

## ВАРИЈАБИЛНОСТ МИКРОСАТЕЛИТА У ПОПУЛАЦИЈИ ЗЕЦА (*Lepus europaeus*) ВОЈВОДИНЕ

Михајла Ђан, Драгана Обрехт, Љиљана Вапа, Милан Вапа<sup>1</sup>

Природно-математички факултет, Трг Доситеја Обрадовића 2, 21000 Нови Сад

<sup>1</sup>Пољопривредни факултет, Трг Доситеја Обрадовића 8, 21000 Нови Сад

### Abstract

**DAN, Mihajla, Dragana OBREHT, Ljiljana VAPA, M. VAPA: VARIABILITY OF MICROSATELITES IN HARE POPULATION (*Lepus europaeus*) IN VOJVODINA.** *Skup 2:* 143-148. [Faculty of Science and Mathematics, 2 Dositej Obradovic Square; Faculty of Agriculture, 8 Dositej Obradovic Square; 21000 Novi Sad].

Microsatellites, high repetitive sequences of a nuclear genome, represent useful molecular markers in analyses of population structure of various species. A high level of polymorphness of these DNA regions and co-dominant hereditary quality enables application of the results in observing genetic variability of natural populations for the purpose of biological conservation and ecological management of species. The aim of this research has been discovering variabilities of the three microsatellite locuses in the hare population (*Lepus Europaeus*) in Vojvodina. Applied standard primers for the amplification of locuses *Sat2*, *Sat5* and *Sat 12* have been developed on the wild hare species (*Oryctolagus cuniculus*) have shown to be applicable amongs various species of the Lagomorph. Following the separation of products of amplification using 6% of the denaturable polyacrilamid gel, 9 alleles in *Sat2* locus, 7 alleles in *Sat5* locus and 10 alleles in *Sat12* locus have been discovered. Heterozygotes were detected for each of the three locuses, and values of noticed heterozygotness per a locus were in the range from 0,222 (*Sat5*) to 0,813 (*Sat12*). By summing the results of the genetic structure of units, a noticed heterozygotness was defined in the hare population in Vojvodina  $H_0=0,520$ , while the value of genetic differentiation according to the parameters of the F statistics had the sum of  $F_{st}=0,329$ . Gotten values point to large genetic differentiation in the hare population in Vojvodina, and to a much higher level of genetic variability discovered by the microsatellite markers, compared to earlier conducted analyses of alohibernal variability of the same populations. Selected microsatellite locuses have shown to be applicable in discovering genetic structure of the hare population, and the analysis of a larger number of units can enable defining of sub-population structure of this species on a broader area.

**Key words:** *Lepus Europaeus*, microsatellites, electrophoresa, genetic variability.

### Сажетак

Микросателити, високорепетитивне секвенце нуклеарног генома, представљају корисне молекуларне маркере у анализама популационе структуре различитих врста. Висок степен полиморфности ових региона ДНК и кододоминантно наслеђивање омогућава примену резултата у сагледавању генетичке варијабилности природних популација, ради биолошке конзервације и еколошког менаџмента врста. Циљ овог рада био је откривање варијабилности три микросателитска локуса у популацији зеца (*Lepus europaeus*) Војводине. Кориштени стандардни прајмери за амплификацију локуса *Sat2*, *Sat5* и *Sat12* развијени су на врсти дивљег кунџа (*Oryctolagus cuniculus*), и показали су се примењивим код различитих врста Lagomorpha. Након раздвајања продуката амплификације на 6% денатуришућем полиакриламидном гелу откривено је 9 алела у *Sat2* локусу, 7 алела у *Sat5* локусу и 10 алела у *Sat12* локусу. Хетерозиготи су детектовани за сва три локуса, и вредности уочене хетерозиготности по локусу кретале су се од 0,222 (*Sat5*) до 0,813 (*Sat12*). Сумирањем резултата генетичке структуре јединки дефинисана је

уочена хетерозиготност у популацији зеца Војводине  $H_0=0,520$ , док је вредност генетичке диференцијације према параметрима F статистике износила  $F_{ST}=0,329$ . Добијене вредности указују на велику генетичку диференцијацију у популацији зеца Војводине, и много већи степен генетичке варијабилности откривен микросателитским маркерима, у односу на раније анализе алозимске варијабилности истих популација. Одабрани микросателитски локуси показали су се примењивим у откривању генетичке структуре популације зеца, и анализа већег броја јединки може омогућити дефинисање субпопулационе структуре ове врсте на ширем ареалу.

