

**Genetska analiza populacije velikega  
škurha (*Numenius arquata*) na  
Ljubljanskem barju**



**Nacionalni inštitut za biologijo (NIB)**

**Ljubljana, november 2021**

# Genetska analiza populacije velikega škurha (*Numenius arquata*) na Ljubljanskem barju

**Izvajalec:** Nacionalni inštitut za biologijo  
Večna pot 111  
SI-1001 Ljubljana

**Nosilec:** doc. dr. Al Vrezec, univ. dipl. biol.

**Naročnik:** Javni zavod Krajinski park Ljubljansko barje  
Podpeška cesta 380  
SI-1357 Notranje Gorice  
(predstavnik naročnika: Janez Kastelic, direktor)

**Avtorja poročila:**

doc. dr. Al Vrezec, univ. dipl. biol.

dr. Klemen Čandek, mag. ekol. biod.

Priporočen način citiranja:

**Vrezec A., Čandek K. 2021. Genetska analiza populacije velikega škurha (*Numenius arquata*) na Ljubljanskem barju. Poročilo. Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana.**

## **PREDGOVOR**

Nalogo »Genetska analiza vsaj 11 vzorcev velikega škurha« je izvedel Nacionalni inštitut za biologijo (predstavnik doc. dr. Al Vrezec) na osnovi pogodbe številka 430-075/202t-8 Javnega zavoda Krajinski park Ljubljansko barje (predstavnik Janez Kastelic) .

## KAZALO VSEBINE

|  |    |
|--|----|
| PREDGOVOR .....  | 4  |
| KAZALO VSEBINE.....  | 5  |
| KAZALO TABEL .....   | 6  |
| KAZALO SLIK.....   | 6  |
| POVZETEK.....  | 7  |
| 1. UVOD.....   | 8  |
| 2. ZBRANI VZORCI IN METODE .....   | 10 |
| 2.1 ZBRANI VZORCI VELIKEGA ŠKURHA  | 10 |
| 2.2 METODE ANALIZE   | 13 |
| 2.2.1 Izolacija, kvantifikacija in pomnoževanje DNK                      | 13 |
| 2.2.2 Genetske analize: haplotipske mreže in filogenetska rekonstrukcija | 14 |
| 3. REZULTATI IN DISKUSIJA .....  | 15 |
| 3.1 ANALIZA UPORABNOSTI ZBRANIH VZORCEV                                  | 15 |
| 3.2 FILOGEOGRAFSKA POZICIJA VELIKEGA ŠKURHA Z LJUBLJANSKEGA BARJA        | 17 |
| 4. SKLEPI S PREDLOGOM NADALJNJIH UKREPOV .....                           | 21 |
| 5. LITERATURA.....   | 23 |

## KAZALO TABEL

Tabela 1: Pregled zbranih vzorcev velikega škurha (*Numenius arquata*) z Ljubljanskega barja za genetsko analizo (PMSL – Prirodoslovni muzej Slovenije (navedena je inventarna številka primerka v muzejski zbirki), NIB – Nacionalni inštitut za biologijo).....11

Tabela 2: Koncentracija in čistoča izolirane DNK iz vzorcev velikega škurha (*Numenius arquata*).....16

## KAZALO SLIK

Slika 1: Veliki škurh (*Numenius arquata*) gnezdi na Ljubljanskem barju na ekstenzivnih travnikih (Foto: Davorin Tome).....9

Slika 2: Zgodovinski primerki študijskih mehov velikih škurhov (*Numenius arquata*) v muzejski študijski ornitološki zbirki Prirodoslovnega muzeja Slovenije. (foto: Al Vrezec).....11

Slika 3: Primerki jajc velikega škurha (*Numenius arquata*) v muzejski oološki ornitološki zbirki Prirodoslovnega muzeja Slovenije. (foto: Al Vrezec).....12

Slika 4: Rentgenski posnetek poškodovanega samca velikega škurha (*Numenius arquata*) najdenega 22.4.2021 na Ljubljanskem barju. Ptica ima multifraktni zlom peruti, v spodnji čeljustnici in desni rami pa sta vidni dve šibri. (foto: dr. Joško Račnik, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani).....12

Slika 5: Primer opazovanja signalov po gelski elektroforezi. Vzorec #12 je tipični primer jasnega signala ustrezne dolžine, ki nakazuje na uspešno pomnoževanje dela gena MUSK z metodo PCR. Pri preostalih vzorcih se tarčni gen ni pomnožil, kar nakazuje na težave s kvaliteto DNK.....15

Slika 6: Haplotipske mreže vzorcev velikega škurha (*Numenius arquata*) na podlagi analiz posameznih tarčnih genov. Krogi predstavljajo različne haplotipe, velikost krogov njihovo frekvenco, barve pa izvirno državo vzorca. Prečne črtice na povezavah med haplotipi predstavljajo število mutacij med njimi.....18

Slika 7: Bayesijska filogenetska analiza velikega škurha (*Numenius arquata*) na podlagi treh genov (ND2, COI in MUSK). Ujemanje vzorcev filogenije in geografskega izvora ni prisotno, podpore razvejitvam pa so izrazito nizke. Z upoštevanjem teh dejstev ne moremo potrditi značilnih razlik med katerimi koli populacijami. Glede na rezultate na podlagi treh genov je genetska struktura populacij velikega škurha precej homogena.....20

## POVZETEK

Poročilo zajema genetsko analizo 12 vzorcev 11 primerkov velikega škurha (*Numenius arquata*) z Ljubljanskega barja. V vzorec so zajeti primerki zbrani med letoma 1949 in 2021. Pomnoževanje DNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) je bilo narejeno za tri različne gene oziroma molekularne markerje: mitohondrijski gen za Citokrom C oksidazo, podenoto 1 (COI), mitohondrijski gen za NADH dehidrogenazo, podenoto 2 (ND2), in jedrni gen za Tirozin kinazo 14 receptorja skeletnih mišic (MUSK14). Pri nadaljnji analizi pa se je izkazalo, da je bil postopek pridobitve nukleotidnega zaporedja uspešen le pri enem vzorcu, ki je bil zbran leta 2021. Pri ostalih vzorcih je bila ohranjenost oziroma kvaliteta DNK preslaba za pomnoževanje s klasičnim PCR postopkom. Edini slovenski vzorec tako tvori klad skupaj z vzorci iz Švedske, Nemčije in Španije. Vzorec velikega škurha iz slovenske populacije se zelo verjetno ne razlikuje značilno od preostalih evropskih populacij in da populacija na Ljubljanskem barju verjetno ni povsem izolirana od ostalih evropskih populacij. V okviru raziskave pa je bil zabeležen tudi ustreljeni osebek velikega škurha, kar morda nakazuje na problem prezimovališča ali selitvenih poti barjanske populacije. Za učinkovito varstvo in ohranjanje populacije velikega škurha na Ljubljanskem barju so predlagani sledeči ukrepi: (1) nadaljevanje zbiranja svežega genetskega materiala za nadaljnje molekularne raziskave genetske pestrosti barjanske populacije; (2) izvedba raziskave z nameščanjem naprav za daljinsko spremljanje za ugotavljanje ključnih območij za vrsto na Ljubljanskem barju, selitvenih poti in prezimovališč; (3) z ukrepi je potrebno bistveno izboljšati gnezditveni uspeh velikega škurha na Ljubljanskem barju s strogim varstvenim režimom na večjih površinah travišč; (4) identificirati plenilce gnezd; (5) določiti ukrepe, ki bi zmanjšali plenilski pritisk na talna gnezda; (6) priprava akcijskega načrta, ki poleg ohranjanja obstoječih travišč predvideva tudi renaturacijo uničenih travišč za varstvo velikega škurha in drugih kvalifikacijskih vrst travniških ptic z visoko varstveno vrednostjo.

