https://doi.org/10.63356/stes.nat.2026.004 УДК 597.522.53:556.53(4-672EU)

UPOTREBA GENBANK BAZE PODATAKA U KONZERVACIONOJ GENETICI: PREGLED DOSTUPNIH SEKVENCI I NJIHOVA PRIMJENA NA PRIMJERU VRSTE LYNX LYNX

Autor: NINA KUTIĆ
e-mail: nina.kutic@student.pmf.unibl.org
Mentor: prof. dr Dragana Šnjegota
Departman za biologiju
Prirodno-matematički fakultet Univerziteta u Banjoj Luci

Uvod: Globalni biodiverzitet suočava se sa sve izraženijim pritiscima, koji dovode do smanjenja brojnosti i rasprostranjenosti brojnih vrsta. U tom kontekstu, genetička raznolikost predstavlja važnu komponentu biodiverziteta, jer doprinosi adaptivnom potencijalu i dugoročnoj održivosti populacija. Evroazijski ris (Lynx lynx), najveća vrsta mačaka u Evropi, tokom prošlog vijeka pretrpio je značajno smanjenje brojnosti i rasprostranjenosti populacija. Posebno je osjetljiva dinarska populacija, čiju redukovanu genetičku raznolikost karakterišu posljedice efekta osnivača i inbridinga.

Cilj: Cilj rada bio je da se sistematskom pretragom baze GenBank (NCBI) izvrši pregled dostupnih nukleotidnih sekvenci vrste Lynx lynx, utvrdi geografska zastupljenost sekvenci prema državi u kojoj su dobijene, te procijeni obim i struktura javno dostupnih podataka relevantnih za konzervacionu genetiku evropskih populacija.

Materijal i metode: Pretraživanje baze GenBank izvršeno je za vrstu Lynx lynx u kategoriji Nucleotide i pomoću alata BLAST search, a dostupne sekvence analizirane su prema tipu genetičkog materijala, geografskom porijeklu i dužini sekvenci (bp), dok su podaci za evropske uzorke sortirani u programu Microsoft Excel.

Rezultati: Analizom je obuhvaćeno 420 sekvenci vrste Lynx lynx koji potiču iz evropskih populacija. Rezultati su ukazali na dominaciju sekvenci mitohondrijalne DNK (mtDNA) koja čini 81,43% (342 sekvence) ukupnog seta podataka, dok sekvence informacione RNK (iRNK) i jedarne DNK učestvuju sa 9,52% (40) i 9,05% (38). Najčešća dužina mtDNA sekvenci iznosi 16.448 bp (112 zapisa, kompletni mitohondrijalni genom), dok je druga najzastupljenija dužina 724 bp (46 zapisa, kontrolna regija D-loop). Geografska distribucija ukazuje na veliku neujednačenost: više od polovine sekvenci potiče iz Španije (36,67%) i Njemačke (16,67%), dok su Dinaridi i Balkan u izrazitom deficitu i zastupljeni sa svega šest sekvenci iz Hrvatske (1,43%), bez evidentiranih zapisa iz Bosne i Hercegovine.

Zaključak: Dobijeni rezultati ukazuju na potrebu za intenzivnijim molekularnim istraživanjima i deponovanjem genetičkih podataka za dinarske i balkanske populacije radi njihovog efikasnijeg monitoringa i zaštite.

Ključne riječi: Lynx lynx; GenBank; konzervaciona genetika; mitohondrijalna DNK

UVOD

U savremenom dobu suočavamo se sa rapidnim gubljenjem globalnog biodiverziteta, pri čemu se velikom broju vrsta smanjuje brojnost i prijeti im rizik od potpunog izumiranja. Te vrste se označavaju odgovarajućim stepenima ugroženosti na crvenim listama, te se u skladu s tim definišu i sprovode specifične metode zaštite[1]. Ovim metodama se uspješno može povećati broj jedinki neke vrste, ali ipak, sama brojnost jedinki nije dovo-

ljan pokazatelj stabilnosti populacije niti garancija njenog opstanka. Najvažniji faktor u opstanku jedne vrste predstavlja njen genetički materijal. Vrste i populacije koje odlikuje visoka genetička raznovrsnost imaju veći potencijal da se adaptiraju na promjene u uslovima životne sredine, te da izdrže stresne i nepovoljne situacije. U takvim populacijama prirodna selekcija djeluje na širi spektar genetičkih varijacija, što povećava vjerovatnoću preživljavanja jedinki pri promjenama uslova životne sredine[2].

Grana genetike koja se bavi proučavanjem genetičke raznovrsnosti ugroženih vrsta i razvojem strategija za njeno očuvanje naziva se konzervaciona genetika. Njen značaj se ogleda u procjeni genetičkog statusa populacija, praćenju stopa migracija i pojava mutacija, sprječavanju ukrštanja u srodstvu (inbridinga), te u primjeni molekularnih i bioinformatičkih metoda za monitoring populacija [3]. Njen cilj je očuvanje biološke raznovrsnosti i sprečavanje izumiranja ugroženih vrsta.

Konzervaciona genetika proučava genetičke varijabilnosti unutar i između populacija, analizira parametre poput veličine populacije, inbridinga, genetičkog drifta, protoka gena i populacione strukture. Ovo je od ključnog značaja, jer genetička raznovrsnost predstavlja osnovu evolutivnog potencijala neke vrste. Populacije sa višim nivoom varijabilnosti posjeduju veću sposobnost prilagođavanja promjenama u životnoj sredini, pojavi novih bolesti i drugim ekološkim stresorima. Ona omogućava da se na vrijeme detektuju štetne posljedice genetičkog uskog grla i inbriding depresije, kao i da se precizno definiše jedinica ugroženosti i zaštite[4].

Primjena molekularnih markera ima veliku ulogu u neinvazivnom monitoringu populacija i planiranju programa reintrodukcije ili translokacije jedinki radi povećanja genetičke varijabilnosti lokalne populacije. Napredak u tehnologijama sekvenciranja nove generacije (NGS) omogućio je prelazak sa tradicionalne analize malog broja neutralnih markera na savremenu konzervacionu genomiku [3]. Analiza čitavog genoma daje znatno preciznije podatke o veličini populacije, srodstvu i genima ključnim za preživljavanje i prilagođavanje vrste [3]. Napredak u metodologiji pruža bolji uvid u mehanizme preživljavanja ugroženih vrsta, čime se stvaraju uslovi za kvalitetnije planiranje mjera očuvanja biodiverziteta.

