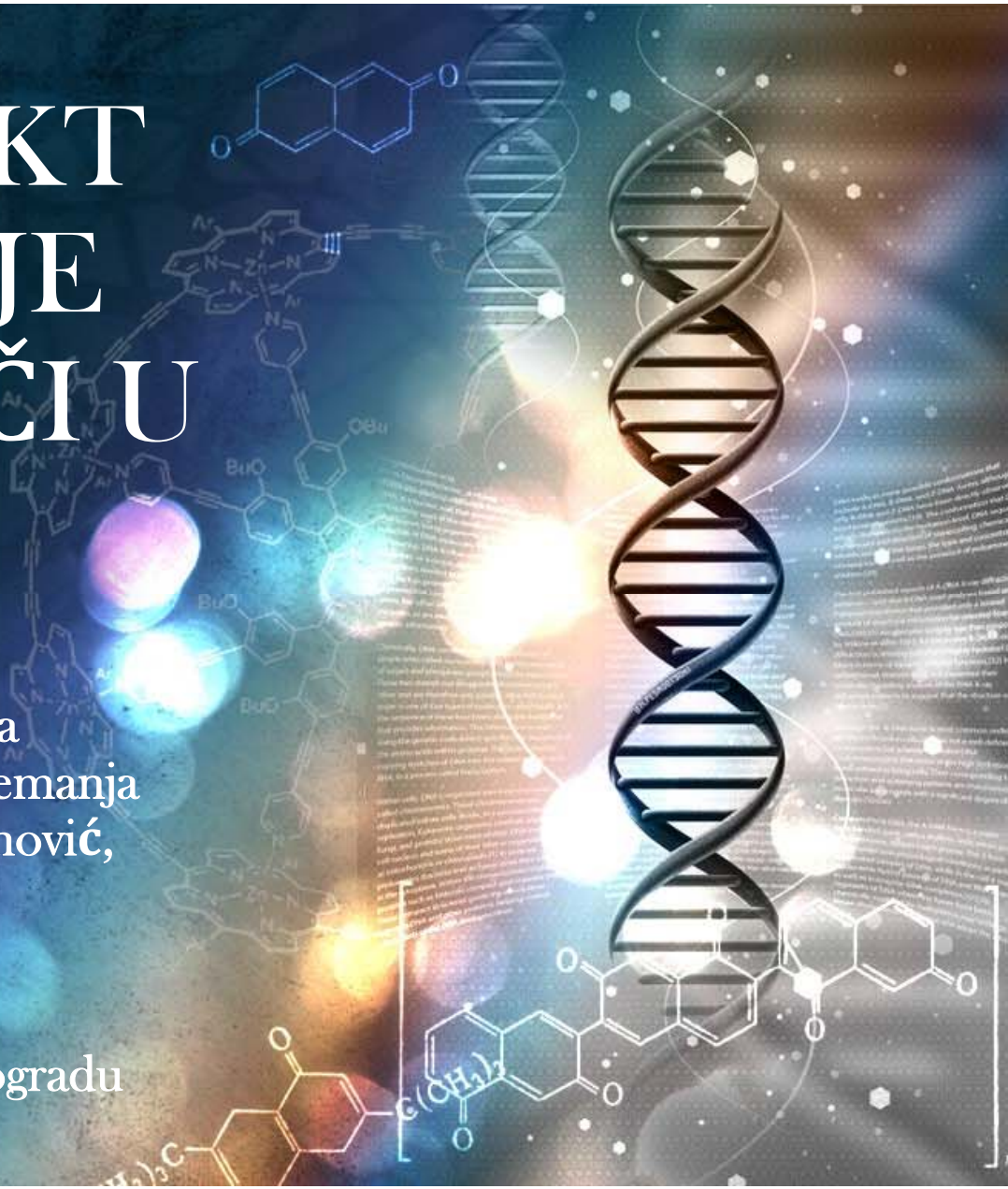


# GENETIČKI ASPEKT REINTRODUKCIJE JELENSKE DIVLJAČI U SRBIJI

Dajana Davitkov dr vet. med., prof. dr Vanja  
Dimitrijević, asist. Uroš Glavinić dr vet. med., Nemanja  
Jovanović dr vet. med., prof. dr Jevrosima Stevanović,  
prof. dr Zoran Stanimirović

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu



# Značaj i potreba očuvanja genetičkih resursa

- Genetički resursi se još nazivaju i 'pravi resursi'
- Geni su oni koji povezuju sve generacije živih organizama na planeti i imaju ogroman uticaj na biodiverzitet.
- Održavanje autohtonih genotipova divljači od velikog značaja za održavanje genetske raznolikosti
- Nepovratni gubitak genetskih resursa smanjuje i naše mogućnosti za budući razvoj



# Varijabilnost u okviru vrste:

- Mutacioni procesi - pojava različitih alela
- Genetički drift:
  - smanjuje genetičku varijabilnost unutar populacija
  - povećava genetičku razliku između populacija
- Sistemi ukrštanja
- Inbriding
- Prolazak populacije kroz usko grlo
  - smanjuje genetičku varijabilnost unutar populacija
  - povećava genetičku razliku između populacija
- Osnivanje nove populacije
- Selektivni pritisci - favorizovanje različitih alela



