

## PRIKAZ SLUČAJA – CASE REPORT

DOI: 2298/VETGL1304279D

UDK 619:639.1:343.771

**MOLEKULARNO-GENETIČKI PRISTUP INDIVIDUALNOJ IDENTIFIKACIJI SRNDAČA U SLUČAJU KRIVOLOVA U SRBIJI\******A MOLECULAR GENETIC APPROACH TO ROEBUCK INDIVIDUAL IDENTIFICATION IN THE CASE OF POACHING IN SERBIA*****V. Dimitrijević, Ruzica Trailović, B. Petrukić, Mila Savić, P. Simeunović, Jevrosima Stevanović, Z. Stanimirović\*\***

*Primena molekularno-genetičkih tehnika u forenzičkim slučajevima koji uključuju divlje životinje u značajnom je porastu tokom poslednjih godina. Ove tehnike se u praktičnom radu na slučajevima primarno koriste u rešavanju četiri ključna problema: utvrđivanje vrste divlje životinje, određivanje geografskog porekla, utvrđivanje srodničkih veza i individualna identifikacija. U ovom radu predstavljamo prvi slučaj primene ispitivanja polimorfizma mikrosatelitskih genetičkih markera u okviru forenzičke analize slučaja krivolova u Srbiji. Cilj forenzičke analize bio je da se utvrdi da li meso zaplenjeno tokom pretresa kuće osumnjičenog potiče od srndaća (*Capreolus capreolus*), čiji su ostaci pronađeni od strane lovočuvara na terenu tokom perioda lovostaja, pri čemu je osumnjičeni negirao delo tvrdeći da meso potiče od drugog srndaća ubijenog tokom prethodne sezone lova. DNK je izolovana iz uzoraka kože i krzna uzetih sa leša srndaća nađenog u šumi i uzoraka zamrznutog mesa nađenog u kući osumnjičenog. Izvršena je amplifikacija i ispitivanje polimorfizma osam mikrosatelitskih markera (ROE01, NVHRT16, NVHRT21, NVHRT24, NVHRT48, NVHRT73, RT7 i RT27). U svim ispitivanim uzorcima ustanovljen je isti obrazac varijabilnosti testiranih mikrosatelita, odnosno pokazano je da su DNK profili uzoraka uzetih sa leša srndaća identični DNK profilu uzorka mesa nađenog u kući osumnjičenog. Ovakav rezultat jasno ukazuje na to da su svi ispitivani biološki uzorci poticali od iste životinje i predstavlja forenzički validan dokaz u slučaju krivolova srndaća.*

*Ključne reči: DNK forenzika, mikrosateliti, individualna identifikacija, srndać, krivolov*

\* Rad primljen za štampu 21. 05. 2012. godine

\*\* Dr sci. med. vet. Vladimir Dimitrijević, docent, dr sci. med. vet. Ruzica Trailović, docent, dr sci. med. vet. Branko Petrukić, asistent, dr sci. med. vet. Mila Savić, redovni profesor, Predrag Simeunović, dr vet. med., asistent, dr sci. Jevrosima Stevanović, docent, dr sci. Zoran Stanimirović, redovni profesor, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

## Uvod / Introduction

Ilegalna trgovina divljim životinjama, kao i produktima poreklom od ovih životinja je problem čiji je značaj u stalnom porastu. Procenjuje se da vrednost ovakve ilegalne trgovine na globalnom nivou tokom jedne godine iznosi oko 20 milijardi dolara (Wilson-Wilde, 2010). U skladu sa ovakvim trendom, tokom poslednjih godina beleži se i značajan porast broja forenzičkih slučajeva koji uključuju divlje životinje. Kada su u pitanju tehnike koje se koriste u forenzičkim analizama relevantnim za divlje životinje, situacija je slična kao i u humanoj forenzici. Tehnike molekularne biologije, koje su ranije primarno bile primenjivane u ispitivanju strukture populacija i filogenetskih odnosa različitih vrsta divljih životinja, tokom nekoliko poslednjih godina postaju sve važnije i u oblasti veterinarske forenzike usmerene na divlje životinje (Ogden i sar., 2009; Alacs i sar., 2010). Svaki pojedinačni slučaj forenzičke DNK analize koji uključuje divlje životinje ima neke svoje osobenosti, ali načelno se izdvajaju četiri ključna problema: identifikacija vrste, određivanje geografskog porekla, utvrđivanje srodničkih veza i individualna identifikacija.