Evroazijski ris (*Lynx lynx*) predstavlja najveću mačku evropskog kontinenta i ključnu komponentu šumskih ekosistema, čije su populacije tokom prošlog vijeka pretrpjele drastičan pad širom Evrope usljed gubitka staništa, prekomjernog lova i smanjenja prirodnog plijena. Ris je autohtona vrsta na području Dinarida i Balkanskog poluostrva, ali 1911. godine došlo je do potpunog nestanka ove vrste u Bosni i Hercegovini [5].

Godine 1973. sprovedena je reintrodukcija jedinki iz Slovačkih Karpata u Sloveniju [5,6]. Jedinke su tada migrirale kroz planinski vijenac, i ponovo nastanile dio Dinarida u Hrvatskoj i Bosni i Hercegovini. Kako današnja dinarska populacija potiče od samo šest reintrodukovanih jedinki [7], karakteriše je smanjena genetička raznolikost i povećan rizik od inbridinga. Upravo zbog toga evroazijski ris predstavlja dobar model za istraživanja u oblasti konzervacione genetike.

U malim i fragmentisanim populacijama dolazi do evolutivnih i genetičkih procesa koji vremenom smanjuju genetičku raznolikost, prije svega to su genetički drift i ukrštanje u srodstvu (inbriding). Genetički drift predstavlja slučajne promjene u učestalosti alela iz generacije u generaciju. Brzina i intenzitet genetičkog drifta obrnuto su proporcionalni veličini populacije; u malim populacijama promjene u frekvencijama alela su znatno izraženije, što drastično povećava vjerovatnoću trajnog gubitka rijetkih i korisnih alela ili fiksacije štetnih alela, u odnosu na velike populacije. Posebni slučajevi genetičkog drifta, u kojima je njegov efekat naročito izražen, jesu efekat uskog grla i efekat osnivača [8]. Kada frekvencija nekog alela usljed drifta dostigne nulu, on trajno nestaje iz populacije i može se nadoknaditi jedino novim mutacijama ili protokom gena [8]. Budući da je populacija risa u većem dijelu Evrope izuzetno mala i fragmentisana, ona je direktno izložena uticaju genetičkog drifta i ubrzanom gubitku genetičke raznolikosti.

Efekat uskog grla nastaje kada se broj jedinki u populaciji naglo smanji zbog prirodnih katastrofa ili ljudskog djelovanja. Preostale jedinke zadržavaju samo dio prvobitne genetičke raznolikosti, zbog čega se smanjuje genetički diverzitet populacije. Ovu pojavu potvrđuje analiza skandinavske populacije evroazijskog risa. Upotrebom 11 mikrosatelitskih lokusa i mtDNK sekvenciranjem utvrđen je smanjen broj alela, povećana homozigotnost i potpuna fiksacija za samo jedan mtDNK haplotip u Skandinaviji u poređenju sa okolnim baltičkim populacijama [9].

Efekat osnivača se javlja kada novu populaciju osnuje mali broj jedinki. Te jedinke ne nose sve gene iz izvorne populacije, te zbog toga dolazi do smanjenja genetičke varijabilnosti kod populacije njihovih potomaka. Inbriding nastaje kada se ukrštaju srodne jedinke, čime se povećava vjerovatnoća da potomci naslijede iste alele od oba roditelja. To dovodi do povećanja homozigotnosti i češćeg ispoljavanja štetnih recesivnih alela, što može izazvati inbriding depresiju [5].

Razvojem molekularne genetike i efikasnih metoda sekvenciranja DNK značajno je povećan broj dostupnih genetičkih podataka. U savremenoj konzervacionoj genetici sve više se koriste bioinformatički alati i javno dostupne baze podataka. Jedna od najznačajnijih institucija u ovoj oblasti je NCBI (National Center for Biotechnology Information). Za istraživanja u oblasti konzervacione genetike posebno je značajna GenBank, najveća javno dostupna baza podataka za čuvanje, organizovanje i razmjenu sekvenci DNK i RNK različitih organizama [10].

GenBank predstavlja javno dostupnu bazu podataka u koju istraživači nakon sprovedenih istraživanja unose dobijene nukleotidne sekvence. Svakoj sekvenci dodjeljuje se jedinstveni identifikacioni broj, poznat kao *accession number*, koji omogućava njeno označavanje i lako pronalaženje u bazi podataka [10]. Pored same sekvence DNK ili RNK, svaki GenBank zapis sadrži i brojne informacije koje omogućavaju pravilno tumačenje i korištenje podataka. Baza GenBank funkcioniše u okviru međunarodne saradnje sa Evropskom arhivom nukleotida (ENA) i Japanskom bazom podataka DNK (DDBJ) kroz International Nucleotide Sequence Database Collaboration (INSDC) [10].

Evroazijski ris (*Lynx lynx*) pripada klasi sisara (*Mammalia*) redu mesoždera (*Carnivora*), porodici mačaka (*Felidae*), i predstavlja najveću evropsku divlju mačku. U Bosni i Hercegovini prisutan je karpatski podtip ove vrste (*Lynx lynx carpathicus*), koji je nekada bio široko rasprostranjen širom Dinarskih planina. Ris je isključivo mesožder, specijalizovan za lov srednje krupnih sisara. U svom prirodnom staništu u Bosni i Hercegovini, ishrana risa se dominantno sastoji od srna, divokoza i divljih svinja [5]. Kada je dostupnost plijena ograničena često konzumira sitniji plijen poput glodara, među kojima je najčešći veliki puh [11]. Sezona parenja evroazijskog risa odvija se u periodu od sredine februara do početka aprila, nakon čega trudnoća traje 70 dana i ženka rađa mladunce tokom maja ili juna [12].