# Koliko je jelenska divljač u genetičkom pogledu istražena u Srbiji?



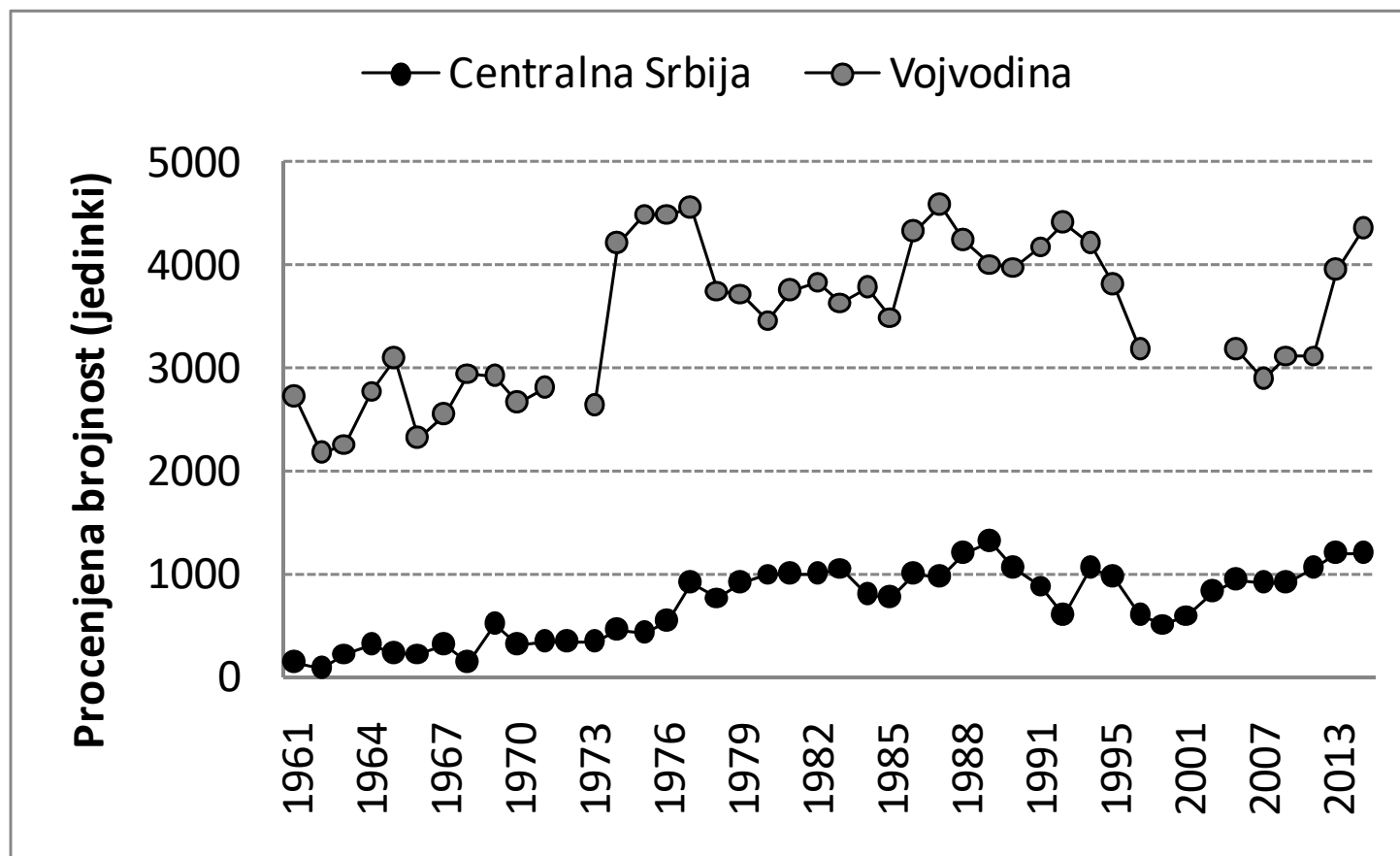
- Evropski jelen - jedna od najrasprostranjenijih vrsta divljači u Evropi (Hmwe 2000; Zachos i sar., 2016)
- Literaturni podaci u Srbiji – relativno oskudni
- Na osnovu analize mDNK razlikuju se 3 velike filogeografske grupe jelena: Zapadno-Evropski (predeli Španije, Francuske, Britanskih ostrva, centralna i severna Evropa), Istočno-Evropski (predeli Balkana i Istočne Evrope) i Afričko-Sardinijski (Zachos i sar., 2016)