## 1. UVOD

V Evropi je populacija velikega škurha (*Numenius arquata*) ocenjena na 252.176 gnezdečih parov, od tega glavnina leži v severni Evropi oziroma na Finskem (33 %), Rusiji (27 %) in Veliki Britaniji (27 %) (BirdLife International 2017). Evropska populacija se je med letoma 1980 in 2017 se je zmanjšala za 36 % (<https://pecbms.info/trends-and-indicators/species-trends/>). Močan upad populacije po večjem delu Evrope pripisujejo predvsem nižjemu gnezditvenemu uspehu kot pa manjšemu preživetju med selitvijo in prezimovanjem, saj je preživetje odraslih ptic dokaj visoko (Ławicki & Wylegała 2011, Robinson s sod. 2020). Po ocenah najdb obročkanih ptic na Finskem je smrtnost v prvem letu življenja visoka (79 %), kasneje pa izjemno pade na vsega nekaj %, ptice pa dočakajo visoko starost do 30 let (Saurola s sod. 2013).

Proti jugu Evrope populacija velikega škurha ni več sklenjena in je omejena na posamezne subpopulacije, najjužnejše izolirane populacije pa so poznane iz Španije, Francije in Slovenije (Hagemeijer & Blair 1997). Populacija v Sloveniji je edina gnezditvena populacija vrste na Balkanskem polotoku. Genetske raziskave izolirane španske populacije je pokazala, da je populacija genetsko povezana s preostalim delom evropske populacije, vendar se njena izoliranost odraža v manjši genetski pestrosti (Rodrigues s sod. 2018). To je posledica izredno velike filopatrije in nizke gnezditvene disperzije vrste, saj škurhi večinoma gnezdiijo v bližini mesta, kjer so se izvalili (Wernham s sod. 2002, Saurola s sod. 2013).

V Sloveniji je Ljubljansko barje ključno gnezdišče vrste (slika 1), poleg tega pa redno gnezdi tudi na Cerkniskem jezeru, gnezdenja na ostalih območjih pa so priložnostna (Denac 2019). Sloveniji najbližja gnezdišča so v Avstriji in na Madžarskem (Hagemeijer & Blair 1997). Sicer je vrsta v Sloveniji uvrščena med kritično ogrožene vrste, ki jim grozi izumrtje.

Za Slovenijo in Ljubljansko barje navaja literatura za velikega škurha kontinuirano pojavljanje za vsaj zadnjih 250 let (Scopoli 1769, Freyer 1842, Schulz 1895) zato populacije na Ljubljanskem barju ne moremo obravnavati kot obrobne, pač pa kot verjeten reliktni ostanek po upadu populacije v Južni in Srednji Evropi. Zaradi tega je namen pričujoče študije preveriti, v kolikšni meri izolirana populacija v Sloveniji oziroma na Ljubljanskem barju genetsko odstopa od ostalega dela evropske populacije vrste.





Slika 2: Veliki škurh (*Numenius arquata*) gnezdi na Ljubljanskem barju na ekstenzivnih travnikih (Foto: Davorin Tome).

## 2. ZBRANI VZORCI IN METODE

### 2.1 ZBRANI VZORCI VELIKEGA ŠKURHA

Za namene genetske analize gnezdeče populacije velikega škurha na Ljubljanskem barju smo zbrali 12 vzorcev sicer 11 različnih ptic (Tabela 1). Med zbranimi vzorci je 10 zgodovinskih in izhajajo večinoma iz muzejske zbirke ptic Prirodoslovnega muzeja Slovenije, dodatno pa smo pridobili še vzorec perja od uplenjene ptice najdene na Ljubljanskem barju leta 1993 (zaporedne številke 1-10 v Tabeli 1). Muzejski primerki so večinoma zgodovinske ustreljene ptice (primerki po zaporednimi številkami 1-4 v Tabeli 1) zbrani med letoma 1949 in 1951. Iz zbirke Prirodoslovnega muzeja Slovenije smo vključili vse primerke iz Ljubljanskega barja, razen starejših več kot 100 let starih primerkov, ki jih v to študijo zaradi pričakovane večje stopnje degradiranosti DNK nismo vključili. Med vzorce smo vključili tudi recentno zbrane primerke z obdobja med letoma 1993 in 2018, pri čemer gre za pasivno zbrane primerke bodisi peres uplenjenih ptic, bodisi za jajčen lupine iz uplenjenih ali propadlih gnezd (primerki po zaporednimi številkami 5-10 v Tabeli 1). Vsi naštetih primerki so bili suho hranjeni za namene dolgoročnega hranjenja po uveljavljenih muzejskih standardih (Sliki 2 in 3), ne pa za namene genetskih analiz, ki zahtevajo drugačno hranjenje vzorcev.

Edini na ta način zbrani vzorec je bil vzorec krvi in perja živega, a poškodovanega drugoletnega samca, ki je bil dne 22.4.2021 najden na Ljubljanskem barju in prenesen v Ambulanto za ptice, kunce, glodalce in plazilce Veterinarske fakultete Univerze v Ljubljani (vzorec pod zaporedno številko 11 in 12 v Tabeli 1). Glede na rentgenski posnetek je imela ptica multifraktalen zlom desne peruti, dodatno pa dve šibri v spodnji čeljustnici in desni rami (Slika ). Glede na to da vhodne rane niso bile najdene, gre morda za pretekli dogodek, ki ni povezan s trenutno akutno poškodbo desne nadlahtnice ter koželjnice in komolčnice (J. Račnik, pisno), čeprav kompliciran zlom desne peruti streljanja na gnezdišču ne izključuje (Z. Golob, pisno). Ptica ni več sposobna letanja, čeprav ima druge življenjske funkcije neprizadete (Z. Golob, pisno), zato bo trajno premeščena v oskrbo v ZOO Ljubljana.

Vsi vzorci so bili po odvzemu iz muzejske zbirke ali ambulantem odvzemu krvi iz žive ptice do genetske analize shranjeni na temperaturi -20°C. Vzorci suhe kože, jajčnih lupin in perja so bili shranjeni v epruveh brez dodanega konzervirnega sredstva, vzorec krvi pa je bil shranjen v EDTA.