Na evropskom nivou, evroazijski ris je na IUCN Crvenoj listi svrstan u kategoriju najmanje ugroženih vrsta (*Least Concern*, LC), ali su pojedine regionalne populacije, poput balkanske, kritično ugrožene [13,14]. Na Balkanu razlikujemo tri ključne populacije: Dinarsku, koja je prošla efekat osnivača zbog reintrodukcije 1973. godine, autohtonu Balkansku populaciju (*Lynx lynx balcanicus*) koja naseljava granična područja Sjeverne Makedonije, Albanije, Crne Gore i Kosova i Metohije [15], te populaciju u istočnoj Srbiji nastalu spontanom rekolonizacijom karpatskog risa (*Lynx lynx carpathicus*) [15]. Ris je upisan na Crvenu listu ugroženih vrsta Republike Srpske [16] i Federacije Bosne i Hercegovine [17].

Molekularni markeri su specifični nizovi DNK ili RNK čije se sekvence ili dužine razlikuju među jedinkama, populacijama ili vrstama, te služe za procjenu biološke varijabilnosti [18]. Mitohondrijalna DNK je jedan od najčešće korištenih molekularnih markera, nasljeđuje se uniparentalno, po majčinskoj liniji i karakteriše je odsustvo rekombinacija

[18]. Jedarna DNK obuhvata cjelokupni genetički materijal smješten u hromozomima unutar ćelijskog jedra i nasljeđuje se biparentalno, od oba roditelja. Informaciona RNK (iRNK) služi za analizu ekspresije gena i odgovor organizma na spoljašnje ili unutrašnje faktore. Mikrosateliti su kratki ponavljajući nukleotidni motivi u jedarnoj DNK sa visokim polimorfizmom [10]. Oni nisu obuhvaćeni ovom analizom iz razloga što je baza GenBank dizajnirana za pohranjivanje kontinuiranih nukleotidnih sekvenci, dok se mikrosatelitski podaci u naučnoj literaturi uglavnom publikuju u formi tabela sa dužinama alelnih fragmenata [10].

U ovom radu analiza je usmjerena na dostupne sekvence i uzorke evroazijskog risa *Lynx lynx* iz baze podataka GenBank sa područja Evrope. Iako GenBank sadrži veliki broj sekvenci iz Azije, kao prirodnog areala rasprostranjenja ove vrste, one nisu uključene u detaljnu analizu.

Cilj ovog rada jeste da se sistematskom pretragom i analizom sekvenci mitohondrijalne DNK, jedarne DNK i informacione RNK iz baze GenBank izvrši sveobuhvatan pregled genetičkog materijala evropskih populacija evroazijskog risa (*Lynx lynx*), te evaluira geografska zastupljenost sekvenci prema državi u kojoj su sekvencirane i procijeni nivo deponovanih podataka.

MATERIJAL I METODE

Praktični dio rada zasniva se na metaanalizi i pregledu publikovanih genetičkih podataka za *Lynx lynx*, dostupnih u bazi podataka GenBank, kojoj se pristupalo putem platforme NCBI.

Pretraživanje baze podataka vršeno je putem zvanične web platforme NCBI. U glavnom polju za pretragu korišten je naučni naziv vrste: *Lynx lynx*. Kako bi se pretraga suzila na nukleotidne sekvence, u meniju sa desne strane (*Resource selector*) izabrana je kategorija *Nucleotide*. Ovim korakom filtrirani su svi dostupni zapisi molekularnih sekvenci (DNK i RNK) koji se odnose na istraživanu vrstu.

Pored pretrage baze podataka, metodologija rada obuhvatila je i analizu relevantne naučne literature iz oblasti konzervacione i populacione genetike evroazijskog risa. Tokom pregleda objavljenih radova, iz samog teksta i pratećih dodataka izdvojeni su navedeni *Accession numbers* deponovanih sekvenci. U situacijama kada je u literaturi bio naveden samo pristupni broj bez ostatka pratećih informacija, ili kada je bilo potrebno precizno potvrditi o kojoj je sekvenci riječ, korišten je bioinformatički alat BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) [10]. Unosom pristupnog broja u BLAST vršena je identifikacija i verifikacija nukleotidnih nizova, čime su dobijeni podaci o tačnom nazivu gena ili genomskog regiona i tipu genetičkog materijala (mtDNA, jedarna DNK ili iRNK) [10]. Ovim je osigurana potpuna tačnost podataka prije njihovog unosa u Microsoft Excel tabelu.

Fokus ove analize bio je usmjeren na sekvence povezane sa evropskim državama. Za zapise koji su se odnosili na istraživanja sprovedena u Evropi, izdvojene su informacije i oni su ubačeni u Microsoft Excel tabelu. Formirana je Excel tabela u koju su za svaki evropski uzorak uneseni sljedeći parametri: Pristupni broj (*Accession number*), Dužina sekvenci (bp – *base pairs*), Tip genetičkog materijala (Mitohondrijalna DNK, jedarna DNK ili informaciona RNK), Autori i Država u kojoj je izvršena analiza sekvenci.

Nakon unosa svih evropskih zapisa u Excel tabelu, izvršena je obrada podataka. Podaci su analizirani i grupisani prema: učešću različitih tipova genetičkog materijala (odnos mtDNA, jedarne DNK i iRNK), geografskoj distribuciji dostupnih sekvenci po evropskim državama i regijama u kojima je obavljeno sekvenciranje, te prosječnim i najčešćim dužinama sekvenci (bp) po tipu genetičkog materijala.

Važno je napomenuti da se geografska oznaka dostupne sekvence u većini slučajeva

odnosi na područje porijekla, odnosno prirodno stanište jedinke od koje je uzorak prikupljen. Međutim, postoje i slučajevi u kojima su uzorci prikupljeni na teritoriji jedne države, dok su njihova laboratorijska obrada i sekvenciranje obavljeni u drugoj državi. U takvim slučajevima, geografsko svrstavanje sekvenci izvršeno je prema državi u kojoj su analizirani i sekvencirani, budući da je upravo u okviru tih istraživanja genetički materijal obrađen i podaci učinjeni dostupnim u javnim bazama podataka.

