Lapovo, Boljevac, Niš i Suvi Do, odnosno između lokaliteta Beograd i lokaliteta Boljevac i Niš, kao i između lokaliteta Lapovo i Boljevac. Statistički značajna razlika u prisutnim haplotipovima utvrđena je između lokaliteta Suvi Do i lokaliteta Boljevac i Niš (Tabela 22).

Tabela 22. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dva lokaliteta prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na osnovu analize spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Lokalitet	Beograd	Lapovo	Boljevac	Čajetina	Niš	Suvi Do	Šaprance
Palić	0,073	0,397	0,151	< 0,001	0,741	0,237	0,367
Beograd		0,886	< 0,001	< 0,001	0,010	0,860	0,285
Lapovo			0,004	< 0,001	0,097	0,732	0,503
Boljevac				< 0,001	0,771	0,002	0,054
Čajetina					< 0,001	< 0,001	0,053
Niš						0,040	0,339
Suvi Do							0,299

Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta prema sličnosti haplotipova varoe utvrđenih analizom spojenih sekvenci *cox1* i *cytb* izvršeno je na bazi izračunatih kvadratnih Mahalanobis-ovih odstojanja između lokaliteta i Ward-ovog metoda povezivanja. Posmatrani lokaliteti su raspoređeni u tri jasno odvojene grupe (Grafikon 37). Prvu grupu čine lokaliteti Palić, Niš i Boljevac. U drugoj grupi nalaze se Beograd, Suvi Do, Lapovo i Šaprance, dok je u trećoj grupi samo Čajetina.

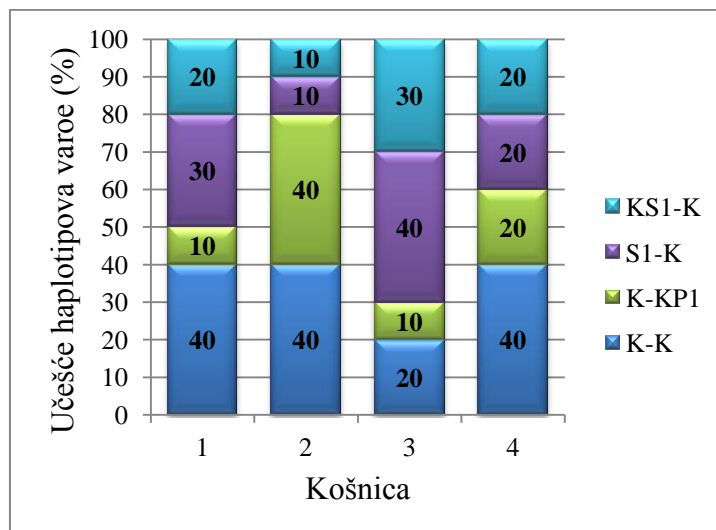


Grafikon 37. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta prema sličnosti haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Testiranjem kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, utvrđeno je da se na osnovu haplotipova varoe utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci vrlo značajno razlikuju prva i druga ($p < 0,001$), prva i treća ($p < 0,001$), kao i druga i treća grupa lokaliteta ($p < 0,001$).

5.5.2. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* u košnicama sa posmatranih lokaliteta

U svim košnicama na lokalitetu Palić utvrđeni su haplotipovi K-K i S1-K zajedno sa KS1-K i K-KP1 jedinkama (Grafikon 38). Haplotip K-K bio je dominantan u dve košnice, u jednoj je bio podjednako zastupljen kao i K-KP1 jedinke, dok je u jednoj bio dominantan haplotip S1-K.



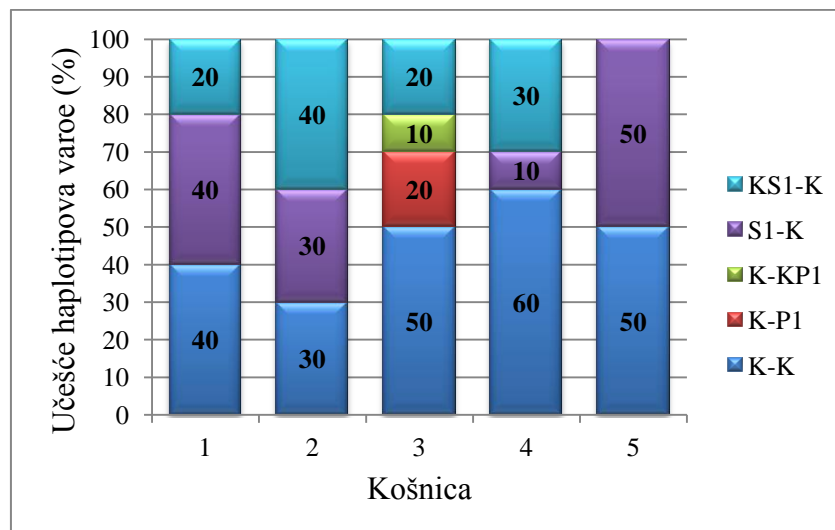
Grafikon 38. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Palić analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Na osnovu utvrđenih nivoa značajnosti, posmatrane košnice na lokalitetu Palić nisu se statistički značajno razlikovale po zastupljenosti prisutnih haplotipova varoe (Tabela 23).

Tabela 23. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Palić, na osnovu analize spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Košnica	2	3	4
1	0,368	0,815	0,932
2		0,152	0,701
3			0,613

U svim košnicama na lokalitetu Beograd pronađen je haplotip K-K, u po četiri košnice haplotipovi S1-K i KS1-K jedinke, dok su u jednoj košnici bili prisutni haplotip K-P1 i K-KP1 jedinke (Grafikon 39).



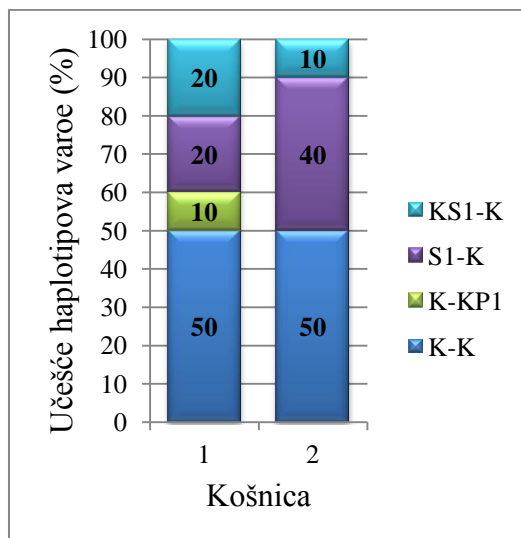
Grafikon 39. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Beograd analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, utvrđeno je da su se, na osnovu prisutnih haplotipova varoe, statistički vrlo značajno razlikovale košnice broj 3 i 5, dok su statistički značajne razlike postojale između košnice broj 3 i košnica 1 i 2 (Tabela 24).

Tabela 24. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Beograd, na osnovu analize spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Košnica	2	3	4	5
1	0,883	0,019	0,665	0,883
2		0,023	0,766	0,342
3			0,071	0,007
4				0,278

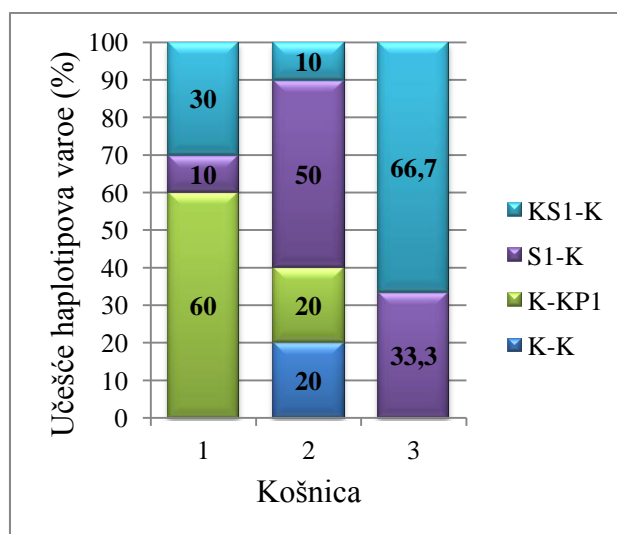
U obe košnice na lokalitetu Lapovo bili su prisutni haplotipovi K-K, S1-K i KS1-K jedinke, dok su u jednoj od njih utvrđene heteroplazmične K-KP1 jedinke (Grafikon 40).



Grafikon 40. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Lapovo analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Nivo značajnosti utvrđene distance haplotipova varoa u košnicama na lokalitetu Lapovo ($p=0,629$), ukazuje da se one nisu statistički značajno razlikovale na osnovu prisutnih haplotipova varoe.

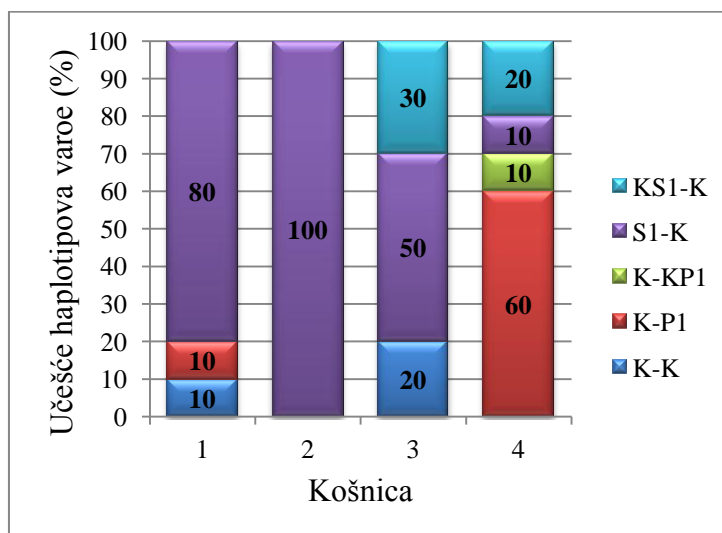
Na lokalitetu Boljevac, u sve tri posmatrane košnice bili su prisutni haplotip S1-K i KS1-K jedinke varoe (Grafikon 41). U dve od njih ustanovljene su K-KP1 jedinke, dok je haplotip K-K utvrđen samo u jednoj košnici.



Grafikon 41. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Boljevac analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Nivoi značajnosti utvrđenih distanci haplotipova varoe između košnica 1 i 3 ($p=0,307$), odnosno 2 i 3 ($p=0,254$) na lokalitetu Boljevac, ukazuju da između njih nije postojala statistički značajna razlika. Zbog malog broja posmatranih varoa, može se smatrati da statistički značajna razlika nije postojala ni između košnica 1 i 2 ($p=0,048$).

U sve četiri košnice na lokalitetu Čajetina bio je prisutan jedino haplotip S1-K (Grafikon 42). U po dve košnice utvrđeni su haplotipovi K-K, K-P1 i KS1-K jedinke, dok su jedinke K-KP1 pronađene u samo jednoj košnici.



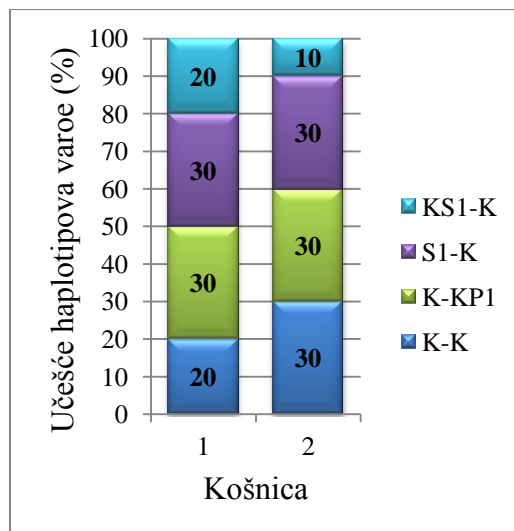
Grafikon 42. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Čajetina analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Po zastupljenosti haplotipova varoe, statistički vrlo značajno su se razlikovale košnica 4 u odnosu na košnice 1 i 3, dok su se košnice 4 i 2 razlikovale statistički značajno (Tabela 25).

Tabela 25. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Čajetina, na osnovu analize spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

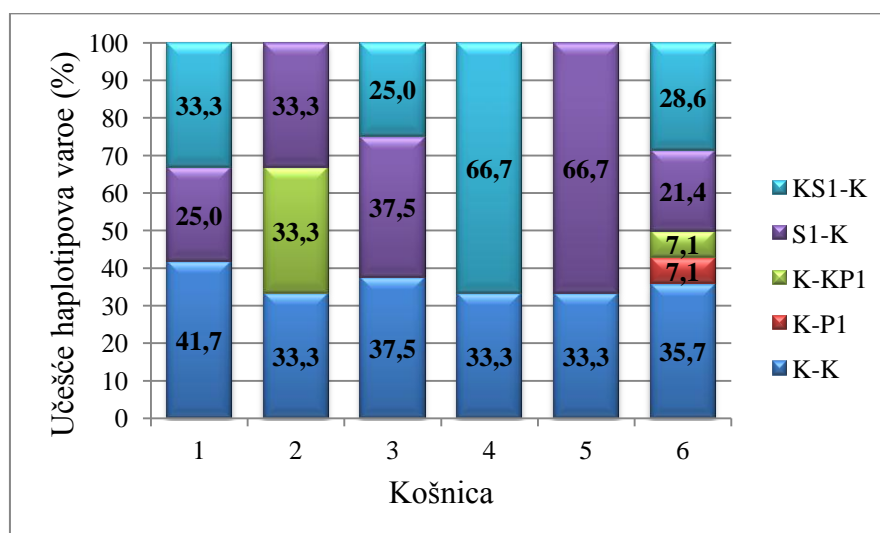
Košnica	2	3	4
1	0,964	0,372	0,001
2		0,486	0,012
3			0,001

U obe posmatrane košnice na lokalitetu Niš utvrđeni su K-K i S1-K haplotipovi varoe zajedno sa heteroplazmičnim K-KP1 i KS1-K jedinkama (Grafikon 43) u odnosu koji se nije statistički značajno razlikovao ($p=0,931$).



Grafikon 43. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Niš analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

U svim posmatranim košnicama na lokalitetu Suvi Do ustanovljen je haplotip K-K (Grafikon 44). Haplotip S1-K bio je prisutan u pet košnica, KS1-K jedinke u četiri, K-KP1 u dve, a haplotip K-P1 u samo jednoj košnici.



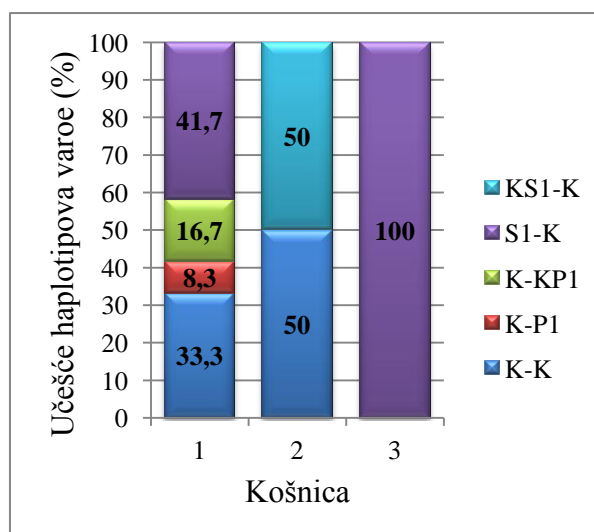
Grafikon 44. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Suvi Do analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Na osnovu nivoa značajnosti utvrđenih distanci, između posmatranih košnica na lokalitetu Suvi Do nije postojala statistički značajna razlika u strukturi prisutnih haplotipova varoe (Tabela 26).

Tabela 26. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve košnice prema utvrđenim haplotipovima varoa i jedinkama sa heteroplazmijom na lokalitetu Suvi Do, na osnovu analize spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Košnica	2	3	4	5	6
1	0,183	0,984	0,842	0,686	0,731
2		0,261	0,195	0,437	0,329
3			0,689	0,897	0,748
4				0,374	0,680
5					0,563

Na lokalitetu Šaprance, haplotipovi K-K i S1-K utvrđeni su u po dve posmatrane košnice, a haplotip K-P1 i jedinke sa heteroplazmijom u po jednoj košnici (Grafikon 45).

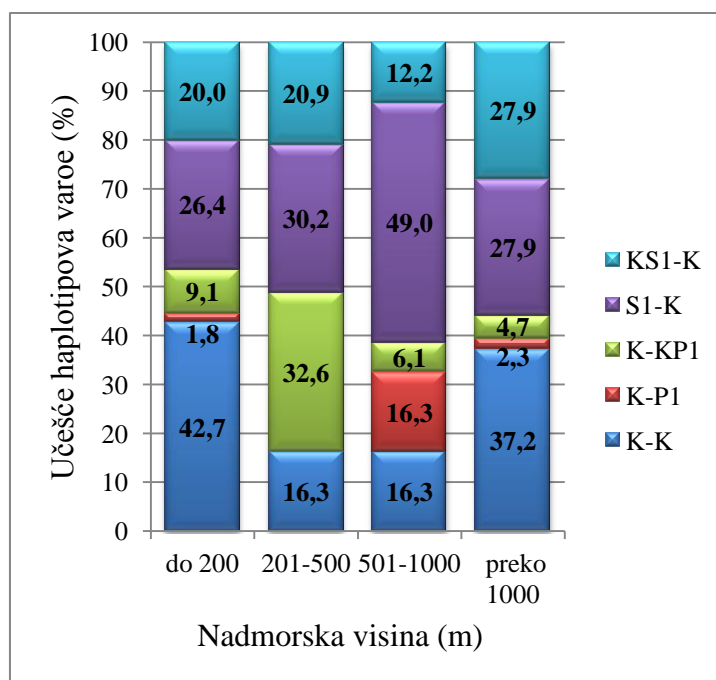


Grafikon 45. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih u košnicama na lokalitetu Šaprance analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Na osnovu nivoa značajnosti utvrđenih distanci haplotipova varoe, između košnica 1 i 2 ($p=0,081$), 1 i 3 ($p=0,737$), odnosno 2 i 3 ($p=0,122$) na lokalitetu Šaprance, nije utvrđena statistički značajna razlika u zastupljenosti haplotipova varoe.

5.5.3. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* u zavisnosti od nadmorske visine posmatranih lokaliteta

Na svim kategorijama nadmorske visine ustanovljeni su K-K i S1-K haplotipovi varoe, odnosno K-KP1 i KS1-K jedinice, dok haplotip K-P1 nije utvrđen jedino na nadmorskoj visini 201-500 m (Grafikon 46). Statističkim testiranjem je utvrđeno da od nadmorske visine vrlo značajno zavisi zastupljenost haplotipova varoe ($\chi^2=59,042$; $p<0,001$).



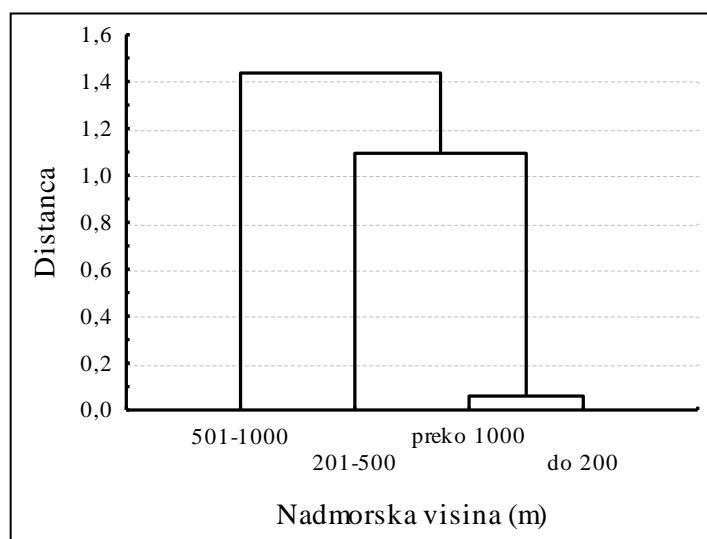
Grafikon 46. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinice sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci u zavisnosti od nadmorske visine

Osim toga, testiranjem značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja došlo se do zaključka da se statistički značajno nisu razlikovale samo raspodele haplotipova varoa na nadmorskoj visini do 200 m i preko 1000 m (Tabela 27).

Tabela 27. Nivoi značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja između dve kategorije nadmorske visine prema haplotipovima varoe i jedinkama sa heteroplazmijom utvrđenim na osnovu analize spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Nadmorska visina (m)	201-500	501-1000	preko 1000
Do 200	<0,001	<0,001	0,771
201-500		<0,001	0,001
501-1000			<0,001

Hijerarhijska klaster analiza zasnovana na kvadratnom Mahalanobis-ovom odstojanju i Ward-ovom metodu povezivanja potvrdila je da su najbližije strukture haplotipova varoe imali lokaliteti na nadmorskoj visini do 200 m i preko 1000 m, a da je struktura haplotipova na nadmorskoj visini 201-500 m bila sličnija ovim raspodelama, nego strukturi na lokalitetima 501-1000 m nadmorske visine (Grafikon 47).

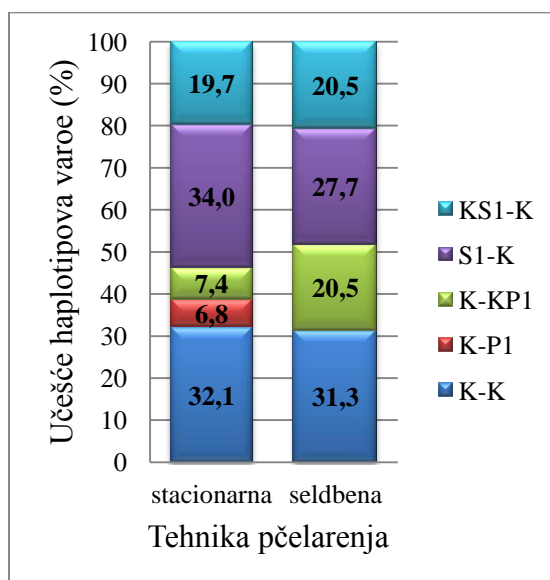


Grafikon 47. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa različitih nadmorskih visina prema sličnosti haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

5.5.4. Zastupljenost haplotipova *V. destructor* u zavisnosti od tehnike pčelarenja

Haplotipovi K-K, K-P1, S1-K i KS1-K jedinice pronađeni su u košnicama sa obe primenjene tehnike pčelarenja, dok je haplotip K-P1 utvrđen samo u košnicama koje nisu seljene (Grafikon 48).

Rezultati χ^2 testa pokazuju da učestalost haplotipova varoe definisanih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci vrlo značajno zavisi od primenjene tehnike pčelarenja ($\chi^2=14,258$; $p=0,007$).



Grafikon 48. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinice sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci u zavisnosti tehnike pčelarenja

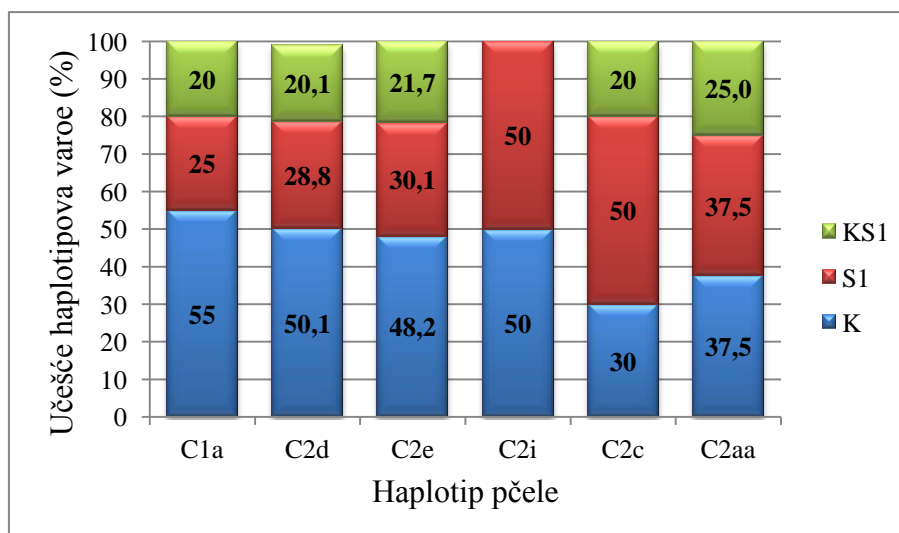
5.6. Korelacija u distribuciji haplotipova *Apis mellifera* i *Varroa destructor* u funkciji analize odnosa domaćin-parazit

5.6.1. Distribucija haplotipova *Varroa destructor* na haplotipovima *Apis mellifera* u ukupnom uzorku

5.6.1.1. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cox1* sekvence

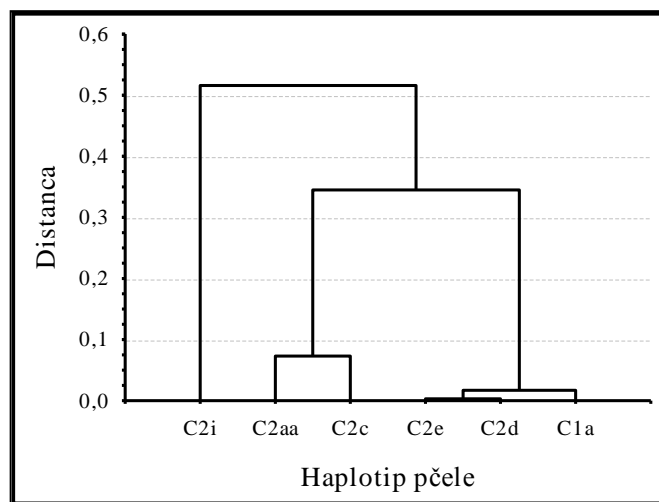
Haplotipovi varoe K i S1 pronađeni su na svim detektovanim haplotipovima pčela, dok KS1 jedinice nisu pronađene samo na pčelama C2i haplotipa (Grafikon 49). Najveći broj varoa koje su parazitirale na pčelama C1a, C2d i C2e haplotipa pripadao je haplotipu K, zatim haplotipu S1, dok su najmanje zastupljene bile jedinice sa heteroplazmijom. Na pčelama C2i i C2aa haplotipa podjednako su bile zastupljene varoe K i S1 haplotipa, dok je S1 haplotip varoe bio dominantan na pčelama C2c haplotipa.