Tabela 1: Pregled zbranih vzorcev velikega škurha (*Numenius arquata*) z Ljubljanskega barja za genetsko analizo (PMSL – Prirodoslovni muzej Slovenije (navedena je inventarna številka primerka v muzejski zbirki), NIB – Nacionalni inštitut za biologijo).

| Zap. št. | Vir vzorca     | Spol | Kraj                               | Datum najdbe | Tip vzorca    | Opomba                   | Slika   |
|----------|----------------|------|------------------------------------|--------------|---------------|--------------------------|---------|
| 1        | PMSL-Aves-434  | ♀    | Ljubljansko barje, Iščica          | 23.05.1950   | suha koža     | muzejski študijski meh   | Slika 2 |
| 2        | PMSL-Aves-435  | ♂    | Ljubljansko barje, Notranje Gorice | 05.06.1951   | suha koža     | muzejski študijski meh   | Slika 2 |
| 3        | PMSL-Aves-436  | ♂    | Ljubljansko barje                  | 24.06.1949   | suha koža     | muzejski študijski meh   | Slika 2 |
| 4        | PMSL-Aves-437  | ♀    | Ljubljansko barje                  | 07.06.1950   | suha koža     | muzejski študijski meh   | Slika 2 |
| 5        | PMSL-Aves-7143 |      | Ljubljansko barje, Ig, Parte       | 21.05.2017   | jajčna lupina | jajce v študijski zbirki | Slika 3 |
| 6        | PMSL-Aves-7144 |      | Ljubljansko barje, Ig, Parte       | 21.05.2017   | jajčna lupina | jajce v študijski zbirki | Slika 3 |
| 7        | PMSL-Aves-7145 |      | Ljubljansko barje, Ig, Parte       | 21.05.2017   | jajčna lupina | jajce v študijski zbirki | Slika 3 |
| 8        | PMSL-Aves-7146 |      | Ljubljansko barje, Ig, Parte       | 21.05.2017   | jajčna lupina | jajce v študijski zbirki | Slika 3 |
| 9        | PMSL-Aves-7375 |      | Ljubljansko barje, Ig, Parte       | 10.05.2018   | jajčna lupina | jajce v študijski zbirki | Slika 3 |
| 10       | NIB            |      | Ljubljansko barje, Grmez           | 11.06.1993   | perje         | suho shranjeno perje     |         |
| 11       | NIB            | ♂    | Ljubljansko barje, Ig, Parte       | 22.04.2021   | perje         | živa poškodovana ptica   | Slika 4 |
| 12       | NIB            | ♂    | Ljubljansko barje, Ig, Parte       | 22.04.2021   | kri (EDTA)    | živa poškodovana ptica   | Slika 4 |



Slika 2: Zgodovinski primerki študijskih mehov velikih škurhov (*Numenius arquata*) v muzejski študijski ornitološki zbirki Prirodoslovnega muzeja Slovenije. (foto: Al Vrezec)



Slika 3: Primerki jajc velikega škurha (*Numenius arquata*) v muzejski oološki ornitološki zbirki Prirodoslovnega muzeja Slovenije. (foto: Al Vrezec)



Slika 4: Rentgenski posnetek poškodovanega samca velikega škurha (*Numenius arquata*) najdenega 22.4.2021 na Ljubljanskem barju. Ptica ima multifraktalni zlom peruti, v spodnji čeljustnici in desni rami pa sta vidni dve šibri. (foto: dr. Joško Račnik, Veterinarska fakulteta Univerze v Ljubljani)

## 2.2 METODE ANALIZE

### 2.2.1 Izolacija, kvantifikacija in pomnoževanje DNK

V postopek izolacije DNK smo vključili vzorce z zaporednimi številkami od 1 do 10 (Tabela 1) ter dve različni tkivi (pero in kri) iste ptice pod zaporednima številka 11 in 12 (Tabela 1). Za izolacijo smo uporabili MicroDNA ekstrakcijski kit proizvajalca QIAGEN, ki velja za enega najboljših kitov za izolacijo DNK iz potencialno problematičnih vzorcev z nizko vsebnostjo DNK. Pri postopku izolacije smo sledili navodilom proizvajalca in upoštevali priporočilo 24 urne inkubacije vzorcev v proteinazi K, za maksimizacijo izločanja DNK iz tkiv. Po končanem postopku izolacije, smo pridobili 30 µL elucije z raztopljeno DNK za vsak vzorec.

Vsem 12 vzorcem izolirane DNK smo preverili kvaliteto in določili koncentracijo DNK s spektrofotometrom Nanodrop 2000.

Pomnoževanje DNK z verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo opravili za tri različne gene oziroma molekularne markerje. Mitohondrijski gen za Citokrom C oksidazo, podenoto 1 (COI), smo pomnoževali z oligonukleotidnima začetnikoma BIRD F1 (TTCTCCAACCAAGACATTGGCAC) in BIRD R1 (ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG). Mitohondrijski gen za NADH dehidrogenazo, podenoto 2 (ND2), smo pomnoževali z oligonukleotidnima začetnikoma L5219Met (CCCATACCCCGAAAATGATG) in H6313Trp (CTCTTATTTAAGGCTTTGAAGGC). Jedrni gen za Tirozin kinazo 14 receptorja skeletnih mišic (MUSK14) smo pomnoževali z oligonukleotidnima začetnikoma MUSK-I3F (CTTCCATGCACTACAATGGGAAA) in MUSK-I3R (CTCTGAACATTGTGGATCCTCAA).

Za vse markerje smo pripravili 35 µL reakcije in v prvi fazi uporabili osnovne PCR protokole, pridobljene iz literature. Ustreznost PCR produktov smo določili s pregledom signalov po gelski elektroforezi. Ker večina PCR produktov (vsi vzorci razen vzorca krvi osebk pod zaporedno št. 11) ni bila ustrezne kakovosti, smo PCR reakcije ponavljali. Glede na osnovni protokol smo pri optimizaciji povečali število ciklov PCR, spremenili temperature naleganja oligonukleotidnih začetnikov, vzpostavili temperaturni gradient naleganja oligonukleotidnih začetnikov ter tudi zamenjali klasično Taq polimerazo (Promega) in uporabili natančnejšo in zmogljivejšo HiFi Polimerazo (KAPA Biosystems).

Skupno smo opravili pet poskusov pomnoževanja gena COI, tri poskuse pomnoževanja gena ND2 in tri poskuse pomnoževanja gena MUSK14. Vse primerne PCR produkte in tudi take, za katere je bila vsaj najmanjša možnost pridobitve nukleotidnega zaporedja, smo poslali na sekvenciranje s Sangerjevo metodo v podjetje MacroGen Europe.

## 2.2.2 Genetske analize: haplotipske mreže in filogenetska rekonstrukcija

Prejete sekvenčne kromatograme (originalni zapis branja nukleotidnega zaporedja na sekvenatorju) smo uvozili v program Geneious v5.5.6, kjer smo jih pregledali in uredili. Urejena nukleotidna zaporedja smo izvozili v formatu FASTA in jih združili z vsemi javno dostopnimi zaporedji tarčnih genov (podatkovni bazi GenBank in BoldSystems). Zbrana zaporedja smo poravnali z algoritmom Muscle v programu MEGA-X. S tem programom smo nato izračunali genetske razdalje med vsemi zaporedji, ki nam povedo, za koliko odstotkov se dve zaporedji med sabo razlikujeta v nukleotidni sestavi.

