

GENETIČKI MONITORING POPULARNIH VRSTA DIVLJAČI U LOVIŠTIMA VOJVODINE

Đ M.¹, Veličković N.¹, Popović D.¹, Obreht D.¹, Beuković M.², Vapa Lj.¹

Sažetak: Utvrđivanje i praćenje genetičke varijabilnosti divljači je osnova za razvoj adekvatnog menadžmenta i konzervaciju prirodnih populacija. Cilj ovog rada je da se prikažu uporedni podaci genetičkog monitoringa dve popularne vrste divljači u lovištima Vojvodine, zeca i divlje svinje. Prvo određivanje genetičke varijabilnosti u populacijama zeca Vojvodine korišćenjem mikrosatelita kao molekularnih markera urađeno je 2006. godine i preporučeno je trogodišnji monitoring ovih populacija. Pri kontinuiranom praćenju populacija zečeva u Vojvodini analizirana su tri najčešće korišćena mikrosatelita. Novi aleli pronađeni su u sva tri analizirana lokusa i nije nađeno substrukturiranje populacija. U populacijama divljih svinja Vojvodine analizirano je pet mikrosatelitskih lokusa sa ciljem da se utvrdi nivo njihove genetičke varijabilnosti. U svim lokusima je nađen visok nivo polimorfizma, a utvrđeno je i substrukturiranje ovih populacija.

Ključne reči: zec, divlja svinja, genetički monitoring

Uvod

Jedan od aspekata u kontinuiranom praćenju divljači u lovištima jeste genetički monitoring. Ovaj pristup predstavlja organizovano praćenje prirodnih populacija korišćenjem prethodno odabranih molekularnih markera i prema standardizovanim protokolima sa ciljem da se odredi nivo genetičke varijabilnosti unutar populacija, genetička struktura populacija, nivo inbridinga i sl. Dobijeni podaci su korisni u predviđanju kretanja populacije, utvrđivanju potencijala odgovora populacija na negativne efekte koji mogu biti uzrokovani lovom, kao i određivanje adekvatnih mera ekološkog menadžmenta. Odabir odgovarajućih molekularnih markera je od suštinskog značaja kako bi se dobili podaci od praktičnog interesa kao što su stepen srodstva, fragmentisanost populacije, broj migranata, procena veličine populacije i dr.

Sa razvojem molekularnih markera i tehnologija, različite klase molekularnih markera korišćene su u karakterizaciji prirodnih populacija divljači u Vojvodini. Zec (*Lepus europaeus*) je rasprostranjen širom Evrope i predstavlja važnu vrstu divljači u poljoprivrednim oblastima, otvorenim šumama i pašnjacima do 1500m nadmorske visine. Krajem 1950-ih, zec je spadao u najbrojnije vrste divljači u Vojvodini, sa brojnošću od 400.000 do 500.000 jedinki. Ekološke promene dovele su do naglog smanjenja brojnosti populacija zeca u Vojvodini, od oko 200.000 jedinki u roku od samo deset godina [1]. U svetlu ovih ekoloških promena i smanjenja populacija zeca širom Evrope, održavanje genetičkih resursa lokalno adaptiranih populacija se smatra važnim za dugoročni razvoj ove vrste. Zečevi ne samo da igraju važnu ulogu u lovnoj privredi Vojvodine, već takođe predstavljaju značajnu vrstu plena i doprinose protoku organskih materija i nutrijenata, na primer, pod pretpostavkom da je gustina zečeva 50 jedinki na 100 ha, možemo očekivati preko jedne tone suve mase izmeta godišnje. Prvo što je urađeno je analiza populacija zeca u Vojvodini korišćenjem alozima kao molekularnih markera [2], [3]. Ove analize su otkrile male genske razlike između populacija i nizak nivo substrukturiranosti, ali su ukazale na moguću ulogu reke Dunav kao geografske barijere koja ograničava protok gena između populacija. Zbog tehničkih ograničenja i slabe informativnosti, alozimi nisu korišćeni pri kontinuiranom monitoringu ovih populacija i uvedeni su mikrosateliti kao molekularni markeri nove generacije. Prvi skrining korišćenjem mikrosatelita u populacijama zeca Vojvodine urađen je 2006. godine [4], i u ovim analizama je utvrđen visok nivo substrukturiranosti između populacija. Jedna od preporuka posle ovog istraživanja je utvrđivanje genetičke varijabilnosti u definisanom vremenskom periodu od tri godine. U narednom skriningu istih populacija nakon tri godine, urađena je analiza dodatnih mikrosatelitskih lokusa zajedno sa prethodnim [5], [6], i novi aleli koji su pronađeni omogućili su da se dodatno definiše genetička struktura analiziranih populacija. Pored alozima i mikrosatelita, uključena je i analiza kontrolnog regiona mtDNK, primarno sa ciljem filogenetskih analiza u ovim populacijama, ali i kao novi marker za populaciono genetičke analize [7], [4], [8].

