

FORENZIČKA GENETIKA DIVLJIH VRSTA – SREDSTVO ZA KONTROLU KRIVOLOVA

Paule L.¹, D., Krajmerová¹, I., Romšáková¹, L., Nedelová¹, J., Slamečka²

Sažetak: Genetika sudske medicine divljih životinja je primenjena nauka koja je nastala iz istraživanja genetske konzervacije i prakse genetske sudske medicine da bi poslužila kao sredstvo u sprovođenju istraživanja zakona divljih životinja. Prikazani radu sa kratkim pregledom na istraživački projekat čiji je cilj izradu niza mitohondrijalnih DNK markera za identifikaciju divljači kopitara- jelena, srne, jelen lopataram muflona i dva velika mesoždera – mrkog medveda i risa. Drugi cilj ovog istraživačkog projekta je dizajn reakcije mikrosatelitskih multipleksa PCR za pouzdanu identifikaciju jedinki. Rasući pritisak kriminala životnesredine ugrožava održivo korišćenje divljači, kao i opstanak ugroženih vrsta. Što se tiče nekoliko međunarodnih sporazuma koji se odnose na očuvanje vrsta i trgovinu ugroženim životinjskim vrstama, genetika sudske medicine divljih životinja služi i kao sredstvo za identifikaciju ugroženih vrsta i njihovo poreklo, kao i proizvoda koji potiču od njih.

Ključne reči: genetika sudske medicine, krivolov, ugrožene vrste, CITES.

Uvod

Razvoj genetskih studija vrsta divljih životinja (divljači ili oni zakonom zaštićenih) u poslednje dve decenije je bilo moguće samo zahvaljujući podršci molekularnih genetskih analiza. Stepem očuvanja genetskih primena bio je proporcionalan sa razvojem pojedinih bioloških disciplina kao što je populacione genetike, filografije i filogenije kao i molekularne ekologije i taksonomije. Jedan od genetskih konzervatorskih primena je razvoj molekularnih tehnika pogodnih za identifikaciju vrsta i jedinki za potrebe genetike sudske medicine divljih životinja. Genetika sudske medicine divljih životinja bavi se dokazima o identifikaciji vrsta, populacija i rođacima ali i jedinke. Njen razvoj je paralelan, iako mnogo kasni, sa metodama i primenom genetike sudske medicine ljudi. U okviru nacionalnih i međunarodnih pravnih okvira za očuvanje biotopa i biodiverziteta (npr. CITES), analiza sudske medicine DNK postala je ključno sredstvo u borbi protiv kriminala životne sredine divljih životinja (divljači) i zaštićenih vrsta [1], [4], [7], [9].

Genetska identifikacija vrsta zasniva se na genetskim markerima DNK koje su vrlo konzervativni u okviru vrste, ali se vrlo razlikuju između vrsta. Kod životinja, gen lokusa mitohondrijalne DNK, na primer citohrom b i citochromokidase, jedinke I (COI) se najčešće koristi. DNK je prihvatio tehniku korišćenja od strane Međunarodnog udruženja za sudsku genetiku (ISFG) [2], [3], [8] i prihvaćena je kao postupak indentifikacije sudske medicine [11].

S druge strane, genetički markeri nuklearnog DNK, na primer, mikrosatelita ili otiska prsta (AFLP) zbog njihovog visokog polimorfizma se često koristi za identifikaciju jedinke unutar vrste. Od među genetičkih markera nuklearne DNK, neki od njih su specifični za vrstu, a takođe može da posluži za identifikaciju vrsta. U principu, genetičari sudske medicine rade sa različitim tipovima biološkog materijala, npr krv, meka tkiva, kosti, zubi, kosa, pljuvačka, urin ili fekalije. Neke vrste biološkog materijala (npr. kosti, rogovi) sadrže malu količinu DNA, ali koji je dobro očuvan tokom više godina, a sa druge strane kod mekih tkiva mnogo je DNK, ali zbog prisustva enzima on razlaže mnogo brže ukoliko se ne čuva pravilno.

