

ZAKLJUČNO POROČILO
O REZULTATIH OPRAVLJENEGA RAZISKOVALNEGA DELA
NA PROJEKTU V OKVIRU CILJNEGA RAZISKOVALNEGA
PROGRAMA (CRP)
»NAŠA HRANA, PODEŽELJE IN NARAVNI VIRI« 2022 – 2024«

I. Predstavitev osnovnih podatkov raziskovalnega projekta

1. Šifra projekta:

V4-2223

2. 1. Naslov projekta v slovenskem jeziku:

Ritje divjih prašičev: vzroki, posledice in možnosti za zmanjšanje škod ter konfliktov

2.2. Naslov projekta v angleškem jeziku:

Wild boar rooting: causes, consequences, possibilities for reducing damages

3. Ključne besede projekta

3.1. Ključne besede projekta v slovenskem jeziku:

Divji prašič, ritje, škode, travinje, konflikti, ekosistemska vloga, prehrana

3.2. Ključne besede projekta v angleškem jeziku:

Wild boar, rooting, damages, grassland, conflicts, ecosystem value, diet

4. Šifra ter ime in priimek vodje projekta:

18112 Boštjan Pokorny

5. Naziv nosilne raziskovalne organizacije:

Fakulteta za varstvo okolja (2872)

5.1. Seznam sodelujočih raziskovalnih organizacij (RO):

- Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta (481)
- Univerza na Primorskem, Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije (1988)
- Gozdarski inštitut Slovenije (404)

6. Raziskovalno področje po šifrantu ARRS¹:

4.01 Gozdarstvo, lesarstvo in papirništvo

7. Raziskovalno področje po šifrantu FOS²:

4.01 Kmetijstvo, gozdarstvo in ribištvo

¹ Spletni naslov šifrantu ARRS: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/sif-vpp.asp>

² Spletni naslov šifrantu FOS: <http://www.arrs.gov.si/sl/gradivo/sifranti/klasif-znan-FOS.asp>

8. Sofinancer/sofinancerji:

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano
Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost RS

Datum: 15. 10. 2024

Podpis vodje projekta:

prof. dr. Boštjan Pokorny

**Boštjan
Pokorny** Digitalno podpisal
Boštjan Pokorny
Datum: 2024.10.15
15:21:34 +02'00'

Podpis izvajalca:

doc. dr. Gašper Gantar, direktor

 Digitalno podpisal
Gašper Gantar
Datum: 2024.10.15
15:27:37 +02'00'

II. Vsebinska struktura zaključnega poročila o rezultatih raziskovalnega projekta v okviru CRP

1. Cilji projekta:

1.1. Ali so bili cilji projekta doseženi? (v izbran kvadrater vtispaš črko x)

☒ a) v celoti

☐ b) delno

☐ c) ne

Če b) in c), je potrebna utemeljitev.

/

1.2. Ali so se cilji projekta med raziskavo spremenili?

☐ a) da

☒ b) ne

Če so se, je potrebna utemeljitev:

/

2. Vsebinsko poročilo o realizaciji predloženega programa dela

Izhodišče raziskave

V zadnjih desetletjih povsod po Evropi izrazito naraščata številčnost in prostorska razširjenost divjega prašiča (*Sus scrofa*). Ob trenutnem pomanjkanju podatkov o populacijskih gostotah takšen trend najboljše prikazujejo podatki o odstrelu, ki je zelo dober kazalnik (medletne variabilnosti) številčnosti te vrste. Tako se je v obdobju 1982–2012 odstrel divjih prašičev v večini evropskih držav povečal za petkrat do desetkrat (Massei in sod., 2015), v zadnjih desetih letih pa je rast odstrela/številčnosti še bistveno bolj strma (Apollonio in sod., v pripravi). Podobno je tudi v Sloveniji: odstrel divjih prašičev se je po letu 1955, ko je bilo odstreljenih 230 osebkov, povečal za kar 82-krat, tj. na 18.963 odstreljenih oz. 19.377 odvzetih osebkov v letu 2021 oz. 15.990 (16.241) v letu 2023 (Oslis, 2024). Takšni trendi v populacijski dinamiki vrste in večanju njene prostorske razširjenosti predstavljajo poleg intenziviranja ekosistemske vloge in neposrednih koristi, ki jih ima vrsta za ekosisteme/okolje, tudi velik upravljavski izziv. Naraščanje številčnosti divjih prašičev ima namreč za posledico tudi večanje števila konfliktnih situacij, zlasti škod na kmetijskih površinah (zbrano v Pokorny in Jelenko, 2013). Slednje je še posebej problematično, ker napovedni prostorski modeli kažejo, da bi se lahko (ob nespremenjenih zunanjih dejavnikih) številčnost, populacijske gostote in razširjenost vrste v Sloveniji v prihodnje še povečevali (Stergar, 2017).

Približno polovica vseh letno nastalih škod po divjem prašiču v Sloveniji (vključno s tistimi, ki so sanirane s poravnavanjem travne ruše in zanje ni izplačana odškodnina) nastane na travinju zaradi ritja; te škode so prostorsko razpršene, časovno raztegnjene na skoraj celo leto in jih je težko preprečevati oz. vsaj zmanjševati. Zaradi tega in premajhnega poznavanja vzrokov in posledic ritja, vključno s pozitivnimi vplivi, ritje divjih prašičev na kmetijskih površinah (predvsem travnikih) povzroča največ konfliktov med lastniki zemljišč ter upravljavci populacij. Vendar je prav zaradi ritja (tako na kmetijskih površinah kot tudi v gozdovih) divji prašič prepoznan kot zelo pomemben »okoljski inženir«, ki vpliva na spremembo strukture in dinamike celotne življenjske združbe (Sims, 2005), vključno z lastnostmi tal, biotsko raznolikostjo in razvojem kopenskih ekosistemov. Ritje ima namreč številne (negativne in pozitivne) posledice, npr.: poškodbe rastlin, in sicer neposredno zaradi prehranjevanja ali večje izpostavljenosti drugim biotskim in abiotskim dejavnikom; mešanje horizontov tal in zmanjšanje debeline zgornjega organskega horizonta; povečanje talne erozije, kompaktnosti in zaglinevanja tal; povečanje hitrosti razgradnje organske snovi, kroženja hranil in kislosti ter zmanjšanje količine dostopnih hranil; povečanje kalivosti semen in spreminjanje sestave vegetacije oz. vrstne pestrosti v gozdnih ter travniških ekosistemih (zbrano v Jelenko in sod., 2010; Pokorny in Jelenko, 2013).

V Sloveniji smo v preteklosti v sklopu CRP projekta *Divji prašič in škode v agrarni krajini* (Jelenko in sod., 2010) preliminarno že preučevali vpliv talnih lastnosti na ritje divjih prašičev, in sicer

primerjalno na pogosto razritih in nerazritih delih istih travnikov v dveh raznolikih območjih (gričevnato-hribovito obrobje Šaleške in Savinjske doline; višje ležeči travniki v Idrijskem hribovju). Na skupaj 18 parno-primerjalnih ploskvah smo ugotovili, da se ritje pojavlja tam, kjer so večje vsebnosti hranil (ogljika, dušika, kalija, fosforja) in so posledično boljši življenjski pogoji za talno favno oz. rastline z večjimi potrebami po hranilih; v gričevnato-hribovitem svetu smo na območju ritin ugotovili statistično značilno večjo abundanco makroartropodske favne in deževnikov, na višje ležečih travnikih pa čebulic spomladanskega žafrana. Ugotovitve nakazujejo, da lahko ima antropogeni vnos hranil oz. gnojenje pomemben vpliv na nastanek ritin na travinju. Vendar pa ne vemo, kakšen je ta vpliv (oz. vpliv drugih dejavnikov) v drugih območjih Slovenije, vzdolž širokega gradienta populacijskih gostot vrste (ki je sedaj mnogo širši, gostote pa bistveno večje) in pri različnih praksah vnosa hranil (npr. raznoliki režimi, načini ter količine gnojenja) kot tudi ob različnih klimatskih pogojih (npr. količina in razporeditev padavin).

Način rabe travinja je v Sloveniji zelo raznolik, od intenzivnih travnikov za pridelavo silažne krme in sena do ekstenzivne paše na planinskih pašnikih. Posledično se med območji bistveno razlikujejo antropogeni vnosi hranil, vzroki za ritje divjih prašičev in vpliv le-tega. Povsod pa je dejanski vpliv ritja na bioprodukcijo in vrstno sestavo/pestrost travinja domala neznan. Pri večjih populacijskih gostotah se ritje divjih prašičev pojavlja tudi na odprtih površinah, kjer se tal že desetletja ne obdeluje oz. ni recentnih antropogenih vnosov hranil (primer raziskovalno-eksperimentalnega poligona/lovišča Prolom pri Glini na Hrvaškem); tudi tam je – podobno, kot kažejo izkušnje iz Slovenije – značilno, da divji prašiči praviloma rijejo po istih delih travnikov/pašnikov oz. odprtih površin (Šprem Nikica; ustno sporočilo). Za kompleksno razumevanje vzrokov za selektivno ritje divjih prašičev je zato smiselno izvesti primerjalne analize ritja v pogojih raznolike kmetijske rabe (tj. v različnih območjih Slovenije), na desetletja zapuščenih kmetijskih površinah brez recentnih antropogenih vnosov hranil in tudi v gozdnih ekosistemih.

Divji prašiči rijejo predvsem zaradi prehranjevanja oz. iskanja prehranskih virov v tleh. V večini primerov gre za beljakovinske vire, tj. različne nevretenčarske organizme in male sesalce (Jelenko in sod., 2009b). S prehranjevanjem z njimi divji prašiči zmanjšujejo številčnosti številnih organizmov oz. vrst, ki lahko sicer povzročajo škodo kmetijski proizvodnji; posledično poleg neposredne škode zaradi izpada dela pridelka/odkosa travinja povzročajo tudi kaskadno pogojene koristi zaradi zmanjšanja vplivov drugih organizmov (zbrano v Pokorny in Jelenko, 2013). Vendar je tovrstni vpliv divjih prašičev pogosto spregledan oz. zelo slabo poznan: pri nas ni bilo do sedaj opravljene nobene raziskave, v kateri bi ugotavljali zastopanost nevretenčarskih organizmov v prehrani divjega prašiča in njegov vpliv na zmanjšanje populacij teh vrst. Poleg tega ne vemo, kakšen je dolgotrajen (celoleten) vpliv ritja na donos travinja, in sicer tako v smislu spremenjene količine kasnejših odkosov kot tudi kakovosti oz. hranilne vrednosti.

Vsebina, metode in realizacija predvidenega programa dela

V projektu smo sodelovali strokovnjaki z več institucij: Fakultete za varstvo okolja (v nadaljevanju: **FVO**), Univerze v Ljubljani: Biotehniška fakulteta (**BF**), Univerze na Primorskem: Fakulteta za matematiko, naravoslovje in informacijske tehnologije (**UP FAMNIT**) in Gozdarskega inštituta Slovenije (**GIS**). Kot mednarodni partner z velikimi izkušnjami in znanjem na področju raziskav in upravljanja divjega prašiča je bila v projektno skupino vključena tudi Agronomska fakulteta Vseučilišča v Zagrebu (**AFZG**). S tako interdisciplinarno skupino smo zagotovili celotno paleto za izvedbo projekta potrebnih znanj, analitskih pristopov, metodoloških in organizacijskih prijemov, pridobili pa smo tudi možnosti izvajanja dela aktivnosti v 7.700 ha velikem in edinstvenem raziskovalno-eksperimentalnem poligonu/lovišču Prolom, ki je v upravljanju AFZG.

Projekt smo izvajali v različnih območjih Slovenije, in sicer vzdolž gradienta populacijskih gostot divjega prašiča in upoštevaje različen namen ter intenziteto rabe travinja (intenzivni in ekstenzivni travniki v gričevnatem/hribovitem svetu, sredogorski pašniki), in sicer v naslednjih lovskoupravljaljskih območjih (LUO) oz. predelih: Primorsko LUO (Brkini, Istra, Kras), Savinjsko-Kozjansko LUO (gričevnato-hribovito obrobje Šaleške doline in Spodnje Savinjske doline), Kamniško-Savinjsko LUO (Menina planina) ter Zasavsko LUO (Zasavsko hribovje).

Upoštevaje izhodišča, probleme in raziskovalne cilje smo projekt izvajali v več ločenih, a vendarle medsebojno prepletenih in povezanih delovnih svežnjih (sklopih; DS), ki so predstavljeni v nadaljevanju poročila. Na tem mestu (v tehničnem poročilu) za vsak DS predstavljamo izhodišča in povzetek metodologije; le-ta je v celoti skupaj z ugotovitvami in razpravo podana v vsebinskem poročilu (v prilogi).

DS-1: Pregled dosedanjih ugotovitev o vzrokih in posledicah ritja, ekosistemski vlogi divjih prašičev ter vplivih krmljenja na fitnes in populacijsko dinamiko vrste

Izhodišča

Za uspešno reševanje izzivov oz. konfliktnih situacij na področju upravljanja populacij divjadi, kot so npr. škode po divjem prašiču na travinju, je treba poznati značilnosti nastanka in razumeti najpomembnejše vzročno-posledične povezave, v tem primeru ritja kot evolucijsko determinirane prehranske aktivnosti divjih prašičev. Pri tem so lahko v veliko pomoč znanstveno-raziskovalne ugotovitve oz. odnosi/povezave, ki vladajo na širšem/globalnem nivoju. Poleg samih neposrednih vzrokov in posledic ritja divjih prašičev je pomembno poznati tudi širšo ekosistemsko vlogo vrste, ki jo v zelo pomembnem obsegu določa prav ritje, zaradi česar je divji prašič prepoznan kot pomemben »ekološki inženir« (Sims, 2005). Ker je med številčnostjo oz. populacijsko dinamiko vrste in škodami po divjem prašiču na kmetijskih površinah očitna pozitivna soodvisnost (ZGS, 2011), po dožemanju

nekaterih uporabnikov prostora pa na populacijsko dinamiko vrste zelo pomembno vpliva krmljenje, je smiselno zbrati in sintetizirati tudi znanstvene ugotovitve o povezavi med antropogenim vnosom hrane in številčnostjo divjih prašičev (oz. medletno variabilnostjo le-te). Za celostno razumevanje naštetih odnosov oz. značilnosti in za kasnejše sprejemanje primernih upravljavskih odločitev so, poleg novo pridobljenih domačih znanj, lahko v veliko pomoč prav znanstveno verificirane ugotovitve, pridobljene drugod po svetu in še zlasti v Evropi, kjer je divji prašič domorodna vrsta.

Metode

V prvem delovnem sklopu smo nadgradili/ažurirali v preteklosti že pripravljen pregled vzrokov in posledic ritja ter celovite ekosistemske vloge divjega prašiča (Pokorny in Jelenko, 2013), in sicer z vključitvijo ugotovitev, pridobljenih v svetu (s poudarkom na Evropi) v zadnjih desetih letih. Za pregled objavljene znanstvene literature o ekosistemski vlogi in ritju divjih prašičev smo uporabili različne spletne zbirke (*Web of Science*, *Science Direct*, *Google Scholar*) in ustrezne kombinacije ključnih besed, besednih zvez oz. kombinacij besed v angleškem jeziku, npr. *wild boar / wild pig in ecosystem value / rooting / damages / meadow / pasture* itd. Podobno smo storili tudi za iskanje znanstvenih ugotovitev o vplivu krmljenja na številčnost oz. populacijsko dinamiko divjih prašičev, in sicer tudi v povezavi oz. relativno glede na druge pomembne prehranske vire; pri čemer smo v brskalnikih uporabljali naslednje kombinacije ključnih besed: *wild boar abundance / body mass / reproductive potential / litter size / population dynamic in supplementary feeding / baiting / anthropogenic food sources / seed masting* itd. Skupno smo zbrali in pregledali več kot 200 virov.

DS-2: Prostorsko-habitatna analiza vplivnih dejavnikov, ki vplivajo na nastanek ritin na travinju

Izhodišča

Divji prašič je ena najbolj razširjenih vrst sesalcev na svetu (Massei in Genov, 2004). Njegov areal se danes namreč razteza po vseh kontinentih razen Antarktike. V Evraziji in severni Afriki je divji prašič sicer avtohtona vrsta, medtem ko je bila drugod po svetu v okolje vnesena s strani človeka (Barrios-Garcia in Ballari, 2012). Poleg širokega areala je za divjega prašiča značilno tudi doseganje mestoma visokih populacijskih gostot zaradi izjemne sposobnosti prilagajanja vrste na okoljske razmere in visokega reprodukcijskega potenciala (Geisser in Reyer, 2005). Hkrati so se zaradi različnih antropogenih sprememb okolja divjemu prašiču izboljšali habitatni pogoji, zato se po letu 1960 soočamo z naraščanjem njegove številčnosti v večjem delu območja razširjenosti vrste (Sodeikat in Pohlmeier, 2002). Danes je torej omenjena vrsta ena najbolj uspešnih sinatropskih prostoživečih vrst v Evropi.