Genetički skrining divljači u lovištima Vojvodine je proširen na druge popularne vrste, pa je genetički monitoring proširen na populacije divljih svinja. Divlja svinja je jedan od najzastupljenijih sisara u lovištima u Vojvodini i veoma važna vrsta divljači, kako u ekonomskom, tako i u ekološkom smislu. Širom Evrope, populacije divljih svinja doživele su lokalna istrebljenja i brojne translokacije tokom prošlosti, ali danas se veoma brzo šire u Evropi i menadžment ovih populacija je hitno potreban [9]. Razumevanje kako su prošli i skorašnji događaji uticali na

¹ Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 2, 21000 Novi Sad

² Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu, Trg Dositeja Obradovića 8; 21000 Novi Sad, Serbia

Kontakt autor: Mihajla Djan, e-mail: mihajla.djan@dbe.uns.ac.rs; tel: +381 21 485 2656

genetičku strukturu ove vrste predstavlja osnovu za razvoj adekvatnih strategija menadžmenta. Prva karakterizacija divljih svinja u Vojvodini uključila je analizu mikrosatelitskih lokusa u populaciji divljih svinja iz gatera u Podunavskom regionu [10],[11],[12]. Lokusi SW251 i SW2429 su prvi put uspešno amplifikovani u populacijama divljih svinja i pokazali su zadovoljavajući nivo polimorfizma. Dobijeni rezultati su pokazali da je nivo genetičke varijabilnosti u analiziranoj populaciji divljih svinja iz Vojvodine sličan drugim populacijama ove vrste širom Evrope. U populaciji divljih svinja iz lovišta Podunavlje-Podravlje (smešteno između reka Dunava i Drave) utvrđen je visok nivo genetičkog diverziteta [13]. Opis genetičke strukture ove populacije bio je prvi korak ka genetičkoj karakterizaciji divljih svinja u regionu Zapadnog Balkana, što je glavni smisao u razvoju strategija menadžmenta i konzervacije. Da bi dobili bolji uvid u genetički diverzitet, tri populacije divljih svinja sa proširenog regiona Zapadnog Balkana (Vojvodina, Slavonija i Bosna) su kasnije analizirane i nađen je određen nivo genetičke struktuiranosti populacija [14].

Sa aspekta konzervacione biologije, veoma je važno definisati sve prisutne molekularne varijacije u populaciji, jer povećanje brojnosti populacije ne ukazuje nužno na odgovarajuću adaptivnu vrednost populacija. Kod velikih populacija u kojima je signifikantno povećana homozigotnost, antropogeni, kao i drugi faktori, mogu dovesti do drastičnih promena kao i u malim populacijama.

Cilj ovog rada je da se predstave uporedni podaci genetičkog monitoringa dve popularne vrste divljači u lovištima Vojvodine, zeca i divlje svinje.

Materijal i metod rada

U toku lovnih sezona 2004-2006., sakupljeno je 41 jedinki zeca sa tri različita regiona u Vojvodini, dok je 60 individua prikupljeno sa istih regiona tokom lovne sezone 2009. godine. Mišićno tkivo 67 jedinki divljih svinja sakupljeno je sa ista tri regiona u Vojvodini. Ova tri geografska regiona, tretirana kao „populacije“, uključena su u genetičke analize: Bačka, Banat i Srem. Uzorkovano tkivo je zamrznuto odmah nakon smrti jedinke.