Brojni međunarodni ugovori o zaštiti životinjskih vrsta ili trgovini zaštićenim vrstama (npr. CITES) obavezuju potpisnice na aktivnu zaštitu vrsta, ali i da aktivno pravno kontrolišu trgovinu zaštićenim vrstama. Kod nelegalne trgovine zaštićenih vrsta kao i lovokrađe, koriste se prilično sofisticirane metode poslednjih decenija, i shodno tome slične sofisticirane metode treba da koriste za otkrivanje ekoloških zločina koji takođe mogu da se koriste u pravnim procesima.

Materijal i metode

Različite vrste uzoraka: tkiva, krv, kosti, dlake, kao i tragovi koji se često koriste u humanoj genetici sudske medicine se takođe koriste kao eksperimentalni dokaz ili genetski materijal u analizama u sudske medicine divljih životinja. Cilj dokaza sudske medicine je usmeren na lovokrađu u slučajevima koji se, u suštini, zasnivaju na dva koraka - identifikaciju vrste i identifikaciju individualnog identiteta. Dokazi sudske medicine usmereni na ilegalnu trgovinu zaštićenih životinja se obično zasnivaju na identifikaciji vrsta ili podvrsta i / ili stavljanje pojedinca u filogeografski obrazac za identifikaciju porekla pojedinca i njegovog mogućeg vraćanja u zemlju (populaciju) porekla.

¹ Faculty of Forestry, Technical University, SK-96053 Zvolen, Slovakia; paule@vsld.tuzvo.sk; krajmer@vsld.tuzvo.sk; romsak@vsld.tuzvo.sk; nedelova@vsld.tuzvo.sk

² Animal Production Research Centre Nitra, Hlohoveckácesta 2, SK- 951 41 Nitra, Slovakia; slamecka@cvzv.sk

Metode za izolaciju DNK treba da odgovaraju dobro utvrđenom protokolu za izolaciju DNA uzoraka sa visokim ili niskim sadržajem DNK i takođe treba da poštuju faze razgradnje DNA. Najčešće korišćene metode DNA izolacije su: CTAB metod za tkiva, i različiti pribori za pojedine vrste biološkog materijala, npr uzorci krvi, kostiju, kosa (npr. Macheri Nagel, Qiagen, itd)

Idealan postupak bila bi upotreba brojnih specifičnih paralelnih parametara za identifikaciju vrsta ijedinke. Nažalost, postoji nedostatak tih prajmera za vrste divljih životinja, jer se većina prajmera za vrste divljih životinja razvila iz prajmera koje su korišćeni u prošlosti za domaće životinje (Bovinae, Suidae i Caprinae) i mnogi rade na dve ili više vrsta divljih životinja (crveni i srna, domaća i divlja svinja svinja, itd).

Protokol primene sudske medicine divljih životinja treba da pokrije dva koraka – identifikaciju pomoću mitohondrija markera vrste i identifikaciju jedinke koja koriste mikrosatelite ili druge markere koji su u stanju da prepoznaju individualne varijacije. Neki od nuklearnih DNK markera mogu biti specifična vrsta i mogu takođe lako da prepoznaju vrste, npr prajmer G10P mrkog medveda, koja bi mogao lako da se razlikuje od uzoraka mrkog medveda a i od drugih vrsta divljih životinja.

Cilj našeg istraživanja je: (i) da razradi skup specifičnih markera vrste za identifikaciju vrste, i (ii) da razvije jednostavan multipleksni skup mikrosatelitskih lokusa sa visokim stepenom polimorfizma za identifikaciju jedinki. Ovo istraživanje ima za cilj razvoj multipleks-prajmera podešenih za identifikaciju crvenih jelena (*Cervus elaphus*), jelena lopatar (*Dama dama*), srna (*Capreolus capreolus*), divljih svinja (*Sus scrofa*), muflona (*Ovis musimon*), divokoza (*Rupicapra rupicapra*), mrkog medveda (*Ursus arctos*), risa (*Link link*), zeca (*Lepus europaeus*) i kunića (*Orientalis cuniculus*). Kopitari i dva velika mesoždera su najčešći predmet lovokrađa. Takođe smo dodali druge dve vrste koje se love bespravno, ali sa druge strane njihova ekonomska vrednost nije toliko značajna. Oni bi, međutim, mogli poslužiti kao model za ispitivanje uzorke obrađenog mesa i mesnih prerađevina.

