

GENETIČKA KONZERVACIJA: NOVI INSTRUMENTI, ZA GAZDOVANJE DIVLJIM VRSTAMA I ZAŠTITU PRIRODE

Paule, L.,¹ D., Krajmerová¹, I., Romšáková,¹ D., Schlosserová¹

Sažetak: Očuvanje genetike je u poslednje dve decenije koristan instrument za sve odluke koje se tiču prirode. Pravilna procena veličine populacije, gen raznolikosti i raznolikost populacija i populacione strukture nisu potrebne za sve odluke koje se tiču očuvanja vrsta i / ili njihovog rukovođenja.

Karpati i uglavnom balkansko poluostrvo za mnoge vrste postale su stanište tokom njihove migracije u post-ledenom periodu. To je slučaj posebno sa *Rupicapra rupicapra* koji je u ovom regionu ostao sa tri različite podvrste i *Ursus arctos* i *Cervus elaphus* sa dve različite genetske linije. Sličan obrazac može se očekivati i sa nekim drugim velikim sisarima i / ili životinjskim vrstama (riba, ptice, insekti).

Uporedne studije genetske raznovrsnosti i diferencijacije zaštićenih divljih vrsta i upravljanje u okviru šireg područja Karpata treba da posluži za odluke koje se tiču njihovog upravljanja i očuvanja prakse. Takvo poređenje bi bilo potrebno makar za mrkog medveda i populaciju divokoza (u Slovačkoj i Rumuniji), gde se javljaju dve različite veličine i gustine populacije za obe vrste.

Ključne reči: očuvanje genetike, *Ursus arctos*, *Rupicapra rupicapra*, pilogeografija, genetske raznovrsnosti.

Uvod

Konzervaciona genetika je interdisciplinarna nauka koja ima za cilj da primenjuje genetske metode za konzervaciju i restauraciju biodiverziteta. Interdisciplinarna konzervacije genetike se zasniva na interakciji više oblasti, uključujući i molekularnu genetiku, ekologije, biologiju, evolucionu biologiju kao i sistematsku. Genetička raznovrsnost je jedna od tri osnovna nivoa biodiverziteta sa direktnim uticajem na očuvanje raznolikosti vrsta i ekosistema [1], [2].

Konzervaciona genetika je nova naučna oblast šire primene koje je uvedena u cilju očuvanja biologije nakon pojave molekularnih metoda 1990. Što se tiče eksperimentalnog uzorkovanja materijala, genetika biljne konzervacije je metodično jednostavnija, dok konzervaciona genetika divljih životinja mora da se oslanja na više sofisticirane metode uzorkovanja, na primer, neinvazivno uzorkovanje.

Filogeografija je proučavanje istorijskih procesa koji mogu biti odgovorni za savremene geografske raspodele vrsta. Ovaj termin je uveden da opiše geografski strukturirane genetske signale unutar i između vrsta. Eksplisitno težište prošlosti biogeografskih vrsta odvaja Filogeografiju od klasične populacione genetike i filogenetike. Ispituje se širenje populacije, populaciju uska grla, varijanse i migracije [2].

Proučavanje filografije i velikih razlika populacije može da odigra važnu ulogu u rešavanju problema očuvanja genetike prilikom definisanja značajnih evolutivnih jedinica (ESU) ili konzervatorskih jedinica i/ili razumevanja inerno-specifične taksonomske klasifikacije. Iako je filografija prilično mlada grana biologije (osnovana 1987.), poslednje dve decenije njene prime značajno je doprinelo razumevanju procesa osnivanja današnjih grupacija brojnih vrsta divljih životinja kao rezultat migracija u periodu posle ledenog doba kao i drugih evolucionih procesa. Studija mitohondrijskih markera se smatra glavnim instrumentom za studije filografije. Pronalazaak lančane reakcije polimeraze (PCR), procesa u kom se milioni primeraka DNK segmenata mogu ponoviti, bio je ključan u razvoju filografije. Zahvaljujući ovim napredku, informacije sadržane u mitohondrijama DNK bile su mnogo više dostupnije. Napredak u oba laboratorijska metoda (npr. kapilarna DNK tehnologija) koji su omogućili lakše raspoređivanje DNK i bolje korišćenje podataka dobijenih računarskim metodama.