Jedan od najčešćih vidova primene molekularno genetičkih tehnika u veterinarskoj forenzici divljih životinja jeste identifikacija vrste. Tako, na primer, utvrđivanje vrste može biti značajno u forenzičkoj analizi slučajeva trgovine zaštićenim vrstama divljih životinja (Wong i sar., 2004) i krivolova (Gupta i sar., 2005; An i sar., 2007). Identifikacija vrste primenom genetičkih analiza posebno je važna u slučajevima trgovine produktima animalnog porekla koji su izgubili prepoznatljive morfološke karakteristike. Tipičan primer za ovu situaciju jesu različiti preparati tradicionalne medicine koji se u nekim kulturama još uvek masovno koriste (Wetton i sar., 2002; Peppin i sar., 2008). Ključne karakteristike DNK markera odgovarajućih za identifikaciju vrste su značajna varijacija između različitih vrsta uz visok stepen konzerviranosti u okviru svake pojedinačne vrste (Tobe i Linacre, 2010). Danas je standardni pristup u identifikaciji vrsta životinja sekvenciranje regiona u okviru mitohondrijalne DNK, a pre svega gena za citohrom b i subjedinicu 1 citohrom-oksidadze (Tobe i Linacre, 2010). Određivanje geografskog porekla biološkog uzorka je od potencijalno velikog značaja u velikom broju forenzičkih slučajeva, jer omogućava primenu, kako nacionalnih, tako i međunarodnih zakona koji se odnose na divlje životinje. Iz perspektive forenzičke genetike, identifikacija geografskog porekla biološkog uzorka zapravo znači prepoznavanje reproduktivne populacije iz koje uzorak potiče (Ogden i sar., 2009; Alacs i sar., 2010). Ključni korak u geografskoj, odnosno reproduktivnoj diferencijaciji populacija, jeste utvrđivanje frekvenci alela različitih genetičkih markera (Alacs i sar., 2010). Na osnovu tipizacije varijabilnih genetičkih markera, kao što su na primer mikrosateliti, može se dokazati, odnosno isključiti pripadnost biološkog materijala, koji je predmet forenzičke analize, datoj populaciji (Kotze i sar., 2008; Alacs i sar., 2010). Utvrđivanje stepena srodstva je veoma značajno za mnoge aspekte konzervacione genetike, ali u veterinarskoj DNK forenzici divljih životinja pri-

marni fokus je razlikovanje životinja koje su gajene u zatočeništvu od onih koje žive slobodno u divljini (Ogden i sar., 2009; Alacs i sar., 2010). Programi gajenja u zatočeništvu ugroženih vrsta divljih životinja, kao i vrsta znatne komercijalne vrednosti danas su veoma zastupljeni širom sveta. Najčešća situacija u kojoj je potrebno utvrditi srodničke veze jeste kada se životinje nedozvoljeno ulovljene u divljini, odnosno produkti ovih životinja prodaju kao da su u pitanju životinje gajene u zatočeništvu u okviru posebnih programa (Ogden i sar., 2009; Alacs i sar., 2010). Genetički markeri koji se uobičajeno koriste za verifikaciju srodničkih veza su mikrosateliti. Primer je panel mikrosatelita koji se već više godina koristi u Velikoj Britaniji za verifikaciju srodničkih veza kod šest različitih vrsta ptica (Dawnay i sar., 2009). U veterinarskoj DNK forenzici divljih životinja prepoznate su brojne situacije u kojima je potrebno postići individualnu identifikaciju, a u tom smislu posebno su ilustrativni slučajevi krivolova. U pitanju su situacije u kojima je neophodno dokazati da, na primer, meso, koža, kost ili rog potiču od određene jedinke. U većini studija u kojima je cilj bio individualna identifikacija divljih životinja kao genetički marker korišćeni su mikrosateliti (Gupta i sar., 2011; Lorenzini, 2005; Marín i sar., 2009; Mondol i sar., 2009). Veliki, ali ipak relativno stabilan polimorfizam mikrosatelita ključni je faktor koji je doprineo tome da su mikrosateliti postali jedan od najčešće korišćenih genetičkih markera za individualnu identifikaciju.