Na osnovu nivoa značajnosti utvrđenih Mahalanobis-ovih kvadratnih distanci, zastupljenost haplotipova varoe definisanih analizom *cox1* sekvence ne zavisi od haplotipa pčele ($p > 0,05$).



Grafikon 49. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinice sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence na različitim haplotipovima pčela

Na dendrogramu (Grafikon 50) se jasno uočavaju tri grupe pčela na osnovu strukture haplotipova varoa koje su na njima parazitirale. Prvu grupu formirali su C1a, C2d i C2e haplotipovi pčela. Drugoj grupi pripadali su haplotipovi C2c i C2aa, dok se u trećoj nalazio samo haplotip C2i.

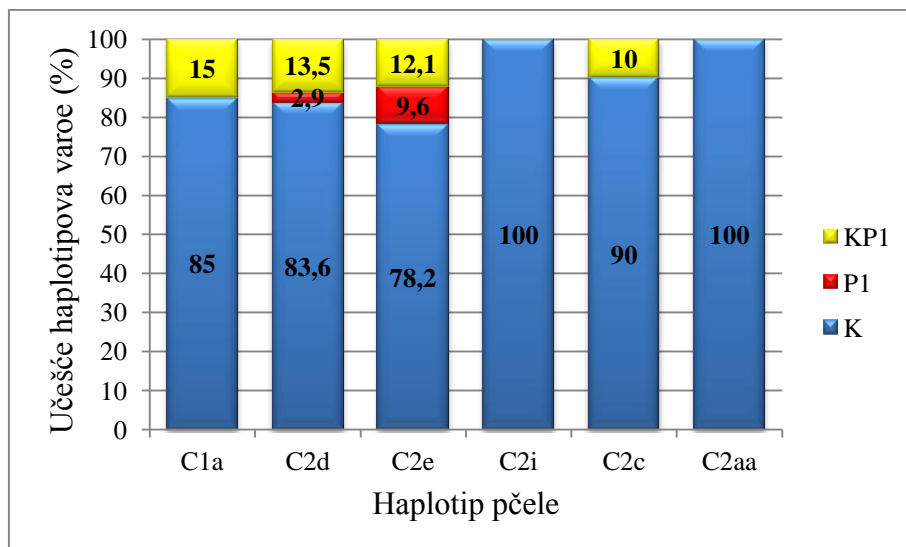


Grafikon 50. Hijerarhijsko grupisanje haplotipova pčela prema sličnosti haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence

5.6.1.2. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cytb* sekvence

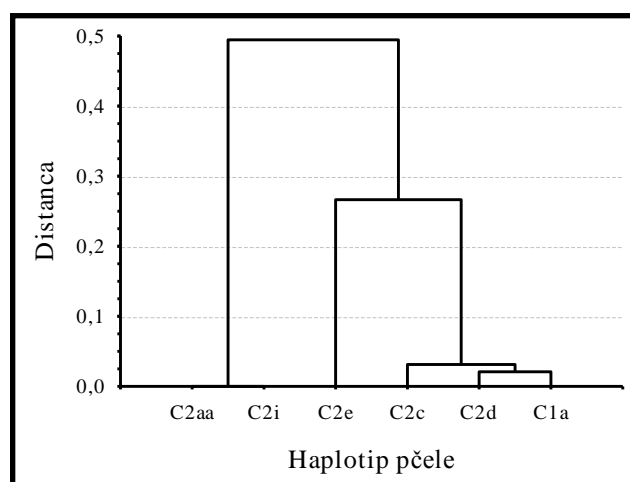
Na svim haplotipovima pčela, u najvećem procentu pronađene su varoe K haplotipa (Grafikon 51). KP1 jedinice utvrđene su na pčelama C1a, C2d, C2e i C2c haplotipa, dok je P1 haplotip pronađen samo na C2d i C2e haplotipovima pčela.

Na osnovu nivoa značajnosti utvrđenih Mahalanobis-ovih kvadratnih distanci, zastupljenost haplotipova varoe definisanih analizom *cytb* sekvence ne zavisi od haplotipa pčele ($p > 0,05$).



Grafikon 51. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na različitim haplotipovima pčela

Na dendrogramu (Grafikon 52) se uočavaju tri klastera pčela na osnovu strukture haplotipova varoa definisanih analizom *cytb* sekvence. Prema ovom kriterijumu, najbliži su bili C1a, C2d i C2c haplotipovi pčela, zbog čega su svrstani u prvi klaster. U drugom klasteru nalaze se pčele C2e haplotipa, dok treći klaster čine haplotipovi C2i i C2aa.

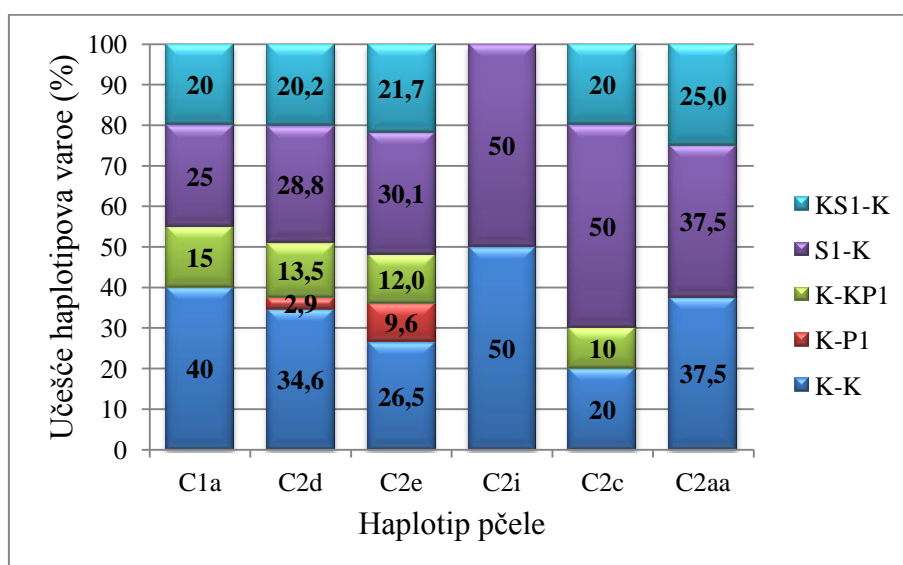


Grafikon 52. Hijerarhijsko grupisanje haplotipova pčela prema sličnosti haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence

5.6.1.3. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

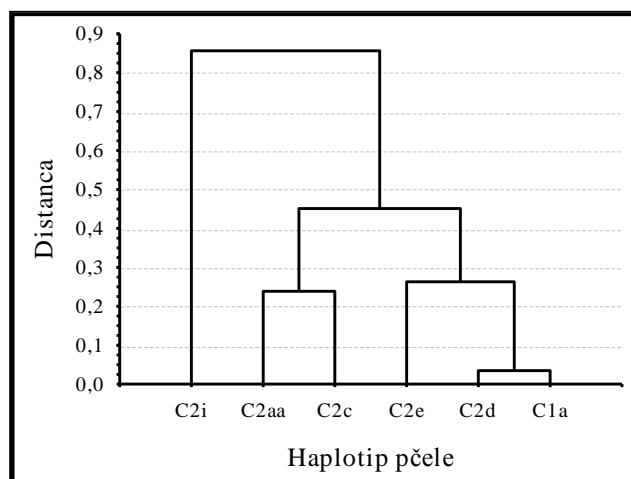
K-K i S1-K haplotipovi varoe utvrđeni su na svim haplotipovima pčela, dok KS1-K jedinke nisu ustanovljene jedino na pčelama C2i haplotipa (Grafikon 53). Jedinke K-KP1, odnosno haplotip K-P1, bili su prisutni na C1a, C2d, C2e i C2c, odnosno C2d i C2e haplotipovima pčela.

Na osnovu nivoa značajnosti utvrđenih kvadratnih Mahalanobis-ovih odstojanja, zastupljenost haplotipova varoe definisanih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci ne zavisi od haplotipa pčele ($p > 0,05$).



Grafikon 53. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na različitim haplotipovima pčela

Na dendrogramu (Grafikon 54) se jasno uočavaju tri klastera pčela na osnovu strukture prisutnih haplotipova varoa. U prvom klasteru nalaze se haplotipovi C1a, C2d i C2e. Njima su najbliži haplotipovi C2c i C2aa, koji čine drugi klaster. U trećem klasteru nalaze se samo pčele C2i haplotipa.

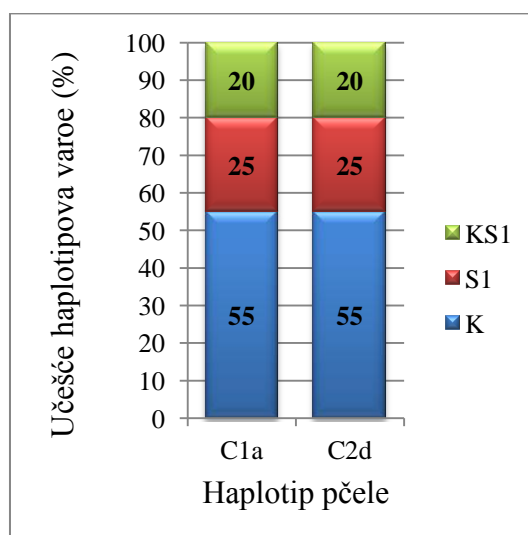


Grafikon 54. Hijerarhijsko grupisanje haplotipova pčela prema sličnosti haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

5.6.2. Distribucija haplotipova *Varroa destructor* na haplotipovima *Apis mellifera* sa posmatranih lokaliteta

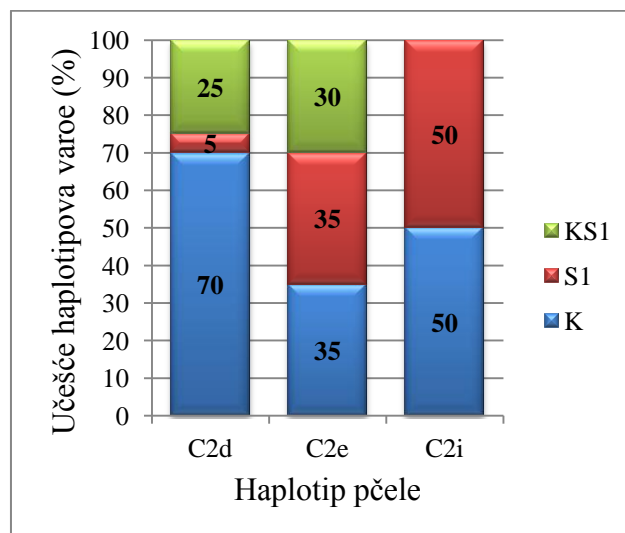
5.6.2.1. Distribucija haplotipova V. destructor utvrđenih analizom cox1 sekvence

Na detektovanim C1a i C2d haplotipovima pčela sa lokaliteta Palić ustanovljena je identična struktura haplotipova K, S1 i jedinki sa heteroplazmijom (Grafikon 55).



Grafikon 55. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama sa lokaliteta Palić

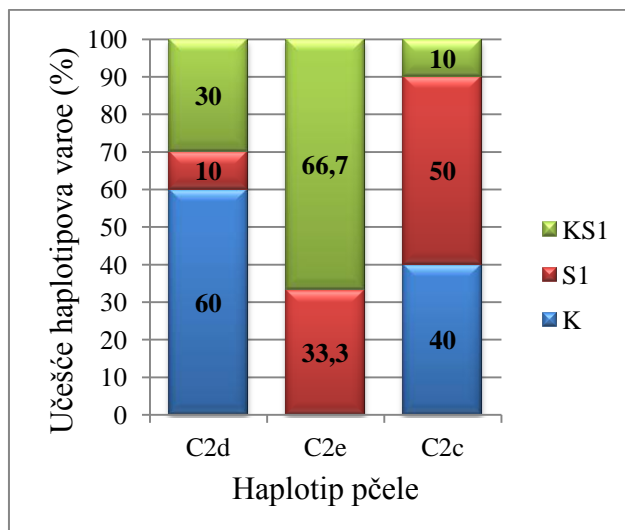
Na C2d i C2e haplotipovima pčela sa lokaliteta Beograd, uz jedinke sa heteroplazmijom pronađene su varoe K i S1 haplotipa, dok su na pčelama C2i haplotipa ustanovljeni samo K i S1 haplotipovi varoe (Grafikon 56). Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, po strukturi haplotipova varoa statistički značajno su se razlikovale pčele C2d i C2i haplotipa ($p=0,022$).



Grafikon 56. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinke sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama sa lokaliteta Beograd

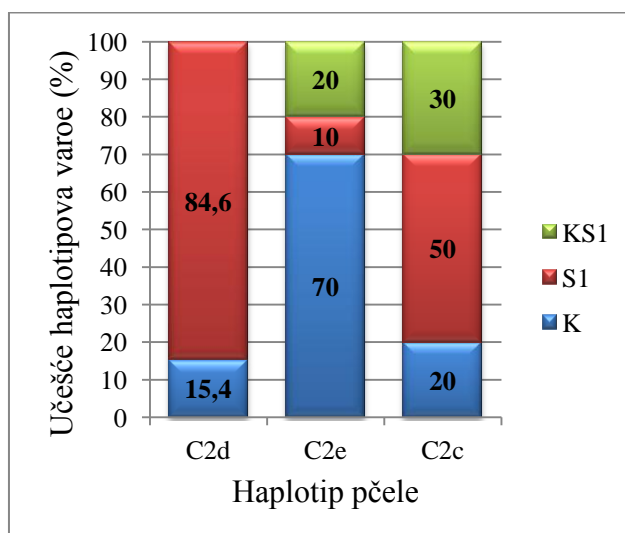
Na lokalitetima Lapovo, Niš i Šaprance bio je zastupljen po jedan haplotip pčela, zbog čega nije bilo moguće posmatrati distribuciju haplotipova varoe utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama sa ovih lokaliteta.

Na C2d i C2c haplotipovima pčela sa lokaliteta Boljevac utvrđene su varoe K, S1 haplotipa i KS1 jedinke, dok na pčelama C2e nisu pronađene varoe K haplotipa (Grafikon 57). Između pčela C2e i C2c haplotipa postojala je statistički značajna razlika na osnovu strukture utvrđenih haplotipova varoa ($p=0,028$).



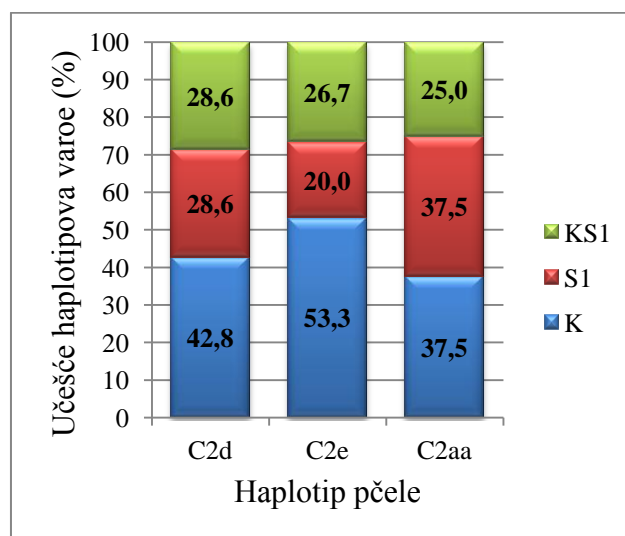
Grafikon 57. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama sa lokaliteta Boljevac

Na C2e i C2c haplotipovima pčela sa lokaliteta Čajetina utvrđeni su haplotipovi K, S1 i KS1 jedinke varoe, dok su na pčelama C2d ustanovljeni K i S1 haplotipovi varoe (Grafikon 58). Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnih Mahalanobis-ovih distanci, po strukturi haplotipova varoa statistički vrlo značajno su se razlikovale pčele C2d i C2e haplotipa ($p=0,001$), dok su se C2e i C2c razlikovale statistički značajno ($p=0,042$).



Grafikon 58. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama sa lokaliteta Čajetina

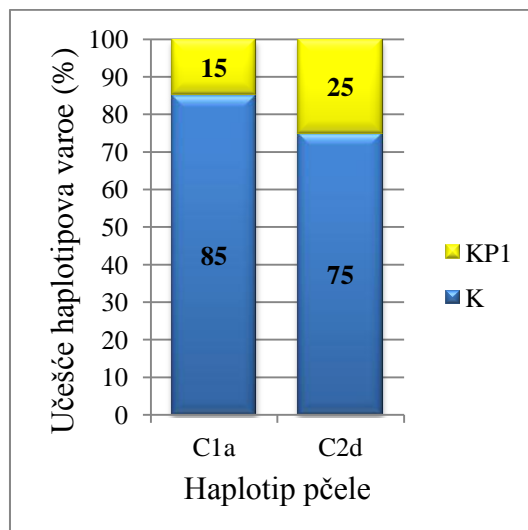
Na sva tri detektovana haplotipa pčela sa lokaliteta Suvi Do pronađene su varoe K, S1 haplotipa i jedinke sa heteroplazmijom (Grafikon 59). Varoe K haplotipa bile su dominantne na C2d i C2e haplotipovima pčela, dok su na pčelama C2aa haplotipa bile podjednako zastupljene kao haplotip S1. Na osnovu utvrđenih nivoa značajnosti, između analiziranih haplotipova pčela nisu postojale razlike u zastupljenosti haplotipova varoa ($p > 0,05$).



Grafikon 59. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinke sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama sa lokaliteta Suvi Do

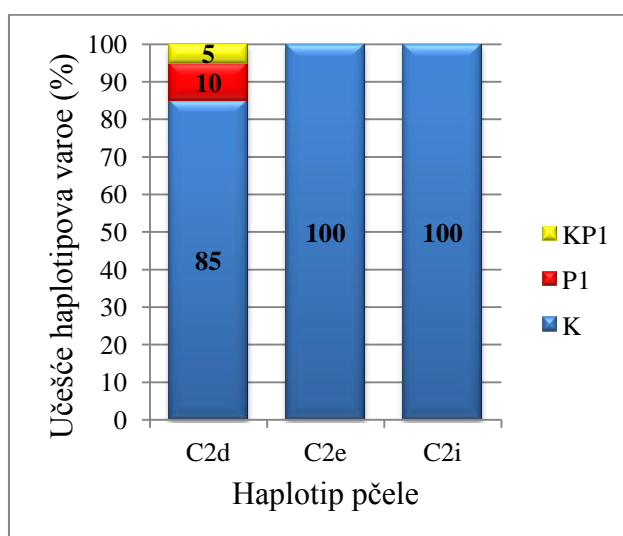
5.6.2.2. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cytb* sekvence

Na haplotipovima pčela C1a i C2d sa lokaliteta Palić utvrđeni su K haplotip i KP1 jedinke varoe (Grafikon 60). Strukture prisutnih haplotipova varoe nisu se značajno razlikovale na pronađenim haplotipovima pčela ($p = 0,442$).



Grafikon 60. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama sa lokaliteta Palić

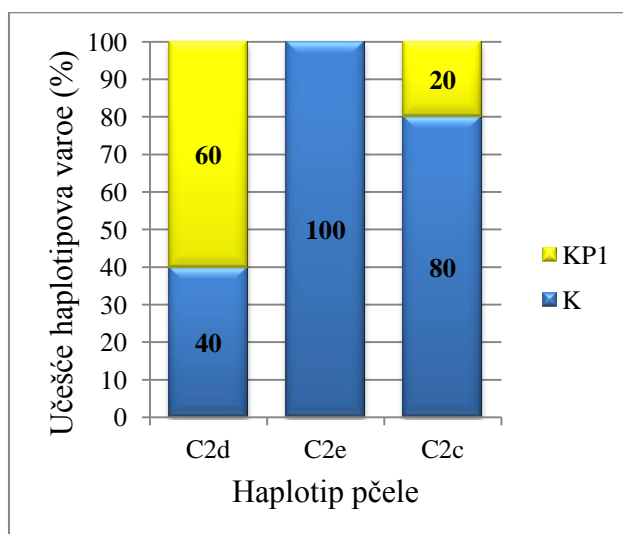
Na svim detektovanim haplotipovima pčela sa lokaliteta Beograd utvrđen je K haplotip varoe, dok su haplotip P1 i KP1 jedinke ustanovljeni samo na pčelama C2d haplotipa (Grafikon 61). Osim toga, utvrđeni haplotipovi pčela nisu se statistički značajno razlikovali po strukturi prisutnih haplotipova varoe ($p > 0,05$).



Grafikon 61. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama sa lokaliteta Beograd

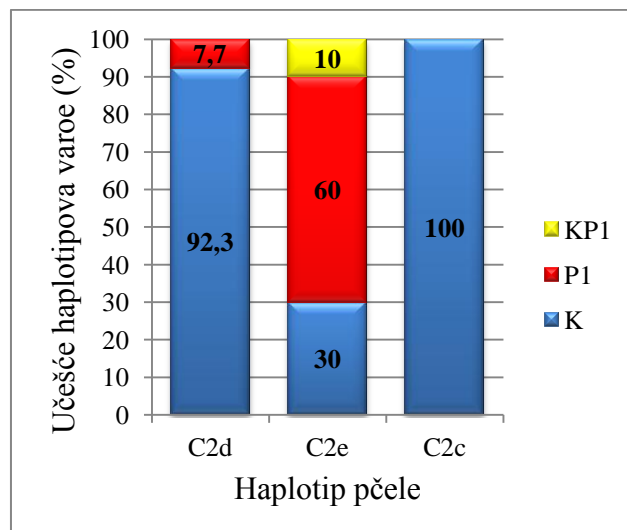
Na lokalitetima Lapovo, Niš i Šaprance bio je zastupljen po jedan haplotip pčela, zbog čega nije bilo moguće porediti distribuciju haplotipova varoe utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama različitog haplotipa sa ovih lokaliteta.

Na svim detektovanim haplotipovima pčela sa lokaliteta Boljevac utvrđen je K haplotip varoe, dok su na pčelama C2d i C2c haplotipa ustanovljene i jedinke sa heteroplazmijom (Grafikon 62). Takođe, struktura haplotipova varoe nije se značajno razlikovala između utvrđenih haplotipova pčela ($p > 0,05$).



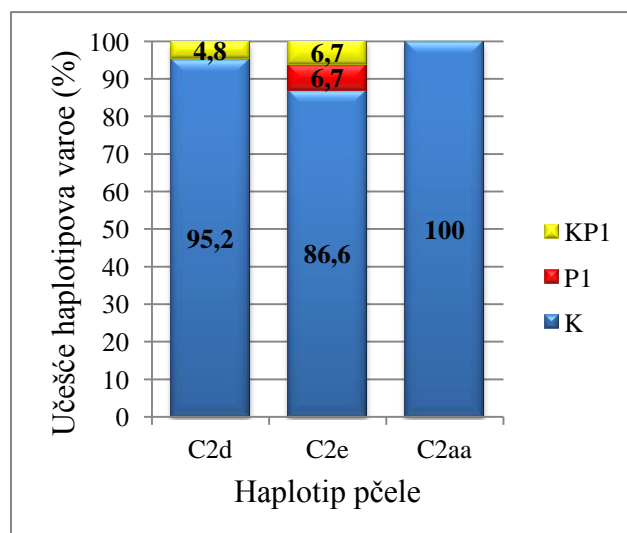
Grafikon 62. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama sa lokaliteta Boljevac

Na svim prisutnim haplotipovima pčela sa lokaliteta Čajetina ustanovljene su varoe K haplotipa (Grafikon 63). Na pčelama C2d i C2e bio je prisutan P1 haplotip, dok su KP1 jedinke utvrđene samo na pčelama C2e haplotipa. Struktura utvrđenih haplotipova varoe razlikovala se vrlo značajno između pčela C2d i C2e, odnosno C2e i C2c haplotipa ($p < 0,001$).



Grafikon 63. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama sa lokaliteta Čajetina

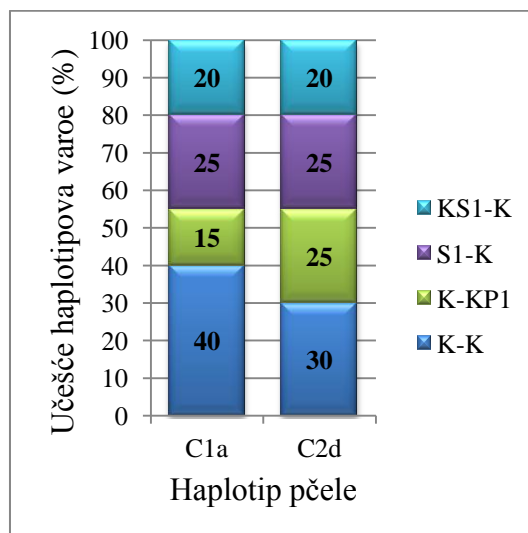
Na svim prisutnim haplotipovima pčela sa lokaliteta Suvi Do dominantno je bilo prisustvo K haplotipa varoe (Grafikon 64). U znatno manjem procentu, na pčelama C2d i C2e bile su prisutne jedinke sa heteroplazmijom, dok je P1 haplotip utvrđen samo na pčelama C2e haplotipa. Međutim, haplotipovi pčela se nisu značajno razlikovali po strukturi prisutnih haplotipova varoe ($p > 0,05$).