# Koliko je jelenska divljač u genetičkom pogledu istražena u Srbiji?



- Taksonomski, Evropski jelen se češće klasifikuje u sedam podvrsta: *C. elaphus scoticus*, *C. elaphus atlanticus*, *C. elaphus elaphus*, *C. elaphus hippelaphus*, *C. elaphus barbarus*, *C. elaphus hispanicus* i *C. elaphus corsicanus*, dok se Karpatski ponekada navodi i kao *C. elaphus montanus* (Zachos i Guenther., 2011)
- Prema dostupnoj stručnoj literaturi, na području Srbije se nalaze 2 podvrste: Centralno-Evropski jelen (*C. elaphus hippelaphus*) (Szabolcsi i sar., 2014; Zachos i sar., 2016) i Karpatski jelen (*C. elaphus montanus*) (Feulner i sar., 2004)

Na osnovu podataka iz Statističkog godišnjaka Republike Srbije – Poljoprivreda (2016) u 2015. godini je bilo prisutno 6620 jedinki, a odstreljeno 1134 jedinke



## Genetički značaj porekla jelenske divljači koja se reintrodukuje (naseljava) u centralnu Srbiju

- Naseljavanje jedinki nepoznatog porekla u velikoj meri može ugroziti već postojeći genofond.
- Pored problema koji bi nastao uvođenjem životinja bez provere njihove genetske strukture i odsustvo uvida u zdravstveno stanje, može predstavljati veliku opasnost.



Stoga bi pored genotipizacije jedinki bilo bi neophodno izvršiti proveru zdravstvenog stanja tj. testiranje na zarazne bolesti i tretiranje protiv ekto i endo parazita.



## **Koje mere i radnje je potrebno obaviti prilikom izbora jelenske divljači (matičnog zapata) za naseljavanje**

- Zakon o divljači i lovstvu ("Sl. glasnik RS", br. 18/2010) - uređuje zaštitu, upravljanje, lov, korišćenje i unapređivanje populacija divljači u lovištu; zaštitu, očuvanje i unapređivanje staništa divljači; zaštitu, uređivanje i održavanje lovišta i druga pitanja od značaja za divljač i lovstvo.





## Koje mere i radnje je potrebno obaviti prilikom izbora jelenske divljači (matičnog zapata) za naseljavanje

### NEOPHODNO JE:

- Strogo definisati periode lovostaja, način lova, način izavanja veterinarskih uverenja i dozvola, izvođenje veterinarskih mera u cilju zdravstvene zaštite lovne divljači.

- Voditi računa o odnosu polova, pratiti fenomen efektivne veličine populacije specifične za svaku vrstu. Takođe voditi računa o genetičkom opterećenju i srodničkim odnosima jedinki u nadgledanoj populaciji.



# Šta bi trebalo uraditi u narednom periodu u okviru projekta vezano za genetički aspekt reintrodukcije jelenske divljači

Genotipizacija Evropskog jelena (*Cervus elaphus*) na teritoriji RS i statistička obrada dobijenih rezultata imala bi za cilj:

- izučavanje genetičkog i funkcionalnog diverziteta populacija
- formiranje baze referentnih DNK profila (GENSKA BANKA) ove životinjske vrste u R. Srbiji
- razvijanje strategije u cilju konzervacije i utilizacije jelenske divljači u ispitivanim staništima

## **Molekularno-genetička ispitivanja će obezbediti:**

- izradu populacione studije o distribuciji alelenih oblika i dalju primenu u selekciji i zdravstvenoj zaštiti
- uvid u stepen genetičke varijabilnosti Evropskog jelena u Srbiji
- obezbeđivanje rezultata neophodnih za izradu strategije očuvanja i ekonomičnog korišćenja populacija u skladu sa stepenom ugroženosti i veličinom populacije.



Pojedine forenzičke analize (utvrđivanje porekla mesa, identifikacija vrste divljači i dr) omogućile bi rasvetljavanje slučajeva krivolova i praćenje kretanja divljači.

Metode koje omogućavaju ovakvu vrstu analiza već su standardizovane i dostupne u Laboratoriji za genetiku životinja na Katedri za biologiju Fakulteta veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu ([Spisak usluga Laboratorije za genetiku životinja 2016](#)).



