

Odhad velikosti populace medvěda hnědého (*Ursus arctos*) na Slovensku analýzou DNA

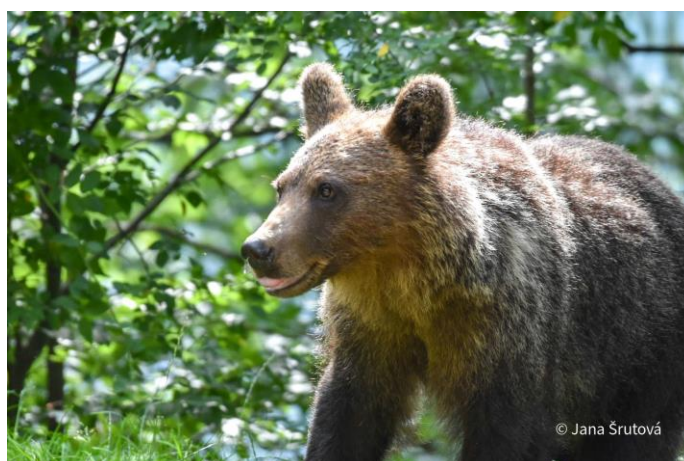
Nikola Tkáčová¹, Jana Šrutová¹, Barbora Černá Bolfíková², Veronika Kornová³, Mária Apfelová⁴, Michal Kalaš⁴, Vladimír Antal⁴, Slavomír Find'o⁴, Marián Hletko⁴, Pavel Hulva^{1,3}

¹Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika

²Katedra chovu zvířat a potravinářství v tropech, Fakulta tropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita, Praha, Česká republika

³Katedra biologie a ekologie, Přírodovědecká fakulta, Ostravská univerzita, Ostrava, Česká republika

⁴Štátná ochrana prírody, Banská Bystrica, Slovensko



Závěrečná zpráva k projektu: Zisťovanie počtosti veľkých šeliem a zisťovanie stupňa hybridizácie vlka dravého na základe analýz DNA. Referenční číslo: ŠOP SR/1159/2017.

Štúdiá vznikla v rámci projektu „Realizácia programov starostlivosti o veľké šelmy na Slovensku“, ktorý je spolufinancovaný prostredníctvom Kohézneho fondu EÚ v rámci Operačného programu Kvalita životného prostredia, ITMS kód projektu: 310011L489.



PŘÍRODOVĚDECKÁ
FAKULTA
Univerzita Karlova



Fakulta tropického
zemědělství



OSTRAVSKÁ UNIVERZITA
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



MINISTERSTVO
ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY



OPERAČNÝ PROGRAM
KVALITA ŽIVOTNÉHO PROSTREDIA



Európska únia
Kohézny fond



ŠTÁTNA
OCHRANA PRÍRODY
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

Obsah

Obsah	2
Abstrakt	4
Úvod	7
Genetický monitoring a odhady velikosti populace	7
Efektivní velikost populace a minimální životaschopná velikost populace	11
Fylogeografie medvěda hnědého v Evropě	12
Cíle studie	13
Materiál a metodika	14
Vzorkování	15
Metodika laboratorní práce	16
Analýza genetických markerů	19
Identifikace jedinců	19
Analýza příbuzenských vztahů	21
Populační genetika	21
Genetická diverzita populace	22
Demografie	22
Velikost populace	22
Východní Karpaty	22
Odhady početnosti na základě CMR modelů	22
Západní Karpaty	22
Charakteristika období a uzavřenost populace	22
Odhad velikosti populace	23
Testování správnosti odhadů velikosti populace pomocí simulací	25
Efektivní velikost populace	25
Analýza životaschopnosti populace	26
Změna velikosti populace	26
Porovnání distribuce vzorků	27
Populační hustota	27
Výsledky	29
Vzorkování	29
Analýza genetických markerů	31
Identifikace jedinců	32
Analýza příbuzenských vztahů	35
Populační genetika	35
Genetická diverzita populace	41
Demografie	43
Velikost populace	43
Východní Karpaty	43
Odhady početnosti na základě CMR modelů	43
Západní Karpaty	43

Charakteristika období a uzavřenost populace	43
Odhad velikosti populace	44
Testování správnosti odhadů velikosti populace pomocí simulací	52
Efektivní velikost populace	53
Analýza životaschopnosti populace	55
Změna velikosti populace	57
Porovnání distribuce vzorků	57
Populační hustota	59
Diskuze	61
Analýza genetických markerů	61
Identifikace jedinců	62
Analýza příbuzenských vztahů	63
Populační genetika	63
Genetická diverzita populace	64
Demografie	66
Velikost populace	66
Východní Karpaty	66
Odhady početnosti na základě CMR modelů	66
Západní Karpaty	66
Charakteristika období a uzavřenost populace	66
Odhad velikosti populace	68
Testování správnosti odhadů pomocí simulací	71
Efektivní velikost populace a minimální životaschopná populace	71
Analýza životaschopnosti populace	72
Změna velikosti populace	73
Lokální změny v distribuci druhu	74
Populační hustota	76
Změny chování medvědů, human wildlife conflict	76
Poděkování	77
Podíl autorů	77
Seznam literatury	78

Abstrakt

Recentně dochází v ekologii ke změně paradigmatu, která zohledňuje roli velkých savců jako klíčových druhů pro fungování ekosystémů. Z tohoto trendu vychází i pozornost věnovaná statusu západokarpatské populace medvěda hnědého a tato studie, založená především na přístupech neinvazivní genetiky. Během let 2019–2021 bylo získáno celkem 2172 vzorků. Jednalo se zejména o neinvazivní vzorky, především o vzorky trusu, které byly doplněny dalšími typy vzorků. Následně byla izolována DNA a amplifikováno 12 mikrosatelitových lokusů a lokus pro gen SRY jako pohlavní marker. Shodně se studií Paule 2015 bylo pro analýzy použito 8 mikrosatelitových lokusů. Filtrování kvality dat proběhlo s nastavením $PIsib=0.001$ a k minimalizaci výskytu statistických chyb typu I a typu II při určování identit byl použit R balíček ALLELEMATCH. Bylo získáno 1036 genotypů, z toho 632 unikátních. U samců byla pozorována vyšší míra opětovných záchytů.

i) Prvním cílem studie bylo odhadnutí cenzní velikosti populace medvěda hnědého na Slovensku, které zahrnuje většinu západokarpatské populace. K tomu byly využity metody zpětného odchyty (Capture Mark Recapture, CMR). Design analýz byl v základních parametrech nastaven dle studie početnosti z let 2013–2014, aby bylo možné stanovit trendy změn velikosti populace. Byly použity program CAPWIRE, který je vhodný pro kontinuální vzorkování, a Hugginsovy modely pro uzavřenou populaci v programu MARK, na základě kterých bylo možné zohlednit odlišné aspekty heterogenity ve výskytu zpětných záchytů. Data ze Západních Karpat byla rozdělena do dvou sezón. Na základě statistických testů byla populace hodnocena jako uzavřená. Na základě dat z lépe navzorkované sezony byl stanoven odhad velikosti populace s 95% konfidenčním intervalem pomocí CAPWIRE na 1056 (1012–1275) jedinců, pomocí MARK na 1074 (787–1565) jedinců a pomocí SECR na 871 (798–958) jedinců. Tyto odhady jsou očištěny o natalitu, dokumentovaná antropogenní mortalita v tomto období tvořila přibližně 35 jedinců. Správnost odhadů byla testována pomocí simulačních procedur. Simulace naznačují, že pozorovaná data odpovídají velikosti populace okolo 1000 jedinců, při simulovaném výběru z hypotetické větší populace dospívají použité modely k vyšším odhadům, než byly získány z empirických dat. Správnost odhadu konverguje k reálné hodnotě již při počtu vzorků odpovídajících ca. 25% reálné velikosti populace. Pro počty vzorků odpovídající 25–100% reálné velikosti populace jsou odhady dokonce mírně nadhodnocené, což je potřeba vztáhnout i na výsledky této studie.

Důležitým cílem byla interpretace získaných výsledků v kontextu učebnicových paradigmat evoluční a ochránářské genetiky, které se týkají souvislosti velikosti populace a její životaschopnosti. Za tímto účelem byla odhadnuta efektivní velikost populace, která je důležitějším parametrem než cenzní velikost populace z hlediska životaschopnosti populace. Pro určení efektivní velikosti populace byly využity výsledky Bayesiánské klastrovací analýzy, na jejímž základě byla zkoumaná populace rozdělena do čtyř genetických klastrů, mezi nimiž pravděpodobně existuje určitá míra genového toku. Byla použita metoda vazebné nerovnováhy v softwaru LDNE, která dospěla ke kumulativní hodnotě 266 (189–421) jedinců. Nižší hodnota oproti modelované cenzní velikosti populace souvisí pravděpodobně zejména s nízkými populačními stavy během minulých staletí. Je pravděpodobné, že tato hodnota nepřesahuje běžně uváděné odhady minimální životaschopné velikosti populace, to znamená, že je důležité

se vážně zabývat rizikem inbreedingu, ztráty genetické variability vlivem genetického driftu a genetické eroze. Analýza životaschopnosti populace provedená v programu VORTEX naznačuje, že některé scénáře budoucího vývoje populace při realistickém nastavení hodnot populačních parametrů mohou zahrnovat i její zmenšování, i zde je proto aktuální téma potenciálního extinkčního dluhu.

ii) Stanovení trendů změn velikosti populace nebylo přímým cílem studie. K takovým odhadům bude potřeba srovnání s výsledky předchozí studie provedené podobnou metodou, které zatím není možné kvůli odlišnostem v metodice. Datasetsy obou prací jsou nicméně homologické co se týče použitých markerů a analogické co se týče základního nastavení metod (vymezení sezón, statistický přístup CMR modelování). Nastavení některých parametrů bylo ale na základě statistických power analýz zvoleno odlišně. Hlavní rozdíl spočívá v počtu tolerovaných mismatchů, který je u novější studie 2 (na základě analýz v software ALLELEMATCH), u starší studie 1, což mohlo vést k nadhodnocení počtu jedinců ve starší oproti novější studii. Odhad v programu CAPWIRE pro starší studii dospěl k číslu 1214 (konfidenční interval nebylo možno stanovit), oproti 1056 (1012–1275) v novější studii. Ani tak tedy získaná data neukazují významný nárůst velikosti studované populace ve zkoumaném období. Testované hypotézy o rychlosti změn populační velikosti je navíc potřeba konfrontovat i s empirickými hodnotami rychlosti změny velikosti populace u savců, která se většinou pohybuje v hodnotách jednotlivých procent za rok.

iii) Stanovení potenciálního přemnožení nebylo předmětem této studie. Tento fenomén závisí zejména na populační hustotě a vyžaduje analýzu nosné kapacity prostředí. Populační hustota stanovená na základě odhadů velikosti populace je srovnatelná s již publikovanými odhady získanými monitoringem na základě genetiky i přímého pozorování a pobytových stop. Analýza vztahu populace medvěda hnědého k nosné kapacitě prostředí bude vyžadovat ekologický přístup a modelování trofické niky.

iv) Human-wildlife konflikt nebyl předmětem této studie. Takové téma vyžaduje analýzu prostorové i behaviorální ekologie medvěda, jakož i zohlednění zvyků lidské populace. Po integraci genetických a prostorově ekologických dat z telemetrie můžou data získaná v této studii přispět k této otázce pomocí výsledků v rámci přístupů krajinné genetiky.

v) Stanovení populační struktury a případných překážek genového toku mezi jednotlivými subpopulacemi bylo jedním z předmětů této studie. Analýza populační struktury je důležitým nástrojem v managementu a ochraně volně žijících populací. V dnešní lidmi pozměněné krajině jsou populace častěji vystaveny ostrovním efektům, což v konečném důsledku může vést až ke vzniku extinkčního víru. Především malé a izolované populace jsou náchylnější ke ztrátě genetické variability, proto by se mělo dbát na udržení a obnovení genového toku mezi subpopulacemi. Analýzy byly provedeny pomocí neprostorové bayesiánské klastrovačí analýzy v programu STRUCTURE, ta slovenskou populaci rozdělila do čtyř, respektive pěti klastrů podle zvolené metody. Dále bylo využito prostorových bayesiánských přístupů v programu GENELAND, analýza v tomto programu rozdělila populaci do čtyř klastrů. Na základě těchto analýz byly stanoveny hlavní přirozené a antropogenní překážky genového toku.