Seveda to tako v Sloveniji kot tudi drugod po Evropi predstavlja velik upravljavski izziv, saj je divji prašič prostoživeča vrsta, ki jo v delu javnosti spremlja izrazita nenaklonjenost (Stergar, 2014). Eden od razlogov za to je tudi za vrsto značilen vedenjski vzorec, ki mu pravimo ritje (ang. *rooting*). Divji prašiči namreč – najpogosteje v skupinah, kar še poveča obseg posledic – v iskanju hrane prerivajo zgornje plasti prsti (Welandar, 2000). Kljub temu je divji prašič z vidika vloge v okolju še vedno relativno slabo raziskana vrsta. Pomanjkanje objav na temo ekologije divjih prašičev je nasploh izrazito v njegovem avtohtonem arealu, torej tudi v evropskem prostoru (Pokorny in Jelenko, 2013). Z namenom nadgradnje znanja na področju poznavanja vrste smo v okviru tega delovnega sklopa raziskovali nekatere aspekte življenja divjih prašičev, vezanih na ritje in nastajanje ritin s ciljem, da bi novo pridobljeno znanje v prihodnosti lahko tudi aplicirali na preprečevanje in reševanje konfliktov med upravljalci populacij ter lastniki zemljišč, na katerih se škode po divjem prašiču pojavljajo.

Metode

Zbiranje podatkov in proučevano območje

Za obdobje 2020 do 2022 smo iz podatkovne baze lovskoinformacijskega sistema LISjak zbrali in geokodirali zapisnike o prijavljenih škodah na travinju in drugih kmetijskih kulturah na območju vseh lovskoupravljaljskih območij v Sloveniji. Podatke o relativnih populacijskih gostotah divjega prašiča smo za obdobje 2016–2023 pridobili iz Osrednjega lovskoinformacijskega sistema OSLIS, pri čemer smo spremenljivko relativnih gostot opredelili na podlagi geokodiranih podatkov o odvzemu. Izdelali smo kernelsko karto gostote prijavljenih škod, ki je bila podlaga za prostorsko analizo habitatnih in populacijskih dejavnikov za nastanek škodnih dogodkov oziroma nastanek ritin na travinju. Na podlagi teh podatkov smo izdelali eksplicitne habitatne modele pojavljanja vseh škod ter ločeno pojavljanja ritin na travinju, in sicer z vključitvijo večjega števila potencialno pojasnjevalnih spremenljivk o dejanskih rabah (kulturah), oddaljenosti lokacij ritin od gozdnega roba, zgradbi/značilnostih prostora in drugih domnevno pomembnih okoljskih dejavnikov, prisotnosti krmišč ter kazalnikov lokalne populacijske gostote divjega prašiča (glejte poglavje: Modeliranje vpliva okoljskih spremenljivk na prisotnost ritin divjih prašičev).

Za pet izbranih lovišč (Oljka, Gornji Grad, Vransko, Žabnik Obrov in Rižana) smo pojavljanje ritin podrobneje locirali oz. kartirali neposredno na terenu. V izbranih loviščih smo v sodelovanju z lokalnimi lovci ter po potrebi tudi lastniki zemljišč skušali pridobiti čim bolj zanesljive podatke o načinu gnojenja (gnoj vs. gnojevka vs. umetna gnojila; vrsta gnoja) in pogostosti le-tega. Te podatke smo vključili v analizo vzorcev dejavnikov (z metodo naključna gozdovja – angl. *Random forests*), s pomočjo katere smo želeli izluščiti, pri kakšnih režimih gnojenja znotraj podobnih ekoloških razmer ter ob kakšnih vegetacijskih in drugih okoljskih razmerah prihaja do ritja divjih prašičev.

V ta namen smo izdelali atlase v merilu 1:15.000, ki omogočajo natančno beleženje lokacij ritin v zadnjih 18 mesecih (januar 2023 – junij 2024), ter pridobili lokalne podatke o načinih rabe površin ter izbranih prostorskih spremenljivk (ključne rastlinske vrste za divjega prašiča ter značilnosti tal).

Na izbranih lokacijah ritin smo uporabili brezpilotni zrakoplov oz. dron (DJI Mavic2 Enterprise Dual), ki ima ob visokoločljivostni kameri še termovizijsko spektralno kamero, s pomočjo katere smo posneli površino območja ritin. Posnetke smo nato obdelali v programskem okolju ENVI, ki je orodje za obdelavo in analizo hiperspektralnih in multispektralnih podatkov, pri čemer smo lahko razlikovali območja ritin (gola tla) od okoliške vegetacije oziroma travinja. Tako smo lahko opredelili obseg oziroma neto površino ritin ter določili delež poškodovane travne površine.

Modeliranje vpliva okoljskih spremenljivk na prisotnost ritin divjih prašičev

Pristop z generaliziranim linearnim modeliranjem. Za pregled spremenljivk, ki značilno vplivajo na pojavljanje ritin divjih prašičev ter ovrednotenje njihovega vpliva, smo uporabili generalizirane linearne modele z mešanimi učinki (angl. *generalized linear mixed effect models* – GLMM). Ti predstavljajo nadgradnjo generaliziranih linearnih modelov (angl. *generalized linear models* – GLM), ki poleg fiksni spremenljivk vključujejo tudi spremenljivke z mešanim (nepoznanim oziroma nedirektnim) vplivom (angl. *random effect*) – spremenljivke, ki lahko dodatno pojasnijo pojav na račun kvantifikacije variacij med osebkami, območji in podobnimi spremenljivkami (Bolker in sod., 2009), ki na višji ravni zajamejo spremenljivke, ki bi jih bilo praktično nemogoče zajeti.

Točke prisotnosti ritin in drugih lokacij škodnih dogodkov smo pridobili iz baze škodnih primerov med leti 2020 in 2022 (Lisjak, 2023), ki predstavljajo lokacije ritin divjega prašiča na različnih kulturah. Med nadaljnjim modeliranjem smo ločili med uporabo vseh točk (N = 6726) ter uporabo točk na traviščih (N = 4682), kjer je kultura, na kateri se je zabeležilo škodni primer navedena kot travna ruša ali travne kulture. V obeh primerih smo uporabili 2959 naključnih točk, ki v modelu predstavljajo točke ozadja oziroma točke naključnosti.

Zanimal nas je vpliv naslednjih okoljskih spremenljivk, ki smo jih določili kot fiksne spremenljivke ter pripravili v rastrski obliki v resoluciji 500 x 500 m v programu QGIS (QGIS Development Team, 2023): oddaljenost od gozda, oddaljenost od večjih cest, oddaljenost od vseh cest, oddaljenost od zgradb, prisotnost gozda obliki binarnega rastra, indeks človeškega prstnega odtisa (angl. *human footprint index*), gostota pokrovnosti z gozdom, gostota odstrela divjih prašičev, nadmorska višina v obliki digitalnega modela nadmorskih višin ter iz njega izpeljane naklon, grobost (angl. *terrain ruggedness index*) in razgibanost (angl. *roughness*) površja ter pozicija terena (pobočje, vznožje, ravnina, ovršna površina hriba) (angl. *topological position index*). Dodatno smo na območju 1 km ter 3 km okoli točk (prisotnosti in naključnih točk) pridobili tako imenovane percepcijske spremenljivke v obliki deleža urbanih, kmetijskih, traviščnih, gozdnih in drugih površin (ki vključujejo mokrišča,

gole ter vodne površine), in sicer s pomočjo tamponskih con in orodja Zonal histogram v programu QGIS (QGIS Development Team, 2023). Za spremenljivko z mešanim vplivom (angl. *random effect*) smo izbrali območja posameznih LUO.

Na spremenljivkah smo najprej opravili test multikolinearnosti z metodo Spearmanovega ρ koeficienta v osnovnem R paketu stats (R Core Team, 2024) v programskem okolju R Studio (Rstudio Team, 2024). Pare spremenljivk z absolutnimi vrednostmi več kot 0,5 (Booth in sod., 1994; cit. po Zuur in sod., 2009) smo označili ter pripravili kombinacije spremenljivk, kjer je lahko prisotna le ena iz koreliranega para. Dobili smo 30 različnih kombinacij fiksnih spremenljivk za 30 različnih modelov, vsakemu pa je bila dodana tudi spremenljivka z mešanim vplivom – območja LUO.

Za izdelavo modelov smo uporabili paket lme4 (Bates in sod., 2015) v programskem okolju R (Rstudio Team, 2024; R Core Team, 2024), zaradi binarne narave odzivne spremenljivke (prisotnost ali odsotnost – 1 ali 0) smo izbrali binomsko skupino funkcij s povezano logit (logistično) funkcijo. Modele smo ločeno izdelali na celotnem setu točk prisotnosti ter setu točk na travnih kulturah in travni ruši. Najboljši model za vsak set smo izbrali na podlagi AIC vrednosti. Ker se je spremenljivka z mešanim vplivom pri vseh modelih izkazala za pomembno (je v veliki meri doprinesla k varianci oziroma je pomembno pridodala k opisu pojava), smo ostali pri uporabi GLMM.

Pristop z metodo MaxEnt

Za dodaten pregled spremenljivk, ki vplivajo na prisotnost ritin divjih prašičev in kasnejšo prostorsko napoved primernosti prostora za ritje divjih prašičev smo izdelali tudi model z MaxEnt algoritmom strojnega učenja (Phillips in sod., 2006; Phillips in Dudík, 2008). Pri metodi gre za oceno verjetnosti razširjenosti glede na verjetnost razširjenosti pod največjo entropijo, ki je omejena z danimi podatki (vrednostmi okoljskih spremenljivk na lokacijah prisotnosti ritin v primerjavi z vrednostmi na naključnih točkah). Prednost metode sta med drugim njena sposobnost uporabe majhnih podatkovnih setov ter delo zgolj s podatki o prisotnosti (pojavnosti) vrste (Phillips in sod., 2006).

Uporabili smo enak set točk prisotnosti ritin, prav tako smo v nadaljevanju ločili med uporabo vseh točk ter uporabo točk na travniščih. Pripravili smo tudi 10.000 naključnih točk, ki v MaxEnt-u služijo kot točke ozadja za strojno učenje. Pred modeliranjem smo odstranili vse točke, ki so bile podvojene znotraj celic rastrov okoljskih spremenljivk. Ker v primeru prostorskih predikcij MaxEnt potrebuje podatke o okoljskih spremenljivkah v rastrski obliki (za razliko od predhodno ekstrahiranih vrednostih pri modeliranju z GLMM), smo pripravili tudi percepcijske raste rabe tal na območju 1 in 3 km okoli točk (prej pripravljenih v obliki spremenljivk, vezanih na same točke, z orodjem Zonal Histogram v programu QGIS (QGIS Development Team, 2023)) s pomočjo r.neighbor GRASS GIS orodja v programu QGIS (GRASS Development Team, 2020; QGIS Development Team, 2023).

Okoljske spremenljivke smo testirali za korelacijo s faktorjem variacije inflacije (angl. *variation inflation factor* – VIF) s pomočjo paketa *usdm* (Naimi in sod., 2014) v programskem okolju R (RStudio Team, 2024; R Core Team, 2024) ter odstranili spremenljivke z VIF vrednostjo večjo od 5 (Guissan in sod., 2017). Tako smo pri modeliranju uporabili naslednje spremenljivke: nadmorska višina, oddaljenost od vseh cest, oddaljenost od zgradb, oddaljenost od gozda, oddaljenost od večjih cest, binarni raster prisotnosti gozda, gostota odstrela, indeks človeškega odtisa, kategorična spremenljivka lovskoupravljaljskih območij (ki je bila v GLMM uporabljena kot spremenljivka z mešanim vplivom, tukaj pa smo jo uporabili kot kategorično spremenljivko), gostota pokrovnosti z gozdom, pozicija terena.

Modele z vsemi točkami in točkami na traviščih smo pripravili s pomočjo paketa *ENMeval* (Kass in sod., 2021) v programskem okolju R (RStudio Team, 2024; R Core Team, 2024). Uporabili smo set različnih nastavitev (sensu Kuralt in sod., 2023) – za multiplikator regularizacije (angl. *Regularization multiplier*), ki določa kompleksnost modela, smo uporabili vrednosti med 2 in 5 (razmak 0,5), za razrede značilnosti oziroma odnosov med spremenljivkami (angl. *feature classes*), ki opisujejo obliko krivulje odziva, pa linearnega, kvadratnega in tečajnega (angl. *hinge* – posebna oblika krivulje s pragom). Za metodo delitve (angl. *partitioning method*) smo izbrali opcijo “checkerboard2”.

Za izbiro najboljšega modela smo izbrali kombinacijo kriterijev po principu, ki so ga za modeliranje uporabili Kuralt in sod. (2023): dAIC, CBI, sekvenčno metodo (ki izbere najprej model z najmanjšo povprečno vrednostjo testa izpustitve (angl. *average test omission*) in nato še model z najvišjo AUC vrednostjo (Radosavljevic in Anderson, 2014; Kass in sod., 2020)) ter nato pridobljen set najboljših modelov rangirali in izbrali tistega z najmanjšim številom koeficientov – najbolj enostavnega.

Analiza značilnosti mikrolokacij ritin s pomočjo metode »Naključna gozdovja«

Naključno gozdovje (angl. *Random forests*) je metoda strojnega učenja, ki se uporablja tako za klasifikacijo kot tudi za regresijo. Temelji na konceptu združevanja napovedi več odločitvenih dreves, s čimer doseže boljše rezultate in robustnost napovedi. Metoda je zasnovana na pristopu *bagging* (angl. *bootstrap aggregating*), ki zmanjšuje preveliko prilaganje (*overfitting*) in izboljša natančnost modela. Naključno gozdovje ima običajno veliko natančnost, saj temelji na povprečenju napovedi več modelov, kar zmanjša verjetnost prekomernega prilaganja. Modeli so robustni tudi pri večjem številu nepotrebnih spremenljivk in hrupu v podatkih.

Naključno gozdovje je sestavljeno iz velikega števila posameznih odločitvenih dreves, ki delujejo kot “komite”. Vsako drevo v gozdovju daje svojo napoved, pri čemer se pri regresiji upošteva povprečje, pri klasifikaciji pa najpogostejši razred (glasovanje z večino). Tako se ustvarijo bolj stabilni in splošni modeli, ki so manj občutljivi na motnje v podatkih.

Koncept naključnega gozdovja temelji na dveh pomembnih pristopih:

1. Bootstrap Vzorčenje: Za izgradnjo vsakega posameznega drevesa smo uporabili metoda bagging, kar pomeni, da smo iz izvornih podatkov večkrat naključno vzorčili podmnožice podatkov. Vsako odločitveno drevo dobi nekoliko drugačne podatke, zaradi česar so drevesa med seboj različna. Ker se vzorčenje izvede z vračanjem, lahko posamezni podatki nastopajo večkrat znotraj istega vzorca.

2. Naključno izbiranje spremenljivk: Naključno gozdovje dodatno povečuje raznolikost znotraj dreves z naključnim izbiranjem podmnožice pojasnjevalnih spremenljivk pri vsakem razcepu drevesa. Namesto da pri vsakem razcepu preveri vse razpoložljive spremenljivke, se upošteva samo naključno izbran manjši nabor spremenljivk. To pomaga zmanjšati korelacijo med posameznimi drevesi in posledično izboljša učinkovitost celotnega modela.

Postopek gradnje naključnega gozdovja je bil sestavljen iz več korakov. Iz celotnega nabora podatkov o mikrolokacijah ritin smo naključno vzeli 50 podmnožic podatkov. Za vsako vzorčeno podmnožico smo izdelali odločitveno drevo. Za drevesa nismo uporabili omejitev (angl. *pruning*), kar pomeni, da smo vsakemu drevesu dovolili, da se popolnoma prilagodi svoji podmnožici. To sicer vodi v prilaganje posameznega drevesa, vendar metoda ta problem odpravi s povprečenjem. Pri vsakem razcepu drevesa smo izbrali naključen nabor spremenljivk (parametriziran s hiperparametrom *mtry*), s čimer se zmanjša korelacija med drevesi in omogoči večja variabilnost modelov. Ko so bila vsa drevesa zgrajena, smo za napovedovanje uporabili povprečenje (regresija), katerega končni rezultat je povprečje napovedi vseh dreves.

DS-3: Vpliv talnih lastnosti in dostopnosti prehranskih virov za divjega prašiča v tleh na ritje

Izhodišča

Ritine, ki jih divji prašiči vsako leto naredijo na travnikih, njivah in v gozdovih, so povezane z njihovim prehranjevanjem oz. iskanjem prehransko zanimivih virov v tleh. V večini primerov gre za beljakovinske vire, tj. različne nevretenčarske organizme in male sesalce (Jelenko in sod., 2009). Ker ritje pomembno vpliva na spreminjanje (an)organske snovi in procese v tleh, povzroča tudi spremembo strukture in dinamike celotne življenjske združbe oziroma ekosistemov. Zlasti zaradi ritja so divji prašiči zelo pomembni »okoljski inženirji« in imajo kot takšni poudarjeno ekosistemsko vlogo (Sims, 2005).