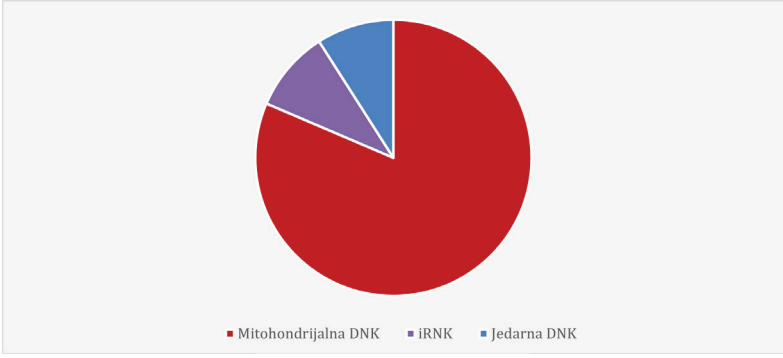
REZULTATI

Na osnovu pretrage baze podataka GenBank (NCBI) i analize naučne literature, formirana je jedinstvena baza podataka koja obuhvata ukupno 420 evropskih sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*).

Prikupljeni zapisi iz baze GenBank razvrstani su prema tipu genetičkog materijala, nakon čega je prebrojan broj sekvenci unutar svake kategorije i podijeljen sa ukupnim brojem zapisa kako bi se dobio njihov procentualni udio. Struktura analiziranih sekvenci prikazana je u *Tabeli br. 1* i *Grafikonu br. 1*. Od ukupno 420 analiziranih sekvenci, najveći udio u bazi GenBank čine sekvence mitohondrijalne DNK (81,43%, ukupno 342 sekvence), dok jedarna DNK i iRNK predstavljaju manji dio. iRNK obuhvata ukupno 40 zapisa, čineći 9,52% od cjelokupnog analiziranog uzorka, dok jedarnu DNK čini 38 sekvenci (9,05%) [19].

Tip genetičkog materijala	Broj sekvenci	Učešće (%)
Mitohondrijalna DNK	342	81,43
iRNK	40	9,52
Jedarna DNK	38	9,05
Ukupno	**420**	**100**

Tabela br. 1 Struktura analiziranih sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*) u bazi GenBank prema tipu nukleotidnih sekvenci



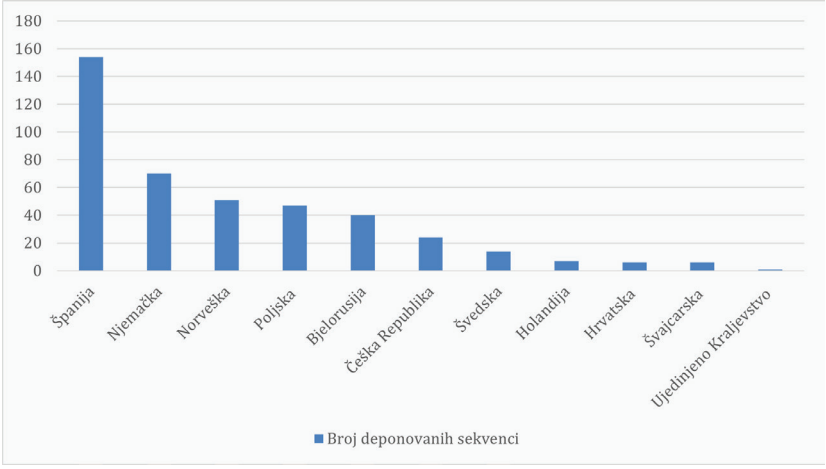
Grafikon br. 1 Grafički prikaz odnosa analiziranih sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*) u bazi GenBank prema tipu nukleotidnih sekvenci

U okviru analize posmatrana je geografska zastupljenost dostupnih sekvenci, pri čemu su zapisi razvrstani isključivo prema državi u kojoj su uzorci sekvencirani (*Tabela br. 2* i *Grafikon br. 2*). Španija (36,67%) i Njemačka (16,67%) zajedno čine više od 53% svih

dostupnih evropskih sekvenci u bazi GenBank. Viši udio sekvenci bilježe i Norveška (12,14%), Poljska (11,19%) i Bjelorusija (9,52%), dok su ostale evropske države, poput Češke (5,71%), Švedske (3,33%), Holandije (1,67%), Švajcarske (1,43%) i Ujedinjenog Kraljevstva (0,24%), zastupljene sa znatno manjim brojem zapisa. Postoji izrazit deficit podataka na području Balkana i Dinarida, koji su zastupljeni samo uzorcima iz Hrvatske sa svega šest sekvenci (1,43%), dok na području Bosne i Hercegovine, Crne Gore, Sjeverne Makedonije i Albanije uopšte ne postoje deponovane nukleotidne sekvence [7].

Država	Broj sekvenci	Učešće (%)
Španija	154	36,67
Njemačka	70	16,67
Norveška	51	12,14
Poljska	47	11,19
Bjelorusija	40	9,52
Češka Republika	24	5,71
Švedska	14	3,33
Holandija	7	1,67
Hrvatska	6	1,43
Švajcarska	6	1,43
Ujedinjeno Kraljevstvo	1	0,24
Ukupno	420	100

Tabela br. 2 Geografska zastupljenost sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*) u bazi GenBank prema državama u kojima je obavljeno sekvenciranje

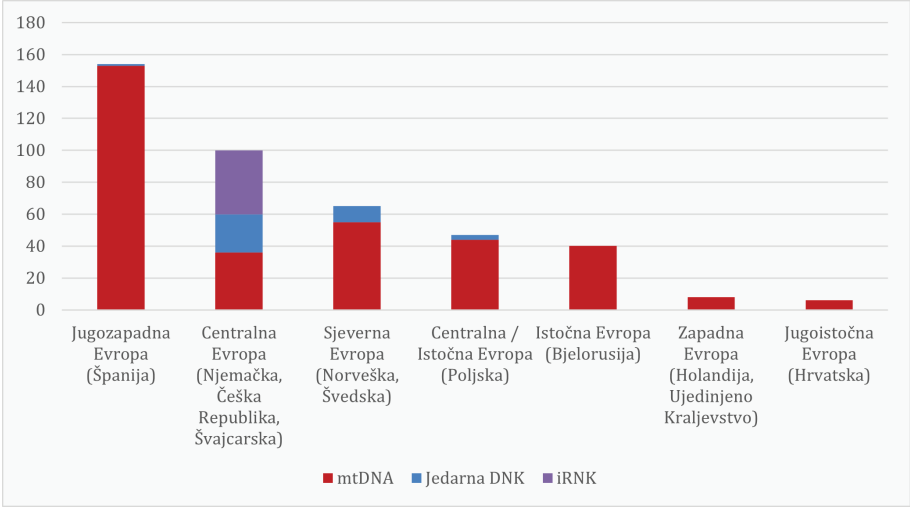


Grafikon br. 2 Grafički prikaz geografske zastupljenosti sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*) prema državama u kojima je obavljeno sekvenciranje

