



**LIFE** Population level management and  
**DINALP** conservation of brown bears in northern  
**BEAR** Dinaric Mountains and the Alps



LIFE13 NAT/SI/000550

# GENETIČKA PROCJENA BROJNOSTI I EFEKTIVNE VELIČINE POPULACIJE SMEĐIH MEDVJEDA U SJEVERNIM DINARIDIMA

Tomaž Skrbinšek, Maja Jelenčič, Roman Luštrik,  
Marjeta Konec, Barbara Boljte, Klemen Jerina,  
Rok Černe, Marko Jonožovič, Matej Bartol,  
Đuro Huber, Juraj Huber, Slaven Reljić, Ivan Kos

prosinac, 2017.  
*Univerza v Ljubljani*



  
ZAVOD za GOZDOVE  
SLOVENIJE  
Slovenia Forest Service





## Zahvale

Provođenje ove studije ne bi bilo moguće bez (doslovno!) tisuća volontera koje su nam pomogle u terenskome radu. Iako su nam pomogli i članovi drugih interesnih skupina ili šire javnosti, najveći dio posla ipak su odradili lovci i šumari. Osim što su još jednom pokazali da im je stalo do prirode, potvrdili su svoju ulogu ključnih protagonista u očuvanju divljine i upravljanju njome. Lovci i šumari obaju zemalja odradili su „lavovski“ posao, i to na kvalitetan način, no moramo posebno naglasiti i punu potporu Lovačkog saveza Slovenije i različitih službi Zavoda za šume Slovenije (ZGS), posebice inspektora zaduženih za procjenu šteta uzrokovanih divljim životinjama i vještaka za procjenu smrtnih slučajeva te Posebnih državnih lovišta koja djeluju pod ZGS. U Sloveniji, ova je studija u čitavom svom trajanju podupirana i od strane Ministarstva okoliša i prostornog planiranja kojima smo također duboko zahvalni. Neiscrpnu potporu na hrvatskoj strani pružili su nam Ministarstvo poljoprivrede i njena Uprava šumarstva, lovstva i drvne industrije, Hrvatske šume čiji lovočuvari upravljaju najvećim i najboljim staništem medvjeda, ali i mnogi lovci organizirani u svoja lovačka društva.

Veliko hvala i Meti Mavec, Nuši Hrgi i Dini Botti, koji su nam bili velika pomoć u laboratoriju u procesu izrade znanstvenih podataka iz ogromnog broja sakupljenih uzoraka medvjedeđeg izmeta. Također moramo zahvaliti Hubertu Potočniku, Francu Kljunu i Mihi Krofelu koji su pomogli u organiziranju kampanja za skupljanje uzoraka u Sloveniji.

Posebno hvala ide Marti De Barba, Christianu Miquelu, Stephanu Lobréauxu i Pierru Taberletu iz Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) iz Grenobla u Francuskoj, za svu pomoć u primjeni njihove „high-throughput“ metode sekvencioniranja u našem laboratoriju, čak i prije njenog službenog predstavljanja i objavljivanja.

Suradnja i volja svih uključenih da pomognu, kao i sve međunarodne suradnje koje smo razvili i koje još uvijek razvijamo unutar LIFE DINALP BEAR projekta, ali i drugih inicijativa, nešto je što nadilazi dnevne uspone i padove u odnosima između osoba, ali i zemalja. To je ono što je potrebno cijeniti i nje govati u svim godinama koje su pred nama.

## Prošireni sažetak

### Uvod

Ovaj izvještaj sastavljen je kao rezultat projektne akcije C.5, „Uspostavljanje i optimizacija intergrativnog očuvanja i praćenja stanja zaštite smeđeg medvjeda na razini populacije“. Opći cilj bio je uspostaviti snažan i učinkovit sustav praćenja smeđih medvjeda u našem projektnome području. Genetika je jedno od najsnažnijih oruđa koje se koristi u ove svrhe i jedini je alat koji nam može pružiti pouzdane odgovore na teška, ali ključna pitanja o populacijama divljih životinja – veličini, dinamici i dugoročnim ishodima zaštite.

U prvom dijelu ove konkretne studije pokušalo se, što je preciznije moguće, odrediti **broj jedinki smeđeg medvjeda na području sjeverozapadnih Dinarida u Sloveniji i Hrvatskoj**. Isplanirali smo i proveli intenzivno gensko uzorkovanje smeđih medvjeda na cjelokupnom području njihove rasprostranjenosti u obje zemlje. Unaprijedili smo laboratorijske metode da bismo ubrzali procese budućih analiza te smanjili troškove njihova provođenja i na taj način položili čvrste temelje za dugotrajno genetičko praćenje smeđih medvjeda u projektnome području. Osim toga, ponudili smo prvu preciznu procjenu veličine i spolne strukture populacije smeđeg medvjeda na području sjeverozapadnih Dinarida u Sloveniji i Hrvatskoj te na taj način definirali referentnu točku za sve buduće projekte očuvanja i upravljanja ovom vrstom, unutar naših geografskih predjela.

