

ЭКОЛОГО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ПОПУЛЯЦИИ ДИКОГО КАБАНА (*SUS SCROFA L*) ЗАПОВЕДНОГО УЧАСТКА «ЛЕС НА ВОРСКЛЕ»¹

Э.А. Снегин¹, М.В. Щекало²,
А.А. Горбачева¹

¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

²Государственный природный заповедник «Белогорье», Россия, 309340, Белгородская обл., пгт. Борисовка, пер. Монастырский, 3
E-mail: snegin@bsu.edu.ru

В работе проведен предварительный анализ жизнеспособности популяции дикого кабана (*Sus scrofa L.*) заповедного участка «Лес на Ворскле». Учитывались данные зимних учетов численности животных, регистрировались следы жизнедеятельности на стационарных маршрутах. Анализ генофонда осуществлялся с помощью метода *RAPD-PCR*. На основании полученных данных можно констатировать, что исследованная популяция кабана заповедного участка «Лес на Ворскле» находится в уязвимом состоянии и ее дальнейшее существование во многом будет определяться степенью влияния антропогенного фактора.

Ключевые слова: популяция, дикий кабан, *RAPD-PCR*.

Введение

Дикий кабан (*Sus scrofa L.*) является объектом пристального изучения как важный объект охоты, и как эдификатор природных экосистем. Мониторинг его популяций составляет важное звено в системе контроля за состоянием природных комплексов, в том числе и в заповедниках. Более того генофонд дикого кабана используется селекционерами для совершенствования полученных ранее и выведения новых пород домашних свиней [1, 2].

Стоит отметить, что в прошлом генофонды популяций дикого кабана тестировались авторами только с помощью карпологических и иммуногенетических методов. Настоящая работа является первой попыткой оценить уровень жизнеспособности популяции дикого кабана на основе, как экологических характеристик, так и генетических данных, полученных с использованием ДНК-маркеров.

Материал и методы

Полевые исследования проводились на базе ФГБУ «ГПЗ «Белогорье» с 2008 по 2012 гг. Анализ ДНК был проведен в научно-исследовательской лаборатории популяционной генетики и генотоксикологии НИУ «БелГУ».

Материалом для исследований экологии диких копытных послужили данные зимних учетов численности животных и регистрации следов жизнедеятельности на стационарных маршрутах в заповедном участке «Лес на Ворскле». Исследуемая территория представляет собой типичный ландшафт Среднерусской лесостепи с преобладанием нагорных дубрав и расположена на высоком правом берегу реки Ворсклы в Борисовском административном районе Белгородской области [3]. Учеты диких копытных животных здесь систематически велись с 1995 года. Численность кабана определялась методом шумового прогона [4, 5, 6, 7]. Время проведения учетов - последняя декада января.

Относительно небольшие площади лесных массивов в лесостепной зоне [8] позволили проводить полное обследование территории с подробным картированием при помощи GPS-приемника следов жизнедеятельности животных без закладки пробных площадей. Такая методика применения GPS и ГИС-технологий была апробирована нами при изучении инфраструктуры участка обитания кабана в заповеднике «Белогорье» в 2008-2010 годах [9].

В качестве картографической основы мы использовали схему участка «Лес на Ворскле» из материалов лесоустройства 1985 г. [10]. На ней обозначена граница заповедника, просеки, границы выделов и тропы. Для перевода бумажной схемы в электронный вид и картографического оформления результатов исследования использовалась геоинформационная система (ГИС) ArcGIS 9.2.

¹ Работа выполнена при поддержке МОН РФ госконтракт П1050.



Степень освоения и использования территории заповедника кабанами определялась при проведении картирования с помощью GPS-приемника Garmin eTrex Vista постоянных структурных элементов участка обитания – чесалок и купалок. Нанесение на схему лежек животных не представляется возможным, так как большая их часть является временными, что весьма характерно для относительно теплого климата лесостепной зоны. Для этого проводились обходы территории заповедника. Во время обходов при помощи GPS-приемника определяли координаты обнаруженных деревьев-чесал и купалок. Точность определения координат под пологом леса составляла 5-10 м в зависимости от полноты древостоя и сомкнутости кроны.