Grafikon 64. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama sa lokaliteta Suvi Do

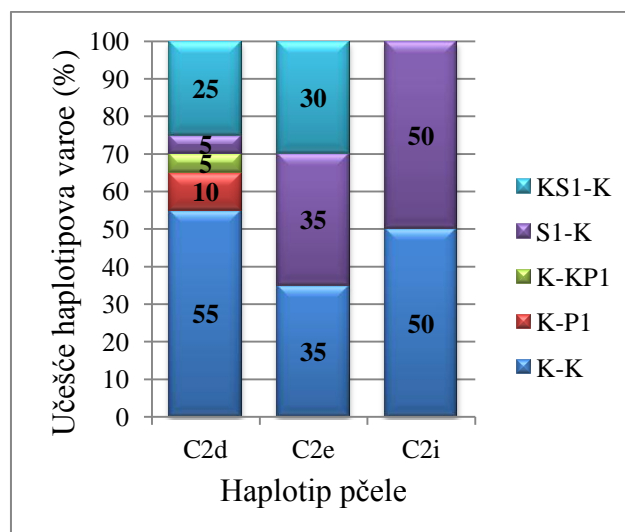
5.6.2.3. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Na pčelama sa lokaliteta Palić utvrđeni su K-K i S1-K haplotipovi varoe, odnosno K-KP1 i KS1-K jedinke u približno istom procentu (Grafikon 65). Osim toga, prema značajnosti kvadratne Mahalanobis-ove distance, struktura utvrđenih haplotipova varoe nije zavisila od haplotipa pčele ($p=0,868$).



Grafikon 65. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama sa lokaliteta Palić

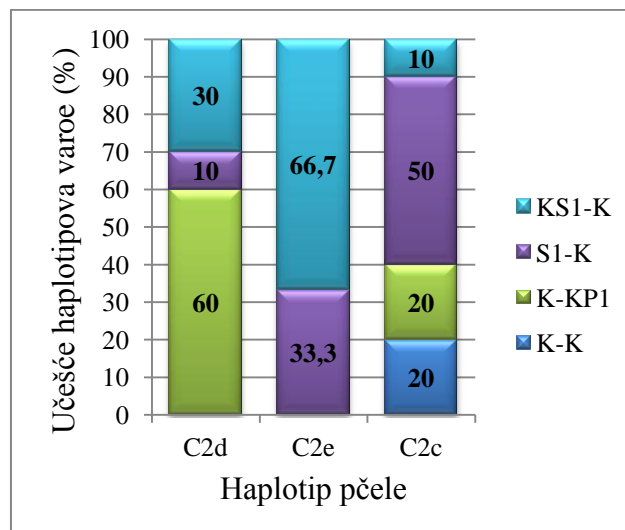
Na svim haplotipovima pčela sa lokaliteta Beograd utvrđeni su K-K i S1-K haplotipovi varoe (Grafikon 66). Heteroplazmične KS1-K jedinke bile su prisutne na pčelama C2d i C2e, a varoe K-P1 haplotipa i K-KP1 jedinke samo na pčelama C2d haplotipa. Po strukturi prisutnih haplotipova varoe značajno su se razlikovali jedino C2d i C2i haplotipovi pčela ($p=0,042$).



Grafikon 66. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama sa lokaliteta Beograd

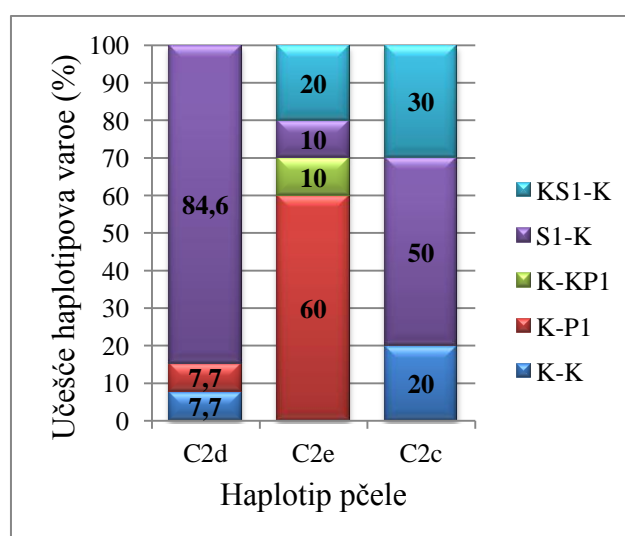
Na lokalitetima Lapovo, Niš i Šaprance bio je zastupljen po jedan haplotip pčela, zbog čega nije bilo moguće porediti distribuciju haplotipova varoe utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama različitog haplotipa sa ovih lokaliteta.

Na svim haplotipovima pčela sa lokaliteta Boljevac pronađeni su S1-K haplotip i KS1-K jedinke varoe (Grafikon 67). Varoe K haplotipa utvrđene su na pčelama C2c, a K-KP1 jedinke na pčelama C2d i C2c haplotipa. Na osnovu strukture prisutnih haplotipova varoe, značajno su se razlikovale pčele C2d i C2c haplotipa ($p=0,038$).



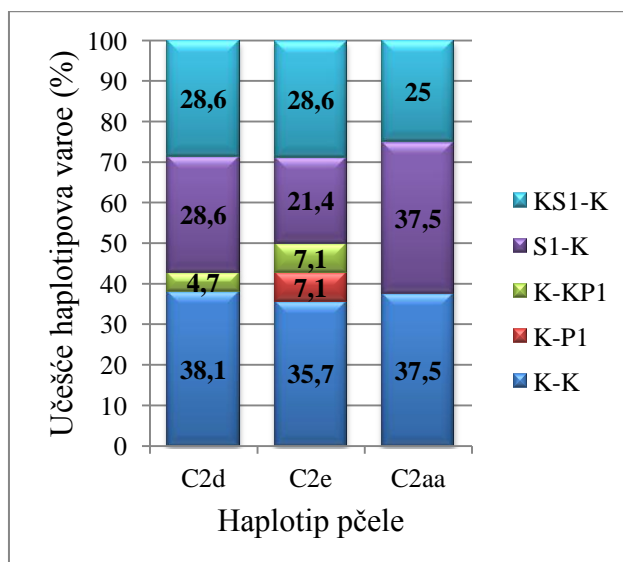
Grafikon 67. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama sa lokaliteta Boljevac

Na svim haplotipovima pčela sa lokaliteta Čajetina bile su prisutne varoe S1-K haplotipa (Grafikon 68). Varoe K-K haplotipa utvrđene su na pčelama C2d i C2c, K-P1 haplotipa na pčelama C2d i C2e, a KS1-K jedinke na pčelama C2e i C2c haplotipa. Jedinke K-KP1 pronađene su jedino na pčelama C2e. Pčele C2e haplotipa su se prema strukturi utvrđenih haplotipova varoe vrlo značajno razlikovale od haplotipova pčela C2d i C2c ($p < 0,001$).



Grafikon 68. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama sa lokaliteta Čajetina

Na svim haplotipovima pčela sa lokaliteta Suvi Do bili su prisutni K-K i S1-K haplotipovi, odnosno KS1-K jedinke varoe (Grafikon 69). Jedinke K-KP1 utvrđene su na pčelama C2d i C2e, a K-P1 jedino na pčelama C2e haplotipa. Na osnovu dobijenih nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, haplotipovi pčela nisu se značajno razlikovali prema prisutnim haplotipovima varoe ($p > 0,05$).



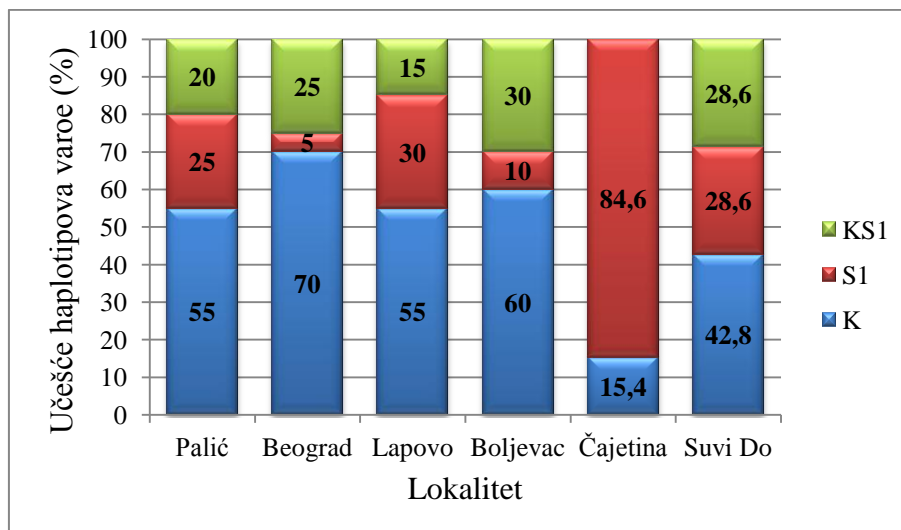
Grafikon 69. Zastupljenost haplotipova varoe i jedinke sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama sa lokaliteta Suvi Do

5.6.3. Distribucija haplotipova *Varroa destructor* na istom haplotipu *Apis mellifera* sa različitih lokaliteta

5.6.3.1. Distribucija haplotipova V. destructor na C2d haplotipu A. mellifera

5.6.3.1.1. Distribucija haplotipova V. destructor utvrđenih analizom cox1 sekvence

Na pčelama C2d haplotipa sa svih lokaliteta nađeni su haplotipovi K, S1 i KS1 jedinke varoe, osim na lokalitetu Čajetina gde su izostale jedinke sa heteroplazmijom (Grafikon 70). Takođe, K haplotip varoe je bio dominantan na svim lokalitetima izuzev Čajetine, gde je dominantan bio S1 haplotip.



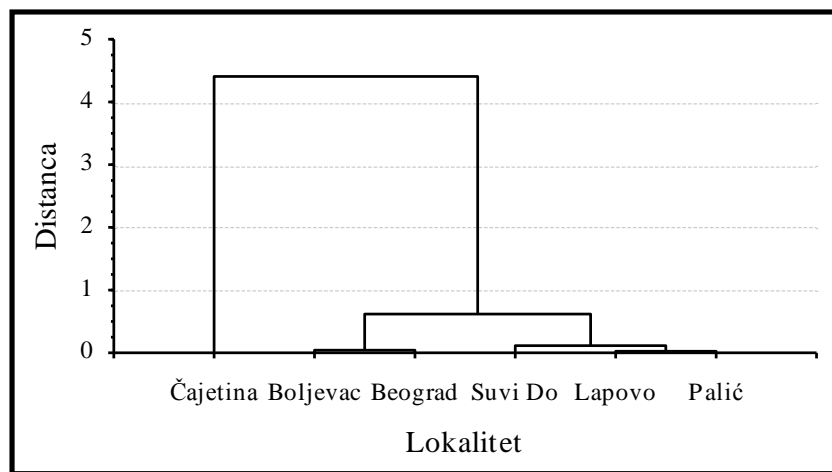
Grafikon 70. Distribucija haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama C2d haplotipa sa različitih lokaliteta

Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnih Mahalanobis-ovih distanci, lokalitet Čajetina se prema strukturi detektovanih haplotipova varoa statistički vrlo značajno razlikovao u odnosu na sve ostale lokalitete (Tabela 28).

Tabela 28. Nivoi značajnosti distanci između dva lokaliteta na osnovu haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama C2d haplotipa

Lokalitet	Beograd	Lapovo	Boljevac	Čajetina	Suvi Do
Palić	0,297	0,886	0,584	<0,001	0,710
Beograd		0,147	0,871	<0,001	0,132
Lapovo			0,362	0,001	0,556
Boljevac				<0,001	0,477
Čajetina					<0,001

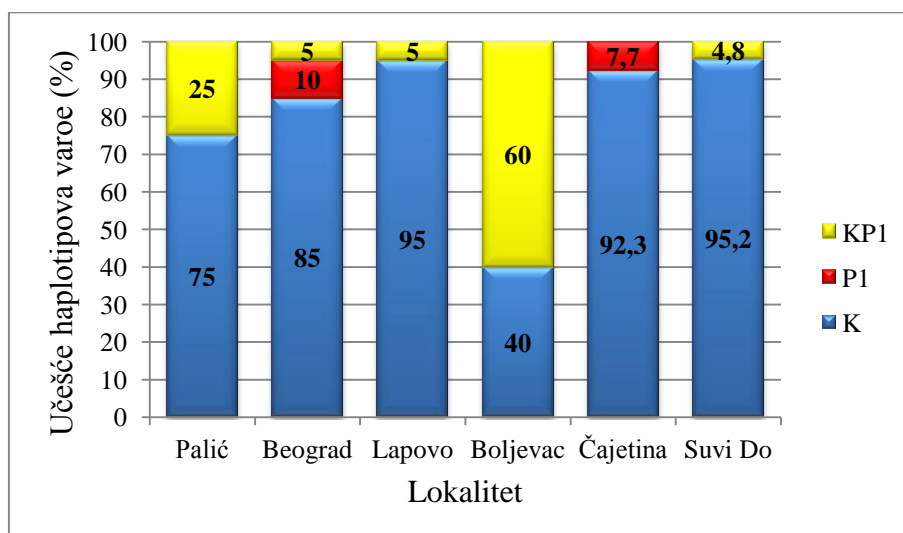
Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta prema sličnosti haplotipova varoe utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama C2d haplotipa izvršeno je na bazi utvrđenih kvadratnih Mahalanobis-ovih odstojanja između lokaliteta i Ward-ovog metoda povezivanja. Posmatrani lokaliteti su raspoređeni u tri klastera (Grafikon 71). U prvom klasteru nalaze se lokaliteti Palić, Lapovo i Suvi Do. Drugom klasteru pripadaju Beograd i Boljevac, a trećem samo Čajetina.



Grafikon 71. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa pčelama C2d haplotipa na osnovu strukture haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *coxI* sekvence

5.6.3.1.2. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cytb* sekvence

Na pčelama C2d haplotipa sa svih šest lokaliteta bio je prisutan K haplotip varoe (Grafikon 72). Isti haplotip bio je dominantan kod varoa sa svih lokaliteta, osim na lokalitetu Boljevac gde su dominantne bile jedinice sa heteroplazmijom. Varoe P1 haplotipa pronađene su na pčelama C2d haplotipa sa lokaliteta Beograd i Čajetina.



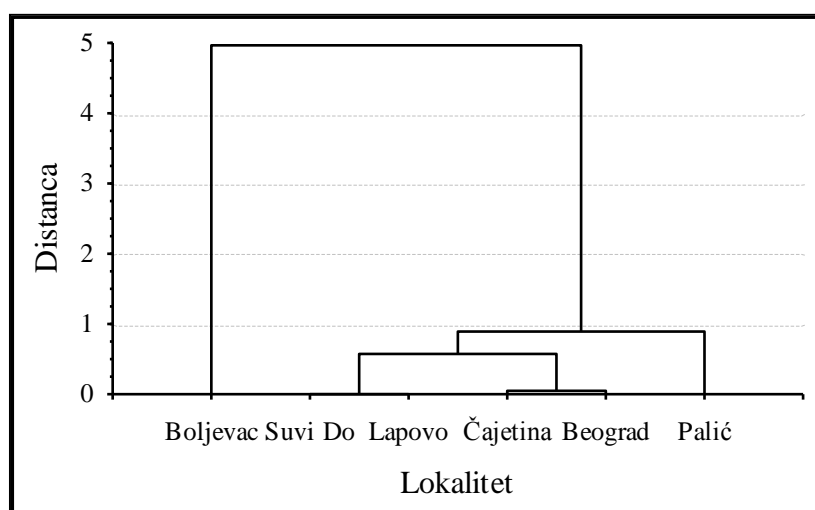
Grafikon 72. Distribucija haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama C2d haplotipa sa različitih lokaliteta

Lokalitet Boljevac se prema strukturi detektovanih haplotipova varoa na pčelama C2d haplotipa statistički vrlo značajno razlikovao od lokaliteta Beograd, Lapovo, Čajetina i Suvi Do, dok se lokalitet Palić značajno razlikovao u odnosu na Beograd, Boljevac i Čajetinu (Tabela 29).

Tabela 29. Nivoi značajnosti distanci između dva lokaliteta na osnovu haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama C2d haplotipa

Lokalitet	Beograd	Lapovo	Boljevac	Čajetina	Suvi Do
Palić	0,024	0,121	0,015	0,037	0,110
Beograd		0,174	<0,001	0,832	0,166
Lapovo			<0,001	0,400	1,000
Boljevac				<0,001	<0,001
Čajetina					0,397

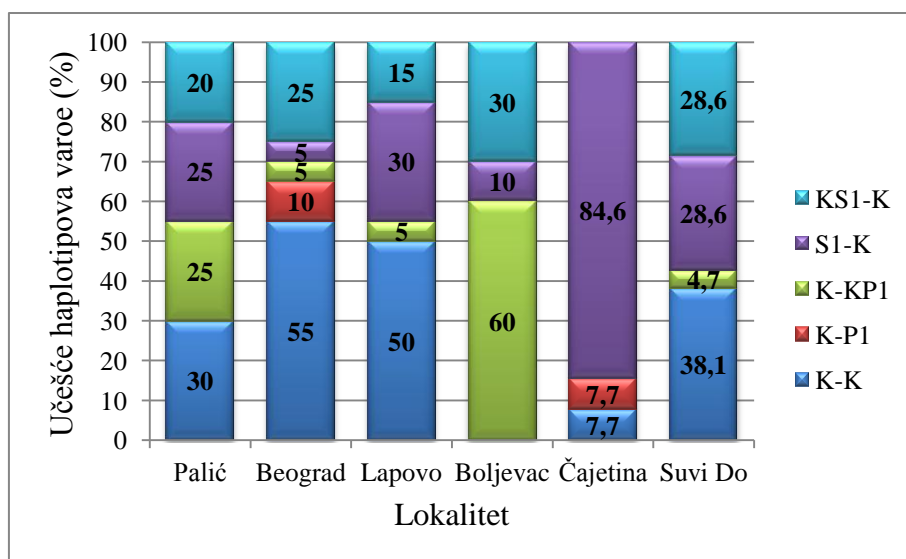
Na osnovu dendrograma, posmatrani lokaliteti su raspoređeni u četiri klastera (Grafikon 73). U prvom klasteru nalaze se Čajetina i Beograd, koji se na sledećem nivou udružuju sa drugim klasterom, koga čine lokaliteti Lapovo i Suvi Do. U trećem klasteru nalazi se lokalitet Palić, a u četvrtom Boljevac.



Grafikon 73. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa pčelama C2d haplotipa na osnovu strukture haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence

5.6.3.1.3. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Na svih šest lokaliteta, na pčelama C2d haplotipa bio je prisutan jedino S1-K haplotip varoe (Grafikon 74). Varoe K-K haplotipa nisu ustanovljene jedino na lokalitetu Boljevac, dok su na lokalitetu Čajetina izostale jedinice sa heteroplazmijom. Varoe K-P1 haplotipa bile su prisutne na pčelama C2d haplotipa sa lokaliteta Beograd i Čajetina.



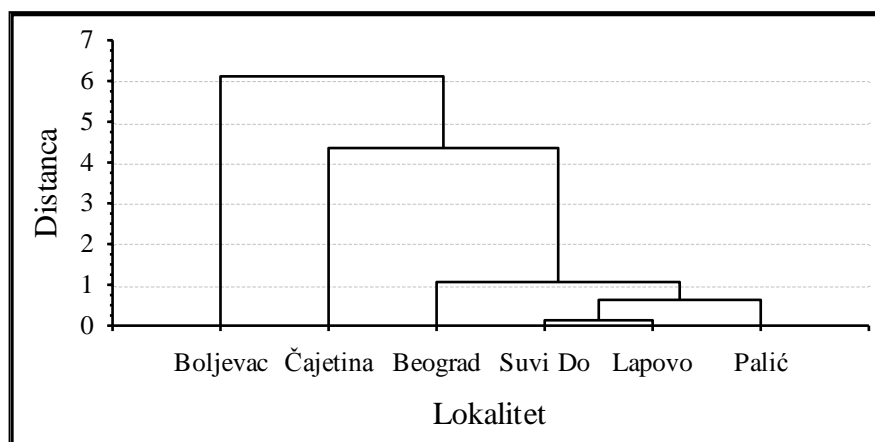
Grafikon 74. Distribucija haplotipova varoe i jedinice sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama C2d haplotipa sa različitih lokaliteta

Statistički vrlo značajne razlike prema strukturi detektovanih haplotipova varoa na pčelama C2d haplotipa ustanovljene su između lokaliteta Čajetina i svih ostalih, odnosno između Boljevca i Beograda, Lapova i Suvog Dola (Tabela 30). Lokalitet Palić se u odnosu na lokalitete Beograd i Boljevac statistički značajno razlikovao prema strukturi utvrđenih haplotipova varoa.

Tabela 30. Nivoi značajnosti distanci između dva lokaliteta na osnovu haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama C2d haplotipa

	Beograd	Lapovo	Boljevac	Čajetina	Suvi Do
Palić	0,029	0,248	0,031	<0,001	0,354
Beograd		0,169	<0,001	<0,001	0,157
Lapovo			<0,001	0,002	0,858
Boljevac				<0,001	<0,001
Čajetina					0,001

Na dendrogramu se uočava da su posmatrani lokaliteti raspoređeni u tri klastera (Grafikon 75). Prvom klasteru pripadaju lokaliteti Lapovo, Suvi Do, Palić i Beograd. Njima se na sledećem nivou pridružuje drugi klaster u kome se nalazi Čajetina, a u naredni treći klaster svrstan je Boljevac.

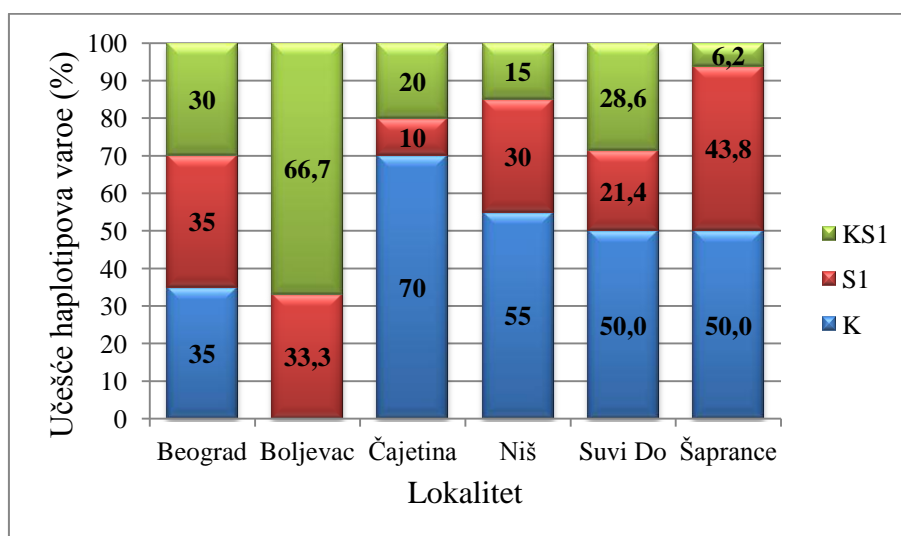


Grafikon 75. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa pčelama C2d haplotipa na osnovu strukture haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

5.6.3.2. Distribucija haplotipova *V. destructor* na C2e haplotipu *A. mellifera*

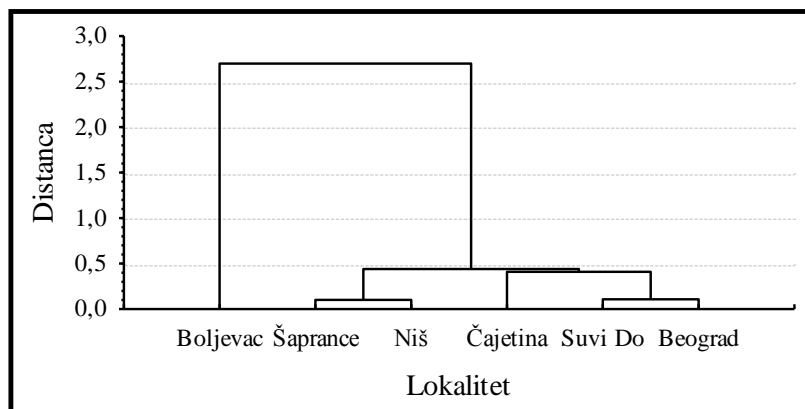
 5.6.3.2.1. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *coxI* sekvence

Na pčelama C2e haplotipa sa svih lokaliteta utvrđene su varoe S1 haplotipa i KS1 jedinke, dok K haplotip varoe nije utvrđen jedino na lokalitetu Boljevac (Grafikon 76). Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnih Mahalanobis-ovih distanci, posmatrani lokaliteti se nisu statistički značajno razlikovali prema strukturi detektovanih haplotipova varoe ($p > 0,05$).