Provedené analýzy naznačují, že z pohledu evoluční genetiky je západokarpatská populace medvěda hnědého malá, to znamená její budoucí vývoj mohou výrazně ovlivnit stochastické faktory. To je poměrně podstatné, neboť západokarpatská populace představuje fylogeografickou linii odštěpenou od kontinentální linie 3a, která se liší od linie 1b ve východních karpatech a zbytku karpatského oblouku a je tedy unikátní populací.

Úvod

Genetický monitoring a odhady velikosti populace

Pro efektivní ochranu nejen velkých šelem je nutné brát v potaz ekologii daného druhu, ale také jeho populační strukturu a trendy v početnosti. Ochrana a management velkých šelem zahrnuje mnoho aspektů, mezi které patří politické, socioekonomické a ochranářské zájmy. Proto je důležité mít k dispozici věrohodné odhady velikosti populace (Creel et al., 2015; Darimont et al., 2018; Lopéz-Bao et al., 2020; Skrbínšek et al., 2019). Spolehlivé odhady velikosti populace jsou nezbytné pro zvýšení důvěryhodnosti monitorování velkých šelem i pro řádné posouzení stavu ochrany druhu (Lopéz-Bao et al., 2020).

Genetický monitoring spojený s neinvazivním sběrem vzorků se stal často používanou a rychle se rozvíjející oblastí genetiky. Umožňuje získávat informace o jedincích, aniž by došlo k jejich rušení (Beja-Pereira et al., 2009). Medvěd hnědý (*Ursus arctos* Linnaeus, 1758) je jedním z průkopnických modelů pro neinvazivní genetiku (Höss et al., 1992; Taberlet & Bouvet 1992). Tento přístup umožňuje analyzovat populačně-genetické parametry včetně genetické diverzity a jejich trendů, izolovanost populací a případný genový tok, strukturu a efektivní velikost populace. Také je používán ke sledování demografických parametrů včetně odhadu velikosti populace (Bellemain et al., 2005; De Barba et al., 2010; Kendall et al., 2009; Schwartz et al., 2007; Skrbínšek et al., 2021; Straka et al., 2012; Swenson et al., 2011; Taberlet et al., 1997; Tallmon et al., 2004).

Odhady velikosti populace na základě genetických dat jsou díky rozvoji molekulárních nástrojů i statistických metod stále používanějším přístupem (Luikart et al., 2010). Pro odhady velikosti populace je neinvazivní genetický monitoring často spojen s capture-mark-recapture přístupy (metoda zpětného odchyty, CMR). Základním konceptem CMR přístupu je odchycení části populace, její označení, vypuštění zpět do populace a poté další odchycení části populace. Následně dochází ke kvantifikaci počtu označených jedinců. Odhady velikosti populace jsou v nejjednodušších modelech určovány na základě poměru neoznačených a označených jedinců v jednotlivých záchytech. Předpokladem je, že označení i neoznačení jedinci mají stejnou pravděpodobnost na zachycení (Seber, 1986). V klasických capture-mark-recapture studiích dochází k fyzickému označení zachycených jedinců. Je však náročné a někdy až nemožné takto zachytit dostatečný počet jedinců pro spolehlivé odhady velikosti populace.

Spojení CMR přístupu a neinvazivního genetického monitoringu se stalo běžně využívanou metodou v ochranářské genetice a demografii (Gervasi et al., 2010; Kendall et al., 2019; Latham et al., 2012; Vanpé et al., 2021; Woods et al., 1999). Při tomto přístupu dochází k získávání přesných záznamů o výskytu jedinců, aniž by byli vystavováni manipulaci a stresu a lze získat větší množství dat než při klasickém CMR přístupu. Principem tohoto přístupu je genotypování neinvazivně získaných vzorků např. trusu nebo srsti. Shodné genotypy jsou považovány za vzorky od stejného jedince a jsou stanoveny jako opětovné záchyty, oproti tomu neshodné genotypy jsou považovány za nově odchycené jedince. Na základě toho je vytvořena historie záchyty, která je použita pro následné analýzy (Lukacs & Burnham, 2005).

Důležitým faktorem je úspěšnost genotypizace, která ovlivňuje výsledný počet vzorků, které jsou zahrnuty do dalších analýz a také genotypizační chyby. I přesto, že se postupem času zvýšila úspěšnost laboratorního zpracování vzorků a došlo ke snížení výskytu genotypizačních chyb, stále je individuální identifikace zatížena statistickou chybou (Boulanger et al., 2002). Genotypizační chyby mohou být způsobeny více faktory, mezi které patří např. použití genetických markerů, které se vyznačují malou variabilitou (Waits et al., 2001; Woods et al., 1999). Na základě těchto chyb může docházet k nesprávné identifikaci jedinců a následnému zkreslenému odhadu velikosti populace (Creel et al., 2003). I přes značné laboratorní a analytické nároky je tento přístup široce využíván (Bellemain et al., 2005; Davoli et al., 2013; Gray et al., 2014; Karamanlidis et al., 2012; Robinson et al., 2007).

Vůbec poprvé bylo využito spojení capture-mark-recapture přístupu a neinvazivního genetického monitoringu právě u medvěda hnědého, kdy byla pro odhady početnosti použita DNA, která byla extrahována ze srsti získané z chlupových pastí (Woods et al., 1999). Metody odhadů velikosti populace se postupně vyvíjely až k velmi komplexním modelům, které pro výpočty integrují informace o řadě populačních parametrů, např. věku, pohlaví, reprodukčním stavu jedinců ve studované populaci aj., v těchto případech jsou však zakomponovaná data i od uhynulých jedinců (Bellemain et al., 2005; Carroll et al., 2013; Skrbínšek et al., 2017; Tumendemberel et al., 2021). Pro odhady velikosti populace mohou být použity one session nebo multi-session přístupy. One session přístup využívá kontinuální vzorkování, kdy mohou být jedinci zachyceni víckrát během jedné záchyťové události. Multi-session přístup využívá vícenásobné diskrétní záchyťové události, kdy v každé může být jedinec zachycen pouze jednou.

U vzorků získaných pomocí neinvazivního monitoringu může docházet k tomu, že jedinci mohou být zachyceni víckrát v rámci jedné vzorkovací události nebo, že existuje pouze jedna vzorkovací událost. Pro tento typ dat byla vyvinuta metoda CAPWIRE (Miller et al., 2005). Principem této metody je, že u jedinců zachycených vícekrát v rámci vzorkovací události, jsou všechny záchyty nad rámec prvního považovány za opětovný záchyt.

Metoda je konzistentní pokud jsou data záchyťů heterogenní, tedy pokud je počet záchyťů u jedinců rozdílný. Pokud jsou data záchyťů homogenní a populace je výrazně vyšší než 100, tak mohou být stanovené výsledky méně spolehlivé (Miller et al., 2005). Tato metoda funguje na principu analogického losování z osudí, kdy jsou zkoumány dvě pravděpodobnosti zachycení jedinců, homogenní a heterogenní. U homogenní pravděpodobnosti záchyťu je předpoklad, že každý jedinec bude zachycen při každém losování se stejnou pravděpodobností. U heterogenní pravděpodobnosti je předpoklad, že při každém losování je pravděpodobnost zachycení u jedinců rozdílná. U této metody je také předpokládáno, že se jedinci v populaci náhodně mísí v prostoru. To znamená, že neinvazivní vzorky, které se najdou blíže u sebe nejsou s větší pravděpodobností od stejného jedince než vzorky, které jsou od sebe více vzdálené (Miller et al., 2005).

Tento předpoklad u medvěda hnědého není většinou splněn. Příslušníci tohoto druhu jsou považováni za soliterní a nepříliš teritoriální šelmy (Bellemain et al., 2006; Clark et al., 2013; Egbert et al., 1976). Výjimku ze soliterního způsobu života představují samice s mláďaty a sourozenci z vrhu, kteří spolu určitou dobu žijí a sdílí společný prostor (Dahle & Swenson, 2003a; Stonorov & Stokes, 1972). Sociální interakce mezi samci a samicemi jsou omezeny pouze na období rozmnožování (Clark et al., 2013; Steyaert et al., 2012). Vzhledem k tomu, že jsou medvědi nepříliš teritoriální, dochází u nich k překryvu domovských okrsků. Domovské okrsky se mohou překrývat mezi jedinci stejného, ale i opačného pohlaví (Dahle & Swenson, 2003c; Frank et al., 2017; Preatoni et al., 2005). Větší rozsah překryvu domovských okrsků byl zjištěn v oblastech s vyšší sezonalitou a s ní spojenou sezónní dostupností potravy (McLoughlin et al., 2000; Seryodkin et al., 2017) a také u příbuzných samic (Olejarz et al., 2022; Støen et al., 2005), ale nikdy nedochází k náhodnému mísení jedinců v populaci. Bylo však zjištěno, že prostorová segregace jedinců nemá na výsledné odhady velikosti populace pomocí CAPWIRE metody vliv (Miller et al., 2005).

Tato metoda, která byla navržena pro neinvazivní vzorkování se stala široce využívanou (Davoli et al., 2013; Ebert et al., 2021; Gray et al., 2014; Pérez et al., 2006; Puechmaille et al., 2007; Stenglein et al., 2010b; Zhan et al., 2006) a je často používána i pro odhady velikosti populace medvěda hnědého. Využívá se u méně početných populací medvěda hnědého, jako je například Apeninská, Alpská populace či populace nacházející se v centrální části pohoří Pindos (De Barba et al., 2010; Skrbínšek et al., 2019; Karamanlidis et al., 2012; Tosoni et al., 2017). I přesto, že byla tato metoda vyvinuta pro malé populace (Miller et al., 2005), je využívána i pro odhady početnosti medvěda hnědého u větších populací, například pro populaci medvěda hnědého na území Slovinska, Bulharska, Slovenska nebo pro Kantabrijskou populaci (Frosch et al., 2014; Mendéz et al., 2014; Paule, 2015; Skrbínšek et al., 2019). Důvodem je pravděpodobně efektivnější využití získaných dat, díky minimalizaci jejich ztráty. Neinvazivní sběr vzorků často probíhá kontinuálně (Karamanlidis et al., 2012; Skrbínšek et al., 2019) a při použití této metody mohou být použity všechny záchyty jedinců (Miller et al., 2005).

Odhady velikosti populace bývají prováděny pomocí více přístupů současně. Často dochází ke stanovení početnosti pomocí CAPWIRE, který představuje one session přístup v kombinaci s využitím modelů z programu MARK (White & Burnham, 1999), který naopak představuje multi-session přístup (Davidson et al., 2014; Dou et al., 2016; Draper et al., 2017; Lonsiger et al., 2019; Robinson et al., 2007; Robinson et al., 2009). Se spojením těchto dvou přístupů se můžeme setkat i při stanovení velikosti populace medvěda hnědého (Skrbínšek et al., 2017; Skrbínšek et al., 2019). Program MARK představuje jeden z nejběžněji používaných programů pro odhad velikosti populace v rámci multi-session přístupu (Luikart et al., 2010). U multi-session přístupu dochází k úpravě nezpracovaných dat pomocí pravděpodobnosti záchytu. Pravděpodobnost záchytu se může lišit podle pohlaví, věku, času atd. Pro přesné odhady velikosti populace je důležitá vysoká pravděpodobnost záchytů, a proto je nutná dostatečná velikost vzorku (Luikart et al., 2010). Pro odhady velikosti populace disponuje MARK více než 100 modely, které se liší ve výchozích parametrech (White et al., 2006).

Modely lze na základě předpokladu uzavřenosti populace rozdělit na otevřené a uzavřené modely. Otevřené modely umožňují změnu ve velikosti populace během sledovaného období.