Для исследования территориального размещения животных и определения масштабов их роющей деятельности в разные сезоны года мы использовали общепринятую методику картирования следов жизнедеятельности животных на трансектах [11, 12]. На территории заповедника нами было заложено 7 стационарных маршрутов, общей протяженностью 11 км 138 м и шириной учетной линии 4 м.

Для генетического анализа использовали волосяные луковички кабанов, собранные при отлове животных в 2010–2011 годах. Всего было отловлено 66 особей кабана в возрасте до двух лет (возрастная группа *subadultus*). Из них для генетического анализа было взято 35 особей. Выделение ДНК проводили с использованием комплект реагентов «ДНК-ЭКСТРАН-2» фирмы «Синтол».

Раствор полученной ДНК использовали для исследования генома на основе ДНК-маркеров (метод *RAPD-PCR*). На первоначальном этапе был проведен скрининг по четыре случайным праймерам. Из них был выбран один праймер, дающий наиболее четко диагностируемые и воспроизводимые флангиринты – *OPC 8* (5'-GGGATATCGG-3'). ПИР проводили в 20 мкл реакционной смеси с применением набора PCR ScreenMix-HS (5X) («Евтоген»). Амплификацию ДНК проводили в амплификаторе MyCycler™ («Bio-Rad»). Реакция протекала в следующих условиях: «горячий старт» - 3 мин/94°C, 35 циклов (денатурация - 30 с/94°C, отжиг праймера - 15с/36°C, 15с/45°C, синтез - 1 мин/72°C), дополнительный синтез - 5 мин/72°C, охлаждение до 4°C.

Продукт ПИР разделяли с помощью электрофореза в 2 % агарозном геле с использованием TAE буфера. Блоки окрашивали бромистым этидием. Визуализировали под ультрафиолетовым излучением на трансиллюминаторе TFX 20MC.

По картинам электрофореза составляли бинарные матрицы, где присутствие полосы обозначалось как «1» (аллель *p*), отсутствие «0» (аллель *q*). Ввиду того, что при методе *RAPD* могут появляться неспецифические продукты амплификации, для анализа мы использовали четко проследимые и воспроизводимые ампликоны.

Полученные данные были обработаны статистически с помощью программы MS Excel и GenAlEx [13].

Результаты и обсуждение

В район заповедного участка «Лес на Ворскле» кабан, возможно, мигрировал из Сумской области Украины, расселяясь по пойме реки Ворсклы. На территории прилегающей к заповеднику кабаны начали встречаться в конце 50-х годов, а в 1965-1967 годах здесь постоянно обитало несколько особей этих копытных [14]. В самом заповедном участке кабаны впервые после спада численности 1920-1930-х гг. появились в 1971 году. По данным Е.К. Тимофеевой [15, 16], количество кабанов в заповеднике с площадью 1000 га составляло в 1972-1982 годах от 20-30 летом до 80-150 особей зимой. По данным визуальных наблюдений С.А. Царева [17] численность вида в 1984-1987 гг. составляла от 93 до 127 особей. По данным

учета методом прогона в период с 1995 по 2012 год численность кабана в среднем составляет 146 особей (колебания от 6 до 474 особей) (рис. 1).