Ipak, markeri nuklearnog DNK, koji zbog svog dvo-roditeljskog nasleđanja takođe oslikavaju nedavne događaje, npr. uticaj selekcije, međusobno parenje i protoka gena treba takođe posmatrati kao sredstvo za paralelna filogeografska ispitivanja. Primena oba, mitohondrijskog i nuklearnog DNK markera za filogeografska ispitivanja, zahteva genetski popis više uzoraka biološkog materijala za analize. Prednost DNK analize je mogućnost da prikuplja uzorke i invazivne i neinvazivne metode i pošto mnoge divlje životinje su u isto vreme i divljač, čak i istorijski uzorci sa dobro očuvanim DNK (muzeji i trofej uzorci) mogu da se koriste kao izvor biološkog materijala za komparativna ispitivanja.

Među praktičnim primenama očuvanja, genetska ispitivanja populacija divljih životinja imaju za cilj rešavanje taksonomijskih (sistematski) pitanja, npr. položaj nižih taksonomskih jedinica, ispitivanja usmerena na istraživanje genetskih razlika ugroženih vrsta i očuvanje populacija divljih životinja, određivanje značajnih evolucionih jedinica (ESU) i posledice rasparčavanja populacija zbog ljudskog uticaja. Istraživanje svih ovih problema populacija divljih životinja ne bi bilo moguća pre otkriće PCR tehnike kao i kasnije razvijanje neinvazivnih uzorkovanja brojnih vrsta divljih životinja [9].

¹Ladislav Paule nPh D. Faculty of Forestry, Technical University of Zvolen, Slovakia, SK-96053 Zvolen, Slovakia; paule@vsld.tuzvo.sk; Diana Krajmerová krajmer@vsld.tuzvo.sk; Ivana Romšáková romsak@vsld.tuzvo.sk; Dušana Schlosserová

Skorašnja dostignuća genetike konzervacije su metodološki povezana sa molekularnom ekologijom i bojnim genetskim uzorkovanjem na jednoj strani i sa sofisticiranim statističkim analizama baziranih na Baiesian pristupu i metoda pejzažne genetike, s druge strane.

Cilj našeg istraživanja su velike genetičke razlike nekoliko vrsta divljih životinja:

- crveni jelen (*Cervus elaphus*) - intenzivno izučavanje genetskih razlika populacija crvenog jelena na Karpatima i susednim teritorijama,
- divlja svinja (*Sus scrofa*) - Proučavanje širom Evrope genetskih razlika sa posebnim osvrtom na intra-specifične taksonomske jedinice.
- mrki medved (*Ursus arctos*) – genetske razlike populacija mrkog medveda duž Karpata i zapadnog Balkana, i
- divokoza (*Rupicapra rupicapra*) – genetske razlike populacija divokoza za tri podvrste.

Materijal i metod

Uzorci svih četiri vrsta su prikupljeni u periodu između 2004. i 2010. Na području Karpata i Balkanskog poluostrva. Ukupno je prikupljeno 564 uzoraka crvenih jelena, 900 uzoraka divljih svinja, 300 uzoraka mrkog medveda i 700 uzoraka divokoza. DNK iz tkiva i krvi je izolovana ili korišćenjem modifikovane metode Sambrook-a [10] koja uključuje varenje preko noć sa K praćeno ekstrakcijom fenol - hloroforma ili uz pomoć Chelek-a 100 smola (Biorad) 20 minuta na 99 ° C u 10 % Chelek rešenja. Uzorci kostiju su stajali u dekalcinatu u EDTA i konačno DNK je izolovana pomoću NucleoSpin ® pribora (Macherei - Nagel). Uzorci fekalije i kose obrađeni su u laboratoriji korišćenjem isključivo neinvazivnih uzoraka. DNK je izolovan iz fekalija korišćenjem QIAampDNK mini pribora (Qiagen) prema uputstvu za proizvođača. Kosa DNK je izolovana uz pomoć Chelek-a, koristeći isti protokol kao i za tkiva i krvi. Jedna ili dve negativne kontrole su korišćene u svakoj seriji vađenja ne bi li otkrile moguću kontaminaciju.