## **U skladu sa planiranim aktivnostima, analize bi obuhvatile:**

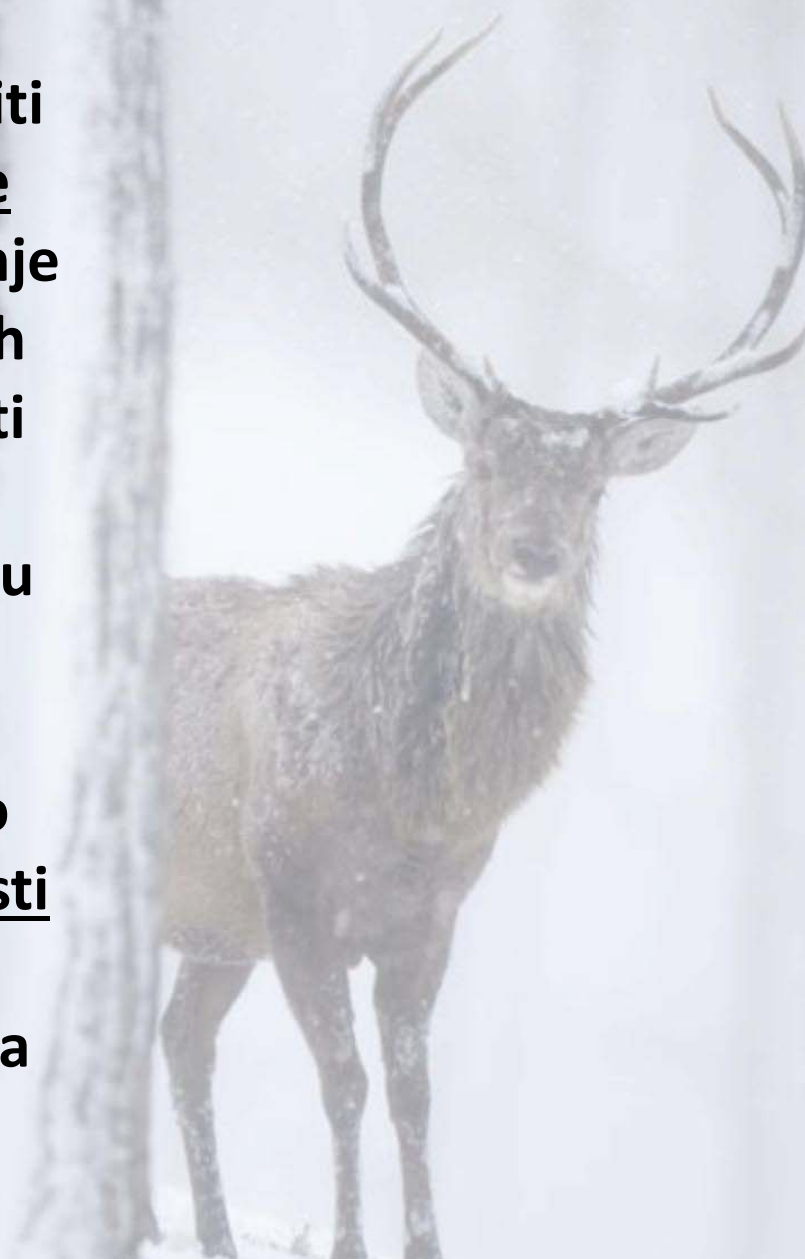
genotipizaciju ispitivanih jedinki korišćenjem panela preporučenih molekularno genetičkih markera - mikrosatelita (Szabolcsi i sar., 2014)

## **Obimna statistička analiza dobijenih rezultata, koja je trebalo da pruži odgovore na pitanja kao što su:**

- koliki je stepen genetičkog i funkcionalnog diverziteta populacija,
- da li postoje negativni efekti ukrštanja u srodstvu,
- prolazak populacija kroz „usko grlo“,
- genetički drift ,
- eventualne pojave inbredne depresije i dr.



- **Dobijeni rezultati bi mogli biti osnov za formiranje genske banke lovne divljači i uvođenje mikrosatelita kao pouzdanih genetičkih markera u oblasti kontrole roditeljstva i identifikacije jedinki u okviru vrste na teritoriji RS.**
- **Ovakav pristup bi doprineo planskom povećanju brojnosti populacija i pravilnim pristupima i odabiru metoda selekcije u odgajivačkim programima.**