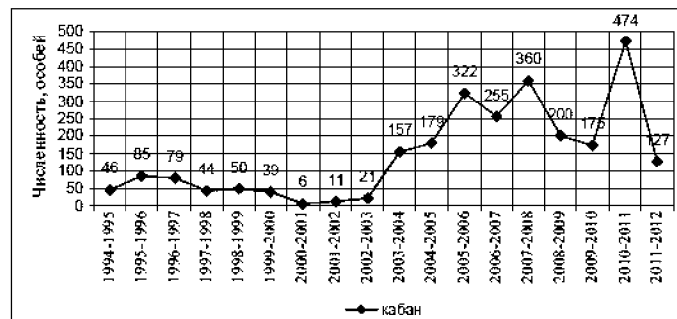


Рис. 1. Динамика численности кабана в нагорной дубраве заповедного участка «Лес на Ворскле»



На графике хорошо видно, что в период с 1995 по 2003 годы численность кабана колебалась в незначительных пределах, то есть оставалась довольно стабильной. С 2003 года наблюдался постепенный рост численности, который достиг максимума в 2008 году, после чего наблюдалось заметное падение численности вида. В зимний период 2009-2010 гг. высота снежного покрова в лесном массиве превышала 60 см, что вызвало отток животных с территории охотничьего участка в поймы рек Ворскла, Готня и Локня. Пик численности в 2010-2011 гг. вызван обильным урожаем дуба черешчатого, плоды которого служат излюбленным кормом кабанов. К 2012 г. опять наблюдался спад численности кабана, что может быть вызвано активным проведением биотехнических мероприятий на территориях охотхозяйств на сопредельных территориях.

По данным проекта лесоустройства [10] оптимальная плотность кабана на территории участка «Лес на Ворскле» не должна превышать 8-10 особей на 1000 га леса, без проведения биотехнических мероприятий [18]. Тем не менее, на протяжении последних 18 лет численность кабана значительно превышала допустимые нормы.

Также необходимо отметить, что зимний рост численности животных (период проведения учета) связан с миграциями животных на заповедную территорию, которые вызваны усилением фактора беспокойства, вызванного проведением охот на сопредельных территориях.

Степень освоения и использования территории заповедника кабаном определялась при проведении картирования постоянных структурных элементов участка обитания – чesалок и купалок. Нанесение на схему лежек животных не представляется возможным, так как большая их часть является временными, что весьма характерно для относительно теплого климата лесостепной зоны. Во время обходов территории при помощи GPS-приемника измерялись координаты обнаруженных деревьев-чesал и купалок.

По результатам картирования мы определили, что деревья-чesала и расположенные в непосредственной близости от них купалки находятся практически во всех кварталах заповедника, где имеются насаждения сосны обыкновенной. Кроме того, размещены чesалки приурочено либо к склонам оврагов, либо к пойменной части реки, где расположена большая часть купалок. 87 % отмеченных деревьев были расположены на магистральных тропах кабанов или в непосредственной близости от них. Только 13 % деревьев были расположены одиночно, либо не имели никакого отношения к проложенной сети троп [10]. Скорее всего, такие деревья служили своеобразными ольфакторно-оптическими метками [17]. Большая часть поврежденных кабаном деревьев приходится на долю сосны обыкновенной (83%). Среди деревьев лиственных пород наиболее часто в заповеднике кабаном использовались липа (7%) и клен (5%).

Другой важный элемент участка обитания кабана – это тропы, характеризующие перемещения животных, особенно в глубоководный период. На территории заповедника картирование троп проводилось в осенне-зимний период 2009-2010 года. Для фиксации положения троп осуществлялся их проход с записью трека GPS-приемником.

В осенний период нами отмечалась более густая сеть троп, которые в основном являлись второстепенными (рис. 1 - А). В зимний период число второстепенных троп значительно сокращалось (рис. 1 - В), что связано с климатическими условиями (высотой залегания снежного покрова, его плотности, колебаниями температуры). Магистральные тропы зимнего периода соединяли две части заповедника – сады с северной и северо-восточной стороны и пойму рек Ворскла, Готня и Локня с южной и западной.

