

## EFEKTI RAZLIČITOG LOVNOG GAZDOVANJA NA GENETSKU STRUKTURU POPULACIJE DIVLJE SVINJE U JUŽNOJ ITALIJI

Rippa, D.,<sup>1</sup> Maselli, V.,<sup>2</sup> Di Donato, S.,<sup>1</sup> Salvioli, L.,<sup>1</sup> Liguori, A.,<sup>3</sup> Ligrone, R.,<sup>2</sup> Fulgione, D.,<sup>1</sup>

**Sažetak:** U ovom radu bavimo se uticajima na različite načine gazdovanja (visoko zaštićeni rezervati, Nacionalni park i uređeno lovište) na populaciju divlje svinje (*Sus scrofa*) u Italiji, uz pomoć genetskih markera. Genetske analize su urađene na 300-bp mtDNK 140 uzoraka i 800 sekvenci iz banke gena (GenBank). Analizirali smo nivoe molekularnog diverziteta i nepoklapanja distribucija za svaku populaciju iz ovih lovnih oblasti. Šesnaest haplotipova je identifikovano u setovima podataka za divlje svinje koji pripadaju italijanskim, evropskim i azijskim lozama. Zanimljivo je da visoko zaštićeni rezervati pokazuju poseban italijanski haplotip, dok ostale dve oblasti pokazuju sličan genetski patern sa visokim genetskim diverzitetom i varijabilnošću. U ove poslednje dve oblasti pečat ojačavanja populacije rađen u prošlosti je očigledan. U Nacionalnom parku bespravni lov bi mogao da bude odgovoran za osiromašenje autohtonih (italijanskih) haplotipova.

**Ključne reči:** divlja svinja; gazdovanje; mtDNK; zaštićene i nezaštićene oblasti; Italija

### Uvod

Divlja svinja, *Sus scrofa*, je značajna vrsta divljači. U osamnaestom i devetnaestom veku, zbog neodgovornog lova, ova vrsta je doživela demografski pad, a negde čak i lokalno gašenje. Od 1980., promene u poljoprivrednoj praksi, postavljanje veštačkih hranilica, progresivno smanjenje grabljivica divlje svinje, favorizovalo je porast populacije iste u celoj evropskoj oblasti [1, 2]. Prema ovom scenariju ekstenzivna reintrodukcija za potrebe lova verovatno je odigrala kritičnu ulogu [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Veliki broj grla divlje svinje iz istočne Evrope preseljen je u srednju Evropu [12], uključujući i Italiju, s tim da se nije vodilo računa o mogućim posledicama za autohtone grupe životinja. U stvari, populacije divlje svinje se mnogo eksploatišu u celoj Evropi. U nekim slučajevima on se smatra resursom među vrstama divljači, sa populacijama koje služe za lov i održavaju se veštačkim popunjavanjem, dok u drugim slučajevima predstavlja napast, odnosno štetočinu [12, 13].

U Italiji, gazdovanje divljom svinjom, kao i drugim vrstama divljači, razlikuje se po oblastima. Na primer, postoje *Visoko zaštićeni rezervati (HPR)*, u kojima je zabranjen lov i ojačavanje populacije divlje svinje, *Nacionalni park (NP)* u kojem su ove aktivnosti bile razvijene do 1995., i *Uređena lovišta (MHA)* (na italijanskom *AT, Ambiti Territoriali di caccia*) u kojima je dozvoljen lov i obnavljanje populacije (Tabela 1). U sva ova tri različita tipa oblasti, populacije divlje svinje imaju svoja staništa. Zaključci o strukturi populacije i genetskim osobinama omogućavaju nam da dobijemo informacije o optimalnim strategijama menadžmenta za ovaj resurs, divljeg vepra.

U ovom radu pokušali smo da procenimo efekat menadžmenta na genetsku strukturu divlje svinje pomoću sredstava molekularne genetike.