Zaradi ritja se zmanjša debelina zgornjega organskega horizonta (Singer in sod., 1984), povečajo se lahko talna erozija (Bratton, 1974; Mauri in sod., 2019), zbitost tal, zaglinjevanje in spiranje hranil (Bratton, 1975; Sims, 2005; Bueno, 2011). Kljub temu je ritje divjih prašičev z ekosistemskega in tudi antropocentričnega vidika lahko tudi koristno. Ritje namreč pospešuje razgradnjo (dekompozicijo) organske snovi zaradi vnosa gozdnega opada v tla, zaradi česar se, npr., zmanjša nevarnost gozdnih

požarov (Jeziarski in Myrcha, 1975). Vnos opada v tla lahko bistveno prispeva k zadrževanju vlage (Singer in sod., 1984), kar zlasti na ilovnatih tleh pozitivno vpliva na kalitev semen, rast rastlin in na talno živalstvo (Sims, 2005), povečana akumulacija vode pa lahko tudi zmanjša talno erozijo na razritih območjih (Pitta-Osses in sod., 2020). Nasprotno lahko v tleh, revnih z organsko snovjo, ritje zmanjša talno vlažnost zaradi razbitja in izpostavitve talnih horizontov soncu, kar vpliva na povišano temperaturo tal (npr. Kotanen, 1994), podaljša dormanco semen oziroma prepreči njihovo kalitev ter zmanjša rast rastlin (Sims, 2005). Ritje praviloma pospeši kroženje hranil v zgornjem talnem horizontu, zato so bile med razritimi tlemi in primerjalnimi nerazritimi ploskvami ugotovljene značilne razlike v vsebnostih kalcija, fosforja, magnezija, mangana, cinka, bakra in dušika; v razritih tleh so praviloma večje vsebnosti naštetih elementov, večja je tudi kationska izmenjevalna kapaciteta (Lacki in Lancia, 1986), prav tako pa se poveča zaloga stabiliziranega ogljika v mineralnem horizontu tal (Don in sod., 2019). Ritje pa lahko vpliva tudi na povečanje kislosti tal in s tem na zmanjšanje količine dostopnih hranil v tleh (Sims, 2005; Bueno, 2011). Nasprotno Groot Bruinderink in Hazebroek (1996) v gozdnih tleh nista ugotovila vpliva ritja na vsebnosti dušika in organske snovi, pa tudi ne na hitrost razgradnje organske snovi in na debelino talnih horizontov. Podobno tudi nekateri drugi avtorji (Moody in Jones, 2000; Cushman in sod., 2004; Tierney in Cushman, 2006; Mitchell in sod., 2007) za naseljene populacije divjih prašičev zunaj njihovega naravnega območja razširjenosti niso niti v gozdovih niti na travnikih ugotovili značilnih razlik v teksturi tal, talni vlagi, kislosti tal (pH) in vsebnosti anorganskega dušika med razritimi in nerazritimi ploskvami. Vendar se pri interpretaciji razlik v vsebnostih hranil postavlja vprašanje, ali so te razlike resnično posledica in ne vzrok; v tleh, bogatih s hranili, so namreč ugodnejše razmere za talno živalstvo, zato je v takšnih tleh večja verjetnost za nastanek ritin, kar smo ugotovili tudi pri nas (Jelenko in sod., 2010, 2011b).

Vpliv divjih prašičev na lastnosti tal torej ni enoznačen in čeprav so ugotovitve o vplivih ritja divjih prašičev na lastnosti tal protislovne, je dejstvo, da majhne zaplate spremenjenih talnih razmer, ki nastanejo kot posledica lokalnih motenj, povzročijo nastanek in ohranitev heterogenosti v ekosistemu (Sims, 2005).

Metode

Raziskavo o vplivih talnih lastnosti na ritje divjega prašiča smo izvedli v različnih ekosistemskih razmerah (travniki/pašniki v nižinskem, kolinskem in montanskem pasu) vzdolž gradienta populacijskih gostot divjega prašiča v Sloveniji ter pri različni intenzivnosti oz. namenu rabe travinja. Primerjalno smo vključili tudi območje z dolgotrajno (>30 let) opuščenim kmetovanjem (raziskovalno-eksperimentalni poligon Prolom). Določitev potencialnega vpliva talnih lastnosti (osnovne pedološke značilnosti, vsebnosti makrohranil, prisotnost oz. dostopnost prehransko zanimivih virov, tj. podzemnih delov rastlin in talnih živali) na aktivnost divjega prašiča na travnikih oz. na pojav ritin smo ugotavljali s parnimi primerjalnimi ploskvami znotraj istih travniških

kompleksov, in sicer znotraj vsakega v raziskavo vključenega LUO ter na raziskovalno-eksperimentalnem poligonu Prolom.

Vzorci za pedološke analize tal smo odvzeli na dveh različnih globinah (0 – 6 cm in 6 – 12 cm), in sicer primerjalno na razritem delu in na delu, kjer se ritine (po besedah domačinov) nikdar ne pojavljajo. Ploskve, ki so jih divji prašiči razrili, smo poimenovali kot »ritine«, kontrolne ploskve, kjer ritine niso bile prisotne, pa »neritine«. Jeseni 2023 smo vzorčenje izvedli na območju štirih lovsko upravljavskih območij, in sicer na območju Primorskega LUO (lovišče Žabnik-Obrov, 4 lokacije, skupaj 16 vzorcev), Zasavskega LUO (lovišče Laze, 3 lokacije, skupaj 12 vzorcev), Kamniško-Savinjskega LUO (lovišče Gornji Grad, 2 lokaciji, skupaj 8 vzorcev) in Savinjsko-Kozjanskega LUO (lovišči Oljka in Velenje, 4 lokacije, skupaj 16 vzorcev). V poletnem in zgodnjejesenskem obdobju 2024 smo vzorčenje ponovili znotraj treh lovsko upravljavskih območij, in sicer v Zasavskem LUO (lovišče Laze, 3 lokacije, 12 vzorcev), Kamniško-Savinjskem LUO (lovišče Mozirje, 1 lokacija, 4 vzorci) in Savinjsko-Kozjanskem LUO (lovišči Oljka in Velenje, 4 lokacije, skupaj 16 vzorcev). V letih 2023 in 2024 smo analizirali talne vzorce 21-tih površin trajnih travnikov in pašnikov na razritem in nerazritem delu (skupno 84 vzorcev).

Na posamezni lokaciji smo določili opis lokacije vzorčenja tal (zemljepisna širina in dolžina, nadmorska višina, nagib, usmerjenost pobočja) ter opisali vzorčna mesta (raba tal, vegetacija, relief, oblika pobočja, lega lokacije, razgibanost mikroreliefa, površinska organska snov, vlažnost tal ob opisu, dreniranost tal, št. dni od padavin, zastajanje vode – pogostost, zastajanje vode – trajanje, poplave – pogostost, poplave – trajanje, kamnitost, skalovitost, erozija – vrsta, erozija – stopnja, potencialni viri onesnaženja, vreme ob opisu), morfološke lastnosti tal (konzistenca, vlaga, struktura – oblika, struktura – izraženost, zrnastost, organska snov, velikost skeleta, oblika skeleta, ocena prekoreninjenosti, talna makrofavna) in talne horizonte (konzistenca, vlaga, struktura, zrnastost, organska snov, skelet, prekoreninjenost, talna makrofavna).

Pri vzorčenju tal smo upoštevali, da je bila razdalja od gozdnega roba do mesta vzorčenja enako oddaljena na razritem in nerazritem delu, kmetijska raba pa je bila na obeh delih enaka. Med ritinami in kontrolnimi površinami je bila razdalja vsaj 30 m. Vzorčili smo linijsko glede na gozdni rob. Na razritem delu smo talne vzorce odvzeli na 3 ritinah, pri čemer smo si pomagali s hori-hori nožem in kovinsko zajemalko (vevnico). Talne vzorce smo na vsaki ritini odvzeli na dveh globinah, in sicer na globini 0 – 6 cm (ritina 1), do koder navadno sega ob ritju dvignjena plast tal in travne ruše, ter na globini 6 – 12 cm (ritina 2). Na nerazritem delu smo travniška tla vzorčili tako, da smo na 3 mestih (podvzorci) izsekali kvader velikosti cca. 30 x 30 x 20 cm. Iz vsakega odsekanega podvzorca smo nato odvzeli stranske ploskve tal na globini 0 – 6 cm (neritina 1) in 6 – 12 cm (neritina 2). V obeh primerih talnih vzorcev (ritine in neritine) smo odstranili primesi (skelet, dele lesa, večje in, če je bilo možno, tudi drobnejše korenine, ekskreme in druge morebitne primesi) ter podvzorci združili v plastičnem

vedru (ločeno podvzorce ritin in neritin), nato pa smo jih ročno razdrobili, premešali in shranili v označene natronske vrečke. Odstranili in posebej shranili smo tudi vse makroskopsko vidne dele talne favne, ki smo jih kasneje uporabili za določitev taksonomske pripadnosti z določitvijo e-DNA. Vzorčenje tal smo izvedli v skladu s predpisanim mednarodnim standardom ISO/DIS-10381-1-6.

Pedološke analize, ki opredeljujejo fizikalno-kemične in biološke lastnosti tal, smo opravili v laboratoriju Zavoda za opčo proizvodnjo bilja na Agronomski fakulteti v Zagrebu (AFZG). Vse metode, ki smo jih uporabili, so bile primerljive s predhodno raziskavo (Jelenko in sod., 2010, 2013), s čimer smo omogočili primerljivost s starejšimi podatki.

V letu 2022 smo vzorce za talne analize odvzeli tudi na območju dolgotrajno opuščenega kmetovanja v raziskovalno-eksperimentalnem poligonu Prolom na Hrvaškem, kjer smo skupno vzorčili 20 lokacij (10 nerazritih in 10 razritih območij).

DS-4: Določitev prehranskih preferenc divjega prašiča v povezavi z ritjem, z razvojem in implementacijo metode za zanesljivo določitev prehrane z molekularnimi analizami

Izhodišča

Poznavanje prehrane divjega prašiča je eden ključnih dejavnikov za razumevanje vzrokov in posledic ritja. Divji prašiči rijejo zaradi prehranjevanja oz. iskanja prehranskih virov v tleh. V okviru CRP projekta »Divji prašič in škode v agrarni krajini« (Jelenko in sod. 2010) so raziskovalci že preučevali vpliv talnih lastnosti na ritje divjih prašičev na razritem in nerazritem travinju; ugotovili so, da se ritje pojavlja predvsem tam, kjer so tla bogata s hranili (ogljika, dušika, kalija in fosforja), ter kot takšne predstavljajo boljši življenjski habitat za talno favno in rastlinske vrste, ki imajo potrebo po večjem vnosu hranil. Kljub temu, pa tovrsten vpliv divjih prašičev ter zastopanost oz. pomembnost posameznih taksonomskih skupin (nevretenčarskih, vretenčarskih, glivnih in rastlinskih vrst) v prehrani prašiča v Sloveniji ostaja domala nepoznan.

Preučevanje prehranjevalnih preferenc oportunističnih kopenskih sesalcev, kot je divji prašič, je težavno zaradi njihove izjemne raznolikosti in hitre prilagoditve na številne ekološke niše (Di Marco in sod., 2021), kompleksne vloge, ki jo igrajo v dinamičnih trofičnih omrežjih (Blüthgen in Staab, 2021), hitro spreminjajočih se prehranjevalnih navad zaradi številnih človekovih motenj in njihovih raznolikih prehrabnih virov (Castillo-Contreras in sod., 2021; Matas in sod., 2021; Pineda-Munoz in Alroy, 2014). Sezonske, medletne in regionalne razlike v prehrani divjih prašičev potrjujejo, da je njihova prehranska strategija izjemno raznolika, zelo prilagodljiva in odvisna predvsem od razpoložljivosti prehrabnih virov v danem letnem času območja (Mysterud in sod., 2024). Prisotnost določene talne flore in favne, kot so deževniki (Lumbricidae), polži (Gastropoda), hrošči (Coleoptera), zlasti ličinke hroščkov (npr. *Melolontha melolontha*) ali čebulice rastlin, kot so čebulice

spomladanskega žafrana (*Crocus vernus*), predstavljajo pomembne prehrabne vire za divjega prašiča (zbrano v (Jelenko in sod., 2010; Pokorny in Jelenko, 2013)). Na splošno so divji prašiči zelo prilagodljivi, oportunistični vsejedi z afiniteto do lahko dostopnih in tudi energijsko bogatih virov, predvsem rastlinskih virov prehrane (Mysterud in sod., 2024) kot so različni rastlinski plodovi (želod, kostanj, žita itd.), gomolji in čebulice, korenine in semena (Ballari in Barrios-García, 2014; Herrero in sod., 2006; Mysterud in sod., 2024). Pozimi pogosto plenijo tudi energijsko bogate ličinke nevretenčarjev, zlasti žuželk (npr. Carpio in sod., 2014; Herrero in sod., 2006).

Tradicionalne analize prehrane sesalcev vključujejo analize, ki temeljijo na mehanski obdelavi in določevanju prehrabnih virov v iztrebkih (npr. de Sousa in sod., 2019; Furusawa in sod., 2021; Gosselin in sod., 2017; Matthews in sod., 2020). Te se večinoma opirajo na morfološko identifikacijo neprebavljenih ostankov hrane v želodcih ali v iztrebkih, ali na opazovanju prehranjevalnega vedenja (in vivo ali s pomočjo fotopasti) (npr. Garnick in sod., 2018). Tradicionalne metode morfološkega določanja pa so pogosto neučinkovite zaradi različne hitrosti razgradnje prehrabnih virov (npr. mehka telesa nevretenčarjev se razgradijo veliko hitreje, kot trdni delci ostankov kosti ali semen rastlinskih vrst), ter težje identifikacije nekaterih prehrabnih virov, predvsem redkih, težko določljivih in kriptičnih vrst (Casper in sod., 2007; Matthews in sod., 2020; Spaulding in sod., 2000; Zeale in sod., 2011) ter posledično podvržene napakam pri identifikaciji, ter nezmožnosti zaznavanja nekaterih prehrabnih virov. Zlasti redke vrste ali vrste, ki imajo lahko prebavljive trdne dele, so pogosto spregledane ali napačno določene (Spaulding in sod., 2000).

V zadnjih letih so se na področju prehranske ekologije pojavili številni novi pristopi preučevanja prehranjevalnih navad sesalcev. Še posebej so k bolj natančnemu in zanesljivemu določevanju in prepoznavanju prehrabnih virov prispevali razvoj barkodiranja s pomočjo črtnih kod DNK (Galimberti in sod., 2015), biomarkerjev in visoko zmogljivega sekvenciranja neinvazivnih vzorcev DNA (kot so npr. iztrebki) in okoljskih vzorcev (eDNA) (Alberdi in sod., 2018, 2019; Liu in sod., 2021) kot osnove za sodobne analize tj. metabarkodiranja (De Barba in sod., 2014; Nørgaard in sod., 2021). Zlasti zadnji pristop metabarkodiranja, ki vključuje ekstrakcijo DNA iz neinvazivnih vzorcev iztrebkov (nekateri jo uvrščajo v okoljsko DNA; angl. environmental DNA; eDNA), pomnoževanje DNA z univerzalnimi začetnimi oligonukleotidi (Binladen in sod., 2007) in sekvenciranje pomnoženih produktov s sodobno metodo sekvenciranja prihodnje generacije (angl. Next-generation sequencing; NGS), je močno izboljšal natančnost in zanesljivost identifikacije/prepoznavanja taksonov v ekoloških študijah prehrane (Poelen in sod., 2014). Sodobne tehnike metabarkodiranja omogočajo visoko ločljivost, natančnost in izboljšano stopnjo detekcije zaznavanja plena in drugih prehrabnih virov (Alberdi in sod., 2019; Ando in sod., 2020). Poleg tega molekularne metode metabarkodiranja skrajšajo čas analize, omogočajo visoko resolucijo identifikacije pomnoženih zaporedij DNA prehrabnih virov v iztrebkih generalistov (Nørgaard in sod., 2021). Značilnost tega pristopa, ki

dopolnjuje in izpopolnjuje dragocene tradicionalne makroskopske analize prehrane, je prepoznavanje redkih ali v prehrani le sezonsko zastopanih vrst, ki jih tradicionalne metode lahko spregledajo (De Barba in sod., 2014). Poleg tega omogoča hitro in zanesljivo taksonomsko identifikacijo tudi v primeru slabo ohranjenih vzorcev, saj se lahko sekvencira kratke fragmente DNA (npr. De Barba in sod., 2014; Kartzinell in sod., 2015).

V okviru DS 4 smo preučevali prehrano divjih prašičev, ki so prehransko zelo učinkovita vrsta, z ritjem pa močno spremenijo mikrohabitatne in mikroklimatske razmere na območju ritin (npr. Cuevas in sod., 2012; Labadessa in Ancillotto, 2023). Zaradi tega je možno, da na razritih ploskvah določenega taksona s klasičnimi zoološkim ali fitocenološkimi popisi ne bomo zaznali, čeprav je bil pred ritjem tam prisoten. Vendar pa tla tudi po ritju divjih prašičev in ob morebitnem lokalnem izginotju prej prisotnih vrst še vedno vsebujejo DNK živali in rastlin, ki so bile prisotne in so za sabo pustile sledi.

Zaradi tega smo v raziskovalni projekt vpeljali povsem novo metodo za potrjevanje dostopnosti prehranskih virov za divjega prašiča v tleh, tj. metabarkodiranje okoljske DNK iz tal. Z metabarkodiranjem okoljskega vzorca s pomočjo sekvenciranja naslednje generacije smo sočasno odkrivali večje število taksonov v enem vzorcu, in sicer v kompleksnem ekstraktu DNK iz vzorcev tal. Za povečanje prepoznavne moči analiz smo DNK, izolirano na območju ritja iz gliv in nevretenčarjev (potencialno ključnih za prehrano vrste), uporabili za nadgradnjo referenčne knjižnice DNK s pomočjo barkodiranja posameznega talnega taksona (povezava z DS-3). Ker smo v fazi analiz sklopa DS-4, prepoznali takson gliv kot pomembne prehranske vire v analiziranih iztrebkih, smo v nadaljevanje sklopa vključili v analizo sklopa predvsem nevretenčarske in glivne taksonov. Na ta način smo še dodatno okrepili poznavanje dostopnosti prehranskih virov za divjega prašiča v tleh.

Naloga je zajemala naslednje aktivnosti:

- testiranje in ovrednotenje uspešnosti razvitega protokola s sklopa DS-4 za analize metabarkodiranja nevretenčarskih in glivnih taksonov z vzorcev tal;
- pripravo seznama talnih glivnih in nevretenčarskih taksonov, ki se potencialno nahajajo v bližini ritin (povezava s sklopom DS-4).