Также нами отмечались и описывались лежки животных в разные сезоны года. Осенние лежки по своей структуре практически не отличались от зимних. Они представляют собой небольшое углубление в земле среди поваленных деревьев. Для организации таких лежек, по-видимому, значение имеет тип почвы. Из учтенных нами лежек 36% были расположены в 1 и 5 кварталах на сухих песчаных почвах, где встречаются насаждения сосны совместно с дубом.

В зимний период нами также отмечались лежки, выстланные сухой растительностью.

Для изучения сезонного размещения животных территорию заповедного участка условно разделили на три части: северную (примыкающую к садам), центральную и припойменную. Результаты картирования пороев и других следов жизнедеятельности на стационарных маршрутах с 2008 по 2011 гг. представлены на рисунке 2.

Размещение животных по территории заповедника определяется различными факторами. Так, в глубоководные и морозные зимы кабаны предпочитали держаться в поймах рек и прилегающих к заповеднику садах. Такое явление наблюдалось в 2009-2010 гг., когда в лесном массиве порою не регистрировались. Другим определяющим фактором служит кормовая база. При большом урожае желудей (например, в 2010-2011 гг.) наблюдалось увеличение численности и площади повреждений в лесном массиве. С другой стороны, при грамотном проведении биотехнических мероприятий в соседних охотничьих хозяйствах наблюдается закономерные перемещения животных (это явление как раз хорошо заметно в 2011-2012 гг.).



Проведенные исследования позволили установить некоторые закономерности в размещении дикого кабана по территории нагорной дубравы заповедного участка «Лес на Ворскле». Так, в осенний период пространственное размещение кабана в большей степени приурочено к северо-западной и центральной частям заповедника. Здесь же отмечено большее число визуальных встреч с животными. В зимний период, наоборот, звери концентрировались в поймах рек Ворсклы, Готни и Локни и на склоне нижней террасы.

В весенне-летний период наблюдалось более равномерное размещение животных. Это связано с тем, что в дубраве остаются в основном самки с приплодом текущего года, которые осваивают небольшие по площади территории участка обитания в непосредственной близости от места опороса.

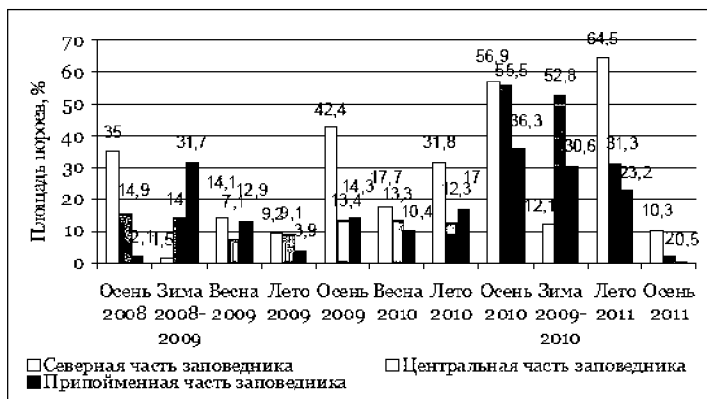


Рис. 2. Сезонная динамика роющей деятельности кабана в заповедном участке «Лес на Ворскле» по даны учета следов жизнедеятельности на стационарных маршрутах

Размещение животных на исследуемой территории в этот период также зависит от факторов внешней среды. Большое количество кровососущих насекомых в лесу заставляли животных перемещаться на открытые пространства или в водно-болотные угодья с высокостебельной растительностью.

Также нами была проведена оценка жизнеспособности популяции кабана заповедного участка «Лес на Ворскле» на основе генетических данных.

Анализируемая выборка по дикому кабану составила 35 особей. На электрофореграммах нами было диагностировано 13 полиморфных фрагментов ДНК. Электрофоретические спектры продуктов амплификации представлены на рисунке 3. Частоты аллелей и уровень гетерозиготности выделенных *RAPD*-локусов представлен в таблице 1 и на рисунке 4.