Grafikon 76. Distribucija haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *coxI* sekvence na pčelama C2e haplotipa sa različitih lokaliteta

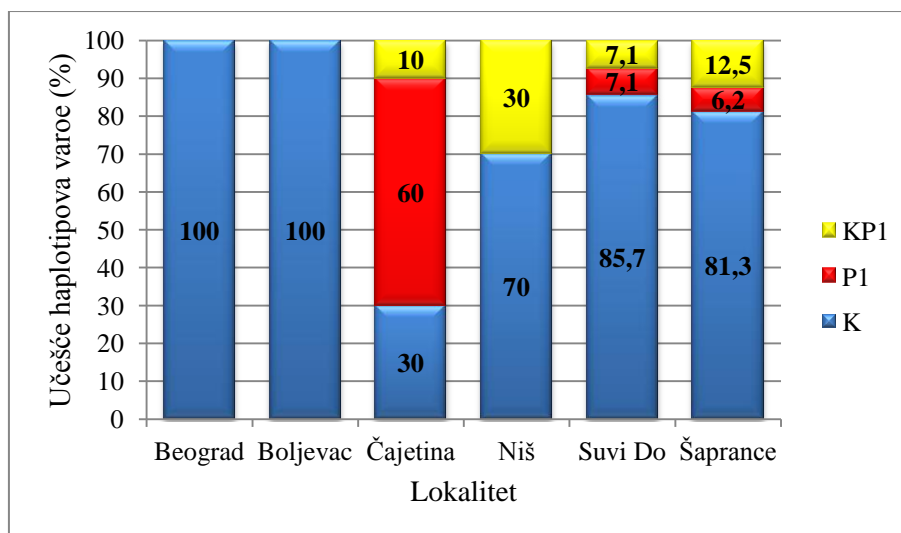
Lokaliteti na kojima su bile prisutne pčele C2e haplotipa, grupisani su u tri klastera na osnovu sličnosti haplotipova varoe utvrđenih analizom *coxI* sekvence (Grafikon 77). U prvom klasteru nalaze se lokaliteti Beograd, Suvi Do i Čajetina, u drugom Niš i Šaprance, a u trećem samo Boljevac.



Grafikon 77. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa pčelama C2e haplotipa na osnovu strukture haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *coxI* sekvence

5.6.3.2.2. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cytb* sekvence

Na pčelama C2e haplotipa sa svih lokaliteta utvrđen je K haplotip varoe (Grafikon 78). Varoe P1 haplotipa bile su prisutne na tri, a KP1 jedinice na četiri posmatrana lokaliteta.



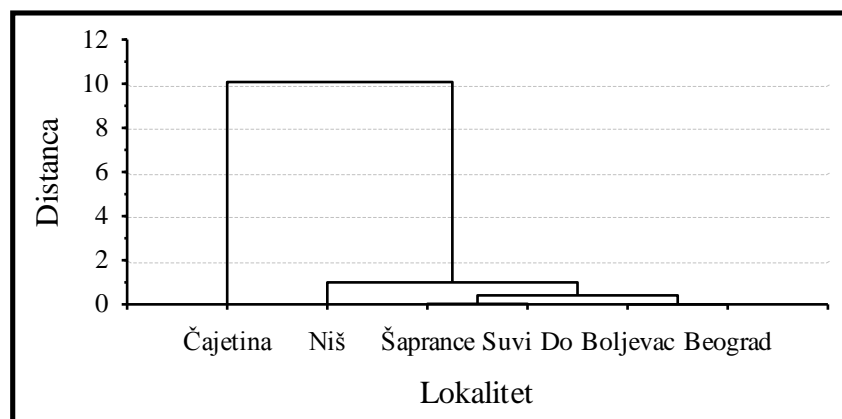
Grafikon 78. Distribucija haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama C2e haplotipa sa različitih lokaliteta

Statistički vrlo značajna razlika prema strukturi detektovanih haplotipova varoa na pčelama C2e haplotipa ustanovljena je između lokaliteta Čajetina i svih ostalih, dok je značajna razlika postojala između lokaliteta Beograd i Niš (Tabela 31).

Tabela 31. Nivoi značajnosti distanci između dva lokaliteta na osnovu haplotipova varoa i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama C2e haplotipa

Lokalitet	Boljevac	Čajetina	Niš	Suvi Do	Šaprance
Beograd	1,000	<0,001	0,014	0,515	0,326
Boljevac		0,001	0,316	0,819	0,725
Čajetina			<0,001	<0,001	<0,001
Niš				0,110	0,232
Suvi Do					0,900

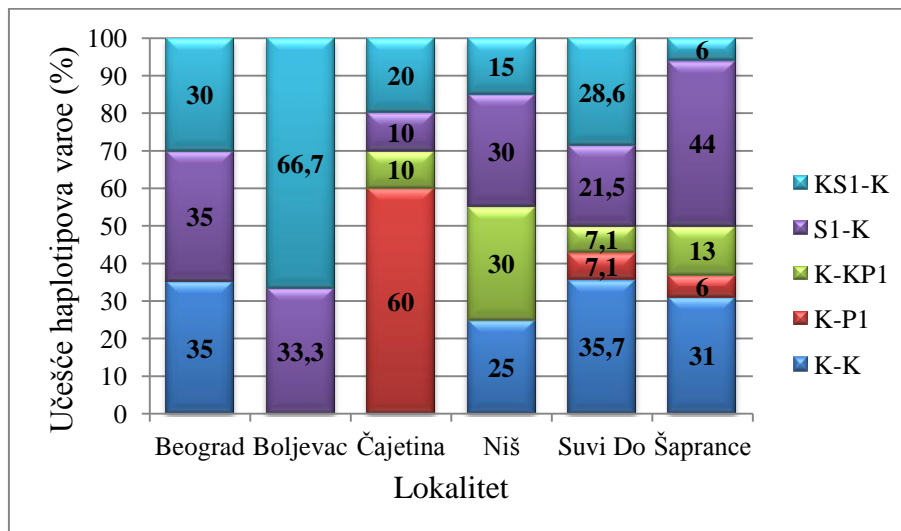
Na osnovu sličnosti haplotipova varoe utvrđenih analizom *cytb* sekvence, lokaliteti na kojima su bile prisutne pčele C2e haplotipa grupisani su u tri klastera (Grafikon 79). Prvi klaster čine lokaliteti Beograd, Boljevac, Suvi Do i Šaprance, u drugom se nalazi lokalitet Niš, a u trećem samo Čajetina.



Grafikon 79. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa pčelama C2e haplotipa na osnovu strukture haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence

5.6.3.2.3. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Na pčelama C2e haplotipa sa svih šest lokaliteta utvrđene su varoe S1-K haplotipa i jedinke sa *cox1* heteroplazmijom (Grafikon 80). Haplotip K-K i K-KP1 jedinke nisu ustanovljeni na po dva lokaliteta, dok je K-P1 haplotip izostao na tri lokaliteta.



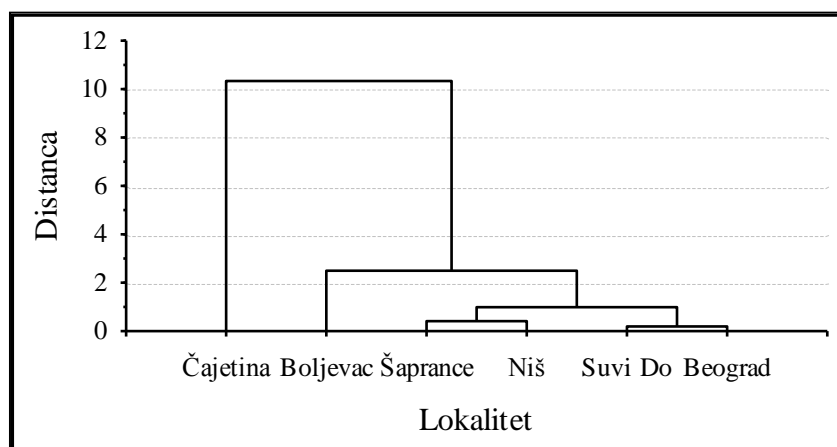
Grafikon 80. Distribucija haplotipova varoe i jedinke sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama C2e haplotipa sa različitih lokaliteta

Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnih Mahalanobis-ovih distanci, prema strukturi detektovanih haplotipova varoa na pčelama C2e haplotipa, vrlo značajno se razlikovao lokalitet Čajetina u odnosu na sve ostale lokalitete (Tabela 32).

Tabela 32. Nivoi značajnosti distanci između dva lokaliteta na osnovu haplotipova varoa i jedinke sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama C2e haplotipa

Lokalitet	Boljevac	Čajetina	Niš	Suvi Do	Šaprance
Beograd	0,603	<0,001	0,067	0,815	0,374
Boljevac		0,005	0,219	0,550	0,241
Čajetina			<0,001	<0,001	<0,001
Niš				0,246	0,475
Suvi Do					0,540

Prema sličnosti prisutnih haplotipova varoe utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci, lokaliteti na kojima su bile prisutne pčele C2e haplotipa podjeljeni su u tri grupe (Grafikon 81). U prvoj grupi nalaze se lokaliteti Beograd, Suvi Do, Niš i Šaprance. U drugoj grupi nalazi se lokalitet Boljevac, a u trećoj Čajetina.

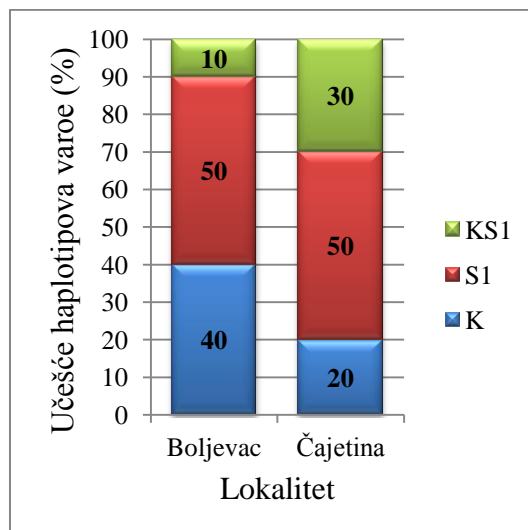


Grafikon 81. Hijerarhijsko grupisanje lokaliteta sa pčelama C2e haplotipa na osnovu strukture haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

5.6.3.3. Distribucija haplotipova *V. destructor* na C2c haplotipu *A. mellifera*

5.6.3.3.1. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cox1* sekvence

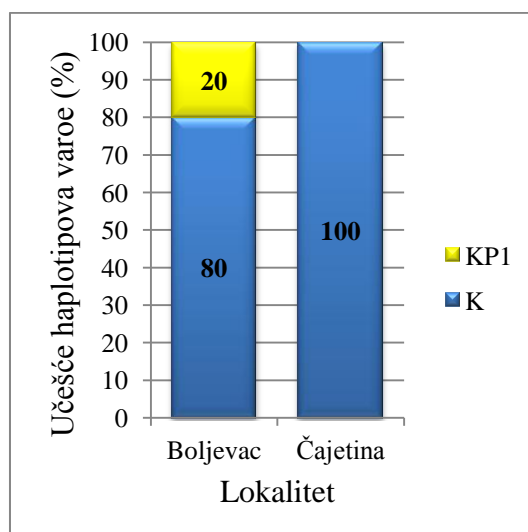
Na pčelama C2c haplotipa sa lokaliteta Boljevac i Čajetina utvrđeni su haplotipovi K, S1 i KS1 jedinke varoe (Grafikon 82). Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja, posmatrani lokaliteti nisu se statistički značajno razlikovali po strukturi haplotipova varoe na pčelama C2c haplotipa ($p=0,477$).



Grafikon 82. Distribucija haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cox1* sekvence na pčelama C2c haplotipa sa različitih lokaliteta

5.6.3.3.2. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom *cytb* sekvence

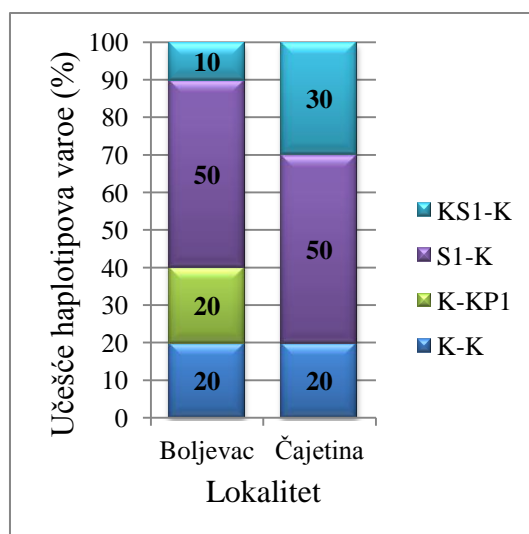
Na pčelama C2c haplotipa sa posmatranih lokaliteta utvrđeni su K haplotip i KP1 jedinke varoe (Grafikon 83). Na osnovu nivoa značajnosti kvadratnih Mahalanobis-ovih distanci, posmatrani lokaliteti nisu se statistički značajno razlikovali po strukturi haplotipova varoe na pčelama C2c haplotipa ($p=0,151$).



Grafikon 83. Distribucija haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom *cytb* sekvence na pčelama C2c haplotipa sa različitih lokaliteta

5.6.3.3.3. Distribucija haplotipova *V. destructor* utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci

Na pčelama C2c haplotipa sa lokaliteta Boljevac i Čajetina utvrđeni su haplotipovi K-K, S1-K i KS1-K jedinke varoe, dok su na lokalitetu Boljevac bile prisutne i K-KP1 jedinke (Grafikon 84). Utvrđeni nivo značajnosti kvadratnog Mahalanobis-ovog odstojanja ukazuje da se posmatrani lokaliteti nisu značajno razlikovali po strukturi haplotipova varoe na pčelama C2c haplotipa ($p=0,444$).



Grafikon 84. Distribucija haplotipova varoe i jedinki sa heteroplazmijom utvrđenih analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci na pčelama C2c haplotipa sa različitih lokaliteta

6. DISKUSIJA

Analizom dobijenih sekvenci tRNA^{leu}-cox2 intergenskog regiona *A. mellifera*, u našem istraživanju uočeno je šest polimorfniha mesta na osnovu kojih je identifikovano šest haplotipova pčela: C1a, C2c, C2d, C2e, C2i i C2aa. Prvih pet haplotipova bilo je opisano ranije u Srbiji i okolnim zemljama (Sušnik i sar., 2004; Muñoz i sar., 2009; Stevanovic i sar., 2010; Muñoz i sar., 2012), dok je haplotip C2aa opisan po prvi put u ovom istraživanju. Ovaj haplotip razlikuje se od referentne sekvence mtDNK *A. mellifera* (GenBank identifikacioni broj L06178) na osnovu delecije na poziciji 3431 i tranzicije C→T na poziciji 3575. Ovim nalazom, broj haplotipova pčela koji nastanjuju teritoriju Srbije dostigao je osam, što je znatno više u poređenju sa po jednim do sada utvrđenim haplotipom u Sloveniji i Makedoniji, dva u Albaniji i četiri u Hrvatskoj (Sušnik i sar., 2004; Muñoz i sar., 2009; Stevanovic i sar., 2010; Muñoz i sar., 2012). Ovako velika genetička raznolikost medonosne pčele u Srbiji može se tumačiti značajnom ulogom koju je ovaj deo Balkanskog poluostrva imao u opstanku velikog broja životinjskih vrsta za vreme perioda glacijacije u pleistocenu (Hewitt i sar., 1999). Osim toga, ne treba zanemariti ni antropogeni uticaj, imajući u vidu visok stepen komercijalne razmene matica.

Najzastupljeniji haplotip među analiziranim pčelama u našem istraživanju bio je C2d, čije je učešće u ukupnom uzorku iznosilo 50%, dok je odmah za njim sledio haplotip C2e koji je bio prisutan u 36% slučajeva. Haplotip C2c i C1a bili su zastupljeni sa 6%, odnosno 4%, dok su najmanje zastupljeni bili haplotipovi C2i i C2aa sa po 2%. Ovako neravnomeran odnos haplotipova uslovio je statistički veoma značajnu razliku u njihovoj zastupljenosti posmatrano u ukupnom uzorku, što je prvenstveno posledica prisustva haplotipova sa izuzetno visokim (C2d), odnosno izuzetno niskim učešćem (C2i i C2aa).

Razlike u prisutnim haplotipovima pčela uočene su i između lokaliteta, pri čemu je na tri lokaliteta utvrđen po jedan haplotip, na jednom lokalitetu dva haplotipa i na preostala četiri lokaliteta utvrđeno je po tri haplotipa pčela. Haplotip C2d je bio dominantno prisutan na svih šest lokaliteta na kojima je utvrđen (Palić, Beograd, Lapovo, Boljevac, Čajetina i Suvi Do). Ovakav nalaz je u saglasnosti sa rezultatima Muñoz i sar. (2012) koji su takođe utvrdili dominantno prisustvo C2d haplotipa u svim

ispitivanim regionima Srbije. Ovaj haplotip, koji je prvobitno utvrđen u istraživanju **Sušnik i sar.** (2004) u populacijama *A. m. macedonica* iz Grčke, a zatim i u društvima *A. m. carnica* sa jednog lokaliteta u Hrvatskoj (**Muñoz i sar., 2009**), bio je jedini ustanovljen u velikom broju analiziranih uzoraka *A. m. carnica* i *A. m. macedonica* iz Srbije, Bosne i Hercegovine i Makedonije (**Stevanovic i sar., 2010**). Velika zastupljenost C2d haplotipa u našem istraživanju može se tumačiti pretpostavkom da je on autohton za ovo područje Balkanskog poluostrva, od koga su mutacijama nastali ostali haplotipovi iz podgrupe C2, uključujući i novoopisani haplotip C2aa. Ukoliko se uporede sekvence dostupne u GenBank, jasno se uočava da se C2i i C2aa haplotipovi razlikuju od C2d na osnovu polimorfizma pojedinačnih nukleotida, dok C2e haplotip ima jednu deleciju više. S obzirom da je haplotip C2d zajednički za dve podvrste medonosne pčele u okviru C evolutivne linije (*A. m. carnica* i *A. m. macedonica*), kao i da je u istraživanju **Stevanovic i sar.** (2010) *A. m. macedonica* bila zastupljena u čak 65% ispitanih uzoraka iz Srbije, dominacija C2d haplotipa u našem istraživanju je potpuno razumljiva.

Haplotip C2e se u našem istraživanju pojavljivao samostalno na dva lokaliteta (Niš i Šaprance), dok je na svim ostalim lokalitetima na kojima je utvrđen bio manje zastupljen od C2d haplotipa (Beograd, Boljevac, Čajetina i Suvi Do). Ovaj haplotip prvobitno je otkriven u istraživanju **Muñoz i sar.** (2009) kao najzastupljeniji u društvima *A. m. carnica* iz priobalnih delova Hrvatske sa ukupnom učestalošću od 0,45. Niža zastupljenost u Srbiji u odnosu na susednu Hrvatsku ukazuje da je C2e haplotip *A. m. carnica* u Srbiju verovatno dospelo putem komercijalne trgovine maticama između pčelara dveju zemalja.

C2c haplotip otkriven je kao jedini u društvima *A. m. carnica* iz Slovenije i Hrvatske (**Sušnik i sar., 2004**). Njegovo prisustvo kasnije je ustanovljeno i u subpopulaciji *A. m. carnica* u južnom priobalju Hrvatske, ali sa učestalošću od svega 0,15 (**Muñoz i sar., 2009**). U našem istraživanju, ovaj haplotip utvrđen je na dva lokaliteta (Boljevac i Čajetina). Njegovo prisustvo na lokalitetu Boljevac u saglasnosti je sa prethodnim nalazom istog haplotipa u istočnoj Srbiji (**Muñoz i sar., 2012**), dok se njegovo prisustvo u Čajetini može tumačiti posledicom komercijalne trgovine maticama.

Haplotipovi C1a, C2i i C2aa su u našem istraživanju pronađeni na po jednom lokalitetu (Palić, Beograd i Suvi Do). Haplotip C1a je karakterističan za podvrstu *A. m. ligustica* i dominantan je haplotip pčela u Italiji, dok njegova učestalost u primorskom delu Hrvatske iznosi 0,35 (Muñoz i sar., 2009). U Srbiji je u prethodnim istraživanjima pronađen na samo jednom lokalitetu u Timočkom regionu (Muñoz i sar., 2012), što se, kao i kod našeg nalaza ovog haplotipa na lokalitetu Palić, može tumačiti unošenjem *A. m. ligustica*, podvrste medonosne pčele koja je zbog svojih pozitivnih karakteristika u prošlosti bila intenzivno izvožena iz Evrope u druge delove sveta (Franck i sar., 2000a).

Haplotip C2i je prvobitno utvrđen u društvima *A. m. macedonica* iz Grčke (Muñoz i sar., 2009), a kasnije je pronađen u Albaniji, kao i na lokalitetima u Banatu i Timočkom regionu (Muñoz i sar., 2012). U našem istraživanju, ovaj haplotip utvrđen je samo na eksperimentalnom pčelinjaku sa lokaliteta Beograd, koga odlikuju pčelinja društva čije su matice poreklom iz različitih delova Srbije.

Novoopisani haplotip C2aa pronađen je samo u jednoj košnici sa lokaliteta Suvi Do, koji se nalazi na Peštorskoj visoravni. S obzirom da ovu čitavu oblast odlikuju specifične geo-klimatske osobine, stacionarni način pčelarenja, kao i prisustvo autohtonih eko- i haplotipova pčela (Stanimirović i sar., 2005a,b; Muñoz i sar., 2012), Peštorska visoravan se može smatrati geografskim područjem sa jedinstvenim diverzitetom *A. mellifera* u Srbiji, što bi trebalo iskoristiti u nacionalnim programima zaštite autohtonih genetičkih resursa i selekcije. Imajući u vidu malu geografsku i procentualnu zastupljenost haplotipova C1a, C2c, C2i i C2aa, najverovatnije je da su oni na teritoriji Srbije prisutni znatno kraće od više zastupljenih haplotipova C2d i C2e, ili su od njih manje prilagođeni na uslove koji vladaju u ovom delu Balkanskog poluostrva. Ipak, za razliku od prethodnog istraživanja gde je genetička raznovrsnost *A. mellifera* praćena na osnovu pojedinačnih uzoraka sa različitih lokaliteta (Muñoz i sar., 2012), u našem istraživanju pčele su poticale iz više različitih košnica (dve do šest) sa istog pčelinjaka. Ovakvim dizajnom eksperimenta bilo je moguće utvrditi i postojanje međupopulacijske varijabilnosti na nivou lokaliteta, koja nije registrovana u opsežnoj studiji Stevanovic i sar. (2010), iako je analizirano po 10 košnica sa svakog ispitivanog lokaliteta.

Najviše analiziranih pčela u našem istraživanju poticalo je sa nadmorske visine do 200 m, nešto manje sa visine 201-500 m i 501-1000 m, a najmanje sa lokaliteta preko 1000 m nadmorske visine. Međutim, statističkom analizom podataka ustanovljeno je da raspored haplotipova pčela ne zavisi statistički značajno od nadmorske visine. Ovakav nalaz je očekivan ukoliko se ima u vidu da se uzete kategorije nadmorske visine nalaze u relativno malom opsegu, s obzirom da u Srbiji ne postoje izrazito visoki planinski venci. U prilog ovoj pretpostavci idu rezultati istraživanja **Quezada-Euán i sar.** (2003) koji su utvrdili da stepen hibridizacije u populacijama evropskih i afrikanizovanih pčela *A. mellifera* zavisi od nadmorske visine, pri čemu su uzorci poticali iz različitih regiona Perua čija je nadmorska visina bila u opsegu 0-3500 m.

Kada je reč o varijabilnosti pčelinjeg krpelja *V. destructor*, naša inicijalna analiza sekvenci *atp6-cox3* gena nije pokazala nikakva odstupanja od referentne sekvence za K haplotip, tako da je ispitivanje genetičke varijabilnosti *V. destructor* nastavljeno je isključivo na osnovu *cox1* i *cytb* sekvenci. Kod pojedinih uzoraka, ove dve sekvence su bile potpuno identične sa odgovarajućim referentnim sekvencama za K haplotip, koji je bio jedini utvrđeni haplotip varoe u uzorcima iz bivše Jugoslavije (**Anderson i Trueman, 2000**). Međutim, kod nekih uzoraka u našem istraživanju, analizom 376 bp i 929 bp dugih sekvenci *cox1* gena utvrđen je nukleotidni polimorfizam u tipu tranzicije (A→G) na poziciji 1932 ukupne mtDNK, pri čemu su jedinke sa ovom tačkastom mutacijom svrstane u novi haplotip nazvan Srbija 1 (S1). U prilog nedvosmislenom postojanju ove mutacije, osim što su identični rezultati dobijeni sekvencioniranjem u oba smera, ide i nalaz polimorfnog nukleotida u obe (376 bp i 929 bp) analizirane sekvence *cox1* gena.

Slična situacija zabeležena je i prilikom analize 985 bp duge sekvence *cytb* gena, u kojoj je tačkasta mutacija, takođe u tipu tranzicije (G→A), ustanovljena na poziciji 10133. Ovakve jedinke svrstane su u novi haplotip pod nazivom Pešter 1 (P1). Značajno je napomenuti da utvrđeni nukleotidni polimorfizmi u *cox1* i *cytb* sekvencama spadaju u „tihe“ mutacije, koje ne dovode do promene aminokiselinske sekvence, što je potpuno u skladu sa funkcionalnim značajem proteina koje kodiraju.

Nalaz novih haplotipova varoe u Srbiji u ovom istraživanju demantuje tvrdnju o odsustvu varijabilnosti unutar sekvenci karakterističnih za K i J haplotip (**Solignac i**

sar., 2005), kao i o ekstremnom odsustvu polimorfizma *V. destructor* izvan Azije (Navajas i sar., 2010), koji se tumačio posledicom genetičkog „uskog grla“ nastalog pre i nakon prelaska parazita sa *A. cerana* na *A. mellifera*. Osim toga, varijabilnost u okviru sekvence *cytb* gena koja postoji kod P1 haplotipa, nije utvrđena ni kod jednog od haplotipova *V. destructor* iz K haplogrupe pronađenih na *A. mellifera* u Aziji (Navajas i sar., 2010).