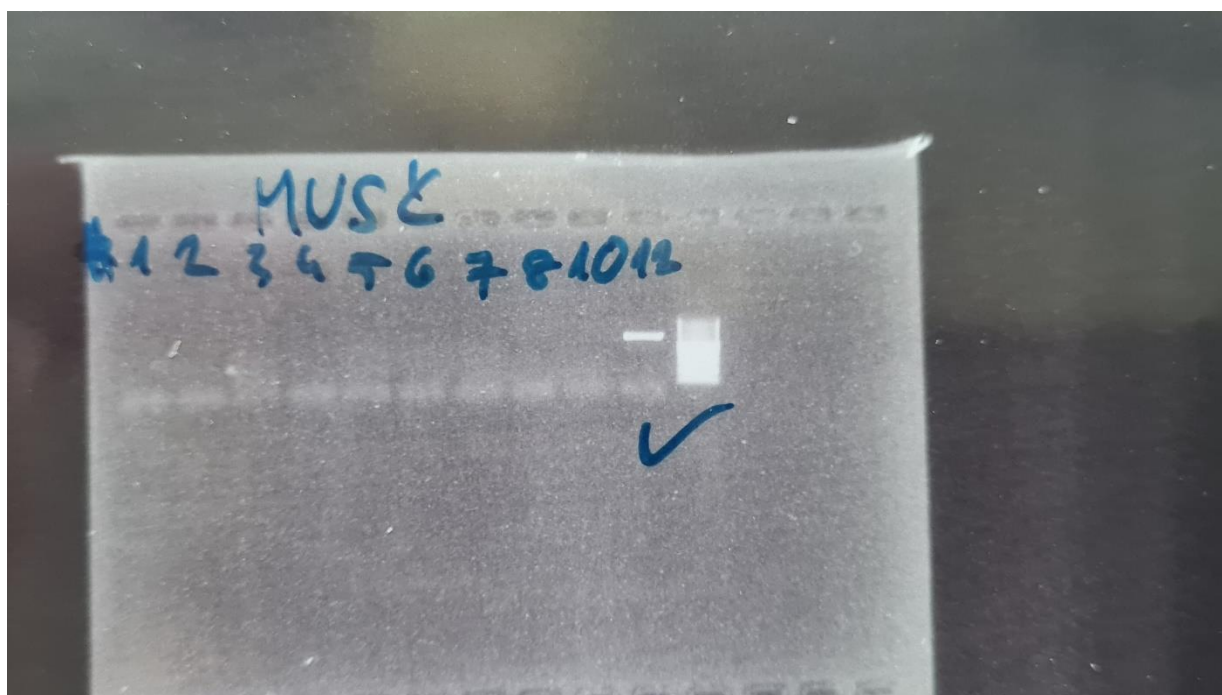
Za grafični prikaz populacijske strukture smo opravili analizo haplotipskih mrež v kateri smo uporabili 14 zaporedij COI, 59 zaporedij ND2 in 32 zaporedij MUSK14. Analizo haplotipskih mrež smo opravili v informacijskem orodju R s programskim paketom *pegas*. Frekvenco posameznega haplotipa smo kodirali z velikostjo kroga v haplotipski mreži, z različnimi barvami pa smo kodirali države izvorov posameznih vzorcev.

Za prikaz sorodstvenih odnosov znotraj vrste *N. arquata* smo opravili še filogenetsko rekonstrukcijo na podlagi vseh treh izbranih genov. Najprimernejše evolucijske modele nukleotidnih zamenjav smo testirali s programom Mega-X. Genetska zaporedja smo nato združili v programu Mesquite in pripravili datoteko za izračun Bayesijske filogenije. V filogenetiki so za pravičen izračun drevesa pomembne tudi ne tarčne t.i. zunanje skupine, zato smo v analizo vključili še zaporedja vrste sorodne velikemu škurhu, *N. phaeopus*. Izračun filogenije smo opravili s programom MrBayes, kjer smo privzetim nastavitvam spremenili število MCMC generacij v 1 000 000, nastavili tri particije (za tri gene), določili substitucijski model HKY za ND2 in COI particiji ter model JC za MUSK particijo. Ustreznost statističnih parametrov filogenije smo preverili v programu Tracer v1.7.1.

### 3. REZULTATI IN DISKUSIJA

#### 3.1 ANALIZA UPORABNOSTI ZBRANIH VZORCEV

Izolacija DNK je bila uspešna pri vseh vzorcih, nadaljnji postopki pa so se izkazali za bolj problematične. Pridobili smo nukleotidna zaporedja za vse tri tarčne gene pri vzorcu krvi velikega škurha (označen pod številko #12), pri ostalih enajstih vzorcih pa nukleotidnega zaporedja s predlaganim postopkom ni bilo možno pridobiti. Postopek pridobitve DNK zaporedja s Sangerjevo metodo je ustrezen za široko paleto vzorcev, s predpogojem, da smo z metodo PCR pomnožili ustrezen del tarčnega gena, kar zaznamo kot jasen signal ustrezne dolžine na gelski elektroforezi (Slika 5, primer #12). Kadar jasnih (ali šibkih) signalov ni mogoče opaziti, kot npr. v našem primeru pri vseh vzorcih razen številke #12, to običajno nakazuje na težave z uporabljenim DNK.



Slika 5: Primer opazovanja signalov po gelski elektroforezi. Vzorec #12 je tipični primer jasnega signala ustrezne dolžine, ki nakazuje na uspešno pomnoževanje dela gena MUSK z metodo PCR. Pri preostalih vzorcih se tarčni gen ni pomnožil, kar nakazuje na težave s kvaliteto DNK.

Težave z DNK pri pomnoževanju s PCR običajno lahko uvrstimo v enega izmed treh tipov: 1) uporabljena je bila premajhna količina DNK, 2) v izolirani DNK je prisotnih preveč nečistoč ali 3) DNK je preveč degradirana. Prva dva tipa težav zlahka preverimo s pregledov parametrov, ki jih poda spektrofotometer (npr. NanoDrop 2000). Na primeru vzorcev velikega škurha vidimo, da je bila koncentracija in posledično tudi celotna količina izolirane DNK v 30  $\mu$ L elucije pri vseh vzorcih zadovoljiva oziroma pri nekaterih celo izredno visoka (Tabela 2).