Согласно полученным данным, наиболее полиморфными оказались локусы с третьего по восьмой. В шестом локусе уровень ожидаемой гетерозиготности достиг 0,5. Более мономорфными были локусы 11, 12, 13 ($H_o=0,056$). Средняя гетерозиготность по всем 13 локусам составила $0,293 \pm 0,051$. Такой, относительно невысокий средний уровень гетерозиготности можно объяснить частыми сокращениями численности изучаемой популяции, что провоцирует так называемый эффект «бутылочного горлышка» [19], в результате чего в популяции размножается небольшое число особей, имеющих, вероятно, тесные родственные связи.

Для дальнейшего анализа жизнеспособности популяционной группировки кабана нами была рассчитана ее эффективная численность (N_e) по формуле [20]:

$$N_e = \frac{4NmN_f}{Nm + N_f},$$

где N_m – численность половозрелых самцов, N_f – численность половозрелых самок.

Расчеты показали, что эффективная численность кабана для района исследования составила 170 особей (при общей численности 283 особи). При этом, отношение N_e/N в исследуемой популяции кабана исследуемой территории было равным 0,60. Стоит отметить, что по данным Дж. Кроу и Н. Мортона (1955) соотношение N_e/N в популяции человека (как наиболее процветающего вида) находится в диапазоне 0,69–0,95. Полученное нами значение оказалось ниже обозначенного диапазона. Это свидетельствует о нестабильности популяционной группировки, что может быть обусловлено действием различных факторов, включая антропогенные.

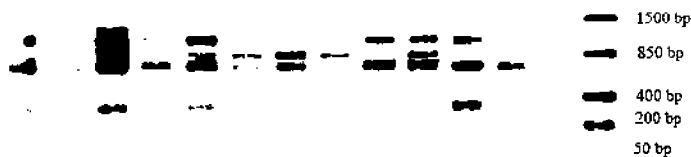


Рис. 3. Участок электрофоремы продуктов амплификации ДНК *Sus scrofa*, полученные методом RAPD-PCR при использовании праймера OPC-8

Частоты аллелей ДНК-локусов *Sus scrofa*

Таблица 1

| Локусы | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | Среднее |
|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| <i>p</i> | 0.189 | 0.189 | 0.622 | 0.522 | 0.345 | 0.493 | 0.324 | 0.303 | 0.090 | 0.044 | 0.029 | 0.029 | 0.029 | 0.247±0.057 |
| <i>q</i> | 0.811 | 0.811 | 0.378 | 0.478 | 0.655 | 0.507 | 0.676 | 0.697 | 0.910 | 0.956 | 0.971 | 0.971 | 0.971 | 0.753±0.057 |

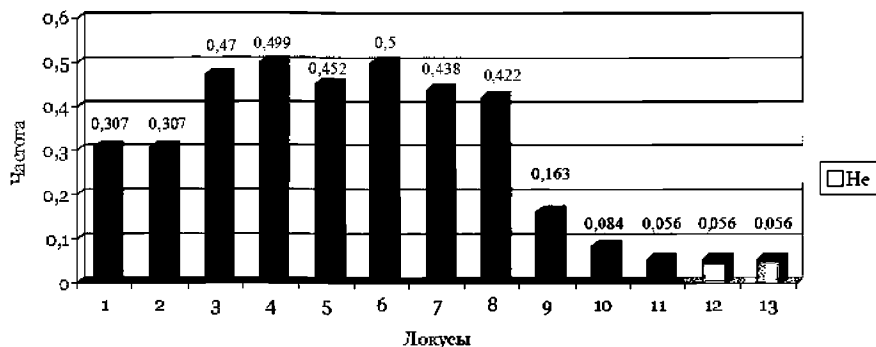


Рис. 4. Уровень гетерозиготности RAPD-локусов ДНК кабана

Дело в том, что отсутствие культуры охоты в нашей стране приводит к тому, что под выстрел попадают наиболее сильные особи репродуктивного возраста. Если в европейских странах в настоящее время ведется в основном селекционный отстрел, при котором из популяции выводятся наиболее слабые и старые животные, то в России, наоборот, проводят трофейные охоты. Когда ведется добыча кабана ради мяса (как лицензионная, так и браконьерская), объектами охоты часто становятся взрослые самки, как беременные, так и с приплодом текущего года. Оставшийся без матери молодежь часто погибает, либо нарушается выработка основных рефлексов, что приводит к изменениям в поведении.