Za sva četiri ispitivanja, skup mikrosatelitne nuklearne DNK (otprilike 14 , 11 , 13 ili 24 ,) korišćen je optimizovan za skup multipleksa. Baiesian-ova analiza (STRUKTURA) za opisivanje jedinka u unapred definisanim populacijama korišćena je kao glavni instrument za statističku procenu koja je kasnije kompletirana uz pomoć nekoliko metoda pejzažne genetike (BARRIER , GENELAND).

Rezultati i diskusija

Za slučaje ispitivanja genetskih razlika populacije crvenih jelena, korišćeno je 564 uzoraka (mekih tkiva i rogova) i 14 mikrosatelitima lokusa je optimizovano u četiri multipleksa. Set uzoraka pokriva područje centralne i jugoistočne Evrope, sa posebnim akcentom da prosvetli genetske razlike crvenih jelena sa Karpata i susednih teritorija sa ciljem da istraž položaj karpatskog crvenog jelena, *Cervus elaphus montanus* Botezat.

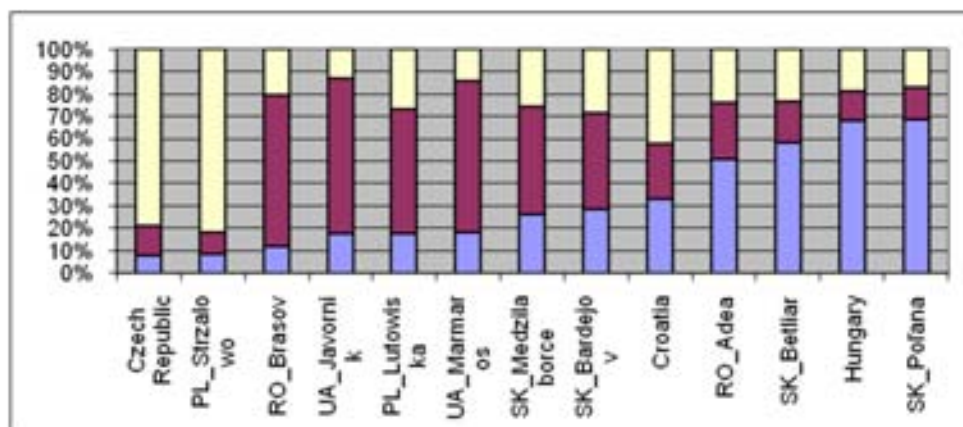
Taksonomsku položaj karpatskog jelena je prvi opisao Botezat [4] , i od tada se smatra podvrstom *Cervus elaphus montanus* Botezat (međutim, prema Grubb [8] , ime *montanus* je taksonomski nevažće) . Dobroruka (1960) daje geografsku raspodelu *C. elaphus montanus* koji je stigao do istočnog Karpata i Krima [5] , a na drugoj strani , prema Grovesu i Grubbu (1987) do Baltika i južne Mađarske [7] .

Pored veličine tela, zooolozi i lovci su obratili pažnju na veličinu i oblik trofeja, koji se krajem 19. i početkom 20. veka smatra najvećim u Evropi. Slično tome, veličina lobanje crvenih jelena preklom sa istočnog Karpata puno je veća nego ona iz zapadne Evrope. Prema Philipovicz-u (1961.) , dužina lobanje varirala je između 47 i 50 cm širine a širina jagodične kosti je varirala između 15 i 18cm. Nasuprot tome, dužina lobanje zapadnoevropskog jelena varirala je između 42 i 43 cm a dužina lobanje karpatskog jelena bila veća za 15-20% [11] .

