

## ГЕНЕТИЧКИ ДИВЕРЗИТЕТ ДИВЉИХ СВИЊА У ЛОВИШТИМА ВОЈВОДИНЕ

Ђан Михајла, Величковић Невена, Обрехт Драгана, Вапа Љиљана

Депарتمان за биологију и екологију, Природно-математички факултет, Универзитет у  
Новом Саду, Трг Доситеја Обрадовића 2, 21000 Нови Сад, Србија

### Abstract

**DJAN, Mihajla, Nevena VELIČKOVIĆ, Dragana Obreht, Ljiljana VAPA: GENETIC DIVERSITY OF WILD BOARS IN HUNTING AREAS IN VOJVODINA.** [Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, University of Novi Sad, Trg Dositeja Obradovica 2, 21000 Novi Sad, Serbia]

The wild boar is an important wildlife species, in both economical and ecological terms. Its widespread recovery across Europe during the last 50 years has raised concerns about the management of this species. Knowledge of species genetic diversity and structure is the basis for adequate wildlife management and conservation. The primary objective of this study was an estimation of genetic diversity of wild boar populations in hunting areas in Vojvodina. Muscle tissue samples were collected, and samples were pooled to three geographical regions: Backa, Banat and Srem, subsequently termed “populations”. The analyzed sample included individuals of both sexes and different age classes. Five microsatellite loci, previously shown as high polymorphic, were selected. A total of 54 different alleles were found at the five analysed loci (from 4 to 18; mean 10.8 alleles per locus). The observed heterozygosity ( $H_o$ ) values at each locus were between 0.42 and 0.77 with a mean of 0.61. Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium was found due to significant heterozygote deficiency detected for three of five loci, and for Backa and Srem populations. The overall  $F_{IS}$  in the population was 0.1519, and the effective number of migrants based on private alleles was 2.596, indicating fair amount of gene flow between all populations.

**Key words:** microsatellite, wild boar, genetic diversity

### Сажетак

Дивља свиња је економски и еколошки веома важна врста дивљачи. С обзиром на широко распрострањење и експанзију широм Европе у последњих 50 година јавила се потреба за развојем стратегије менаџмента ове врсте. Познавање генетичког диверзитета и структуре врсте је основа за развој адекватног менаџмента природних популација и конзервацију. Циљ овог рада био је процена генетичког диверзитета у популацијама дивљих свиња у ловиштима Војводине. Сакупљени су узорци мишићног ткива дивљих свиња, и груписани у три географска региона: Бачка, Банат и Срем, третираних као “популације”. Узорак су чиниле јединке оба пола и различитих старосних група. За анализу је одабрано пет микросателитских локуса, за које је претходно утврђено да показују висок ниво полиморфности. У пет анализираних локуса нађено је 54 различита алела (од 4 до 18 алела; просечно 10,8 алела по локусу). Уочена хетерозиготност по локусу кретала се од 0,42 до 0,77, са просечном вредности 0,61. Уочено је одступање од Харди-Вајнбергове равнотеже, услед статистички значајног смањења хетерозигота у три од пет локуса, као и у популацијама Бачке и Срема. Коефицијент инбридинга  $F_{IS}$  у анализираном узорку био је 0,1519, а ефективан број миграната израчунат на основу јединствених алела 2,596, што указује на релативно велик проток гена између свих популација.

**Кључне речи:** микросателити, дивља свиња, генетички диверзитет

### УВОД

Дивља свиња је најраспрострањенија врста дивљих папкара у Србији и економски и еколошки веома важна врста дивљачи. Ово је аутохтона врста која се одликује изузетном прилагођавању станишту и распрострањена је широм Европе.

С обзиром на широко распрострањење и експанзију у току последњих 50 година јавила се потреба за развојем стратегије менаџмента ове врсте.