Izolovana je ukupna DNK iz jetre i jezika zeca, kao i mišićnog tkiva divljih svinja postupkom standardne Proteinaza K digestije [15]. Kod zeca je u prvom setu uzoraka analizirano jedanaest mikrosatelitskih lokusa sa različitim nivoom polimorfnosti Sat2, Sat5, Sat12 [16], Sol03, Sol08, Sol28 [17], Sol33 [18], Lsa1, Lsa2, Lsa3 i Lsa8 [19], dok su u drugom setu uzoraka korišćena 3 najinformativnija lokusa: Sat2, Sat5 i Sat12. Kod divljih svinja, odabrano je pet polimorfnih mikrosatelitskih lokusa S0068, S0005 [20], SW251, SW857 [21], SW2429 [22].

PCR reakcije za prajmer parove lokusa Sat2, Sat5 i Sat12 rađene su u volumenu od 20 μ l sa finalnim koncentracijama od 100ng genomske DNK, 1x Taq pufera (sa 15mM MgCl₂), 200 μ M dNTP, 10 pmol svakog prajmera, 1 mM MgCl₂ i 1U Taq DNA polimeraze. Reakcije amplifikacije za prajmer parove lokusa S0068, S0005, SW251, SW2429 i SW857 rađene su u volumenu od 20 μ l, sa 10pmol svakog prajmera, 100 μ M dNTPs, 1x Taq pufera, 1 U Taq DNA polimeraze, 2.5 mM MgCl₂ i 100ng genomske DNK. Umnoženi PCR produkti analizirani su na standardnim denaturišućim 6% poliakrilamidnim gelovima koji su bojeni metodom srebrnog bojenja [15].

Poređenje genetičke varijabilnosti u populacijama zeca tokom dve lovne sezone urađeno je na osnovu analize tri zajednička lokusa. Za analizirane mikrosatelitske lokuse u populacijama zeca i divljih svinja rađen je test odstupanja od Hardy-Weinberg-ovog ekvilibrijuma (HWE) i test za utvrđivanje disekvilibrijuma genotipske vezanosti korišćenjem Markov chain metode u softveru GENEPOP verzija 3.4 [23]. Frekvencije alela, prosečan broj alela (A), uočena (Ho) i očekivana (He) heterozigotnost računata je za svaki lokus i svaku populaciju korišćenjem programa GENETIX [24]. Ovaj program je takođe korišćen za izračunavanje koeficijenata inbridinga (F_{IS}) u populacijama divljih svinja.

Rezultati istraživanja i diskusija

Uporedni prikaz osnovnih genetičkih parametara broja alela po lokusu (A), broj jedinstvenih alela, i uočena (Ho) lokus-specifična heterozigotnost po populaciji kod zeca za sezone 2006. i 2009., prikazani su u Tabeli 1.

Tabela 1. Osnovni parametri genetičke varijabilnosti 3 mikrosatelitska lokusa u populacijama zeca (*Lepus europaeus*) Vojvodine

Godina	2006			2009		
	Sat2	Sat5	Sat12	Sat2	Sat5	Sat12
Lokus						
A	18	8	11	23	18*	8
Jedinstveni aleli	2	1	6	7	11*	3
Ho Bačka	0,692	0,280	0,708	0,941	0,556	0,737
Ho Banat	0,577	0,091	0,720	0,842	0,833**	0,824
Ho Srem	0,739	0,150	0,869	0,950	0,733**	0,945
Ho Vojvodina	0,680	0,146	0,744	0,911*	0,707*	0,835

* p < 0.05 ** p < 0.01; A – broj alela po lokusu; Ho – uočena heterozigotnost

Pronađeno je ukupno 37 alela u tri mikrosatelitska lokusa u populacijama zeca Vojvodine iz sezone 2006. godine, dok je veći broj od 49 alela utvrđen u populacijama iz istog regiona analiziranim 2009. godine. U analizama populacija iz 2009. novi aleli su pronađeni u sva tri lokusa. Veći broj alela utvrđen je u lokusima *Sat2* i *Sat5*, ali statistički značajna razlika je potvrđena samo za lokus *Sat5*. U *Sat5* lokusu, broj jedinstvenih alela je takođe bio signifikantno veći 2009. godine (1 jedinstveni alel 2006. i 11 jedinstvenih alela 2009.).