U ovom radu predstavljamo prikaz prvog slučaja primene ispitivanja polimorfizma mikrosatelitskih genetičkih markera u okviru forenzičke analize slučaja krivolova u Srbiji.

## **Materijal i metode rada / *Material and methods***

### **Istorija slučaja / *Case history***

U februaru 2011. godine, tokom perioda lovostaja na srndaća, lovočubar je pronašao delove tela srndaća na području lovišta na severozapadu Srbije. Anonimni telefonski poziv ukazao je na potencijalnog počinioca. Tokom pretresa kuće osumnjičenog, u zamrzivaču je pronađeno nekoliko paketa smrznutog mesa za koje je osumnjičeni tvrdio da potiče od drugog srndaća ubijenog tokom prethodne sezone lova. Lokalno lovačko društvo "Fazan Vladimirci" kontaktiralo je Katedru za stočarstvo i genetiku Fakulteta veterinarske medicine u Beogradu sa zahtevom da se utvrdi da li meso zaplenjeno tokom pretresa kuće osumnjičenog potiče od životinje, čiji su ostaci pronađeni od strane lovočuvara na terenu tokom perioda lovostaja.

### **Izolacija DNK / *DNK isolation***

Uzorci za izolovanje DNK bili su koža i krzno uzeti sa leša srndaća, kao i zaplenjeno meso pronađeno u kući osumnjičenog. Izolacija genomske DNK iz-

vedena je korišćenjem komercijalno dostupnog sistema pod nazivom *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen Inc, Valencia, CA, United States), u skladu sa preporukama proizvođača. Za proveru prisustva genomske DNK korišćena je elektroforeza na 1% agarozu gelu. Procena količine izolovane DNK izvršena je kvantifikacijom na spektrofotometru *BioPhotometer* (Eppendorf, Hamburg, Germany). Uzorci DNK potom su razblaženi u dejonizovanoj vodi (Eppendorf, Hamburg, Nemačka), u količini od 50  $\mu$ l po uzorku. Tako razblaženi uzorci čuvani su na temperaturi od -18°C.

### **Genotipizacija mikrosatelitskih lokusa / *Genotipization of microsatellite locuses***

U cilju ispitivanja podudarnosti između DNK profila uzoraka kože i krzna sa leša ubijene životinje i DNK profila uzoraka mesa nađenog u kući osumnjičenog, korišćeno je 8 mikrosatelitskih genetičkih lokusa: *ROE01*, *NVHRT16*, *NVHRT21*, *NVHRT24*, *NVHRT48*, *NVHRT73*, *RT7* i *RT27*. Fickel i Reinsch (2000) opisali su specifični lokus *ROE01*, dok su mikrosateliti *NVHRT16*, *NVHRT21*, *NVHRT24*, *NVHRT48* i *NVHRT73* i odgovarajući parovi prajmera identifikovani od strane Roed i Midthjell (1998). Parove prajmera za specifične lokuse obeležene kao *RT7* i *RT27* opisali su Wilson i saradnici (1997). Ispitivanje polimorfizma izabranih mikrosatelitskih markera izvršeno je prema protokolu koji su opisali Roed i Midthjell (1998). U kratkim crtama, mastermiks za jedan uzorak ukupne zapremine od 10  $\mu$ L sadržao je sledeće komponente: 20-40 ng DNK, po 22 pmol svakog od prajmera, 50 mM KCl, 1,5  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl, po 0,2 mM svakog od dNTP i 0,5 U AmpliTaq Gold DNK polimeraze (Applied Biosystems, CA, US). Inicijalni korak u amplifikaciji bio je jedan ciklus na temperaturi od 94°C u trajanju od 5 minuta, a zatim 30 ciklusa od po 1 minut na 95°C, 30 sekundi na 55°C i 1 minut na 72°C. Završna faza bila je ekstenzija na 72°C u trajanju od 10 minuta, nakon čega su uzorci držani na 6°C. S obzirom na to da su uzvodni prajmeri svih izabranih mikrosatelitskih lokusa bili obeleženi fluorescentnim obeleživačem kovalentno vezanim za 5' kraj, sledeći korak bio je separacija dobijenih obeleženih PCR produkata postupkom kapilarne elektroforeze u ABI3110 (Applied Biosystems, CA, US) automatskom sekvenatoru. Dobijeni rezultati analizirani su primenom *GeneScan* softvera ver. 3.7 (Applied Biosystems, CA, US).