Квартарне климатске осцилације, а нарочито последња глацијација и наредни топли период, довели су до видљивих последица на нивоу генетичке варијабилности неких врста (Pettit и сар., 2003). Током последњег леденог доба, вечити лед је скоро изоловао Иберију, Италију и Балкан (Hewitt, 2000) и можемо предпоставити да су након глацијације дивље свиње реколонизовале централне и северне шуме Европе и тако достигле континуирану и стабилну дистрибуцију коју модификују само сезонске варијације. У погледу европске дивље свиње десила су се још најмање четири процеса која су утицала на генетичку варијабилност и повезана су са активношћу човека: доместификација у неолиту; пролазак кроз неколико уских грла у различитим областима; демографска експанзија након Другог светског рата; неконтролисана интродукције индивидуа, са циљем да се обнове популације у областима где су дивље свиње изумрле или су присутне у малом броју.

На основу анализе микросателитских маркера Vernesi и сар. (2003) су били први који су покушали да квантификују генетички утицај на демографски пад и догађаје транслокације дивљих свиња у Италији. Ови аутори наглашавају да су микросателити као молекуларни маркери важни за развој стратегија конзервације и менаџмента. Ferreira и сар. (2008) су применом микросателита и на основу података о дистрибуцији дивљих свиња потврдили да су дивље свиње у Португалији пролазиле кроз неколико уских грла, што подразумева експанзивно ширење врсте из рефугијума, који су некада постојали, на територију читаве Португалије. Митохондријални и нуклеарни маркери примењени су у анализи постгласијалног распрострањења дивљих свиња у Европи, процеса доместификације и хибридације дивље и домаће свиње, проблема прекомерног изловљавања и демографског пада у популацијама дивље свиње, као и у анализи нагле експанзије популација широм Европе и процеса неконтролисана транслокације индивидуа (Scandura и сар., 2008). Резултати овог истраживања су показали да се код европске дивље свиње уочава модел постгласијалне демографске експанзије, са изузетком дивљих свиња у Италији код којих је уочено да се прегласијални диверзитет задржао у високом проценту. Осим тога, аутори су закључили да је неопходно анализирати већи број узорака са Иберијског и Балканског полуострва са циљем да се утврди који рефугијум је највише утицао на генетички диверзитет који данас уочавамо у популацијама дивљих свиња широм Европе.

И поред чињенице да је познавање генетичког диверзитета и структуре врсте основа за развој адекватног менаџмента природних популација и конзервацију, постоји мало података о генетичкој варијабилности дивљих свиња у Србији и региону (Ћан и сар., 2008; Величковић и сар., 2010). Циљ овог рада био је процена генетичког диверзитета у популацијама дивљих свиња у ловиштима Војводине.

## МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

За испитивање генетичког диверзитета у популацијама дивљих свиња Војводине сакупљени су узорци мишићног ткива 67 јединки, и груписани у три географска региона: Бачка, Банат и Срем, третиралих као "популације". Узорак су чиниле јединке оба пола и различитих старосних група. Укупна ДНК из мишићног ткива изловљених јединки изолована је у поступку стандардне протеиназа К дигестије праћене фенол-хлороформ-изоамилалкохол екстракцијом (Sambrook и Russell, 2001). За анализу је одабрано пет микросателитских локуса (S0068, S0005, SW251, SW2429, SW857) за које је претходно утврђено да показују висок ниво полиморфности. Реакције амплификације микросателитских локуса рађене су у волумену од 20  $\mu\text{l}$ , са 10 pmol сваког пражмера, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 1xTaq пуфер, 1,5 U Taq ДНК полимеразе, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, и 25 ng геномске ДНК. Програм амплификације састојао се из уводне денатурације на 92°C 2

минута, потом 30 циклуса: денатурација на 94°C 30s, позиционирање прајмера на  $T_a$  30s, и полимеризација на 72°C 30 s, и финалне екстензије на 72°C 5 минута (Ro h r e g и с а р., 1994). Умножени PCR продукти анализирани су на стандардним денатуришућим 6% полиакриламидним геловима.