Uočena lokus-specifična heterozigotnost je varirala u opsegu od 0,091 (*Sat5* lokus u populaciji Banata) do 0,869 (*Sat12* lokus u populaciji Srema) u sezoni 2006., dok je u sezoni 2009. ova vrednost bila u opsegu od 0,556 (*Sat5* lokus u populaciji Bačke) do 0,95 (*Sat2* lokus u populaciji Srema). U sezoni 2009., signifikantno veća H_o je uočena u lokusu *Sat5* u populacijama Banata i Srema u poređenju sa uočenom heterozigotnošću u ovom lokusu u istim populacijama u sezoni 2006. U proseku, signifikantno veća H_o je pronađena u sezoni 2009. u lokusima *Sat2* and *Sat5* (Tab. 1).

Tabela 2. Očekivana (H_e) i uočena (H_o) heterozigotnost po populacijama kod zeca iz Vojvodine

Populacija	He	Ho	He	Ho
Godina	2006		2009	
Bačka	0,760	0,567	0,864	0,745
Banat	0,821	0,477	0,903	0,850*
Srem	0,776	0,572	0,870	0,876
Vojvodina (prosek)	0,786	0,539	0,879	0,823**

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ H_e – očekivana heterozigotnost; H_o – uočena heterozigotnost;

Nije uočeno statistički značajno odstupanje od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže u populacijama zeca Vojvodine. Očekivane i uočene heterozigotnosti po populacijama tokom dve analizirane sezone prikazane su u Tabeli 2. Signifikantno veća uočena heterozigotnost pronađena je u populaciji Banata 2009. godine u odnosu na sezonu 2006. Prosečna uočena heterozigotnost je takođe bila veća u sezoni 2009., i ova razlika je bila veoma signifikantna (Tab. 2). Prosečna očekivana heterozigotnost za sve populacije zeca u Vojvodini bila je 0,786 u sezoni 2006. i 0,879 u sezoni 2009. Na osnovu dobijenih podataka, možemo zaključiti da je u analiziranim populacijama utvrđen srednji nivo genetičkog polimorfizma što se i očekuje za velike kontinuirano rasprostranjene populacije sisara [25].

Tabela 3. Genetička varijabilnost 5 mikrosatelitskih lokusa u populacijama divljih svinja iz Vojvodine

Populacija	Lokus	S0068	S0005	SW251	SW2429	SW857	Prosek
Bačka	A	11	6	4	14	7	8,4
	Najučestaliji alel	210	220	130	160	148,150,156	
	H_o	0,42	0,67	0,9	0,68	0,99	0,73
	H_e	0,69	0,79	0,72	0,82	0,82	0,77
	F_{IS}	0,41	0,17	-0,23	0,19	-0,20	0,066
Banat	A	6	2	4	4	6	4,4
	Najučestaliji alel	192,250	234	130	160,164	150,156	
	H_o	0,50	0,50	0,50	0,99	0,99	0,69
	H_e	0,81	0,37	0,56	0,68	0,81	0,65
	F_{IS}	0,5	-0,20	0,25	-0,33	-0,09	0,067
Srem	A	12	7	3	14	8	8,8
	Najučestaliji alel	192	220	136	150	154	
	H_o	0,41	0,43	0,40	0,71	0,86	0,56
	H_e	0,88	0,70	0,64	0,88	0,76	0,77
	F_{IS}	0,55	0,39	0,39	0,21	-0,104	0,29
Vojvodina Prosek	A	17	8	4	15	9	10,6
	Opseg alela u bp	150-260	210-240	126-140	100-170	144-160	
	H_o	0,44	0,53	0,60	0,79	0,95	0,67
	H_e	0,79	0,62	0,64	0,79	0,80	0,73
	F_{IS}	0,49	0,12	0,14	0,023	-0,13	0,13

A – broj alela po lokusu; H_e – očekivana heterozigotnost; H_o – uočena heterozigotnost;