### Materijal i metod rada

Dlaka, koža, skeletni mišići, i ušno tkivo uzeti su od 140 divljih svinja iz 3 različite oblasti u Italiji: HPR, NP i MHA (vidi Tabelu 1). Ukupna genomska DNK je ekstrahovana pomoću standardne fenol–hloroform metode [14]. Da bi se povećao mtDNK region parcijalne kontrole (CR) uzeli smo dva prajmera razvijena prema Okumura et al. [15] (mitL76, 5'-AATATGCGACCCCAAAAATTTAACCATT-3' i mitH62, 5'-CCTGCCAAGCGGGTTGCTGG-3'). Svi umnoženi fragmenti prečišćeni su pomoću GFX PCR DNK i gel trake kita za prečišćavanje (Purification Kit) (GE Healthcare, UK) da bi se koristile kao sekvence za poređenje.

<sup>1</sup> Department of Structural and Functional Biology, University of Naples Federico II, Naples, Italy

<sup>2</sup> Department of Environmental Science – University of Naples 2 SUN, Via Vivaldi, 81100 Caserta, Italy;

<sup>3</sup> Ambito Territoriale di Caccia delle Aree Contigue al Parco Nazionale del Cilento e Vallo di Diano. Salerno, Italy

Nukleotidni delovi obe trake određeni su pomoću aparata za sekvencioniranje DNK, Primenjeni Biosistemi (Applied Biosystems 3100 DNK sequencer sa BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit) (Applied Biosystems).

Tabela 1 – Oblasti sa različitim načinom upravljanja lovištima N<sup>0</sup>= broj divljih veprova pregledanih u svakoj tipološkoj oblasti

	Ojačavanje divljeg vepra	Lovna aktivnost	Vreme lova	Prirodni predator	N <sup>0</sup>
Visoko zaštićeni rezervat	Nikad	Ne	Nikad	Ne	13
Nacionalni park	do 1995	krivolov	Uvek	Poneki vuk	93
Uređeno lovište	Aktuelno	Lov	Od sep. do dec.	Poneki vuk	34

Uradili smo set poređenja, uključujući divlje svinje iz naših oglednih oblasti i 800 sekvenci iz banke gena (GeneBank) savremenih divlji svinja i rasa svinja, izabranih kao predstavnika tekućeg genetskog diverziteta zapadnog evroazijske divlje svinje [15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24]. Haplotipovi su izdvojeni iz celokupnog seta podataka pomoću kolaps verzije 1.2 softvera (Posada, dostupan na <http://darwin.uvigo.es>), zasnivajući se na analizi prisustva delecija.

Dobili smo intraspecifične mtDNK filogene. Filogenetska analiza je izvedena pomoću MrBayes softvera v.8 [25] i parametara modela identifikovanih putem ModelTest [26]. Prema HKY85+G+I modelu, procene parametara (uključujući kasnije verovatnoće) i filogenetskih stabala dobijenih kao rezultat pet MrBayes nizova od najmanje 1 miliona generacija za svaki, bile su zabeležene i upoređene. Kasnije verovatnoće ispisane na oba stabla predstavljaju najniže zabeležene vrednosti među datim nizovima.

Nivoi molekularnog diverziteta kao što su diverziteti broja polimorfno mesto, haplotipa (Hd) i nukleotida ( $\pi$ ), konzervacija sekvenci (C), homozigotnost, srednji broj razlika para nukleotida (k) i respektivna varijansa izračunati su pomoću Arlequin verzije 3.01 [27] za naše tri populacije divljeg vepra.

Distribucije nepoklapanja za ove populacije su izvedene prema modelu iznenadne ekspanzije, pomoću DNKsp [28]. Intervali pouzdanosti dobijeni su putem karika kao parametara, pristupa koji se bazira na 10000 simuliranih uzoraka [29]. Očekuje se da populacije koje su doživele demografsku ekspanziju predstavljaju unimodalnu distribuciju nepoklapanja. Obrnuto, populacije koje su doživele demografsko uravnotežavanje trebalo bi da stvore multimodalnu distribuciju [30, 31].

