

UDC 575.111:636.32/.38(497.11)
Originalni naučni rad DOI: 10.5937/zaoardz25014S

PRIMENA GENOMSKE ANALIZE U PROCENI GENETSKE RAZNOLIKOSTI U POPULACIJI CIGAJA RASE OVACA U REPUBLICI SRBIJI

Dragan Stanojević^{1*}, Nikolija Gligović¹, Vladan Bogdanović¹, Nikola Raguz²,
Nina Moravčikova³, Radovan Kasarda⁴, Krstina Zeljić- Stojiljković⁴

Prof. dr Dragan Stanojević, vanredni profesor, Poljoprivredni fakultet
Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

Ms. sci Nikolija Gligović, asistent, Poljoprivredni fakultet Univerziteta u
Beogradu, Beograd, Srbija

Prof. dr Vladan Bogdanović, redovni profesor, Poljoprivredni fakultet
Univerziteta u Beogradu, Beograd, Srbija

Prof. dr Nikola Raguz, redovni profesor, Fakultet agrobiotehničkih znanosti
Sveučilišta u Osijeku, Osijek, Hrvatska

Prof. dr Nina Moravčikova, vanredni profesor, Poljoprivredni Univerzitet, Nitra,
Slovačka

Prof. dr Radovan Kasarda, redovni profesor, Poljoprivredni Univerzitet, Nitra,
Slovačka

Ms. sci Krstina Zeljić Stojiljković, istraživač saradnik, Institut za stočarstvo,
Beograd, Srbija

*stanojevic@agrif.bg.ac.rs

Kratak sadržaj

Cilj istraživanja bio je da se primenom genomike i bioinformatičkog pristupa proceni genetska raznolikost i nivo inbridinga u populaciji cigaja ovaca gajenih u Republici Srbiji. Istraživanjem je obuhvaćeno 26 grla oba pola (26 ovaca i 2 ovna) i oba soja (somborska i čokanska cigaja). Biološki materijal za izolaciju DNK uzet je pomoću nazalnog brisa. Nakon izolacije DNK, urađena je genotipizacija uzoraka pomoću Illumina platforme OvineSNP50 BeadChip V3. Posle genotipizacije urađena je standardna kontrola kvaliteta u programsku paketu PLINK v1.9 što je rezultiralo da se iz analize isključi je 8936 SNP, te je konačan set podataka obuhvatao genotipske informacije za 47236 SNP markera kod 26 jedinki. Za procenu nivoa inbridinga u populaciji korišćen je metod genomskog inbridinga (F_{ROH}) koji meri udeo autozomalnog genoma jedinke. Za detekciju ROH ostrva korišćen je paket detectRUNS koji se koristi za skeniranje genoma za homozigotne ili heterozigotne segmente koristeći metod uzastopnih SNP-ova. Analizom celokupnog genoma ovaca rase cigaja utvrđeno je

postojanje čak 2115 ROH ostrva. Najveći broj ROH ostrva očekivano je utvrđen u klasi dužine 1-2 Mbp (870), dok je najmanji broj utvrđen u klasi većoj od 16 Mbp i iznosio je 59. Kada je reč o hromozomima najveći broj ROH ostrva pronađen je na hromozomu 1, čak 289 i njegova pokrivenost ROH ostrvima iznosila je 13,66%. Nešto nižu pokrivenost, ali dalje jako visoku imali su hromozomi 2 (241 ROH sa pokrivenošću od 11,39%) i 3 (228 ROH sa pokrivenošću 10,78%). Utvrđena vrednost individualnog F_{ROH} imala je svoje vrednosti od 0,012 do čak 0,321. Prosečna vrednost F_{ROH} iznosila je 0,14. Utvrđena bvrednost F_{ROH} ukazuje na umereno visok nivo genetskog inbridinga, što nosi ozbiljne implikacije za očuvanje genetske raznolikosti, zdravlja i održivost ove populacije.

Ključne reči: genetska raznolikost, genomika, F_{ROH} , SNP, cigaja

UVOD

Ovčarska proizvodnja se svrstava u najznačajnije segmente stočarske proizvodnje ne samo u Evropi, nego i u čitavom svetu. Ovce spadaju među vrste koje su prve domestikovane. Prema istraživanju Zeder-a (2008) ovce su domestikovane pre oko 10500 godina u delu jugositočne Anadolije. Dalje se ovce, kao domestikovana vrsta, šire preko Balkana i dunavskim basenom i mediteranskom obalom u ostale delove Evrope. Ovce kao vrstu karakteriše odlična prilagodljivost prema različitim agroekološkim uslovima gajenja te se gaje od tropskih do subpolarnih oblasti naše planete. Zbog svega toga danas u svetu je identifikovano preko 1300 rasa ovaca, od čega najveći deo čine lokalne rase prilagođene vrlo specifičnim uslovima gajenja (Ganbold i sar., 2019).