Drugi dio studije bavi se temeljnim parametrima – **genetskom raznolikošću i, što je još važnije, efektivnom veličinom populacije**. Efektivna veličina populacije (ili  $N_e$ ) je jedan od najvažnijih (ako ne i najvažniji) parametara evolucijske i konzervacijske biologije. Iako to nije potpuno egzaktna definicija, možemo ju definirati kao broj životinjskih jedinki koje se uspješno razmnožavaju (što je brojka koja se uvelike razlikuje od ukupnog broja jedinki unutar populacije). Ovaj elegantni koncept u samo jednom indeksu adresira osjetljivost pojedine populacije na genetsku stohastičnost (gubitak genetske raznolikosti i inbreeding - razmnožavanje u srodstvu), ali i sažima ključne informacije o evolutivnom potencijalu populacije te vjerojatnosti dugotrajnog preživljavanja populacije. Nakon procjene ovog parametra možemo početi s korištenjem teorija populacijske genetike kako bismo predvidjeli sudbinu populacija i za vrste uvelike različite biologije. Metodološke i teoretske prednosti posljednjih nekoliko godina po prvi puta olakšavaju praćenje ovih ključnih parametara u divljini.

## Metode

### Kratko pojašnjenje načela primijenjenih u studiji

Za procjenu broja medvjeda koji obitavaju na području sjeverozapadnih Dinarida u Sloveniji i Hrvatskoj koristili smo neinvazivno gensko uzorkovanje. Cilj je sakupiti neinvazivne genske uzorke (uglavnom uzorke izmeta, dlake i sline) te pomoću genotipiziranja (izrada genskih „otisaka prstiju“) identificirati pojedine jedinice medvjeda od kojih uzorci potječu. Na ovaj način možemo izravno izbrojati koliko smo medvjeda identificirali (minimalan broj medvjeda u populaciji). Pomoću „uhvati-označi-ponovo uhvati“ modeliranja procjenjujemo broj medvjeda koji nam je promaknuo prilikom uzorkovanja što nam na kraju daje procjenu veličine cjelokupne populacije.

Također smo sakupili uzorke tkiva mrtvih medvjeda te ih genotipizirali s krajnjim ciljem utvrđivanja efektivne veličine naše populacije smeđeg medvjeda. U populaciji ograničene veličine stvara se nenasumična povezanost između alela na lokusima koji su inače nezavisni („linkage disequilibrium“ – „neravnoteža povezanosti“). Što je manja efektivna veličina populacije, snažnija je povezanost. Neravnoteža povezanosti između lokusa može se procijeniti pomoću genskog uzorkovanja i iskoristiti kao indikator procjene efektivne veličine populacije.

### Uzorkovanje i njegova uspješnost

Sakupili smo uzorke s cjelokupnog područja na kojemu stalno obitavaju medvjedi u Sloveniji i Hrvatskoj veličine preko 20 000 km<sup>2</sup>. Centralni dio provođenja studije nalazi se u Dinarskome gorju koje se proteže duž obale Jadranskoga mora i tvori jednu od najvećih kontinuiranih šumskih cjelina u Europi.



Karta: Projektna područja LIFE DINALP BEAR. Intenzivno neinvazivno gensko uzorkovanje obuhvatilo je čitave sjeverne Dinaride, dok se oportunističko uzorkovanje (provođeno kontinuirano tijekom projekta) provelo u Alpama.

Da bismo uspješno proveli uzorkovanje, morali smo organizirati široku mrežu volontera koji će sudjelovati u akciji i poslati nam uzorke. Nakon razmatranja mogućnosti, odlučili smo se usredotočiti prvenstveno na lovce i šumare (koji su također među najvažnijim interesnim skupinama koje sudjeluju u upravljanju medvjedom). Pokušali smo uspostaviti individualne komunikacijske kanale (putem e-maila) sa što je više sudionika moguće kako bismo razvili sudjelovanje na individualnoj razini te im osigurali povratne informacije. Volonterima smo osigurali komplete za uzorkovanje s materijalima potrebnima za sakupljanje uzoraka. Uzorci su dostavljeni natrag u laboratorij u unaprijed adresiranim i plaćenim poštanskim kuvertama.

Pratili smo učinak uzorkovanja u stvarnome vremenu. Svi uzorci uneseni su u bazu geopodataka odmah po pristizanju u laboratorij. Baza geopodataka automatski je raspoređivala uzorke na karti područja što nam je omogućilo da u svakome trenutku pratimo napredak procesa. Redovito smo provjeravali oznake na karti kako bismo se uvjerali da nema praznih područja na kojima nisu sakupljeni uzorci. Praćenje uzorkovanja u stvarnome vremenu omogućilo nam je da se pobrinemo za nedostatke koji bi se u suprotnome pretvorili u problem.

### **Laboratorijske analize, broj obrađenih uzoraka i uspjeh genotipiziranja.**

DNA izdvojena iz neinvazivnih genskih uzoraka najčešće je niske kvalitete i kvantitete, a kontaminacija uzorka je još jedan problem koji je potrebno pažljivo riješiti. Za ekstrakciju DNA te PCR proces koristili smo odvojeni laboratorij za gensko uzorkovanje, a služili smo se strogim protokolima za sprječavanje kontaminacije. Svaki smo uzorak „pratili“ pomoću 2D barkoda, eliminirali smo ručno unošenje ID kodova svakog uzorka, a svaki smo ključni korak katalogizirali – od ulaska uzorka u laboratorij do konačnog genotipa.