Tabela 2: Koncentracija in čistoča izolirane DNK iz vzorcev velikega škurha (*Numenius arquata*).

| Zap. št. | Gen. koda vzorca | Koncentracija DNK v 30 $\mu$ L elucije [ng/ $\mu$ L] | Indeks čistoče (A260/280) |
|----------|------------------|--|---------------------------|
| 1        | NA 434           | 125.6  | 1.71                      |
| 2        | NA 435           | 72.4   | 1.63                      |
| 3        | NA 436           | 152  | 1.76                      |
| 4        | NA 437           | 503.6  | 1.80                      |
| 5        | NA 7143          | 57.1   | 1.76                      |
| 6        | NA 7144          | 52.6   | 1.81                      |
| 7        | NA 7145          | 1377.7   | 1.90                      |
| 8        | NA 7146          | 17.2   | 1.75                      |
| 9        | NA 7375          | 26.6   | 1.21                      |
| 10       | NA NIB 1         | 304.4  | 1.74                      |
| 11       | NA NIB 2         | 134.2  | 1.39                      |
| 12       | NA NIB 2 B       | 524.1  | 1.82                      |

Količino DNK, ki se uporabi kot osnova za PCR, prilagodimo glede na priporočene vrednosti za PCR protokol, ki običajno zahteva 10-100 ng DNK na reakcijo. Slabi rezultati pomnoževanja DNK pri vzorcih velikega škurha torej niso posledica premajhnih količin DNK.

Čistočo izolirane DNK preverjamo z vrednostmi razmerja valovnih dolžin A260 in A280. Za odlične običajno veljajo vrednosti med 1.8 in 2.0, sprejemljive so tudi vrednosti nad 1.7. Pri primeru velikega škurha so samo trije vzorci dvomljive čistoče: #9 in #11 glede na vrednosti ne vsebujeta čiste DNK, #2 je lahko problematična. Nizke vrednosti signalizirajo prisotnost proteinov ali določenih drugih snovi v eluciji in so lahko posledica premajhne količine tkiva, ki vsebuje DNK (lupina #9 in del peresa #11) ali prisotnosti drugih nečistoč (muzejski vzorec #2). Vsekakor bi glede na vrednosti A280/A260 pričakovali več uspešno pomnoženih tarčnih genov vzorcev velikega škurha, zato sklepamo, da glavni problem ni čistoča izolirane DNK.

Kot glavni razlog za neuspešen postopek pridobitve nukleotidnega zaporedja pri večini vzorcev torej ostane pomanjkljiva ohranjenost/kvaliteta DNK. DNK, ki je degradirana/fragmentirana se ne more uspešno pomnoževati s klasičnim PCR postopkom, ki potrebuje ohranjen zapis celotnega tarčnega gena. Daljši tarčni gen kot si izberemo, manjša je verjetnosti uspešnega pomnoževanja. Glavni razlogi za degradirano DNK so starost vzorcev, nepravilno shranjevanje vzorcev, izpostavljenost vzorcev vremenskim vplivom, svetlobi in visokim (tudi sobnim) temperaturam ali neustrezna preparacija tkiva s sredstvi, ki uničujejo DNK (npr. formalin). Glede na to, da je večina vzorcev velikega škurha relativno starih, shranjenih za muzejske potrebe in ne s primarno idejo ohranjanja DNK, je DNK zelo verjetno v slabem stanju in ne omogoča klasičnih in cenovno ugodnih pristopov k populacijski genetiki. To se sklada tudi z našimi rezultati, saj smo samo iz ustrezno shranjene krvi pridobili kvalitetna nukleotidna zaporedja. Glede na rezultate lahko sklepamo, da je za pridobivanje nukleotidnih zaporedij precej bolj pomembno ustrezno shranjevanje vzorcev kot tip tkiva iz katerega izoliramo DNK.

Kot morebitno izboljšavo postopka in pridobitev dodatnih genetskih informacij bi lahko predlagali izbiro drugih tarčnih genov ali pa manjše fragmente genov izbranih v tej študiji. Tak postopek seveda prinaša svoje omejitve, saj z izbiro drugih (nestandardnih)