Другой фактор, влияющий на состояние популяции кабана – это биотехнические мероприятия, которые зачастую проводятся без учета специфики ландшафтов. Кроме того, подкормка кабана в охотхозяйствах в течение всего года приводит к изменениям в поведении животных, которые становятся оседлыми, нарушаются естественные процессы размножения (могут приносить потомство до 2-х раз в год и в любой сезон года).

В заключении нами был составлен прогноз длительности существования популяции кабана на исследуемой территории с учетом эффективной численности (N_e). Расчет времени существования изучаемых популяций проводился с использованием формулы [21]:

$$t = 1,5N_e,$$

где t – количество поколений.



Процесс убыли гетерозиготности за t поколений рассчитывался по формуле [22]:

$$H_t = \left(1 - \frac{1}{2N_e}\right)^t H_0,$$

где H_0 – уровень гетерозиготности в начальной точке.

Учитывая, что продолжительность жизни одного поколения дикого кабана составляет в среднем десять лет [23], был проведен расчет общей продолжительности жизни изучаемых популяций в годах. Данные расчетов приводятся в таблице 2, согласно которым изучаемая группировка кабана на данной территории может просуществовать более 2,5 тыс. лет.

Таблица 2

**Прогноз времени существования популяционной группировки кабана
заповедного участка «Лес на Ворскле» (среднее за 3 года)**

| Общая численность кабана | Эффективная численность для исследуемого участка N_e | Время существования в поколениях, t | Время существования в годах | Уровень гетерозиготности в конце срока существования |
|-----------------------------|---|--|-----------------------------|--|
| 283 | 170 | 255 | 2550 | 0.140 |

Однако, представленный нами прогноз осуществим только при естественном существовании популяции. Учитывая тот факт, что изучаемая популяция кабана находится в уязвимом положении из-за постоянного антропогенного воздействия, время ее существования может быть значительно сокращено.

