

PRIJAVA TEME DOKTORSKE DISERTACIJE

OPŠTI PODACI O DOKTORANDU	
Titula, ime i prezime	Magistar Marija Vojinović
Fakultet	Prirodno-matematički fakultet
Studijski program	Biologija
Broj indeksa	1/18
Ime i prezime roditelja	Miloš Vojinović
Datum i mjesto rođenja	07.08.1993.
Adresa prebivališta	Zetska 26, 81 400, Nikšić, Crna Gora
Telefon	+38267018811
E-mail	marijavojinovic16@gmail.com
BIOGRAFIJA I BIBLIOGRAFIJA	
Obrazovanje	Marija Vojinović rođena je 07.08.1993. godine u Nikšiću u Crnoj Gori. Osnovnu školu „Braća Ribar“ u Nikšiću završila je 2008. godine sa odličnim uspjehom, nakon čega je upisala srednju školu Gimnaziju „Stojan Cerović“ u Nikšiću koju je završila 2012. godine takođe sa odličnim uspjehom. Dobitnica je diplome Luča I. 2012. godine upisala je osnovne studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, studijski program Biologija. 2015. godine je završila osnovne studije sa prosječnom ocjenom 8.12 i stekla bečelor diplomu. Iste godine (2015) upisuje specijalističke studije na istom fakultetu i završava ih 2016. godine sa prosječnom ocjenom 9.55 i stiče zvanje diplomirani biolog. 2016. godine upisuje Master studije takođe na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta Crne Gore, studijski program Biologija. Navedene studije završava 2018. godine sa prosječnom ocjenom 10 i time stiče zvanje Master biologije. 2018. godine upisuje doktorske studije na Prirodno-matematičkom fakultetu Univerziteta Crne Gore u Podgorici, studijski program Biologija.
Radno iskustvo	2010 - 2018 – Umjetnički rukovodilac i koreograf dječijih folklornih ansambala; Umjetnički centar „Korak“ Nikšić 2016 - sadašnjost – Mentor i asistent na Ljetnjoj i Zimskoj školi nauke; Fondacija za promovisanje nauke Prona januar 2017 - oktobar 2017 – Profesor Biologije – pripravnik; Gimnazija „Stojan Cerović“ Nikšić 2017 - sadašnjost – Koordinator Ljetnje i Zimske škole nauke; Fondacija za promovisanje nauke Prona
Popis radova	/