Kraniološke analize su otkrile razlike između karpatskih i zapadnoevropskim crvenih jelena u veličini lobanje (kao što je izraženo dužinom i širinom lobanje) i nekim drugim karakteristikama . Prisustvo konveksnih nosnih kostiju, kako su ranije tvrdili neki autori, da je tipičan za karpatskog jelena, nije dokazano. Ovaj tip lobanje se javlja, ali ne baš često.

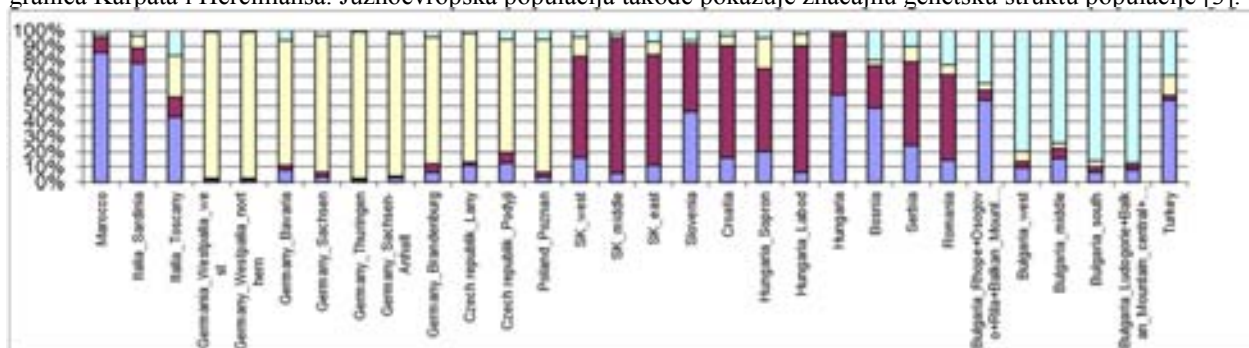
Genetska ispitivanja zasnovana na skupu od 311 jedinki i 12 mikrosatelitskih lokusa, pokazala su prilično dobro razlike karpatske populacije (uključujući i susedne teritorije, odnosno Slovačke, Mađarske i južne Poljske) u odnosu na populacije poreklom iz Češke (Krkonosé) i Poljske (Sztralovo). Ove razlike su pokazali da je statistički značajno koristi BARRIER-u, kao i STRUKTURU softvera (sl. 1). Visok procenat karpatskih gena prikazan je crvenom bojom, dok zapadno-evropski u žutom a sve tranzicione populacije plavom bojom.

Mađarska populacija poreklom iz Zala je pokazala više izražene sličnosti sa karpatskom jelenom nego populacija iz Baje, jer su mnogi jeleni premeštene u region Zala tokom 19. veka [14].



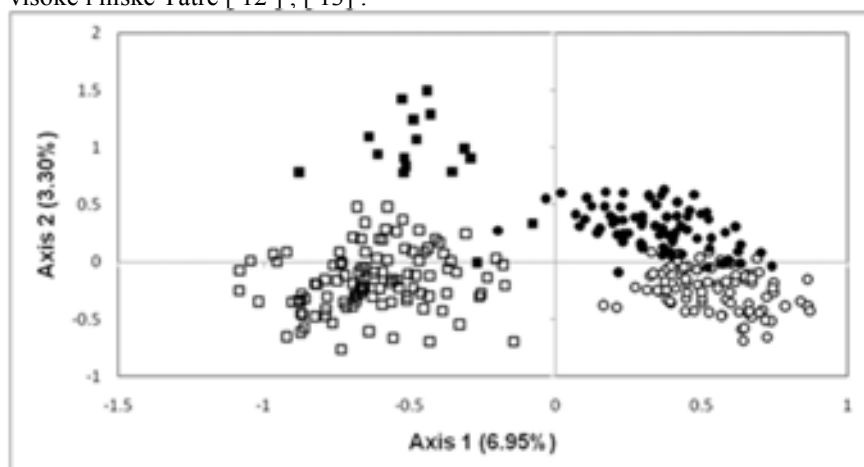
Sl. 1 Rezultati strukturalnih analiza (broj grupa = 3) . Sve 311 jedinki je grupisano u grupe prema geografskom poreklu, različite boje predstavljaju udeo gena u pojedinačnim grupama (žuta - zapadnoevropska ; crveno - Karpata i plava - tranzicijone grupe) .