### Rezultati istraživanja i diskusija

Podaci za mitohondrijalne sekvence (300 bp) dobijeni su iz 3 populacije, od čega 13 uzoraka iz HPR (Visoko zaštićen rezervat), 93 iz NP (Nacionalni park) i 34 iz MHA (Uređeno lovište). Bayesian filogenetsko stablo izgrađeno pomoću svih sekvenci zajedno sa drugim sekvencama dobijenim iz banke gena (GenBank), omogućilo nam je da rasporedimo uzorke u različite grupe divljih svinja. U stvari, prethodne genetske studije [22, 32, 33] identifikovale su u Italiji prisustvo tri glavne *S. scrofa* mtDNK loze: azijsku, evropsku i italijansku lozu. Prve dve loze su široko rasprostranjene, dok italijanski haplotipovi nisu primećeni van Italije.

Iz naših podataka, u NP 85% uzoraka pripada evropskoj lozi, a 15% autohtonoj lozi, od čega 11% pripada italijanskoj lozi, a 4% azijskoj lozi. Uzorci u MHA pripadaju 82% evropskoj lozi, a 18% italijanskoj (Slika 1). U HPR umesto toga, nalazimo 100% autohtonog italijanskog divlje svinje (Slika 1).

Broj polimorfni mesta bio je vrlo nizak za poslednju populaciju, sa samo 1 polimorfni mestom, dok nalazimo 8 i 7 polimorfni mesta u NP i u MHA, prema rodeu navođenja.

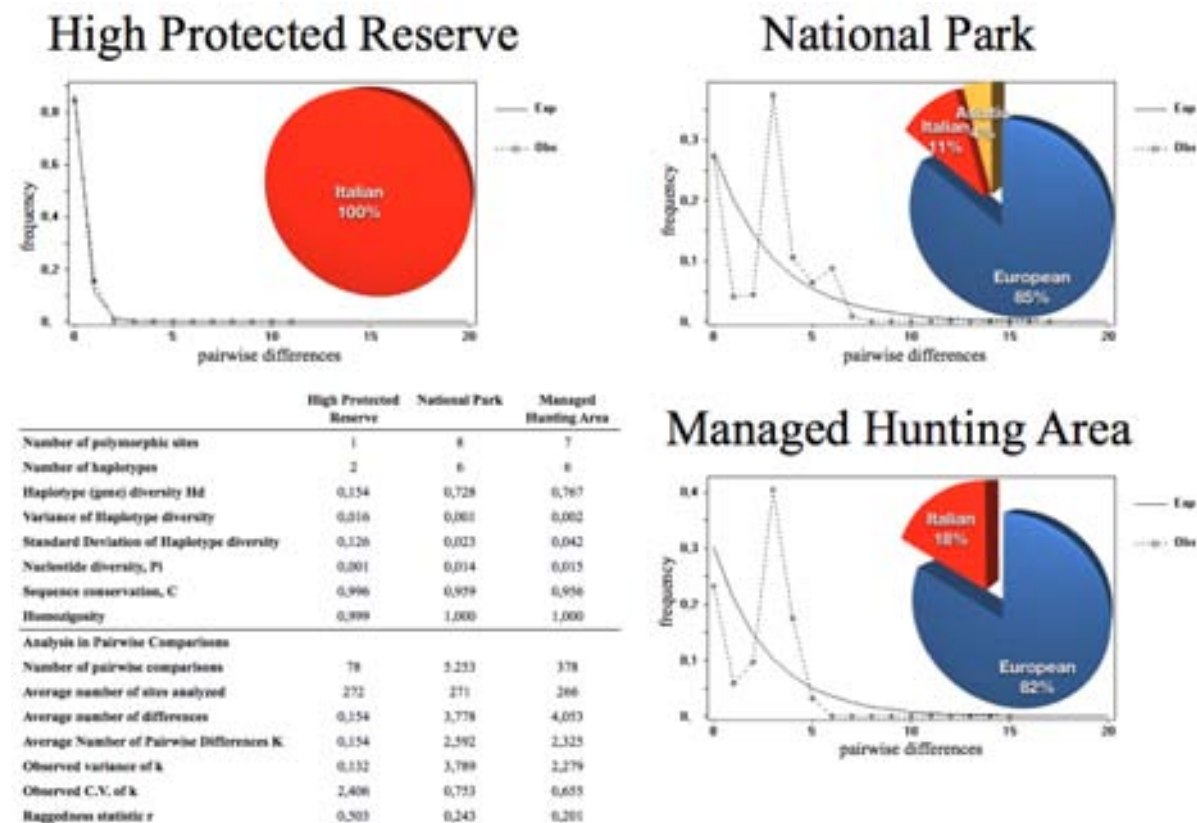
Relativno vreme ekspanzije haplotipnih klastera može se nazreti brižljivim ispitivanjem nepodudarnih distribucija za različite populacije. Mape nepodudarne distribucije bile su bi-modalne u NP i u MHA, iako je gore pomenuta populacija u HPR pokazala ravnu, jednomodalnu krivu (Slika 1).