**Кључне речи:** *Lepus europaeus*, микросателити, електрофореза, генетичка варијабилност

## УВОД

Велики број популационо-генетичких студија указао је на могућност примене микросателита у анализама структуре популација које показују низак ниво полиморфности алозима. Истраживања генетичке варијабилности различитих врста рода *Lepus* европског континента применом анализе алозимске варијабилности (Vapa et al., 2002b; Suchentrunk et al., 2003) открила су мали степен генетичке диференцијације између различитих популација зеца у поређењу са осталим врстама сисара. Обзиром да је развој и стандардизација прајмера за амплификацију микросателитских локуса скуп и дуготрајан процес, у бројним студијама кориштени су микросателитски прајмери развијени на сродним врстама (Andersson et al., 1999). Микросателити, високорепетитивне секвенце нуклеарног генома, представљају корисне молекуларне маркере у анализама популационе структуре различитих врста због високог степена полиморфности ових региона ДНК и кодоминантног наслеђивања. Наведене карактеристике омогућавају примену резултата у сагледавању генетичке варијабилности природних популација ради биолошке конзервације и еколошког менаџмента врста.

Зеца (*Lepus europaeus*) насељава цео европски континент изузев Иберијског полуострва и представља једну од најловљенијих врста дивљачи, те поред биолошког има и велики економски значај у различитим регионима (Vapa, Šelmić, 1997). Након последњег леденог доба ова врста је успешно населила степске пределе Европе и временом се адаптирала на пољопривредна подручја низијско-брдских предела. Поред постгласијалне експанзије, врста *Lepus europaeus* успешно је интродукована у јужна подручја Скандинавског полуострва (Andersson et al., 1999), Велику Британију (Suchentrunk et al., 2001) и острвска подручја Грчке (Mamuris et al., 2001). Интродуковане јединке успешно су хибридизовале са другим врстама рода *Lepus* што је узроковало промене генетичке структуре популација. Све наведене промене као и чињеница да се ради о најловљенијој дивљачи, иницирале су бројна истраживања генетичке структуре популација зеца. Анализе алозимске варијабилности показале су низак ниво генетичке варијабилности популација на ширем ареалу (Hartl et al., 1993; Suchentrunk et al., 2003; Davidović, 2003). У даљим генетичким студијама применом микросателитских маркера дефинисан је већи ниво генетичке диференцијације различитих популација (Andersson et al., 1999).

До данас детаљне генетичке студије популације зеца Војводине урађене су применом анализе алозимске варијабилности (Vapa et al., 2002a, 2002b; Davidović, 2003) и варијабилности митохондријалног генома (Đan et al., 2005), и показани ниво генетичке варијабилности ( $H_0=0,056$  и  $P=25\%$ ) анализирани популације био је у нивоу осталих средњеевропских популација зеца, без изражене генетичке диференцијације.

Циљ овог рада био је откривање варијабилности три микросателитска локуса у популацији зеца (*Lepus europaeus*) Војводине, ради утврђивања примене одабраних

молекуларних маркера у откривању генетичке структуре популације зеца и дефинисању субпопулационе структуре ове врсте.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ РАДА

Узорци ткива језика и јетре 20 јединки зеца, изловљених на територији Војводине, у току ловне сезоне 2004/05., кориштени су за анализу. Узорци су замрзнути одмах након сакупљања, и чувани су на  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Укупна ДНК сваке јединке изолована је из приближно  $1\text{mm}^3$  ткива фенол-хлороформ-изоамилалкохол, екстракцијом према методи Kocher et al. (1989).

Прајмери кориштени за анализу микросателитских локуса *Sat2*, *Sat5* и *Sat12*, развијени су на врсти дивљег кунућа (*Oryctolagus cuniculus*) и дизајнирани су према Mougel i sar. (1997). Услови и оптимизација PCR амплификације анализираних региона урађена је према Andersson et al. (1999). Након амплификације PCR, производи су раздвојени 2% агарозном електрофорезом и бојени етидијум бромидом ради визуализације под UV светлом. Узорци који су показали специфичну амплификацију микросателитских региона раздвојени су на 6% денатуришућем полиакриламидном гелу, према методи Sambrook & Russell (2001), и визуализовани стандардним сребрним бојењем.