Molekularni markeri koji se koriste za identifikaciju vrsta u okviru našeg projekta su citohrom b i citochromokidase, podvrsta I (COI) i D - petlja. Broj testiranih mikrosatelita za individualne kopitare ili vrste mesoždera zavisi od vrste i varira u ovom trenutku od 12 za risa do 17 za mrkog medveda i jelena i 24 za divokoza. Iako, većina prajmerima pojačava dobro, njihova prednost se zasniva na broju alela koji se mogu prepoznati u celini, i/ili u specifičnoj populaciji. U tom smislu, populacija specifične alele može biti značajan doprinos prilikom identifikovanja porekla nepoznatog uzorka.

Razvoj jednostavnog skupa multipleksa mikrosatelitskih lokusa stoga treba da bude usmeren na optimizaciju broja lokusa (cena) i verovatnoće da otkrije pojedinca u jednoj populaciji. Prajmeri sa većim brojem alela su prednost, dok oni sa malim brojem alela su od vredni samo u slučaju da ovi aleli su vrste -ili populacije -specifične.

Rezultat i diskusija

Najčešći slučajevi u genetici sudske medicine divljih životinja se lovokrađe. Sa metodološkog stanovišta, to se povezuje sa identifikacijom objekta, obično lokalizovanog u šumi npr kože, creva, tragova krvi i dokaza predmeta npr sastanak, trofej, kože, itd Ako su oba uzorka su na raspolaganju istovremeno molekularni dokaz je prilično jednostavan i povezan je sa profilom sa kojim se podudara ili genotipom oba seta uzoraka. Broj markera koji se koriste u multipleks setu povećava verovatnoću ispravne identifikacije.

Još su problematični slučajevi lovokrađe u kojima lovokradica ili predmet nisu poznati. Postoje samo identifikovani tragovi i biološki dokazi iz šume, ali u datom trenutku predmet jenepoznat. Kao idealan slučaj bi identifikacija biološkog dokaza (vrsta, pol, genotip) i čuvati uzorak u bazi podataka za kasnije poređenje sa drugim slučajevima, npr trofeji, ili mesne prerađevine na tržištu, itd. Razvoj baze podataka sudske medicine divljih životinja sa "nerešenim" slučajevima smatra se dobrom investicijom za budućnost. Razvoj protokola (preciznije još prajmera ili različitih prajmera), skladištenje DNK alikuota ili bioloških uzoraka će biti od vrednosti. U ovom slučaju u arhivi uzorci mogu biti od pomoći da daju preciznije uzorke.

Prema važećem zakonodavstvu u Slovačkoj (Zakon o lovu), u svakoj pravno pojedinačno ustreljena divljač (crveni jelen , srna , jelen lopatar , muflon , divlja svinja i mrki medved) mora da bude označen jedinstvenim znakom , brojem koji treba da se evidentira u dozvole za lov lovca i broj koji treba da prate životinju do krajnjeg korisnika . Svaka ustreljena jedinka divljači bez ovog jedinstvenog znaka smatra se odstreljenom bespravno , čak i ako lovac poseduje dozvolu za lov. Samo nekoliko ilustracija ispitivanja slučaja koje smo uradili u našoj laboratoriji:

- Brojni dokazi identiteta između bioloških tragova životinja koje su bespravno ulovljene i bioloških tragova (sastanak, krv, trofeji) na predmet različitih vrsta (jelen, srna, divlja svinja),
- dokaz o identitetu dlake mrkog medveda koji je ostao na telu ubijene osobe sa genotipom mrkog medveda koji je ustreljen kasnije. Ovaj dokaz bio neophodan da potvrdi odluku da se ukloni zdrav mrki medved sa netipičnim ponašanjem koji je ubio čoveka,
- dokaz o identitetu mesa mrkog medveda u restoranu sa zakonsi odabranim mrkim medvedom.

Slučajevi istraživanja zabeležili su dva metka koja se koriste za poređenje dva seta uzoraka koristeći veći broj markera. Tako su metodične procedure prilično jednostavane, ali zbog uzoraka različitog kvaliteta, a ponekad, zbog nepoznatih vrsta, veoma dugo traju.