Ispitivanja drugog slučaja su imala za cilj inter-specifična strukturiranja populacija divljih svinja u okviru Evropskih vrsta. Do sada, koristili smo 900 uzoraka i 11 microsatelita lokusa optimizovanih u četiri multipleks PCR reakcije. Ukupna procena pokazala je da obrazac masovnog genetskog strukturiranja populacije može da liči na naprisustvo podvrste kao što se prvobitno tvrdilo, međutim , granice opsega ne poklapaju sa opsezima koji su opisani u literaturi. Očekivana granica između pojave *Sus scrofa* Atila i *SS scrofa* se pomera mnogo više ka zapadu i kreće se između granica Karpata i Herciniansa. Južnoevropska populacija takođe pokazuje značajnu genetsku strukturu populacije [3].



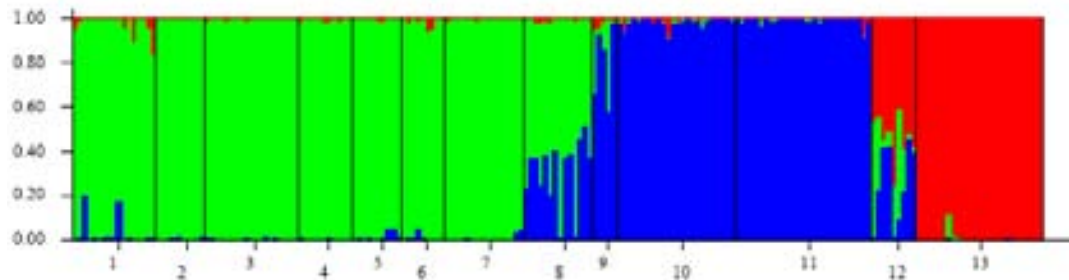
Sl. 2 Rezultati analize strukture populacije divljih svinja u Evropi-šire istraživanje.

Ispitivanja trećeg slučaja su bila usmerena na proučavanje populacije mrkog medveda duž Karpata . Koristili smo ukupno oko 300 uzoraka tkiva iz zakonski dozvoljenih odstreljenih mrkih medveda u Slovačkoj i nekih dodatnih uzoraka dlake i fekalija, koji su kasnije upoređeni sa oko 120 uzoraka iz Grčke. Za analize, 13 mikrosatelita je korišćeno u tri multipleksa. Sve u svemu prikazana je razlika između rumunske i slovačke populacije mrkog medveda i u Slovačkoj je došlo do odvajanja severnih i centralno slovačkih populacija sa nekim migrantima. To je bilo zbog fragmentacije pejzaža kao posledice izgradnje brane, autoputa i industrijske infrastrukture u dolini između visoke i niske Tatre [12] , [13] .



Sl. 3 Rasparčanost populacije mrkog medveda sa Karpata (prazan kvadrat - Rumunija ; puni kvadrati - istočna Slovačka ; puni krugovi - Severna Slovačka i prazni krugovi - centralna Slovačka) (Straka i sar , 2012 .)