Distribucija nepoklapanja pokazuje za HPR tipičnu distribuciju populacije koja je doživela demografsku ekspanziju, kao što se i očekuje u ovom slučaju. U druge dve populacije vidimo efekat ljudskog upravljanja

preko ojačavanja, upotrebom alohtonih jedinki, ako uzmemo u obzir rezultat klasterizacije haplotipova. Čak i ako je u NP obnavljanje obustavljeno 1995., to je dobar znak sekundarnog kontakta, kao u MHA.

U suštini primećujemo značajnu razliku samo u HPR, gde je populacija iskusila progresivnu demografsku ekspanziju, verovatno zbog odsustva i prirodnih i ljudskih predatora. Problem je što divlji vepar u ovom slučaju može da se pojavi kao štetočina u dogledno vreme.

Zanimljive su strukture prikazane u NP i MHA. U prvoj, nivo zaštite nije mogao da ukloni pečat prethodnog



Slika 1 – Distribucija nepodudarnosti uzorka Divljeg vepara. Na horizontalnoj osi je broj razlika nukleotidnih mesta između parova jedinki. Otvoreni krugovi pokazuju relativne frekvencije parova sa  $i$  razlikama. Čvrsta linija je teoretska nepodudarna distribucija.

ojačavanja, a bespravni lov može da bude odgovoran za osiromašenje autohtonih (italijanskih) haplotipova. U stvari, iznenađujuće je to da, u HMA, procenat čistog italijanske divlje svinje izgleda visok. Pretpostavili smo da stalno ojačavanje i kratkotrajan lov, koji deluju bolje na populacije nedavno uvedene u polje (alohtone), paradoksalno, mogu da sačuvaju autohtone jedinke koje su bolje prilagođene životnoj sredini Mediterana i shodno tome, teže ih je ubiti. Ovo mišljenje ne može se interpretirati kao povoljno o obnavljanju sa alohtonim uzorcima koji predstavljaju loše upravljanje lovištem. U isto vreme treba podvući da, kao i u NP, nivo zaštite mora da bude paralelno usmeren i ka odsustvu uvođenja alohtonih divlje svinje i ka ograničavanju krivolova. Bez ovog združenog načina upravljanja mogu se dobiti neočekivani i neželjeni rezultati.

Bespravno lovljenje, ustvari, deluje tako da se jedinke ubijaju tokom cele godine, a bez periodičnog ojačavanja alohtonih rasa osiromašuje se autohtona italijanska populacija.

#### Literatura

- [1] Massei, G., Genov, P. Calderini Edagricole, Bologna, 2000. [2] Massei, G., Toso, S. I.N.F.S., Documenti Tecnici, 5, 1993. [3] Apollonio, M., Randi, E., Toso, S. Bollettino Di Zoologia 3: 213–221, 1988. [4] Marsan, A., Spano S., Tognoni C. IBEX Journal of Mountain Ecology, 3: 219–221, 1995. [5] Ueda, G., Kanzaki N. Wildlife Biology in Practice, 1, 2: 146–151, 2005. [6] Boitani, L., Trapanese P., Mattei L. IBEX Journal of Mountain Ecology, 3: 197–201, 1995. [7] Monaco, A., Franzetti B., Pedrotti L., Toso S. Ministero Politiche Agricole e Forestali- I.N.F.S., 2003. [8] Vernesi, C., Crestanello, B., Pecchioli, E., Tartari, D., Caramelli, D., Hauffe, H., Bertorelle, G. Molecular Ecology, 12: 585–595, 2003. [9] Carnevali, L.,