Za potrebe populacionih i konzervacionih istraživanja sekvence su razvrstane i prema prirodnim populacijama i biogeografskim cjelinama kojima pripadaju (*Tabela br. 3* i *Grafikon br. 3*). Jugozapadna Evropa obuhvata najveći udio od 36,67% svih analiziranih sekvenci (154 zapisa, od kojih 153 pripadaju mtDNK). Centralna Evropa (23,81% ukupnih sekvenci) predstavlja metodološki najraznovrsniji region i obuhvata 24 sekvence jedarne DNK i sve sekvence iRNK (40 zapisa) [19]. Sjeverna, Centralno-istočna i Istočna Evropa zajedno čine više od 36% ukupnih zapisa. Jugoistočna Evropa učestvuje sa svega 1,43% od ukupnog uzorka (6 mtDNK sekvenci iz Hrvatske).

Biogeografska regija	Ukupno sekvenci	mtDNA	Jedarna DNK	iRNK	Učešće (%)
Jugozapadna Evropa (Španija)	154	153	1	0	36,67
Centralna Evropa (Njemačka, Češka Republika, Švajcarska)	100	36	24	40	23,81
Sjeverna Evropa (Norveška, Švedska)	65	55	10	0	15,48
Centralna / Istočna Evropa (Poljska)	47	44	3	0	11,19
Istočna Evropa (Bjelorusija)	40	40	0	0	9,52
Zapadna Evropa (Holandija, Ujedinjeno Kraljevstvo)	8	8	0	0	1,90
Jugoistočna Evropa (Hrvatska)	6	6	0	0	1,43

Tabela br. 3 Zastupljenost tipova nukleotidnih sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*) po geografskim regijama Evrope u kojima je obavljeno sekvenciranje

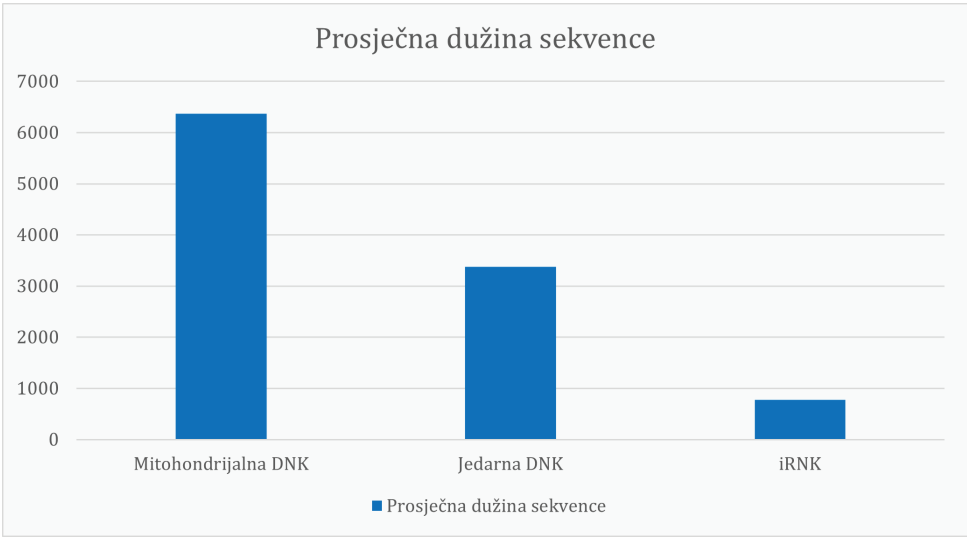


Grafikon br. 3 Grafički prikaz zastupljenosti tipova nukleotidnih sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*) po geografskim regijama Evrope u kojima je obavljeno sekvenciranje

Posmatrane su dužine nukleotidnih nizova (bp) za svaki prikupljeni zapis (*Tabela br. 4* i *Grafikon br. 4*). Mitohondrijalna DNK se odlikuje najvećim rasponom dužina (132 bp do 17.046 bp). Najčešća dužina u bazi iznosi 16.448 bp (ukupno 112 sekvenci), što odgovara sekvencama kompletnog mitohondrijalnog genoma risa. Druga najučestalija dužina je 724 bp (46 sekvenci), koja je fragment kontrolne regije mitohondrijalne DNK (D-loop) [20]. Prosječna dužina sekvenci jedarne DNK iznosi 3.380,74 bp, sa medijanom od 2.050,5 bp i najčešćom dužinom od 4.551 bp. iRNK ima najnižu prosječnu dužinu (779,32 bp) i medijanu (636,5 bp).

Tip genetičkog materijala	Broj (n)	Prosjek (bp)	Medijana (bp)	Najčešća dužina / Mod (bp)	Min (bp)	Max (bp)	Standardna devijacija
Mitohondrijalna DNK	342	6.369,12	724,0	16.448	132	17.046	7.691,76
Jedarna DNK	38	3.380,74	2.050,5	4.551	179	9.336	2.967,85
iRNK	40	779,32	636,5	579	213	3.903	651,50
Ukupno / Prosjek	420	5.566,38	724,0	16.448	132	17.046	7.412,35

Tabela br. 4 Statistika dužina sekvenci (bp) evroazijskog risa (*Lynx lynx*) u bazi GenBank prema tipu nukleotidnih sekvenci



Grafikon br. 4 Grafički prikaz prosječne dužine sekvenci (bp) evroazijskog risa (*Lynx lynx*) u bazi GenBank prema tipu nukleotidnih sekvenci

Pored 420 evropskih sekvenci, u bazi GenBank identifikovani su i zapisi evroazijskog risa iz devet vanevropskih zemalja (Azija, Sjeverna i Južna Amerika), koji nisu uvršteni u detaljnu obradu. Za azijske zemlje postojanje sekvenci je očekivano jer čine dio prirodnog areala, dok je prisustvo uzoraka u SAD, Kanadi, Brazilu i Japanu rezultat držanja ovih životinja u zatvoreništvu.