### **Rezultati i diskusija / *Results and Discussion***

Primena molekularno-genetičkih tehnika postepeno zauzima sve važniju ulogu u različitim forenzičkim slučajevima koji uključuju divlje životinje. Jedna od tipičnih situacija u kojima ove tehnike postaju ključno sredstvo forenzičke istrage jeste otkrivanje počinitelaca u delu krivolova. U ovoj studiji opisan je prvi slučaj primene molekularnog pristupa u rešavanju slučaja krivolova u Srbiji. U pitanju je bio slučaj krivolova na srndaća (*Capreolus capreolus*). Srndać je vrlo široko rasprostranjena vrsta u Evropi, a i u Srbiji je takođe jedna od najraspostra-

njenijih i najšire zastupljenih vrsta divljih cervida. U pitanju je vrsta divljači na koju je u Srbiji lov dozvoljen, ali Zakon o divljači i lovstvu koji je objavljen u Službenom glasniku Republike Srbije u broju 18 od 2010. godine, jasno definiše pod kojim i kakvim okolnostima. Lov na srndaća dozvoljen je lovcima sa dozvolama lokalnih lovačkih udruženja, i to na određenoj teritoriji, samo tokom određenih perioda godine. Krivolov na srndaća u Srbiji je realan problem, mada ne postoje precizne procene razmera ovog problema. U ovoj studiji korišćen je panel od osam mikrosatelitskih markera koji su specifični za cervide i/ili specifični (Wilson i sar., 1997; Roed i Midthjell, 1998; Fickel i Reinsch, 2000). Ispitivanje polimorfizma navedenih mikrosatelitskih markera izvedeno je u cilju individualne identifikacije životinje od koje testirani biološki uzorci potiču, a u skladu sa osnovnim zahtevom tražene forenzičke analize. Naime, trebalo je odgovoriti na pitanje da li uzorci mesa zaplenjeni tokom pretresa kuće osumnjičenog i uzorci uzeti sa leša srndaća ubijenog u krivolovu potiču od iste životinje. Genotipizacija osam mikrosatelitskih lokusa pokazala je isti obrazac varijacije u svim ispitivanim uzorcima. U uzorcima kože i krzna srndaća ubijenog u krivolovu ustanovljeno je da su četiri mikrosatelitska markera heterozigoti, dok su preostala četiri lokusa pokazala homozigotni status. Ovakav DNK profil u potpunosti je odgovarao DNK profilu dobijenom iz mesa koje je zaplenjeno u kući osumnjičenog. Dobijeni rezultat jasno ukazuje na to da svi ispitivani biološki uzorci koji su bili predmet forenzičke analize potiču od iste životinje. Ipak, statistički proračun verovatnoće podudaranja nije bio moguć bez referentne baze podataka frekvencija pojedinačnih alela u okviru svakog od ispitivanih lokusa u populaciji srndaća u Srbiji. Sličan eksperimentalni dizajn primenjen je i u drugim studijama u kojima su korišćene molekularno genetičke tehnike u forenzičkoj analizi slučajeva krivolova. Tako je, na primer, na osnovu upoređivanja DNK profila mikrosatelitskih markera u tragovima krvi na nožu osumnjičenog lovokradice i DNK profila ostataka životinje nađenih u divljini dokazan slučaj krivolova divlje svinje u Italiji (Lorenzini, 2005). U Čileu su Marín i saradnici (2009) takođe koristili mikrosatelite kao genetičke markere i na osnovu analize DNK profila zamrznutog mesa nađenog kod osumnjičenog lovokradice i ostataka životinja nađenih u divljini pružili dokaze za slučaj krivolova guanakoa.