F_{IS} – koeficijent inbridinga

Broj alela po lokusu (A), najučestaliji aleli, opseg alela (u bp), očekivana (H_e) i uočena (H_o) lokus-specifična heterozigotnost po populacijama, i koeficijenti inbridinga u populacijama divljih svinja Vojvodine prikazani su u Tabeli 3. . Svih pet analiziranih lokusa je uključeno u statističku analizu s obzirom da ni jedan par mikrosatelita nije pokazao značajnu vezanost. Ukupno je pronađeno 53 alela u tri populacije divljih svinja u Vojvodini, sa prosekom od 10,6 alela po lokusu. Najveći broj alela po lokusu nađen je u lokusu S0068 ($A=17$), dok je najmanji broj alela uočena u lokusu SW251 ($A=4$). Najveći broj alela pronađen je u populaciji divljih svinja iz Srema ($A=44$, prosek $A=8,8$). U analizi genetičke varijabilnosti divljih svinja Portugala prosečan broj alela je bio isti kao u našim populacijama $A=10,17$ [26], dok je kod divljih svinja Italije i Mađarske uočena veći broj alela po lokusu $A=12,11$ [27]. Uočena lokus-specifična heterozigotnost po populaciji varirala je u opsegu od 0,40 (u lokusu SW251 u populaciji Srema) do 0,99 (u lokusu SW857 u populacijama Bačke i Banata, i lokusu SW2429 u populaciji Banata), sa prosečnom vrednošću $H_o=0,67$. Slične vrednosti uočene heterozigotnosti nađene su u populacijama divljih svinja iz Italije i Mađarske $H_o=0,662$ [27]. Kod divljih svinja iz Portugala uočena je manja prosečna heterozigotnost $H_o=0,627$ [26], kao i u populaciji divljih svinja iz lovišta Podunavlje-Podravlje $H_o=0,57$ [13] i većem broju populacija sa velikog područja evropskog kontinenta $H_o=0,57$ [9]. Očekivana lokus-specifična heterozigotnost po populaciji bila je u opsegu od 0,37 do 0,88, sa prosekom $H_e=0,73$. Utvrđena očekivana heterozigotnost je manja u odnosu na ove vrednosti u populacijama divljih svinja Evrope [13], [26], [9].

Uočeno je odstupanje od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže s obzirom da je nađeno statistički značajno smanjenje heterozigotnosti u tri (S0068, S0005 i SW2429) od pet proučavanih lokusa i u populacijama Bačke i Srema, što može da ukazuje na postojanje genetičke struktuiranosti populacija [28]. Koeficijenti inbridinga bili su u opsegu od 0,33 (za lokus SW2429 u populaciji Banata) do 0,55 (za lokus S0068 u populaciji Srema), sa prosečnom vrednošću 0,13. Pozitivne vrednosti koeficijenta inbridinga mogu da ukazuju na činjenicu da je inbriding glavni uzrok uočenog odstupanja od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže.

Zaključak

U ovom radu predstavljeni su uporedni podaci genetičkog monitoringa dve popularne vrste divljači, zeca i divlje svinje, u lovištima Vojvodine. Kontinuirani genetički monitoring u populacijama zeca Vojvodine nije pokazao postojanje genetičke substrukuiranosti u analiziranim populacijama, dok je analiza mikrosatelita u populacijama divljih svinja Vojvodine otkrila postojanje genetičke substrukuiranosti između analiziranih populacija. U daljim istraživanjima u kojima će biti urađen kontinuirani monitoring populacija divljih svinja moći ćemo da utvrdimo tačan nivo genetičke substrukuiranosti ovih populacija.