DISKUSIJA

Sistematskom pretragom i metaanalizom baze podataka GenBank (NCBI) prikupljeno je i obrađeno ukupno 420 sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*) povezanih sa evropskim istraživanjima. Najzastupljeniji podaci pripadaju mitohondrijalnoj DNK (81,43%, 342 zapisa), dok jedarna DNK obuhvata 9,05% (38 sekvenci) i iRNK 9,52% (40 sekvenci). Dominacija mtDNK bila je očekivana jer se mitohondrijalni genom odlikuje prisustvom velikog broja kopija po ćeliji, uniparentalnim nasljeđivanjem i odsustvom rekombinacija [18]. Zbog ovih osobina mtDNK predstavlja metodološki najpouzdaniji i najpristupačniji marker pri radu sa neinvazivnim uzorcima sa terena (dlaka, izmet) ili starim trofejnim uzorcima.

Analizom dužina sekvenci mtDNK uočena su dva dominantna pika: 16.448 bp (112 zapisa, kompletni mitohondrijalni genom) i 724 bp (46 zapisa, fragment kontrolne regije D-loop). D-loop je nekodirajući dio mitohondrijalnog genoma sa visokom stopom mutacija, te se decenijama primjenjuje kao standardni marker za populaciono-genetičke studije [20].

Sve identifikovane iRNK sekvence (40 zapisa) su analizirane u Njemačkoj (IZW institut) i rezultat su studija usmjerenih na analizu ekspresije gena i reproduktivnu biologiju risa [19]. Jedarna DNK je zastupljena u manjem procentu jer zahtijeva svježe biološke uzorke visokog kvaliteta (krv ili svježe tkivo), što je kod rijetkih divljih mačaka na terenu izuzetno teško prikupiti.

Dobijeni nalazi u potpunosti se slažu sa dosadašnjom naučnom literaturom [9,20]. Međutim, sprovedena metaanaliza ukazala je i na metodološko ograničenje same baze GenBank. Mikrosatelitski genotipovi uopšte nisu obuhvaćeni bazom GenBank, jer je ona dizajnirana za pohranjivanje kontinuiranih nukleotidnih nizova u FASTA formatu, dok se mikrosatelitski podaci objavljuju u formi tabela sa dužinama alelnih fragmenata [10].

Najvažniji rezultat ove analize je izražena geografska neujednačenost dostupnih sekvenci prema državama u kojima je obavljeno njihovo sekvenciranje. Više od polovine svih analiziranih evropskih sekvenci povezano je sa Španijom (36,67%) i Njemačkom (16,67%). Znatno manji broj sekvenci povezan je sa državama jugoistočne Evrope, među kojima je Hrvatska zastupljena sa svega šest zapisa (1,43%), dok za Bosnu i Hercegovinu, Crnu Goru, Sjevernu Makedoniju i Albaniju nisu evidentirani zapisi povezani sa istraživanjima sprovedenim u tim državama. Ovakva raspodjela ukazuje na neujednačenu zastupljenost istraživačkih aktivnosti i dostupnih genetičkih podataka među evropskim državama. Ipak, ona ne mora nužno odražavati stvarnu geografsku zastupljenost populacija evroazijskog risa, budući da uzorci mogu biti prikupljeni u jednoj državi, a analizirani i sekvencirani u drugoj. Zbog toga se dobijeni rezultati moraju tumačiti u kontekstu dostupnosti i geografske zastupljenosti molekularnih istraživanja, a ne kao direktan pokazatelj rasprostranjenosti vrste ili stanja njenih populacija.

Iako je najveći broj dostupnih sekvenci vrste *Lynx lynx* u analiziranoj bazi podataka evidentiran u Španiji, važno je naglasiti da ovaj podatak ne odražava nužno stvarnu geografsku zastupljenost vrste, niti porijeklo svih analiziranih jedinki. Naime, evroazijski ris je na području Španije istorijski bio prisutan, ali je njegova populacija iščezla prije nekoliko vijekova [21]. Detaljnijom analizom podataka dostupnih u GenBank bazi utvrđeno je da dio sekvenci potiče od drevnih ostataka risa, dok se druge odnose na jedinke iz uzgoja u zatvoreništvu. Takođe, među evidentiranim sekvencama nalaze se i one dobijene analizom uzoraka prikupljenih u drugim dijelovima Evrope, ali obrađenih u istraživačkim institucijama u Španiji. Iz tog razloga, prilikom statističke obrade, ove sekvence svrstane su u Španiju prema mjestu u kojem je izvršeno sekvenciranje, a ne nužno prema stvarnom geografskom porijeklu risova. Ovakav pristup ukazuje na značaj razlikovanja mjesta porijekla biološkog materijala od mjesta njegove laboratorijske obrade prilikom interpretacije

geografske distribucije dostupnih genetičkih podataka.

Prednosti korištenja GenBank baze ogledaju se u tome što je to besplatan i javno dostupan resurs koji omogućava poređenje sekvenci putem alata BLAST bez potrebe za ponovnim uzorkovanjem [10]. Ograničenja su izostanak mikrosatelitskih podataka i zavisnost od samostalne inicijative istraživača da deponuju svoje podatke. Neophodno je pokrenuti neinvazivni monitoring na području Bosne i Hercegovine i susjednih zemalja, te uspostaviti praksu obaveznog deponovanja novoizolovanih sekvenci u bazu GenBank.