NASLOV PREDLOŽENE TEME	
Na službenom jeziku	Napredna molekularno biološka istraživanja i analiza evolutivnih procesa na modelu balkanskih pastrmskih vrsta
Na engleskom jeziku	Advanced molecular biology research and analysis of evolutionary processes on Balkan trout species model
Obrazloženje teme	
Sa početkom primjene istraživanja molekula DNK u izučavanju filogenetskih i evolucionih procesa smatralo se da će se konačno otkloniti sva subjektivnost i da će ovo omogućiti da na matematički precizan način konačno razlikujemo sve taksonne među sobom. Početna istraživanja dala su veliku nadu, ali kako se uvećavao broj proučavanih uzorka i kao se proširivala geografska teritorija sa koje su podaci o istim ili srodnim organizmima stizali slika je postajala sve maglovitija. Najveći problem je bio u tome što svi djelovi jednog istog DNK molekula nemaju istu brzinu kojom se mijenjaju (neki djelovi DNK su jako konzervativni, dok su drugi podložni čestim izmjenama – mutacijama). Poređenje između familija ili čak klasa kao i rekonstrukcija najvjerovatnijih modela evolucije i filogenetskih odnosa među njima pokazala se kao veoma pouzdana kada se analiziraju djelovi DNK molekula koji imaju relativno nizak nivo izmjena, pa su se ova istraživanja uglavnom koncentrisala na upoređivanje čitavih ili dijelova nekih glavnih gena koji učestvuju u važnim biohemijskim procesima. Sama prirodna selekcija koja je jedan od glavnih „motora“ evolutivnih procesa pokazala se kao velika prepreka za ova istraživanja jer veoma često, čak i neke manje mutacije kod važnijih gena mogu da vode ili letalnoj posledici ili je selekcija protiv njih toliko jaka da nosioci takvih mutacija ne ostavljaju potomstvo, što vodi ka tome da se te mutacije ne prenose na sledeću generaciju. Rješenje je potraženo u takozvanim strukturnim dijelovima DNK molekula (npr. d-loop mitondrijske DNK), to jeste dijelovima DNK molekula koji ne kodiraju nikakav protein i, koliko nam je za sada poznato, imaju ulogu samo da povezuju pojedinačne gene unutar molekula DNK. Ova istraživanja pokazala su početne uspjehe, ali kao što je i navedeno, sa povećanjem broja uzoraka i proširivanjem geografske teritorije sistem je pokazao veliku slabost. Da bi se povećala raznolikost na individualnom nivou u ovim istraživanjima se koriste i visoko repetitivni motivi koji se nalaze u molekulama DNK (mikrosateliti) uz pomoć kojih se sa lakoćom identifikuju pojedinačne jedinke i koji su pokazali veliki potencijal za unutar i inter populaciona istraživanja između geografski bliskih populacija, ali sa povećanjem geografske teritorije njihova velika varijabilnost je samo stvorila veliku količinu redundantnih podataka (takozvani „šum“) koji je prikrivao stvarne evolutivne događaje i učinio otežanim rekonstrukciju filogenetskih odnosa među njima. Od početka primjene ovih istraživanja bilo je jasno da bi najbolji pristup bio sekvencioniranje kompletnog genoma i njihovo poređenje, međutim Sanger tehnologija sekvencioniranja je neprikladna za ovakva istraživanja jer je potrebno uposliti veliki broj ljudi kao i potrošiti ogromno vrijeme i resurse da bi se sekvencionirao samo jedan genom jedne individue. Sa pojavom NGS tehnologije (Next Generation Sequencing) stvorili su se uslovi za skeniranje daleko većeg dijela DNK (pa čak i kompletnog) u relativno kratkom vremenskom intervalu po daleko nižoj cijeni i sa razumnim utroškom resursa. Međutim, opet je cijena vrlo visoka i podrazumijeva timski rad, a skeniranje većeg broja uzoraka je i dalje ostalo veoma problematično sve do pojave RADseq, dRADseq i ddRADseq protokola (restriction-site associated DNA sequencing i digest ili double digest restriction-site associated DNA sequencing). Ova tehnika omogućava takozvano sekvencioniranje molekula DNK po principu sačme kada se skeniraju i čitaju svi segmenti DNK molekula željene dužine koji su nastali nakon aktivnosti jednog ili dva restriktiona enzima. Ovo je relativno nova tehnika koja je tek počela da se primjenjuje i na istraživanje evolutivnih procesa i rekonstrukcije filogenije. ddRAD tehnika i NextGenerationSequencing tehnologija do sada nije rađena u Crnoj Gori	

obzirom da se radi o relativno novom pristupu u molekularnoj biologiji, kao i o opremi za subvencioniranje koja je relativno skupa i zahtijeva ozbiljnu obuku za korišćenje. Za sada su se u oblasti analize DNK različitih taksona, kao i rekonstrukcije evolucije, populacione strukture i filogenetske istorije analiziranih vrsta koristili mali dijelovi DNK: strukturni dijelovi mitohondrijske DNK, mitohondrijski ili jedarni geni i mikrosatelitska DNK. Ove analize su se bazirale na najviše stotinjak SNP-ova (kratka polimorfna mjesta u DNK molekulu), dok ova nova tehnika i tehnologija omogućavaju rad sa 5000 – 10000 SNP-ova što nam otvara neslućene mogućnosti u istraživanju. Ovo istraživanje će nam dati mogućnost novog i mnogo preciznijeg uvida u evolutivne procese, filogenetske odnose i populacionu strukturu i testiranje mogućnosti, ali i ograničenja ove nove tehnologije u molekularnoj biologiji na izabranom modelu - balkanske pastrmske vrste. Predloženi model se sastoji od uzoraka sve tri filogenetske linije potočne pastrmke (kompleks vrsta *Salmo trutta*), zatim endemične mekousne pastrmke (*Salmo obtusirostris*), glavatice (*Salmo marmoratus*) ohridske belvice (*Acantholingua ohridana*) ali i najugorženije evropske pastrmske vrste mladice (*Hucho hucho*). Dakle, tema ove doktorske disertacije je primjena i adaptacija ove molekularno biološke tehnike na predloženi model vrsta kao i kasnija rekonstrukcija evolutivnih procesa i filogenetskih odnosa među izabranim OTUima („Operational taxonomic units“)