Konačno, napravili smo poređenje populacije divokoza kojoj pripadaju četiri podvrste - *Rupicapra rupicapra rupicapra* R. R. *Balcanica* , R., R. *tatica* i R. R. *carpatica* . Analizirali smo ukupno 395 uzoraka tkiva, (kosti) i koristi se 24 mikrosatelita optimizovanih za tri multipleks reakcije i dva singleplekesa. Razlika je prikazana između tri podvrste *Rupicapra rupicapra rupicapra* (populacija 1-7) , R., R. *Balcanica* (populacija 10-11) , R., R. *tatica* (populacija 13) , osim R.r. *carpatica* (populacija 12) za koji još nismo dovoljno uzoraka . Neke populacije R.r. *Balcanica* (populacija 8-9) su okarakterisane primesama gena jedinke dve podvrste zbog translokacija životinja radi održanja veličine populacije i kvalitet trofeja. Pošto su ove lokacije trenutno u nacionalnom parku Velebit, izgleda da je teško kontrolisati genetske čistoće populacije i unapredi njihov konzervatorski status.



Sl. 4 Rezultati strukturalnih analiza populacije divokoze sa Alpa, Tatre i Balkana.

Zaključak

Ispitivanja četiri slučaja, koja pokazuju ispitivanja genetičke strukture i razlike populacija divljih životinja (jelen, divlja svinja, medved i divokoza) , pokazala su da je moguće koristiti mikrosatelite na nuklearni DNK za proučavanje razlika populacije na velikoj geografskoj skali i / ili filogeografski obrazac koji bi mogao da doprinese razumevanju intra-specifične strukture i položaja pojedinih nižih jedinica taksonomskih jedinica obično opisanih u prošlosti na osnovu morfoloških varijacija.

Pored analize korišćenja nuklearnih mikrosatelita, bilo bi korisno da uporedimo date rezultate i sa obrascem mitohondrijalne DNK varijacije . Ovo bi moglo da prosvetli istorijsku pozadinu sadašnjih populacija u vezi sa migracionim procesima u periodu posle ledenog doba i / ili nedavnim translokacionim aktivnostima.

Zahvalnost

Ovaj rad je rezultat projekta: Extension of the Centre of Excellence „Adaptive Forest Ecosystems“, ITMS: 26220120049, podržanog od strane Operativnog programa Istraživanje i Razvoj finansiranog od strane ERDF

Literatura

- [1] Allendorf, F.W. & Luikart, G., 2006: Conservation and Genetics of Population. Blackwell, Malden, Massachusetts, USA. [2] Avise, J.C., 2004: Molecular Markers, Natural History and Evolution. Sinauer Associates Sunderland. [3] Bakan, J., 2011: Štúdium genetickej diverzity a diferenciacie diviaka lesného (*Sus scrofa*) v strednej Európe. Lesnícka fakulta TU vo Zvolene, PhD thesis, 113 pp. [4] Botezat, E. Gegenbaurs Morphologische Jahrbücher 32: 104–158, 1903. [5] Dobroruka, L.J. Zoologischer Anzeiger 165: 481–483, 1960. [6] Feulner, P.G.D., Bielfeldt, W., Zachos, F.E., Bradvarović, J., Eckert I., Hartl, G.B. Heredity 93: 299–306, 2004. [7] Groves, C.P., Grubb, P., 1987: Relationships of Living Deer. In: Wemmer CM (ed) Biology and Management of the Cervidae. Smithsonian Institution Press: Washington, D.C., London, pp 21–59. [8] Grubb, P. Acta Theriologica 45: 289–307, 2000. [9] Mills, L.S., 2007: Conservation of Wildlife Populations. Demography, genetics and management. Blackwells Oxford. [10] Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T., 1989: Molecular Cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA. [11] Philipowicz, I. Zeitschrift für Jagdwissenschaften 7: 1–18, 1961. [12] Straka, M., Paule, L., Štofik, J., Ionescu, O. & Adamec, M. Beiträge für Wild- und Jagdforschung 36: 77–86, 2011. [13] Straka, M., Paule, L., Ionescu, O., Štofik, J., Adamec, M. Conservation Genetics 13: 153-164, 2012. [14] Tullová, M., 2008: Genetická diverzita a diferenciacia jeleňa lesného (*Cervus elaphus* L.) v Karpatoch. Lesnícka fakulta TU vo Zvolene, PhD thesis, 86 pp. + attachments.