ZAKLJUČCI

Sistematskom analizom baze podataka GenBank i metaanalizom ukupno 420 evropskih sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*), u ovom radu je potvrđen značaj bioinformatičkih resursa i javno dostupnih baza podataka u savremenim istraživanjima konzervacione genetike. Dobijeni rezultati pokazuju dominaciju mitohondrijalne DNK kao molekularnog markera (81,43%), što je očekivano zbog odsutnosti rekombinacija i velikog broja kopija u ćeliji. Najčešće deponovane dužine sekvenci obuhvataju kompletne mitohondrijalne genome (16.448 bp) i D-loop fragment kontrolne regije (724 bp).

Centralni uvid rada jeste postojanje izrazite geografske neujednačenosti u zastupljenosti dostupnih genetičkih podataka prema državama u kojima je obavljeno sekvenciranje. Najveći broj sekvenci povezan je sa Španijom i Njemačkom, dok je znatno manji broj povezan sa državama jugoistočne Evrope. Hrvatska je zastupljena sa svega šest zapisa (1,43%), dok za Bosnu i Hercegovinu nije evidentiran nijedan zapis. Dobijeni rezultati ukazuju na neujednačenu zastupljenost istraživačkih aktivnosti i dostupnih molekularnih podataka u različitim dijelovima Evrope.

Dobijeni rezultati ukazuju na jasnu potrebu za uspostavljanjem redovnog neinvazivnog monitoringa u našem regionu i obaveznim deponovanjem novoizolovanih sekvenci u javne baze podataka radi donošenja naučno utemeljenih odluka o zaštiti ove vrste.

LITERATURA

[1] International Union for Conservation of Nature (IUCN). IUCN Red List categories and criteria: version 3.1. 2nd ed. Gland: IUCN; 2012

[2] Kardos M, Taylor HB, Ellegren H, Luikart G, Allendorf FW. Crucial role of genome-wide genetic variation in conservation biology. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2021;118(48):e2104642118.

[3] Allendorf FW, Hohenlohe PA, Luikart G. Genomics and the future of conservation genetics. Nat Rev Genet. 2010;11(10). doi:10.1038/nrg2844

[4] Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. Introduction to conservation genetics. Cambridge: Cambridge University Press; 2002.

[5] Soldo V. The lynx in Bosnia and Herzegovina. U: Breitenmoser-Würsten C, Breitenmoser U, urednici. The Balkan Lynx Population - History, Recent Knowledge on its Status and Conservation Needs. KORA Bericht Nr. 7. Muri: KORA; 2001.

[6] Kotrošan D, Bjedov V, Kryštufek B. Stanje istraženosti faune sisara Bosne i Hercegovine. Rad Šumar Fak Univ Sarajevu. 2005;30(1).

[7] Polanc P, Sindičić M, Jelenčič M, Gomerčić T, Kos I, Huber D. Genotyping success of historical Eurasian lynx (*Lynx lynx* L.) samples. Mol Ecol Resour. 2012;12(2). doi:10.1111/j.1755-0998.2011.03084.x

[8] Masel J. Genetic drift. Curr Biol. 2011;21(20):R837-8. doi:10.1016/j.cub.2011.08.007

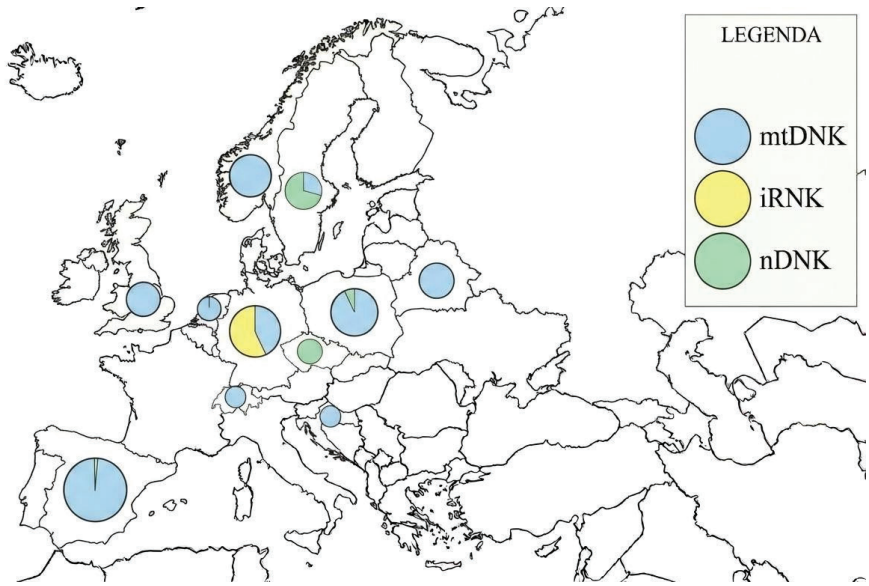
[9] Hellborg L, Walker CW, Rueness EK, Stacey JE, Ellegren H, Sundquist AK. Differentiation and levels of genetic variation in northern European lynx (*Lynx lynx*) populations revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. Conserv Genet. 2002;3(2). doi:10.1023/A:1015217723287

[10] Sayers EW, Cavanaugh M, Clark K, Ostell J, Pruitt KD, Karsch-Mizrachi I. GenBank. Nucleic Acids Res. 2019;47(D1):D94-9. doi:10.1093/nar/gky989