Pregled istraživanja

U prethodnom periodu balkanske salmonide su bile predmet detaljnijih DNK istraživanja u kojima se koristila Sanger tehnologija sekvencioniranja i nakon skoro 20 godina istraživanja jedino što se sa sigurnošću može tvrditi jeste da su precizno definisane populacije unutra sistema uzoraka koji su analizirani. Evolutivni procesi, kao i pouzdanije rekonstruisanje filogenije čitavih populacija i organizama (a ne pojedinačnih gena), na kraju su ostali nedokučivi jer je svako sledeće istraživanje skoro negiralo ona prethodna, a u zavisnosti od seta uzorka i veličine geografske teritorije sa kojih su prikupljani (Bernatchez et al., 1992; Bernatchez, 2001; Berrebi et al., 2000 i 2013; Cortey et al., 2004; Crivelli et al., 2000; Dellling et al., 2000; Marić et al., 2006 i 2012; Mrdak et al., 2012; Tošić et al., 2014 i 2016; Sušnik et al., 2007, Pustvrh et al., 2014; Razpet et al., 2007; Snoj et al., 2002 i 2009; Sušnik et al., 2004 i 2006).

Do sada ova tehnika nije primjenjivana na endemičnim pastrmskim taksonima i za sada postoji samo jedno istraživanje u kojem su ove tehnike primijenjene na atlantskom lososu i potočnoj pastrmci (Leitwein et al., 2017), ali je istraživanje rađeno u pravcu razumijevanja organizacije njihovog genoma. Sekvenciranje čitavog genoma je jako skup, vremenski i kadrovski zahtijevan proces dok je za druge tehnike koje se bavi istraživanjem većih dijelova genoma potrebno da postoji baza podataka kompletno pročitane DNK cilnog organizma. Predložena tehnika je relativno nov koncept, ne zahtijeva da je prethodno obavljeno sekvencioniranje kompletnog genoma, značajano je brža i što je najbitniji - daleko je jeftinija.

Istraživanja ovom metodom na ovako kompleksnom model-sistemu balkanskih endemičnih pastrmskih taksona su prva ili među prvim takvim jer do sada ona nijesu urađena (možda su neka i u toku, što nama nije poznato jer ne postoje publikacije u relevantnim časopisima).

Stoga će ova doktorska disertacija biti pionirski poduhvat kojim će, nadamo se, otpočeti novo poglavlje u primjeni ove molekularno biološke tehnike, jer pored sekvencioniranja dodatni i ne manji izazov predstavlja obrada ovako komplikovanih i obimnih podataka (očekuje se da se pročita od 10 do 15 miliona baznih parova genoma od svake od analiziranih individua).

Cilj i hipoteze

Primarni cilj ove doktorske teze biće primjena nove molekularno biološke tehnike i njena adaptacija za model-sistem balkanskih pastrmskih vrsta. Očekuje se da će se kroz ovo