Obvykle vyžadují větší velikost vzorku, vzhledem k většímu množství parametrů, které používají, a delší dobu studia oproti uzavřeným modelům. Často se používají pro získávání informací o míře přežití jedinců a změně velikosti populace (Kendall et al., 2019; Otis et al., 1987). Uzavřené modely jsou široce využívaným přístupem pro odhady velikosti populace (Creel et al., 2003; Gervasi et al., 2012; Skrbínsek et al., 2019; Solberg et al., 2006). Definujícím předpokladem uzavřených modelů je demografická a geografická uzavřenost populace. Během sledovaného časového období tedy nedochází k natalitě, mortalitě, imigraci nebo emigraci jedinců a velikost populace je konstantní. Dalším definujícím předpokladem těchto modelů je konstantní a stejnoměrná pravděpodobnost záchytu u všech jedinců ve zkoumané populaci. Výhodou uzavřených modelů je schopnost modelovat variace v pravděpodobnosti zachycení a tím do určité míry uvolnit tyto předpoklady (Luikart et al., 2010; Otis et al., 1987).

Předpoklad uzavřenosti populace i předpoklad konstantní a stejnoměrné pravděpodobnosti záchytu u všech jedinců představují ideální situaci, která není v přirozené populaci nikdy zcela platná (Carothers, 1971, Otis et al., 1987). Předpoklady mohou být do jisté míry porušeny, například náhodnou dočasnou emigrací nebo přirozenou mortalitou, aniž by došlo ke zkreslení výsledků (Kendall et al., 1999, Seber et al., 1986). Výsledná kvalita odhadů početnosti závisí na odchylce od těchto předpokladů (Otis et al., 1987). Tyto modely mohou být používány nezávisle na velikosti populace a představují jeden z nejběžněji používaných přístupů pro stanovení velikosti populací u medvěda hnědého (Bellemain et al., 2005; Ciucci et al., 2015; Gervasi et al., 2008; Gervasi et al., 2012; Kindberg et al., 2011; Morton et al., 2016; Skrbínsek et al., 2019; Solberg et al., 2006; Tumendemberel et al., 2015; Wirsing et al., 2018).

Data pro analýzy musí být rozdělena do jednotlivých diskrétních intervalů (Cooch, 2008). Z tohoto důvodu jsou často vzorky sbírány na základě systematického monitoringu, např. pomocí chlupových pastí. U tohoto typu vzorkování dochází ke sběru vzorků v určitých, předem stanovených časových intervalech, kde je každý interval považován za jednu záchytovou událost (Gervasi et al., 2008; Gervasi et al., 2010; Kendall et al., 2009; Morton et al., 2016). Pro odhady velikosti populace mohou být použita i data z kontinuálního vzorkování. V takovém případě dojde k rozdělení souboru dat, který byl získán během vzorkování do jednotlivých diskrétních intervalů. Jedinec může být v daném intervalu zachycen pouze jednou, vícenásobné záchyty v jednom intervalu nejsou použity (Bellemain et al., 2005; Skrbínsek et al., 2019).

Efektivní velikost populace a minimální životaschopná velikost populace

Zatímco počet jedinců dané populace (cenzní velikost populace) je důležitá v případě velkých šelem zejména v souvislosti s human-wildlife konfliktem, tento parametr má omezenou vypovídací hodnotu, co se týče životaschopnosti populace. V této souvislosti se používá termín efektivní velikost populace (effective population size, N_e), což je velikost idealizované populace, která by vedla ke stejné míře příbuzenského křížení nebo genetickému driftu jako v dané reálné populaci (Caballero, 1994). Zatímco cenzní velikost populace

představuje celkový počet jedinců v populaci, efektivní velikost populace představuje odhad počtu jedinců, kteří přispívají potomky do další generace (Charlesworth, 2009). V populacích které jsou předmětem ochrany přírody obvykle docházelo kvůli malé efektivní velikosti k příbuzenskému křížení a genetickému driftu. Tyto evoluční procesy mohou vést ke snížení genetické variability.

Efektivní velikost populace je ovlivněna mnoha faktory, například změnami ve velikosti populace, odlišným počtem potomků mezi jedinci nebo rozdílným poměrem pohlaví. Extrapolace cenzní velikosti populace na efektivní velikost populace je pro většinu populací obtížná (Frankham et al., 2014). Stanovení efektivní velikosti populace je nicméně stále používanějším přístupem a často doplňuje tradiční demografické odhady (Luikart et al., 2010). Odhady efektivní velikosti populace často odkazují na odlišné časové rámce a různá prostorová měřítka, a proto může být obtížné je porovnávat (Schwartz et al., 1998). Odhady pro časový rámec zahrnující několik generací jsou nejspolehlivější (Luikart et al., 2010).

Čím menší je efektivní velikost populace, tím větší může být ztráta genetické diverzity, protože frekvence alel jsou náchylnější ke změnám kvůli genetickému driftu (Wright, 1931). Ztráta genetické diverzity se zrychluje s klesající velikostí populace a je obzvláště velká u velmi malých populací. Některé definice tohoto pojmu používají popis pomocí genetické velikosti populace, která je nepřímo úměrná rychlosti genetické eroze, ztrátě genetické variace a ztrátě adaptačního potenciálu (Hoban et al., 2020). N_e je teoretický koncept s důležitou praktickou hodnotou, který má dobře stanovené prahy pokud jde o genetickou erozi. Při efektivní velikosti nižší než 500 (Jamieson & Allendorf, 2012) bude mít populace sníženou schopnost přizpůsobit se změnám prostředí (někteří stanovují práh N_e na 1000; Frankham et al., 2014).

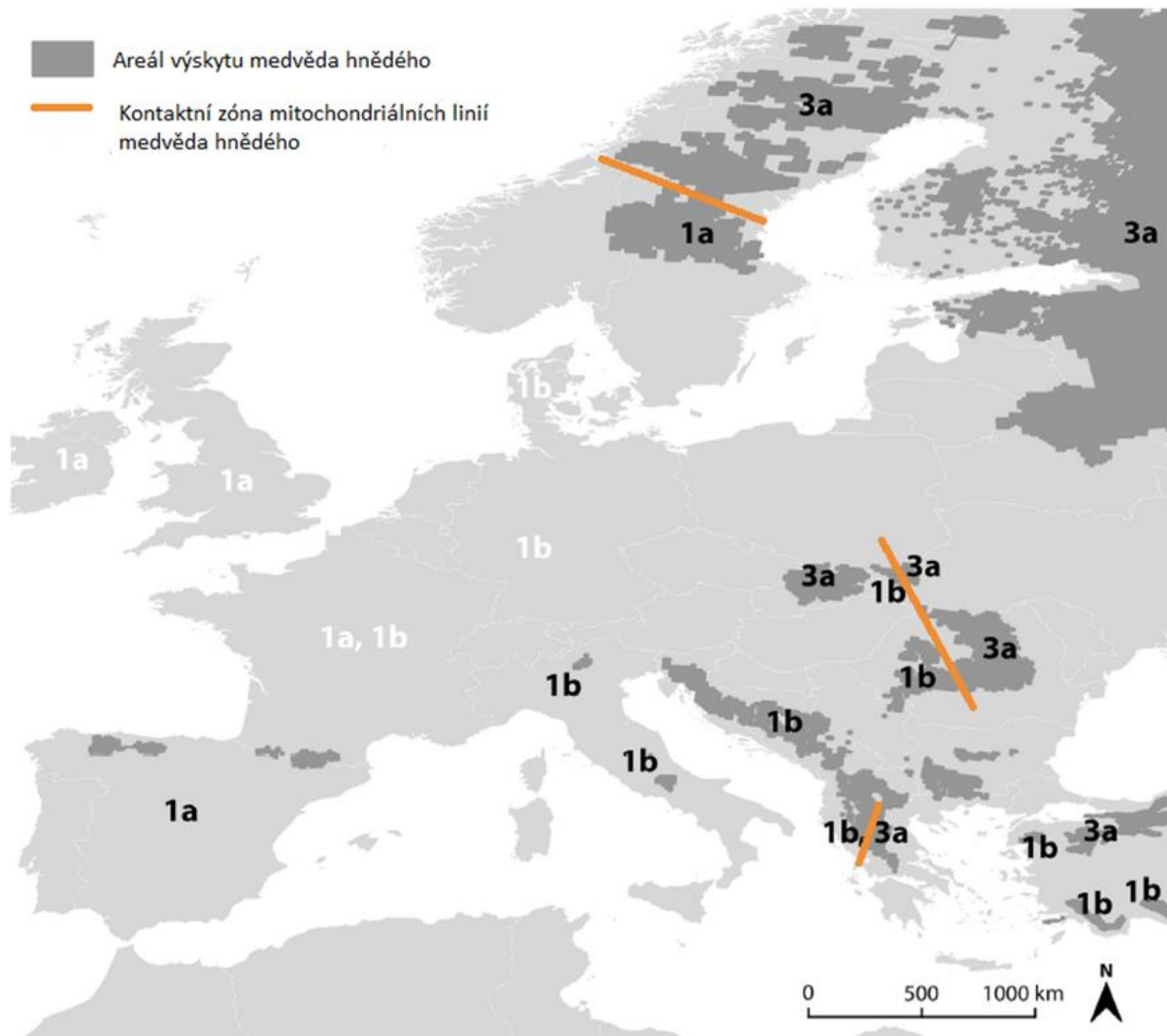
Výše zmíněné úvahy směřují ke konceptu minimální životaschopné populace (Minimum Viable Population, MVP). Jedna z definic tohoto pojmu popisuje nejmenší možnou izolovanou populaci, která má 99% pravděpodobnost existence po dobu 1000 let navzdory předvídatelným vlivům demografické, environmentální a genetické stochasticity či přírodních katastrof (Schaffer, 1981). Předpokládá se, že pokud je efektivní velikost populace menší než 100, tak bude populace čelit vážným genetickým hrozbám po pěti a více generacích. Pokud je efektivní velikost větší než 1000, je zachován evoluční potenciál (Frankham et al., 2014).

K posouzení pravděpodobnosti dlouhodobého přežívání populace určitého druhu se používá analýza životaschopnosti populace (Population Viability Analysis, PVA). Za tímto účelem bylo vyvinuto mnoho metodických přístupů a používání termínu PVA se pohybuje od kvalitativních, verbálních popisů bez modelů až po matematicky sofistikované, prostorově explicitní a stochastické simulační modely. Všechny přístupy mají společné posouzení rizika extinkce (nebo kvazi-extinkce) populace, případně alternativních scénářů za stávajících podmínek, nebo očekávaného v důsledku navrhovaného managementu v určitém časovém období, obvykle 100 let nebo déle. Často je PVA využívána pro porovnání účinků potenciálních managementových opatření na alternativní scénáře budoucího vývoje populace (Reed et al., 2002).

Fylogeografie medvěda hnědého v Evropě

Při fylogeografických studiích u živočichů je často používána mitochondriální DNA (mtDNA) (Emerson & Hewitt, 2005). Není tomu jinak ani v případě medvěda hnědého (Randi

et al., 1994; Taberlet & Bouvet, 1994; Tumendemberel et al., 2019; Valdiosera et al., 2007), kde je mitochondriální DNA klasickým nástrojem (Anijalg et al., 2018). Charakteristikou mtDNA je snadná amplifikace při PCR díky velkému počtu kopií na buňku, absence rekombinace, samičí filopatrie a vysoká rychlost nukleotidových substitucí (Avise, 2000; Graur & Li, 2000). V Evropě se v současnosti nacházejí dvě mitochondriální linie medvěda hnědého (Obr. 1). Současná fylogeografická struktura medvěda hnědého je ovlivněna pleistocenními oscilacemi klimatu a alopatrickou speciací spojenou s mediteránními refugii, prostorové vzorce rekolonizace se staly jedním z paradigmat pro fylogeografii Evropy (Anijalg et al., 2018; Davison et al., 2011; Hewitt, 2000; Saarma et al., 2007; Taberlet & Bouvet, 1994). Ke kontaktu mitochondriálních linií dochází na třech různých místech (Obr. 1). První místo kontaktu je Skandinávie, dále dochází ke kontaktu v Karpatech a posledním místem kontaktu těchto linií je Řecko (Kohn et al., 1995; Pylidis et al., 2021; Taberlet et al., 1995; Zachos et al., 2008).