Počeli smo koristiti automatske laboratorijske strojeve (robot za manipuliranje tekućinama) za potrebe ekstrakcije DNA te za neke ključne faze pipetiranja da bismo povećali uspješnost i pouzdanosti. Za genotipiziranje smo koristili nedavno razvijenu metodu koja koristi visoki potencijal nove generacije sekvencioniranja (NGS) i rješava mnoge probleme koji su dosad mučili „standardne“ metode (poteškoće uspoređivanja rezultata dobivenih u različitim laboratorijima, subjektivnost u genotipiziranju...), povećava uspješnost genotipiziranja i značajno ubrzava analizu dok istovremeno umanjuje trošak cijelog postupka (De Barba et al., 2017). Surađujemo s Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA) iz Grenobla, Francuska, koji je razvio metodu. Koliko nam je poznato, prvi smo laboratorij koji je ovu metodu primijenio na velikoj stvarnoj studiji.

Uz NGS protokol, koristili smo 13 mikrosatelitskih markera + identifikacijski (ID) spolni marker za individualno ID genotipiziranje neinvazivnih genskih uzoraka. Za tkiva smo ovo dodatno proširili s dodatnih 16 mikrosatelitskih markera za cjelokupni panel od 29 markera za populacijsko-genetičku studiju.

### **Analiza podataka**

Svi podaci o uzorcima i genotipovima čuvaju se u bazi podataka aplikacije MisBase koju smo razvili u našem laboratoriju, a koju također koristimo za neke važne korake manipuliranja podacima i njihovu

analizu, posebice uspoređivanje uzoraka (identificiranje koji uzorci pripadaju kojim jedinkama) te procjeni pouzdanosti genotipova. Za NGS analizu podataka dobivenih pomoću mikrosatelita koristili smo nekoliko alata koje nam je ustupio autor metode, ali smo, uz to, programirali i neke svoje alate koji su nam bili potrebni za analizu širih razmjera.

Za procjenu veličine populacije koristili smo „uhvati-označi-ponovo uhvati“ (Capture-Mark-Recapture, CMR) modeliranje i nekoliko pristupa problemu (Capwire, MhChao i Huggins modele) te smo konstruirali veći broj modela različitih parametara s ciljem da u modele uključimo sve specifičnosti podataka. Za izradu završnih rezultata odabrali smo najprikladniji model, no donosimo i rezultate drugih, konkurentskih modela u cjelovitom izvještaju.

Omjer spolova određen je kako iz modeliranih rezultata tako i direktno od identificiranih jedinki. Iako su rezultati svih metoda bili gotovo identični, druga je metoda jednostavnija, uključuje manje pretpostavki te je stoga korištena za izradu finalne procjene omjera mužjaka i ženki.

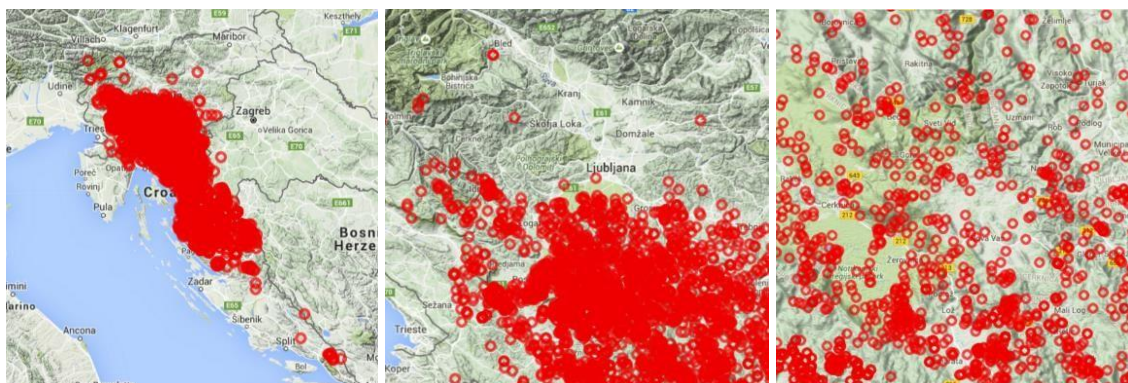
U uzorcima tkiva istraživali smo neke osnovne populacijsko-genetičke parametre, kao i parametre genske raznolikosti. Koristili smo R statističko okruženje sa specijaliziranim paketom za populacijsku genetiku, a napravili smo i provjeru kvalitete podataka da bismo identificirali bilo kakvu vrstu problema unutar ove vrste podataka. Usljedila je i brza PCA analiza genotipova kako bismo provjerili postoje li jasne indikacije strukture populacije ili imigranata unutar nje.

Metoda neravnoteže povezanosti (LD) poslužila nam je za procjenu efektivne veličine populacije ( $N_e$ ) i njenih promjena kroz vrijeme. S obzirom da je većini mrtvih medvjeda uključenih u studiju dob određena iz slojeva dentina na zubima, ove podatke o starosti u kombinaciji s godinom smrti koristili smo za određivanje godine rođenja jedinke. Napravili smo godišnje uzorke za svaku godinu, počevši sa 1997. pa sve do 2014. godine. U ove uzorke uključili smo sve jedinke, živuće u ciljnoj godini, dobi od 0 do 8 godina (generacijski interval). Pomoću ovih godišnjih uzoraka i programa NeEstimator dobili smo poprilično nepristranu procjenu  $N_e$ -a za svaku godinu proučavanog perioda. Za svaku smo godinu napravili tri procjene, koristeći sve uzorke, kao i uzorke za svaku obuhvaćenu zemlju.