Фрагментна анализа добијених алела урађена је применом BIOSYS-1 release 1.7 компјутерског пакета (Swofford, Selander, 1989), у циљу израчунавања алелних фреквенција, уочене и очекиване хетерозиготности, просечне хетерозиготности, просечног броја алела по локусу, као и основних параметара F статистике.

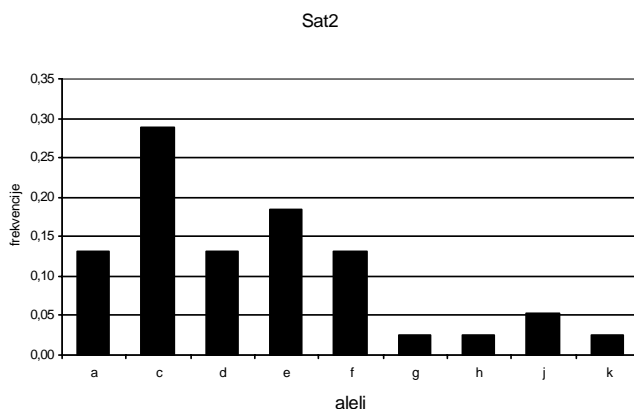
## РЕЗУЛТАТИ И ДИСКУСИЈА

Међу анализираним микросателитским локусима, сва три су показала полиморфност у популацијама зеца Војводине, и откривено је 9 алела у *Sat2* локусу, 7 алела у *Sat5* локусу и 10 алела у *Sat12* локусу, што укупно чини 26 алела у три локуса.

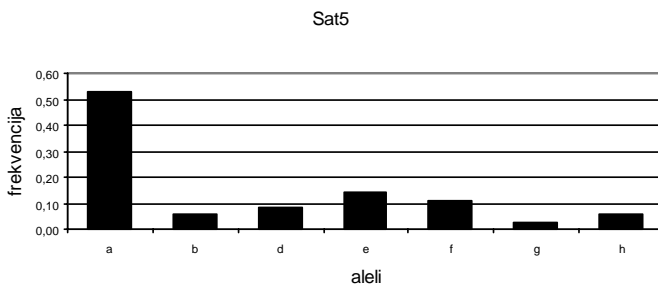
Приближна величина алела, нађених у локусу *Sat2*, кретала се између 224bp и 264bp. Амплификовани алели *Sat5* локусу били су приближне дужине од 190bp до 224bp. Најмању величину показали су алели локуса *Sat12*, приближне дужине од 108 до 152bp.

Mougel et al. (1997) су анализом истих микросателитских локуса код кунућа уочили мањи број алела по локусу, и то по 4 у *Sat2* и *Sat12* локусима, и 6 у *Sat5* локусу. Опсег величина алела по локусу такође је био мањи, и кретао се од 241bp до 253bp у *Sat2*, од 206bp до 234bp у *Sat5* и између 122bp и 138bp у *Sat12* локусу. Andersson et al. (1999), поред показане примене анализе ова три микросателитска локуса код врста *L. europaeus* и *L. timidus*, утврдили су приближан број алела и величину алела као и у популацији зеца Војводине. У локусу *Sat2* детектовано је 9 алела, величине од 227bp до 255bp, 7 алела у *Sat5* локусу, величине између 197bp и 221bp и 8 алела *Sat12* локуса, величине од 106bp до 138bp (Andersson et al., 1999) у популацијама зеца Скандинавије. У популацији зеца Војводине, нађен је већи број алела и алели веће дужине, у односу на исте микросателитске локусе код врсте *Oryctolagus cuniculus*.