Pedrotti L., Riga F., Toso S. *Biological Conservation Fauna*, 117, I.N.F.S., 2009. [10] Fulgione, D., Rippa D., Maselli V., Russo G., Polese G., De Marco A., Grieco M., Ligrone R. XX congresso Società Italiana di Ecologia, *Le scienze ecologiche oggi*, Bolzano, Italy, 2010. [11] Maselli, V., Fulgione D., Rippa D., Russo G., De Marco A., Ligrone R. XX congresso Società Italiana di Ecologia, *Le scienze ecologiche oggi*, Bolzano, Italy, 2010. [12] Scandura, M., Iacolina, L., Apollonio, Mammal Review, 41, 2: 125–137, 2011. [13] Bieber, C, Ruf, T. *Journal of Applied Ecology* 42: 1203–1213, 2005. [14] Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, 1989. [15] Okumura, N., Kurosawa, Y., Kobayashi, E., Watanobe, T., Ishiguro, N., Yasue, H. & Mitsuhashi, T. *Genetics* 32: 139–147, 2001. [16] Ursing, B.M., Arnason, U. *Journal of Molecular Evolution*, 47: 302–306, 1998. [17] Giuffra, E., Kijas, J.M.H., Amarger, V., Carlborg, O., Jeon, J.T., Andersson, L. *Genetics*, 154: 1785–1791, 2000. [18] Kijas, J.M.H., Andersson, L. *Journal of Molecular Evolution*, 52: 302–308, 2001. [19] Kim, K.I., Lee, J.H., Li, K., Zhang, Y.P., Lee, S.S., Gongora, J., Moran, C. *Animal Genetics*, 33: 19–25, 2002. [20] Alves, A., Ovilo, C., Rodriguez, M.C., Sileo, L. *Animal Genetics*, 34: 319–324, 2003. [21] Gongora, J., Fleming, P., Spencer, P.B.S., Mason, R., Garkavenko, O., Meyer, J.N., Droegemueller, C., Lee, J.H. & Moran, C. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 33: 339–348, 2004. [22] Larson, G., Dobney, K., Albarella, U., Fang, M., Matisoo-Smith, E., Robins, J., Lowden, S., Finlayson, H., Brand, T., Willerslev, E., Rowley-Conwy, P., Andersson, L., Cooper, A. *Science* 307: 1618–1621, 2005. [23] Fang, M., Andersson, L. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273: 1803– 1810, 2006. [24] Fang, M., Berg, F., Ducos, A., Andersson, L. *Animal Genetics*, 37: 459–464, 2006. [25] Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574, 2003. [26] Posada, D., Crandall, K.A. *Bioinformatics*, 14: 817–818, 1998. [27] Excoffier, L., Laval, G., Schneider, D. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47–50, 2005. [28] Librado, P., Rozas, J. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452, 2009. [29] Schneider, S., Excoffier, L. *Genetics*. 152: 1079–1089, 1999. [30] Rogers, A.R., Harpending, H. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552–569, 1992. [31] Slatkin, M., Hudson, R.R. *Genetics* 129: 555–562, 1991. [32] Larson, G., Albarella, U., Dobney, K., Rowley-Conwy, P., Schibler, J., Tresset, A., Vigne, J.D., Edwards, C.J., Schlumbaum, A., Dinu, A., Bălăçescu, A., Dolman, G., Tagliacozzo, A., Manaseryan, N., Miracle, P., Van Wijngaarden-Bakker, L., Masseti, M., Bradley, D.G., Cooper, A. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 15276–15281, 2007. [33] Scandura, M., Iacolina, L., Crestanello, B., Pecchioli, E., Di Benedetto, F., Russo, V., Davoli, R., Apollonio, M., Bertorelle, G. (2008). Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable? *Molecular Ecology* 17: 1745–1762, 2008.