Obr. 1: Mapa zobrazující kontaktní zóny mitochondriálních linií medvěda hnědého (dle Bray et al., 2013; Cilingir et al., 2016; Davison et al., 2011; Matosiuk et al., 2018; Pylidis et al., 2021, graficky upraveno). Bílou barvou jsou označeny vymřelé populace a černou barvou jsou označeny přeživší populace medvěda hnědého. Linie 1a a linie 1b patří do západní mitochondriální linie a linie 3a patří do východní mitochondriální linie. Oranžovou čarou je označena kontaktní zóna mezi západní a východní mitochondriální linií.

Cíle studie

i) Prvním cílem studie bylo získání genetického datasetu z neinvazivních vzorků medvěda hnědého získaných na Slovensku během dvou vegetačních sezón v letech 2019–2021 a na tomto základě provedení analýz identit pod statistickou kontrolou s přihlédnutím k možnému výskytu statistické chyby prvního a druhého typu. Dalším cílem byl odhad cenzi velikosti populace medvěda hnědého na Slovensku, které zahrnuje většinu západokarpatské populace, za pomoci modelů vycházejících z metod zpětného odchyty (Capture Mark Recapture, CMR). Dalším cílem bylo testovat správnost získaných odhadů pomocí simulačních procedur.

Důležitým cílem byla interpretace získaných výsledků v kontextu učebnicových paradigmat evoluční a ochránářské genetiky, které se týkají souvislostí velikosti populace a její životaschopnosti, tedy rizika inbreedingu, ztráty genetické variability vlivem genetického driftu a genetické eroze. Cílem je tedy odhadnout efektivní velikost populace a simulovat možné budoucí scénáře vývoje velikosti populace k přihlédnutím k trendům v prostředí pomocí analýzy životaschopnosti populace.

ii) Stanovení změn velikosti populace nebylo přímým cílem studie. Protože je ale stanovení populačních trendů důležitá informace, byla studie od začátku nastavena tak, aby toto srovnání bylo principiálně po sladění detailů metodiky možné.

iii) Stanovení potenciálního přemnožení nebylo předmětem této studie. Tento fenomén nicméně závisí zejména na populační hustotě, jejíž hodnoty jsou při analýze početnosti odhadovány. Analýza vztahu populace medvěda hnědého k nosné kapacitě prostředí bude vyžadovat ekologický přístup a modelování trofické niky.

iv) Analýza pravděpodobnosti střetnutí medvěda s člověkem nebyla předmětem této studie. Taková analýza vyžaduje analýzu prostorové i behaviorální ekologie medvěda, jakož i zohlednění zvyků lidské populace. Po integraci genetických a prostorově ekologických dat z telemetrie můžou data získaná v této studii přispět k této otázce pomocí výsledků v rámci přístupů krajinné genetiky.

v) Součástí studie jsou i základní popisné parametry populace, jako jsou informace o pohlavní a genealogické struktuře populace, diferenciaci subpopulací a jejich vzájemné izolaci (případně genovém toku).

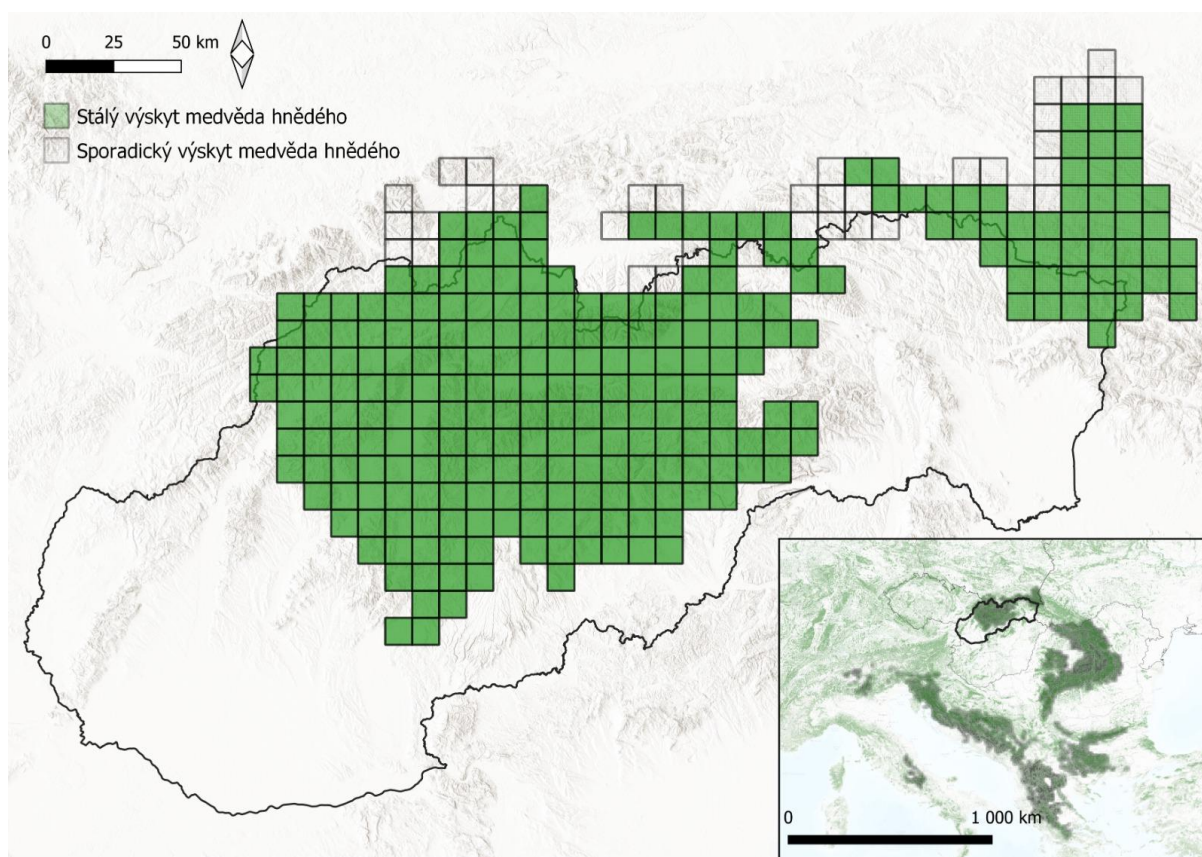
Co se týče formy, jedná se o závěrečnou zprávu projektu, určenou širšímu spektru zájemců o přírodní vědy, čemuž je přizpůsoben styl i žánr textu. Zprv je optimalizována srozumitelnost a nikoli přesnost, zadruhé je preferován popis kontextu nad úzkým zaměřením, jedná se tedy v souladu se zadáním o “komplexní studii”. Do budoucna budou připraveny rukopisy do odborných vědeckých periodik v příslušném žánru vědeckého textu.

Materiál a metodika

Vzorkování

1) Studované území

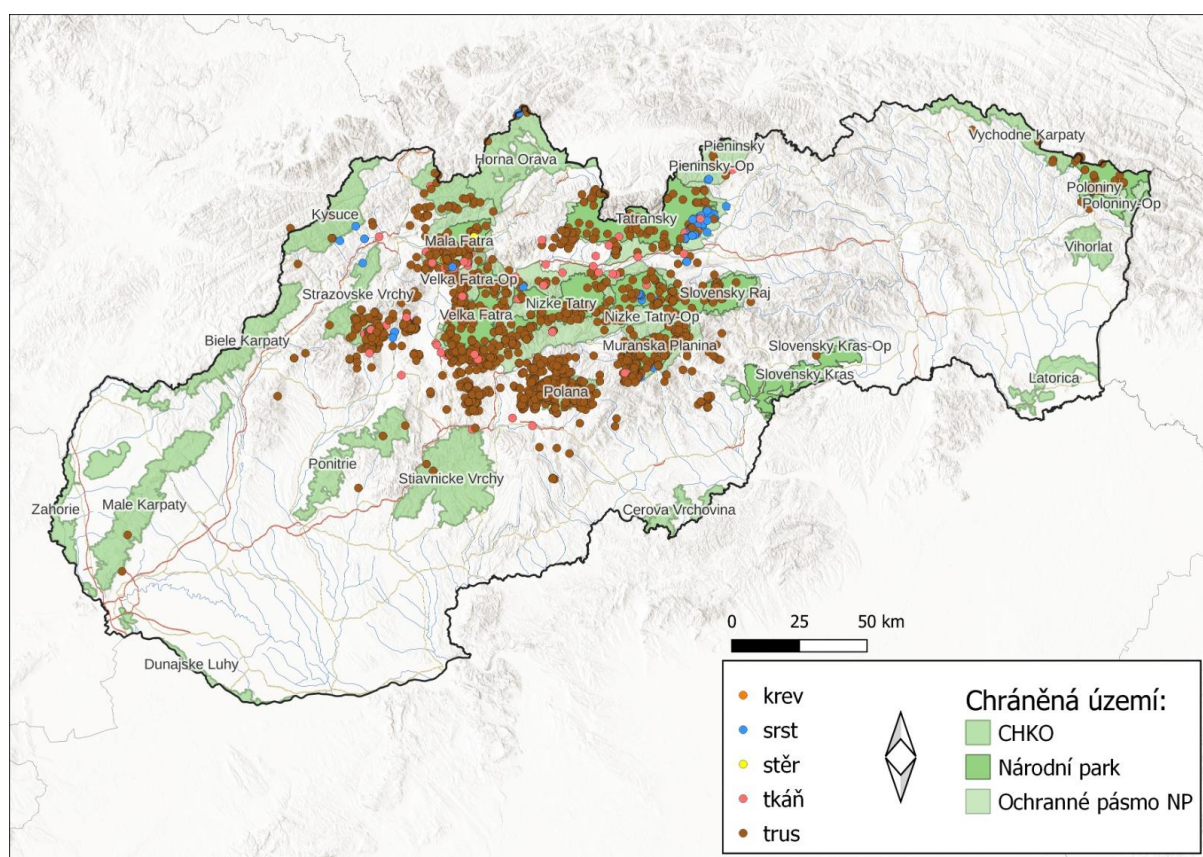
Materiál pro studii byl získán sběrem vzorků v Západních a Východních Karpatech na území Slovenské republiky. Sběr vzorků v terénu zajistila Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky (ŠOP SR). Vzorkování proběhlo v místech permanentního výskytu medvěda hnědého (Obr. 2), tzn. v národních parcích (NP) a chráněných krajinných oblastech (CHKO) a na území v kompetenci daných NP a CHKO.



Obr. 2: Mapa zobrazující permanentní a sporadický výskyt medvěda hnědého na Slovensku a v příhraničí dle Chapron et al. (2014).

2) Materiál

Sběr vzorků probíhal od září roku 2019 do konce dubna 2021. Lokality získaných vzorků jsou znázorněny na Obr. 3. Ve většině případů se jednalo o neinvazivní vzorky, zejména vzorky trusu a v menší míře vzorky srsti. Vzorky srsti byly získány ze značkových stromů. Podobně jako v předchozí studii (Paule 2015) nebylo zaznamenáváno vzorkovací úsilí. Neinvazivní vzorky byly doplněny o vzorky tkání. Tyto vzorky pocházely z nalezených uhynulých jedinců nebo usmrcených problematických jedinců. Byl získán i jeden tkáňový vzorek od jedince uhynulého v důsledku pytláctví. Vzorky krve a bukalní stěry byly získány i z jedinců, kteří byli odchyceni pro účely telemetrie. Byly zpracovány i převážně tkáňové vzorky, které byly získány před i po daném období. Vzorky trusu, tkání a stěry byly uloženy v 50 ml zkumavkách v 96% ethanolu a vzorky srsti byly uloženy v papírových obálkách. Vzorky krve byly uchovány ve speciálních odběrových zkumavkách na krev. Všechny vzorky byly zaznamenány do databáze a uchovány v mrazácích při -20°C .



Obr. 3: Mapa s lokalitami všech získaných vzorků medvěda hnědého. Barevné kódy odpovídají typu vzorku.

Metodika laboratorní práce

1) Extrakce DNA

Pro extrakci DNA ze vzorků trusu byl použit izolační kit *QIAamp DNA Stool Mini Kit* a *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)* a pro extrakci DNA ze vzorků srsti, tkání a stěrů byl použit izolační kit *Tissue Genomic DNA Mini Kit (Geneaid)*. DNA ze vzorků krve byla extrahována pomocí *Blood/Cultured Cell DNA Mini Kit (Geneaid)*. Extrakce DNA byla provedena dle standardních protokolů daných izolačních kitů.