Primena molekularno-genetičkih tehnika u Srbiji u proceni struktura populacija životinja još uvek je u početnoj fazi, i do sada izvedena istraživanja bila su usmerena isključivo na farmske životinje (Stevanović i sar., 2010). Kada je u pitanju veterinarska DNK forenzika, mogućnosti primene DNK tipizacije u sudskim slučajevima koji uključuju životinje još uvek predstavljaju potpunu novinu. Uspostavljanje veterinarske forenzičke genetike, uključujući i DNK forenziku divljih životinja, kao primenjene naučne oblasti, zahteva značajna sredstva i kapacitete (Ogden, 2010). Jedan od ključnih problema jeste osnivanje i organizacija laboratorije usmerene na DNK analize u okviru forenzičkih slučajeva koji uključuju divlje životinje (Ogden, 2010). Za projekat uspostavljanja ovakve laboratorije postoji nekoliko veoma važnih prepreka. Prvo, broj vrsta životinja za koje treba razviti odgovarajuće metode veoma je veliki. Drugo, za sve razvijene metode treba uspo-

staviti odgovarajući sistem kontrole kvaliteta, u skladu sa jasno definisanim zahtevima forenzičkih analiza. Treće, statistički proračuni verovatnoće podudaranja zahtevaju razvoj referentnih baza podataka odnosno dostupnost podataka o frekvencama alela korišćenih genetičkih markera u lokalnim populacijama pojedinačnih vrsta divljih životinja. To praktično znači da neposredna primena molekularno-genetičkih tehnika u forenzičkim slučajevima koji uključuju divlje životinje načelno zahteva prethodna populaciono-genetička ispitivanja u lokalnim populacijama različitih vrsta divljih životinja. Kao što je već navedeno, ovo je bio problem i u statističkom proračunu verovatnoće podudaranja u DNK forenzičkoj analizi opisanoj u našoj studiji. Imajući u vidu sve navedeno, danas je čest pristup u izvođenju DNK forenzičkih analiza koje uključuju divlje životinje upravo onaj koji smo i mi koristili, a to je izvođenje ovih analiza u već postojećim laboratorijama akademskih i naučnih institucija (Ogden i sar., 2009; Ogden, 2010). Pored toga, preporuka za sredine sa ograničenim materijalnim resursima i još uvek nedovoljnim iskustvom u oblasti DNK forenzike divljih životinja jeste da se ovakve analize izvode u saradnji sa već uspostavljenim laboratorijama za veterinarsku DNK forenziku (Ogden, 2010), što je u slučaju naše studije bila laboratorija u Norveškoj (Section of Genetics, Norwegian School of Veterinary Sciences).

#### **Zaključak / Conclusion**

Rezultat genotipizacije izabranih mikrosatelitskih markera jasno je pokazao da su svi ispitivani biološki uzorci poticali od iste životinje i predstavlja forenzički validan dokaz u predstavljenom slučaju krivolova srndaća. U pitanju je prva opisana primena ispitivanja polimorfizma mikrosatelita u okviru forenzičke analize slučaja krivolova u Srbiji, odnosno prva opisana DNK forenzička analiza koja uključuje divlje životinje u našoj zemlji. Pored konkretnog rezultata forenzičke analize, ova studija trebalo bi da doprinese prepoznavanju značaja veterinarske DNK forenzike divljih životinja u našoj sredini. U pitanju je kompleksna primenjena oblast koja je još uvek u usponu, ali se već pokazala kao važno sredstvo u borbi protiv kriminala koji uključuje divlje životinje.