# Balkanski magarac



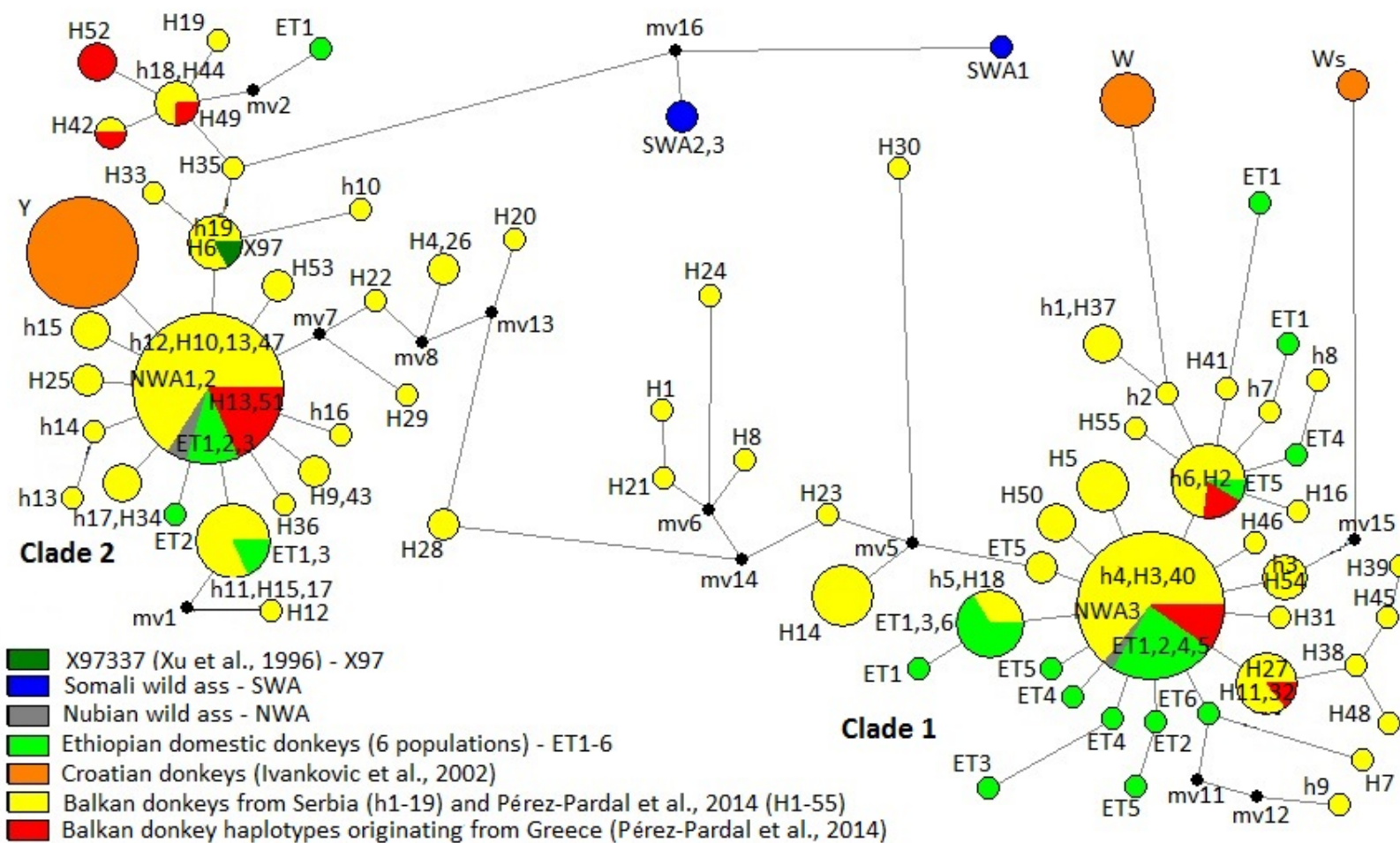
# Haplotipovi pronađeni kod kod Balkanskog magarca na teritoriji Srbije

Positions of nucleotide substitutions and indels within the mitochondrial control region																											Frequency of haplotypes in populations					
GenBank	Cl	h	G	C	T	1 bp indel	A	A	T	C	G	A	A	G	A	C	T	A	C	C	T	C	T	A	C	C	G	G	ZA	SP	KO	All
KR081377	1	1	A	T	C		G	G	.	T	A	.	.	A	.	T	C	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A			0.222	0.041
KR081378	1	2	A	T	C		G	G	.	T	A	.	.	A	.	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033			0.020
KR081379	1	3	A	T	C		G	G	.	T	.	G	.	A	.	T	C	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033			0.020
KR081380	1	4	A	T	C		G	G	.	T	.	G	.	A	.	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.067		0.111	0.061
KR081381	1	5	A	T	C		G	G	.	T	.	G	.	A	G	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033	0.100		0.041
KR081382	1	6	A	T	C		G	G	.	T	.	.	.	A	.	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033	0.100		0.041
KR081383	1	7	A	T	C		G	G	.	T	.	.	.	A	G	T	.	G	.	T	C	T	.	.	T	T	A	A	0.033			0.020
KR081384	1	8*	A	T	C		G	.	.	T	.	.	.	A	.	T	.	G	.	T	C	T	.	G	T	T	A	A	0.033			0.020
KR081385	1	9*	A	T	C		G	.	.	T	.	G	.	A	G	T	.	G	.	T	.	.	.	.	T	T	A	A			0.111	0.020
KR081386	2	10*	.	.	.		G	.	C	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		0.100		0.020
KR081387	2	11	.	.	.		.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.			0.222	0.041
KR081388	2	12	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0.467	0.300	0.333	0.408
KR081389	2	13	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.		0.100		0.020
KR081390	2	14	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		0.033		0.020
KR081391	2	15*	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0.067	0.100		0.061
KR081392	2	16*	.	.	.		.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		0.100		0.020
KR081393	2	17	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.		0.033		0.020
KR081394	2	18	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.		0.067		0.041
KR081395	2	19	.	.	.		.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	0.033	0.200		0.061