Trus

Trus byl uložen ve zkumavkách s 96% ethanolem. Po vyjmutí vzorku ze zkumavky a odpaření ethanolu byla zejména z povrchu odebrána část vzorku potřebná pro izolaci. Nežádoucí složky trusu jako zbytky listů, plodů, srsti, hmyzu atd. byly odstraněny. Extrakce DNA z trusu byla provedena dle standardního protokolu, ve kterém došlo k modifikaci při finální fázi extrakce DNA, kdy byl snížen objem elučního pufru z 200 µl na 100 µl. Tato modifikace byla provedena pro zvýšení koncentrace DNA.

Tkáň

Ze vzorků tkání se stejně jako ze vzorků trusu nechal odpařit etanol a následně byla odebrána část vzorku potřebná pro izolaci. Tato část byla homogenizována a dále izolována podle standardního protokolu, ve kterém nedošlo k modifikacím.

Stěr

Stěry byly vyjmuty ze zkumavky a nechal se z nich odpařit ethanol. Poté byla ze štětičky odstřížena bavlněná část, ze které došlo k extrakci DNA dle standardního protokolu.

Srst

U vzorků srsti byly k izolaci použity pouze chlupy s folikuly. Přítomnost folikulu byla ověřena u každého vzorku pomocí binolupy. Následně byla na základě standardního protokolu z částí chlupů s folikuly extrahována DNA.

Krev

Vzorky krve byly přeneseny do sterilní 1.5 ml zkumavky a následně byla z těchto vzorků extrahována DNA dle standardního protokolu.

2) Amplifikace mikrosatelitových lokusů

Pro účel genotypizace obdržených vzorků bylo použito 12 mikrosatelitových lokusů v jednom multiplexu (Skrbinšek et al., 2010) a gen SRY pro určení pohlaví (Tab. 1), který je specifický pro heterogametické pohlaví (Bellemain & Taberlet, 2004).

Tab. 1: Přehled použitých mikrosatelitových markerů s názvy lokusů, sekvencí použitých primerů, délkami alel a barevným označením.

Název lokusu		Sekvence primeru 5' – 3'	Délka alel	Barevné označení	Zdroj
G10C	F R	AAAGCAGAAGGCCTTGATTTCTG GGGACATAAACACCGAGACAGC	87–107	VIC	Paetkau et al., 1998
G10H	F R	CAACAAGAAGACCACTGTAA AGAGACCACCAAGTAGGATA	222–258	6-FAM	Paetkau et al., 1998
G10L	F R	ACTGATTTTATTCACATTTCCC GATACAGAAACCTACCCATGCG	143–159	PET	Paetkau & Strobeck, 1994
G10P	F R	TACATAGGAGGAAGAAAGATGG AAAAGGCCTAAGCTACATCG	147–167	VIC	Paetkau et al., 1998
G10X	F R	CCCTGGTAACCACAAATCTCT GATCTCAGTTATCTGTGAAATC	134–148	6-FAM	Paetkau et al., 1998
G1D	F R	ATCTGTGGTTTATAGGTTACA CTACTCTTCTACTCTTTAAGAG	167–179	6-FAM	Paetkau & Strobeck, 1994
Mu10	F R	ATTCAGATTCATCAGTTTGACA TCAGCATAGTTACACAAATCTCC	112–132	6-FAM	Bellemain & Taberlet, 2004
Mu15	F R	CTGAATTATGCAATTAACAGC AAATAAGGGAGGCTTGGGT	117–129	PET	Taberlet et al., 1997
Mu23	F R	TAGACCACCAAGGCATCAG GCCTGTGTGCTATTTTATCC	142–160	NED	Bellemain & Taberlet, 2004
Mu50	F R	GTCTCTGTCATTTCCCATC AACCTGGAACAAAATTAACAC	78–102	6-FAM	Bellemain & Taberlet, 2004
Mu59	F R	GCTCCTTTGGGACATTGTAA TGACTGTACCAGCAGGAG	90–122	NED	Bellemain & Taberlet, 2004
Mu9	F R	AGCCACTTTGTAAGGAGTAGT ATATAGCAGCATATTTTGGCT	184–200	VIC	Bellemain & Taberlet, 2004
SRY	F R	GAACGCATTCTGGTGTGGTC TGATCTCTGAGTTTGCATTG	82	PET	Bellemain & Taberlet, 2004

K amplifikaci lokusů byl použit *Type-it Microsatellite PCR Kit (Qiagen)*. Každá 10 µl reakční směs obsahovala 5 µl Type-it Multiplex PCR Master Mix, fluorescenčně značené primery o finální koncentraci 0.04–0.08 µM, 3 µl ddH₂O a 1 µl izolátu DNA nezávisle na koncentraci DNA (Tab. 2). PCR byly prováděny v termocykleru T100™ Thermal Cycler Bio Rad. Před zpracováním vzorků proběhla optimalizace podmínek pro PCR a následně všechny PCR proběhly na základě následujícího termálního protokolu:

95°C	5 minut	}	32 cyklů
95°C	30 sekund		
59°C	90 sekund		
72°C	60 sekund		
60°C	30 minut		

Reakční směs pro fragmentační analýzu o celkovém objemu 10 µl obsahovala 0.5 µl PCR produktu, 0.25 µl velikostního standardu *Applied Biosystems™ GeneScan™ 500 LIZ™ Dye Size Standard* a 9.25 µl formamidu (Tab. 3). Fragmentační analýza probíhala na přístroji 3130xl Genetic Analyzer.

Tab. 2: Obsah reakční směsi na PCR

PCR	10 µl reakce
master mix	5 µl
ddH ₂ O	3 µl
primer mix	1 µl
DNA	1 µl

Tab. 3: Obsah reakční směsi na fragmentační analýzu

Fragmentační analýza	10 µl reakce
formamid	9.25 µl
LIZ 500	0.25 µl
PCR produkt	0.5 µl

Analýza genetických markerů

Výsledky fragmentační analýzy byly vizualizovány v softwaru geneious prime 2020.1.1 (<https://www.geneious.com>). V tomto softwaru byly odečteny délky jednotlivých alel (allele calling) na základě nastavení parametrů u jednotlivých lokusů a velikostního standardu Applied Biosystems™ GeneScan™ 500 LIZ™ Dye Size Standard. Výsledky těchto odečtů byly kontrolovány na případný výskyt artefaktů amplifikace (stutter bands, -A alely). Následně byly pomocí stejného softwaru proveden binning.

Důležitým faktorem při analýze mikrosatelitů jsou genotypizační chyby. Mezi hlavní příčiny těchto chyb řadíme výpadek alely (alelický dropout, Taberlet et al., 1996) nebo falešné alely (Beja-Pereira et al., 2009; Pompanon et al., 2005). Pro neinvazivní vzorky je typická nízká koncentrace a vysoká fragmentace DNA. Jedním z přístupů, jak dosáhnout snížení frekvence genotypizačních chyb, je provedení více PCR opakování na vzorek (tzv. multiple-tube přístup, Taberlet et al., 1996) a následné vytvoření konsensus genotypu. V tomto případě byl konsensus genotyp stanoven podle metody $n/2$, kde musí být alela detekována alespoň v polovině replikátů (Benschop et al., 2013). Na začátku byly provedeny dvě PCR na lokus pro každý vzorek podle metody Adams & Waits (2006). Alela byla akceptována až poté, co byla pozorována dvakrát, jinak byla provedena třetí PCR, jejíž výsledky byly porovnány s genotypy prvních dvou amplifikací (Tsaparis et al., 2014). U heterozygotního genotypu musela být každá alela pozorována alespoň ve dvou nezávislých PCR a u homozygotního genotypu alespoň ve třech nezávislých PCR (Tumendemberel et al., 2019).

V průměru byly provedeny tři PCR na vzorek. Minimálně byly provedeny dvě PCR na vzorek a to zejména u tkáňových vzorků a u velmi kvalitních neinvazivních vzorků. Maximálně bylo provedeno pět PCR na vzorek. U každého vzorku byly provedeny tedy minimálně dvě opakování a pokud se amplifikovalo alespoň osm z deseti lokusů ($PI_{sib} \sim 0.001$) viz. kapitola identifikace jedinců, byl vzorek zařazen do dalších analýz.

Na základě úspěšnosti amplifikace byla před získáním výsledných genotypů provedena detekce a vyřazení lokusů, jejichž úspěšnost amplifikace byla nízká v porovnání s úspěšností amplifikace zbylých lokusů v multiplexu.

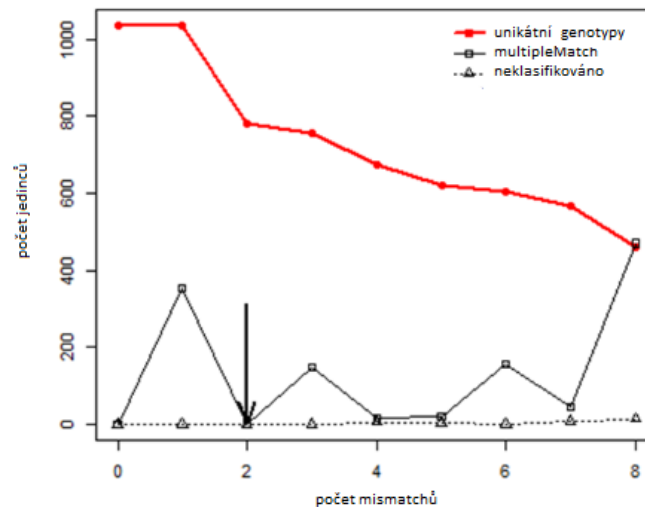
Identifikace jedinců

Pro ověření statistické síly počtu použitých lokusů k identifikaci jedinců byl použit software GIMLET (Valière, 2002). Za pomocí tohoto softwaru byla pro jednotlivé lokusy spočtena hodnota PI (Probability of identity), tedy pravděpodobnost, že dva různí jedinci v jedné populaci mají vlivem náhody shodný genotyp. Dále byla vypočtena hodnota PI_{sib} (probability of identity of siblings), tedy pravděpodobnost, že dva sourozenci sdílejí vlivem náhody stejný genotyp. Podle McKelvey et al. (2004) nesměla být výsledná hodnota PI vyšší než 1×10^{-6} a nebo hodnota PI_{sib} vyšší 1×10^{-3} . V tomto případě byl použitý panel lokusů považován za vhodný k identifikaci jedinců. Minimální počet potřebných lokusů ke spolehlivému rozlišení jedinců, byl zvolen na základě hodnoty PI_{sib} , z důvodu předpokladu příbuznosti jedinců ve zkoumané populaci (Paetkau & Strobeck 1994; Taberlet & Luikart 1999; Waits et al., 2001; Woods et al., 1999).

Identifikace jedinců byla provedena pomocí softwaru CERVUS (Kalinowski et al., 2007). Při analýze identit v tomto softwaru je potřeba stanovit počet zcela shodných lokusů a počet lokusů s neshodou.

Genotypy byly označeny za totožné (tzn. bylo považováno, že se jedná o stejného jedince), pokud byly shodné alespoň v šesti lokusech. Tento počet stále poskytoval dostatečné rozlišení pro identifikaci jednotlivých zvířat (Taberlet & Luikart, 1999; Paetkau, 2003).

Pro určení optimálního povoleného počtu lokusů s neshodou (mismatchem) při určování identit byl použit R balíček ALLELEMATCH (Galpern et al., 2012), který zajistil aby nebyl nadhodnocen či podhodnocen skutečný počet jedinců. ALLELEMATCH vypočítá genetickou podobnost všech genotypů a následně vytváří skupiny založené na genetické podobnosti. Následně tvoří tyto skupiny s postupným zvyšováním počtu neshod a pozoruje počet přítomných unikátních genotypů. Výsledný počet povolených neshod je určen jako bod, kdy je každý genotyp spojen pouze s jednou skupinou. Díky němu byl pro nalezení správného počtu unikátních genotypů stanoven počet lokusů s neshodou na dva (Obr. 4). Pro analýzu byly použity genotypy bez markeru pro určení pohlaví.