Uvidom u hromatograme pojedinih uzoraka varoe za *cox1*, odnosno *cytb* sekvencu, na polimorfnim pozicijama koje definišu S1 i P1 haplotipove utvrđeni su dupli pikovi karakteristični za haplotipove K i S1, odnosno K i P1. Ovakva pojava, koja se manifestuje prisustvom različitih molekula mtDNK u istom organizmu, poznata je pod nazivom heteroplazmija i ranije je opisana kod nekih vrsta insekata i akarina (Salignac i sar., 1983; Paduan i Ribolla, 2008; Van Leeuwen i sar., 2010; Xiong i sar., 2013). U skladu sa dobijenim rezultatima, varoe koje su bile nosioci K i S1 haplotipova označene su kao KS1 jedinke, dok su one sa haplotipovima K i P1 nazvane KP1 jedinke. Međutim, iako su preliminarna istraživanja varijabilnosti mtDNK *V. destructor* sugerisala postojanje heteroplazmije koja se odlikuje prisustvom mtDNK molekula različite dužine (Navajas i sar., 2002), u našem istraživanju je po prvi put utvrđena nukleotidna heteroplazmija kod ove vrste parazita. Različita visina pikova na varijabilnim pozicijama, koja je uočena kod većine heteroplazmičnih jedinki, najverovatnije je posledica razlike u broju mtDNK molekula koji pripadaju određenom haplotipu.

Nakon što su sekvencioniranjem utvrđene tačkaste mutacije u sekvencama *cox1* i *cytb* gena, za identifikaciju haplotipova svih 245 uzoraka *V. destructor* i detekciju jedinki sa heteroplazmijom korišćena je ARMS, odnosno RFLP metoda.

ARMS metoda, koja je namenjena za utvrđivanje bilo koje poznate tačkaste mutacije u DNK (Newton i sar., 1989), korišćena je u našem istraživanju za razlikovanje haplotipova varoe na osnovu polimorfnog mesta na poziciji 1932 u okviru *cox1* sekvence i detekciju *cox1* heteroplazmije. Međutim, s obzirom da nekomplementarni A/C i G/T nukleotidi nisu potpuno refraktarni na ekstenziju koja bi u idealnom slučaju trebalo da bude apsolutna (Newton i sar., 1989), identifikacija haplotipova nije bila moguća korišćenjem BG-K i BG-S1 alel-specifičnih prajmera na tačno određenoj Ta. Kako bi se uz pomoć rastućih Ta povećala specifičnost dizajniranih

alel-specifičnih prajmera (Newton i sar., 1989; Kwok i sar., 1990), za identifikaciju haplotipova korišćen je gradijentni ARMS PCR. U ovakvim uslovima, amplifikacija je do određene Ta uspevala sa oba „forward“ prajmera, nakon čega je izostajala sa nespecifičnim, a nastavljala sa haplotip-specifičnim „forward“ prajmerom.

Na uspeh amplifikacije uticala je i koncentracija $MgCl_2$, koja se smatra jednim od kritičnih parametara za izvođenje PCR (Markoulatos i sar., 2002). Povećanje koncentracije magnezijumovih jona u našem istraživanju dovelo je do smanjenja specifičnosti alel-specifičnih prajmera, pri čemu je dolazilo do povećanja prinosa DNK i temperature anilinga poslednje uspešne amplifikacije. Zbog toga, finalna koncentracija $MgCl_2$ u ARMS PCR reakciji iznosila je 1,5 mM i poticala je isključivo iz korišćenog KAPA Taq pufera.

Identifikacija haplotipova RFLP metodom na osnovu *cytb* sekvence ostvarena je zahvaljujući tome što tranzicija G→A na poziciji 10133 kod P1 haplotipa varoe stvara novo restrikciono mesto za *AseI* (*VspI*) restrikcioni enzim, a koje nedostaje kod K haplotipa. Zbog toga je RFLP obrazac karakterističan za K haplotip podrazumevao jednu traku dužine 226 bp, dok su kod P1 haplotipa postojale dve trake, dužine 168 bp i 58 bp. Osim što su omogućili specifičnu amplifikaciju, novodizajnirani prajmeri za 226 bp dugu *cytb* sekvencu omogućili su značajno bolju rezoluciju RFLP obrasca na gelu za P1 haplotip, nego da se *AseI* (*VspI*) restrikcioni enzim primenjivao na 985 bp dugu sekvencu *cytb* gena, koja je amplifikovana prajmerima iz ranijih istraživanja (Solignac i sar., 2005; Navajas i sar., 2010).

Kod jedinki sa duplim pikovima u *coxI* sekvenci (KS1 jedinke), ARMS PCR reakcija uspevala je na istoj Ta sa oba alel-specifična prajmera. Kod pojedinih heteroplazmičnih uzoraka, poslednji vidljivi amplikoni na gelu davali su trake različitog intenziteta, koji je bio u korelaciji sa odnosom visine pikova na hromatogramu. U takvim slučajevima, gradijentna ARMS PCR metoda mogla bi se smatrati semikvantitativnom, iako u našoj studiji nije vršena kvantifikacija različitih haplotipova pomoću real-time ARMS PCR (Bai i Wong, 2004; Nunes i sar., 2013).

Kod jedinki sa duplim pikovima u *cytb* sekvenci (KP1 jedinke), RFLP metodom na gelu dobijen je obrazac sa trakama dužine 226 bp, 168 bp i 58 bp. Nakon restrikcije *cytb* sekvence određenog broja heteroplazmičnih jedinki, dobijene trake dužine 226 bp i 168 bp bile su različitog intenziteta, koji je odgovarao odnosu u visini pikova na

hromatogramu. Ovakav naš nalaz ukazuje na to da, kod KP1 uzoraka sa različitim brojem kopija mtDNA molekula K i P1 haplotipa, RFLP metoda takođe može biti semikvantitativna.

S obzirom da su nalazi dobijeni ARMS i RFLP metodom bili u potpunoj saglasnosti sa rezultatima koji su za iste uzorke dobijeni sekvencioniranjem *cox1* i *cytb* sekvenci, možemo konstatovati da su se obe metode pokazale kao potpuno pouzdane, kako u identifikaciji haplotipova *V. destructor*, tako i u detekciji heteroplazmije. Osim toga, obe korišćene metode su vrlo ekonomične, s obzirom na to da za njihovo izvođenje nije potrebno sprovesti purifikaciju dobijenih *cox1* i *cytb* amplikona. Gradijentne ARMS PCR reakcije imale su zapreminu 10 µl, tako da izvođenje po pet reakcija za svaki alel-specifični primer (ukupno 100 µl master miksa po identifikovanom uzorku) nije značajno poskupljivalo tipizaciju uzorka u odnosu na standardnu PCR reakciju.

Tačkaste mutacije i dupli pikovi koji su kod određenog broja uzoraka bili uočeni na haplotip-definišućim pozicijama u okviru *cox1* i *cytb* sekvenci, pronađeni su isključivo kod različitih jedinki. Kada se ove sekvence analiziraju odvojeno, kod jedinki bez mutacije u jednoj od sekvenci, druga analizirana sekvenca je mogla da bude nepromenjena, mutirana, ili sa sa duplim pikovima. Međutim, kod jedinki sa mutacijom ili heteroplazmijom u jednoj analiziranoj sekvenci, druga je uvek bila bez mutacije, odnosno identična sa referentnom sekvencom za K haplotip. Ovakav nalaz upućuje na zaključak da su mutacije u sekvencama *cox1* i *cytb* nastale potpuno nezavisno jedna od druge i to u dve različite populacije *V. destructor*, kao što je u istraživanju **Navajas i sar.** (2010) utvrđeno za K i J haplotipove na *A. mellifera* u Aziji.

Verovatnoća da su mutacije u *cox1* i *cytb* nastale nezavisno u nekoliko (više od dve) različitih populacija varoe je gotovo zanemarljiva, jer su dupli pikovi kod svih heteroplazmičnih jedinki detektovani isključivo na varijabilnim pozicijama koje služe za definisanje S1 i P1 haplotipova. Sa druge strane, ukoliko bi takve jedinice vodile poreklo iz samo jedne populacije varoa, u uzorcima iz našeg istraživanja svakako bi bile detektovane i jedinice sa istovremenim mutacijama u obe analizirane sekvence, sa mutacijom u jednoj i duplim pikovima u drugoj sekvenci, odnosno jedinice sa duplim pikovima na obe polimorfne pozicije. Ovakav zaključak o nezavisnom nastanku mutacija potpuno opravdava istraživački pristup koji je primenjen u ovoj studiji, a koji

se zasniva na analizama varijabilnosti i pojedinačnih i spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci *V. destructor*.

Heteroplazmija mtDNK može nastati mutacijom (Chinnery i sar., 2000), „curenjem“ mtDNK oca (*engl.* paternal leakage) (Lansman i sar., 1983) ili kao posledica postojanja jedarnih kopija mitohondrijalnih gena (NUMTs) (Smith i sar., 1992). Iako je poznato da NUMTs postoje kod nekih grupa insekata (Sunnucks i Hales 1996; Vaughan i sar., 1999), oni do sada nisu utvrđeni ni kod jedne vrste iz reda Acarina (Bensasson i sar., 2001; Tixier i sar., 2012). Ostaje da se istraži da li je uočena heteroplazmija kod varoe posledica „curenja“ mtDNK mužjaka, što je ranije potvrđeno kod nekih vrsta insekata (Fontaine i sar., 2007; Nunes i sar., 2013). Takođe, s obzirom na to da su za izolaciju DNK korišćene cele jedinke varoe, ne možemo biti sigurni da li kod ove vrste parazita postoji tkivno specifična heteroplazmija koja je opisana kod *Drosophila subobscura* (Lecher i sar., 1994) ili možda tkivna segregacija haplotipova kao što je utvrđeno kod nekih vrsta pčela sa Havaja (Magnacca i Brown, 2010). Osim toga, specifično reproduktivno ponašanje varoe koje karakteriše parenje u najužem srodstvu unutar zatvorene satne ćelije sa leglom (Donzé i Guerin, 1994), kao i veoma visoka verovatnoća unakrsnog parenja u višestruko infestiranim satnim ćelijama (Donzé i sar., 1996), otežavaju objašnjenje nukleotidne heteroplazmije kod *V. destructor*. U cilju utvrđivanja porekla ove pojave kod odraslih ženki varoe, neophodne su buduće analize koje bi uključivale sve razvojne stadijume ovog parazita iz zatvorenog pčelinjeg legla.

Van Leeuwen i sar. (2008) su pokazali da je rezistencija grinje *Tetranychus urticae* na insekticid bifenazat bila u visokoj korelaciji sa tačkastim mutacijama u *cytb* genu i povezana sa jedinkama kod kojih je utvrđena heteroplazmija. Iako nukleotidni polimorfizmi u *cox1* i *cytb* sekvencama iz našeg istraživanja nisu doveli do promene aminokiselinske sekvence, ne možemo isključiti postojanje tačkastih mutacija unutar ostalih mitohondrijalnih protein-kodirajućih gena koji bi bili odgovorni za rezistenciju *V. destructor* na neke akaricide. U prilog ovakvoj pretpostavci ide istraživanje Nunes i sar. (2013) koji su analizom dodatnih šest mtDNK fragmenata utvrdili heteroplazmiju kod jedinki *Drosophila melanogaster*, a koje su na osnovu analize *cox1* sekvence prethodno označene kao homoplazmične.

Nakon analize svih 245 uzoraka varoe ARMS metodom, utvrđeno je 48,2% jedinki K haplotipa, 31,8% jedinki S1 haplotipa i 20,0% jedinki sa duplim pikovima u *cox1*. Rezultati dobijeni RFLP metodom pokazali su da je 83,7% jedinki pripadalo K haplotipu, 4,5% jedinki P1 haplotipu, dok je 11,8% varoa imalo duple pikove u *cytb*. Iz dobijenih rezultata uočava se znatno manji broj varoa bez mutacije i heteroplazmije na osnovu *cox1* (48,2%) nego što je to bio slučaj na osnovu sekvence *cytb* (83,7%). Takođe, broj jedinki S1 haplotipa, odnosno onih sa *cox1* heteroplazmijom (31,8% i 20,0%) bio je znatno veći od odgovarajućih vrednosti dobijenih analizom *cytb* sekvence (4,5% i 11,8%). Ovakav rezultat upućuje na zaključak da je *cox1* sekvenca podložnija mutacijama od *cytb*, odnosno da su jedinke S1 haplotipa na ovom prostoru prisutne u znatno dužem vremenskom periodu od jedinki P1 haplotipa. Takođe, nalaz malog broja jedinki P1 haplotipa, kao i onih sa *cytb* heteroplazmijom, sugerise da je mutacija u ovom genu mogla nastati kasnije od one unutar *cox1* sekvence, što je uzrok njihove manje zastupljenosti u ukupnom uzorku i manje geografske distribucije. Međutim, postoje izražene razlike u međusobnom odnosu između jedinki S1 haplotipa i KS1 jedinki, odnosno između P1 haplotipa i KP1 jedinki. Posmatrajući *cox1* sekvencu, ovaj odnos iznosi 1,59:1, dok je za *cytb* on svega 0,38:1. **Nunes i sar.** (2013) su procenjivali vreme izraženo u generacijama koje je potrebno da svi potomci jedne ženke *D. melanogaster* sa heteroplazmijom dostignu stanje homoplazmije, koje bi u našem slučaju odgovaralo čistim S1 i P1 haplotipovima. Pomenuti autori su izračunali da je za potpunu segregaciju haplotipova i povratak u homoplazmiju neophodno najmanje 100 generacija insekata, što znači da se heteroplazmija u populacijama može održavati tokom dugog vremenskog perioda. Na osnovu toga, dobijeni odnos između P1 haplotipa i KP1 jedinki mogao bi se pripisati kasnijem nastanku mutacije u *cytb* nego u *cox1* sekvenci, što bi značilo da još uvek nije prošlo dovoljno vremena za potpuno razdvajanje haplotipova. Svakako, treba imati u vidu da se ovde radi o jednom dinamičnom procesu, jer je učestalost heteroplazmije rezultat ravnoteže između „curenja“ mtDNK oca, nastanka novih jedinki sa heteroplazmijom i povratka u homoplazmično stanje (**Nunes i sar., 2013**).

Istraživanja koja su se bavila pojavom heteroplazmije najčešće su sprovedena na različitim vrstama insekata. Visoka frekvencija heteroplazmije u našem istraživanju u suprotnosti je sa nalazima **Paduan i Ribolla** (2008) koji su utvrdili značajnu

varijabilnost jedinki komaraca *Aedes aegypti* u Brazilu, ali i nisku učestalost heteroplazmije, koja je otkrivena kod svega tri uzorka (2,4%). Međutim, naši nalazi slični su rezultatima **Nunes i sar.** (2013) koji su u populacijama *D. melanogaster* utvrdili heteroplazmiju kod 14% jedinki, kao i rezultatima **Robison i sar.** (2015) koji su jedinke sa više od jednog haplotipa mtDNK pronašli u 17% analiziranih populacija *Cimex lectularius*.

Imajući u vidu da je u našem istraživanju po prvi put otkrivena nukleotidna heteroplazmija kod varoe, visoku zastupljenost heteroplazmičnih jedinki utvrđenu u ukupnom uzorku, kao i specifičan način razmnožavanja ovog parazita koji podrazumeva najviši stepen inbridinga (**Donzé i Guerin, 1994**), vrsta *V. destructor* mogla bi da posluži kao model-takson za proučavanje mehanizma nastanka, prenošenja i održavanja heteroplazmije, kao i za mogući uticaj ove pojave na mehanizme delovanja akaricida i odnos domaćin-parazit.

Izostanak mutacije, odnosno duplih pikova u obe analizirane sekvence, utvrđen je kod svega 31,84% jedinki varoe. Međutim, 16,33% jedinki bilo je bez mutacije *cox1*, ali ne i *cytb*, dok je 51,84% bilo bez mutacije *cytb*, ali ne i *cox1* sekvence. Na osnovu ovih rezultata utvrđeno je da pojavljivanje mutacije statistički vrlo značajno zavisi od sekvence analiziranog gena varoe, pri čemu je kod znatno većeg broja jedinki ona utvrđena u fragmentu *cox1* nego *cytb* gena. S obzirom da se kod svih jedinki sa heteroplazmijom, osim pika karakterističnog za sekvencu S1 ili P1 haplotipa, na polimorfnim pozicijama nalazio i pik koji odgovara K haplotipu, zaključuje se da novootkriveni haplotipovi najverovatnije potiču od jedinki K haplotipa.

Međutim, iznenađujuće je to što je na osnovu analize spojenih sekvenci, svega oko jedne trećine naših uzoraka (31,8%) pripadalo K-K haplotipu, koji je bio dominantan u gotovo svim prethodnim istraživanjima varijabilnosti *V. destructor* izvan Azije (**Anderson i Trueman, 2000; Garrido i sar., 2003; Solignac i sar., 2005; Muñoz i sar., 2008**). Takođe, uočava se da su jedinke S1-K haplotipa u ukupnom uzorku bile identično zastupljene kao one K-K haplotipa (31,8%), a da je većina analiziranih uzoraka (68,1%) u našoj studiji pripadala nekom od novoopisanih haplotipova ili jedinkama sa heteroplazmijom. Ovaj nalaz pokazuje da je čist K haplotip, koji je jedini pronađen u uzorcima iz bivše Jugoslavije (**Anderson i Trueman, 2000**), danas zapravo potisnut od strane haplotipova S1 i P1, odnosno jedinki sa

heteroplazmijom. Promene u zastupljenosti određenih haplotipova *V. destructor* tokom vremena nisu neuobičajene. Ovu pojavu pratili su **Garrido i sar.** (2003), koji su nekoliko godina nakon detekcije K i J haplotipova u Brazilu, konstatovali samo prisustvo K haplotipa.

Analizirajući *cox1* sekvencu, uočava se da su jedinke K i S1 haplotipa i jedinke sa heteroplazmijom pronađene na svim ispitivanim lokalitetima. Ovi rezultati u saglasnosti su sa istraživanjem **Gajic i sar.** (2013), u kome su jedinke K haplotipa takođe bile prisutne na svim lokalitetima. Međutim, pomenuti autori utvrdili su prisustvo S1 jedinki na svega pet od devet ispitivanih lokaliteta, dok jedinke sa heteroplazmijom uopšte nisu detektovane.

Rezultati analize *cytb* sekvence u našem istraživanju utvrdili su prisustvo varoa K haplotipa i KP1 jedinki na svih osam lokaliteta, dok su na svega četiri lokaliteta bile prisutne varoe P1 haplotipa. Ovako niska frekvencija P1 haplotipa čini ga ujedno i najmanje zastupljenim haplotipom u našem istraživanju. Osim toga, interesantno je da su varoe P1 haplotipa na svim lokalitetima bile praćene jedinkama sa duplim pikovima u *cytb*, dok su KP1 jedinke na ostalim lokalitetima pronađene nezavisno od jedinki P1 haplotipa. Varoe P1 haplotipa utvrđene su i u studiji **Gajic i sar.** (2013), ali su one pronađene na samo jednom lokalitetu, verovatno zbog toga što *cytb* sekvenca za ostale uzorke nije bila analizirana.

Slični rezultati distribucije haplotipova varoe dobijeni su i analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci, pri čemu su na svih osam lokaliteta utvrđeni K-K, S1-K haplotipovi i jedinke sa *cox1* ili *cytb* heteroplazmijom, dok su varoe K-P1 haplotipa bile prisutne na samo četiri lokaliteta. Iako rezultati testiranja odvojenih *cox1* i *cytb* sekvenci ukazuju da se strukture haplotipova nisu značajno razlikovale na lokalitetima posmatranim istovremeno, statistička značajnost je utvrđena na osnovu analize spojenih sekvenci, najviše zahvaljujući ograničenoj zastupljenosti K-P1 haplotipa. Ipak, ostaje nejasno zašto samo jedinke K-P1 haplotipa nisu bile zastupljene na svim ispitivanim lokalitetima, kao što je to bio slučaj sa ostalim haplotipovima i jedinkama sa heteroplazmijom. Manja zastupljenost S1 haplotipa i izostanak detekcije KS1 i KP1 jedinki u istraživanju **Gajic i sar.** (2013) mogu se tumačiti manjim brojem analiziranih jedinki varoe po lokalitetu, što je za posledicu neminovno imalo i manju reprezentativnost uzorka.

Imajući u vidu visoku frekvenciju heteroplazmičnih jedinki na svim ispitivanim lokalitetima u Srbiji, iznenađujuće je što u prethodnim istraživanjima varijabilnosti mtDNK *V. destructor* nisu utvrđene jedinke sa heteroplazmijom. Registrovanje ove pojave izostalo je nezavisno od broja i dužine analiziranih mtDNK sekvenci (šest sekvenci ukupne dužine 5185 bp, odnosno četiri sekvence ukupne dužine 2700 bp u radu **Solignac i sar., 2005**, odnosno **Navajas i sar., 2010**). Takođe, detekcija nukleotidne heteroplazmije kod *V. destructor* nije zavisila od toga da li je DNK izolovana iz pojedinačnih (**Zhou i sar., 2004; Solignac i sar., 2005; Muñoz i sar., 2008; Navajas i sar., 2010**) ili zbirnih uzoraka odraslih ženki varoe (**Maggi i sar., 2012**). Polazeći od stanovišta da na *A. mellifera* izvan Azije parazitiraju samo K i J haplotipovi *V. destructor*, ali i zbog ekonomičnosti, tipizacija većine ili svih uzoraka u pojedinim istraživanjima vršena je RFLP metodom, a ne sekvencioniranjem (**Zhou i sar., 2004; Solignac i sar., 2005; Muñoz i sar., 2008**). U tom slučaju, novi haplotip, odnosno mtDNK heteroplazmija, mogli su da budu otkriveni jedino ukoliko je nova mutacija nastala na samom restrikcionom mestu, za šta postoji zanemarljiva verovatnoća.

Novija istraživanja koja su se bavila proučavanjem heteroplazmije u populacijama različitih vrsta insekata, sugerišu da je glavni način prenošenja ove pojave „curenje“ očeve mtDNK (**Paduan i Ribolla, 2008; Nunes i sar., 2013; Robison i sar., 2015**). Ipak, ovaj mehanizam prenošenja heteroplazmije može se uočiti jedino ukoliko se sekvence mtDNK oca i majke razlikuju, odnosno ukoliko roditelji pripadaju različitim haplotipovima (**Nunes i sar., 2013**). Utvrđivanje nukleotidne heteroplazmije kod *V. destructor* izostalo je i na prostorima gde se K i J haplotipovi mogu naći zajedno, što može biti posledica postzigotične izolacije između dva klona (**Solignac i sar., 2005**).

U najvećem broju posmatranih košnica, analizom *cox1* sekvence utvrđeno je istovremeno prisustvo K i S1 haplotipova sa KS1 jedinkama. Iako su postojale košnice sa čistim S1 haplotipom, nisu utvrđene one sa jedinkama čistog K haplotipa. Osim toga, nisu utvrđene ni košnice u kojima su bile samo jedinke S1 haplotipa sa KS1 jedinkama. Ovaj nalaz sugeriše da su varoe bez mutacije *cox1* sekvence zastupljene znatno manje nego što se ranije mislilo. Analiza sekvence *cytb* pokazala je prisustvo K haplotipa u većini košnica, bilo samostalno ili u kombinaciji sa P1 ili KP1 jedinkama, dok su

haplotipovi K i P1 bili istovremeno prisutni u samo jednoj košnici na lokalitetu Čajetina.

Analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci uočena je značajna razlika u strukturi haplotipova između košnica na lokalitetu Beograd, kao i između košnica na lokalitetu Čajetina. Istovremeno prisustvo različitih haplotipova varoe u istim košnicama ukazuje da je koegzistencija haplotipova prirodno stanje u društvima *A. mellifera* u Srbiji, iako slična situacija do sada nije utvrđena u drugim zemljama.

Značajno je pomenuti da su jedinke sa *cox1* ili *cytb* heteroplazmijom pronađene u većini košnica na svim ispitivanim lokalitetima. Ovaj nalaz je u suprotnosti sa rezultatima **Robison i sar.** (2015), koji su heteroplazmične jedinke *C. lectularius* otkrili isključivo u populacijama insekata sa različitih lokaliteta. Takođe, naši rezultati ukazuju da postojanje jedinki *V. destructor* sa heteroplazmijom ne zavisi od karakteristika lokaliteta.

Dizajn eksperimenta koji je primenjen u našem istraživanju omogućio je, osim praćenja međupopulacijske (između različitih lokaliteta, odnosno različitih košnica), i sagledavanje unutarpopulacijske varijabilnosti *V. destructor* (unutar istih košnica). U većini prethodnih studija nije bilo moguće ispitivanje unutarpopulacijske varijabilnosti zbog uzorkovanja pojedinačnih varoa po košnici. Nalaz značajne među- i unutarpopulacijske varijabilnosti varoa u našoj studiji u suprotnosti je sa rezultatima drugih autora (**Zhou i sar., 2004; Navajas i sar., 2010; Maggi i sar., 2012**), koji su u svim društvima *A. mellifera* sa jednog lokaliteta utvrdili isti haplotip varoe. Međutim, naši rezultati u saglasnosti su sa nalazima **de Guzman i sar.** (1999) koji su utvrdili varoe K i J haplotipa, kako unutar istih, tako i unutar različitih košnica na jednom lokalitetu. Unutarpopulacijska varijabilnost utvrđena u našem istraživanju mogla bi da bude posledica selidbene tehnike pčelarenja koja se uveliko primenjuje u Srbiji. Veliki broj pčelinjih društava po jedinici površine za vreme pčelinje paše može doprineti lakšem širenju različitih haplotipova varoe za vreme grabeži pčela ili prelaskom pčela izletnica u druge košnice (**Frey i sar., 2011**).