istraživanje otkriti, to jeste dešifrovati, novi djelovi genoma pastrenskih vrsta koji u sebi kriju informaciju o filogenetskim odnosima i evolutivnim procesima zahvaljujući kojima je došlo do ovakve adaptivne radijacije pastrenskih taksona na Balkanu. Ovo je od velikog značaja da se dobije jasnija i bliža slika, kao i shvatanje samog procesa specijacije. Kroz ovo istraživanje pokušaćemo da pronađemo djelove DNK molekula (i da dizajniramo prajmere za njihovo lako umnožavanje zbog budućeg testiranja) koji su diskriminativni na nivou OTU-a to jeste nominalnih vrsta koje postoje. Takođe, želimo da steknemo uvid i u odnose unutar *Salmo trutta* kompleksa kako bi smo mogli da doprinesemo „raspetljavanju“ ovog svojevrsnog Gordijevog čvora evropske ihtiologije. I na kraju, želimo da kroz kompleksne analize dobijenih setova podataka stvorimo sistem softverske analize („pipeline“) koji bi na relativno uniforman način mogao da se koristi i za druga slična istraživanja.

Nulte, to jeste polazne hipoteze ove disertacije su:

H0₁ – ddRAD pristup je veoma informativan i ima veliku mogućnost usavršavanja i nadogradnje kako bi se na relativno jednostavan i jeftin način sekvencionirao veći dio genoma pastrenskih vrsta

H0₂ – Uz pomoć ove tehnike i adekvatnog kreiranja biblioteka („DNK library“) moguće je na NGS-u sekvencionirati veliki broj baznih parova (do 15 miliona BP po jedinci) za relativno veliki broj jedinki u jednom NGS procesu („tray -u“)

H0₃ – Ova tehnika omogućava otkrivanje velikog broja do sada nepoznatih SNP-ova (Short nucleotide polymorphism) kod pastrenskih vrsta

H0₄ – Balkanske endemične vrste iz roda *Salmo* imaju zajedničkog pretka od kojeg su evoluirale u nekoliko pravaca

H0₅ – U okviru *Salmo trutta* kompleksa vjerovatno postoje najmanje dvije dobre vrste (po biološkom konceptu vrste)

H0₆ – ddRAD tehnikom i kasnijom bioinformatičkom analizom moguće je pronaći djelove DNK koji nedvosmisleno odvajaju vrste među sobom i koji su pogodni za budući barkoding ovih vrsta.

Materijali, metode i plan istraživanja

Da bi se ovaj projekat u potpunosti realizovao i da bi se ostvarili glavni ciljevi planom je predviđena realizacija specifičnih ciljeva koji ujedno predstavljaju i plan istraživanja, a koji su navedeni u hronološkom redu.

- Prikupiti uzorke tkiva jedinki vrsta koje će se analizirati (terensko uzorkovanje)
- Izolovanje DNK iz uzoraka tkiva (laboratorijski rad)
- Obrada DNK materijala i restrikcija materijala uz pomoć dva izabrana endonukleazna enzima
- Ligaza isječaka DNK molekula sa adapterima i barkodirajućim sekvencama
- Odabir i izolacija isječaka željene dužine (obično 200 - 700 baznih parova)
- Umnožavanje isječaka (na PCR mašini) i njihovo obilježavanje sa indeksiranim sekvencama specifično dizajniranim za Illumina NG Sekvencer
- Sekvencioniranje (čitavanje) ovako pripremljenih biblioteka na Illumina NG Sekvencioneru
- Informatička obrada i analiza dobijenih sekvenci kao i dalji rad na analizi podataka iz ugla interesovanja ove doktorske teze.

Za ovo istraživanje koristiće se ddRADsequencing metoda (doubledigestrestriction-site associated DNA sequencing) kao i Illumina NG Sekvencer sistem koji omogućavaju brzo i jeftino „iščitavanje“ velikih setova DNK. U kasnijoj obradi i analizi podataka koristimo se znanjem i softverskim rješenjima koja su razvijena u EMBL-ovom informatičkom centru u Londonu i koja

ćemo primijeniti na naš set podataka. Kako se očekuje veliki broj SNP-ova, uz pomoć ovih softverskih paketa bićemo u mogućnosti da selektujemo informativne, to jeste one koji nam omogućavaju dalju analizu, u pravcu ostvarenja zacrtanih ciljeva.