## Rezultati

### Zbirka uzoraka

U periodu od rujna do prosinca 2015. godine uspjeli smo sakupiti 4687 neinvazivnih genskih uzoraka, 56 % više od ciljanih 3000 koje smo planirali sakupiti tijekom pripreme projekta. Prostorna i vremenska pokrivenost je u većini slučajeva bila dobra. Uzorke su nam poslale 962 osobe, a procjenjujemo da je više od 2500 osoba aktivno sudjelovalo u provođenju studije (nisu svi uspjeli pronaći uzorke što je posebice slučaj u područjima u kojima se medvjedi javljaju sporadično). Smatramo da je akcija bila uspješna u potpunosti.



Slika: Sakupljeni neinvazivni uzorci (čitavo područje i 2 uvećana prikaza) prikazani u online sustavu za praćenje uzorkovanja.

Istovremeno, rutinski prikupljamo genske uzorke mrtvih medvjeda iz obje zemlje. Svaki mrtvi medvjed je uzorkovan, izmjeran, izvagan te mu je uzet zub pretkutnjak za potrebe određivanja dobi. Trenutno u banci gena imamo uzorke tkiva 2468 jedinki medvjeda, sakupljenih tijekom proteklih 17 godina.

### Unapređivanje laboratorijske metodologije

Krajnji cilj projektne akcije C.5 jest uspostaviti dugoročno praćenje populacije medvjeda, a čvrst temelj za ostvarenje ovog cilja stvorili smo unapređivanjem naše analitičke procedure za genske uzorke. Pomoću laboratorijske robotike i upotrebe sekvencioniranja nove generacije (NGS) za potrebe genotipiziranja, značajno smo smanjili manualno opterećenje prilikom ekstrakcije DNA i sortiranja alela (što se prije odrađivalo jednim dijelom ručno, a sada u potpunosti bioinformatički). Ovo je rezultiralo kraćim vremenom analize, ali i smanjivanjem troškova. Obje uštede u konačnici su omogućile analiziranje značajno većeg broja uzoraka od prvotno planiranog. Prednosti unapređivanja metodologije sažete su u tablici niže.

Tablica 1: Usporedba performansi „standardnih“ genotipizirajućih metoda koje smo koristili prije nadogradnje i „novih“ metoda korištenih za analizu uzoraka u ovoj studiji. Sve procjene temelje se na učinkovitosti jedne osobe, uz ponešto pomoći od strane nestručnjaka (u našem laboratoriju, uglavnom studenata) u pripremi uzoraka za ekstrakciju DNA.

Stavka	Prijašnji postupak	Novi postupak
Ekstrakcija DNA	Ručno, „spin-column“ bazirana ekstrakcija, 23 uzorka/dnevno + 1 NC	Automatizirana ekstrakcija DNA pomoću robota koji manipulira tekućinama, 95 uzoraka/dan + 1 NC*. *Može se udvostručiti uz relativno skromna ulaganja.
Genotipiziranje	Kapilarna elektroforeza & računalno potpomognut „allele calling“, 30-40 uzoraka/dan.	Sekvencioniranje nove generacije i automatskije „allele calling“ iz sekvenci, 300-400 uzoraka/dan.* *Može se mnogostruko povećati uz relativno skromna ulaganja.



Prijenos podataka	Subjektivno, laboratorijski-specifičan „allele calling“, slab prijenos i dijeljene podataka.	Objektivno, „sequence-based allele calling“, potpuni i nesmetani prijenos podataka.
Buduća provjeravanja za longitudinalne studije	Podaci problematični za longitudinalna istraživanja i za vremenske serije čak i unutar jednog laboratorija (promjene opreme i osoblja mogu uzrokovati nedosljednosti u podacima).	Podaci na najosnovnijem nivou, DNA sekvence. Potpuno iskoristivo u budućnosti, jednako korisno za 100 godina kao i sada.

### Genotipiziranje neinvazivnih genskih uzoraka

Iako smo prvotno planirali obraditi 3000 uzoraka prikupljenih intenzivnim genskim uzorkovanjem u Sloveniji i Hrvatskoj, napredak postupaka za analiziranje omogućio nam je da obradimo 4370 uzoraka, 93% prikupljenih uzoraka i 45.7% više od planiranog. Ovo pokazuje sve prednosti novih metoda za genska praćenja divljih životinja velikih razmjera. Preostali uzorci su relativno stari (niži očekivani postotak uspjeha) ili su iz Slovenije u kojoj je uzorkovanje provedeno intenzivnije te bi dodatni uzorci imali zanemariv učinak na krajnji rezultat.

Uspjeli smo uspješno genotipizirati 3218 neinvazivnih uzoraka ili 73.6% obrađenih uzoraka.