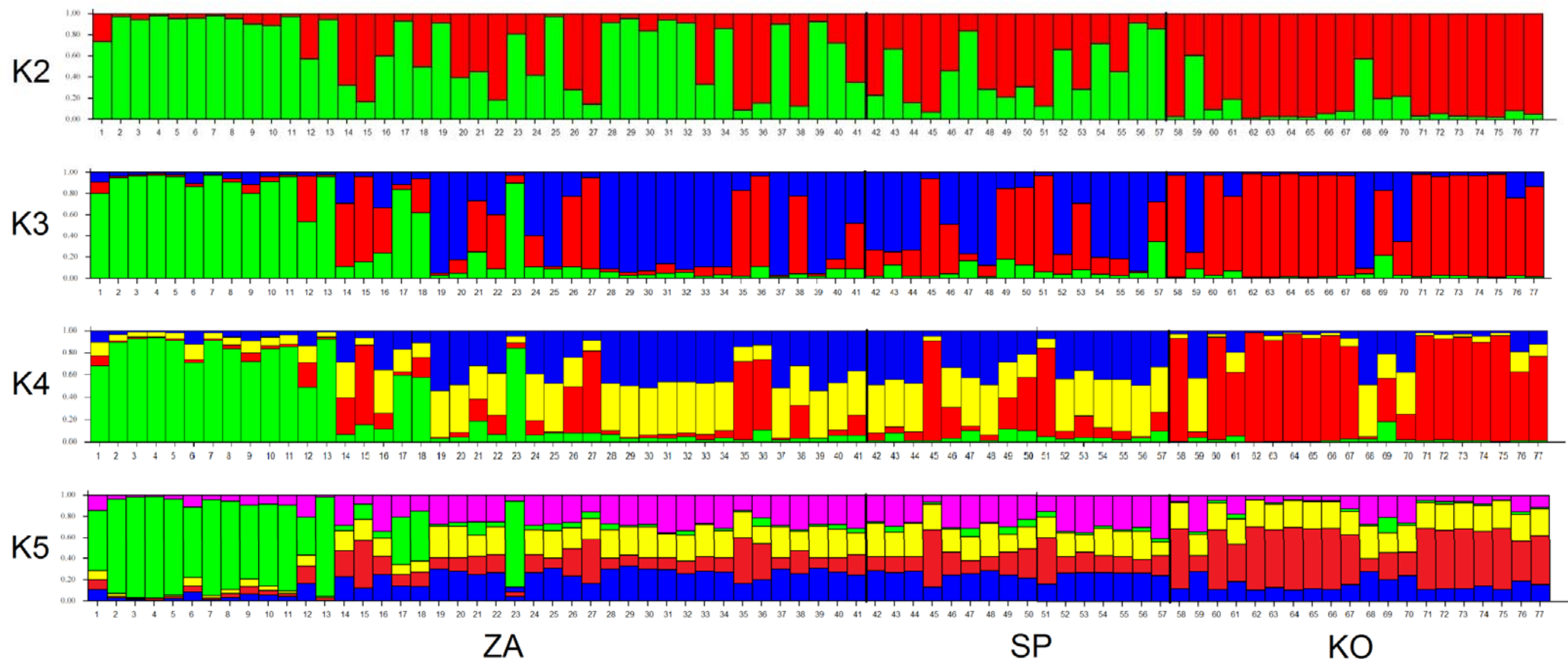
Cl. - mitochondrial Clade 1 or 2; h - haplotype; \* - haplotypes reported for the first time.



# Odnos haplotipova Balkanskog magaraca u odnosu na sve ostale opisane haplotipove magaraca



## Diverzitet populacije Balkanskog magarca u Srbiji na osnovu analize mikrosatelita





# Karakterizacija psa šarplaninca



## Filogenetski odnosi rase šarplaninac sa drugim rasama pasa

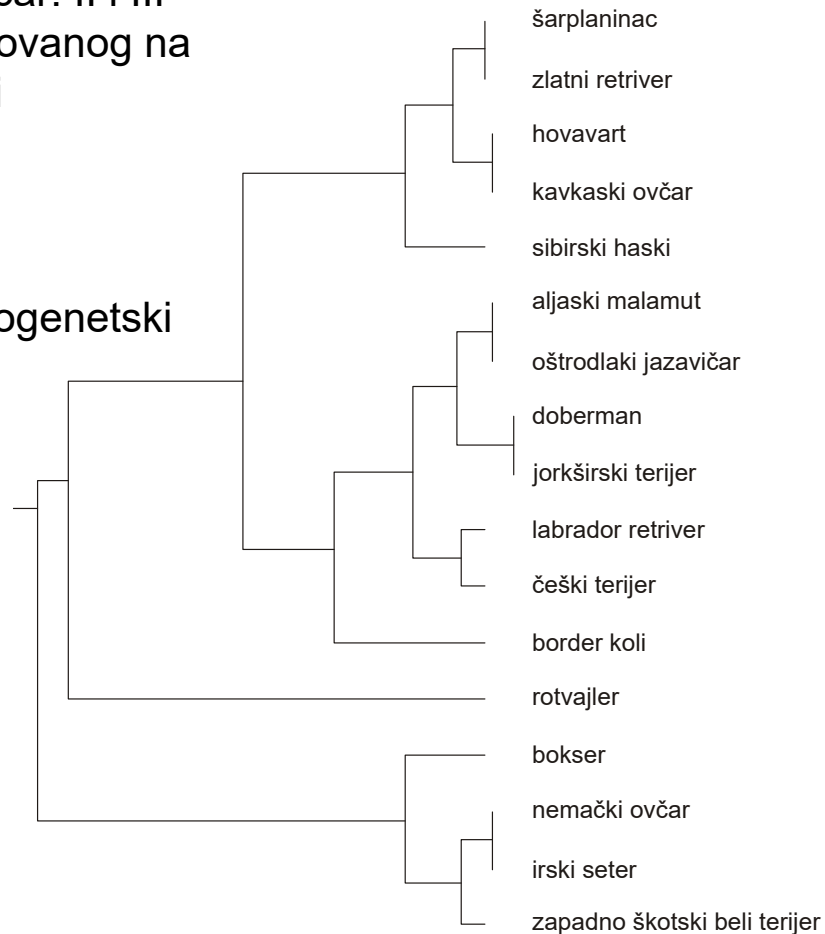
- zlatni retriver, hovavart, kavkaski ovčar: II i III klaster u sistemu klasifikacije rasa zasnovanog na analizi genetičke varijabilnosti