Literatura

- [1] Vapa, Lj, Djan, M., Obreht, D, Hammer, S., Suchentrunk, F. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 53 (1): 75-87, 2007. [2] Vapa, Lj, Obreht, D, Vapa, M, Selmić, V. *Z. Jagdwissenschaft*, 48: 261–266, 2002. [3] Davidović, M. Master thesis, Faculty of Biology, Belgrade (in Serbian), 2003. [4] Djan, M. PhD thesis, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Serbia (in Serbian), 2008. [5] Petrović, D. Diploma work. Faculty of Sciences. University of Novi Sad, 2009. [6] Veličković, N., Djan, M., Obreht, D., Vapa, Lj. *Proceedings of the XII International Symposium "Young People and Multidisciplinary Research"*, Timișoara: Association for Multidisciplinary Research of the West Zone of Romania, 11-12 November 2010, 97-102 [7] Djan, M., Obreht, D., Vapa, Lj. *European Journal of Wildlife Research* 52: 288-291, 2006. [8] Djan, M., Obreht, D., Ben Slimen, H., Lavadinović, V., Vapa, Lj., Suchentrunk, F. *Abstract of II Symposium of population and evolutionary genetic*, Belgrade 9-12 May 2012., (submitted) [9] Scandura, M., Iacolina, L., Crestanello, B., Pecchioli, E., Benedetto, M.F., Russo, V., Davoli, R., Apollonio, M., Bertorelle, G. *Molecular Ecology*, 17: 1745-1762, 2008. [10] Veličković, N. Master Thesis, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Serbia (in Serbian), 2008. [11] Djan, M., Veličković, N., Obreht, D., Gagrcin, M., Beuković, M., Vapa, Lj. 7th International Symposium on Wild Boar (*Sus scrofa*) and on Sub-order suiformes, Sopron: University of West Hungary, 27-31 August 2008. Abstracts 77- 77. [12] Veličković, N., Djan, M., Obreht, D., Gagrcin, M., Beuković, M., Vapa, Lj. X International Symposium "Young People and Multidisciplinary Research", Timișoara: Association for Multidisciplinary Research of the West Zone of Romania, 13-14 November 2008. *Proceedings* 164-168. [13] Veličković, N., Djan, M., Obreht, D., Vapa, Lj. *Archive of Biological Sciences, Belgrade*, 62 (3), 807-810, 2010. [14] Veličković, N., Djan, M., Obreht, D., Vapa, Lj. *Russian Journal of Genetics*, in press, 2012. [15] Sambrook, J.F., Russel, D.W. *Molecular Cloning: A laboratory manual*, 3rd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, USA, 2001. [16] Mougél, F., Mounolou, J.C., Monnerot, M. *Animal Genetics* 28: 58-71, 1997. [17] Rico, C., I. Rico, N. Webb, S. Smith, D. Bell, and G. Hewitt. *Animal Genetics* 25:367, 1994. [21] Fredholm, M., Wintero, A.K., Christensen, K., Kristensen, B., Nielsen, P.B., Davies, W., Archibald, A. *Mammalian Genome* 4: 187-192, 1993. [18] SurrIDGE, A.K., Bell, D.J., Rico, C., Hewitt, G.M. *Animal Genetics*, 28, 302–305, 1997. [19] Kryger, U., Robinson, T.J., Bloomer, P. *Molecular Ecology Resources*, 2 (4): 422-424, 2002. [20] Fredholm, M., Wintero, A.K., Christensen, K., Kristensen, B., Nielsen, P.B., Davies, W., Archibald, A. *Mammalian Genome* 4: 187-192, 1993. [21] Rocher, G.A., Alexander, L.J., Keele, J.W., Smith, T.P., Beattie, C.W. *Genetics* 136: 231-245, 1994. [22] Alexander, L.J., Rohrer, G.A., Beattie, C.W. *Animal Genetics* 27: 137–148, 1996. [23] Raymond, M., Rousett, F. *Journal of Heredity* 86: 248-249, 1995. [24] Belkhir, K., *Genetix 4.05.2.*, University of Montpellier II, Laboratoire Genome et Populations, Montpellier, France, 2004. [25] Suchentrunk, F., Mamuris, Z., Sfougari, A., Stamatis, C. *Biochemical Genetics* 41 (5/6): 127-140, 2003. [26] Ferreira, E., Souto, L., Soares, A.M.V.M., Fonseca, C., *Mammalian Biology*, 74 (4): 274-285, 2009. [27] Vernesi, C., Crestanello, B., Pecchioli, E., Tartari, D., Caramelli, D., Hauffe, H., Bertorelle, G. *Molecular Ecology*, 12:585-595, 2003. [28] Hartl, D.L., Clark, A.G., *Principle on Population Genetics* ed. 4th, Sinauer Associates Inc, Sunderland, 2007.