Список литературы

1. Тихонов В.Н., Никитин С.В., Травушкин В. А. Генетические особенности европейского, среднеазиатского и дальневосточного кабанов при гибридизации с домашней свиньей // Популяционная изменчивость вида и проблемы охраны генофонда млекопитающих. – М., 1983. – С. 193–195.
2. Горелов И.Г. Незаменимый объект исследований. // Наука в Сибири. – 1993. – №4. – С. 6–7.
3. Горышнина Т.К., Тимофеева Е. К. Заповедник «Лес на Ворскле» // Заповедники СССР. Заповедники Европейской части РСФСР. – М.: Мысль, 1989. – С. 13–151.
4. Ларин С.А. Учет численности охотничье-промысловых животных. – М. Издательство технической и экономической литературы по вопросам заготовок, 1954. – 96 с.
5. Насимович А.А. Основные направления в разработке методов количественного учета диких копытных // Ресурсы фауны промысловых зверей в СССР и их учет. – М.: Изд-во Академии наук СССР, 1963. – С. 64–84.
6. Червоный В. В. Учет охотничьих зверей прогоном // Методы учета охотничьих животных в лесной зоне. Труды Окского государственного заповедника. – М., 1973. – Вып.9. – С. 29–35.
7. Сорокина Л. Учет копытных // Охота и охотничье хозяйство. – 1977. – Вып.12. – С. 15–18.
8. Хижняк А. А. Природные ресурсы земли белгородской. – Воронеж.: Центрально-Черноземное издательство, 1975. – 126 с.
9. Шекало М. В., Украинский П. А. Применение GPS-технологий и ГИС для изучения экологии кабана в нагорных дубравах лесостепной зоны // Актуальные проблемы охраны природы, окружающей природной среды и рационального природопользования: Сборник материалов I Международной научно-практической конференции (17–18 июня 2010 года, Чебоксары). – Чебоксары: типография «Новое время», 2010. – с. 23–26.
10. Проект организации и ведения лесного хозяйства учебно-опытного лесхоза «Лес на Ворскле» Ленинградского Государственного Ордена Ленина университета им. А. А. Жданова. Том 1: Объяснительная записка. – Ленинград, 1985. – 255 с.
11. Новиков Г. А. Полевые исследования по экологии наземных позвоночных. – Москва: Государственное издательство «Советская наука», 1953. – 230 с.
12. Дьякова С. А., Дьяков Ю. В. Методы изучения интенсивности роющей деятельности кабанов в Воронежском заповеднике в различные сезоны года // Экология, морфология, использование и охрана диких копытных. – М., 1989. – Ч.2. – С. 204–205.
13. Peakall R., Smouse P.E., GenAlEx V5: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Australian National University, Canberra, Australia. – 2001. <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>.
14. Петров О. В. Млекопитающие учлесхоза «Лес на Ворскле» и его окрестностей // Ученые записки ЛГУ. – 1971. – №351 – Сер. Биол. наук. Вып. 52. – С. 182–183.
15. Тимофеева Е. К. Влияние кабана на растительность лесостепных дубрав // Копытные фауны СССР (экология, морфология, использование и охрана). – М., 1980. – С. 207–208.
16. Тимофеева Е. К. Роль кабана в биоценозе лесных дубрав // III съезд Всесоюзного териологического общества. – М., 1982. – Т.1. – С. 307.



17. Царев С. А. Кабан. Социальное и территориальное поведение // Охотничьи животные России (биология, охрана, реуросоветение, рациональное использование). – Вып. 3. – М.: Центрохотконтроль, 2000. – 144 с.
18. Простаков Н. И. Копытные животные Центрального Черноземья. – Воронеж, 1996. – 375 с.
19. Майр Э. Зоологический вид и эволюция. – М.: Мир, 1968. – 398 с.
20. Wright S. Coefficient of inbreeding and relationship // Amer. Natur. – 1922. – Vol. 56. – P. 330-338.
21. Soule M. E. What is conservation biology? // Bioscience. – 1985. – № 35. P. 727-734.
22. Crow J. F., Kimura M., An introduction to population genetics theory. – N.Y.: Harpers and Row, 1970. – 591 p.
23. Данилкин А. А. Млекопитающие России и сопредельных регионов. Свиньи. – М.: ГЕОС, 2002. – 309 с.

EKOLOGY-GENETIG ANALYSIS OF POPULATION OF THE WILD BOAR (*SUS SCROFA L.*) IN THE RESERVED FIELD "LES NA VORSKLE"

**E.A. Snegin¹, M.V. Shchekalo²,
A.A. Gorbacheva¹**

¹Belgorod State National Research University, Pobedy St., 85, Belgorod, 308015, Russia

²State Reserve "Belogorje", Monastirsky Side Street, 3, Setil. Borisovka, Belgorod Reg., 309340, Russia

E-mail: snegin @ bsu. edu. ru

In work the preliminary analysis of viability of population of a wild boar (*Sus scrofa L.*) of reserved field "Les na Vorskle". In work the data of winter accounts of number of animals was considered, ability to live traces on stationary routes were registered. The gene-fund analysis was carried out by means of method *RAPD-PCR*. On the basis of the received data it is possible to ascertain that the investigated population of a wild boar of reserve "Les na Vorskle" is in a vulnerable condition and its further existence will be defined in many respects by degree of influence of the anthropogenic factor.

Key words: population, a wild boar, *RAPD-PCR*.