- divergencija rasa u ovim klasterima: poslednjih 200 - 300 godina

- sibirski haski: klaster filogenetski starih rasa

osnov za pretpostavku da je rasa šarplaninac nastala u vreme nastanka većine današnjih savremenih rasa

podsticaj za detaljniju studiju genetičkih distanci u odnosu na filogenetski najstarije rase pasa



# Identifikacija porekla mesa divljači korišćenjem PCR tehnike



**Evropski jelen (*Cervus elaphus*)**

**Jelen lopatar (*Dama dama*)**

**Srndać-srna (*Capreolus capreolus*)**

# Prajmeri

## Conserved forward primer

12S-FW 5'- GGTAATCTCGTGCCAGCCA -3'

## Conserved reverse primer

12S-REV 5'- TCCAGTATGCTTACCTTGTTACGAC -3'

720bp

red deer, fallow deer, roe deer, chamois, mouflon, pyrenean ibex, cattle, sheep, goat, and swine meats

## Specific primers Srna (*Capreolus capreolus*)

12SCC-FW 5'- TGAAAATAGATAACGAAAGTAGCTTTGAACTA -3'

175bp

## Specific primers Evropski jelen (*Cervus elaphus*)

12SCE-FW 5'- CAAAAACATATAACGAAAGTAACTTTCCGACC -3'

175bp

## Specific primers Jelen lopatar (*Dama dama*)

12SDD-FW 5'- TAAACAACGAAGGTAACCTTATCG -3'

169bp

Reverse primer- ZAJEDNIČKI ZA SVE TRI VRSTE  
12SCERV-REV 5'- AAAGCACCGCCAAGTCCTT -3'

# Rezultat





# Utvrdživanje vrste divljači – molekularno genska specijes specifična identifikacija

- Evropski jelen *Cervus elaphus*
- Jelen lopatar *Dama dama*
- Srna *Capreolus capreolus*



- PCR targeting specific sequences from the mitochondrial 12S rRNA gene

- Universal *Cervidae* reverse primer

- 12SCERV-REV

- Species-specific forward primers:

- 12SCE-FW for *Cervus elaphus*

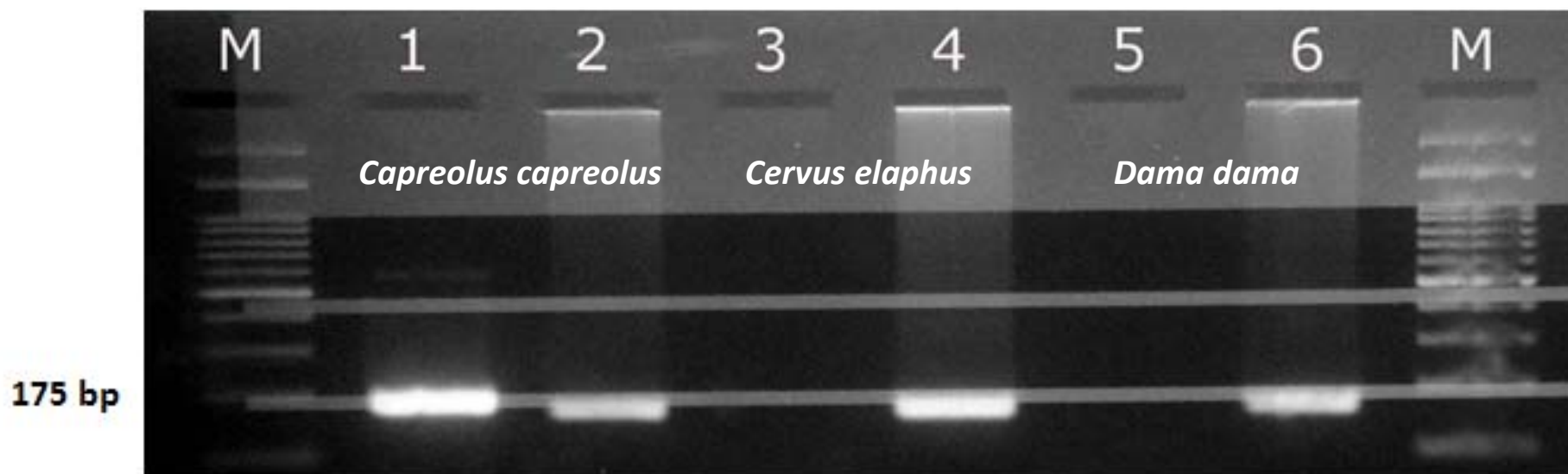
- 12SDD-FW *Dama dama*

- 12SCC-FW *Capreolus capreolus*

**Aktivacija - 93°C tokom 2 minuta**

<b>40 ciklusa</b>	<b>Denaturacija</b>	<b>30 sekundi</b>	<b>93°C</b>
			<b>61°C (Jelen lopatar)</b>
	<b>Aniling</b>	<b>30 sekundi</b>	<b>64°C (Srna)</b>
			<b>67°C (Evropski jelen)</b>
	<b>elongacija</b>	<b>45 sekundi</b>	<b>72°C</b>

**Finalna elongacija - 72°C tokom 5 minuta**



**M, 100 bp marker;**

**1, uзорak;**

**2, K+;**

**3, uзорak;**

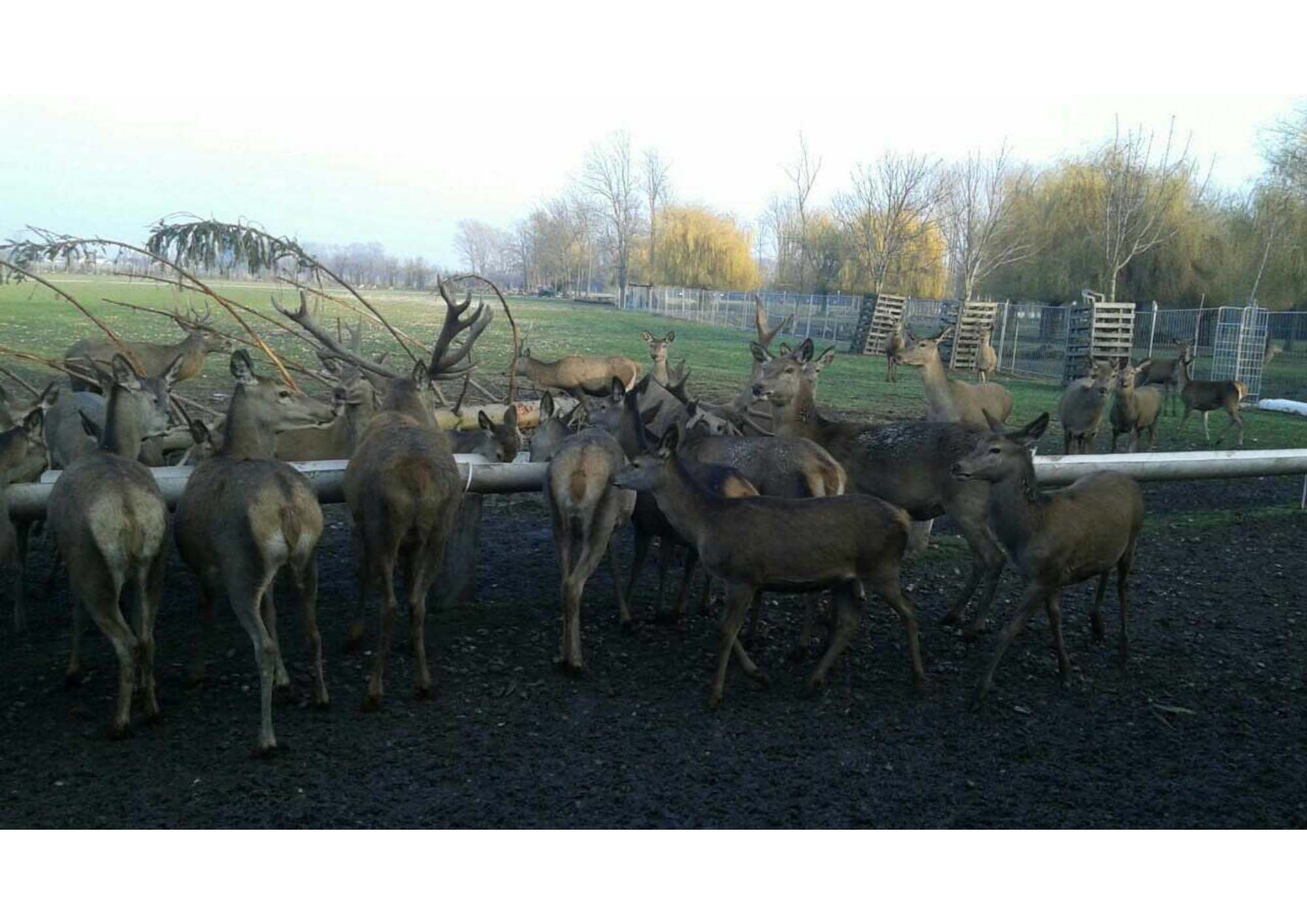
**4, K+;**

**5, uзорak;**

**6, K+;**

**M, marker;**















**Hvala na pažnji!**