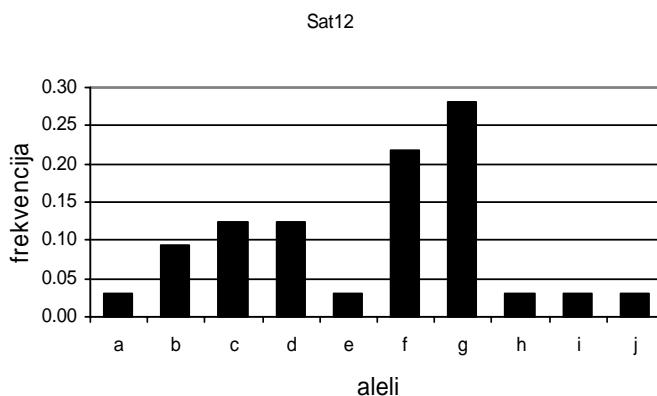
У локусу *Sat2* највећу фреквенцију имао је алел **c** (28,9%), приближне дужине 242bp, док су најмању фреквенцију 2,6% имали алели **g**, **h** и **k** (Сл. 1.). У локусу *Sat5*, међу седам уочених алела, најчешћи је био алел **a** (52,8%), приближне дужине 190bp, док је најмање био заступљен алел **g** (2,8%) (Сл. 2). Алел **g** (приближне дужине 136bp) био је најчешће заступљен у локусу *Sat12*, са фреквенцијом 28,1%, док су алели **h**, **и** и **ј** имали најмању фреквенцију (3,1%) (Сл. 3).



Слика 1. Фреквенције алела *Sat2* локуса у популацији зеца Војводине



Слика 2. Фреквенције алела *Sat5* локуса у популацији зеца Војводине



Слика 3. Фреквенција алела *Sat12* локуса у популацији зеца Војводине

Хетерозиготи су пронађени за сва три локуса и вредности уочене хетерозиготности по локусу кретале су се од 0,222 (*Sat5*) до 0,813 (*Sat12*) (Таб. 1). Сумирањем резултата генетичке структуре јединки дефинисана је просечна уочена хетерозиготност у популацији зеца Војводине  $H_o=0,520$ . Анализа изозимске варијабилности 77 јединки популације зеца Војводине дефинисала је вредност просечне уочене хетерозиготности  $H_o=0,056$  (Davidović, 2003), што је чак десет пута

мања вредност у односу на ово истраживање, на много мањем броју јединки. Овако сигнификантна разлика последица је примене молекуларних маркера изразито веће резолуције у односу на биохемијско-генетичке маркере, чиме је могуће открити промене у структури ДНК у нивоу инсерција, и делеција поновака нуклеотида.

Анализа полиморфности *Sat12* локуса у популацији зеца Скандинавије открила је  $H_0=1$ , а ниже вредности за *Sat2* локус  $H_0=0,611$  и *Sat5* локус  $H_0=0,333$  (Andersson et al., 1999). Иако су нађене вредности уочене хетерозиготности у овом раду биле ниже, потврђено је да највећу вредност показује локус *Sat12*, а следе *Sat2* и *Sat5* (Таб. 1).

Табела 1. Број алела, уочена ( $H_0$ ) и очекивана ( $H_e$ ) хетерозиготност за три микросателитска локуса у популацији зеца Војводине

Локус	Број алела	$H_0$	$H_e$
<i>Sat2</i>	9	0,526	0,848
<i>Sat5</i>	7	0,222	0,695
<i>Sat12</i>	10	0,813	0,855
<b>Средња вредност</b>	<b>8,67</b>	<b>0,520</b>	<b>0,799</b>

У даљој анализи Andersson et al. (1999) уочено је одступање фреквенција генотипова у односу на Hardy-Weinberg-ов еквилибријум за локусе *Sat2* и *Sat5*. Применом исте анализе, на основу резултата добијених у овом раду, одступање фреквенција генотипова у односу на Hardy-Weinberg-ов еквилибријум на нивоу значајности  $p<0,05$  нађено је за локус *Sat5*. Потврђено смањење хетерозиготности у наведеном локусу потенцијална је последица присутног inbreeding-a у популацији или Wahlund-ов ефекат. Уколико се узме у обзир да је вредност генетичке диференцијације, према параметрима F статистике, износила  $F_{ST}=0,329$ , добијена вредност указује на велику генетичку диференцијацију у популацији зеца Војводине, што елиминише тезу о присутном inbreeding-u. Штавише, сличан модел није уочен за друга два локуса, те ова претпоставка не може да се примени на анализирану популацију. Wahlund-ов ефекат, који се јавља уколико анализа обухвати јединке две или више популација, и третира их као јединке исте популације, потенцијалан је узрок смањене хетерозиготности, али потврда ове тезе захтева даљу анализу већег броја јединки. Трећи могући узрок ове појаве, који су разматрали и Andersson et al. (1999), јесте могућност мутације у региону везивања прајмера на једном од хомологих хромозома, чиме се уствари региструје нулти алел, те се такве јединке означавају као хомозиготне, због присуства једне траке на гелу.