Osnovni namen delovnega sklopa 4 je bil razviti enostaven, meta-molekularni pristop metabarkodiranja DNK, za identifikacijo sestavnih delov prehrane divjega prašiča na osnovi določitve DNK z neinvazivnih in invazivnih vzorcev iztrebkov z gastrointestinalnega traku, vzorčenih v izbranih območjih v bližini ritin: i) severozahodnega dela Slovenije (lovišče Oljka, Savinjsko-Kozjansko lovskoupravljavsko območje); in ii) centralnega dela Hrvaške. Ta pristop omogoča hitro in zanesljivo taksonomsko identifikacijo prehranske sestave preko sistema črtnih kod DNK (angl. DNA barcoding), tudi ko je DNK slabo ohranjena in fragmentirana, saj lahko krajše fragmente DNK sekvenciramo v celoti (npr. Alberdi in sod., 2019; De Barba in sod., 2014; Kartzinell in sod., 2015). Metoda se je v

preteklosti izkazala kot uspešna za spremljanje prehrane vsejedih sesalcev, zaradi sposobnosti hkratne identifikacije mnogih taksonov na podlagi prepoznavanja njihovih črtnih kod DNK, s pomočjo uporabe sistemov sekvenciranja nove generacije in uporabe tj.univerzalnih primerjev (začetnih oligonukleotidov), ki omogočajo ciljno pomnoževanje tarčnega, širokega spektra taksonov (Ando in sod., 2020; Buzan in sod., 2024; Carpio in sod., 2023; Nørgaard in sod., 2021).

Za identifikacijo in kvantifikacijo prehrambnih virov prašiča smo preučevali slednje tarčne skupine:

- škodljive organizme v agroekosistemi za razumevanje morebitne ekološke vloge divjega prašiča v agroekosistemi (npr. goli polži, strune, talne sovke, gliste, ličinke majskega in junijskega hrošča, idr.);
- glive, ki predstavljajo pomemben vir prehrane divjega prašiča, v zimskem in poletnem času;
- vretenčarje za razumevanje potencialne kompeticije z ostalimi vrstami oz. preučevanje vpliva na vretenčarske vrste; ter
- rastline oz. njihove korenine, ki predstavljajo primarni vir prehrane divjega prašiča.

Specifični cilji delovnega sklopa so bili:

- preučiti taksonomsko sestavo (kvalifikacija) in zastopanost (kvantifikacija) glivnih, nevretenčarskih, rastlinskih in vretenčarskih vrst v prehrani divjega prašiča;
- primerjati prehranjevalne vzorce v odvisnosti z geografsko lego, sezono vzorčenja ter demografsko strukturo (spolom in starostnim razredom);
- primerjati rezultate taksonomske identifikacije z uporabo različnih referenčnih podatkovnih baz.

Naloga je zajemala naslednje aktivnosti:

- optimizacijo meta-disciplinarnega molekularnega pristopa identifikacije vseh štirih taksonomskih skupin v prehrani divjega prašiča na podlagi metabarkodiranja DNK neinvazivnih in invazivnih vzorcev iztrebkov gastrointestinalnega traku;
- izolacijo DNK in pripravo knjižnice za metabarkodiranje na sekvenatorju prihodnje generacije Ion Torrent S5;
- kvantitativno analizo odčitkov metabarkodiranja s ciljem določitve glavnih prehrambnih virov divjega prašiča;
- primerjalno analizo uporabe različnih publiciranih in razvitih referenčnih podatkovnih baz za ovrednotenje uspešnosti identifikacije tarčnih taksonomskih skupin;
- statistično analizo kvantifikacije in zastopanosti vseh štirih tarčnih skupin prehranjevalnih virov divjega prašiča, v povezavi s sezono vzorčenja, geografsko lokacijo, ter demografsko strukturo (spolom in starostnim razredom) divjih prašičev.

Metode

Za namen metabarkodiranja talnih vzorcev za identifikacijo izbranih taksonov (nevretenčarjev in gliv) v talnih vzorcih v bližini ritin, smo sledili razviti metodologiji laboratorijskih, bionformatičnih in statističnih analiz sklopa DS-4, ki se je izkazala kot uspešna za identifikacijo tarčnih skupin tako z izoliranih vzorcev iztrebkov (DS-4), kot tudi vzorcev prsti (DS-3). Opis metodologije je podan kot del sklopa DS-4.

Dodatno smo v pripravi seznam talnih glivnih in nevretenčarskih taksonov, ki se potencialno nahajajo v bližini ritin na osnovi katerega lahko sklepamo na prisotnost njihove DNK v tleh, saj v tekočem delu nismo posebej analizirali talnih vzorcev.

Razvoj metodologije določanja prehrabnih virov s pomočjo metabarkodiranja

Prehranske preference divjega prašiča v povezavi z ritjem smo določali na podlagi analiz invazivnih genetskih vzorcev iztrebkov (iz gastrointestinalnega traku) odstreljenih divjih prašičev, ter neinvazivnih vzorcev iztrebkov, pobranih z narave. Poleg tradicionalnih metod (analiza vsebine prebavil in iztrebkov z morfološko identifikacijo neprebavljenih ostankov hrane) smo v delovnem sklopu DS-4 razvili enostaven, meta-molekularni pristop za identifikacijo sestavnih delov prehrane divjega prašiča, ki je temeljil na identifikaciji taksonov na podlagi DNK črtnih kod (Slika 1). S pomočjo pomnoževanja s kvantitativnim pomnoževanjem s polimerazo v realnem času (angl. Quantitative polymerase chain reaction in real time; qPCR) smo tako pomnožili kratke odseke DNK molekule (tj. DNK črtne kode), ki so dovolj informativne za razlikovanje med tesno sorodnimi taksoni, pri čemer smo uporabili:

- odsek regije notranjega prepisnega vmesnika ITS1 (angl. internal transcribed spacer) za identifikacijo gliv (White, 1990);
- odsek gena za Citokrom oksidazo I (angl. cytochrome oxidase I; v nadaljevanju COI) za identifikacijo nevretenčarjev (Zeale in sod., 2011);
- odsek kloroplastnega fragmenta DNA trnL (intron P6-loop) (angl. chloroplast trnL (UAA) intron, 6-loop) za identifikacijo rastlin (Taberlet in sod., 2007); ter
- odsek gena za 12S rRNA (angl. 12S rRNA gene; v nadaljevanju 12S rRNA) za identifikacijo vretenčarjev (Riaz in sod., 2011).

Izbrane regije za identifikacijo štirih tarčnih taksonomskih skupin se rutinsko uporabljajo pri barkodiranju in metabarkodiranju okoljskih vzorcev (npr. Alberdi in sod., 2018, 2019; Ando in sod., 2020; Esnaola in sod., 2018; Espinosa in sod., 2023; Kumpula, 2020; Riaz in sod., 2011; Usyk in sod., 2017). Nadaljne analize so vključevale: i) pripravo in sekvenciranje končne genomske knjižnice s pomočjo platforme Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific, ZDA); ii) določanje taksonov zaznanih v

analiziranih iztrebkov, na podlagi podatkovnih referenčnih baz DNK črtnih kod, pri čemer smo primerjali rezultate taksonomskega klasificiranja z že publiciranimi podatkovnimi bazami, testirali pa smo delovanje tudi dveh podatkovnih referenčnih baz, ki smo jih razvili v našem laboratoriju; ter iii) statistične analize kvantifikacije in zastopanosti vseh štirih tarčnih skupin prehranjevalnih virov divjega prašiča, v povezavi s sezono vzorčenja, geografsko lokacijo, ter demografsko strukturo (spolom in starostnim razredom) divjih prašičev.

Vzorčenje

Za razvoj metode določanja prehrabnih virov iz neinvazivnih (pobranih z okolja v bližini ritin) in invazivnih vzorcev iztrebkov divjega prašiča (odvzetih z gastrointestinalnega traku) z molekularnimi (genetskimi) analizami in za določitev taksonomske zastopanosti prehrabnih virov, smo od 97 vzorčenih vzorcev, uporabili in analizirali 37 vzorcev iztrebkov, zbranih v spomladanskem in zimskem času z leta 2020, ter zimskem, spomladanskem in poletnem času. Vzorci iztrebkov so bili pobrani v bližini ritin z dveh območij: i) severozahodnega dela Slovenije ($n = 23$) (lovišče Oljka, Savinjsko-Kozjansko LUO: Veliki Vrh, Gora Oljka in Skorno); ter centralnega dela Hrvaške ($n = 14$) (Brubno, Klasnić in Prolom) (Slika 2).

V analizo smo vključili tudi pozitivne kontrole, za preverjanje uspešnosti analize štirih tarčnih taksonomskih skupin: i) vzorec navadnega lešnikarja (*Maniola jurtina*) za ovrednotenje uspešnosti določanja nevretenčarjev; ii) vzorec oljke (*Olea europaea*) za ovrednotenje uspešnosti določanja rastlin; iii) vzorec podzemne glive z rodu košutnic (*Elaphomyces* sp.) za ovrednotenje uspešnosti določanja gliv; ter iv) tkivni vzorec divjega prašiča (*Sus scrofa* L.) za ovrednotenje uspešnosti določanja vretenčarjev. Za vsako tarčno skupino smo vključili tudi negativno kontrolo.

Vse invazivne vzorce iztrebkov z gastrointestinalnega traku so pridobili lovci v času rednega odstrela divjih prašičev; do analize, ki je bila izvedena v laboratoriju za molekularno ekologijo UP FAMNIT, so bili shranjeni na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Laboratorijske analize metabarkodiranja

Za optimizacijo izolacije, homogenizacije, pomnoževanja in sekvenciranja vzorcev smo izvedli slednje laboratorijske preizkuse: (i) optimizacija izolacije z različnimi izolacijskimi kiti z vključevanjem dveh tehničnih replikatov na vzorec; (ii) testiranje uspešnosti izolacije in homogenizacije vzorca; (iii) optimiziranje qPCR v realnem času za taksonomsko specifične začetne oligonukleotide z vključevanjem treh tehničnih replikatov PCR; (iv) sekvenciranje končne knjižnice s pomočjo platforme Ion Torrent (Ion S5, Thermo Fisher Scientific).

Predpriprava prostora in delovnega materiala

Postopek izolacije DNA iz iztrebkov je zelo občutljiv, in sicer zaradi možne kontaminacije z različnimi dejavniki iz okolja (bakterije, glive, urin, druge plenilske vrste ipd.), zato smo izolacijo nukleinskih kislin iz vzorcev iztrebkov opravili pod posebnimi pogoji, ki so vključevali natančno čiščenje prostora z 2 % raztopino natrijevega hipoklorita ter dvojno izpiranje vzorcev s 70 % etanolom. Dodatno smo celoten prostor izpostavili UV sevanju. Ves uporabljen potrošni material (skalpel, pincete, mikrocentrifugirke, pipete) je bil pred pričetkom dela steriliziran v parnem avtoklavu ali očiščen z uporabo natrijevega hipoklorita in etanola ter obsevan z UV svetlobo. Dodatno smo ob vsaki izolaciji opravili tudi izolacijo tj. negativne kontrole, s katero smo preverjali prisotnost morebitnih okoljskih nukleinskih kislin v kompletu reagentov ali uporabljenem potrošnem materialu.

Optimizacija izolacije in homogenizacije DNK iz iztrebkov

Pred izolacijo smo odstranili zunanji sloj, saj ta vsebuje največ epitelnih celic divjega prašiča in tudi dejavnike potencialne kontaminacije (npr. mikroorganizme iz okolja). Notranje sloje iztrebkov smo vstavili v vrečke z zadrgo in jih položili v hladilnik na 4 °C. Po odtajanju smo vsak iztrebek ročno homogenizirali. Dodatno homogenizacijo iztrebka smo za 5 min s 15 vrtljajev/s izvedli s pomočjo naprave TissueLyser II (Qiagen) kot del postopka lizacije celic, ki je eden prvih korakov pri izolaciji DNA. Za izolacijo celokupne DNA iz iztrebkov smo testirali štiri izolacijske komplete: QIAmp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen); DNeasy PowerSoil Kit (Qiagen); E.Z.N.A. Soil DNA Kit (Omega Bio-tek); FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals). Izolacija s posameznim kompletom je sledila enotnemu protokolu; izolirali smo tri (pod)vzorke iztrebka (180–220 mg) s končnim volumnom 100 µl in eno negativno kontrolo. Sledili smo protokolu proizvajalcev. Uspešnost homogenizacije smo preverili s sekvenciranjem nove generacije (angl. new generation sequencing) na sekvenatorju Ion S5.

Največje koncentracije DNA smo dosegli po izolaciji z izolacijskim kitom QIAmp Fast DNA Stool Mini kit (34,5–56,7 ng/µl) in E.Z.N.A. Soil DNA Kit (63,5–74,6 ng/µl). Uspešnost izolacije smo, poleg merjenja koncentracije DNA, testirali tudi s pomočjo qPCR v realnem času na napravi LightCycler 96 (Roche). Rezultati na podlagi kvantifikacije pomožene DNA s pomočjo qPCR v realnem času so pokazali, da je za izolacijo tarčnih skupin iz iztrebkov divjega prašiča najbolj optimalen izolacijski kit E.Z.N.A. Soil DNA Kit. V nadaljevanju smo vse vzorce izolirali s pomočjo najbolj optimalnega kit in sicer v dveh tehničnih replikatih, za izboljšanje homogenizacije in optimalnih rezultatov taksonomske identifikacije prehrabnih virov.

Merjenje koncentracije DNK

Po izolaciji DNK smo uspešnost izolacije preverili z uporabo fluorimetra Qubit (Life Technologies, ZDA) in kompletom reagentov (Qubit dsDNA BR Assay Kit), po navodilih proizvajalca.

Pomnoževanje in sekvenciranje

Molekularna analiza prehrane divjega prašiča je temeljila na pomnoževanju s qPCR s pomočjo taksonomsko specifičnih univerzalnih oligonukleotidov (primerjev) ter določitvi zaporedja štirih regij za detekcijo tarčnih skupin (opredeljenih v Poglavju 3.1.), s pomočjo metabarkodiranja.

Pomnoževanje in sekvenciranje vzorcev je potekalo po slednjih korakih:

- 1.PCR: optimizacija qPCR v realnem času za taksonomsko specifične začetne oligonukleotide z vključevanjem triplikatov PCR;
- 2.PCR: vezava barkodiranih adapterjev;
- čiščenje PCR produktov;
- sekvenciranje optimiziranega pomnoževanja specifičnih taksonomskih skupin (gliv, nevretenčarjev, rastlin in vretenčarjev) s pomočjo platforme Ion Torrent (Ion S5, Thermo Fisher Scientific).

Optimizacija qPCR v realnem času za taksonomsko specifične začetne oligonukleotide z vključevanjem triplikatov PCR

Za opredelitev uspešnosti pomnoževanja DNA tarčnih skupin iz celokupno izolirane DNA smo izbrali vzorce z največjo koncentracijo DNA ($>20\text{ng}/\mu\text{l}$). Dodatno smo v optimizacijski postopek vključili tako pozitivne kontrole kot negativne kontrole. Za preprečevanje pomnoževanja gostiteljeve DNK (divjega prašiča) smo razvili in uporabili tudi tj. blocking primerja, da bi povečali verjetnost detekcije prehranskih virov tarčne vrste.

Pri pomnoževanju smo uporabili univerzalne začetne oligonukleotide vseh tarčnih skupin, ki smo jih modificirali in podaljšali s tj. unikatnimi repki (angl. unitails), ki so kompatibilni A in P1 adapterjem uporabljene platforme sekvenciranja Ion Torrent. Uspešnost pomnoževanja izbrane regije smo preverili s kvantifikacijo pomnoženih regij s pomočjo qPCR, pri čemer smo v pomnoževanje vključili tri tehnične ponovitve (Slika 2). Vsaka reakcijska mešanica (končni volumen $15\ \mu\text{l}$) je vsebovala $7,50\ \mu\text{l}$ PerfeCTa SYBR Green SuperMix mastermiksa (QuantaBio), $4,50\ \mu\text{l}$ ddH₂O, $0,50\ \mu\text{l}$ začetnih oligonukleotidov s koncentracijo $20\ \mu\text{M}$ in $2\ \mu\text{l}$ DNA. Za reakcijsko mešanico detekcije vretenčarjev smo dodali še blocking primer za prašiča, v razmerju 1:1 z volumnom začetnih oligonukleotidov.

Za vsako tarčno skupino smo testirali ustrezen temperaturni gradient med $50\text{--}62\ ^\circ\text{C}$ za namen določitve optimalne temperature pomnoževanja izbranih odsekov tarčnih skupin. Tako smo opredelili optimalno temperaturo pomnoževanja, ter optimalno število ciklov pomnoževanja za uspešno detekcijo vseh taksonomskih skupin. Uspešnost optimizacije pomnoževanja smo preverili na 2 % agaroznem gelu z uporabo gelske elektroforeze Gel Doc™ EZ System (Bio-Rad).

V nadaljevanju predstavljamo optimizirane protokole 1. PCR za vse štiri tarčne skupine:

Glive

Za določitev gliv smo v prvem ciklu qPCR v realnem času pomnožili 150–350 bp dolg odsek ITS1 z začetnimi oligonukleotidi ITS5F (5'–GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG–3') in ITS2R (5'–GCTGCGTTCTTCATCGATGC–3') (White, 1990). Reakcijsko mešanico smo porazdelili na qPCR ploščo in jo pomnožili po optimiziranem temperaturnem profilu za detekcijo gliv: začetna denaturacija (3 min na 94 °C), 30 ciklov izmenične denaturacije (20 s na 94 °C), prileganja začetnih oligonukleotidov (30 s od 55 °C) ter podaljševanja (60 s na 72 °C).