### Genotipiziranje uzoraka tkiva mrtvih medvjeda

Istovremeno s genotipiziranjem neinvazivnih uzoraka dobivenih intenzivnim uzorkovanjem 2015. godine genotipizirali smo sve uzorke zabilježenih mrtvih medvjeda tijekom tog perioda, 142 jedinke, te uključili genotipove u bazu podataka za „uhvati-označi-ponovo uhvati“ (CMR) procjenu brojnosti smeđeg medvjeda.

Uzorci tkiva rutinski se prikupljaju u Hrvatskoj i Sloveniji. Cjelovita baza podataka o smrtnosti medvjeda trenutno uključuje genotipizirane uzorke 2022 jedinke medvjeda (1040 iz Slovenije i 982 iz Hrvatske). Rutinski smo upotrebljavali 16 lokusa + spolno-identifikacijski marker za genotipiziranje koristeći kapilarnu elektroforezu. Reanalizirali smo sve uzorke prikupljene prije ovog projekta (1326 uzoraka) novim NGS markerima, kako bismo osigurali kompatibilnost sa bazom podataka neinvazivnih uzoraka, ali i dodali detaljniji sadržaj i informacije za buduće analize. Ovo nas dovodi do ukupnog kompleta podataka od 29 polimorfni mikrosatelitskih lokusa + 2 lokusa za potvrdu spolnog identifikatora. Tijekom pisanja ovog izvještaja, u procesu genotipiziranja još uvijek se nalazilo 446 uzoraka, a s obzirom da se i dalje uzorkuju slučajevi smrtnosti medvjeda, analizirat ćemo nove uzorke tkiva do kraja trajanja projekta. Bez obzira na to, naša baza je i dalje jedna od najvećih u svijetu i više nego adekvatna za potrebe procjenjivanja temporalnih varijacija u efektivnoj veličini populacije o kojoj pišemo ovdje.

### Procjena veličine populacije i omjera spolova za cjelokupno područje studije i za individualne zemlje

Nakon što smo tijekom uzorkovanja uključili uzorke tkiva mrtvih medvjeda i filtrirali nekoliko problematičnih uzoraka (problemi sa čuvanjem podataka, poteškoće prilikom genotipiziranja), završili

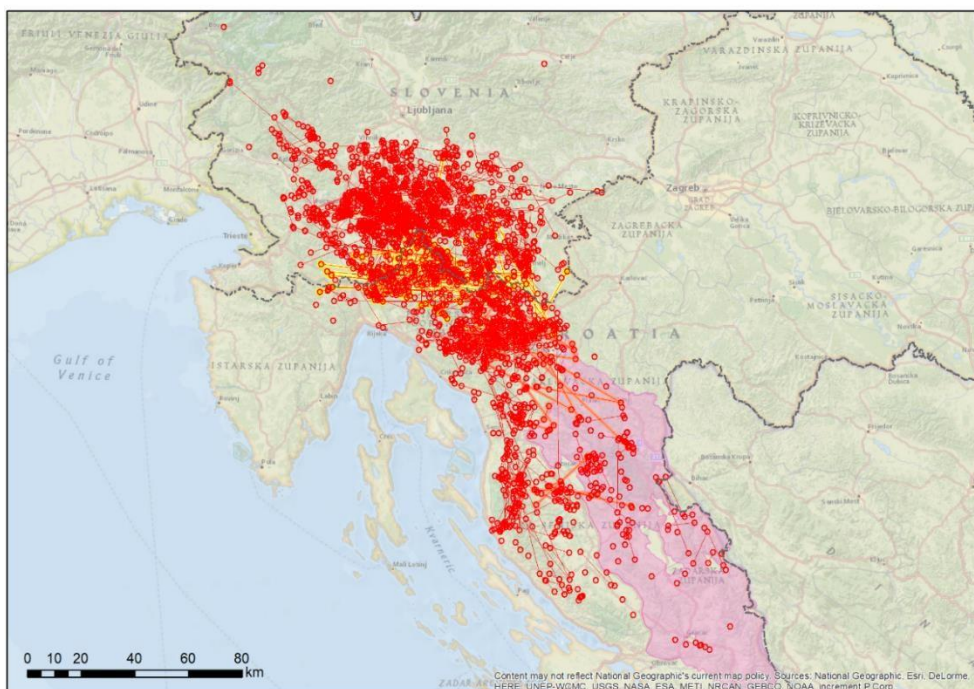
smo s 3263 uzorka koji bi trebali biti bez ikakvih pogrešaka i pogodni za „uhvati-označi-ponovo uhvati“ (CMR) analizu. Rezultati su prikazani u tablici niže.

Tablica: Genotipizirani uzorci, broj uhvaćenih životinja i smrtnost.

Uzorci i uhvaćene životinje	Cjelokupno područje	Slovenija	Hrvatska
Svi genotipizirani uzorci*	3263	1962	1539
Ukupan broj uhvaćenih životinja*	1136	614	582
Ženke	669	366	339
Mužjaci	467	248	243
Ukupan broj ponovo uhvaćenih životinja	730 (64.3 %)	427 (69.5 %)	361 (62 %)
Ukupan broj prekogranično ponovo uhvaćenih životinja		14.10%	16.60%
<b>Smrtnost</b>			
Ukupan broj smrtnosti tijekom uzorkovanja	142	65	77
Ženke	63	27	36
Mužjaci	79	38	41
Prekogranični – poginuli u susjednoj zemlji		5 (2Ž, 3M)	2 (1Ž, 1M)
Ukupan broj smrtnosti u 2015.	256	112 (67M, 45Ž)	144 (92M, 50Ž, 2 nepoznat spol)

\*Ukupne brojke su točne, ali je broj jedinki koje su prešle državne granice zbrajan u obje zemlje.