Овим радом показано је да је много већи степен генетичке варијабилности откривен применом микросателитских молекуларних маркера, у односу на раније анализе алозимске варијабилности популације зеца Војводине. Одабрани микросателитски локуси показали су се примењивим у откривању генетичке структуре популације зеца, и анализа већег броја јединки може омогућити дефинисање субпопулационе структуре ове врсте на ширем ареалу.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Andersson, A.C., C. G. Thulin, H. Tegelström (1999) Applicability of rabbit microsatellite primers for studies of hybridisation between an introduced and a native hare species. *Hereditas* 130: 309-315.
2. Davidović, M. (2003) Molekularno genetička analiza populacija zeca (*Lepus europaeus*, Pallas) u Vojvodini. Magistarska teza, Biološki fakultet, Beograd.
3. Đan, M., D. Obreht, Lj. Vapa (2005) Polymorphism of mtDNA regions in brown hare (*Lepus europaeus*) populations from Vojvodina (Serbia & Montenegro), pp. 84-85. Abstract book of XXXIV Congress of International Union of Game Biology, Hannover, Germany.

4. Hartl, G.B., F. Suchentrunk, K. Nadlinger, R. Willing (1993) An integrative analysis of genetic differentiation in the brown hare *Lepus europaeus* based on morphology, allozymes and mitochondrial DNA. *Acta theriologica* 38, Suppl. 2: 33-57.
5. Kocher, T.D., W. K. Thomas, A. Meyer (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of National Academy of Sciences USA*: 6106-6200.
6. Mamuris, Z., A. I. Sfougaris, C. Stamatis (2001) Genetic structure of Greek brown hare (*Lepus europaeus*) populations as revealed by mtDNA RFLP-PCR analysis implications for conserving genetic diversity. *Biological Conservation* 101: 187-196.
7. Mougél, F., J. C. Mounolou, M. Monnerot (1997) Nine polymorphic microsatellite loci in the rabbit, *Oryctolagus cuniculus*. *Anim. Genet.* 28: 58-59.
8. Sambrook, J. F., D. W. Russell (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
9. Swofford, D. L., R. B. Selander (1989) BIOSYS 1. A computer program for the analysis of allelic variation in population genetics and biochemical systematics. Release 1.7. Users manual. Champaign: Illinois Natural History Survey.
10. Suchentrunk, F., C. Jaschke, A. Haiden (2001) Little allozyme and mtDNA variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from New Zealand and Britain – A legacy of bottlenecks? *Mamm. biol.* 66: 48-59.
11. Suchentrunk, F., Z. Mamuris, A. Sfougaris, C. Stamatis (2003) Biochemical genetic variability in brown hares (*Lepus europaeus*) from Greece. *J. Mamm. Biol.* 38, Vol. 3: 21-33.
12. Vapa, Lj., M. Davidović, D. Obreht, M. Vapa, V. Šelmić (2002a) Nuclear gene pool diversity in brown hare population in Vojvodina (Yugoslavia), p. 58. Abstracts 2002 World Conference on Resource Modelling “Modelling Biotic and Natural Resources in a Changing Planet”, Lesvos, Greece.
13. Vapa, Lj., D. Obreht, M. Vapa, V. Šelmić (2002b) Genetic variability in brown hare (*Lepus europaeus*) populations in Yugoslavia. *Z. Jagdwissenschaft*, Vol. 48: 261-266
14. Vapa, M., V. Šelmić (1997) Sadašnje stanje i budućnost evropskog zeca, pp. 33-45. U: *Zbornik radova: Zec i jarebica u savremenim agroekosistemima*. V. Šelmić (ed.) Simpozijum iz lovstva, Novi Sad.

Примљено: 10.11.2005.

Одобрено: 5.10.2006.