Nevretenčarji

Za določevanje nevretenčarjev smo pomnožili 157 bp dolgo regijo COI z začetnimi oligonukleotidi ZBJ-ArtF1c (5'–AGATATTGGAACWTTATATTTTATTTTGG–3') in ZBJ-ArtR2c (5'–WACTAATCAATTWCCAAATCCTCC–3') (Zeale in sod., 2011). Reakcijsko mešanico smo porazdelili na qPCR ploščo in jo pomnožili po optimiziranem temperaturnem profilu za detekcijo nevretenčarjev: začetna denaturacija (3 min na 94 °C), 35 ciklov izmenične denaturacije (20 s na 94 °C), prileganja začetnih oligonukleotidov (30 s od 52 °C) ter podaljševanja (60 s na 72 °C).

Rastline

Za določitev rastlinskih vrst smo v prvem ciklu qPCR v realnem času pomnožili 180 bp dolg odsek kloroplastne regije trnL (intron 6-loop) (Taberlet in sod., 2007) z začetnimi oligonukleotidi trnL c (5'–CGAAATCGGTAGACGCTACG–3') in trnL h (5'–CCATTGAGTCTCTGCACCTATC–3'). Reakcijsko mešanico smo porazdelili na qPCR ploščo in jo pomnožili po optimiziranem temperaturnem profilu za detekcijo rastlin, in sicer: začetna denaturacija (3 min na 95 °C), 38 ciklov izmenične denaturacije (30 s na 95 °C), prileganja začetnih oligonukleotidov (30 s na 56 °C) ter podaljševanja (45 s na 72 °C).

Vretenčarji

Za določevanje vretenčarjev smo pomnožili 73–110 bp dolgo regijo 12S rRNA (Riaz in sod., 2011) z začetnimi oligonukleotidi 12SV5F (5'–TAGAACAGGCTCCTCTAG–3') in 12SV5R (5'–TTAGATACCCCACTATGC–3'). Za zmanjševanje sekvenciranja tarčne vrste (divjega prašiča), smo dizajnirali tj. blocking primer za divjega prašiča, s sekvenco 5': CTCTAGGTGGATGTGAAGCACCGCCAAGTCCTTTGAGTTTTAGGCTGTTGCGAGTAGTA CTCTGGCGAATAGTTTTGTTATGTAAGTATTTGGGTTTAGGGCTAGGCAT in s C3 modifikatorjem na 3' koncu. Reakcijsko mešanico smo porazdelili na qPCR ploščo in jo pomnožili po optimiziranem temperaturnem profilu za detekcijo vretenčarjev, in sicer: začetna denaturacija (4 min na 96 °C), 40 ciklov izmenične denaturacije (20 s na 96 °C), prileganja začetnih oligonukleotidov (30 na 60 °C) ter podaljševanja (30 s na 72 °C).

Vezava barkodiranih adapterjev

Po prvem ciklu qPCR smo izvedli drugi cikel qPCR za namen vezave specifičnih barkod z adapterji na pomnožke DNA. Reakcijske mešanice za drugi cikel qPCR so vsebovale (končni volumen 25 µl): 12,5 µl PerfeCTa SYBR Green SuperMix mastermiksa (QuantaBio), 9,0 µl ddH₂O, 0,75 µl barkodiranih A adapterjev in 0,75 µl P1 adapterja z edinstvenim vezanim reverznim označevalcem s koncentracijo 10 µM ter 2 µl PCR produkta vsakega vzorca s prvega cikla. Vezavo barkodiranih adapterjev smo izvedli po naslednjem temperaturnem profilu s qPCR v realnem času na LightCycler 96 (Roche): začetna denaturacija (3 min na 94 °C), 8 ciklov izmenične denaturacije (20 s na 94 °C), prileganja začetnih oligonukleotidov (20 s na 60 °C), podaljševanja (30 s na 72 °C).

Čiščenje PCR produktov/knjižnic

Pripravljene knjižnice smo očistili z Beckman Coulter™ Agencourt AMPure XP (Thermo Fisher Scientific) po navodilih proizvajalca. Po končanem čiščenju knjižnic smo le-tem izmerili koncentracijo z uporabo fluorometra Qubit (Life Technologies, ZDA) in kompletom reagentov (Qubit dsDNA BR Assay Kit) ter jih normalizirali na koncentracijo 5 ng/amplikon.

Kakovost in koncentracijo končne knjižnice smo določili z uporabo kompleta reagentov Agilent HS DNA na napravi BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies), ter nadaljevali s sekvenciranjem prihodnje generacije (NGS) na sekvenatorju Ion Torrent S5 (ThermoFischer Scientific). Pred samim sekvenciranjem smo vse knjižnice normalizirali na maso DNK 5 ng, da smo zagotovili enakomerno porazdelitev vseh amplikonov na čipu ter pripravili končno knjižnico z množino 100 pmol.

Sekvenciranje prihodnje generacije

Za analizo izbranih odsekov DNK smo uporabili metodo NGS na sekvenatorju Ion Torrent S5 (ThermoFischer Scientific, ZDA). Tehnologija NGS sekvenciranja temelji na vzporednem paralelnem sekvenciranju, kjer lahko simultano pridobivamo nukleotidna zaporedja različnih tarčnih regij več milijonov kopij DNK hkrati. Zaradi vezave posebnih nukleotidnih označevalcev (barkod) na vzorec lahko vzorcem bioinformatično sledimo s pomočjo specifično določenih barkod (npr. Liu in sod., 2021). Postopek sekvenciranja smo izvedli po navodilih proizvajalca. Končno knjižnico smo pomnožili in ji vezali tj. ISP-jev (angl. Ion Sphere Particles) z uporabo kompleta reagentov Ion 520 & Ion 530 Kit-OT2 (ThermoFischer Scientific; kat. št: A27751) po protokolu za sekvenciranje 400 bp dolgih fragmentov na aparaturi Ion Torrent One Touch 2 (OT2). Naslednji korak je zajemal bogatenje knjižnice z uporabo kompleta reagentov Ion 520 & Ion 530 Kit-OT2 (ThermoFischer Scientific; kat. št: A27751) po navodilih proizvajalca. Pripravljeno knjižnico smo sekvencirali z NGS čipom Ion 530 na Ion Torrent S5 sekvenatorju (Thermo Fisher Scientific, ZDA).

Bioinformatične analize metabarkodiranja

Analize odčitkov s Qiime2

Pridobljene neobdelane odčitke, pridobljene s sekvenciranjem s prejšnjega koraka, smo analizirali s programom QIIME2, v. 2024.2 (Bolyen in sod., 2019). Neobdelane odčitke smo uvozili v delovno okolje z ukazom `qiime tools import (qiime tools import --type 'MultiplexedSingleEndBarcodeInSequence' --input-path input-directory --output-path output.qza --input-format „MultiplexedSingleEndBarcodeInSequenceDirFmt“)`. Rezultat ukaza je bila .qza datoteka (artefakt QIIME2), ki je vsebovala multipleksirane (obdelane) odčitke. Nadaljnjo smo odčitke filtrirali po črtnih kodah oligonukleotidov tarčnih skupin (ITS1 za glive, COI za nevretenčarje, trnL za rastline ter 12S rRNA za vretenčarje) in zaporedjih specifičnih barkod, ki smo jih predhodno dodelili vzorcem v fazi laboratorijskih analiz.

Za filtriranje in odstranjevanje sekvenc začetnega oligonukleotida smo uporabili vtičnik cutadapt in ukaz `qiime cutadapt demux-single (qiime cutadapt demux-single --i-seqs input.qza --m-barcodes-file barcode.tsv --o-per-sample-sequences output.qza --m-barcodes-column „Barcode sequence“ --verbose --o-untrimmed-sequences not_matching.qza)`. FastaQ datoteke filtriranih nukleotidnih zaporedij smo pridobili z uporabo ukaza `seqkit amplicon` (Shen in sod., 2016).

Referenčne podatkovne baze in taksonomska identifikacija prehrabnih virov

Za uspešno taksonomsko klasifikacijo oz. določitev prehrabnih virov v prehrani divjega prašiča, smo v analize vključili različne tako publicirane, kot generirane podatkovne referenčne baze. V analizo smo zajeli tudi testiranje različnih dolžin fragmentov za vse tarčne skupine, z namenom primerjave rezultatov taksonomskega razvrščanja. Podatki o uporabljenih in razvitih referenčnih podatkovnih bazah so prikazani na Sliki 4).

Taksonomska identifikacija oz. razvrščanje (angl. *taxonomic assignment*) je potekala z uporabo:

- razvite podatkovne referenčne baze iz zaporedij 12S na podlagi NCBI za taksonomsko identifikacijo vretenčarjev (klasifikator NCBI);
- obstoječe podatkovne referenčne baze MIDORI2 (klasifikator Midori) za taksonomsko identifikacijo nevretenčarjev (Machida in sod., 2017);
- razvite podatkovne referenčne baze iz zaporedij COI na podlagi NCBI (klasifikator NCBI);
- obstoječe podatkovne referenčne baze UNITE (Abarenkov in sod., 2024) za taksonomsko identifikacijo gliv;
- obstoječe podatkovne referenčne baze OSF (BCEM-UniAndres, 2020) za taksonomsko identifikacijo rastlin.

Za razvoj lastnih podatkovnih referenčnih baz, kjer so bile reprezentativna nukleotidna zaporedja odseka 12S in COI izvožena s podatkovne baze NCBI, smo uporabili programski vtičnik RESCRIPT QIIME2 (Robeson in sod., 2021). Za končno združevanje taksonomskih podatkov s pripadajočimi nukleotidnih zaporedij, pridobljenimi v podatkovni bazi NCBI, v enoten tj. klasifikator (združevanje taksonomskih podatkov z nukleotidnimi zaporedji taksonov) smo uporabili ukaza qiime feature-classifier extract-reads in qiime feature-classifier fit-classifier-naïve-bayes.

Taksonomsko identifikacijo vseh štirih prehrabnih tarčnih virov smo izvedli s pomočjo programa DADA2 z ukazom qiime dada2 denoise-single (Callahan in sod., 2016). Kot prikazano na Sliki 4, smo za taksonomsko klasifikacijo uporabili različno dolge fragmente DNK za vsako posamezno tarčno skupino, da bi dobili najbolj optimalno število zaznanih posameznih sekvenčnih varianc (ASV) ter posledično ujeli maksimalno diverziteto prehrabnih virov. Za pridobitev vhodnih datotek za vizualizacijo in statistične analize (glej Poglavje 3.5), potrebne za naslednje korake, smo izvedli še zadnji ukaz qiime phylogeny align-to-tree-fasttree (natančneje: qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree --i-sequences input.qza --o-alignment aligned_output.qza --o-masked-alignment masked_aligned.qza --o-tree unrooted_tree.qza -o rooted-tree rooted_tree.qza).

Statistične analize metabarkodiranja

Indeksi biotske raznovrstnosti

S pomočjo funkcije qza_to_phyloseq s programskega paketa qiime2R v programskem paketu R v4.4.1 (R Core team, 2024) smo najprej kreirali tj. phyloseq vhodno datoteko (McMurdie in Holmes, 2013), za vse tarčne skupine v prehrani divjega prašiča. Programski paket Phyloseq je orodje za uvoz, shranjevanje, analizo in grafični prikaz kompleksnih podatkov sekvenciranja, ki so že bili združeni v ASV ali drugačne taksonomske enote kot so npr. operativne taksonomske enote (OTU), oz. je zanje bila že generirana taksonomska identifikacija glede na prepoznane variance v nukleotidnih zaporedjih in podatkov o taksonomski klasifikaciji. Ta omogoča nadaljnje analize povezanih metapodatkov o vzorcih (angl. Sample manifest), filogenije oz. gručanja podobnih nukleotidnih zaporedij ter podatkov o taksonomski klasifikaciji (Bisanz, 2024; McMurdie in Holmes, 2013).

Paket phyloseq smo uporabili tudi za izračun tj. alfa diverzitete z uporabo indeksov vrednotenja biotske raznovrstnosti: Chao1, Shannonov in Simpsonov indeks biotske raznovrstnosti. Statistične analize alfa diverzitete biotske raznovrstnosti se uporablja za ovrednotenje raznolikosti vrst (v našem primeru taksonov) znotraj določenih preučevanih skupin ali lokacij (Moreno in sod., 2006; Whittaker, 1972). Diverziteta alfa indeksov biotske raznovrstnosti je bila izračunana za vse štiri tarčne taksonomske skupine v prehrani divjega prašiča na ravni ASV za vse preučevane vzorce, glede na geografsko lokacijo, sezono vzorčenja ter demografsko strukturo odvzetih vzorcev (spolno in starostno strukturo). Chao1 indeks biotske raznovrstnosti temelji predvsem na številčnosti oz. velikosti

vzorca in se osredotoča le na vrstno bogastvo (v našem primeru na diverziteto taksonov), pri čemer daje večjo težo taksonov z nizko številčnostjo oz. manjšo velikostjo vzorcev (npr. Gatti in sod., 2020). Shannonov in Simpsonov indeks pa upoštevata tako diverziteto taksonov, kot enakomernost porazdelitve taksonov. Pri Shannonovem indeksu je večji poudarek na bogastvu vrst (diverziteti taksonov), pri Simpsonovem indeksu pa na porazdelitvi enakomernosti vrst (Fedor in Zvaríková, 2019; Supriatna, 2018). Enakomernost taksonov prikazuje porazdelitev posameznih taksonov znotraj preučevane skupine.

Vizualizacija velikosti vzorca v odvisnosti z zaznano diverziteto prehrabnih virov (angl. Rarefaction curve analysis)

Za vizualizacijo smo uporabili funkcijo rarecurve iz programskega paketa VEGAN (Oksanen in sod., 2013) za ovrednotenje števila ASV na vzorec v primerjavi z velikostjo vzorca. Krivulja analize Rarefaction prikazuje diverziteto taksonov (vrstno bogastvo) kot funkcijo v odvisnosti od velikosti vzorca oz. omogoča vpogled kako dobro globina sekvenciranja zajame vrstno pestrost (v našem primeru diverziteto taksonov). X os predstavlja velikost vzorca (v našem primeru število odčitkov), Y os pa število taksonov (OTU, ali v našem primeru ASV), odkritih v vsakem vzorcu. Za analizo odvisnosti velikosti vzorca (števila odčitkov) in zaznane diverzitet taksonov prehrabnih virov (ASV), smo uporabili funkcijo rarefy_even_depth s pomočjo programskega paketa phyloseq (McMurdie in Holmes, 2013).

Cilj analize je zajeti čim več različnih nukleotidnih zaporedij v velikost vzorca, pri čemer večja raznolikost nukleotidnih zaporedij odraža večjo stopnjo detekcije odkritih vrst; plato krivulje torej predstavlja zadostno globino sekvenciranja za možnost detekcije večine vrstne raznolikosti prehrabnih virov, vključenih v preučevane vzorce. Ko krivulja doseže plato, se pričakuje da s povečanjem velikosti vzorca oz. števila detektiranih zaporedij, verjetno ne bi privedlo do identifikacije novih prehrabnih virov v preučevanem vzorcu (npr. Alberdi in sod., 2020; Hughes in sod., 2001).

Določitev relativne abundance (Foa%) in zastopanosti prehrabnih virov (FOO%)

Po taksonomski identifikaciji vseh naših nukleotidnih zaporedij, smo z uporabo orodja tax_glom iz programskega paketa phyloseq (McMurdie in Holmes, 2013) razvrstili vse rezultate taksonomske identifikacije po rodovih. »Glomming« je postopek združevanja vzorcev po izbranem taksonomskem rangu.

Kvantifikacijo prehrabnih virov v prehrani divjega prašiča (v odvisnosti z geografsko lokacijo, sezono vzorčenja, spolno in starostno strukturo) smo ovrednotili z analizo frekvence relativne abundance (angl. Frequency of relative abundance; FoA%) ter analizo zastopanosti ali pogostosti pojavljanja prehrabnih virov (angl. Frequency of occurrence; FOO%).

FoA% se pogosto uporablja v študijah prehrane prostoživečih živali za oceno relativnega deleža različnih taksonov v prehrani na podlagi števila zaporedij ali odčitkov (npr. Kartzin et al., 2015; Littleford-Colquhoun et al., 2022; Snider et al., 2022). Izraža, kako je posamezen takson številčen v celokupni prehrani glede na ostale prehranske vire, v odvisnosti od velikosti vzorca (števila odčitkov nukleotidnih zaporedij po posameznem taksonu), pridobljenih z metabarkodiranjem DNK. Analiza daje poudarek predvsem na številčnosti posameznega vira. Izračuna se kot delež odčitkov, ki pripadajo določenemu taksonu, glede na celotno število odčitkov v preučevanih vzorcih:

$$\text{FoA (\%)} = (\text{Število odčitkov taksona X}) / (\text{Celotno število odčitkov}) \times 100$$

FOO% je še ena od pogosto uporabljenih kvantitativnih analiz v študijah prehrane (Buzan et al., 2024; Golden et al., 2013; Leighton et al., 2020; Trites et al., 2005). Za razliko od FoA%, FOO% ovrednoti kako pogosto je določen takson najden v nizu preučevanih vzorcev, pri čemer FOO% kaže na pogostost posameznega prehranskega vira v prehrani, ne da bi neposredno ovrednotil njihovo količino ali številčnost. Rezultate torej ne povezuje posredno s številčnostjo (večje število odčitkov ≠ večja številčnost določenega prehranskega vira), temveč oceni zgolj pogostost oz. zastopanost virov (ne glede na oceno številčnosti odčitkov ali številčnosti prehranskega vira), glede na ostale identificirane prehranske vire. FOO% se izračuna kot delež vzorcev, v katerih je bil prisoten določen takson (prehranski vir), glede na skupno število vzorcev:

$$\text{FOO (\%)} = (\text{število vzorcev taksona X}) / (\text{celotno število vzorcev}) \times 100$$

FOO% in FoA% prvih 30 najbolj zastopanih rodov smo izračunali s pomočjo funkcije `transform_sample_counts` orodja `phyloseq` (Bisanz, 2024; McMurdie et al., 2013) in vizualizirali z orodjem `ggplot2` (`ggplot geom_bar`) (Wickham et al., 2016).