Prostorna distribucija uzoraka je dobra (vidi sliku dolje), uz iznimku istočnog dijela Like u Hrvatskoj gdje je intenzitet uzorkovanja bio slabiji, ali i dalje prihvatljiv. Intenzitet uzorkivanja, a s njime i vjerojatnost hvatanja, značajno su varirali od područja do područja. Uz pomoć MARK modela (Huggins) uključili smo opisano u model, ali s drugim modelima to nije moguće stoga smo osmislili zaseban set modela za svako područje i kombinirali rezultate, ispravljajući podatke u slučaju jedinki koje su prelazile s jednog područja na drugo. Različiti pristupi modeliranju iznjedrili su jako slične rezultate (rezultati po modelima nalaze se u cjelovitom izvještaju niže).



Slika: Uspješno genotipizirani uzorci. Linije spajaju uzorke iste jedinke (kretanja), a kretanja prekograničnih jedinki između Slovenije i Hrvatske označeni su žutom bojom. Područje istočne Like na kojemu je intenzitet uzorkovanja slabiji označen je ružičastom, a kretanja jedinki koje prelaze unutar i van tog područja narančastom bojom.

Procijenili smo dva parametra:

**Minimalna godišnja brojnost** procijenjena je direktno pomoću „uhvati-označi-ponovo uhvati“ analize koju smo proveli na kraju godine. Slučajeve smrtnosti koje smo dokumentirali oduzeli smo (ili ih nismo uključili, ovisno o modelu) od „uhvati-označi-ponovo uhvati“ procjene da bismo dobili konačnu vrijednost. Ovo je procjena s kraja godine za 2015. godinu, nakon smrtnosti i prije sljedećeg reproduktivnog ciklusa.

**Maksimalna godišnja brojnost** derivirana je iz minimalne godišnje brojnosti uz dodatak svih dokumentiranih slučajeva smrtnosti te godine. U našem slučaju to znači procijenjena brojnost smeđeg medvjeda u proljeće 2015. Radi se o umanjenoj vrijednosti jer ne uključuje slučajeve nezabilježene smrtnosti, za koju pretpostavljamo da je relativno niska kod smeđih medvjeda (uz moguću iznimku medvjedića okoćenih te godine, a koja također može proći neopaženo).

Tablica: Neinvazivno genetsko uzorkovanje i procjene „uhvati-označi-ponovo uhvati“ modeliranja za minimalnu i maksimalnu brojnost smeđih medvjeda i omjera spolova u sjeverozapadnim Dinaridima u 2015. godini.

Područje	CMR model	Minimalni godišnji N (95% CI)	Maksimalni godišnji N (95% CI)	Omjer spolova Ž:M [%]
Cjelokupna studija	MhChao+Capwire TIRM	1392 (1247-1583)	1648 (1503-1839)	58.9 % : 41.1 %
Slovenija	MhChao	599 (545-655)	711 (657-767)	59.6 % : 40.4 %
Hrvatska	MhChao+Capwire TIRM	793 (702-928)	<b>937 (846-1072)</b>	<b>58.2 % : 41.8 %</b>

## **Dinamika populacije i upravljački aspekti genetičke „označi-ponovo uhvati“ procjene veličine populacije**

U slučaju Hrvatske, ovo je prva pouzdana procjena broja smeđih medvjeda, dok je u Sloveniji slična studija već provedena 2007. godine. Tada je veličina slovenske populacije medvjeda, minimalna godišnja veličina populacije korigirana za rubni učinak prekograničnih jedinki koje dijeli s Hrvatskom, procijenjena na 424 (383-458) medvjeda. Metodološki vrlo slična procjena provedena za 2015. godinu i prezentirana u ovoj studiji iznosi 599 (545-655) medvjeda ili 41.3 % -tno povećanje tijekom osmogodišnjeg perioda.

Naša je procjena prva takve vrste brojnost smeđih medvjeda i omjera mužjaka i ženki u gorju sjeverozapadnih Dinarida. Utemeljena je na konkretnim empirijskim podacima i kao takva postavlja prvu referentnu točku za sva buduća istraživanja. Samim time predstavlja najbolji mogući temelj za znanstveno utemeljenu zaštitu i upravljanje ovom vrstom na čitavome području.

Iako je na razini čitavog područja studije ovo i dalje samo „sličica“ kompletne situacije, u Sloveniji u kojoj je slična studija provedena još 2007. godine, napredovali smo do genetičkog praćenja uz vremensku komponentu. Zahvaljujući tome imamo prvu direktnu procjenu dinamike populacije u ovom području – izgleda pohvalno što se zaštite medvjeda tiče, ali također otvara i širu raspravu o toleranciji prema medvjedima i budućim mjerama upravljanja i zaštite. Bez obzira kakve će biti završne odluke, moći će se temeljiti na najkvalitetnijim znanstvenim principima, ukoliko se na njih odluče ključne i odgovorne osobe u procesu odlučivanja.