У анализи полиморфности микросателитских локуса коришћен је програмски пакет GENEPOP version 3.1d (R a y m o n d и R o u s e t t, 1995). У циљу сагледавања генетичке варијабилности унутар и између испитиваних популација у оквиру овог програмског пакета одређени су следећи параметри: број и фреквенција алела за сваки испитивани locus, очекивана и уочена хетерозиготност сваког локуса,  $F_{IS}$  вредност, тест за утврђивање дисеквилибријума генотипске везаности (*genotypic linkage disequilibrium test*), тестови за утврђивање дефицита и повећања хетерозиготности по локусу за сваку популацију применом Markov chain метода (10000 демеморизација, 100 batches, 5000 итерација) и тест за утврђивање да ли постоји укупно смањење хетерозиготности применом Markov chain метода (10000 демеморизација, 40 batches, 2000 итерација). Сви нивои сигнификантности су одређени за  $p < 0,05$ , односно  $p < 0,01$  након Бониферонијеве корекције  $p$  вредности (R i c e, 1989).

## РЕЗУЛТАТИ

Свих пет анализираних микросателитских локуса успешно су амплификовани и проценат успешности амплификације износио је од 73 до 97%. У сваком локусу и поред понављаних и модификованих услова амплификације није добијен продукт за мањи или већи број јединки, што се може објаснити присуством нулног алела који се најчешће јавља услед мутације прајмер везујућег региона микросателита, али не може се искључити ни неки други узрок инхибиције реакције амплификације у појединим узорцима. Сви локуси били су укључени у статистичку анализу с обзиром да ни један пар микросателита није показао значајну везаност.

У пет анализираних локуса нађено је 54 различита алела. Највећи број алела уочен је у локусу S0068 (18), док је најмањи број алела (4) нађен у локусу SW251. Просечан број алела,  $N_A$ , за све локусе износио је 10,8.

Уочена хетерозиготност по локусу кретала се од 0,42 за locus S0068 до 0,77 у лoкyсима SW2429 и SW857, са просечном вредности 0,61 (Табела 1). Очекивана хетерозиготност по локусу износила је од 0,62 за locus S0005 до 0,79 у лoкyсима S0068 и SW857, са просечном вредности 0,72. Уочено је одступање од Харди-Вајнбергове равнотеже, услед статистички значајног смањења хетерозигота у три (S0068, S0005 и SW2429) од пет локуса, као и у популацијама Бачке и Срема. Коэффициент инбридинга  $F_{IS}$  у анализираном узорку био је +0,152, а ефективан број миграната израчунат на основу јединствених алела 2,596.

**Табела 1.** Број алела, уочена и очекивана хетерозиготност и  $F_{IS}$  вредност у испитиваним популацијама дивљих свиња по локусима

| Маркер                  | Број алела<br>$N_A$ | Уочена хетерозиготност<br>$H_o$ | Очекивана<br>хетерозиготност<br>$H_e$ | $F_{IS}$ |
|-------------------------|---------------------|---------------------------------|---------------------------------------|----------|
| S0068                   | 18                  | 0,42                            | 0,79                                  | + 0,483  |
| S0005                   | 8                   | 0,51                            | 0,62                                  | + 0,264  |
| SW251                   | 4                   | 0,58                            | 0,65                                  | + 0,067  |
| SW2427                  | 15                  | 0,77                            | 0,75                                  | + 0,175  |
| SW857                   | 9                   | 0,77                            | 0,79                                  | - 0,152  |
| Просек за све<br>локусе | 10,8                | 0,61                            | 0,72                                  | + 0,152  |

## ДИСКУСИЈА

Сви локуси у популацијама дивљих свиња у лoвиштима Војводине показали су одговарајући ниво полиморфизма. У анализи генетичке варијабилности популација

дивљих свиња Португалије просечан број алела по локусу,  $N_A=10,17$ , био је сличан као у нашем истраживању (Ferreira и сар., 2008), док је код дивљих свиња Италије и Мађарске уочен нешто већи број алела  $N_A=12,11$  (Vernesi и сар., 2003). У популацијама дивљих свиња Португалије (Ferreira и сар., 2008) уочена је нешто већа хетерозиготност ( $0,627$ ), као и у популацијама из Италије и Мађарске  $H_o=0,662$  (Vernesi и сар., 2003). У анализи већег броја европских популација дивљих свиња нађена је мања хетерозиготност  $H_o=0,57$  (Scandura и сар., 2008), а иста вредност хетерозиготности уочена је у популацији дивљих свиња са подручја Подунавље-Подравље (Величковић и сар., 2010). Поређењем резултата о просечном броју алела и уочене хетерозиготности може се закључити да је ниво генетичке варијабилности дивљих свиња у Војводини сличан другим популацијама ове врсте широм Европе. Уочено је одступање од Харди-Вајнбергове равнотеже, услед статистички значајног смањења хетерозигота у три од пет локуса, као и у популацијама Бачке и Срема. Позитивне вредности  $F_{IS}$  коефицијента указују на то да је инбридинг главни узрок уоченог дефицита хетерозигота. Осим тога, на повећање вредности инбридинга могли су да утичу и нулти алели који су пронађени у свим анализираним локусима. Ефективан број миграната израчунат на основу јединствених алела указује на релативно велик проток гена између свих популација. Дефицит хетерозигота такође је уочен у популацијама дивљих свиња Италије (Vernesi и сар., 2003) и Португалије (Ferreira и сар., 2006).