DS-5: Vpliv ritja divjih prašičev na vrstno sestavo/pestrost travinja

Izhodišča

Ritine, ki jih divji prašiči vsako leto naredijo na travnikih in njivah, so povezane z njihovim iskanjem hrane (rastlinski deli, talne živali), ki je pod travno rušo. Rastline predstavljajo med 80 % in 90 % prehrane divjih prašičev (Schley et al., 2003), sezonsko pa lahko dosega celo 100 % (zbrano v Ditchkoff et al., 2009). Divji prašiči lahko pomembno vplivajo na dinamiko in vrstno raznolikost vegetacije ter na pogostnost posameznih rastlinskih vrst (Massei et al., 2004). Vpliv divjih prašičev na rastlinstvo je posledica njihove aktivnosti, še zlasti: (i) ritja oz. namenskega prehranjevanja s podzemnimi deli rastlin ter nenamenskih poškodb teh delov rastlin zaradi prehranjevanja s talnimi živalmi; (ii) prehranjevanja z nadzemnimi deli rastlin, še zlasti s plodovi in semeni; (iii) prenašanja

semen zaužitih rastlin z iztrebki (endozoohorija) oziroma semen, ki so se oprijela zunanjih delov telesa, zlasti dlake in/ali parkljev (epizoohorija).

Številne študije navajajo, da je ritje glavni vzrok za negativne vplive divjih prašičev na rastlinske združbe (npr. Singer in sod., 1984; Piroznikow, 1998; Hone, 2002; Bueno, 2011; Bueno in sod., 2011b). Ritje poškoduje rastline, s katerimi se divji prašiči neposredno hranijo (zlasti s čebulicami in korenikami), pa tudi tiste, ki jih sicer ne jedo, a je koreninski sistem teh rastlin ostal izpostavljen atmosferskim vplivom in drugim organizmom (Bratton, 1975). Zaradi ritja se lahko zelo zmanjša pokrovnost zeliščnega sloja v različnih ekosistemih (zbrano v Massei in Genov, 2004; Barrios-Garcia in Ballari, 2012). Na Poljskem, npr., je ritje divjih prašičev v listnatem (lipovo-gabrovem) gozdu (Tilio-Carpinetum) zmanjšalo gostoto mladih drevesc za 1,5-krat do 6-krat (Piroznikow, 1998), na Švedskem pa se je pokrovnost spomladanskih efemernih geofitov v treh letih po začetku pojavljanja ritin zmanjšala s 75 % na 39 % (Brunet in sod., 2016). Ritje lahko zelo negativno vpliva na lokalno izginjanje nekaterih prehransko priljubljenih rastlinskih vrst. Tako se je pogostnost petih, v prehrani divjih prašičev priljubljenih rastlinskih vrst dvajset let po prihodu vrste v narodni park Great Smoky Mountains (ZDA) s 30 % zmanjšala na samo 1 % (Howe in sod., 1981), v naravnem rezervatu Delta de Llobregat (Španija) pa se je deset let po naselitvi prašičev številčnost različnih vrst orhidej zmanjšala za 80 % (Navas in sod., 2010). Ritje lahko zelo vpliva tudi na zmanjšanje podzemne mase rastlin v gozdnih in travniških ekosistemih, kar zelo negativno vpliva na produktivnosti celotne združbe (Sims, 2005). Na območju narodnega parka Circeo (Italija) pa so med drugim ugotovili, da ritje divjega prašiča spreminja tudi vrstno sestavo podrasti zaradi neenakomernega vpliva na vrste z različnimi morfološko-funkcionalnimi potezami - ritje se je, npr., v veliko manjši meri pojavljalo na območjih, kjer so prevladovala trnaste vrste (Burrascano in sod., 2015).

Čeprav ritje zmanjšuje številčnost pri posameznih rastlinskih vrstah (zbrano v Sims, 2005), v nekaterih primerih pa tudi vrstno raznolikost (Hone, 2002; Tierney in Cushman, 2006; Siemann in sod., 2009), pa vendarle praviloma povečuje vrstno bogastvo in pestrost, in sicer v gozdnih, travniških in tudi mokrotnih ekosistemih (Lacki in Lancia, 1986; Kotanen, 1994; Onipchenko in Golikov, 1996; Arrington in sod., 1999; Welander, 2000; Sims, 2005). Ritje namreč predstavlja motnjo, zaradi katere nastajajo nove niše, ki jih pogosto poselijo manj kompetitivne vrste. Povečanje pestrosti je še zlasti izrazito v vrstno revnih združbah (Bueno in sod., 2011b). V raziskavi, ki so jo opravljali na območju gorovja Doupov na zahodu Češke, so, npr., ugotovili, da je ritje na polsuhih traviščih s prevladujočo navadno gloto (*Brachypodium pinnatum* L.) povečalo heterogenost mikrohabitatov, posledično pa je bila na razritih območjih večja tudi vrstna pestrost (Horčíčková in sod., 2019). Do podobnih ugotovitev so prišli tudi na Švedskem, kjer se je število rastlinskih vrst po ritju divjih prašičev povečalo v široki paleti habitatnih tipov (Welander, 1995). Podobno se je v Kaliforniji vrstno bogastvo rastlin leto po ritju sicer zmanjšalo, a se je pozneje povečalo in je preseglo izvirno število prisotnih rastlinskih vrst

(Kotanen, 1995). Leto po ritju začno bujno rasti zlasti enoletnice (Kotanen, 1994, 1995), ponovno naselitev (rekolonizacijo) pa začno predvsem vrste z majhnimi semeni, ki jih raznaša veter (Welander, 2000). Zaradi spremenjenih ekoloških razmer se lahko na območje ritin ponovno naselijo nekatere ogrožene vrste, kot je primer kobulnice zdravilni silj (*Peucedanum officinale* L.) na Madžarskem (Biro in sod., 2010).

Metode

V spomladanskem in poletnem obdobju 2024 smo na nekaterih ploskvah, ki smo jih vključili v pedološke analize, opravili tudi fitocenološke popise po srednjeevropski popisni metodi, in sicer na območju Golt (subalpinski pašnik, Kamniško-Savinjsko LUO), Laz (nižinski travnik, Zasavsko LUO) in Ljubije (nižinski travnik, Savinjsko-Kozjansko LUO). Primerjalno smo na razritih in nerazritih tleh v eni (Laze, Ljubija) oz. dveh (Golte) popisnih ploskvah velikosti 1 m² popisali vse rastlinske vrste, prešteli število osebkov ter ocenili skupno pokrovnost vegetacije. Za vsako popisno ploskev smo nato izračunali Shannonov indeks rastlinske pestrosti ter preverili, če so razlike v vrstni pestrosti med ritinami in neritinami statistično značilne.

DS-6: Ocena učinkovitosti izbranih odvrčalnih ukrepov za odvrčanje divjih prašičev s travinja

Izhodišča

Divji prašič je lovsko upravljavsko zelo pomembna vrsta. Z vidika lova je to zelo zanimiva in privlačna vrsta. Upravljalci lovišč, v katerih se divji prašiči pojavljajo pogosto in predvsem v velikem številu, pa imajo poleg veselja pri lovu na divje prašiče, pogosto tudi veliko skrbi s preprečevanje in sanacijo škode, ki jo divji prašiči povzročajo. Škoda, ki divji prašiči povzročajo, se najpogosteje nanaša na poškodbe na travni ruši, pojavlja pa se tudi škoda na drugih kmetijskih pridelkih. Za preprečevanje oz. zmanjšanje zahajanja divjih prašičev na travinje (in druge kmetijske površine) lastniki zemljišč že vrsto let uporabljajo različne odvrčalne ukrepe (npr. električni pastir, plašila na podlagi zvoka, kot je pok in radijski valovi, v zadnjem času tudi svetila), a je ta uporaba individualna, predvsem pa manjkajo sistematične analize ugotovitev o učinkovitosti posameznih ukrepov.

V okviru CRP projekta »Ritje divjih prašičev: vzroki, posledice in možnosti za zmanjšanje škod ter konfliktov« smo ponovno skušali sistematično ugotoviti kakšna je učinkovitost posameznih odvrčalnih ukrepov na območju kjer je številčnost divjih prašičev visoka in kjer se škode na kmetijskih površinah (predvsem na travinju) pogosto pojavljajo. Osredotočili smo se na tri vrste odvrčalnih sredstev, in sicer zvočna odvrčala, kemična odvrčala in električnega pastirja, pri čemer smo želeli bolj podrobno preučiti in razviti zvočna odvrčala.

Zvočna odvrčala in njihova učinkovitost pri preprečevanju škode na kmetijskih površinah so bila v Sloveniji delno že preizkušena v preteklosti v okviru CRP projekta »Preizkus možnosti uporabe in učinkovitosti (ultra)zvočnih odvrčalnih naprav za zmanjšanje konfliktnih situacij (škod) med ljudmi in velikimi vrstami prostoživečih živali« (Pokorny in sod., 2008). Namen preizkusa je bil ugotoviti učinkovitost zvočnih odvrčal za preprečevanje zahajanja divjih prašičev na koruzne njive na Kočevskem in v Zasavju. Izkazalo se je, da so zvočna odvrčala kratkotrajno lahko učinkovita, če imajo živali možnost dostopa do alternativnega prehranskega vira (tj. nezaščitenih njiv koruze), ne pa če je to njihov edini vir. Na monokulturi koruze v Livoldu, kjer v bližini ni bilo drugega vira koruze, so prašiči na njivo vstopali tudi neposredno ob postavljenih zvočnih odvrčalih in zvok nanje ni imel vpliva. Na raziskovalni lokaciji v lovišču LD Litija, pa je bil odvrčalni ukrep uspešen, saj so prašiči prenehali zahajati na to lokacijo. V tem primeru je bilo v okolici več drugih alternativnih koruznih njiv, na katere so se umaknili (Pokorny in sod., 2008).

Pokorny in sod. (2008) so vpliv zvočnih odvrčal na živali preizkušali tudi tako, da so snemali reakcijo srnjadi in jelenjadi na (ultra)zvok. Poizkus je bil izveden s pomočjo daljinskega sprožilca, v dveh nočeh, na krmišču LD Planina. Ugotovljeno je bilo le to, da zvok na jelenjad in srnjad deluje odvrčalno, da pa živali ne odreagirajo panično in bi se s časoma na tak signal lahko tudi navadile.

Učinkovitost zvočnih odvrčal so spremljali tudi v okviru CRP projekta »Vzroki in vplivi decembrskega vetroloma (2017) na nadaljnji razvoj jelovo bukovih sestojev v Sloveniji« (Čater in sod., 2021). Ugotovili so, da je bil odziv na zvočna odvrčala vrstno specifičen, in sicer so bila precej učinkovita v primeru srnjadi, ki se je na raziskovalni ploskvi manj prehranjevala in je pogostejše s ploskev zbežala. V primeru jelenjadi so bila zvočna odvrčala manj učinkovita, a avtorji vseeno zaključujejo, da je uporaba zvočnih odvrčal uspešen ukrep pri zaščiti pred objedanjem gozdnega mladja.

Sicer so se zvočna odvrčala kot odvrčalni ukrep v Sloveniji pred raziskavami preprečevanja škode na kmetijskih površinah in v gozdu, uporabljala predvsem pri preprečevanju povozov. Njihova učinkovitost je bila do sedaj že večkrat potrjena (zbrano v Jelenko in sod., 2013; Pokorny in sod., 2016). Na odsekih z zvočnimi odvrčali je bilo število povoženih parkljarjev v proučevanjem obdobju 2019/2020 za 32 % manjše v primerjavi s povprečjem za prejšnja štiri leta (Pokorny in sod. 2022). Kljub temu, pa so lahko zvočna odvrčala lahko tudi precej neučinkovita, predvsem zato, ker se živali, ob pogosti izpostavljenosti nanje zelo hitro privadijo (Farrell, 2002).

Z uporabo kemičnih odvrčal za preprečevanje povozov so v nekaterih državah srednje in severne Evrope (npr. Nemčija, Švedska) pričeli v osemdesetih letih prejšnjega stoletja (Pokorny in sod. 2006). Ta odvrčala delujejo na način, da z neprijetnim ali celo zastrašujočim vonjem odganjajo divjad od bližine cest in preprečujevali njihovo prečkanje. Pri repelentih, namenjenih izključno preprečevanju

naletov divjadi na cestišča, se aktivna komponenta prek posebne brizgalke vnese v organsko peno, ki se predhodno nanese na vegetacijo ali stebričke ob cestišču; pod vplivom svetlobe se iz organske pene začno sproščati hlapne snovi z neprijetnim vonjem, kar za divjad ustvari posebno vrsto nevidne vonjalne ograje. Ker se substance sčasoma razgradijo, je potrebno tovrstno ogrado redno vzdrževati (v poletnem času na nekaj tednov, sicer pa na dva do tri mesece).

Pri divjih prašičih je voh zelo pomemben čut, ki ima zelo pomembno vlogo v biologiji vrste. Ravno zaradi tega, bi lahko predvidevali, da bodo imeli kemični repelenti uspešen odvrčalni učinek. Schlageter in Wackernager (2011) sta preizkušala učinkovitost kemičnih repelentov ("Wildschwein-Stopp®") proti zahajanju divjih prašičev na kmetijske površine. Poskus je bil izveden na treh različnih regijah v kantonu Basel-Land v severnem delu Švice. Repelent so namestili na krmišča, ki so bila nameščena na travnatih površinah v bližini gozda. Na krmiščih je bila nameščena vaba – hrana (mešanica jabolk, koruze in proteinsko bogatih briketov). Z raziskavo so ugotovili, da repelent ni preprečil prehajanja prašičev na krmišča, saj so zabeležili minimalen in neznačilen vpliv odvrčala na divje prašiče (0,4 %). Raziskovalci zaključujejo, da omenjeni kemični repelenti niso učinkovito odvrčalno sredstvo, ki bi lahko preprečilo zahajanje divjih prašičev na kmetijske površine.

Villardell in sod. (2008) so ugotavljali kako učinkoviti so kemični repelenti pri preprečevanju plenjenja gnezd ogrožene vrste želve (*Testudo hermanni hermanni*). Namen te študije je bil preizkusiti učinkovitost kemičnih repelentov za preprečevanje plenjenja. Edini opazen učinek uporabe repelentov je bil časovni zamik plenjenja, vendar so bila po 4 dneh skoraj vsa zaščitena gnezda plenjena.

Snow in sod. 2021 so v poskusu, ki so ga izvedli v ZDA (Alabama in Teksas) kemična odvrčala uporabili na nekoliko drugačen način, in sicer tako, da so s kemičnih sredstvom (Antraquinon) tretirali koruzna zrna. Tako tretirana zrna so divje prašiče odvrnila od tega, da bi se z njimi prehranjevali. Odvrčalo je bilo učinkovito in je bilo odvisno od višine koncentracije Antraquinona. Učinkovitost je bila 95 % v Alabami in 59 % v Teksasu. Poleg divjih prašičev so spremljali tudi vpliv na druge vrste in ugotovili, da sredstvo ni imelo odvrčalnega vpliva na rakuna, vplivalo pa je na belorepega jelena (*Odocoileus virginianus*) in pa na mulastega jelena (*Odocoileus hemionus*).

Kot eden izmed najbolj učinkovitih ukrepov za preprečevanje škode, velja uporaba električnega pastirja (Santilli in sod. 2006; Poole in sod. 2002, Vidrih in Trdan, 2008). V Sloveniji je bilo že narejenih nekaj raziskav učinkovitosti električnega pastirja pri preprečevanju škode na kmetijskih površinah (npr. Vidrih in Trdan, 2008, Vidrih in sod. 2016). Vidrih in Trdan (2008) sta za preprečevanje vdora divjega prašiča na koruzno njivo na dveh poskusnih območjih (Šmihel in Postojna) v poskusu uporabila začasno elektroograjo in izvedla poskus varovanja posevka (silažne) koruze pred divjim prašičem od konca julija (zadnje dognovanje) do spravila pridelka. Uporabila sta naslednje tri postavitve začasne elektroograje: 1) plastični količek z elektrovrstico in dvema

elektrotrakoma z razmiki 15,15 in 30 cm, 2) plastični količek z elektrovrstico in elektrotrakom z razmikoma 25 in 25 cm, in 3) železni količek v obliki distančnika (številke 7) in višino vrvice/trakov 15, 30 in 55 cm. Med poskusom vse do spravila pridelka ni prišlo do vdora divjih prašičev na ograjeni del zemljišča. Na zunanji strani ograje so bile opazne sledi divjega prašiča. Škoda je bila ugotovljena na sosednjih njivah, ki niso bile varovane.

Vidrih in sod. (2016) zaključujejo, da sočasne elektroograje, ki so sestavljene iz traku, vrvice, vrvi ali mreže, dober način, da divjadi preprečimo dostop na varovana zemljišča in jih usmerimo tja, kjer bo njihova škoda manjša. Pri tem je pomembno, da kadar so le-te pravilno postavljene in vzdrževane. Druga dva dejavnika za zagotavljanje učinkovitosti sta čas in obdobje postavitve ter neprekinjeno in zadovoljivo (dovolj visoka napetost in jakost) napajanje vodnikov elektroograje s pulzi pašnega aparata.