Nalaz samo jedne varoe J haplotipa zajedno sa jedinkama K haplotipa u košnici sa jednog pčelinjaka opisan je od strane **Muñoz i sar.** (2008), a ova pojava protumačena je kao rezultat nekontrolisanog uvoza matica sa američkog kontinenta. Međutim, istovremeno prisustvo različitih haplotipova *V. destructor* i jedinki sa heteroplazmijom

na različitim lokalitetima i košnicama u Srbiji, ukazuje na dugotrajno prisustvo novih haplotipova na ovom prostoru. Ovakvi rezultati ukazuju na neophodnost uzorkovanja više od jedne varoe po košnici, odnosno lokalitetu, kako bi se stekao bolji uvid u među- i unutarpopulacijsku varijabilnost. Ipak, velika rasprostranjenost novih haplotipova na teritoriji Srbije, kao i nalaz S1 haplotipa u arhivskim uzorcima koji su poticali iz 1992. godine (**Gajic i sar., 2013**), ne govori nam o tome da li su oni kao takvi dospeli infestiranim pčelinjim društvima, ili su mutacije nastale na ovom području Balkanskog poluostrva. Nedavna istraživanja pokazala su visoku prevalenciju pčelinjih virusa u društvima *A. mellifera* širom Srbije (**Petrović i sar., 2013; Simeunović i sar., 2014; Simeunović, 2015**). Iako je *V. destructor* kosmopolitski rasprostranjen parazit i ima ulogu mehaničkog i/ili biološkog vektora za neke viruse pčela (**Genersch i Aubert, 2010**), ne može se sa sigurnošću tvrditi da li i kakav uticaj pomenuti virusi imaju na fiziološke funkcije i naslednu osnovu samog pčelinjeg krpelja. Poznato je da određene familije parazitskih osa u svom genomu mogu imati integrisane nukleinske kiseline virusa iz familije Polydnviridae, koji u domaćinu podležu genomskoj i funkcionalnoj evoluciji (**Herniou i sar., 2013**). Takođe, zna se da određeni retrovirusi i papovavirusi životinja mogu dovoditi do mutageneze stvaranjem prekida u DNK domaćina, odnosno do zamene nukleotidnih parova još uvek nerazjašnjenim mehanizmom (**Geissler i Theile, 1983**). Iako u literaturi za sada ne postoje podaci o mutagenom delovanju virusa na mtDNK domaćina, moguće je da su novi haplotipovi *V. destructor* u Srbiji i jedinke sa heteroplazmijom nastali kao posledica delovanja nekog od velikog broja pčelinjih virusa koji se dugo vremena nalaze u koegzistenciji sa varoom. Kako bi pčelinja društva infestirana varoom preživela, u područjima sa umerenom klimom neophodno je primenjivati periodične tretmane protiv varoe (**Boecking i Genersch, 2008; Rosenkranz i sar., 2010**). Međutim, sintetski akaricidi koji se često koriste u Srbiji (amitraz, cimiazol hidrohlorid) pokazali su genotoksična svojstva u različitim testovima sprovedenim *in vivo* i *in vitro* (**Stanimirović i sar., 2003a, 2005b; Pejin i sar., 2006; Radakovic i sar., 2013**). S obzirom na visoku prevalenciju mikrosporidije *N. ceranae* u pčelinjim društvima na teritoriji Srbije (**Stevanovic i sar., 2011a; 2013**), ne treba zanemariti ni uticaj antibiotika fumagilina koji se koristi u terapiji nozemoze pčela, a čija je genotoksičnost ustanovljena u *in vivo* uslovima (**Stanimirovic i sar., 2007**). Reaktivne kiseonične vrste (ROS) koje obuhvataju molekule sa nesparenim elektronom,

prirodno se stvaraju u transportnom lancu elektrona, zbog čega su mitohondrije najviše izložene njihovom štetnom delovanju (Murphy, 2009). Iako u mitohondrijama postoje antioksidativni mehanizmi (Zhang i sar., 2007; Jones, 2008), akaricidi koji poput amitraza oštećuju DNK mehanizmom stvaranja ROS (Radakovic i sar., 2013) mogu prevazići antioksidativni kapacitet mitohondrija i izazvati oksidativni stres. S obzirom na to da se molekuli mtDNK nalaze u blizini transportnog lanca elektrona (Ozawa, 1999), neposredno su izloženi mogućim oštećenjima, odnosno ROS-posredovanim mutacijama. Dokazano je da hemijska sredstva u obliku fungicida, herbicida i insekticida dovode do različitih oštećenja jedarne DNK kod radnika koji su im profesionalno izloženi (Benedetti i sar., 2013). Takođe, kod radnika na plantažama voća koji su nekoliko godina bili neprekidno izloženi udisanju različitih pesticida, ustanovljena je značajno povećana učestalost somatskih mutacija mtDNK u uzorcima plućnog tkiva, pri čemu je u 66,7% slučajeva uočena heteroplazmija (Wang i Zhao, 2012). Visoka stopa mutacija mtDNK u pomenutom istraživanju protumačena je od strane autora posledicom metabolisanja pesticida nakon apsorpcije, pri čemu dolazi do stvaranja ROS i nastanka oksidativnog stresa. S obzirom na to da su radnici u pomenutom istraživanju bili izloženi pesticidima koji su veoma srodni preparatima za tretman varooze, moguće je da su promene u mtDNK utvrđene kod varoa u našem istraživanju nastale kao posledica dugotrajne primene akaricida, iako za ovakvu pretpostavku ne postoje podaci u literaturi koji bi se odnosili na akarine i srodne grupe artropoda. Imajući u vidu veliku zastupljenost i geografsku rasprostranjenost haplotipa S1, P1 i jedinki *V. destructor* sa heteroplazmijom, buduća istraživanja trebala bi da budu usmerena na ispitivanje mogućih razlika u njihovoj patogenosti prema *A. mellifera*.

Nakon identifikacije haplotipova pčela i varoe, u našem istraživanju je praćena korelacija u distribuciji haplotipova *A. mellifera* i *V. destructor*. Proučavanje odnosa domaćin-parazit na genetičkom nivou do sada je bilo predmet istraživanja svega nekoliko radova. Muñoz i sar. (2008) su ispitivali genetički profil *V. destructor* koje parazitiraju na *A. m. iberiensis*, sa ciljem uvida u odnos domaćin-parazit na nivou mtDNK markera. Oni su među 575 analiziranih uzoraka parazita sakupljenih u pčelinjim društvima širom Španije pronašli samo jedan uzorak J haplotipa, dok su svi ostali pripadali K haplotipu. Nakon analize ostalih uzoraka sa pčelinjaka gde su pronađena oba haplotipa parazita, Muñoz i sar. (2008) nisu utvrdili nikakvu korelaciju

u distribuciji haplotipova varoe i mitohondrijalnih linija pčela. Ipak, s obzirom da je zaključak izveden na osnovu samo jednog uzorka J haplotipa, autori su izrazili potrebu za daljim istraživanjima, koja bi u cilju dobijanja objektivnijih rezultata uključila veći broj uzoraka.

U našem istraživanju koje je obuhvatilo 245 varoa iz 29 košnica, takođe je utvrđeno da zastupljenost haplotipova *V. destructor* definisanih analizom odvojenih i spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci ne zavisi od haplotipa pčele. Za razliku od pomenutog istraživanja u Španiji koje je sprovedeno na tri haplotipa pčela podvrste *A. m. iberiensis*, izostanak korelacije u našem radu mogao bi da bude posledica postojanja dve podvrste pčela u Srbiji (*A. m. carnica* i *A. m. macedonica*), čije je prisustvo utvrđeno u istraživanju **Stevanovic i sar.** (2010).

Warrit i sar. (2006) pratili su biogeografsku distribuciju različitih vrsta (*V. jacobsoni* i *V. destructor*) i haplotipova varoa na različitim mitohondrijalnim linijama i haplotipovima *A. cerana* sa Tajlanda. S obzirom da je utvrđen samo jedan haplotip *V. destructor*, nije postojala bilo kakva korelacija u distribuciji ove vrste parazita i genetičke linije pčela na kojoj ona parazitira. Međutim, na svakoj liniji *A. cerana* primećeni su tačno određeni haplotipovi *V. jacobsoni*, što je protumačeno kao moguća adaptacija genetički različitih populacija parazita na specifične osobine lokalnih populacija domaćina.

U našem istraživanju, na lokalitetima Beograd, Boljevac i Čajetina postojala je značajna razlika u zastupljenosti određenih haplotipova varoe na pojedinim haplotipovima pčela. Lokaliteti Čajetina i Boljevac izdvajali su se takođe na osnovu razlika u strukturi haplotipova *V. destructor* na pčelama C2d haplotipa. Pri tome, na pčelama C2d koje su poticale iz Čajetine nisu pronađene varoe sa heteroplazmijom, dok kod onih iz Boljevca nisu utvrđene varoe P1 haplotipa.

Lokalitet Čajetina izdvajao se u odnosu na ostale i po strukturi haplotipova varoe na pčelama C2e haplotipa, odnosno izostankom jedinki čistog K haplotipa i jako malom zastupljenošću KP1 jedinki u odnosu na visok procenat P1 haplotipa. Mala zastupljenost jedinki sa heteroplazmijom na ovom lokalitetu mogla bi da bude posledica niske stope višestruko infestiranih satnih ćelija, iako će objektivno tumačenje ovih razlika biti moguće tek nakon što se utvrdi mehanizam prenošenja heteroplazmije.

7. ZAKLJUČCI

1. Identifikacija šest haplotipova *A. mellifera* ukazuje na znatno veću genetičku varijabilnost medonosne pčele u Srbiji nego u zemljama iz okruženja. Haplotip C2aa utvrđen je prvi put u ovom istraživanju.
2. Postojala je značajna razlika u zastupljenosti haplotipova *A. mellifera* u ukupnom uzorku, kao i između posmatranih lokaliteta.
3. Na osnovu tačkastih mutacija i duplih pikova utvrđenih na polimorfnim pozicijama u *cox1* i *cytb* sekvencama metodom sekvencioniranja, definisani su novi S1 i P1 haplotipovi *V. destructor* i otkrivene jedinke sa nukleotidnom heteroplazmijom.
4. ARMS i RFLP pokazale su se kao brze, jednostavne, pouzdane i ekonomične metode za identifikaciju haplotipova i utvrđivanje heteroplazmičnih jedinki u populacijama *V. destructor*.
5. Znatno veći broj jedinki *V. destructor* sa mutacijom u *cox1* nego u *cytb* sekvenci može se tumačiti posledicom dužeg prisustva S1 od jedinki P1 haplotipa.
6. Odsustvo jedinki sa istovremenom mutacijom u *cox1* i *cytb* ukazuje da S1 i P1 haplotipovi najverovatnije potiču iz dve različite populacije *V. destructor*.
7. Velika zastupljenost novih haplotipova *V. destructor* na teritoriji Srbije demantuje dosadašnji opšteprihvaćeni stav o nedostatku polimorfizama mtDNK kod varoa izvan Azije.
8. U društvima *A. mellifera* iz Srbije, K haplotip *V. destructor* zastupljen je znatno manje nego što se ranije mislilo.
9. Analizom spojenih *cox1* i *cytb* sekvenci utvrđeno je da struktura haplotipova *V. destructor* zavisi od lokaliteta, dok analiza odvojenih sekvenci nije pokazala značajnu zavisnost.
10. Zbog utvrđene koegzistencije haplotipova i jedinki sa heteroplazmijom, za analize varijabilnosti *V. destructor* neophodno je uzorkovati više od jedne varoe po košnici.
11. Na osnovu visoke učestalosti jedinki sa heteroplazmijom i specifičnog biološkog ciklusa, *V. destructor* bi se mogla koristiti kao model-takson za proučavanje mehanizma nastanka, prenošenja i održavanja heteroplazmije.

12. U ukupnom uzorku nije utvrđena korelacija u distribuciji haplotipova *A. mellifera* i haplotipova *V. destructor* koji na njima parazitiraju.
13. Postojala je značajna razlika u strukturi haplotipova varoe na pčelama C2d i C2e haplotipa sa različitih lokaliteta.

8. LITERATURA

1. Aizen M, Garibaldi L, Cunningham S, Klein A, 2008, Long-term global trends in crop yield and production reveal no current pollination shortage but increasing pollinator dependency, *Curr Biol*, 18, 1572–1575.
2. Aizen MA, Harder LD, 2009, The global stock of domesticated honey bees is growing slower than agricultural demand for pollination, *Curr Biol*, 19, 915–918.
3. Akwatanakul P, 1976, Biology and systematics of bee mites of the family Varroidae, MS thesis, Oregon State University, Corvallis, OR, 1–64.
4. Alberti G, Hänel H, 1986, Fine structure of the genital system in the bee parasite, *Varroa jacobsoni* (Gamasida: Dermanyssina) with remarks on spermiogenesis, spermatozoa and capacitation, *Exp Appl Acarol*, 2, 63–104.
5. Alberti G, Zeck-Kapp G, 1986, The nutritimentary egg development in the mite, *Varroa jacobsoni* (Acari, Arachnida), an ectoparasite of honey bee, *Acta Zool (Stock)*, 67, 11–25.
6. Allen MF, Ball BV, White RF, Antoniw JF, 1986, The detection of acute paralysis virus in *Varroa jacobsoni* by the use of a simple indirect ELISA, *J Apic Res*, 25, 100–105.
7. Alpatov WW, 1929, Biometrical studies on variation and races of the honeybee *Apis mellifera* L., *Rev Biol*, 4, 1–57.
8. Anderson D, 2000, Variation in the parasitic bee mite *Varroa jacobsoni* Oud., *Apidologie*, 31, 281–292.
9. Anderson DL, 1994, Non-reproduction of *Varroa jacobsoni* in *Apis mellifera* colonies in Papua New Guinea and Indonesia, *Apidologie*, 25, 412–421.
10. Anderson DL, Fuchs S, 1998, Two genetically distinct populations of *Varroa jacobsoni* with contrasting reproductive abilities on *Apis mellifera*, *J Apic Res*, 37, 69–78.
11. Anderson DL, Sukarsih, 1996, Changed *Varroa jacobsoni* reproduction in *Apis mellifera* colonies in Java, *Apidologie*, 27, 461–466.
12. Anderson DL, Trueman JWH, 2000, *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) is more than one species, *Exp Appl Acarol*, 24, 165–189.

13. Annoscia D, Del Piccolo F, Nazzi F, 2012, How does the mite *Varroa destructor* kill the honeybee *Apis mellifera*? Alteration of cuticular hydrocarbons and water loss in infested honeybees, *J Insect Physiol*, 58 (12), 1548–1555.
14. Arias MC, Rinderer TE, Sheppard WS, 2006, Further characterization of honey bees from the Iberian Peninsula by allozyme, morphometric and mtDNA haplotype analyses, *J Apic Res*, 45, 188–196.
15. Badino G, Celebrano G, Manino A, Ifantidis MD, 1988, Allozyme variability in Greek honeybees (*Apis mellifera* L.), *Apidologie*, 19, 377–386.
16. Bai RK, Wong LJC, 2004, Detection and quantification of heteroplasmic mutant mitochondrial DNA by real-time amplification refractory mutation system quantitative PCR analysis: a single-step approach, *Clin Chem*, 50 (6), 996–1001.
17. Bailey L, Ball BV, 1991, Honey Bee Pathology, Academic Press, 1–208.
18. Ball BV, 1983, The association of *Varroa jacobsoni* with virus diseases of honey bees, *Exp Appl Acarol*, 19, 607–613.
19. Ball BV, 1996, Honey bee viruses: a cause for concern? *Bee World*, 77, 117–119.
20. Ball BV, Allen MF, 1988, The prevalence of pathogens in honey bee (*Apis mellifera*) colonies infested with the parasitic mite *Varroa jacobsoni*, *Ann Appl Biol*, 113, 237–244.
21. Beetsma J, K Zonneveld, 1992, Observations on the initiation and stimulation of oviposition of the *Varroa* mite, *Exp Appl Acarol*, 16, 303–312.
22. Benedetti D, Nunes E, Sarmiento M, Porto C, dos Santos CEI, Dias JF, da Silva J, 2013, Genetic damage in soybean workers exposed to pesticides: evaluation with the comet and buccal micronucleus cytome assays, *Mutat Res-Gen Tox En*, 752 (1), 28–33.
23. Bensasson D, Zhang DX, Hartl DL, Hewitt GM, 2001, Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses, *Trends Ecol Evol*, 16 (6), 314–321.
24. Biesmeijer JC, Roberts SPM, Reemer M, Ohlemüller R, Edwards M, Peeters T, Schaffers AP, Potts SG, Kleukers R, Thomas CD, Settele J, Kunin WE, 2006, Parallel declines in pollinators and insect-pollinated plants in Britain and the Netherlands, *Science*, 313, 251–253.

25. Bodur C, Kence M, Kence A, 2007, Genetic structure of honeybee, *Apis mellifera* L. (Hymenoptera:Apidae) populations of Turkey inferred from microsatellite analysis, *J Apic Res*, 46, 50–56.
26. Boecking O, Genersch E, 2008, Varroosis-the ongoing crisis in bee keeping, *J Verbr Lebensm*, 3, 221–228.
27. Boecking O, Spivak M, 1999, Behavioral defenses of honey bees against *Varroa jacobsoni* Oud, *Apidologie*, 30 (2–3), 141–158.
28. Boot WJ, Calis JN, Beetsma J, 1995, Does time spent on adult bees affect reproductive success of *Varroa* mites?, *Entomol Exp Appl*, 75 (1), 1–7.
29. Boot WJ, Calis JNM, Beetsma J, 1992, Differential periods of *Varroa* mite invasion into worker and drone cells of honey bees, *Exp Appl Acarol*, 16, 295–301.
30. Boot WJ, Calis JNM, Beetsma J, Hai DM, Lan NK, Van Tran T, Trung LQ, Minh NH, 1999, Natural selection of *Varroa jacobsoni* explains the different reproductive strategies in colonies of *Apis cerana* and *Apis mellifera*, *Exp Appl Acarol*, 23 (2), 133–144.
31. Boot WJ, DJA Sisselaar, JNM Calis, J Beetsma, 1994, Factors affecting invasion of *Varroa jacobsoni* (Acari: Varroidae) into honeybee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae), brood cells, *B Entomol Res*, 84, 3–10.
32. Boot WJ, JNM Calis, J Beetsma, 1993, Invasion of *Varroa* mites into honeybee brood cells: A matter of chance or choice?, *J Apic Res*, 32, 167–174.
33. Boot WJ, Tan NQ, Dien PC, Huan LV, Dung NV, Long LT, Beetsma J, 1997, Reproductive success of *Varroa jacobsoni* in brood of its original host, *Apis cerana*, in comparison to that of its new host, *Apis mellifera*, *Bull Entomol Res*, 87, 119–126.
34. Bouga M, Kiliadis G, Harizanis PC, Papatotiropoulos V, Alahiotis S, 2005, Allozyme variability and phylogenetic relationships in honey bee (Hymenoptera: Apidae: *Apis mellifera*) populations from Greece and Cyprus, *Biochem Genet*, 43, 471–483.
35. Bowen-Walker PL, Gunn A, 2001, The effect of the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* on the adult worker honeybee (*Apis mellifera*) emergence weights, water, protein, carbohydrate, and lipid levels, *Ent Exp App*, 101, 207–217.

36. Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A, 1997, Preferential distribution of the parasitic mite, *Varroa jacobsoni* Oud. on over-wintering honeybee (*Apis mellifera* L.) workers and changes in the level of parasitism, *Parasitology*, 114, 151–157.
37. Bowen-Walker PL, Martin SJ, Gunn A, 1999, The transmission of deformed wing virus between honeybees (*Apis mellifera*) by the ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oud, *J Invertebr Pathol*, 73, 101–106.
38. Bubalo D, 1995, Biološke karakteristike različitih ekotipova sive pčele (*Apis mellifera carnica* P. 1879), Magistarska teza, Agronomski fakultet, Sveučilište u Zagrebu.
39. Bubalo D, Langer Z, Dražić M, Pechhacker H, Poklukar J, Kezić N, 1994a, Zimovanje različitih ekotipova sive pčele (*Apis mellifera carnica*) u uvjetima sjeverozapadne Hrvatske, Zbornik sažetaka priopćenja, Peti kongres biologa Hrvatske, Oktobar 3–7, Hrvatsko biološko društvo Zagreb, Pula, Hrvatska, 228–229.
40. Bubalo D, Pechhacker H, Poklukar J, Langer Z, Dražić M, Odak M, Kezić N, 1994b, Biološke karakteristike alpskog, subalpskog i panonskog ekotipa sive pčele (*Apis mellifera carnica*) u uvjetima sjeverozapadne Hrvatske, *Hrvatska pčela*, 10, 169–172.
41. Büchler R, Berg S, Le Conte Y, 2010, Breeding for resistance to *Varroa destructor* in Europe, *Apidologie*, 41 (3), 393–408.
42. Büchler R, Costa C, Hatjina F, Andonov S, Meixner MD, Conte, Le Conte Y, Uzunov A, Berg S, Bienkowska M, Bouga M, Drazic M, Dyrba W, Kryger P, Panasiuk B, Pechhacker H, Petrov P, Kezić N, Korpela S, Wilde J, 2014, The influence of genetic origin and its interaction with environmental effects on the survival of *Apis mellifera* L. colonies in Europe, *J Apic Res*, 53, 2, 205–214.
43. Calatayud F, Verdu MJ, 1994, Survival of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. (Mesostigmata: Varroidae) in broodless colonies of the honey bee *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae), *Exp Appl Acarol*, 18, 10, 603–612.
44. Calderone NW, Kuenen LPS, 2003, Differential tending of worker and drone larvae of the honey bee, *Apis mellifera*, during the 60 hours prior to cell capping, *Apidologie*, 34, 543–552.

45. Cermak K, Kaspar F, 2000, A method of classifying honey bee races by their body characters, *Pszcz Zesz Nauk (XLIV)*, 2, 81–86.
46. Chen, YP, Siede R, 2007, Honey bee viruses, *Adv Virus Res*, 70, 33–80.
47. Chinnery PF, Thorburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HHM, Turnbull DM, Lightowlers RN, Howell N, 2000, The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both?, *Trends Genet*, 16 (11), 500–505.
48. Ćirković D, 2011, Ispitivanje efekta šećera u prahu na stepen invadiranosti pčela sa *Varroa destructor*, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, 1–283.
49. Coelho JR, Mitton JB, 1988, Oxygen consumption during hovering is associated with genetic variation of enzymes in honey bees, *Funct Ecol*, 2, 141–146.
50. Comparini A, Biasiolo A, 1991, Genetic discrimination of Italian bee, *Apis mellifera ligustica* versus Carniolan bee, *Apis mellifera carnica* by allozyme variability analysis, *Biochem Syst Ecol*, 19, 189–194.
51. Cornuet JM, Daoudi A, Chevalet C, 1986, Genetic pollution and number of matings in a black honey bee (*Apis mellifera mellifera*) population, *Theor Appl Genet*, 73, 223–227.
52. Cornuet JM, Garnery L, 1991, Mitochondrial DNA variability in honeybees and its phylogeographic implications, *Apidologie*, 22 (6), 627–642.
53. Cornuet JM, Garnery L, Solignac M, 1991, Putative origin and function of the intergenic region between COI and COII of *Apis mellifera* L. mitochondrial DNA, *Genetics*, 128 (2), 393–403.
54. Cornuet JM, Oldroyd BP, Crozier RH, 1995, Unequal thermostability of allelic forms of malate dehydrogenase in honey bees, *J Apic Res*, 34, 45–47.
55. Crane EE, 1999. The world history of beekeeping and honey hunting. Routledge, Taylor & Francis, 1-682.
56. Crozier RH, Crozier YC, 1993, The mitochondrial genome of the honeybee *Apis mellifera*: complete sequence and genome organization, *Genetics*, 133 (1), 97–117.
57. Crozier RH, Crozier YC, Mackinlay AG, 1989, The CO-I and CO-II region of honeybee mitochondrial DNA: evidence for variation in insect mitochondrial evolutionary rates, *Mol Biol Evol*, 6 (4), 399–411.

58. Dall'Olio R, Marino A, Lodesani M, Moritz RFA, 2007, Genetic characterization of Italian honeybees, *Apis mellifera ligustica*, based on microsatellite DNA polymorphisms, *Apidologie*, 38, 207–217.
59. De Guzman LI, Delfinado-Baker M, 1996, A new species of *Varroa* (Acari:Varroidae) associated with *Apis koschevnikovi* (Apidae: Hymenoptera) in Borneo, *Int J Acarol*, 22, 23–27.
60. De Guzman LI, Rinderer TE, 1999, Identification and comparison of *Varroa* species infesting honey bees, *Apidologie*, 30 (2-3), 85–95.
61. De Guzman LI, Rinderer TE, Beaman LD, 1993, Survival of *Varroa jacobsoni* Oud. (Acari: Varroidae) away from its living host *Apis mellifera* L., *Exp Appl Acarol*, 17, 283–90
62. De Guzman LI, Rinderer TE, Stelzer JA, 1997, DNA evidence of the origin of *Varroa jacobsoni* Oudemans in the Americas, *Biochem Genet*, 35, 327–335.
63. De Guzman LI, Rinderer TE, Stelzer JA, 1999, Occurrence of two genotypes of *Varroa jacobsoni* Oud. In North America, *Apidologie*, 30, 31–36.
64. De Jong D, De Jong PH, Gonçalves LS, 1982, Weight loss and other damage to developing worker honeybees from infestation with *V. jacobsoni*, *J Apic Res*, 21, 165–216.
65. De la Rúa P, Galián J, Pedersen BV, Serrano J, 2006, Molecular characterization and population structure of *Apis mellifera* from Madeira and the Azores, *Apidologie*, 37, 699–708.
66. De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA, 2001, Molecular characterization and population structure of the honeybees from the Balearic islands (Spain), *Apidologie*, 32, 417–427.
67. De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA, 2002a, Microsatellite analysis of non-migratory colonies of *Apis mellifera iberica* from southeastern Spain, *J Zool Evol Res*, 40, 164–168.
68. De la Rúa P, Galián J, Serrano J, Moritz RFA, 2003, Genetic structure of Balearic honeybee populations based on microsatellite polymorphism, *Genet Sel Evol*, 35, 339–350.