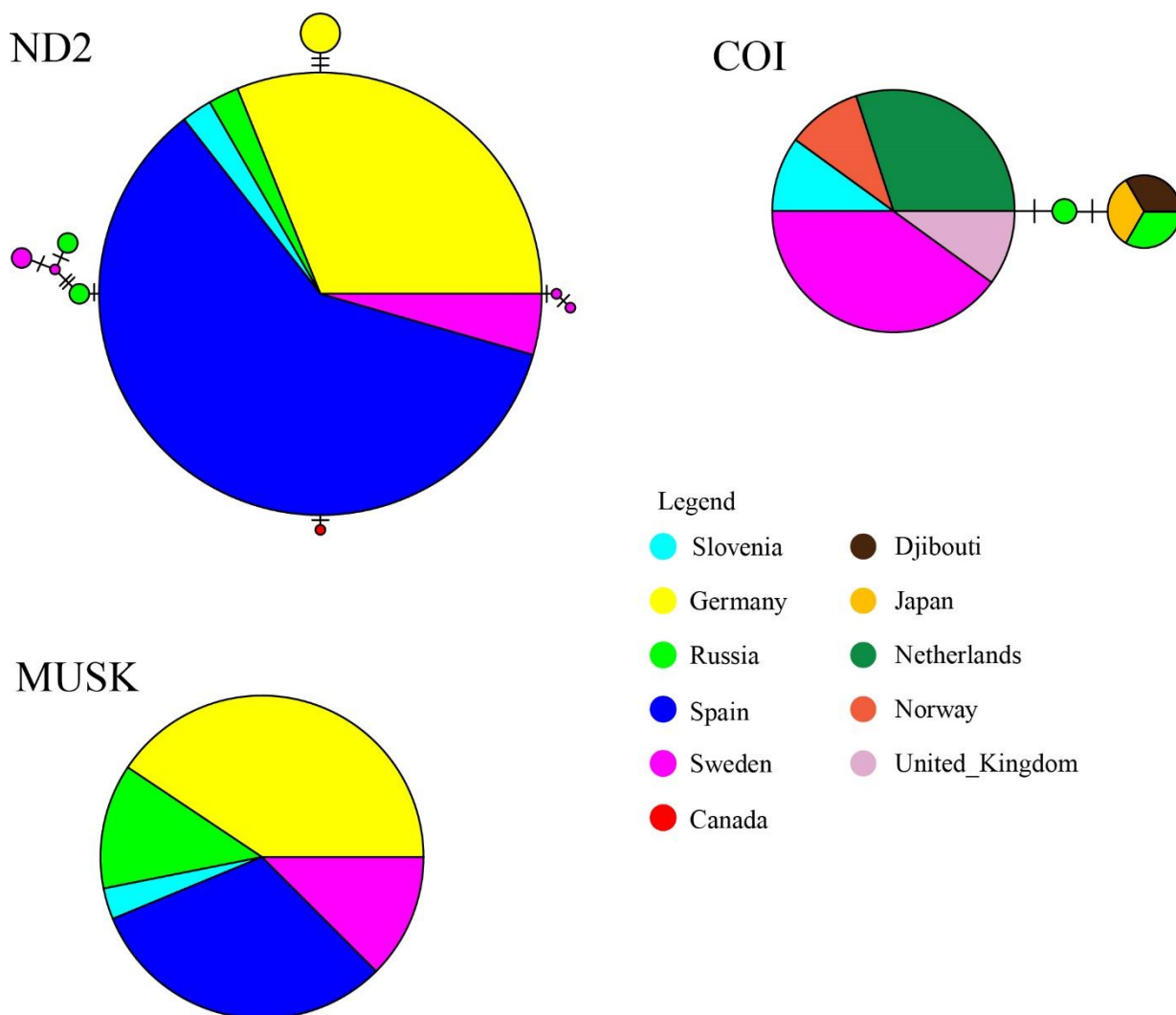


genov izgubimo primerjavo z že objavljenimi genetskimi podatki iz drugih držav, ki so osnova za populacijske analize. Krajši fragmenti standardnih genov pa zahtevajo podrobnejšo analizo samega gena in izdelavo specialnih oligonukleotidnih začetnikov. Krajši fragment v vsakem primeru vsebuje tudi manj informacij, kar je lahko zelo problematično pri organizmih, ki se dobro razširjajo in predvidoma vzdržujejo visok genski pretok med populacijami. Drug način za pridobitev več informacij iz problematične DNK pa je uporaba forenzičnih postopkov ali protokolov za analizo starodavne DNA s sekvenciranjem nove generacije. Tudi omenjeni postopki sekvenciranja nove generacije ne garantirajo kvalitetnih nukleotidnih zaporedij, časovno in cenovno pa so v neprimerljivo višjem razredu, kot postopki, ki smo jih uporabili v tej analizi.

### **3.2 FILOGEOGRAFSKA POZICIJA VELIKEGA ŠKURHA Z LJUBLJANSKEGA BARJA**

Razlike v nukleotidnem zaporedju z ozirom na izvorno lokacijo organizma za posamezne gene najlažje grafično prikažemo s haplotipskimi mrežami (Slika 6). Analiza 59 zaporedij ND2 (58 iz javno objavljenih podatkov in vzorec #12 iz Slovenije) nam razkrije, da je za ta gen trenutno poznanih 9 haplotipov, med katerimi je en daleč najbolj zastopan, saj ga vsebuje kar 46 od 59 osebkov (Slika 6; ND2). Velikost kroga v haplotipski mreži korelira s frekvenco enakih haplotipov. Vzorec iz Slovenije je del tega največjega haplotipa, ki vsebuje še vzorce iz Španije, Nemčije, Švedske in en ruski vzorec. Tudi ostali haplotipi so od glavnega ločeni z le nekaj mutacijami (prikazano s prečnimi črticami na povezavah med haplotipi), katere niso lokacijsko značilne. Na podlagi gena ND2 se torej slovenski vzorec v ničemer ne razlikuje od preostalih evropskih vzorcev.

Za haplotipsko analizo gena COI smo imeli na voljo 14 zaporedij (13 iz podatkovnih baz in #12 iz Slovenije). Za gen COI smo odkrili tri različne haplotipe. Najbolj zastopan je haplotip, ki ga vsebujejo vzorci iz Slovenije, Norveške, Združenega kraljestva, Nizozemske in Švedske. Manjša dva haplotipa vsebujejo vzorci iz Rusije, Japonske in Džibutija. Tudi v tem primeru je težko govoriti o mutacijah, ki bi bile značilne za posamezne regije, saj je vzorcev, ki so nam dostopni, premalo. Zagotovo pa je, da se slovenski vzorec v ničemer ne razlikuje od vzorcev, ki izvirajo iz preostalih delov Evrope.



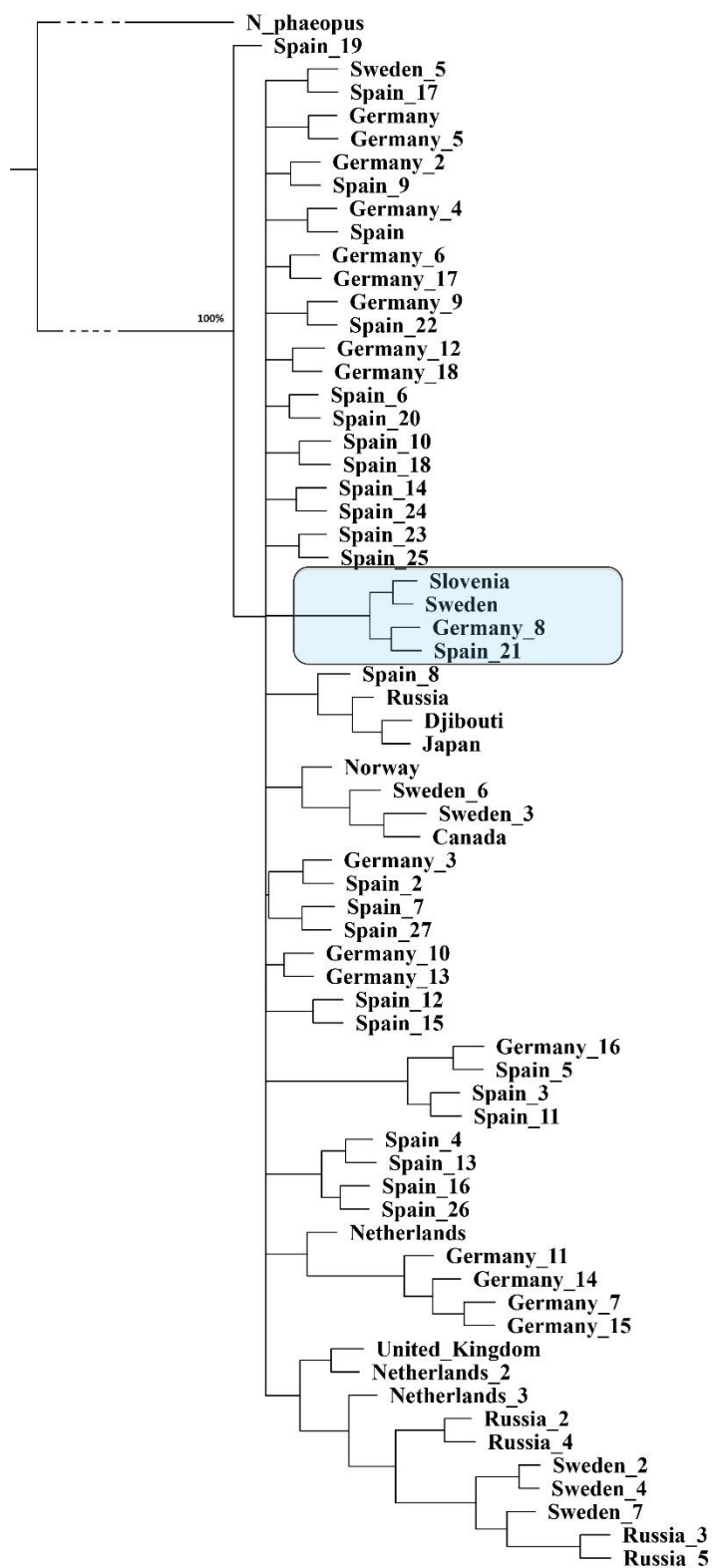
Slika 6: Haplotipske mreže vzorcev velikega škurha (*Numenius arquata*) na podlagi analiz posameznih tarčnih genov. Krogi predstavljajo različne haplotipe, velikost krogov njihovo frekvenco, barve pa izvirno državo vzorca. Prečne črtice na povezavah med haplotipi predstavljajo število mutacij med njimi.