Treće ispitivanje slučaja zahteva bazu podataka svih legalno odstranjenih mrkih medveda (ili drugih vrsta) koji bi se meso moglo naći i na tržištu (meso je vlasništvo lovačke zajednice, a ne lovca, a to može biti prodavano u marketima). Prema slovačkom zakonu, mrki medved se smatrati zaštićenom vrstom i izuzeci za godišnje kvote su izdate od strane Ministarstva zaštite životne sredine. Prema ovim izuzecima uzorak za genetičke analize i merenja biometrijskih odabranih mrkih medveda treba da urade strane lica iz Državne prirode konzervatorije. U ovom slučaju, kompletan set uzoraka odabranih mrkih medveda mogao bi biti dostupan za dalje zakonske procedura. Pored identifikacija vrste često postoji neophodnost da identifikacije podvrste. Podvrste divokoza (*Rupicapra rupicapra tatraica*), *Tatra mrmot* (*Marmota Marmota latirostris*) su predmeti zaštite prirode i strogo su zaštićeni, dok podvrste *rupicapra Rupicapra rupicapra* i *Marmota Marmota Marmota* su naveliko lovljeni kao divljač u Alpima. Za obe vrste, razvili smo metode za razlikovanje podvrste koje mogu lako da posluže kao dokaz o nivou podvrsta, da lijedinka, divokoza ili mrmot, je bespravno lovljen u Visokim Tatrama ili ona potiče sa Alpa. Sličan slučaj je i *Capercaillie*, koji se slobodno lovio u Rusiji i Skandinaviji i zaštićen je u većini evropskih zemalja. U ovim slučajevima su dokazi sudske medicine su na nivou podvrsta, a ne na nivou vrsta.

Drugi važan predmet prijava sudske medicine je kontrola nacionalne i međunarodne trgovine sa grabljivice koje se koriste za sokolarstvo. Sve jedinke koje su držane u zatočeništvu, a korišćene su za uzgoj, treba da se genotipizuju i opreme sa elektronskim čipom koji proverava poreklo njihovog mogućeg potomstva (pedigree). Drugim rečima, trgovina sa grabljivicama nije zabranjena, ali su primena aplikacija sudske medicine treba da pomogne da se kontroliše pravno poreklo jedinki i spreče hvatanje životinja iz njihovih populacija.

Zaključak

Genetika sudske medicine divljih životinja kao ogranak konzervatorske genetike razvila se u poslednjih 20 godina. Njena šira upotreba je, međutim, ograničena za zemlje sa dobro razvijenom molekularne nauke, kao i ekološkim zakonodavstvom koje obraća značajnu pažnju na ekološke zločine npr lovokrađa, korišćenje ugroženih i zaštićenih životinjskih vrsta i trgovinu ugroženih vrsta i proizvoda koji potiču od njih.

Prema našem prethodnom iskustvu, primena tehnike sudske medicine je moguća i za vrste divljih životinja za otkrivanje vrste i u mnogim slučajevima i podvrste iz nepoznatih bioloških uzoraka. Korišćenje molekularnih markera nuklearnog DNK takođe omogućava identifikaciju jedinke. To čini dokaz o identitetu između bioloških tragova u šumi i biološkog materijala na mogućeg osumnjičenog (meso, trofej) .

Dalji razvoj genetike sudske medicine divljih životinja zahteva razvoj jednostavnih protokola za identifikaciju vrsta na jednoj strani i multipleks set prajmera za prepoznavanje jedinki po znatno niskoj ceni i sa visokom tačnošću.

Zahvalnost

Ovaj projekat je podržan od strane Slovačke agencije za istraživanje i razvoj granta APVV - 0368 - 10 .

Ključne reči: konzervacija genetike, *Ursus arctos*, *Rupicapra rupicapra*, *pilogeographi*, genetička raznovrsnost.

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 diferenciácie 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., Štofík, J., Ionescu, O. & Adamec, M. *Beiträge für Wild- und Jagdforschung* 36: 77–86, 2011. [13] Straka, M., Paule, L., Ionescu, O., Štofík, J., Adamec, M. *Conservation Genetics* 13: 153–164, 2012. [14] Tullová, M., 2008: Genetická diverzita a diferenciácia jeleňa lesného (*Cervus elaphus* L.) v Karpatoch. Lesnícka fakulta TU vo Zvolene, PhD thesis, 86 pp. + attachments.