#### **ZAHVALNOST / ACKNOWLEDGEMENT:**

Zahvaljujemo se Prof. Knut H. Roed-u sa Norwegian School of Veterinary Science, Department of Aquatic medicine and Basic Sciences, Section of Genetics, na dragocenoj i velikoj pomoći tokom izrade ove studije. Rad je finansiran sredstvima Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja projekat br. III46002. /

*We pay special gratitude to Prof. Knut H. Roed from Norwegian School of Veterinary Science, Department of Aquatic Medicine and Basic Sciences, Section of Genetics on valuable assistance and great help in completing this study*

*This work was funded by Ministry of Education, Science and Technological Development of Republic of Serbia, Project N<sup>o</sup>.III46002*

## Literatura / References

1. Alacs EA, Georges A, FitzSimmons NN, Robertson J. DNA detective: a review of molecular approaches to wildlife forensics. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 6(3): 180-94.
2. An J, Lee MY, Min MS, Lee MH, Lee H. A molecular genetic approach for species identification of mammals and sex determination of birds in a forensic case of poaching from South Korea. *Forensic Sci Int* 2007; 167(1): 59-61.
3. Dawney N, Ogden R, Wetton JH, Thorpe RS, McEwing R. Genetic data from 28 STR loci for forensic individual identification and parentage analyses in six bird of prey species. *Forensic Sci Int Genet* 2009; 3(2): 63-9.
4. Fickel J, Reinsch A. Microsatellite markers for the European Roe deer (*Capreolus capreolus*). *Mol Ecol* 2000; 9(7): 994-5.
5. Gupta SK, Verma SK, Singh L. Molecular insight into a wildlife crime: the case of a peafowl slaughter. *Forensic Sci Int* 2005; 154(2-3): 214-7.
6. Gupta SK, Bhagavatula J, Thangaraj K, Singh L. Establishing the identity of the massacred tigress in a case of wildlife crime. *Forensic Sci Int Genet* 2011; 5(1): 74-5.
7. Kotze A, Ehlers K, Cilliers D, Grobler J. The power of resolution of microsatellite markers and assignment tests to determine the geographic origin of cheetah (*Acinonyx jubatus*) in Southern Africa. *Mamm Biol* 2008; 73: 458-62.
8. Lorenzini R. DNA forensics and the poaching of wildlife in Italy: A case study. *Forensic Sci Int* 2005; 153(2-3): 218-21.
9. Marín JC, Saucedo CE, Corti P, González BA. Application of DNA Forensic Techniques for Identifying Poached Guanacos (*Lama guanicoe*) in Chilean Patagonia. *J Forensic Sci* 2009; 54(5): 1073-6.
10. Mondol S, Navya R, Athreya V, Sunagar K, Selvaraj VM, Ramakrishnan U. A panel of microsatellites to individually identify leopards and its application to leopard monitoring in human dominated landscapes. *BMC Genetics* 2009; 10: 79-85.
11. Ogden R, Dawney N, McEwing R. Wildlife DNA forensics – bridging the gap between conservation genetics and law enforcement. *Endang Species Res* 2009; 9(3): 179-95.
12. Ogden R. Forensic science, genetics and wildlife biology: getting the right mix for a wildlife DNA forensics lab. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 6(3): 172-9.
13. Peppin L, McEwing R, Carvalho GR, Ogden R. A DNA based approach for the forensic identification of Asiatic black bear (*Ursus thibetanus*) in a traditional asian medicine. *J Forensic Sci* 2008; 53(6): 1358-62.
14. Røed KH, Midthjell L. Microsatellites in reindeer, *Rangifer tarandus*, and their use in other cervids. *Mol Ecol* 1998; 7(12): 1773-6.
15. Stevanović J, Stanimirović Z, Dimitrijević V, Maletić M. Evaluation of 11 microsatellite loci for their use in paternity testing in Yugoslav Pied cattle (YU Simmental cattle). *Czech J Anim Sci* 2010; 55(6): 221-6.
16. Tobe SS, Linacre A. DNA typing in wildlife crime: recent developments in species identification. *Forensic Sci Med Pathol* 2010; 6(3): 195-206.
17. Wetton JH, Tsang CFS, Roney CA, Spriggs AC. An extremely sensitive species-specific ARMs PCR test for the presence of tiger bone DNA. *Forensic Sci Int* 2002; 126(2): 137-44.