Najbolj očitno so populacije velikega škurha genetsko homogene v primeru jedrnega gena MUSK. Prav vseh 32 zaporedij (31 iz javnih podatkovnih baz in #12 iz Slovenije) je identičnih, prisotne ni niti ene mutacije. Glede na nizko število mutacij in dokaj homogeno genetsko strukturo populacij, ki smo jo opazili že pri mitohondrijskih genih (ND2 in COI), je tak rezultat pri jedrnih genih do neke mere pričakovan. Mitohondrijski geni so namreč podvrženi hitrejši evoluciji oz. hitrejšemu kopičenju mutacij kot jedrni geni in zato primerni za populacijsko genetiko organizmov za katere se domneva, da se dobro razširjajo in lahko vzdržujejo visok genski pretok med populacijami.

Tudi genetske razdalje, ki prikazujejo odstotek različnih nukleotidov v določenem zaporedju, govorijo v prid zelo homogeni genetski strukturi populacij velikega škurha. Slovenski vzorec je na podlagi zaporedja gena ND2 genetsko najbolj oddaljen od dveh vzorcev iz Švedske, a je ta oddaljenost le 0,35%. Ta oddaljenost je še manjša pri genu COI in znaša 0,3% med slovenskim in japonskim vzorcem. Znotrajvrstne genetske

razdalje pri mitohondrijskih genih so lahko med različnimi organizmi zelo različne - pri nekaterih organizmih lahko dosežejo tudi nekaj odstotkov - vsekakor pa so izmerjene razdalje v primeru velikega škurha nizke. Na podlagi jedrnega gena MUSK ni možno izračunati genetske razdalje, saj so, kot omenjeno zgoraj, vsa zaporedja identična. Primernejša metoda za raziskovanje razlik med populacijami bi bila analiza genskega pretoka in fiksiranih mutacij (Fst statistika), vendar pa za to nimamo dovolj uporabnih podatkov. Na podlagi zbranih rezultatov, ki sicer obsegajo kar veliko geografsko območje, lahko z veliko mero previdnosti le domnevamo, da bi bili tudi drugi vzorci velikega škurha iz Slovenije podobne genetske sestave, kar posledično pomeni, da vzdržujejo genski tok z drugimi populacijami.

Kot nadgradnjo analiz posameznih genov smo izračunali tudi filogenijo na podlagi združevanja genetskih informacij za vse tri gene (Slika 7). Test najustrežnejših evolucijskih modelov nukleotidne substitucije je kot najboljši model izbral HKY za particijo genov COI in ND2 ter najpreprostejši model JC za particijo gena MUSK. Izračunano filogenetsko drevo prikazuje večinoma nerazrešene sorodstvene odnose znotraj vrste *N. arquata*, ki so glede na predhodne analize haplotipov pričakovani. Za lažjo interpretacijo geografske pozicije so vzorci velikega škurha poimenovani po državah iz katerih vzorci izvirajo. Na drevesu lahko opazimo veliko število politomij – razvejitve, ki niso dihotomne in so posledica težav pri izračunu zaradi minimalnega števila razlik v nukleotidnih zaporedjih. Slovenski vzorec tvori klad skupaj z vzorci iz Švedske, Nemčije in Španije (Slika 7; obarvano), ker pa so podpore razvejitvam izjemno nizke, med enim in 10% (za zanesljive podpore pri bayesianski filogeniji veljajo tiste, ki so višje od 90%), ta klad in njegova pozicija nimata biološko relevantne informacije. Osebki vrste *N. arquata* tvorijo dobro podprt klad, ki je jasno ločen od sorodne vrste *N. phaeopus* (Slika 7; podpora 100%, prikazana ob razvejitvi). Vsi statistični parametri filogenije so ustrezni (ESS vrednost > 200). Sklepi ob pregledu filogenetske analize torej ostajajo enaki kot pri haplotipskih analizah in sicer, da se vzorec velikega škurha iz slovenske populacije zelo verjetno ne razlikuje značilno od preostalih evropskih populacij. Vsekakor pa bi za močnejšo podporo takih sklepov potrebovali dodatne vzorce tako iz Slovenije kot iz drugih delov sveta.



Slika 7: Bayesianška filogenetska analiza velikega škurha (*Numenius arquata*) na podlagi treh genov (ND2, COI in MUSK). Ujemanje vzorcev filogenije in geografskega izvora ni prisotno, podpore razvejitvam pa so izrazito nizke. Z upoštevanjem teh dejstev ne moremo potrditi značilnih razlik med katerimi koli populacijami. Glede na rezultate na podlagi treh genov je genetska struktura populacij velikega škurha precej homogena.

## 4. SKLEPI S PREDLOGOM NADALJNIH UKREPOV

Trenutno zbrani genetski podatki predstavljeni v tem poročilu kažejo, da populacija na Ljubljanskem barju ni povsem izolirana od ostale evropske populacije in da znotraj evropske populacije kljub visoki stopnji filopatrije prihaja do izmenjave genov. Ti rezultati podpirajo tudi podobne ugotovitve iz španske populacije (Rodrigues s sod. 2018), kjer so ugotovili manjšo genetsko pestrost populacije, kar kaže, da je tam mešanje ptic verjetno manjše. Šele analiza večje količine svežih vzorcev pa bo bolj zanesljivo pokazala, v koliki meri je barjanska populacija izolirana in ali prihaja zaradi parjenja v sorodstvu do genetske homogenizacije.

Raziskave obročkanih ptic v Evropi kažejo, da je stopnja preživetja odraslih ptic pri velikem škurhu visoka, vsesplošni upad populacije pa je zelo verjetno posledica manjše gnezditvene uspešnosti (Saurola s sod. 2013, Robinson s sod. 2020). Podobnih demografskih podatkov za Slovenijo nimamo (Denac 2013), saj je bilo pri nas do leta 2019 obročkanih vsega 14 velikih škurhov in sicer med letoma 1975 in 1993, pri čemer ne beležimo nobenih najdb doma ali v tujini obročkanih škurhov (Božič 2009, Šere 2009). Sicer analiza do sedaj najdenih gnezd kaže na nizko gnezditveno uspešnost velikih škurhov na Ljubljanskem barju, saj je uspešnih manj kot 20 % parov (Denac 2015, 2016). Domnevamo, da se na Ljubljansko barje vračajo vsako leto iste ptice, česar pa glede na odsotnost označevanja ptic ni mogoče potrditi. Vsekakor pa nekatere podrobnejše raziskave drugih travniških ptic na Ljubljanskem barju kažejo, da je uspešnost talnega gnezdenja na barjanskih travnikih nizka, ključno vlogo pa pri tem igra neustrezno upravljanje s travišči (zlasti problem košnje), v določeni meri pa tudi povečan plenilski pritisk (Tome s sod. 2020). Povečevanje gnezditvene uspešnosti bo kot kaže pomemben predpogoj za uspešno ohranjanje vrste na Ljubljanskem barju, kjer veliki škurh lahko v ekološkem pogledu odigra ključno vlogo krovne vrste za varstvo travišč, v sociološkem pogledu pa pomembno vlogo karizmatične vrste, prek katere bo možno varovati tudi druge naravovarstveno pomembne vrste (Mori s sod. 2020).