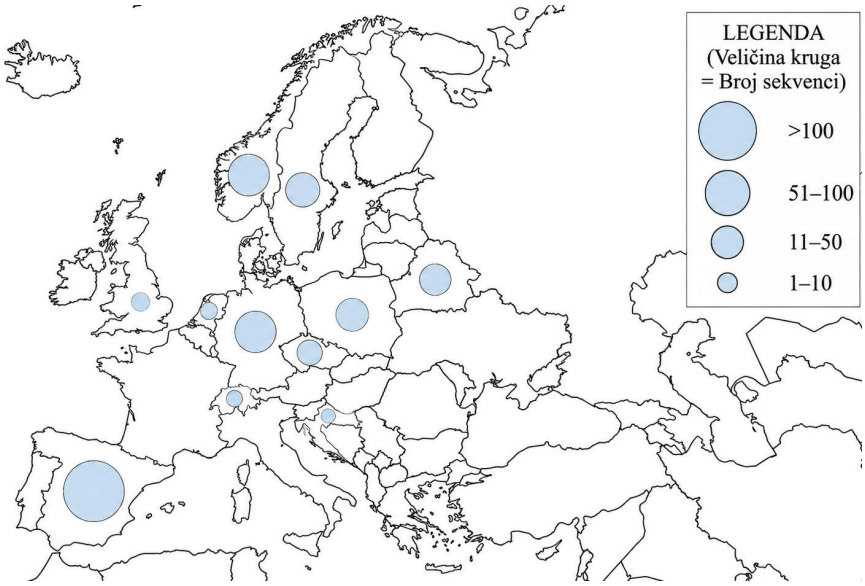
[11] Krofel M, Huber Đ, Kos I. Diet of Eurasian lynx *Lynx lynx* in the northern Dinaric Mountains (Slovenia and Croatia): Importance of edible dormouse *Glis glis* as alternative prey. Acta Theriol. 2011;56(4).

doi:10.1007/s13364-011-0032-2
[12] Henriksen G. Reproductive success, litter size and kitten survival in Eurasian lynx (*Lynx lynx)* in captivity [master rad]. Ås: Norwegian University of Life Sciences; 2005.
[13] Von Arx M, Breitenmoser-Würsten C, Breitenmoser U. Status and conservation of the Eurasian lynx (*Lynx lynx)* in Europe. IUCN/SSC Cat Specialist Group; 2021.
[14] IUCN. *Lynx lynx* (Eurasian Lynx). The IUCN Red List of Threatened Species. 2021. https://www.iucnredlist.org/species/12519/213601289
[15] Paunović M, Milenković M, Ivanović-Vlahović Č. The lynx populations in the Federal Republic of Yugoslavia. U: Breitenmoser-Würsten C, Breitenmoser U, urednici. The Balkan Lynx Population - History, Recent Knowledge on its Status and Conservation Needs. KORA Bericht Nr. 7. Muri: KORA; 2001.
[16] Ministarstvo za prostorno uređenje, građevinarstvo i ekologiju Republike Srpske. Rješenje o Crvenoj listi zaštićenih vrsta divlje flore i faune Republike Srpske. Službeni glasnik Republike Srpske, br. 124/12; 2012.
[17] Federalno ministarstvo okoliša i turizma. Rješenje o Crvenoj listi ugroženih divljih vrsta i taksona u Federaciji Bosne i Hercegovine. Službene novine FBiH, br. 7/14; 2014.
[18] Chinnery PF, Hudson G. Mitochondrial genetics. Br Med Bull. 2013;106(1). doi:10.1093/bmb/ldt017
[19] Zschockelt L, Amelkina O, Siemieniuch MJ, Kowalewski MP, Dehnhard M, Jewgenow K, et al. Synthesis and reception of prostaglandins in corpora lutea of domestic cat and lynx. Reproduction. 2016;152(2). doi:10.1530/REP-16-0180
[20] Rueness EK, Naidenko S, Trosvik P, Stenseth NC. Large-scale genetic structuring of a widely distributed carnivore–the Eurasian lynx (*Lynx lynx*). PLoS ONE. 2014;9(4):e93675.
[21] Rodríguez-Varela R, García N, Nores C, Álvarez-Lao D, Barnett R, Arsuaga JL, Valdiosera C. Ancient DNA reveals past existence of Eurasian lynx in Spain. Journal of Zoology. 2016;298(2):94–102.

PRILOZI



Grafikon br. 5 Geografska distribucija i broj deponovanih sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*) prema državama



Grafikon br. 6 Geografska distribucija deponovanih sekvenci evroazijskog risa (*Lynx lynx*) prema vrstama markera

USE OF THE GENBANK DATABASE IN CONSERVATION GENETICS: AN OVERVIEW OF AVAILABLE SEQUENCES AND THEIR APPLICATION USING THE EXAMPLE OF THE SPECIES LYNX LYNX

Author: NINA KUTIĆ
E-mail: nina.kutic@student.pmf.unibl.org
Mentor: Assoc. Prof. Dragana Šnjegota
Department of Biology, Faculty of Natural Sciences and Mathematics, University of Banja Luka

Introduction: Global biodiversity is facing increasing pressures that are leading to declines in the abundance and distribution of numerous species. Genetic diversity represents an important component of biodiversity, as it contributes to the adaptive potential and long-term sustainability of populations. The Eurasian lynx (Lynx lynx), the largest felid species in Europe, has experienced a significant decline in population size and distribution over the past century. The Dinaric population is particularly vulnerable, with reduced genetic diversity associated with the founder effect and inbreeding.

Aim: The aim of this study was to systematically search the GenBank (NCBI) database to review the available nucleotide sequences of Lynx lynx, determine the geographical representation of the sequences according to the country in which they were obtained, and assess the extent and structure of publicly available data relevant to the conservation genetics of European populations.

Materials and Methods: The GenBank database was searched for Lynx lynx sequences in the Nucleotide category using the BLAST search tool. The available sequences were analysed according to genetic material type, geographical origin, and sequence length (bp), while data for European samples were sorted using Microsoft Excel.

Results: The analysis included 420 sequences of Lynx lynx originating from European populations. Mitochondrial DNA (mtDNA) sequences predominated, accounting for 81.43% (342 sequences) of the dataset, while messenger RNA (mRNA) and nuclear DNA accounted for 9.52% (40) and 9.05% (38), respectively. The most common mtDNA sequence length was 16,448 bp (112 records, complete mitochondrial genome), followed by 724 bp (46 records, D-loop control region). The geographical distribution was highly uneven: more than half of the sequences are associated with Spain (36.67%) and Germany (16.67%), while the Dinaric and Balkan regions were markedly underrepresented, with only six sequences from Croatia (1.43%) and no records from Bosnia and Herzegovina.

Conclusion: The results highlight the need for intensified molecular research and deposition of genetic data for Dinaric and Balkan populations to support their effective monitoring and conservation.

Keywords: Lynx lynx; GenBank; conservation genetics; mitochondrial DNA