18. Wilson GA, Strobeck C, Wu L, Coffin JW. Characterization of microsatellite loci in caribou, *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. Mol Ecol 1997; 6(7): 697-9.
19. Wilson-Wilde L. Wildlife crime: a global problem. Forensic Sci Med Pathol 2010; 6(3): 221-2.
20. Wong KL, Wang J, But PP, Shaw PC. Application of cytochrome b DNA sequences for the authentication of endangered snake species. Forensic Sci Int 2004; 139(1): 49-55.

**ENGLISH**

**A MOLECULAR GENETIC APPROACH TO ROEBUCK INDIVIDUAL IDENTIFICATION IN THE CASE OF POACHING IN SERBIA**

**V. Dimitrijević, Ružica Trailović, B. Petrujkić, P. Simeunović, Jevrosima Stevanović, Z. Stanimirović**

Application of the molecular genetic methods in forensic cases dealing with wild animals has significantly increased recently. These techniques are practically used in order to help solving four key problems : determination of kind of the wild animal, geographic origin, kinship ties and individual identification. In this work the first case of introducing the examination of polymorphism of microsatellite genetic markers within forensic analysis in the cases of poaching in Serbia is presented. The objectives of this forensic analysis was to determine if the meat confiscated during house search of the suspect comes from roebuck origin (*Capreolus capreolus*), which remains had been found by a game warden in the field during closed season, where the suspect denied the offense, claiming that the meat comes from other roebuck that had been shot during the previous hunting season. DNK was isolated from the skin and fur samples taken from the roebuck corpse found in the woods, as well as from the the frozen meat found in the suspect's house. Both amplification and polymorphism examination of the eight microsatellite markers (*ROE01, NVHRT21, NVHRT24, NVHRT48, NVHRT73, RT7 AND RT27*) were carried out. In all the examined samples, the same pattern of variability of the tested microsatellites was determined, that is it was proved that DNK profiles of the samples taken from roebuck corpse were identical to DNK profile of the meat sample found in the suspect's house. This result clearly indicates that all the examined biological samples originate from the same animal, and consequently represents forensically valid evidence in the case of roebuck poaching.

Key words: DNK forensic, microsatellites, individual identification, roebuck, poaching



## МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ САМЦОВ КОСУЛИ В БРАКОНЬЕРСТВЕ В СЕРБИИ

В. Дмитриевич, Ружица Траилович, Б. Петруйкич, П. Симеунович, Евросима Стеванович, З. Станимирович

Применение молекулярно-генетических методов в судебных случаях с участием диких животных заметно растет в последние годы. Эти методы в практике в первую очередь используются для решения четырех основных задач: определение видов диких животных, определения географического происхождения, определения родственных связей и индивидуальной идентификации. В этой статье мы представляем первый случай испытания полиморфизма микросателлитных генетических маркеров при анализе случаев браконьерства в Сербии. Целью судебно-медицинской экспертизы было определить, является ли мясо изъято во время обыска подозреваемого мясом косули (*Capreolus Capreolus*), чьи останки были найдены егерем вне сезона охоты, при чем подозреваемый отрицал преступление, утверждая, что это мясо другой косули, убитой в предыдущем сезоне охоты. ДНК выделяли из образцов кожи и меха взятых из трупов косулей найденных в лесу и из замороженных образцов мяса обнаруженных в доме подозреваемого. Провели амплификацию и испытание полиморфизма восемь микросателлитных маркеров (ROE01, NVHRT16, NVHRT21, NVHRT24, NVHRT48, NVHRT73, RT7 и RT27). Во всех образцах был создан такой же модель изменчивости тестированных микроспутников, т.е. было показано, что профили ДНК образцов, взятых из тела косуля не отличаются от профилей ДНК образцов мяса обнаруженного в доме подозреваемого.

Этот результат ясно показывает, что все испытанные биологические образцы произошли от одного животного и представляет собой судебное доказательство в случае незаконного отстрела косули.

Ключевые слова: ДНК экспертиза, микроспутники, индивидуальная идентификация, косуля и браконьерство