Savremena intenzivna poljoprivreda dovodi do specijalizacije proizvodnje, što u stočarskoj proizvodnji znači gajenje visokoproduktivnih grla dobijenih strogom i planskom selekcijom u tačno definisanim tehnološkim uslovima. Najveći broj lokalnih rasa ne može da parira tako selekcionisanim genotipovima i biva potisnut. Posledično smanjenje broja grla dovodi do smanjenja efektivne veličine populacije. Takav selekcijski pritisak praćen smanjenjem broja aktivno korišćenih rasa bi mogao u budućnosti dovesti do "erozije gena" i nepovratnog gubitka raznolikosti lokalnih autohtonih populacija životinja, koje u sebi nose jedinstvene alele, koji su odgovorni za specifične morfološke i fiziološke karakteristike, koje su ih razlikovale od kosmopolitskih rasa visokih proizvodnih performansi u različitim pravcima (npr. prilagođavanje u surovim uslovima životne sredine).

Raznolikost životinjskih genetičkih resursa (AnGR) ima ogroman uticaj na funkcionalnost i održivost sistema proizvodnje hrane i značajno doprinosi zdravlju, ishrani i sigurnosti populacije kroz širok dijapazon proizvoda životinjskog porekla. Na nacionalnom, kao i na međunarodnom nivou, ulažu se značajni naponi kako bi se sačuvali svi izvori hrane za ljude i poljoprivredu, a u

slučaju lokalnih resursa ne samo zato što su jedinstveni, već čak i više, jer su deo regionalnog bogatstva i integrišući faktor kulturnog nasleđa nacija.

Republika Srbija raspolaže velikim brojem autohtonih rasa i sojeva domaćih životinja. Prema Listi autohtonih rasa domaćih životinja i ugroženih autohtonih rasa (Službeni Glasnik Republike Srbije 104/2021-28) u našoj zemlji se 83 autohtone rase domaćih životinja, od čega najveći broj čine rase golubova, čak 50. Kada je reč o autohtonim rasama ovaca u Republici Srbiji se gaje dve rase: pramenka sa osam sojeva i cigaja sa dva soja. Cigaja rasa ovaca se dominantno gaji u ravničarskom delu naše zemlje (AP Vojvodina), što je dominantno i uticalo na njene proizvodne i morfološke karakteristike. Smatra se da poreklo vodi iz Male Azije i da je u Vojvodinu došla iz Rumunije u 18. veku (Grittner i sar., 2021) Spada u grupu krupnijih rasa ovaca, jake konstitucije i sa trojnim smerom proizvodnje: mleko, meso i vuna. Prema rezultatima dosadašnjih istraživanjima ne spada u grupu ugroženih genotipova u našoj zemlji.

Razvoj molekularne gentike u poslednjim decenijama XX i prvim decenijama XXI veka omogućio je uvid u naslednu osnovu i omogućio mapiranje genoma i bolje razumevanje procesa naslednosti i promenljivosti. Ključni momenat za uspešnu primenu genomike u ovčarstvu jeste 2012. godina kada je genom ovce u potpunosti sekvenciran i publikovan od strane ISGC (Međunarodnog konzorcijuma za genomiku ovaca) (Michailidou i sar., 2018). Trenutno su genomski alati postali važan deo strategija očuvanja lokalnih autohtonih AnGR, jer omogućavaju identifikovanje populacija ili određenih životinja sa jedinstvenim osobinama, koje se tada mogu sve više zaštititi. Pored toga primena genomike i bioinformatike nam omogućava precizniji uvid ključne aspekte za očuvanje autohtonih rasa domaćih životinja, poput nivoa inbridinga i efektivne veličine populacije.

Cilj ovog istraživanja jeste primena genomike i bionformatičkog pristupa u proceni genetske raznolikosti populacije ovaca rase cigaja kako bi se stekla realnija slika o statusu i ugroženosti ove rase u našoj zemlji.

MATERIJAL I METODE

Istraživanjem je obuhvaćeno 26 grla oba pola (26 ovaca i 2 ovna) i oba soja (somborska i čokanska cigaja). Uzorci su uzeti iz dva stada u Banatu. Grla su birana slučajnim metodom. Biološki materijal za izolaciju DNK uzet je pomoću nazalnog brisa. Nakon izolacije DNK, urađena je genotipizacija uzoraka pomoću Illumina platforme OvineSNP50 BeadChip V3 (Illumina Inc, San Diego, California), koja je determinisala 56175 SNP sa prosečnim rastojanjem od 46 kb između SNP.