Uzorci peraja jedinki svakog od OTU-a prikupljeni su prilikom terenskog istraživanja. Ribe su uzorkovane standardnom opremom za elektro izlov i svakoj od individua je uzet uzorak tkiva, komad analnog peraja, koji je pohranjen u tubici sa 96% etil-alkoholom u kojem se DNK ne rastvara. Uzorci jedinki koje su bili zamrznute uzeti su na isti način s time što su od svake individue dodatno uzimani i dijelovi mišićnog tkiva.

U laboratoriji je izvršena izolacija DNK metodom isoljavanja (Miller et al., 1988) da bi se napravili rastvori DNK za svaku jedinku. Koncentracije DNK je izmjerena u svakom od radnih rastvora na mašini Qubit 2.0. Od svakog uzorka uzeto je 500 ng DNK, stavljeno je u reakciju sa dva restrikciona enzima (EcoRI-HF and MspI) i ostavljeno je na termo bloku preko noći da restrikcioni enzimi digestuju DNK.

Nakon toga izvršena je ligacija adaptera na krajevima isječaka koji sadrže barkodove. Poslije ligacije izvršeno je prečišćavanje isječaka sa adapterima uz pomoć CleanPCR beads na taj način da u rastvoru ostanu samo isječci dužina 200 do 700 bp. Nakon ovoga izvršena je selekcija isječaka koji su sa jedne strane bili isječeni EcoRI-HF, a sa druge strane MspI enzimima, a uz pomoć N-270 Sterptovidin Dynabeds™. Neposredno prije sekvencioniranja isječci su umnoženi u PCR reakciji i obilježeni sa jedinstvenim indeksima specifično razvijenim za Illumina sekvencioner (Peterson et al. 2012).

Ovako pripremljene biblioteke su date na sekvencioniranje na Illumina HiSequation 5000 mašinu koja čita po 150 bp sa 5' i 3' strane. Svi uzorci su sekvencionirani zajedno na jednom plejtu.

Nakon ovoga podaci su obrađeni kroz softverski „pipeline“ da bi se mogla raditi dalja analiza. U softverskom paketu STACS (Catchen et al., 2013) gdje će se uraditi alignment u odnosu na referentni genom i dalja analiza preklapajućih sekvenci. Nakon odabira filogenetski informativnih sekvenci uradiće se filogenetska analiza u cilju rekonstrukcije najvjerovatnije filogenije.

U softverskim paketima i korišćenjem specifičnih algoritama analiziraće se dobijeni podaci u cilju otkrivanja novih SNP-a kao i određivanje dijelova genoma koji su podložni evolutivnim procesima kao i onih koji su konzervativni. Daljim upoređivanjem probaćemo da pronademo dijelove DNK koji se nedvosmisleno razlikuju između nominalnih OTUa kako bi se definisali prajmere za jednostavno umnožavanje ovih segmenata.

Očekivani naučni doprinos

Kao što smo već pomenuli, kroz ovo istraživanje će se načiniti ozbiljan pomak u razumijevanju i praktičnoj primjeni molekularne biologije na evolutivnim modelima filogenetski bliskih vrsta. Sagledaće se puni kapacitet ove metodologije i moguće modifikacije koje će doprinijeti sveukupnosti i svestranosti analiziranih podataka i na tome zasnovanim zaključcima. Prelazak sa nivoa od nekoliko desetina na nivo od nekoliko hiljada SNP-ova na osnovu kojih će se raditi dalje analize samo govori o svojevrsnom „kvantnom skoku“ za koji očekujemo da se ostvari u ovoj oblasti. Sigurni samo da će svi rezultati biti objavljeni u prestižnim naučnim časopisima jer se radi o potpuno novom pristupu koji će svakako da zasluži pažnju internacionalne naučne javnosti.

Spisak objavljenih radova kandidata

Kandidat do sada nije imao objavljenih naučnih radova. Za sledeću godinu se očekuje prvo pojavljivanje na kongresu gdje će biti prezentovan dio rezultata, a takođe je planirano da se, čim

se sprovedu kompletna istraživanja (krajem godine), pristupi pisanju i objavi prvog naučnog rada iz ove doktorske disertacije.