## **Genska raznolikost i struktura populacije smeđih medvjeda u sjeverozapadnim Dinaridima**

S obzirom da je genska raznolikost smeđih medvjeda u području provođenja studije već otprije istražena, ovo nije bio temeljni cilj studije. Međutim, zbog mnogo šireg seta lokusa i većeg broja uzoraka korištenih u ovoj studiji te iz razloga što su indeksi genske raznolikosti važni indikatori genskog „zdravlja“ populacije, osvrnuli smo se i na to.

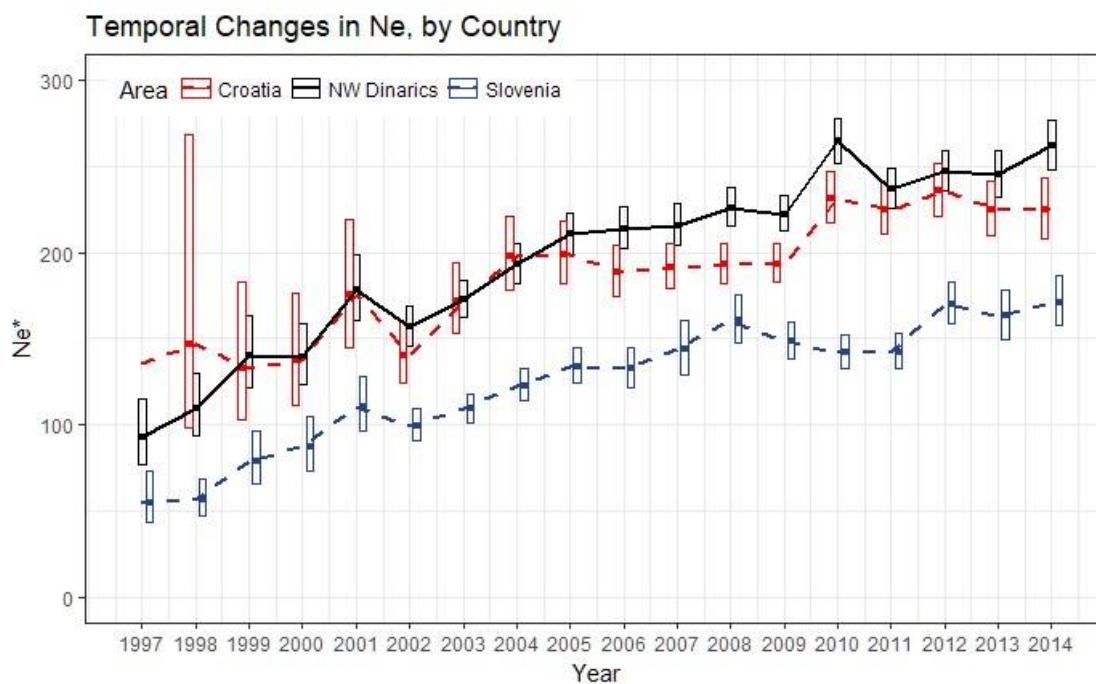
Dva markera pokazuju devijaciju od Hardy-Weinberg proporcija (najvjerojatnije „null allele“ ili greška u genotipiziranju) stoga su isključena iz daljnjih analiza. Za preostalih 27 lokusa kao i za preostale uzorke (N=2021) očekivana heterozigotnost je 0.72, primijećena heterozigotnost 0.71 i prosječna raznolikost na alelima 8 alela po lokusu.

Iako nismo uočili očiglednu gensku strukturu, izolirali smo jednu jedinku neobičnoga genotipa. Prerano je da objavimo radi li se o doseljeniku iz druge populacije medvjeda, ali svakako istražujemo i dalje kako bismo otkrili o čemu se radi. Ova je jedinka izlučena iz daljnjih analiza.

## **Vremenske varijacije efektivne veličine populacije smeđeg medvjeda u sjeverozapadnim Dinaridima**

Bogatstvo uzoraka i podataka o dobi jedinki omogućili su nam da procijenimo efektivnu veličinu populacije ( $N_e$ ) praćenih smeđih medvjeda u 18-godišnjem periodu od 1997. do 2014. godine. Uspjeli

smo sakupiti dovoljan broj uzoraka jedinki dobi od 0 do 8 godina (~ generacijski interval) upravo za ovaj period kako bismo pružili usporedne procjene  $N_e$  za svaku godinu. Procjena je slaba za Hrvatsku u periodu od 1997. do 2001. godine jer je broj uzoraka iz tog područja malen, kao što je očito iz intervala pouzdanosti. Nakon 2014. godine nemamo dovoljno adekvatnu pokrivenost uzorcima u svim kohortama da bismo proizveli pouzdane rezultate. Najrecentnija procjena efektivne veličice populacije za 2014. godinu je  $N_e = 261.6$ , sa 95%-tnim intervalom pouzdanosti 247.5 – 277.0.



Slika: Vremenske varijacije u efektivnoj veličini populacije smeđih medvjeda u sjeverozapadnim Dinaridima od 1997. do 2014. godine. Procjene se temelje na svim uzorcima (SZ Dinaridi) i uzorcima iz svake zemlje zasebno. Žive jedinke dobi od 0 do 8 godina (~ generacijski interval) u ciljnoj godini korištene su u svakom godišnjem uzorku. Procjene nisu neovisne nego svaka procjena u pojedinoj godini ( $t$ ) predstavlja harmonijsku sredinu  $N_e$  za period  $t - GI$ , gdje je  $GI$  generacijski interval ~ 8 godina.