Obr. 4: Graf z programu ALLELEMATCH znázorňující doporučený počet povolených lokusů s neshodou (mismatchem) pro analýzu identit, aby nedošlo k nadhodnocení počtu unikátních genotypů (individuů). Šipka označuje doporučenou hodnotu.

Pokud byly genotypy softwarem CERVUS označeny jako zcela shodné, tak byly považovány za opakované záchyty daného jedince. V případě, kdy software prokázal jen částečnou shodu, tak byla provedena kontrola daných genotypů na úrovni primárních dat.

Analýza příbuzenských vztahů

Pro určení vztahů mezi jedinci v Západních Karpatech byla provedena analýza příbuznosti za pomoci softwaru ML-RELATE (Kalinowski et al., 2006), který počítá odhady příbuznosti na základě maximální věrohodnosti. Vyhodnocení vztahu mezi dvěma jedinci bylo stanoveno na základě výpočtu pravděpodobnosti čtyř typů příbuzenských vztahů, a to nepřibuzní jedinci (U), nevlastní sourozenci (HS), sourozenci (FS) a rodiče a potomci (PO). Cílem analýz bylo určit příbuznost prvního stupně, tj. vztah rodič–potomek nebo pár pravých sourozenců. Vztahy byly hodnoceny pomocí funkce (Confidence sets) s určením příbuzenských vztahů s pravděpodobností nad 90 %. K provedení těchto statistických testů byly použity simulace. Pro každý test bylo provedeno 100 simulací (Blouin, 2003; Kalinowski et al., 2006). Pro analýzu byl použit dataset všech unikátních jedinců.

Populační genetika

Pro zjištění populační struktury a odhad počtu odlišných genetických subpopulací byla použita Bayesiánská klastrovací analýza v programu STRUCTURE 2.3.4. (Pritchard et al., 2004). Jako vstupní soubor byl použit dataset obsahující všechny jedince, kteří byli pro snazší čitelnost výsledných grafů seřazeni od východu na západ. Počet potenciálních klastrů byl nastaven v rozmezí od K1 po K10. Pro každý potenciální klaster bylo provedeno deset nezávislých opakování. Pro analýzu byl zvolen admixture ancestry model spolu s korelovanými frekvencemi alel. Iniciační burn-in perioda byla nastavena na 100 000 a počet MCMC (Markov Chain Monte Carlo) na 1 000 000 opakování (Straka et al., 2012). Pro určení pravděpodobného počtu klastrů byla použita statistika MedMed K, MedMean K, MaxMed K a MaxMean K podle Puechmaille (2016), který akceptuje nerovnoměrné vzorkování.

Pro zjištění odpovídajícího počtu klastrů byl použit online software STRUCTURE-SELECTOR (Li & Liu, 2018), který vyhodnotil nejvíce spolehlivé a konzistentní K. Následná vizualizace výsledků a spojení jednotlivých opakování pro každé K byla provedena pomocí softwaru CLUMPAK (Kopelman et al., 2015).

Dále bylo pro analýzu struktury populace využito prostorového bayesiánského klastrování v programu GENELAND (Guillot et al., 2005; Guillot et al., 2008). Program GENELAND umožňuje analýzu genetických a prostorových dat pomocí příkazového řádku v statistickém nástroji R nebo grafického uživatelského rozhraní. V případě prostorového modelu tento program zkoumá genový tok na základě rozdílných frekvencí alel v jednotlivých částech areálu rozšíření (Guillot et al., 2009). Byl použit dataset obsahující všechny jedince – tedy kodominantní diploidní data spolu se souřadnicemi zeměpisné šířky a délky sběru jednotlivých vzorků.

Nejprve bylo nastaveno 10^6 opakování metody Monte Carlo pomocí Markovova řetězce (MCMC), kdy se každých 100 opakování výsledky ukládaly. Byl nastaven nekorelovaný model alelických frekvencí pro počet klastrů 1 až 10, který probíhal v pěti nezávislých bězích. Nejistota souřadnic byla nastavena na 0.1 stupňů zeměpisné šířky a délky, maximální počet jader v Poisson-Voronoiově teselaci byl kvůli celkovému počtu jedinců nastaven na 632, ostatní hodnoty byly ponechány defaultně. Následovalo seřazení jednotlivých běhů na základně posteriorní pravděpodobnosti, při kterém byl určen nejpravděpodobnější počet klastrů. V rámci

postprocesu pro grafické znázornění výsledků bylo nastaveno 500 pixelů pro osu x i y a vyřazeno prvních 200 opakování. Pro zpřesnění výsledků byl model následně nastaven na takovou hodnotu K, kterou prvotní analýza stanovila jako nejpravděpodobnější, ostatní parametry byly ponechány stejné jako u vstupní analýzy.

Genetická diverzita populace

Pro finální dataset a pro jednotlivé klastry určené na základě výsledků analýzy v programu STRUCTURE 2.3.4. byly pomocí softwaru CERVUS zjištěny frekvence alel. Pro zjištění koeficientu příbuzenského křížení, pozorované heterozygotnosti (H_o) a očekávané heterozygotnosti (H_E) byl použit software FSTAT (Goudet, 1995). Analýzy byly provedeny s výchozím nastavením parametrů. Vzhledem k testování několika lokusů najednou, existuje poměrně vysoká pravděpodobnost, že alespoň jeden z nich může vykazovat odchylku významnou na 5% hladině jen náhodou (statistická chyba typu I). Pro zohlednění této skutečnosti byla zvolena Bonferroniho korekce (Kalinowski et al., 2007).

Demografie

Velikost populace

Východní Karpaty

U východoslovenské subpopulace medvěda hnědého se podařilo získat jen relativně malý počet vzorků, v této části Slovenska je také díky napojení jedinců na populace směrem na východ porušen předpoklad uzavřenosti populace (Straka et al., 2012; Matosiuk et al., 2018), který je zásadní pro relevanci demografických analýz (Kendall 1999; Otis et al., 1978; Pollock 1976). U této subpopulace proto nebyly použity modely CMR.

Odhady početnosti na základě CMR modelů

Západní Karpaty

Charakteristika období a uzavřenost populace

U capture recapture studií je důležitým kritériem výše zmíněná uzavřenost populace, která přímo souvisí s tím, jaká třída modelů je vhodná pro výpočet odhadu velikosti populace. Uzavřená populace je taková populace, jejíž velikost je během zkoumaného období konstantní. To znamená nedochází k žádnému přírůstku (natalita nebo imigrace) nebo ztrátě (mortalita nebo emigrace) jedinců v populaci. To představuje velmi silný předpoklad a v přirozené populaci není téměř nikdy zcela platný. V praxi je uzavřenost populace definována tak, že během zkoumaného období nedojde v počáteční populaci k neznámým změnám (Otis et al., 1978). Pokud je studie navržena správně, může být populace alespoň přibližně demograficky uzavřená.

Za účelem splnění předpokladu uzavřenosti populace, byly všechny genotypy ze Západních Karpat, které byly získány během let 2019 až 2021 pro odhady velikosti populace

rozděleny do dvou sezon. Sezony byly kvůli srovnatelnosti výsledků definovány analogicky jako v předchozí studii (Paule, 2015). Jako první sezona bylo určeno období od září 2019 do srpna 2020 a jako druhá sezona pak období od září 2020 do srpna 2021. Vzorky získané před stanoveným obdobím byly z demografických analýz vyřazeny. Uzavřenost populace byla testována na základě heterogenity pravděpodobnosti záchytů (Otis. et al., 1978) v souvislosti s časově specifickou variací v pravděpodobnostech záchytu (Stanley & Burnham, 1999) pomocí softwaru CLOSETEST (Stanley & Richards, 2005).

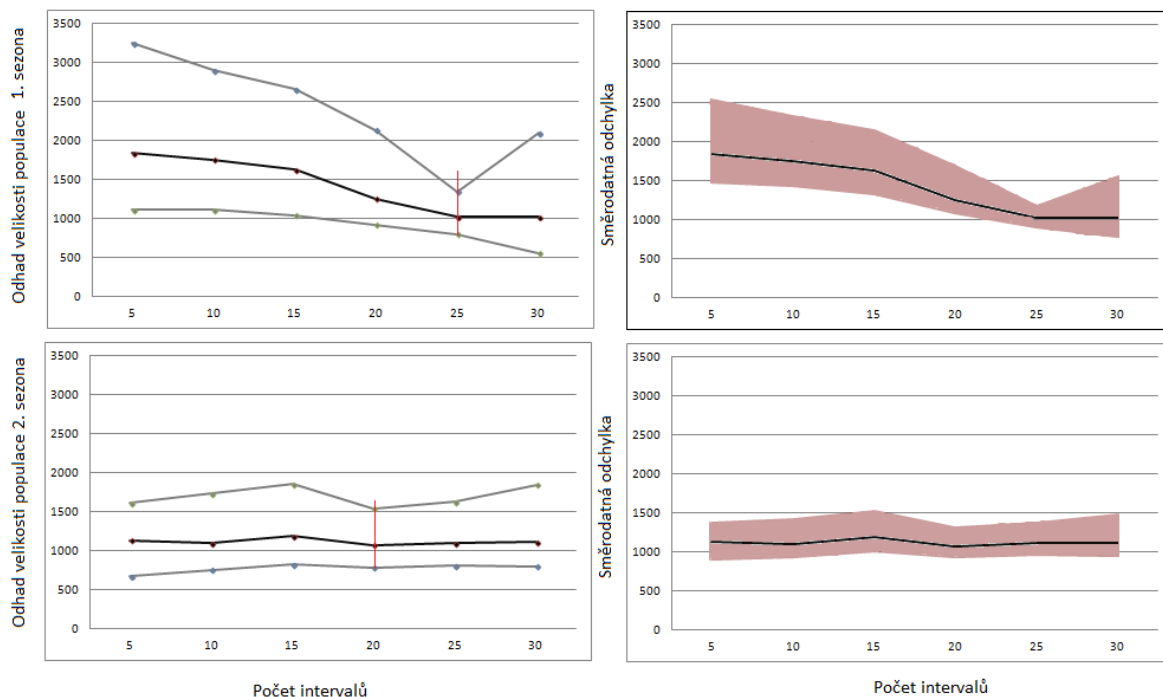
Odhad velikosti populace

Pro odhady velikosti populace medvěda hnědého v Západních Karpatech byly použity tři různé přístupy. Prvním byl CAPWIRE balíček v programu R (Pennell, 2013), druhým byl program MARK (White & Burnham, 1999) a třetím SECR balíček v programu R (Efford, 2011).

CAPWIRE poskytuje nejpřesnější odhady velikosti populace při heterogenní pravděpodobnosti záchytu a byl navržen pro neinvazivní typ vzorkování (Miller et al., 2005). CAPWIRE předpokládá nepřetržité vzorkování, což odpovídá vzorkování v této studii. Dataset pro analýzy odhadů velikosti populace v CAPWIRE obsahoval všechny záchyty každého jedince. Data byla rozdělena do tříd podle počtu zachycení (jedinci ve třídě x byli zachyceni x krát). Pro odhad velikosti populace je možné použít modely ECM a TIRM. Model ECM předpokládá stejnou pravděpodobnost záchytu všech jedinců, model TIRM předpokládá různou pravděpodobnost záchytu všech jedinců. Pro výběr optimálního modelu byl použit likelihood ratio test. Pokud byla P hodnota menší než 0.01 byla zamítnuta nulová hypotéza, tedy že u všech jedinců byla stejná pravděpodobnost záchytu (model ECM). V tomto případě byl pro zbytek analýz použit model TIRM (Miller et al., 2005). Pomocí CAPWIRE byly získány odhady i pro jednotlivé oblasti, které měly větší počet opětovných záchytů. Odhady početnosti byly pomocí tohoto přístupu stanoveny také pro jednotlivé klastry, které byly určeny na základě klastrovacích analýz.