69. De la Rúa P, Hernandez-Garcia R, Jimenez Y, Galián J, Serrano J, 2005, Biodiversity of *Apis mellifera iberica* (Hymenoptera: Apidae) from northeastern Spain assessed by mitochondrial analysis, *Insect Syst Evol*, 36, 21–28.
70. De la Rúa P, Jaffé R, Dall'Olio R, Muñoz I, Serrano J, 2009, Biodiversity, conservation and current threats to European honeybees, *Apidologie*, 40 (3), 263–284.
71. De la Rúa P, Serrano J, Galián J, 1998, Mitochondrial DNA variability in the Canary Islands honeybees (*Apis mellifera* L.), *Mol Ecol*, 7, 1543–1547.
72. De la Rúa P, Serrano J, Galián J, 2002b, Biodiversity of *Apis mellifera* populations from Tenerife (Canary Islands) and hybridisation with East European races, *Biodrugs*, 11, 59–67.
73. De Ruijter A, 1987, Reproduction of *Varroa jacobsoni* during successive brood cycles of the honeybee, *Apidologie*, 18 (4), 321–326.
74. De Ruijter A, Kaas JP, 1983, The anatomy of the *Varroa* mite, In: Cavalloro, R. (Ed.), *Varroa jacobsoni* Oud affecting honey bees: Present status and needs, AA Balkema, 45–47.
75. Dedej S, Biasiolo A, Piva R, 1996, Morphometric and alloenzyme characterization in the Albanian honeybee population *Apis mellifera* L., *Apidologie*, 27, 121–131.
76. Dedej S, Nazzi F, 1994, Two distances of forewing venation as estimates of wing size, *J Apic Res*, 33, 59–61.
77. Delfinado-Baker M, Aggarwal K, 1987, A new *Varroa* (Acari: Varroidae) from the nest of *Apis cerana* (Apidae), *Int J Acarol*, 13, 233–237.
78. Delfinado-Baker M, Houck MA, 1989, Geographic variation in *Varroa jacobsoni* (Acari Varroidae): application of multivariate morphometric techniques, *Apidologie*, 20, 345–358.
79. Delfinado-Baker MD, 1988, Variability and biotypes of *Varroa jacobsoni* Oudemans, *Am Bee J*, 128, 567–568.
80. Donzé G, Guerin PM, 1994, Behavioral attributes and parental care of *Varroa* mites parasitizing honeybee brood, *Behav Ecol Sociobiol*, 34, 305–319.
81. Donzé G, Herrmann M, Bachofen B, Guerin PM, 1996, Effect of mating frequency and brood cell infestation rate on the reproductive success of the honeybee parasite *Varroa jacobsoni*, *Ecol Entomol*, 21, 17–26.

82. Dražić M, Bubalo D, Kezić N, 1999, Diversity of Carniolan bee (*A. m. carnica*) in Croatia, Book of abstracts, XXXVI International Apiculture Congress (APIMONDIA '99), Vancouver, Canada, p. 282.
83. Dražić MM, Filipi J, Prđun S, Bubalo D, Špehar M, Cvitković D, Kezić D, Pechhacker H, Kezić N, 2014, Colony development of two Carniolan genotypes (*Apis mellifera carnica*) in relation to environment, *J Apic Res*, 53 (2), 261–268.
84. Duay P, de Jong D, Engels W, 2002, Decreased flight performance and sperm production in drones of the honey bee (*Apis mellifera*) slightly infested by *Varroa destructor* mites during pupal development, *Genet Mol Res*, 1, 227–232.
85. Duay P, de Jong D, Engels W, 2003, Weight loss in drone pupae (*Apis mellifera*) multiply infested by *Varroa destructor* mites, *Apidologie*, 34, 61–65.
86. Estoup A, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM, 1995, Microsatellite variation in honey bee (*Apis mellifera* L.) populations: Hierarchical genetic structure and test of the infinite allele and stepwise mutation models, *Genetics*, 140, 679–695.
87. Estoup A, Solignac M, Harry M, Cornuet JM, 1993, Characterization of (GT)_n and (CT)_n microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*, *Nucleic Acids Res*, 21, 1427–1431.
88. Evans JD, Lopez DL, 2002, Complete mitochondrial DNA sequence of the important honey bee pest, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae), *Exp Appl Acarol*, 27, 69–79.
89. Evans JD, Schwarz RS, Chen YP, Budge G, Cornman RS, De Le Rua P, De Miranda JR, Foret S, Foster L, Gauthier L, Genersch E, Gisder S, Jarosch A, Kucharski R, Lopez D, Lun CM, Moritz RFA, Maleszka R, Muñoz I, Pinto MA, 2013, Standard methodologies for molecular research in *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research, *J Apic Res*, 52, 4.
90. Fontaine KM, Cooley JR, Simon C, 2007, Evidence for paternal leakage in hybrid periodical cicadas (Hemiptera: *Magicicada* spp.), *PLoS One*, 2, 9, e892.
91. Franck P, Garnery L, Celebrano G, Solignac M, Cornuet JM, 2000a, Hybrid origins of honeybees from Italy (*Apis mellifera ligustica*) and Sicily (*A. m. sicula*), *Mol Ecol*, 9, 907–921.

92. Franck P, Garnery L, Loiseau A, Oldroyd BP, Hepburn HR, Solignac M, Cornuet JM, 2001, Genetic diversity of the honeybee in Africa: microsatellite and mitochondrial data, *Heredity*, 86 (4), 420–430.
93. Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM, 1998, The origin of west European subspecies of honeybees (*Apis mellifera*): New insights from microsatellite and mitochondrial data, *Evolution*, 52, 1119–1134.
94. Franck P, Garnery L, Solignac M, Cornuet JM, 2000b, Molecular confirmation of a fourth lineage in honeybees from the Near East, *Apidologie*, 31, 167–180.
95. Francoy TM, Prado PPR, Gonçalves LS, Costa LD, De Jong D, 2006, Morphometric differences in a single wing cell can discriminate *Apis mellifera* racial types, *Apidologie*, 37, 91–97.
96. Frey E, Schnell H, Rosenkranz P, 2011, Invasion of *Varroa destructor* mites into mite-free honey bee colonies under the controlled conditions of a military training area. *J Apic Res*, 50 (2), 138–144.
97. Fries I, Bommarco R, 2007, Possible host-parasite adaptations in honey bees infested by *Varroa destructor* mites, *Apidologie*, 38 (6), 525–533.
98. Fries I, Camazine S, 2001, Implications of horizontal and vertical pathogen transmission for honey bee epidemiology, *Apidologie*, 32 (3), 199–214.
99. Fries I, Hansen H, Imdorf A, Rosenkranz P, 2003, Swarming in honey bees (*Apis mellifera*) and *Varroa destructor* population development in Sweden, *Apidologie*, 34, 389–398.
100. Fries I, Imdorf A, Rosenkranz P, 2006, Survival of mite infested (*Varroa destructor*) honey bee (*Apis mellifera*) colonies in a Nordic climate, *Apidologie*, 37 (5), 564–570.
101. Fries I, Rosenkranz P, 1996, Number of reproductive cycles of *Varroa jacobsoni* in honey-bee (*Apis mellifera*) colonies, *Exp Appl Acarol*, 20, 103–112.
102. Fuchs S, 1990, Preference for drone brood cells by *Varroa jacobsoni* Oud. in colonies of *Apis mellifera carnica*, *Apidologie*, 21, 193–196.
103. Fuchs S, Langenbach K, 1989, Multiple infestation of *Apis mellifera* L. brood cells and reproduction in *Varroa jacobsoni* Oud, *Apidologie*, 20 (3), 257–266.
104. Gajić B, Radulović Ž, Stevanović J, Kulišić Z, Stanimirović Z, 2011, Preliminarni rezultati molekularno-genetičkih analiza varijabilnosti mtDNK *Varroa*

- destructor* u pčelinjim zajednicama na teritoriji Srbije, Zbornik plenarnih referata i rezimea, Simpozijum entomologa Srbije 2011, Sep 21-25, Donji Milanovac, Srbija, str. 69.
105. Gajic B, Radulovic Z, Stevanovic J, Kulisic Z, Vucicevic M, Simeunovic P, Stanimirovic Z, 2013, Variability of the honey bee mite *Varroa destructor* in Serbia, based on mtDNA analysis, *Exp Appl Acarol*, 61 (1), 97–105.
106. Gallai N, Salles JM, Setteled J, Vaissière BE, 2009, Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline, *Ecol Econ*, 68, 810–821.
107. Garnery L, Franck P, Baudry E, Vautrin D, Cornuet JM, Solignac M, 1998, Genetic diversity of the west European honey bee (*Apis mellifera* and *A. m. iberica*). I. Mitochondrial DNA, *Genet Sel Evol*, 30, 49–74.
108. Garnery L, Mosshine EH, Oldroyd BP, Cornuet JM, 1995, Mitochondrial-DNA variation in Moroccan and Spanish honey-bee populations, *Mol Ecol*, 4, 465–471.
109. Garnery L, Solignac M, Celebrano G, Cornuet JM, 1993, A simple test using restricted PCR-amplified mitochondrial DNA to study the genetic structure of *Apis mellifera* L., *Experientia*, 49 (11), 1016–1021.
110. Garnery L, Vautrin D, Cornuet JM, Solignac M, 1991, Phylogenetic relationships in the genus *Apis* inferred from mitochondrial DNA sequence data, *Apidologie*, 22, 87–92.
111. Garrido C, Rosenkranz P, 2003, The reproductive program of female *Varroa destructor* mites is triggered by its host, *Apis mellifera*, *Exp Appl Acarol*, 31, 269–273.
112. Garrido C, Rosenkranz P, Paxton RJ, Goncalves LS, 2003, Temporal changes in *Varroa destructor* fertility and haplotype in Brazil, *Apidologie*, 34, 535–541.
113. Garrido C, Rosenkranz P, Stürmer M, Rüksam R, Büning J, 2000, Toluidine blue staining as a rapid measure for initiation of oocyte growth and fertility in *Varroa jacobsoni* Oud, *Apidologie*, 31, 559–566.
114. Geissler E, Theile M, 1983, Virus-induced gene mutations of eukaryotic cells, *Hum Genet*, 63 (1), 1–12.
115. Genersch E, Aubert M, 2010, Emerging and re-emerging viruses of the honey bee (*Apis mellifera* L.), *Vet Res*, 41 (6), 54.

116. Genersch E, von der Ohe W, Kaatz H, Schroeder A, Otten C, Buchler R, Berg S, Ritter W, Muhlen W, Gisder S, Meixner M, Liebig G, Rosenkranz P, 2010, The German bee monitoring project: a long term study to understand periodically high winter losses of honey bee colonies, *Apidologie*, 41, 332–352.
117. Glavinić U, Stevanović J, Gajić B, Simeunović P, Đurić S, Vejnović B, Stanimirović Z, 2014, *Nosema ceranae* DNA in honey bee haemolymph and honey bee mite *Varroa destructor*, *Acta Vet-Beograd*, 64 (3), 349–357.
118. Goetze G, 1940, Die beste Biene, Liedlof Loth Michaelis, Leipzig.
119. Goetze G, 1964, Die Honigbiene in natürlicher und künstlicher Zuchtauslese. Teil I: Systematic, Zeugung und Vererbung, Beihefte zur Zeitschrift für angewandte Hamburg und Berlin, *Entomologie*, 19, 1–120.
120. Griffiths DA, Gray J, Pegazzano F, 1983, *Varroa* - the acaralogist's view, In: Proceedings of a Meeting of EC Expert's Group, Wageningen, 79–83.
121. Grobov OF, Pulenetz NM, Sofronov GL, 1980, Geographical variability of the sizes of the dorsal scutellum in females of *Varroa jacobsoni* Oud, In: Arnaj V (ed) Proceedings XXVIIth international beekeeping congress, Athens, Apiacta, 346–350.
122. Grozdanić S, 1926, "Žuta" banatska pčela, *Glasnik entomološkog društva*, 1 (1), 1–16.
123. Guzmán-Novoa E, Eccles L, Calvete Y, McGovan J, Kelly PG, Correa-Benitez A, 2010, *Varroa destructor* is the main culprit for the death and reduced populations of overwintered honey bee (*Apis mellifera*) colonies in Ontario, Canada, *Apidologie*, 41, 443–450.
124. Hails RS, Ball BV, Genersch E, 2007, Infection strategies of insect viruses. In: Aubert M et al. (eds) *Virology and the Honey Bee*, European Communities, Luxembourg, 255–275.
125. Hall TA, 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp Series*, 41, 95–98.
126. Herniou EA, Huguet E, Thézé J, Bézier A, Periquet G, Drezen JM, 2013, When parasitic wasps hijacked viruses: genomic and functional evolution of polydnviruses. *Philos T Roy Soc B*, 368 (1626), 20130051.

127. Hewitt GM, 1999, Post-glacial re-colonization of European biota, *Biol J Linn Soc*, 68 (1-2), 87–112.
128. Ifantidis MD, 1983, Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* in worker and drone honey bee brood cells, *J Apic Res*, 22, 200–206.
129. Ifantidis MD, 1988, Some aspects of the process of *Varroa jacobsoni* mite entrance into honey bee (*Apis mellifera*) brood cells, *Apidologie*, 19 (4), 387–396.
130. Ifantidis MD, 1990, Re-examination of some parameters concerning reproduction of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. In: Proceedings of the international symposium on recent research on bee pathology, Gent, Belgium, 20–26.
131. Ifantidis MD, 1997, Ontogenesis of *Varroa jacobsoni* Oud. In: Cahiers options Méditerranéennes, Varroosis in the Mediterranean region, CIHEAM, Zaragoza, ES, 13–21.
132. Ifantidis MD, Rosenkranz P, 1988, Reproduktion der Bienenmilbe *Varroa jacobsoni* (Acarina: Varroidae), *Entomol Gen*, 14 (2), 111–122.
133. Ivanova EN, Staykova TA, Bouga M, 2007, Allozyme variability in honey bee populations from some mountainous regions in the southwest of Bulgaria, *J Apic Res*, 46, 3–7.
134. Jaffè R, Dietemann V, Allsopp MH, Costa C, Crewe RM, Dall’olio R, De la rúa P, El-niweiri MAA, Fries I, Kezic N, Meusel MS, Paxton RJ, Shaibi T, Stolle E, Moritz RFA, 2010, Estimating the density of honeybee colonies across their natural range to fill the gap in pollinator decline censuses, *Conserv Biol*, 24 (2), 583–593.
135. Jara L, Cepero A, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Higes M, De la Rúa P, 2012, Linking evolutionary lineage with parasite and pathogen prevalence in the Iberian honey bee, *J Invertebr Pathol*, 110 (1), 8–13.
136. Jarne P, Lagoda P, 1996, Microsatellites, from molecules to populations and back, *Trends Ecol Evol*, 11, 424–429.
137. Jay CS, 1963, The development of honeybees in their cells, *J Apic Res*, 2, 117–134.
138. Jones DP, 2008, Radical-free biology of oxidative stress, *Am J Physiol-Cell Ph*, 295 (4), C849–C868.
139. Kandemir I, Kence M, Kence A, 2000, Genetic and morphometric variation in honeybee (*Apis mellifera* L.) populations of Turkey, *Apidologie*, 31, 343–356.

140. Kezić N, Pechhacker H, Poklukar J, Bubalo D, Dražić M, Ruttner F, 1994, Comparison of brood and pollen amount and productivity of 3 strains of *A. m. carnica*, *Apidologie*, 25 (5), 485–487.
141. Klein A-M, Vaissiere BE, Cane JH, Steffan-Dewenter I, Cunningham SA, Kremen C, Tscharntke T, 2007, Importance of pollinators in changing landscapes for world crops, *Proc R Soc B*, 274, 303–313.
142. Kozmus P, Stevanovic J, Stanimirovic Z, Stojic V, Kulisic Z, Meglic V, 2007, Analysis of mitochondrial DNA in honey bees (*Apis mellifera*) from Serbia, *Acta Vet-Beograd*, 57, 465–476.
143. Kralj J, 2004, Parasite-host interactions between *Varroa destructor* Anderson and Trueman and *Apis mellifera* L.: Influence of parasitism on flight behaviour and the loss of infested foragers, Johann Wolfgang Goethe University of Frankfurt am Main, PhD Dissertation.
144. Kralj J, Brockmann A, Fuchs S, Tautz J, 2007, The parasitic mite *Varroa destructor* affects non-associative learning in honey bee foragers, *Apis mellifera* L., *J Comp Physiol A*, 193 (3), 363–370.
145. Kralj J, Fuchs S, 2006, Parasitic *Varroa destructor* mites influence flight duration and homing ability of infested *Apis mellifera* foragers, *Apidologie*, 37 (5), 577–587.
146. Kraus B, Hunt G, 1995, Differentiation of *Varroa jacobsoni* Oud populations by random amplification of polymorphic DNA (RAPD), *Apidologie*, 26, 283–290.
147. Krunic M, 1967, Varijabilitet *Apis mellifica* L. u Jugoslaviji sa posebnim osvrtom na diferencijaciju populacija u Panonskoj niziji, Doktorska disertacija, Prirodno matematički fakultet, Univerzitet u Beogradu.
148. Kuenen LPS, Calderone NW, 1997, Transfers of *Varroa* mites from newly emerged bees: preferences for age- and function-specific adult bees, *J Insect Behav*, 10, 213–228.
149. Kwok S, Kellogg DE, McKinney N, Spasic D, Goda L, Levenson C, Sninsky JJ, 1990, Effects of primer-template mismatches on the polymerase chain reaction: human immunodeficiency virus type 1 model studies, *Nucleic Acids Res*, 18 (4), 999–1005.

150. Lansman RA, Avise JC, Huettel MD, 1983, Critical experimental test of the possibility of "paternal leakage" of mitochondrial DNA, *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 (7), 1969–1971.
151. Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C, 1990, Identification of a brood pheromone in honeybees, *Naturwissenschaften*, 77, 334–336.
152. Le Conte Y, Arnold G, Trouiller J, Masson C, Chappe B, Ourisson G, 1989, Attraction of the parasitic mite *Varroa* to the drone larvae of honeybees by simple aliphatic esters, *Science*, 245, 638–639.
153. Le Conte Y, De Vaublanc G, Crauser D, Jeanne F, Rousselle JC, Bécard JM, 2007, Honey bee colonies that have survived *Varroa destructor*, *Apidologie*, 38 (6), 566–572.
154. Lecher P, Béziat F, Alziari S, 1994, Tissular distribution of heteroplasmy and ultrastructural studies of mitochondria from a *Drosophila subobscura* mitochondrial deletion mutant, *Biol Cell*, 80 (1), 25–33.
155. Lolin M, 1977, Prvi slučaj varoatoze u našoj zemlji, *Pčelar*, 1-2, 14–15.
156. Maggi M, Medici S, Quintana S, Ruffinengo S, Marcangeli J, Gimenez Martinez P, Fuselli S, Eguaras M, 2012, Genetic structure of *Varroa destructor* populations infesting *Apis mellifera* colonies in Argentina, *Exp Appl Acarol*, 56, 309–318.
157. Magnacca KN, Brown MJ, 2010, Tissue segregation of mitochondrial haplotypes in heteroplasmic Hawaiian bees: implications for DNA barcoding, *Mol Ecol Resour*, 10 (1), 60–68.
158. Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M, 2002, Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach, *J Clin Lab Anal*, 16 (1), 47–51.
159. Martin S, Holland K, Murray M, 1997, Non-reproduction in the honeybee mite *Varroa jacobsoni*, *Exp Appl Acarol*, 21, 539–549.
160. Martin SJ, 1994, Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in worker brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions, *Exp Appl Acarol*, 18, 87–100.
161. Martin SJ, 1995, Ontogenesis of the mite *Varroa jacobsoni* Oud. in drone brood of the honeybee *Apis mellifera* L. under natural conditions, *Exp Appl Acarol*, 19, 199–210.

162. Martin SJ, Kemp D, 1997, Average number of reproductive cycles performed by *Varroa jacobsoni* in honey bee (*Apis mellifera*) colonies, *J Apic Res*, 36, 113–123.
163. Mayr E, Linsley EG, Usinger RL, 1953, Methods and principles of systematic zoology, Mc Graw-Hill, New York-London, 328.
164. McGregor SE, 1976, Insect pollination of cultivated cropplants. U.S.D.A. Agriculture Handbook No. 496, 93–98.
165. Meixner M D, Worobik M, Wilde J, Fuchs S, Koeniger N, 2007, *Apis mellifera mellifera* in eastern Europe-morphometric variation and determination of its range limits, *Apidologie*, 38 (2), 191–197.
166. Meixner MD, Pinto MA, Bouga M, Kryger P, Ivanova E, Fuchs S, 2013, Standard methods for characterising subspecies and ecotypes of *Apis mellifera*. In V Dietemann; J D Ellis; P Neumann (Eds) The COLOSS BEEBOOK, Volume I: standard methods for *Apis mellifera* research, *J Apic Res*, 52, 4.
167. Meixner MD, Sheppard WS, Poklukar J, 1993, Asymmetrical distribution of a mitochondrial DNA polymorphism between 2 introgressing honey bee subspecies, *Apidologie*, 24 (2), 147–153.
168. Mestriner MA, 1969, Biochemical polymorphism in bees (*Apis m. ligustica*), *Nature*, 223, 188–189.
169. Meusel MS, Moritz RFA, 1993, Transfer of paternal mitochondrial DNA in fertilization of honeybees (*Apis mellifera* L.) eggs, *Curr Genetics*, 24, 539–543.
170. Moritz RF, Härtel S, Neumann P, 2005, Global invasions of the western honeybee (*Apis mellifera*) and the consequences for biodiversity, *Ecoscience*, 12 (3), 289–301.
171. Moritz RF, Jordan M, 1992, Selection of resistance against *Varroa jacobsoni* across caste and sex in the honeybee (*Apis mellifera* L., Hymenoptera: Apidae), *Exp Appl Acarol*, 16 (4), 345–353.
172. Moritz RFA, de Miranda J, Fries I, Le Conte Y, Neumann P, Paxton RJ, 2010, Research strategies to improve honey bee health in Europe, *Apidologie*, 41, 227–242.
173. Moritz RFA, Hawkins CF, Crozier RH, Mackinley AG, 1986, A mitochondrial DNA polymorphism in honeybees (*Apis mellifera* L.), *Experientia*, 42 (3), 322–324.

174. Morse RA, Flottum K, 1997, Honey bee pests, predators and diseases, Cornell University Press, London.
175. Muñoz I, Dall'Olio R, Lodesani M, De la Rúa P, 2009, Population genetic structure of coastal Croatian honeybees (*Apis mellifera carnica*), *Apidologie*, 40 (6), 617–626.
176. Muñoz I, Garrido-Bailón E, Martín-Hernández R, Meana A, Higes M, De la Rúa P, 2008, Genetic profile of *Varroa destructor* infesting *Apis mellifera iberiensis* colonies, *J Apic Res*, 47 (4), 310–313.
177. Muñoz I, Stevanovic J, Stanimirovic Z, De la Rúa P, 2012, Genetic variation of *Apis mellifera* from Serbia inferred from mitochondrial analysis, *J Apic Sci*, 56, 59–69.
178. Murphy M, 2009, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem J*, 417, 1–13.
179. Nation JL, Sanford MT, Milne K, 1992, Cuticular hydrocarbons from *Varroa jacobsoni*, *Exp Appl Acarol*, 16, 331–344.
180. Navajas M, Anderson DL, de Guzman LI, Huang ZY, Clement J, Zhou T, Le Conte Y, 2010, New Asian types of *Varroa destructor*: a potential new threat for world apiculture, *Apidologie*, 41, 181–193.
181. Navajas M, Le Conte Y, Solignac M, Cros-Arteil S, Cornuet JM, 2002, The complete sequence of the mitochondrial genome of the honeybee ectoparasite mite *Varroa destructor* (Acari: Mesostigmata), *Mol Biol Evol*, 19 (12), 2313–2317.
182. Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham AF, 1989, Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS), *Nucleic Acids Res*, 17 (7), 2503–2516.
183. Nunes MD, Dolezal M, Schlötterer C, 2013, Extensive paternal mtDNA leakage in natural populations of *Drosophila melanogaster*, *Mol Ecol*, 22 (8), 2106–2117.
184. Oudemans AC, 1904, On a new genus and species of parasitic acari. *Notes from the Leyden Museum*, 24, 216–222.
185. Ozawa T, 1999, Mitochondrial genome mutation in cell death and aging, *J Bioenerg Biomembr*, 31 (4), 377–390.