Nakon genotipizacije urađena je standardna kontrola kvaliteta u programsku paketu PLINK v1.9 (Purcell i sar. 2007). Kontrola kvaliteta genetskih podataka obuhvatila je filtriranje jedinki i SNP markera sa uspešnošću pozivanja većom od 90%, kao i SNP markera sa frekvencijom minornog alela većom od 1%. Nakon ovog postupka iz analize je isključeno je 8936 SNP. Konačna baza

podataka obuhvatala je genotipske informacije za 47236 SNP markera kod 26 jedinki.

Za procenu nivoa inbridinga u populaciji korišćen je metod genomskog inbridinga (F_{ROH}) koji meri udeo autozomalnog genoma jedinke koji se nalazi unutar homozigotnih segmenata (ROH – Runs of Homozygosity). Ti segmenti predstavljaju regije u genomu gde su oba hromozoma ili njihovi segmenti nasleđeni identično, odnosno od zajedničkog pretka. Za detekciju ROH ostrva korišćen je paket detectRUNS koji se koristi za skeniranje genoma za homozigotne ili heterozigotne segmente koristeći metod uzastopnih SNP-ova (Marras i sar., 2015). Parametri koji su korišćeni u analizi su minimalna dužina odsečka 1mbp, veličina kontrolnog prozora 15 SNP i broj nedostajućih SNP bio je 0. Dužina ROH strva je posmatrana u 5 klasa: 1-2 Mbp (vrlo udaljeni inbriding preko 20 generacija do zajedničkog pretka), 2-4 Mbp (udaljeni inbriding 10-20 generacija do zajedničkog pretka), 4-8 Mbp (srednje blizak inbriding 5-10 generacija do zajedničkog pretka), 8-16 Mbp (blizak inbriding 3-5 generacija do zajedničkog pretka) i odsecci veći od 16Mbp (vrlo blizak inbriding 1-3 generacije do zajedničkog pretka).

Individualni genomski inbriding izračunat je uz pomoć obrasca:

$$F_{ROH} = \frac{\sum_{i=1}^n \text{dužina ROH}}{\text{Ukupna dužina genoma (Mbp)}}$$

dok se genomski inbriding na nivou populacije računa kao prosečna vrednost F_{ROH} za sve individue u populaciji.

REZULTATI I DISKUSIJA

Analizom celokupnog genoma 26 individua rase cigaja gajenih u Republici Srbiji utvrđeno je postojanje čak 2115 ROH ostrva. Taj broj je znatno veći u odnosu na broj ROH ostrva utvrđenih u populaciji vlaško-vitorogog soja pramenke u gajenog u Republici Srbiji koji su utvrdili Gligović i sar. (2023). Najveći broj ROH ostrva je utvrđen očekivano u klasi dužine 1-2 Mbp (870) dok je najmanji broj utvrđen bio u klasi većoj od 16 Mbp i iznosio je 59. Kada je reč o hromozomima najveći broj ROH ostrva pronađen je na hromozomu 1, čak 289 i njegova pokrivenost ROH ostrvima iznosila je 13,66%. Nešto nižu pokrivenost, ali i dalje jako visoku imali su hromozomi 2 (241 ROH sa pokrivenošću od 11,39%) i 3 (228 ROH sa pokrivenošću 10,78%). Ovako visoka homozigotnost na ova tri hromozoma može biti posledica selekcije sprovedne od strane odgajivača ili prilagođavanja specifičnim agroekološkim uslovima, te u narednim istraživanjima treba im posvetiti posebnu pažnju.

Prosečna dužina ROH ostrva kao i udeo u ukupnom ROH utvrđeni u istraživanju prema klasama prikazani su u tabeli 1:

Klasa ROH	Prosečna dužina (Mbp)	Prosečan udeo (%)
1-2 Mbp	1.423	41
2-4 Mbp	2.813	32
4-8 Mbp	5.602	16
8-16 Mbp	10.945	8
>16Mbp	22.681	3