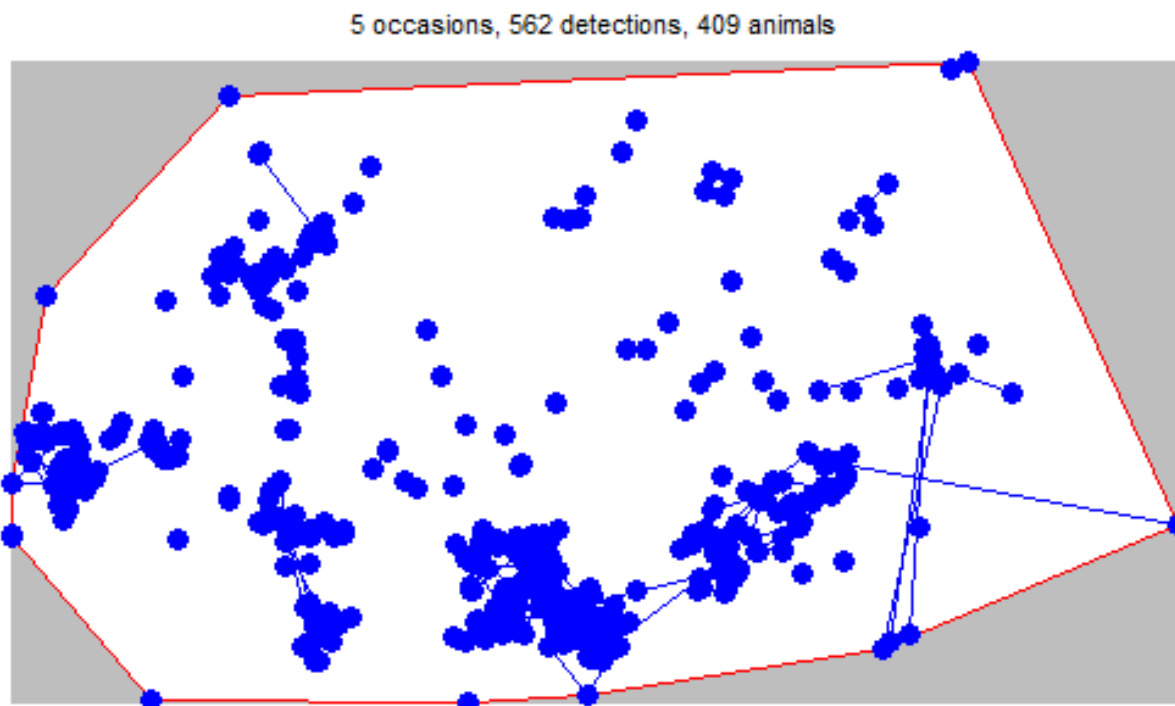
V programu MARK byly na základě výsledků testu pro uzavřenost populace použity pro odhady velikosti populace modely Huggins' Heterogeneity π and p with mis-identification. Tyto modely byly navrženy tak, aby zvládly problematickou identifikaci jedinců, způsobenou zejména genotypizačními chybami. Taktéž zahrnují parametr α , což je pravděpodobnost, že byl jedinec správně identifikován při prvním pozorování (Lukacs & Burnham, 2005). Dále tyto parametrizované modely zohledňují variaci v parametrech času, chování a individuální heterogenity v odhadech pravděpodobností zpětného záchytu. Vzhledem k neinvazivnímu získávání vzorků nebyl důvod očekávat behaviorální reakci a případný vliv na následné získání dalších vzorků. Proto byla pravděpodobnost prvního záchytu každého jedince považována za shodnou s pravděpodobností opětovného záchytu daného jedince. Pro využití modelů v programu MARK muselo být kontinuální vzorkování rozděleno do jednotlivých časových intervalů. Jednotlivé záchyty byly rozděleny do diskrétních intervalů s důrazem na minimalizaci ztráty získaných dat. Bylo vytvořeno více datasetů pro zjištění vlivu délky intervalů na odhad velikosti populace (Obr. 5). Pokud byl jedinec v daném intervalu detekován, byl záchyt označen jako 1 a v případě, že detekován nebyl, byl záchyt označen jako 0. Jedinci byli dále rozděleni do dvou skupin na základě pohlaví. Ostatní atributy modelu byly ponechány ve výchozím nastavení. Byly spočítány demografické odhady pro modely, ve třech základních třídách: model M_t , který umožňuje, aby se pravděpodobnosti záchytu měnily v čase; model

Mb, který umožňuje zachytit behaviorální reakce a model Mh, který umožňuje heterogenitu v pravděpodobnosti zachycení zvířat. Dále různé kombinace těchto modelů (Mtb, Mbh, atd.) a model M₀, který neumožňuje žádné z výše zmíněných variací (Lee & Chao, 1994; Otis et al., 1978). Pro výběr nejlepšího modelu byla v programu vypočtena hodnota AICc (Akaikovo informační kritérium druhého řádu), které hodnotí “goodness of fit” modelu a penalizuje nadparametrizované modely (Akaike, 1974; Guthery, 2003; Sugiura, 2007) a hodnota $\Delta AICc$ (Burnham & Anderson, 1998; Anderson & Burnham, 2002). U všech odhadů velikosti populace byl určen 95% interval spolehlivosti.



Obr. 5: Zobrazení vlivu nastavení počtu diskretních intervalů záchytů na odhady velikosti populace medvěda hnědého v programu MARK pro první sezonu a druhou sezonu. Černou barvou je zobrazen odhad velikosti populace, šedou barvou je označen 95% interval spolehlivosti. Červená úsečka označuje vybraný počet diskretních intervalů záchytů. Barevná plocha na grafech znázorňuje směrodatnou odchylku odhadů velikosti populace a 95% intervalu spolehlivosti.

Balíček SECR představuje prostorově explicitní CMR metodu, která umožňuje odhad velikosti populace včetně stanovení denzity populace. Pro vymezení studovaného území byl použit polygon (Efford, 2023), který nejlépe odpovídá CMR typu studie analyzující neinvazivní vzorky trusu. Polygon byl vytvořen ze souřadnic vzorků získaných z druhé sezony (Obr. 6). Dále byl vytvořen vstupní dataset obsahující označení polygonu ve kterém byl vzorek získán, ID vzorku, ID vzorkovací události, X a Y souřadnice. Byly vytvořeny datasey pro obě pohlaví dohromady, pouze pro samice a pouze pro samce. Obdobně jako u programu MARK byly získány odhady velikosti populace pomocí modelů ze tří základních tříd (Mt, Mb, Mh) a pomocí jejich kombinací. Nejlepší modely byly vybrány na základě hodnoty AICc. Odhady velikosti a denzity populace byly určeny s 95% intervalem spolehlivosti. Při odhadech denzity populace byl ve funkci “secr.fit” použit nejprve základní nulový model a následně pokročilejší model “(D ~ x + y + x² + y² + xy)”.



Obr. 6: Červenou linií je zobrazen vytvořený polygon představující oblast vymezenou na základě lokality sběru vzorků získaných v oblasti Západních Karpat pro obě pohlaví během druhé sezony. Uvnitř polygonu jsou modrými značkami zobrazeny jednotlivé genetické záchyty, shodné genotypy jsou propojeny modrou linií.

Testování správnosti odhadů velikosti populace pomocí simulací

Pro ověření odhadů velikosti populace byly provedeny simulace záchytových dat na základě náhodného záchytu jedince s pravděpodobností 1-100% a na základě parametrů reálných dat. Pro parametry distribuce reálných dat byl použit balíček *vcd* (Meyer et al., 2023). Datasets simulovaných dat byly vytvořeny pomocí *CAPWIRE*. Bylo vytvořeno 8 datasetů s fixním počtem záchytů odpovídajícím počtu záchytů ve druhé sezoně a předpokládanou velikostí populace od 1000 do 4000 jedinců. Dále bylo vytvořeno 18 datasetů s fixní velikostí populace 1000 jedinců (počet přibližně odpovídající výsledkům odhadu velikosti populace ve druhé sezoně) a počtem vzorků od 50 do 2000. Pro jednotlivé datasety byly stanoveny odhady velikosti s 95% konfidenčním intervalem pomocí modelu *TIRM*.

Efektivní velikost populace

Efektivní velikost populace (N_e) byla vypočtena zvlášť pro jednotlivé subpopulace definované jako klastry získané v programu *STRUCTURE*. Kritéria pro zařazení do klastrů byla založena na q hodnotě. Jedinci s q hodnotou vyšší než 0.7 byli rozděleni do daných klastrů, jedinci u kterých byla q hodnota nižší, nebyly do jednotlivých klastrů zahrnuti (Anijalg et al., 2020). Efektivní velikost populace byla stanovena pomocí metody vazebné nerovnováhy v softwaru *LDNE* (Waples & Do, 2008). Pro výpočet byl použit model pro náhodné páření a alely vyskytující se s frekvencí $P_{crit} > 0.01$ byly vyloučeny z analýz. U odhadů byl stanoven 95% interval spolehlivosti (Anijalg et al., 2020; Pylidis et al., 2021).

Analýza životaschopnosti populace

Pro modelování populační dynamiky a hodnocení pravděpodobnosti extinkce populace byl použit program VORTEX (Lacy, 1993), speciálně navržený pro provádění PVA. Využívá stochastický simulační model k odhadu změn velikosti a životaschopnosti populace v čase, přičemž bere v úvahu různé demografické a environmentální faktory. Jednou z klíčových výhod tohoto softwaru je jeho flexibilita a schopnost zahrnout komplexní data a modelové předpoklady. Může také zahrnout nejistotu a variabilitu údajů a předpokladů, což umožňuje robustnější a realističtější hodnocení životaschopnosti populace.

Pro PVA byly použity demografické parametry, které jsou uvedeny v Tab. 4. Pro model byl zvolen časový interval 100 let, přičemž pro každý scénář bylo umožněno 10 000 iterací. Počáteční velikost populace byla stanovena na základě výsledků odhadů početnosti pro jednotlivé klastry. Nosná kapacita pro medvěda nebyla formálně odhadnuta. Existují náznaky, že se jí populace pravděpodobně blíží vzhledem k podobným odhadům velikosti populace v této studii a ve studii z roku 2015 (Paule, 2015). Výsledky odhadu početnosti pro jednotlivé klastry byly použity jako minimální hodnota nosné kapacity prostředí. Pro porovnání byla provedena i PVA s nosnou kapacitou přibližně 200 % s ohledem na odhady početnosti v této studii.

Tab. 4: Vstupní parametry pro model populační predikce medvěda hnědého.

Parametr	Hodnota	Zdroj
Počet opakování	1000	Gervasi & Ciucci 2018
Počet simulovaných let	100	Gervasi & Ciucci 2018
Úmrtnost mláďat do dvou let	0.25–0.5	Baláž 2002; Baláž 2003; Jakubiec 2001; Lenko 2006
Úmrtnost subadultů	0.15–0.35	Bunnell & Tait 1985
Typ reprodukčního systému	polygynní	Steyaert et. al. 2012
Věk první reprodukce	4	Gervasi & Ciucci 2018
Reprodukční senescence	27	Schwartz et al., 2003
Velikost vrhu	1.7–2.3	Hell & Sabadoš 1995; Sabadoš & Šimiak 1981
Poměr pohlaví při narození	50:50:00	Bellemain et al., 2005; Schwartz et al., 2003
Podíl rozmnožujících se samic	0.15–0.3	Schwartz et al., 2003; Tosoni et al., 2017

Změna velikosti populace

Jedna z možností studování změn velikosti populace spočívá ve srovnání současné studie (mezi lety 2019-2021) s minulou studií (Paule 2015, roky 2012-2015). Takové srovnání vyžaduje porovnání studovaného území (ověření, zda nedošlo ke změnám areálu), srovnání distribuce vzorků a srovnání vlastních CMR modelů.

Porovnání distribuce vzorků

Rozdíly v počtu vzorků v jednotlivých území mohou být způsobeny a) rozdíly v intenzitě vzorkování a b) změnami v lokální distribuci druhu. Vzhledem k tomu, že vzorkovací úsilí ani v jedné studii nebylo měřeno, explicitní odlišení obou faktorů je obtížné. Srovnání počtu vzorků v jednotlivých územích (např. kvadrátech) však není možné provést přímo (tj. s použitím parsimoniálních metod), ale s přihlédnutím k rozdílům vhodnosti habitatu (tj. minimálně s použitím metod maximum likelihood).