Honda (2021) je ugotavljal kakšna napetost je najbolj ustrezna za odvrčanje različnih vrst živali. V okviru poskusa, ki je potekal na Japonskem, so po gozdu postavili majhne električne ograje. Znotraj in zunaj ograje so namestili vabe. S pomočjo fotopasti je spremljal odzive različnih živalskih vrst. Ugotovil je, da večje vrste, npr. divji prašič, že pri nižjih napetostih ograje (1500 V) niso prestopile, med tem ko je morala biti pri srednje velikih vrstah (rakunasti psi, jazbeci) ta napetost višja (10000 V), saj so te živali pri nižjih napetostih ograje prehajale. Razlog za to bi lahko bila električna prevodnost tal, saj so ugotovili, da je prevodnost večja, če je teža na tleh večja.

Električne ograje so na ravni Evrope najbolj priljubljena metoda za zaščito kmetijskih polj pred škodo, ki jo povzročajo divji prašiči. Kljub učinkovitosti, pa je ta ukrep pogosto predmet razprav, saj pogosto prihaja do tega, da se škoda le preusmeri z zaščiteneh na nezaščitena polja, ne da bi dosegli splošno zmanjšanje škode. Poleg tega je ta ukrep povezan tudi z visokimi stroški materialov in vzdrževanja ograje.

Santili in sod. (2006) so ocenjevali učinkovitost 16,5 km dolge linearne električne ograje, nameščene za zaščito velikega namakalnega kmetijskega območja, kjer večinoma gojijo koruzo, na jugu Toskane (Italija). V petih letih po postavitvi ograje je bilo na zaščiteneh območjih opaženo 93 % zmanjšanje škode, ne da bi pri tem opazili znatno povečanje škode na sosednjih območjih. Da je bil ukrep uspešen, so ocenili tudi iz ekonomskega vidika. Avtorji zaključujejo, da bi moral biti natančno načrtovan ukrep postavitve električnih ograj na velikih kmetijskih območjih, del integrirane strategije za zmanjšanje konfliktov med kmeti in populacijami divjih prašičev.

Metode

Učinkovitost različnih odvrčalnih sredstev smo testirali na lokacijah na širšem območju Vnajnarij, v lovišču Laze v Zasavskem LUO. Na lokacijah, na katerih smo testirali odvrčala, je zaznana stalna

prisotnost prašičev in se škoda pojavlja vsako leto, že več let zapored. V letih od 2017 do 2022 se je letni odvzem gibal med 131 in 164 odvzetimi prašiči, kar znaša v povprečju 145 odvzetih prašičev na leto. Pri testiranju odvrčal smo se osredotočili na lokacije, kjer opažamo znake ritja prašičev vsako leto (L1), poleg tega pa smo odvrčala (zvočna) testno preizkusili še na lokaciji, ki je bila umeščena sredi gozda in od najbližjih kmetijskih površin oddaljena vsaj 1200 m zračne linije (L2).

Testirali smo učinkovitost različnih vrst odvrčal, in sicer zvočnih in kemičnih ter električnega pastirja. Podrobno smo se osredotočili na testiranje učinkovitosti zvočnih odvrčal, ki smo jih razvijali v sodelovanju z Laboratorijem za elektronske naprave (LEN) na Gozdarskem inštitutu Slovenije.

Zvočna odvrčala

Testiranje učinkovitosti zvočnih odvrčal smo izvajali dve leti zapored, in sicer v letih 2023 in 2024. V letu smo učinkovitost odvrčal spremljali na eni lokaciji, privabljalnem krmišču za divje prašiče (L1), v letu 2024, pa smo poleg te lokacije dodali še eno lokacijo sredi gozda.

V marcu 2023 (8.3.2023) smo na privabljalno krmišče za divje prašiče namestili kamero za spremljanje prisotnosti divjih prašičev, kasneje pa smo na isti lokaciji izvedli testiranje zvočnih odvrčal in reakcijo prašičev na odvrčala. Zvočna odvrčala so bila izdelana na Gozdarskem inštitutu Slovenije v Laboratoriju za elektronske naprave (LEN). Cilj je bil razviti zvočno odvrčalo, ki se ne bo prožilo periodično, temveč se bo sprožilo šele ob zaznanem gibanju divjadi. Z nenehnim proženjem in ponavljajočimi se istimi zvoki, obstaja večja možnost, da se živali na zvoke navadijo. Zvočna odvrčala so se tako sprožila s pomočjo senzorja gibanja, v njih pa smo namestili 10 različnih zvokov, ki so se poljubno menjali. Zvoki so vključevali glasbo, žvižganje, ploskanje, udarjanje kovine ob kovino, pasji lajež. Na ta način smo zagotovili raznolikost zvokov in se skušali izogniti temu, da bi se živali na prehitro zvoke navadile.

Na krmišču smo skušali posneti odziv prašičev na odvrčalo. Na krmišče, kjer smo 2 meseca prej spremljali prisotnost prašičev, smo namestili zvočno odvrčalo in spremljali odziv. Pred namestitvijo zvočnih odvrčal so bili prašiči na krmišču stalno prisotni (slika 3). Po postavitvi odvrčal, smo na krmišče še vedno polagali koruzo in spremljali odziv. Za uspešno izvedbo raziskave smo želeli ugotoviti, ali bo kljub vabi (koruzi) odvrčalo uspešno delovalo in pa, ali se bodo prašiči, ki jih bo odvrčalo pregnalo, premaknili na drugo krmišče, k drugemu prehranskemu viru.

Odvrčalo smo namestili na krmišče, zraven njega je bila nameščena kamera za spremljanje odziva prašiče. Kamera je delala videoposnetke. Nasproti te kamere in odvrčala, na drugo stran krmišča, smo namestili še eno kamero, ki je delala fotografije in jih pošiljala preko aplikacije Molnus. S pomočjo tega smo lahko že na daljavo spremljali prisotnost prašičev in se glede na to po potrebi lahko odpravili na teren pregledati video posnetke in delovanje zvočnega odvrčala.

V letu 2024 smo poskus ponovili. Za potrebe poskusa, smo poleg obstoječega privabljalnega krmišča (Lokacija 1) izbrali še eno lokacijo sredi gozda (Lokacija 2) (sliki 4 in 5). Ta lokacija je od najbližjih kmetijskih površin oddaljena vsaj 1200 m zračne linije. Želeli smo ugotoviti, ali je zvočno odvrčalo bolj učinkovito na območjih, kjer prašiči niso vajeni človekove prisotnosti. Na tem mestu je sicer že več let postavljena solnica za divjad, v času poskusa, pa smo sem polagali še manjše količine vabe (koruze) in s pomočjo fotopasti spremljali odziv prašičev na zvočno odvrčalo.

Kemična odvrčala

Pri preizkušanju kemičnih odvrčalnih sredstev smo uporabili kemično odvrčalo Hagopur Duftzaun-Scent® Barrier, ki se sicer uporablja za preprečevanje povoza divjadi na cestah, v preteklosti pa smo ga že testirali za odganjanje rastlinojedih parkljarjev (jelenjadi, srnjadi) v pomladitvenih gozdnih jedrih. Ker smo tam posneli nekaj odzivov divjih prašičev (pozitivno je delovalo na samce, ne pa družine svinj z mladiči), smo se odločili, da ga preizkusimo še v tem projektu, kjer bo tarčna vrsta divji prašič. Odvrčalno sredstvo smo namestili v začetku maja (3. 5. 2023) na skupni dolžini cca. 270 m na mejo med gozdom in travniki, na katerih se vsako leto pojavljajo znaki ritja divjih prašičev. Proizvajalec zagotavlja, da kemikalija učinkuje od 5 do 6 tednov po nanosu, nato pa je treba kemično sredstvo ponovno nanesti. Učinkovitost kemičnega odvrčala smo spremljali le v letu 2023.

Električni pastir

Električnega pastirja (CAMOUFLAGE A (12V/4,8J/70km)) smo postavili na razdalji 300 m na rob med gozdom in travnikom, na katerem so se predhodno vsako leto pojavljale večje škode zaradi ritja divjih prašičev. Električna žica je bila nameščena na višini 25 cm od tal. Pastirja smo po potrebi redno vzdrževali (polnjenje baterije, košnja trave ob pastirju), da je deloval brezhibno. Učinkovitost električnega pastirja smo spremljali le v letu 2023.

DS-7: Zasnova metodologije ocenjevanja številčnosti divjih prašičev v Sloveniji z uporabo fotopasti

Izhodišča

Številčnost oz. populacijske gostote divjih prašičev povsod po Evropi v zadnjih desetletjih izrazito naraščajo (Massei in sod., 2015), kar je eden ključnih vzrokov za večanje škod na kmetijskih površinah, vključno z ritjem (Pokorny in Jelenko, 2013). Vendar trenutno dejanskih številčnosti vrste nikjer v Evropi ne poznamo. Zaradi tega je v zadnjih letih nastala mednarodna mreža raziskovalcev divjih prašičev, ki pod okriljem projekta Enetwild oz. platforme European Observatory of Wildlife skuša razviti sodobne in realne metode, ki bi jih bilo za ugotavljanje številčnosti vrste mogoče standardizirano izvajati povsod po Evropi, pri čemer je poseben poudarek na uporabi podatkov o odvzemu, kjer Slovenija zaradi kakovosti podatkov predstavlja modelno državo (Enetwild consortium,

2021), in predvsem fotopasti (Enetwild consortium, 2022). Fotopasti se pogosto uporabljajo za merjenje razširjenosti in gostote vrst ter ritma aktivnosti prostoživečih živali. Zanesljive ocene števila prostoživečih živali, vključno z gostoto, so potrebne za spremljanje populacijskih trendov, za ocene tveganja in razvoj izboljšanih strategij upravljanja. Fotopasti so za razvoj monitoringa prostoživečih živali s pomočjo državljanske znanosti eden najpomembnejših pripomočkov tudi v sklopu H-2020 projekta StepChange (*Science Transformation in EuroPe through Citizens involvement in HeAlth, coNservation and enerGY rEsearch*), ki poteka tudi v Sloveniji.

Skladno z že razvito metodologijo in protokoli (ENETWILD-consortium, 2023) je bil cilj ob začetku projekta v izbranih loviščih namestiti večje število kamer (fotopasti), zbrane posnetke živali (divjih prašičev) pa uporabiti za oceno populacijskih gostot (npr. z uporabo modela naključnih srečanj; angl. random encounter model, REM). Protokol postavitve kamer in algoritmi obdelave podatkov so bili že razviti, zato smo z implementacijo v praksi pridobili realne podatke o številčnosti in gostoti populacije divjih prašičev v izbranih območjih, kar je pomemben vhodni podatek za razumevanje vzrokov za prostorsko in časovno variabilnost ritja te vrste.

Izvedba sklopa bo prispevala k realizaciji projektnih ciljev:

- Začeti s sistematičnim ocenjevanjem številčnosti oz. populacijskih gostot divjih prašičev v Sloveniji (kot enega ključnih vplivnih dejavnikov na nastanek škod na travinju), in sicer z implementacijo sodobnih raziskovalnih tehnik/pripomočkov ter vključevanjem v evropske konzorcije/mreže, ki razvijajo tovrstne metode (npr. European Observatory of Wildlife).
- Prispevati k izobraževanju, vzgoji novih kadrov in dvigu raziskovalnega potenciala na področju raziskav divjadi in lovstva v Sloveniji.

Metode

Fotopasti (angl. »camera traps« (CT)) smo namestili v skladu z navodili mednarodnega konzorcija ENETWILD-2 oz. projektne aktivnosti European Observatory of Wildlife (EOW), katerega osnovni namen je standardiziran vseevropski monitoring in ugotavljanje populacijskih gostot večjih vrst sesalcev, s poudarkom na divjem prašiču (ENETWILD-consortium 2023). Za vsako izbrano lovišče smo, kot predvideva protokol, izbrali 36 lokacij, na katere smo namestili po 12 kamer v treh šesttedenskih obdobjih. Za izbiro lokacij postavitve smo uporabili računalniški program, ki je točke (lokacije) naključno razporedil v sistematični mreži s fiksnim razmikom med njimi (1,5 km), s čimer smo tudi zagotovili naključnost vzorčenja. V letu 2022 smo fotopasti namestili v dveh loviščih Primorskega LUO (Rižana in Vrhe Vrabče), v letu 2023 pa smo kamere namestili še v dveh dodatnih loviščih, in sicer Oljka Šmartno ob Paki (Savinjsko-Kozjansko LUO) in Žabnik-Obrov (Primorsko LUO).

Na terenu smo kamere skušali postaviti čim bližje računalniško določeni točki, vendar je bilo to zaradi neprimernosti reliefa oz. nepreglednosti lokacije v nekaterih primerih onemogočeno; v vseh primerih pa so bile lokacije izbrane v radiusu <150 m od vnaprej določene točke. Kamere so bile v skladu s protokolom (Enetwild in sod., 2023) nastavljene tako, da so delovale 24 ur dnevno in so neprekinjeno brez premora med serijami posnetkov (interval 0 – 1 s) hkrati zajemale največje možno število zaporednih fotografij v hitrem zaporedju (skupno po 8 fotografij). Bliskavico smo nastavili na srednjo intenzivnost, s čimer smo se izognili prekomerni osvetljenosti fotografij. Kamere smo namestili na primerna drevesa na višini 50 cm na tlemi, pri čemer smo, v kolikor je bilo to izvedljivo, fotopasti usmerili proti severu. Na vseh lokacijah smo za oceno velikosti območja, ki ga je zajemala posamezna kamera, in za določanje hitrosti gibanja živali izvedli fotogrametrijo, pri kateri računalniški vid preslika položaje slikovnih pik v realne položaje na tleh, ki temeljijo na poziciji kamere. Za oceno položaja živali na slikah uporabljamo zemljevid za umerjanje, ki ga sestavljajo kalibracijske palice s kontrastnimi pasovi, postavljene v vidno polje kamere na vsaki lokaciji. Vsak kontrastni pas na kalibracijski palici označuje razdaljo vsakih 20 cm. Za ustvarjanje zemljevida za umerjanje na terenu smo na vsaki lokaciji postavljali kalibracijsko palico znotraj vidnega polja kamere, pri čemer smo zajeli vsaj 25 do 30 točk postavitve palice, ki so bile razporejene čez celotno vidno polje kamere, pri čemer smo med postavitvami ohranjali razdaljo 0,5 m. Pri postavitvi smo zagotovili, da se je spodnji del palice dotikal tal, ta pa je bila postavljena pravokotno na vidno polje kamere.

Po pregledu vseh sekvenc, ki smo jih posneli s fotopastmi, smo za izračun populacijske gostote divjih prašičev uporabili paket *camtrapDensity* (<https://bit.ly/45wU5Ya>) v programu RStudio (RStudio Team 2020). Ta nam omogoča, da iz podatkov, izvoženih iz programa Agouti, pridobimo oceno populacijske gostote za ciljne vrste. Za izračun gostote smo uporabili model naključnega srečanja (angl. random encounter model; REM) (ENETWILD, 2020), ki za izračun gostote upošteva napor raziskave (kamera dni), dnevni razpon oz. povprečna razdalja, ki je odvisna od hitrosti premikanja in aktivnost vrste, polmer zaznavanja in kot zaznavanja. REM model določanje gostote temelji na način brez identifikacije posameznih osebkov.

DS-9: Diseminacija rezultatov

V sklopu projekta je nastalo oz. nastaja več izvirnih znanstvenih in strokovnih člankov ter strokovno-znanstvena monografija o divjem prašiču. Raziskovalno delo smo povezovali s pedagoškim procesom – v okviru projekta je bilo izdelanih več diplomskih/magistrskih del. Diseminacijo smo povečali s pripravo spletne strani, na kateri so podrobno predstavljene projektne aktivnosti in dosežki. Tekoče novice in dogajanja v okviru projekta smo širili tudi preko socialnih omrežij za različne ciljne skupine (npr. Twitter, Instagram, Facebook), pa tudi prek spletnih strani sodelujočih institucij. Rezultati so bili predstavljeni na več strokovnih srečanjih (Lovski dnevi, mednarodne konference).