Utvrđena vrednost individualnog F_{ROH} imala je svoje vrednosti od 0,012 do čak 0,321. Prosečna vrednost F_{ROH} iznosila je 0,14. Znatno niže vrednosti u svom istraživanju utvrdili su Gligović i sar. (2023) u populaciji vlaško-vitoroge pramenke u Srbiji, kao i Držajić i sar. (2022) u populacijama autohtonih rasa ovaca gajenih u Republici Hrvatskoj. Ovako visoka vrednost F_{ROH} utvrđene u populaciji cigaja rase ovaca gajenih u Republici Srbiji ukazuje na umereno visok nivo genomskog inbridinga, što nosi ozbiljne implikacije za očuvanje genetske raznolikosti, zdravlja i održivost ove populacije. Ovako visok nivo inbridinga može dovesti do smanjenja plodnosti i preživljavanja, povećanja učestalosti recesivnih genetskih anomalija, kao i smanjenja adaptivnog potencijala populacije na promene okruženja i bolesti. Odnosno utvrđeni nivo genomskog inbridinga ukazuje na ugroženost osobina zdravlja, otpornosti, kao i reproduktivnih osobina od inbriding depresije. Povećan F_{ROH} je indikator da genetski drift ima izražen uticaj što za posledicu može imati dodatno i naglo smanjenje genetske raznolikosti. Takođe u ovoj populaciji može relativno lako doći do fiksacije nepoželjnih alela, te do slučajnih, nepovratnih promena u genetskoj strukturi.

ZAKLJUČAK

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na izražen nivo homozigotnosti u genomu cigaja ovaca gajenih u Republici Srbiji, sa identifikovanih ukupno 2115 ROH ostrva kod analiziranih individua. Utvrđena prosečna vrednost genomskog inbriding koeficijenta ($F_{ROH} = 0,14$) ukazuje na umereno visok nivo inbridinga, što je znatno više u poređenju sa drugim domaćim populacijama ovaca, uključujući vlaško-vitorogu pramenku. Ovaj nivo inbridinga ima potencijalno negativne posledice po zdravlje, otpornost i reproduktivne osobine populacije, i predstavlja znak genetske ugroženosti. U cilju očuvanja genetskog integriteta i dugoročne održivosti cigaja rase ovaca u našoj zemlji, neophodno je sprovođenje mera konzervacione genetike, uključujući kontrolu parenja,

proširenje efektivne veličine populacije i korišćenje genomskih informacija u odgajivačkim programima. Pored ove rase, pažnju treba posvetiti i drugim autohtonim vrstama i rasama domaćih životinja kako bi stekli bolju sliku o njihovoj ugroženosti i na vreme mogli da zaštitimo ovako važno nacionalno blago.

ZAHVALNICA

Istraživanje je izvedeno u okviru multilateralnog projekta “Indicators of genetic diversity of autochthonous sheep and goat breeds from Slovakia, Austria, Czech Republic, Serbia and Montenegro” koji se realizuje između zemalja Dunavske regije, kao i u okviru ugovora o realizaciji naučnoistraživačkog rada između Poljoprivrednog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija, broj 451-03-137/2025-03/200116.

LITERATURA

1. Držaić I., Curik I., Lukić B., Shibabi M., Meng-Hua L., Kantanen J., Mastrangelo S., Ciani E., Lenstra J., Cubric-Curik V. (2022): High-Density Genomic Characterization of Native Croatian Sheep Breeds. *Front. Genet. Sec. Livestock Genomics*, Vol. 13.
2. Gligović N., Stanojević D., Moravčíková N., Bogdanović V., Zeljić-Stojiljković K., Djedović R., Kasarda R., Mészárosóvá M. (2023): Application of genomic tools in the characterisation of the Vlaško-Vitoroga strain of Pramenka sheep in the Republic of Serbia. *Book of Abstracts of the 1st Regional Meeting of the European Federation of Animal Science, Nitra, Slovakia, 26-28 April, 2023*, p.37.
3. Grittner N., Mandić R., Urošević M. (2021): Animal Genetic Resources of Serbia: Situation and Perspectives. *Pakistan J. Zool.*, vol. 53(3):1131-1147.
4. Michailidou S., Tsangaris G., Fthenakis G. C., Tzora A., Skoufos I., Karkabounas S. C., Banos G., Argiriou A., Arsenos G. (2018): Genomic diversity and population structure of three autochthonous Greek sheep breeds assessed with genome-wide DNA arrays. *Molecular Genetics and Genomics* (2018) 293:753–768.
5. Ganbold O., Seung-Hwan L., Dongwon S., Woon Kee P., Prabuddha M., Munkhbaatar M., Jun Heon L. (2019): Genetic diversity and the origin of Mongolian native sheep, *Livestock Science*, Volume 220: 17-25.
6. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M. A. R., Bender D. et al. (2007): PLINK: a Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 559–575.

7. Zeder M.A. (2008): Domestication and early agriculture in the Mediterranean Basin: Origins, diffusion, and impact. Proc Natl Acad Sci USA 105:11597–11604