## ЗАКЉУЧАК

Циљ овог рада била је процена генетичког диверзитета у популацијама дивљих свиња у ловиштима Војводине. На основу анализе пет високо полиморфних микросателитских маркера може се закључити да је ниво генетичке варијабилности дивљих свиња у Војводини сличан другим популацијама ове врсте широм Европе. Резултати добијени у овом истраживању представљају једне од првих резултата анализе генетичког диверзитета дивљих свиња на подручју Републике Србије и имају непроцењиви значај за будући развој стратегија менаџмента и конзервације ове врсте. Оно што је неопходно урадити у будућности је анализа већег броја јединки са различитих локалитета и примена додатних молекуларних маркера у циљу што прецизније квантификације генетичког диверзитета дивљих свиња у региону.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Djan, M., N. Velickovic, D. Obreht, M. Gagrčin, M. Beukovic & Lj. Vapa (2008): Microsatellite variability within captive wild boar population. In: Nahlik A (ed): *Abstracts of 7th International Symposium on Wild Boar (Sus scrofa) and on sub-order Suiformes*: 77. University of West Hungary, Sopron.
2. Ferreira, E., L. Souto, A.M.V.M. Soares, C. Fonseca (2006): Genetic structure of the wild boar (*Sus scrofa* L.) population in Portugal. *Wildl. Biol. Pract.* 2: 17-25..
3. Ferreira, E., L. Souto, A.M.V.M. Soares & C. Fonseca (2008): Genetic structure of the wild boar population in Portugal: Evidence of a recent bottleneck. *Mamm. Biol.* 74 (4): 274-285.
4. Hewitt, G. (2000): The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
5. Petit, R.J., I. Aguinagalde, J-L. de Beaulieu (2003): Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563-1565.
6. Raymond, M., F. Rousset (1995): GENEPOP (version 3.1d): population genetic software for exact tests and ecumenism. *J Hered.* 86: 248-249.
7. Rice, W.R. (1989): Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43: 223-225.

8. Rohrer, G.A., L.J. Alexander, J.W. Keele, T.P. Smith, C.W. Beattie (1994): A microsatellite linkage map of the porcine genome. *Genetics* 136: 231-245.
9. Sambrook, J.F., D.W. Russel(2001): *Molecular Cloning: A laboratory Manual*. 3<sup>rd</sup> Ed., Cold Spring Harbor, Laboratory Press, USA .
10. Scandura, M., L. Iacolina, B. Crestanello, E. Pecchioli, M.F. Benedetto, V. Russo, R. Davoli, M. Apollonio, G.Bertorelle(2008): Ancient vs. Recent processes as factors shaping genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable. *Molecular Ecology* 17: 1745-1762.
11. Veličković N., M. Djan, M. Zorić, D. Obreht, M. Gagrčin, Lj. Vapa(2010): An assessment of the genetic diversity in the wild boar population from the Podunavlje-Podravljje hunting area. *Arch. Biol. Sci.*, 62 (3): 807-810.
12. Vernesi, C., B. Crestanello, E. Pecchioli, D. Tartari, D. Caramelli, H. Hauffe, G. Bertorelle(2003): The genetic impact of demographic decline and reintroduction in the wild boar (*Sus scrofa*): A microsatellite analysis. *Molecular Ecology* 12: 585-595.

Примљено: 06. 12. 2010.

Одобрено: 19. 07. 2011.