Primjećujemo da se ukupna efektivna veličina populacije povećava s vremenom i čini se da se udvostručila od kraja 90-ih godina. Ovo je vjerojatno posljedica veće brojnosti smeđeg medvjeda unutar populacije na ovome području tijekom zadnja dva desetljeća. Stopa ovog povećavanja ipak kao da se smanjuje (ali je i dalje pozitivna) u periodu nakon 2005. godine što bi mogla biti posljedica poprilično povećanih kvota za odstrel u obje zemlje nakon 2002. godine.

Zanimljiv je podatak da procjene iz svake pojedinačne zemlje i dvaju zemalja zajedno daju različitu procjenu  $N_e$  (slika 20). I dok se procjene temeljene na uzorcima obaju zemalja i uzorcima sakupljenima samo u Hrvatskoj poprilično dobro podudaraju, procjene na temelju slovenskih uzoraka značajno su niže. Rezultat je iznenađujuć – ako su jedinke obaju zemalja izmješane unutar iste populacije, kao što bi trebale biti na temelju telemetrijskih podataka, sve ove procjene trebale bi biti otprilike jednake.

Jednako tako primjećujemo značajne razlike u pristupima upravljanju. U Hrvatskoj se u osnovi radilo o trofejnom lovu, što znači da je najveći broj odstrijeljenih jedinki unutar skupine odraslih mužjaka. U Sloveniji je odstrel strogo kontroliran i cilja uglavnom mlade jedinke u pre-reproduktivnoj dobi. Ovo

rezultira značajnim razlikama u omjeru spolova, ali i u dobnoj strukturi odstrela (analizu donosimo u cjelovitom izvještaju).

U Sloveniji visoka stopa smrtnosti mladih jedinki i niska smrtnost odraslih ograničava životinjama ulazak u reproduktivnu skupinu. Zbog ovoga je određenim, uvijek istim, jedinkama omogućeno monopoliziranje prilika za reprodukciju što onda povećava odstupanja u veličini obitelji tijekom životnog vijeka (većina jedinki nema potomaka, a njih nekoliko ima puno potomstva) i smanjuje efektivnu veličinu populacije. Također, visoka stopa smrtnosti među pre-reproduktivnim dijelom populacije i mladim životinjama onemogućava uspjeh potencijalnih imigranata iz Hrvatske, učinkovito ograničavajući protok gena iz Hrvatske, odnosno „lokalizirajući“ gene slovenskih medvjeda.

S druge strane, u Hrvatskoj trofejnoj izlov kao upravljačka strategija rezultira sasvim oprečnim učinkom. Visoka smrtnost odraslih mužjaka nudi i mladim mužjacima priliku da sudjeluju u reprodukciji. Niska je stopa smrtnosti i za mlade ženke, a jednom kad se reproduciraju uvelike su zaštićene jer uz sebe imaju mladunčad. Ovo umanjuje odstupanja u veličini obitelji tijekom životnog vijeka i povećava efektivnu veličinu populacije. Očekujemo zanimljiv efekt na protok gena u Sloveniji, s obzirom da mlade jedinke iz te zemlje imaju bolje šanse za opstanak, ali i za sudjelovanje u reproduktivnom ciklusu u Hrvatskoj nego u Sloveniji. Ovo uzrokuje priljev gena u Hrvatsku i „miješanje“ gena.

### **Efektivna veličina populacije – zaštitarski i upravljački aspekti**

Efektivna veličina populacije smeđih medvjeda u sjeverozapadnim Dinaridima nije malena (procjena iz 2014. godine donosi brojku od 261.6 (247-277)). Ovo je dovoljno za sprječavanje inbreedinga, ali i dalje manje od pravila praga od 500 jedinki koje su potrebne za očuvanje evolutivnog potencijala. Ovo svakako podcrtava važnost omogućavanja kontakta s drugim populacijama medvjeda u široj regiji, no ne znači nužno da bi se efektivna veličina populacije u SZ Dinaridima morala povećavati drugačijim upravljačkim strategijama.

Vidjeli smo da različiti upravljački modeli u Sloveniji i Hrvatskoj u relativno malenome i dobro povezanome području SZ Dinarskog gorja imaju značajan i poprilično neočekivan efekt na većinu temeljnih genskih parametara koji su kritični za očuvanje. Već je neko vrijeme poznato i predmetom je rasprava da ljudi imaju snažan učinak na evoluciju vrsta s kojima su u interakciji, što je posebno točno u slučaju divljih životinja koje se odstreljuju ili kojima se upravlja na bilo koji drugi smrtonosni način. O ovome će se, u kontekstu naših medvjeda, morati raspravljati i u budućnosti i svakako uklopiti u svaki budući plan upravljanja smeđim medvjedom. Oba upravljačka modela imaju svoje pozitivne i negativne strane (o kojima detaljnije raspravljamo u cjelovitom izvještaju) te je potrebno pokrenuti širu raspravu o tome kako ova nova razumijevanja ukomponirati u praktične upravljačke i zaštitarske mjere.