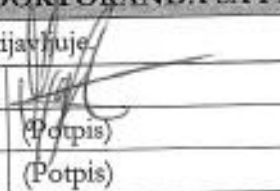
Popis literature

1. Bernatchez, L., Guyomard, R., Bonhomme, F. 1992. DNA sequence variation of the mitochondrial control region among geographically and morphologically remote European brown trout *Salmo trutta* populations. *Molecular Ecology*, 1: 161-173.
2. Bernatchez, L. 2001. The evolutionary history of brown trout (*Salmo trutta* L.) inferred from phylogenetic, nested clade, and mismatch analyses of mitochondrial DNA variation. *Evolution*, 55 (2): 351-379.
3. Berrebi, P., Povž, M., Jesenšek, D., Cattaneo – Berrebi, G., Crivelli, A. J. 2000. The genetic diversity of native, stocked, and hybrid populations of marble trout in Soča river, Slovenia. *Heredity*, 85 (3): 277-287.
4. Berrebi, P., Tougaard, C., Dubois, S., Shao, Z., Koutseri, I., Petkovski, S. & Crivelli, A.J. (2013). Genetic diversity and conservation of the Prespa Trout in the Balkans. *International Journal of Molecular Sciences* 14, 23454–23470.
5. Cortey, M., Pla, C., García-Marín, J. L. 2004. Historical biogeography of Mediterranean trout. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 831-844.
6. Crivelli, A., Poizat, G., Berrebi, P., Jesenšek, D., Rubin, J. F. (2000): Conservation biology applied to fish: The example of a project for rehabilitating the marble trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Cybius*, 24, (3), 211–230.
7. Dellling, B., Crivelli, A. J., Rubin, J-F., Berrebi, P. (2000): Morphological variation in hybrids between *Salmo marmoratus* and alien *Salmo* species in the Volaria stream, Soca River Basin, Slovenia. *Journal of Fish Biology*, 57, 1199–1212.
8. Marić, S., Sušnik, S., Simonović, P., Snoj, A. 2006. Phylogeographic study of brown trout from Serbia, based on mitochondrial DNA control region analysis. *Genetic Selection and Evolution*, (Paris). 4: 411-430.
9. Marić, Saša, Kalamujić, Belma, Snoj, Aleš, Razpet, Andrej, Lukić-Bilela, Lada, Pojskić, Nariš, Sušnik Bajec, Simona (2012): Genetic variation of European grayling (*Thymallus thymallus*) populations in the Western Balkans. *Hydrobiologia*, 691, 1, 225- 237.
10. Sušnik, S., Schöffman, J., Snoj, A. 2004. Phylogenetic position of *Salmo* (*Platysalmo*) *platicephalus* Behnke 1968 from south-central Turkey, evidenced by genetic data. *Journal of Fish Biology*, 64: 947-960.
11. Snoj, A., Marić, S., Berrebi, P., Crivelli, A., Shumka, S., Sušnik, S. 2009. Genetic architecture of trout from Albania as revealed by mtDNA control region variation. *Genetics Selection and Evolution*, 41, 22.
12. Simonović, P., Marić, S., Nikolić, V. 2007. Trout *Salmo* spp. complex in Serbia and adjacent regions of the western Balkans: reconstruction of evolutionary history from external morphology. *Journal of Fish Biology*. 70: (Supplement C), 359–380.
13. Leitwein, M., P. A. Gagnaire, E. Desmarais, S. Guendouz, M. Rohmer et al., 2016 Genome-wide nucleotide diversity of hatchery-reared Atlantic and Mediterranean strains of brown trout *Salmo trutta* compared to wild Mediterranean populations. *J. Fish Biol.* 89: 2717–2734.
14. Bourret, V., M. P. Kent, C. R. Primmer, A. Vasemägi, S. Karlsson et al., 2013 SNP-array reveals genome-wide patterns of geographical and potential adaptive divergence across the natural range of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Mol. Ecol.* 22: 532–551.
15. Bohling, J., P. Haffray, and P. Berrebi, 2016 Genetic diversity and population structure of domestic brown trout (*Salmo trutta*) in France. *Aquaculture* 462: 1–9.
16. Allendorf, F. W., and G. H. Thorgaard, 1984 Tetraploidy and the evolution of salmonid fishes, pp. 1–53 in *Evolutionary Genetics of Fishes*, Monographs in Evolutionary