Tekom te raziskave smo na Ljubljanskem barju zabeležili tudi obstreljenega samca velikega škurha, kar odpira nove razsežnosti varstva vrste na Ljubljanskem barju. Domnevno je bila ptica ustreljena izven Ljubljanskega barja, torej na selitvi. Ni namreč znano kje veliki škurhi z Ljubljanskega barja prezimujejo, domnevno pa gre za sredozemska prezimovališča vzdolž jadranske obale. Ker veliki škurh na Ljubljanskem barju do sedaj ni bil deležen večje raziskovalne pozornosti, ne moremo izključiti možnosti, da je strmo upadanje populacije posledica tudi nezakonitega lova na prezimovališčih. Za ta namen je nujno opremiti nekaj barjanskih ptic z napravami za daljinsko sledenje, saj z obročkanjem pri močno zmanjšani populaciji ni mogoče dobiti zanesljivih podatkov o selitvi in prezimovanju, ki so potrebni za oblikovanje varstvene strategije vrste.

Za učinkovito varstvo in ohranjanje populacije velikega škurha na Ljubljanskem barju predlagamo sledeče aktivnosti in ukrepe:

- zbiranje svežega genetskega materiala za nadaljnje molekularne raziskave genetske pestrosti barjanske populacije (peresa, kadavri, jajca ali ostanki lupin, vzorci krvi ujetih ali poškodovanih živali); pri tem je potrebno material iz terena v najkrajšem možnem

času s terena prinesiti v laboratorij, kjer ga je potrebno ustrezno konzervirati in preprečiti nadaljnje propadanje dednine;

- na manjšem številu odraslih ptic izvesti raziskavo z nameščanjem naprav za daljinsko spremljanje, v kateri bomo ugotavljali ključna območja za vrsto na Ljubljanskem barju, selitvene poti in prezimovališča;

- bistveno izboljšati gnezditveni uspeh na Ljubljanskem barju s strogim varstvenim režimom na večjih površinah travišč okoli gnezdišč (Denac 2015, 2016) s prepovedjo košnje do konca julija, ko po ocenah mladiči že lahko letijo;

- identificirati ključne plenilce na gnezdišč (Denac 2016);

- določiti in izvajati ukrepe, ki bodo zmanjšali plenilski pritisk na talna gnezda ter zmanjševanje prisotnosti plenilcev na širšem območju gnezdišč (prepoved vlaganja potencialnih plenskih vrst, npr. fazana (*Phasianus colchicus*), ki kot nadomesten plen vzdržujejo velike populacije plenilcev talnih gnezd);

- za dolgoročno zagotavljanje varstvenih ciljev za ohranjanje populacije velikega škurha na Ljubljanskem barju je potrebno pripraviti akcijski načrt, ki poleg ohranjanja obstoječih travišč predvideva tudi renaturacijo uničenih ekstenzivnih travišč na površinah njiv in intenzivnih travnikov, kar bo vplivalo ugodno tudi na druge kvalifikacijske vrste travniških ptic z visoko varstveno vrednostjo.

## 5. LITERATURA

- BirdLife International (2017): European birds of conservation concern: populations, trends and national responsibilities. – BirdLife International, Cambridge.
- Denac K. (2013): Velikost in razširjenost populacije velikega škurha *Numenius arquata* na Ljubljanskem barju v letih 2011 in 2012. – *Acrocephalus* 34 (156/157): 33–41.
- Denac K. (2015): Identifikacija lokacij gnezdišč velikega škurha *Numenius arquata* na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje v letu 2015. – DOPPS, Ljubljana.
- Denac K. (2016): Identifikacija lokacij gnezdišč velikega škurha *Numenius arquata* na območju Krajinskega parka Ljubljansko barje v letu 2016. DOPPS, Ljubljana.
- Denac K. (2019): Veliki škurh *Numenius arquata*. In: Mihelič T., Kmecl P., Denac K., Koce U., Vrezec A., Denac D. (eds.): Atlas ptic Slovenije. Popis gnezdik 2002–2017. – DOPPS, Ljubljana.
- Freyer H. (1842): Fauna der in Krain bekannten Säugethiere, Vögel, Reptilien und Fische. Eger'schen Gubernial – Buchdruckerei, Laibach.
- Geister I. (1995): Ornitološki atlas Slovenije. – DZS, Ljubljana.
- Hagemeijer W. J. M., Blair M. J. (eds.) (1997): The EBCC Atlas of European Breeding Birds: Their distribution and abundance. – T & A D Poyser, London.
- Ławicki Ł. & Wylegała P. (2011): Recent data on the declining breeding population of Eurasian Curlew *Numenius arquata* in western Poland. – *Wader Study Group Bull.* 118 (1): 14–17.
- Mori N., Vrezec A., Tome D., Šalamun A., Ratajč U. (2020): Poročilo o Pilotni akciji "Revizija biodiverzitete v Krajinskem parku Ljubljansko barje" s priporočili za varstvo biodiverzitete kopenskih, negozdnih okolij Krajinskega parka Ljubljansko barje. Projekt BID-REX (PGI601505), Interreg Evropa. Nacionalni inštitut za biologijo, Ljubljana.
- Robinson R.A., J.D. Sanders, E.C. Rees (2020): Survival of Eurasian Curlew *Numenius arquata* differs by season but not breeding origin. – *Wader Study* 127 (1): 25-30.
- Rodrigues T.M., P. Andrade, M. Vidal, M. Boschert, D. Gonçalves, J. Domínguez (2018): No genetic differentiation, but less diversity, in the Iberian breeding population of the Eurasian Curlew (*Numenius arquata*). – *Journal of Ornithology*, <https://doi.org/10.1007/s10336-018-1598-0>
- Saurola, P., Valkama, J., Lehtikoinen, A., Lehtikoinen, E., Piha, M., Sola, P. & Velmala, W. (2013): The Finnish Bird Ringing Atlas. Vol. I. – Finnish Museum of Natural History, Ministry of Environment, Helsinki.
- Schulz F. (1895): Verzeichniss der in Krain beobachteten Vögel vom Jahre 1890-1895. Die Schwalbe, Mitteilungen des ornitologischen Vereines in Wien, 19 (6): 81-83, 103-104, 114-117.
- Scopoli J.A. (1769): Annus I. Historico-Naturalis. Descriptiones Avium. Sumtib. Christ. Gottlob Hilscheri, Lipsiae.
- Tome D., D. Denac, A. Vrezec (2020): Mowing is the greatest threat to Whinchat *Saxicola rubetra* nests even when compared to several natural induced threats. – *Journal for Nature Conservation* 54: 125781.
- Wernham C.V., Toms M.P., Marchant J.H., Clark J.A., Siriwardena G.M., Baillie S.R. (2002): The Migration Atlas: movements of the Birds of Britain and Ireland. – T & AD Poyser, London.