Znanstvene objave (izvirni znanstveni članki)

- Stefanović M., Velickovic N., **Bončina A.**, Potušek S., Matić I., Djan M., **Bužan E.** Duplication, recombination and weak selection shape evolution at the MHC class II SLA-DRB1 locus in wild boars from the western Balkans. *Mammalian biology*. 2024, str. 1-10, ilustr. ISSN 1616-5047. <https://link.springer.com/article/10.1007/s42991-024-00433-3>, <https://doi.org/10.1007/s42991-024-00433-3>, DOI: 10.1007/s42991-024-00433-3.
- de Jong J.F., Iacolina L., Prins H.H.T., van Hooft P., Crooijmans R.P.M.A., van Wieren S.E., Vicente Baños J., Baubet E., Cahill S., Ferreira E., Fonseca C., Glazov P.M., Jelenko Turinek I., Náhlík A., Lizana Martín V.M., **Pokorny B.**, Podgórski T., Šprem B., Veeroja R., Ydenberg R.C., Megens H.J. 2023. Spatial genetic structure of European wild boar, with inferences on late-Pleistocene and Holocene demographic history. *Heredity*, 130(3): 135–144, doi: 10.1038/s41437-022-00587-1.
- **Bončina A.**, **Pokorny B.**, **Iacolina L.**, **Bužan E.**, Potušek S. 2022. Molekularno-genetske raziskave divjega prašiča razkrile pojav večočetovstva in matrilinealnega učinka socialnih skupin. *Zlatorogov zbornik*, 9:35–60.
- Enetwild-consortium, Guerrasio T., Acevedo P., Aleksovski V., Apollonio M., Arnon A., Barroqueiro C., Belova O., Berdión O., Blanco-Aguilar J.A., Bijl H., Bleier N., Bučko J., **Bužan E.**, Carniato D., Carro F., Casaer J., Carvalho J., Csányi S., del Rio L., Del Val Aliaga H., Ertürk A., Escribano F., **Duniš L.**, Fernández-Lopez J., Ferroglio E., Fonseca C., Gačić D., Gavashelishvili A., Giannakopoulos A., Gómez-Molina A., Gómez-Peris C., Gruychev G., Gutiérrez I., Häberlein V., Hasan S.M., Hillström L., Hoxha B., Iranzo M., Janječić M., Jansen P., Illanas S., Kashyap B., Keuling O., Laguna E., Lefranc H., Licoppe A., Liefting Y., Martínez-Carrasco C., Mrđenović D., Nezaj M., Pardavila X., Palencia P., Pereira G., Pereira P., Pinto N., Plhal R., Plis K., Podgórski T., **Pokorny B.**, Preite L., Radonjić M., Rowcliffe M., Ruiz-Rodríguez C., Santos J., Rodríguez O., Scandura M., Sebastian M., Sereno J., Šestović B., Shyti I., Somoza E., Soriguer R., Solà de la Torre J., Soyumert A., Šprem N., Stoyanov S., Smith G.C., Sulce M., Torres R.T., Trajçe A., Urbaitis G., Urbani N., Uguzashvili T., Vada R., Zanet S., Vicente J. 2023. Wild ungulate density data generated by camera trapping in 37 European areas: first output of the European Observatory of Wildlife (EOW). EFSA Supporting Publication 2023: EN-7892, 90 str. doi:10.2903/sp.efsa.2023.EN-7892.

Prispevki na konferencah

- **Bončina A.**, Sollitto M., **Pokorny B.**, Šprem N., **Bužan E.** Metabarcoding analysis of wild boar (*Sus scrofa*) dietary preferences at rooting sites 10th Congress of the Genetic Society of Slovenia & 10th Meeting of the Slovenian Society for Human Genetics.
- **Bužan E.** Genomic approaches in wildlife management and conservation. V: Benussi, Matteo (ur.), Privileggio, Luca (ur.), Pajmon Rak, Taja (ur.). SymBioSE 2023 Slovenia : abstract booklet : 27th Symposium of Biology Students in Europe : Koper, 23rd - 29th July. Electronic ed. Marežige: Mladinsko društvo, 2023. Str. 15. ISBN 978-961-96335-0-2.
- **Bužan E.** Genetic data are crucial to conserve and manage wildlife in Southeast Europe. Genetics & applications. 2021, vol. 5, no. 2, str. 18. ISSN 2566-431X. <http://www.genapp.ba/index.php/genapp/article/view/145>, Repozitorij Univerze na Primorskem - RUP, DOI: 10.31383/ga.vol0iss0pp1-95.
- Anteljević A., **Duniš L.**, **Bužan E.**, **Pokorny B.** Camera traps as a modern way to monitor wildlife. V: Marjanović K. (ur.), Zagoranski M. (ur.). 3. Biološko-psihološka študentska konferenca = 3rd Biological-Psychological Student Conference : zbornik povzetkov = abstract book : Koper, 14.-16. september 2023. Koper: Društvo študentov biopsihologije: = Associazione di studenti di Biopsichologia, 2023. Str. 46. ISBN 978-961-96371-0-4.
- **Pokorny B.**, **Bužan E.**, **Bončina A.**, **Duniš L.**, **Iacolina L.**, **Jerina K.**, **Stergar M.**, Jelenko Turinek I., **Flajšman K.**, **Alagić A.**, **Levanič T.**, **Al Sayegh-Petkovšek S.**, Kotnik, Klemen, **Šprem N.**, **Kos I.**, **Potočnik H.** Divji prašič : kaj že vemo in kaj bi še želeli ugotoviti o vrsti v Sloveniji. V: Pokorny B. (ur.). Lovstvo, trajnostna raba naravnih virov in biodiverziteta : zbornik izvečkov : 14. Slovenski lovski dan, Celje, 18. marec 2023. 14. Slovenski lovski dan, Celje, 18. marec 2023. Ljubljana: Lovska zveza Slovenije, Strokovno-znanstveni svet LZS, 2023. Str. 13.
- **Duniš L.**, **Pokorny B.**, **Potočnik H.**, **Kos I.**, Krstić M., Velkavrh Ž., **Bužan E.** Državljanska znanost in uporaba fotopasti kot moderen način monitoringa divjadi. V: POKORNY, Boštjan (ur.). Lovstvo, trajnostna raba naravnih virov in biodiverziteta : zbornik izvečkov : 14. Slovenski lovski dan, Celje, 18. marec 2023. 14. Slovenski lovski dan, Celje, 18. marec 2023. Ljubljana: Lovska zveza Slovenije, Strokovno-znanstveni svet LZS, 2023. Str. 17
- **Bužan, Elena**, **Bončina, Aja**, Urzi, Felicita, **Duniš, Luka**, **Potočnik, Hubert**, **Kos, Ivan**, **Pokorny, Boštjan**. Exploring wild boar rooting behaviour and wolf predation through DNA metabarcoding : unravelling ecological insights. V: Quo vadis wildlife management? : 36th Congress of International Union of Game Biologists : 28–31. 08. 2023, Warsaw, Poland. 36th International Union of Game Biologists, 28–31. 08. 2023, Warsaw, Poland. [S. l.: s. n.], 2023. Str. 33-34. <https://wildlife.wisent.org/abstracts/>.

- **Bončina A., Duniš L., Pokorny B., Iacolina L., Bužan E.** First insights into spatial, reproductive and social behaviour of wild boar by using MHC and neutral genetic diversity. V: Book of abstract : 13th International Symposium on Wild Boar and Other Suids, 6th-9th September 2022, Seva, Barcelona, Spain. 13th International Symposium on Wild Boar and Other Suids, 6th-9th September 2022, Seva, Barcelona, Spain. [S. l.: s. n., 2022]. Str. 136. https://wildboarsymposium.com/wpcontent/uploads/2022/09/13th_Wild_Boar_Symposium_2022_Seva.pdf.
- **Pokorny B., Cerri J., Šprem N., Safner T., Bužan E.** Detrimental effects of long-lined anthropogenic barriers : deer mortality on roads, railways, and in border fences in Slovenia. V: KONJEVIĆ, Dean (ur.), BUJANIĆ, Miljenko (ur.), ŠKVORC, Nikolina (ur.). Book of abstracts 2022 : 10th International Deer Biology Congress, Osijek, Croatia 4th-9th September 2022. 10th International Deer Biology Congress, Osijek, Croatia 4th-9th September 2022. Zagreb: University of Zagreb, Veterinary Faculty; Osijek: University J. J. Strossmayer, Faculty of Agrobitechnical Sciences Osijek, 2022. Str. 77-78.
- **Bužan E., Pokorny B., Šprem N., Konjević D.** Molecular data improve understanding of deer evolutionary history, conservation, and management. V: KONJEVIĆ, Dean (ur.), BUJANIĆ, Miljenko (ur.), ŠKVORC, Nikolina (ur.). Book of abstracts 2022 : 10th International Deer Biology Congress, Osijek, Croatia 4th-9th September 2022. 10th International Deer Biology Congress, Osijek, Croatia 4th-9th September 2022. Zagreb: University of Zagreb, Veterinary Faculty; Osijek: University J. J. Strossmayer, Faculty of Agrobitechnical Sciences Osijek, 2022. Str. 43-44.
- Kanalec S., **Bončina A., Bužan E.** Izdelava kmetijsko upravljaljske strategije za ohranjanje biodiverzitete v kmetijski krajini. V: PRIVILEGGIO, Luca (ur.), KLEPAC, Anja (ur.), PAJMON RAK, Taja (ur.). BPSC 2022 : 2. Biološko-psihološka študentska konferenca = 2nd Biological-Psychological Student Conference : zbornik povzetkov = abstract book : Koper, 15.-17. september 2022. Elektronska različica. Koper: Društvo varstvenih biologov - Biodiva, 2022. Str. 18. ISBN 978-961-95930-1-1. <https://bio-psi-konferenca.famnit.upr.si/sl/resources/files//konferenca/zborniki/bpsc2022digital.pdf>.
- **Bončina A., Iacolina L., Pokorny B., Bužan E.** Uporaba molekularnih orodij za proučevanje genetske povezanosti, prostorsko-razmnoževalnega in socialnega vedenja divjega prašiča in evropske srne. V: PRIVILEGGIO, Luca (ur.), et al. 1. Biološko-psihološka študentska konferenca = 1st Biological-Psychological Student Conference : Koper, 9.–10. oktober 2021 = Koper, 9–10 October 2021 : zbornik povzetkov = abstract book : BPSC 2021. Elektronska izd. Koper: Založba Univerze na Primorskem, 2021. Str. 44-45. ISBN 978-961-293-143-8, ISBN 978-961-293-144-5. <https://www.hippocampus.si/ISBN/978-961-293-143-8.pdf>.

- **Bužan E.** Affiliation of genetics and genomics in wildlife management and consolation. V: Abstract book. Tashkent: [s.n.], 2021. Str. 12.
- **Bončina A., Bužan E., Pokorny B.,** Iacolina L. Genetics as a useful tool for understanding relatedness, movements and social behaviour in wild boar. V: Book of abstracts : 25-27 January 2021, Kaunas, Lithuania. [S. l.: s. n., 2021]. Str. 41.

Drugi bibliografski dosežki projektne skupine (intervjuji)

- **Pokorny, B.** 2023. Celjane skrbijo obiski divjih prašičev, lovci nemočni, saj gre za nelovno površino. Dnevnik. Ljubljana: Radiotelevizija Slovenija. https://www.rtv slo.si/okolje/celjane-skrbijo-obiski-divjih-prasicev-lovci-nemocni-saj-gre-za-nelovno-povrsino/685710?fbclid=IwAR05E7yNHj-6bjxsHA3ZT_LZ1FdaOm5BcTUXhq4BgcWtkp-zrPTO0F7iS4Q.
- Trobič M., Vrezec A., **Pokorny B.** 2023. Živali v urbanem. Ljubljana: Radiotelevizija Slovenija. Nedeljska reportaža. <https://prvi.rtv slo.si/podkast/nedeljska-reportaza/96>.

3. Izkoriščanje dobljenih rezultatov:

3.1. Kakšen je potencialni pomen rezultatov in učinkov vašega raziskovalnega projekta:

- F.01 Pridobitev novih praktičnih znanj, informacij in veščin
- F.02 Pridobitev novih znanstvenih spoznanj
- F.03 Večja usposobljenost raziskovalno-razvojnega osebja
- F.15 Razvoj novega informacijskega sistema/podatkovnih baz
- F.18 Posredovanje novih znanj neposrednim uporabnikom (seminarji, forumi, konference)
- F.27 Prispevek k ohranjanju/varovanje naravne in kulturne dediščine
- G.06 Varovanje okolja in trajnostni razvoj

3.2. Označite s katerimi družbeno-ekonomskimi cilji sovpadajo rezultati vašega raziskovalnega projekta:

- 2 Okolje: varovanje živalskih vrst in njihovega naravnega okolja
- 8 Kmetijstvo: kmetijstvo, gozdarstvo in ribištvo
- 12 Splošni napredek znanja: biološke vede

3.3. Kateri so neposredni rezultati vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

S projektom smo pridobili številna nova spoznanja o tem, kako habitatni in populacijski dejavniki ter antropogeni vnos hranil vplivajo na izpostavljenost kmetijskih površin ritju divjih prašičev; z analizami tal in dostopnosti prehranskih virov za divjega prašiča v tleh smo osvetlili vzroke ritja divjih prašičev na travinju; s kombinacijo klasičnih (analize vsebine želodcev) in sodobnih raziskovalnih metod (molekularno genetske metode: metabarkodiranje okoljskih vzorcev in iztrebkov, tj. določanje prisotnosti okoljske DNK) smo pridobili nove ugotovitve o prehranskih preferencah divjega prašiča v povezavi z ritjem; ocenili smo učinkovitost nekaterih odvrtačalnih ukrepov, ki se že uporabljajo ali bi se lahko uporabljala za odvrtačanje divjih prašičev s travinja; pričeli smo s sistematičnim ocenjevanjem številčnosti oz. populacijskih gostot divjih prašičev v Sloveniji, in sicer z implementacijo sodobnih raziskovalnih tehnik ter vključitvijo v evropske konzorcije/mreže, ki razvijajo tovrstne metode; z diseminacijo rezultatov končnim uporabnikom smo prispevali k zmanjšanju konfliktov med lastniki zemljišč in upravljavci populacij.

3.4. Kakšni so lahko dolgoročni rezultati vašega raziskovalnega projekta glede na zgoraj označen potencialni pomen in razvojne cilje?

Divji prašiči so ena izmed "konfliktnih vrst", zaradi česar je ogroženo trajnostno upravljanje z vrsto. Približno polovica vseh letno nastalih škod po divjem prašiču v Sloveniji nastane na travinju zaradi ritja, natančnejše poznavanje vzrokov za nastanek ritin pa je bistvenega pomena za njihovo preprečevanje oz. učinkovito reševanje konfliktnih situacij med človekom in divjim prašičem. Poleg tega so rezultati o oceni številčnosti oz. populacijskih gostotah divjih prašičev v Sloveniji bistveni za učinkovitejšo in trajnostno upravljanje z vrsto pri nas. Nove ugotovitve, ki smo jih pridobili v sklopu raziskave (vsi delovni sklopi) bodo po naši oceni odmevni tudi v mednarodni raziskovalni sferi in v krogih tujih upravljavcev s populacijami divjih prašičev.

3.5. Kje obstaja verjetnost, da bodo vaša znanstvena spoznanja deležna zaznavnega odziva?

- ☒ a) v domačih znanstvenih krogih;
- ☒ b) v mednarodnih znanstvenih krogih;
- ☒ c) pri domačih uporabnikih;
- ☐ d) pri mednarodnih uporabnikih.

3.6. Kdo (poleg sofinancerjev) že izraža interes po vaših spoznanjih oziroma rezultatih?

Lovska zveza Slovenije
Območna združenja upravljalcev lovišč
Zavod za gozdove Slovenije
Zavod RS za varstvo narave
Pedagoške organizacije (visokošolske, srednješolske)
Javni mediji

3.7. Število diplomantov, magistrrov in doktorjev, ki so zaključili študij z vključenostjo v raziskovalni projekt?

V okviru projekta je bilo izdelanih 6 diplomskih in 2 magistrski deli:

Diplomska dela (prvostopenjski študij):

- Andrea Čaleta: Preučevanje zastopanosti rastlin in nevretenčarjev v prehrani divjih prašičev na podlagi metabarkodiranja okoljske DNA (diplomsko delo; UP FAMNIT)
- Melanie Lakota: Programski cevovod snakemake za identifikacijo vretenčarjev in gliv v prehrani divjih prašičev z uporabo tehnologije Ion Torrent (diplomsko delo; UP FAMNIT)
- Tina Pirc: Vpogled v časovno aktivnost in vedenje izbranih vrst velikih sesalcev v loviščih Oljka, Rižana in Vrhe Vrabče z uporabo fotopasti (diplomsko delo; UP FAMNIT)
- Urška Penko: Ocena populacijske gostote divjih prašičev na območju Brkinov in Čičarije z uporabo fotopasti (diplomsko delo; UP FAMNIT)
- Lucija Šumah: Škode po divjem prašiču na kmetijskih površinah: odnos lastnikov zemljišč in njihove izkušnje z uporabo odvrčalnih metod (diplomsko delo; FVO)
- Marin Kolić: Utjecaj fizikalno kemijskih indikatora tla na rovanje divjih svinja (diplomsko delo; AF ZG)

Magistrska dela:

- Katrin Školnik Škrabe: Ocenjevanje populacijskih gostot parkljarjev in srednje velikih zveri s pomočjo fotopasti (magistrsko delo; UP FAMNIT)
- Dhyan Anaja Banič: Določitev časovne aktivnosti velikih sesalcev v modelnem območju v osrednji Sloveniji z uporabo fotopasti (magistrsko delo; UP FAMNIT)

4. Sodelovanje s tujimi partnerji:

4.1. Navedite število in obliko formalnega raziskovalnega sodelovanja s tujimi raziskovalnimi institucijami.

Eno pomembno sodelovanje – Agronomski fakultet Sveučilišta u Zagrebu (zunanji partner na projektu, na območju njihovega raziskovalno-eksperimentalnega poligona Prolom je bilo opravljeno več terenskega dela in vzorčenja v DS-3 in DS-4, izdelana je bila ena diplomska naloga, pripravljenih in objavljenih je bilo več skupnih znanstveno-raziskovalnih dosežkov, izvedeno je bilo več gostujočih predavanj oz. gostovanj; znanstveno, strokovno in pedagoško sodelovanje se še nadaljuje).

Datum: 15. 10. 2024

Podpis vodje projekta:

Boštjan Pokorny
Digitalno podpisal
Boštjan Pokorny
Datum: 2024.10.15
15:22:39 +02'00'

Podpis in žig izvajalca:


Digitalno podpisal
Gašper Gantar
Datum: 2024.10.15
15:27:53 +02'00'

Priloga 1: Vsebinsko poročilo – študija

RITJE DIVJIH PRAŠIČEV: VZROKI, POSLEDICE IN MOŽNOSTI ZA ZMANJŠANJE ŠKOD TER KONFLIKTOV (V4-2223)

Ciljni raziskovalni program »Naša hrana, podeželje in naravni viri«