- Biology, Volume 1, edited by Turner, B. J. Springer, Berlin.
17. Allendorf, F.W., S. Bassham, W. A. Cresko, M. T. Limborg, L.W. Seeb et al., 2015 Effects of crossovers between homeologs on inheritance and population genomics in polyploid-derived salmonid fishes. *J. Hered.* 106: 217–227.
 18. Catchen, J., P. A. Hohenlohe, S. Bassham, A. Amores, and W. A. Cresko, 2013 Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Mol. Ecol.* 22: 3124–3140.
 19. Coop, G., 2016 Does linked selection explain the narrow range of genetic diversity across species? *bioRxiv* Available at: <http://biorxiv.org/content/early/2016/03/07/042598>
 20. Ekblom, R., and J. Galindo, 2011 Applications of next generation sequencing in molecular ecology of non-model organisms. *Heredity* 107:1–15.
 21. Lamaze, F. C., C. Sauvage, A. Marie, D. Garant, and L. Bernatchez, 2012 Dynamics of introgressive hybridization assessed by SNP population genomics of coding genes in stocked brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Mol. Ecol.* 21: 2877–2895.
 22. Sauvage, C., M. Vagner, N. Derôme, C. Audet, and L. Bernatchez, 2012 Coding gene single nucleotide polymorphism mapping and quantitative trait loci detection for physiological reproductive traits in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *G3* 2: 379–392.
 23. Peterson, B. K., J. N. Weber, E. H. Kay, H. S. Fisher, and H. E. Hoekstra, 2012 Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One* 7: e37135.
 24. Phillips, R., and P. Ráb, 2001 Chromosome evolution in the *Salmonidae* (Pisces): an update. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 76: 1–25.
 25. Waples, R. K., L. W. Seeb, and J. E. Seeb, 2016 Linkage mapping with paralogs exposes regions of residual tetrasomic inheritance in chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Mol. Ecol. Resour.* 16: 17–28.
 26. Tsai, H. Y., D. Robledo, N. R. Lowe, M. Bekaert, J. B. Taggart et al., 2016 Construction and annotation of a high density SNP linkage map of the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome. *G3* 6: 2173–2179.
 27. Van Ooijen, J. W., 2006 JoinMap 4; Software for the Calculation of Genetic Map in Experimental Populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
 28. Nugent, C. M., A. A. Easton, J. D. Norman, M. M. Ferguson, and R. G. Danzmann, 2017 A SNP based linkage map of the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) genome provides insights into the diploidization process after whole genome duplication. *G3* 7: 543–556.
 29. Palm, S., L. Laikre, P. E. Jorde, and N. Ryman, 2003 Effective population size and temporal genetic change in stream resident brown trout (*Salmo trutta*, L.). *Conserv. Genet.* 4: 249–264.
 30. Liu, S., Y. Li, Z. Qin, X. Geng, L. Bao et al., 2016 High-density interspecific genetic linkage mapping provides insights into genomic incompatibility between channel catfish and blue catfish. *Anim. Genet.* 47: 81–90.

SAGLASNOST PREDLOŽENOG/IH MENTORA I DOKTORANDA SA PRIJAVOM

Odgovorno potvrđujem da sam saglasan sa temom koja se prijavljuje

Prvi mentor	Danilo Mrdak	
Drugi mentor	(Ime i prezime)	(Potpis)
Doktorand	(Ime i prezime)	(Potpis)

IZJAVA

Odgovorno izjavljujem da doktorsku disertaciju sa istom temom nisam prijavio/la ni na jednom drugom fakultetu.

U Podgorici,
08.10.2019.



Ime i prezime doktoranda
Mr Marija Vojinović