186. Özdil F, Yildiz MA, Hall HG, 2009, Molecular characterization of Turkish honeybee populations (*Apis mellifera* L.) inferred from mitochondrial DNA RFLP and sequence results, *Apidologie*, 40, 570–576.
187. Paduan KDS, Ribolla PEM, 2008, Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil, *J Med Entomol*, 45 (1), 59–67.
188. Palmer KA, Oldroyd BP, 2000, Evolution of multiple mating in the genus *Apis*, *Apidologie*, 31, 235–248.
189. Pejini I, Stanimirovic Z, Stevanovic J, Kulisic Z, 2006, Evaluation of genotoxic potential of amitraz by cytogenetic test in vivo, *Vet glasnik*, 60, 163–174.
190. Pejović D, 2001, Ispitivanje higijenskog i negovateljskog ponašanja pčela podvrste *Apis mellifera carnica* u funkciji njihove otpornosti prema bolestima, Magistarski rad, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, 1–1174.
191. Pejović D, 2008, Utvrđivanje stepena heritabilnosti higijenskog i negovateljskog ponašanja sive medonosne pčele *Apis mellifera carnica* i uticaj ovih osobina na reproduktivna i produktivna svojstva pčelinjih zajednica, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, 1-123.
192. Pejovic D, Vucicevic M, Stanimirovic Z, 2002, Grooming behaviour in varroosis resistance in two honeybee ecogeographic varieties (*Apis mellifera carnica*) from Serbia, *Apiacta*, 37 (1), 65–70.
193. Peng YS, Fang Y, Xu S, Ge L, 1987a, The resistance mechanism of the Asian honey bee, *Apis cerana* Fabr., to an ectoparasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans, *J Invertebr Pathol*, 49, 54–60.
194. Peng YS, Fang Y, Xu S, Ge L, Nasr ME, 1987b, Response of foster Asian honey bee (*Apis cerana* Fabr.) colonies to the brood of European honey bee (*Apis mellifera* L.) infested with parasitic mite *Varroa jacobsoni* Oudemans, *J Invertebr Pathol*, 49, 259–264.
195. Petrović T, Vidanović D, Stojanov I, Lupulović D, Lazić G, Plavša N, Lazić S, 2013, First molecular detection of six honeybee viruses in Serbian apiaries, Proceedings of the 10th International Symposium Modern Trends in Livestock Production, Belgrade, 2-4 October, Institute for Animal Husbandry, 627–639.

196. Pettis JS, Delaplane KS, 2010, Coordinated responses to honey bee decline in U.S.A., *Apidologie*, 41, 256–263.
197. Plužnikov LA, 1995, Характеристика морфологических и хозяйственных признаков пчел Югославии, Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора сельскохозяйственных наук, Министерство сельского хозяйства и продовольствия Республики Молдова, Государственный Аграрный Университет Молдовы
198. Quezada-Euán JGG, Pérez-Castro E, May-Itzá WDJ, 2003, Hybridization between European and African-derived honeybee populations (*Apis mellifera*) at different altitudes in Peru, *Apidologie*, 34 (3), 217–225.
199. Radakovic M, Stevanovic J, Djelic N, Lakic N, Knezevic-Vukcevic J, Vukovic-Gacic B, Stanimirovic Z, 2013, Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay, *J Bioscience*, 38 (1), 53–62.
200. Radoman P, 1974, *Organska evolucija*, II izdanje, Zavod za udžbenike i nastavna sredstva, Beograd.
201. Rath W, 1999, Co-adaptation of *Apis cerana* Fabr. and *Varroa jacobsoni* Oud, *Apidologie*, 30, 97–110.
202. Rehm SM, Ritter W, 1989, Sequence of the sexes in the offspring of *Varroa jacobsoni* and resulting consequences for the calculation of the developmental period, *Apidologie*, 20, 339–343.
203. Robison GA, Balvin O, Schal C, Vargo EL, Booth W, 2015, Extensive mitochondrial heteroplasmy in natural populations of a resurging human pest, the bed bug (Hemiptera: Cimicidae), *J Med Entomol*, tjv055.
204. Rosenkranz P, Aumeier P, Ziegelmann B, 2010, Biology and control of *Varroa destructor*, *J Invertebr Pathol*, 103, S96-S119.
205. Ruttner F, 1983, Varroatosis in honeybees: extent of infestation and effects, In: Proceedings of a Meeting of EC Expert's Group, Wageningen, 7–13.
206. Ruttner F, 1988, *Biogeography and Taxonomy of Honeybees*, Springer Verlag, Berlin, 1–284.
207. Ruttner F, Tassencourt L, Louveaux J, 1978, Biometrical statistical analysis of the geographic variability of *Apis mellifera* L. I: Materials and methods, *Apidologie*, 9, 363–382.

208. Schroder S, Wittmann D, Drescher W, Roth V, Steinhage V, Cremers AB, 2002, The new key to bee: Automated identification by image analysis of wings. in: Kevan P, Imperatriz Fonseca VL (Eds.), Pollinating bees - the Conservation Link Between Agriculture and Nature, Ministry of Environment, Brasilia.
209. Seeley TD, 2007, Honey bees of the Arnot Forest: a population of feral colonies persisting with *Varroa destructor* in the northeastern United States, *Apidologie*, 38 (1), 19–29.
210. Sheppard WS, Arias MC, Grech A, Meixner MD, 1997, *Apis mellifera ruttneri*, a new honey bee subspecies from Malta, *Apidologie*, 28, 287–293.
211. Sheppard WS, Berlocher SH, 1989, Allozyme variation and differentiation among four *Apis* species, *Apidologie*, 20 (5), 419–431.
212. Sheppard WS, Rinderer TE, Meixner MD, Yoo HR, Stelzer JA, Schiff NM, Kamel SM, Krell R, 1996, *Hinf* 1 variation in mitochondrial DNA of old world honey bee subspecies, *J Hered*, 87, 35–40.
213. Simeunović P, 2015, Molekularno-genetička detekcija i identifikacija uzročnika mikrosporidijalnih i virusnih infekcija zastupljenih kod pčelinjih društava na teritoriji Srbije, Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu, 1–166.
214. Simeunović P, Stevanović J, Vidanović D, Nišavić J, Radović D, Stanišić L, Stanimirović Z, 2014, A survey of deformed wing virus and acute bee paralysis virus in honey bee colonies from Serbia using real-time RT-PCR, *Acta Vet-Beograd*, 64 (1), 81–92.
215. Simpson GG, 1961, Principles of animal taxonomy, Columbia University Press.
216. Smith DR, Glenn TC, 1995, Allozyme polymorphisms in Spanish honeybees (*Apis mellifera iberica*), *J Hered*, 86, 12–16.
217. Smith MF, Thomas WK, Patton JL, 1992, Mitochondrial DNA-like sequence in the nuclear genome of an akodontine rodent, *Mol Biol Evol*, 9 (2), 204–215.
218. Solignac M, Cornuet JM, Vautrin D, Le Conte, Anderson D, Evans J, Cros-Arteil S, Navajas M, 2005, The invasive Korea and Japan types of *Varroa destructor*, ectoparasitic mites of the Western honey bee (*Apis mellifera*), are two partly isolated clones, *Proc Roy Soc Lond Ser B Biol Sci*, 272, 411–419.

219. Solignac M, Monnerot M, Mounolou JC, 1983, Mitochondrial DNA heteroplasmy in *Drosophila mauritiana*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 80 (22), 6942–6946.
220. Solignac M, Mougel F, Vautrin D, Monnerot M, Cornuet JM, 2007, A third-generation microsatellite-based linkage map of the honey bee, *Apis mellifera*, and its comparison with the sequence-based physical map, *Genome Biol*, 8 (4), R66.
221. Solignac M, Vautrin D, Loiseau A, Mougel F, Baudry E, 2003a, Five hundred and fifty microsatellite markers for the study of the honeybee (*Apis mellifera* L.) genome, *Mol Ecol Notes*, 3, 307–311.
222. Solignac M, Vautrin D, Pizzo A, Navajas M, Le Conte Y, Cornuet JM, 2003b, Characterization of microsatellite markers for the apicultural pest *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) and its relatives, *Mol Ecol Notes*, 3 (4), 556–559.
223. Southwick EE, Southwick JrL, 1992, Estimating the economic value of honey bees (Hymenoptera: Apidae) as agricultural pollinators in the United States, *J Econ Entomol*, 85, 621–633.
224. Stanimirović Z, Fišter S, Stevanović J, 2003a, Analysis of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes treated with cymiazole hydrochloride, *Acta Vet-Beograd*, 53 (5-6), 419–426.
225. Stanimirović Z, Marković B, Stevanović J, Pejović D, 1997a, Selekcija medonosne pčele (*Apis mellifera* Linne, 1758), *Veterinarski glasnik*, 51 (11–12), 553–648.
226. Stanimirovic Z, Pejovic D, Stevanovic J, 2001a, Hygienic behavior in disease resistance of two honeybee ecogeographic varieties (*Apis mellifera carnica*) from Serbia, Book of abstracts, XXXVII International Apiculture Congress (APIMONDIA 2001), Durban, South Africa, p. 256.
227. Stanimirovic Z, Pejovic D, Stevanovic J, 2002a, Hygienic behavior in disease resistance of two honeybee ecogeographic varieties (*Apis mellifera carnica*) from Serbia, *Apiacta*, 37 (1), 24–131.
228. Stanimirović Z, Pejović D, Stevanović J, Vučinić M, Mirilović M, 2002b, Investigations of hygienic behaviour and disease resistance in organic beekeeping of two honeybee ecogeographic varieties from Serbia, *Acta Vet-Beograd*, 52 (2-3), 169–180.

229. Stanimirović Z, Popesković B, Soldatović B, 1998a, Genetički resursi medonosne pčele i očuvanje biodiverziteta: proučavanje ultrastrukture hromozoma ekotipova medonosne pčele (*Apis mellifera* L. 1758) na teritoriji Jugoslavije, VII Kongres veterinarara Jugoslavije, 27-29. oktobar, Zbornik radova II, Beograd, str. 656–657.
230. Stanimirović Z, Popesković D, Marković B, 1997b, Ispitivanje hromozomskog polimorfizma nekih autotonihi ekotipova medonosne pčele (*Apis mellifica*) jugoslovenskog područja, *Savremena poljoprivreda*, 47 (5–6), 253–260.
231. Stanimirović Z, Popesković D, Pejović D, 1998b, Specificities of ultrachromosomal structure of the Peshtersko–Sjenichky ecotype of the honeybee (*Apis mellifera*, Linne), Second International Congress of the Biodiversity, Ecology and Conservation of the Balcan Fauna, Sept 16–20, Ohrid, Macedonia, p. 87.
232. Stanimirović Z, Popesković D, Pejović D, 1999a, Biodiversity of the honeybee *Apis mellifera*, Linne (1758), from the Yugoslav regions: I – The biometric variability of the chromosomes of the Banat and Syenichko – Peshterski ecotypes, *Acta Vet-Beograd*, 49 (2–3), 199–206.
233. Stanimirović Z, Soldatović B, Pejović D, 1997c, Genetičke osnove ponašanja medonosne pčele (*Apis mellifera*, Linne, 1758), *Veterinarski glasnik*, 51 (9–10), 433–552.
234. Stanimirović Z, Stevanović J, 2000, Cytogenetic investigations of Balkan honeybee ecotypes, Abstracts from EEMS-2000 (30th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society) 22–26 Aug, Volume 86, Budapest, Hungary, p. 162.
235. Stanimirović Z, Stevanović J, Aleksić N, Stojić V, 2010, Heritability of grooming behaviour in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Acta Vet-Beograd*, 60 (2-3), 313–323.
236. Stanimirovic Z, Stevanovic J, Andjelkovic M, 2005a, Chromosomal diversity in *Apis mellifera carnica* from Serbia, *Apidologie*, 36, 31–42.
237. Stanimirovic Z, Stevanovic J, Bajic V, Radovic I, 2007, Evaluation of genotoxic effects of fumagillin by cytogenetic tests in vivo, *Mutat Res-Gen Tox En*, 628 (1), 1–10.

238. Stanimirović Z, Stevanović J, Brajković M, 1999b, Biodiverzitet medonosne pčele na teritoriji Srbije II deo: Ultrastrukturalna hromozomska karakterizacija genoma dva ekotipa, Zbornik rezimea, Simpozijum entomologa Srbije '99, 21-23. oktobar, Goč, str. 14.
239. Stanimirović Z, Stevanović J, Ćirković D, 2003b, Investigations of reproductive, productive, hygienic and grooming features of Syenichko-Peshterski honey bee ecotype, *Apidologie*, 34 (5), 487–488.
240. Stanimirović Z, Stevanović J, Jovanović S, Andjelković M, 2005b, Evaluation of genotoxic effects of Apitol® (cymiazole hydrochloride) in vitro by measurement of sister chromatid exchange, *Mutat Res-Gen Tox En*, 588 (2), 152–157.
241. Stanimirović Z, Stevanović J, Mirilović M, Stojić V, 2008, Heritability of hygienic behavior in grey honey bees (*Apis mellifera carnica*), *Acta Vet-Beograd*, 58 (5-6), 593–601.
242. Stanimirović Z, Stevanović J, Pejović D, Mirilović M, 2001b, Hygienic and grooming behaviour in disease resistance of two honeybee ecogeographic varieties (*Apis mellifera carnica*) from Serbia, *Mellifera*, 1 (2), 56–61.
243. Stanimirović Z, Stevanović J, Vučinić M, 1999c, Tolerancija Sjeničko-peštorskog ekotipa medonosne pčele na asfiksiju u prisustvu različitih preparata propolisa, Zbornik kratkih sadržaja I Simpozijuma iz oblasti veterinarske nauke i prakse, 23–28. novembar 1999, Zlatibor, str. 78–79.
244. Stanimirović Z, Vučinić M, Stevanović J, 1999d, Biodiversity of the honeybee *Apis mellifera*, Linne (1758), from some Yugoslav regions: II – Ultrastructural chromosomal differences between Banat and Syenichko-Peshterski honeybee ecotype, *Acta Vet-Beograd*, 49 (2–3), 207–214.
245. Stanimirović ZŽ, Stevanović JB, Ćirković D, 2005c, Behavioural defenses of the honey bee ecotype from Sjenica–Pester against *Varroa destructor*, *Acta Vet-Beograd*, 55 (1), 69–82.
246. Steffan-Dewenter I, Potts SG, Packer L, 2005, Pollinator diversity and crop pollination services are at risk, *Trends Ecol Evol*, 20, 651–652
247. Steiner J, Diehl PA, Vlimant M, 1995, Vitellogenesis in *Varroa jacobsoni*, a parasite of honey bees, *Exp Appl Acarol*, 19 (7), 411–422.

248. Steiner J, Dittmann F, Rosenkranz P, Engels W, 1994, The first gonocycle of the parasitic mite (*Varroa jacobsoni*) in relation to preimaginal development of its host, the honey bee (*Apis mellifera carnica*), *Invertebr Rep Develop*, 25, 175–183.
249. Stevanovic J, 2002, Istraživanja morfometrijske i hromozomske varijabilnosti u funkciji očuvanja diverziteta kranjske medonosne pčele (*Apis mellifera carnica* Pollmann, 1879) na teritoriji Srbije, Magistarska teza, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1–190.
250. Stevanović J, 2007, Ekološko-etološki odbrambeni mehanizmi *Apis mellifera carnica* prema ektoparazitu *Varroa destructor* na području Srbije, Doktorska disertacija, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu, 1–202.
251. Stevanovic J, Simeunovic P, Gajic B, Lakic N, Radovic D, Fries I, Stanimirovic Z, 2013, Characteristics of *Nosema ceranae* infection in Serbian honey bee colonies, *Apidologie*, 44 (5), 522–536.
252. Stevanovic J, Stanimirovic Z, 2001a, The three indigenous honeybee ecotypes in Serbia - a remarkable genetic resource for highly selected breeds improving, Book of papers, The 2nd international exhibition "INTERMIOD-2001", 14 Sep, Moscow, Russia, pp. 198–199.
253. Stevanović J, Stanimirović Z, 2001b, The investigations of variability and the protection measures of indigenous honeybee ecotypes in Serbia, Book of abstracts, 1st International Symposium "Food in the 21st century", Nov 14–17, Subotica, Serbia, pp. 77–78.
254. Stevanović J, Stanimirović Z, Brajković M, 1999, Biodiverzitet medonosne pčele na teritoriji Srbije. I deo: Biometrijska karakterizacija hromozoma dva ekotipa, Zbornik rezimea, Simpozijum entomologa Srbije '99, 21–23. oktobar, Goč, str. 13.
255. Stevanović J, Stanimirović Z, Brajković M, 2001a, Odstupanja u nervaturi krila medonosnih pčela (*Apis mellifera*) u Srbiji, Zbornik rezimea, Simpozijum entomologa Srbije 2001, 26–29. septembar, Goč, str. 43.
256. Stevanović J, Stanimirović Z, Brajković M, 2001b, Morphometric variability of hind wing parameters of indigenous honeybee ecotypes (*Apis mellifera carnica*) from Serbia, Book of abstracts. XXXVII International Apiculture Congress (APIMONDIA 2001), Durban, South Africa, p. 377.

257. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Genersch E, Kovacevic SR, Ljubenkovic J, Radakovic M, Aleksic N, 2011a, Dominance of *Nosema ceranae* in honey bees in the Balkan countries in the absence of symptoms of colony collapse disorder, *Apidologie*, 42 (1), 49–58.
258. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Lakic N, Aleksic N, Simeunovic P, Kulisic Z, 2011b, Safety assessment of sugar dusting treatments by analysis of hygienic behaviour in honey bee colonies. *Arch Biol Sci*, 63 (4), 1199–1207.
259. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Lakic N, Djelic N, Radovic I, 2012, Stimulating effect of sugar dusting on honey bee grooming behaviour, *Entomol Exp et Appl*, 143 (1) 23–30.
260. Stevanovic J, Stanimirovic Z, Radakovic M, Kovacevic RS, 2010, Biogeographic study of the honey bee (*Apis mellifera* L.) from Serbia, Bosnia and Herzegovina and Republic of Macedonia based on mitochondrial DNA analyses, *Russ J Genet*, 46, 603–609.
261. Stojanović R, 1992, Izučavanje biometrijskih karakteristika elemenata spoljašnje morfologije medonosne pčele (*Apis mellifica* L) sa različitih geografskih područja naše zemlje, Magistarska teza, Veterinarski fakultet, Univerzitet u Beogradu, str. 1–100.
262. Sunnucks P, Hales DF, 1996, Numerous transposed sequences of mitochondrial cytochrome oxidase I-II in aphids of the genus *Sitobion* (Hemiptera: Aphididae), *Mol Biol Evol*, 13 (3), 510–524.
263. Sušnik S, Kozmus P, Poklukar J, Meglič V, 2004, Molecular characterisation of indigenous *Apis mellifera carnica* in Slovenia, *Apidologie*, 35, 623–636.
264. Tautz D, 1993, Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences, In *DNA fingerprinting: State of the science*, Birkhauser; Basel, 21–28.
265. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting, position specific gap penalties and weight matrix, *Nucleic Acids Res*, 22, 4673–4680.
266. Tixier MS, Okassa M, Kreiter S, 2012, An integrative morphological and molecular diagnostics for *Typhlodromus pyri* (Acari: Phytoseiidae), *Zool Scr*. 41, 68–78.

267. Tofilski A, 2004, DrawWing, a program for numerical description of insect wings, *J Insect Sci*, 4, 17–21.
268. Uzunov A, Costa C, Panasiuk B, Meixner MD, Kryger P, Hatjina F, Bouga M, Andonov S, Bienkowska M, Le Conte Y, Wilde J, Gerula D, Kiprijanovska H, Filipi J, Petrov P, Ruottinen L, Pechhacker H, Berg S, Dyrba W, Ivanova E, Büchler R, 2014a, Swarming, defensive and hygienic behaviour in honey bee colonies of different genetic origin in a pan - European experiment, *J Apic Res*, 53 (2), 248–260.
269. Uzunov A, Kiprijanovska H, Andonov S, Naumovski M, Gregorc A, 2009, Morphological diversity and racial determination of the honey bee (*Apis mellifera* L.) population in the Republic of Macedonia, *J Apic Res*, 48 (3), 196–203.
270. Uzunov A, Meixner MD, Kiprijanovska H, Andonov S, Gregorc A, Ivanova E, Bouga M, Dobi P, Büchler R, Francis R, Kryger P, 2014b, Genetic structure of *Apis mellifera macedonica* in the Balkan Peninsula based on microsatellite DNA polymorphism, *J Apic Res*, 53 (2), 288–295.
271. Van Leeuwen T, Vanholme B, Van Pottelberge S, Van Nieuwenhuyse P, Nauen R, Tirry L, Denholm I, 2008, Mitochondrial heteroplasmy and the evolution of insecticide resistance: non-Mendelian inheritance in action, *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 5980–5985.
272. Van Leeuwen T, Vontas J, Tsagkarakou A, Dermauw W, Tirry L, 2010, Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: a review, *Insect Biochem Molec*, 40 (8), 563–572.
273. Vaughan HE, Heslop-Harrison JS, Hewitt GM, 1999, The localization of mitochondrial sequences to chromosomal DNA in orthopterans, *Genome*, 42 (5), 874–880.
274. Villa JD, Bustamante DM, Dunkley JP, Escobar LA, 2008, Changes in honey bee (Hymenoptera: Apidae) colony swarming and survival pre- and postarrival of *Varroa destructor* (Mesostigmata: Varroidae) in Louisiana, *Ann Entomol Soc Am*, 101 (5), 867–871.
275. Wang CY, Zhao ZB, 2012, Somatic mtDNA mutations in lung tissues of pesticide-exposed fruit growers, *Toxicology*, 291 (1), 51–55.
276. Warrit N, Smith DR, Lekprayoon C, 2006, Genetic subpopulations of *Varroa* mites and their *Apis cerana* hosts in Thailand, *Apidologie*, 37, 19–30.

277. Watanabe ME, 1994, Pollination worries rise as honey bees decline, *Science*, 265, 1170.
278. Whitfield CW, Behura SK, Berlocher SH, Clark AG, Johnston JS, Sheppard WS, Smith DR, Suarez AV, Weaver D, Tsutsui ND, 2006, Thrice out of Africa: ancient and recent expansions of the honey bee, *Apis mellifera*, *Science*, 314 (5799), 642–645.
279. Williams IH, 1994, The dependences of crop production within the European Union on pollination by honey bees, *Agric Zool Rev*, 6, 229–257.
280. Xiong H, Barker SC, Burger TD, Raoult D, Shao R, 2013, Heteroplasmy in the mitochondrial genomes of human lice and ticks revealed by high throughput sequencing, *PloS one*, 8, 9, e73329.
281. Yang X, Cox-Foster DL, 2005, Impact of an ectoparasite on the immunity and pathology of an invertebrate: evidence for host immunosuppression and viral amplification, *Proc Natl Acad Sci Usa*, 102 (21), 7470–7475.
282. Yang X, Cox-Foster DL, 2007, Effects of parasitization by *Varroa destructor* on survivorship and physiological traits of *Apis mellifera* in correlation with viral incidence and microbial challenge, *Parasitology*, 134, 405–412.
283. Zhang H, Go YM, Jones DP, 2007, Mitochondrial thioredoxin-2/peroxiredoxin-3 system functions in parallel with mitochondrial GSH system in protection against oxidative stress, *Arch Biochem Biophys*, 465 (1), 119–126.
284. Zhou T, Anderson D, Huang ZSH, Yao J, Tan K, Zhang Q, 2004, Identification of *Varroa mites* (Acari: Varroidae) infesting *Apis cerana* and *Apis mellifera* in China, *Apidologie*, 35, 645–654.
285. Ziegelmann B, Lindenmayer A, Steidle J, Rosenkranz P, 2013, The mating behavior of *Varroa destructor* is triggered by a female sex pheromone, *Apidologie*, 44 (3), 314–323.
286. Živanović J, 1893, Srpski pčelar, Knjižara Luke Jocića, Novi Sad, str. 298.

BIOGRAFIJA

Bojan Gajić rođen je 15. maja 1983. godine u Kragujevcu. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu upisao je 2002. godine, a diplomirao 2009. godine sa prosečnom ocenom 9,72. Nagrada Udruženja univerzitetskih profesora i naučnika Srbije dodeljena mu je 2007. godine, a poveljom Univerziteta u Beogradu za najboljeg studenta generacije nagrađen je 2010. godine. Iste godine upisao je doktorske akademske studije na Fakultetu veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu. Položio je sve ispite predviđene planom i programom poslediplomskih studija sa prosečnom ocenom 9,76.

U februaru 2010. godine izabran je za saradnika u nastavi na Katedri za parazitologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, a 2011. za asistenta na istoj Katedri. Od iste godine angažovan je kao istraživač na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije pod nazivom „Molekularno-genetička i ekološka istraživanja u zaštiti autohtonih animalnih genetičkih resursa, očuvanja dobrobiti, zdravlja i reprodukcije gajenih životinja i proizvodnje bezbedne hrane” (rukovodilac Prof. dr Zoran Stanimirović, ev. br. 46002).

Za vreme osnovnih studija bio je stipendista Ministarstva prosvete Republike Srbije u periodu 2003-2004, a zatim Republičke Fondacije za razvoj naučnog i umetničkog podmlatka u periodu 2004-2009.

U okviru CEEPUS programa, 2013. godine boravio je na stručnom usavršavanju na Katedri za parazitologiju Fakulteta veterinarske medicine u Brnu (Češka Republika), a 2015. godine pohađao je trening školu u Cluj-Napoca (Rumunija) koja je organizovana u okviru EurNegVec COST projekta.

Kao autor ili koautor objavio je 20 naučnih i stručnih radova, od kojih je sedam objavio u časopisima sa SCI liste.

Oženjen je, otac jednog deteta.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Potpisani Bojan Gajić

broj upisa

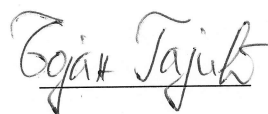
Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom „Ispitivanje genetičke varijabilnosti i korelacije haplotipova medonosne pčele *Apis mellifera* i pčelinjeg krpelja *Varroa destructor*“

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Beogradu,
2016. godine

Potpis doktoranda



Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Bojan Gajić

Broj upisa:

Studijski program: doktorske akademske studije

Naslov rada: „Ispitivanje genetičke varijabilnosti i korelacije haplotipova medonosne pčele *Apis mellifera* i pčelinjeg krpelja *Varroa destructor*“

Mentor 1: dr Zoran Kulišić, redovni profesor

Mentor 2: dr Željko Radulović, naučni saradnik

Potpisani Bojan Gajić


Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu,
2016. godine

Potpis doktoranda



Prilog 3.

Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom „Ispitivanje genetičke varijabilnosti i korelacije haplotipova medonosne pčele *Apis mellifera* i pčelinjeg krpelja *Varroa destructor*“ koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu,
2016. godine

Potpis doktoranda