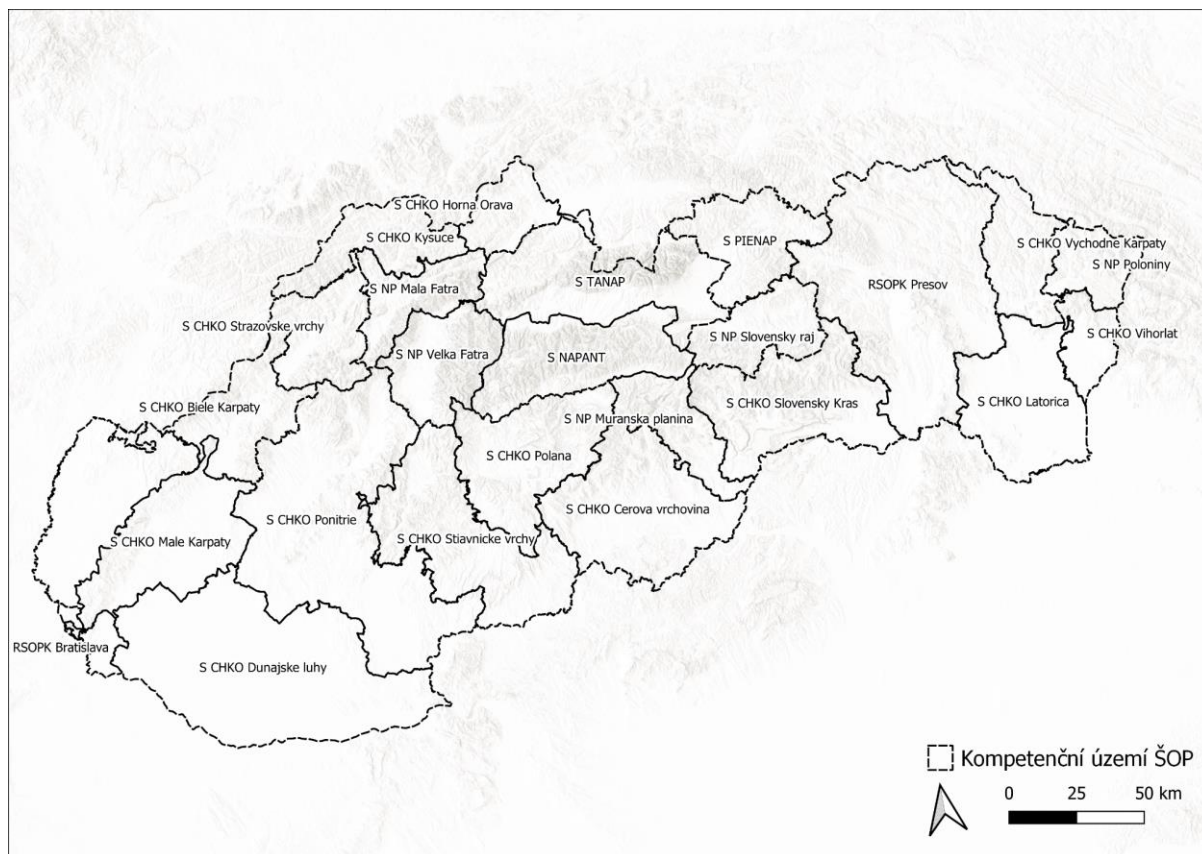
Podrobná analýza tohoto typu je nad rámec této studie, je zde však uvedeno zobrazení distribuce vzorků spolu s výsledky habitatového modelování.

Habitatové modelování bylo provedeno v programu MAXENT (Phillips et al., 2016). Byla použita nálezová a telemetrická data medvědů hnědých a environmentální data, která jsou tvořena abiotickými faktory zahrnující nadmořskou výšku, sklonitost a heterogenitu povrchu a intenzitu slunečního záření, habitatovými faktory sestávající z tříd a rozmanitosti krajinného pokryvu a antropogenní faktory představující transformaci krajiny, vzdálenosti k sídlům a silnicím (Okániková et al., 2021; Vlková et al., 2022). Výsledná vhodnost habitatu je definována hodnotami indexu HSI (habitat suitability index).

Změny v úspěšnosti vzorkování na lokální úrovni mohou být také odrazem změn distribuce vlivem dramatických změn v krajině, ke kterým v posledních dekadách dochází. Analýza těchto změn je nad rámec této studie.

Populační hustota

Celková populační hustota byla stanovena na základě počtu jedinců z druhé sezony. Z tohoto počtu byly odebrány všichni usmrcení jedinci. Populační hustota byla určena i na základě odhadovaného počtu jedinců. Jako areál výskytu byl použit součet všech kompetenčních území CHKO a NP odkud byly získány genotypy ("Mapový portál KIMS: Kompetencie ŠOP" 2014) (Obr. 7). Vzhledem k tomu, že v některých územích byl výskyt jedinců na základě DNA prokázán jen na malé části tohoto území, byly pro přesnější odhady populační hustoty použity údaje o přítomnosti medvěda hnědého v jednotlivých mysliveckých sdruženích. Dále byla odečtena zastavěná území a velké vodní plochy (Koreň et al., 2011). Protože tato plocha představuje území výskytu na celém Slovensku, bylo následně odečteno území s výskytem medvěda ve východní části areálu (Rigg & Adamec, 2007). Pro jednotlivá území byla stanovena populační hustota na základě počtu unikátních genotypů z lépe ovzorkované sezony. Pro ta území, u kterých byl díky dostatečnému počtu vzorků stanoven odhad velikosti populace, byla denzita vypočtena jako podíl odhadu velikosti populace na daném území vůči ploše kompetenčního území.

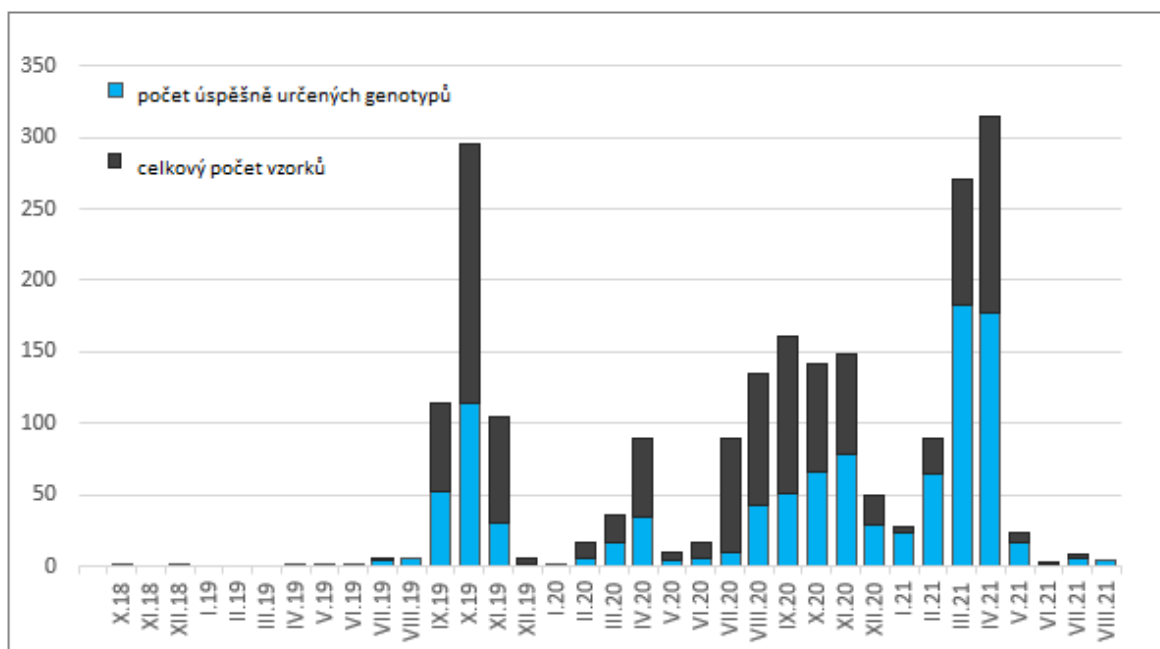


Obr. 7: Mapa zobrazující jednotlivá kompetenční území ŠOP.

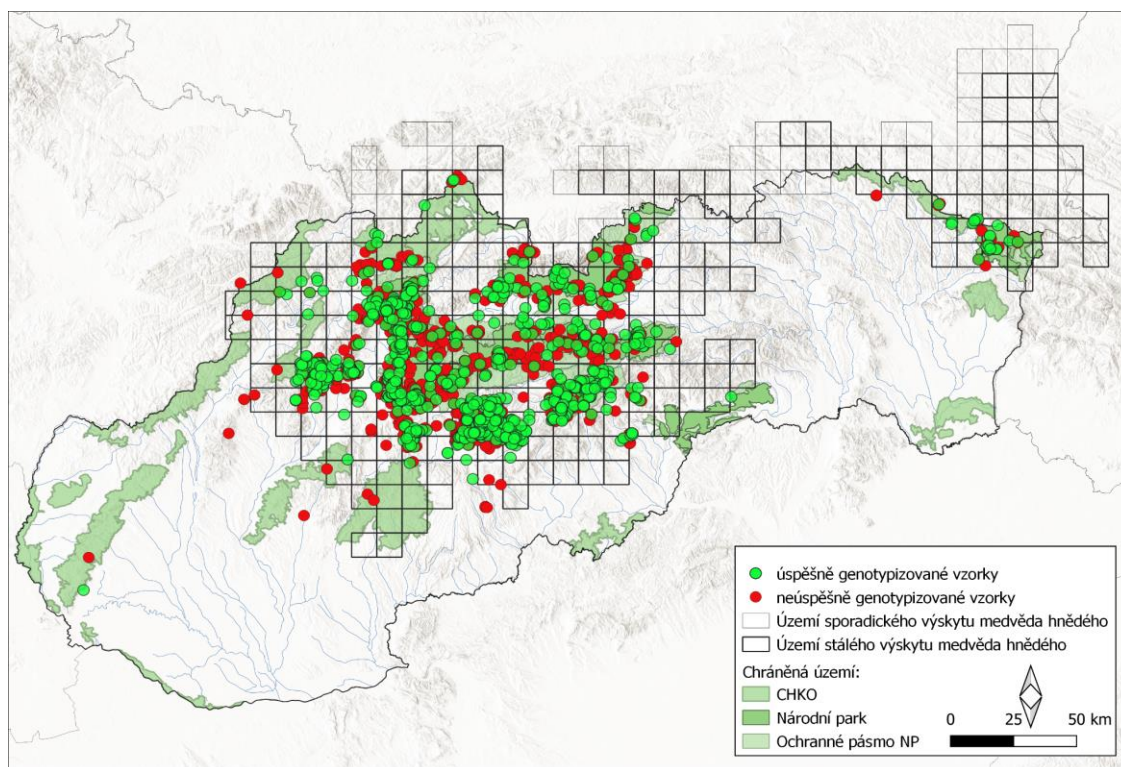
Výsledky

Vzorkování

Celkem bylo z celého studovaného území za dané zkoumané období zpracováno 2172 vzorků, jednalo se zejména o neinvazivní vzorky které tvořily 93 % ze všech obdržených vzorků. Z celkového počtu vzorků se úspěšně podařilo určit 1036 genotypů (Obr. 8). Z oblasti Západních Karpat bylo získáno celkem 1015 genotypů a z oblasti Východních Karpat bylo získáno 21 genotypů (Obr. 9).



Obr. 8: Přehledový graf znázorňující počty vzorků a počty úspěšně určených genotypů medvěda hnědého v průběhu jednotlivých měsíců za studované období v letech 2018–2021.



Obr. 9: Mapa znázorňující geografickou polohu úspěšně a neúspěšně genotypizovaných vzorků medvěda hnědého na Slovensku za celé studované období.

Průměrná úspěšnost genotypizace mikrosatelitových lokusů byla 48 %. Úspěšnost genotypizace jednotlivých druhů vzorků je uvedena v Tab. 5. Ze všech zpracovaných vzorků byla nejmenší úspěšnost genotypizace u vzorků srsti, a to 24 %. Naopak nejvyšší úspěšnost genotypizace byla u stěrů, a to 100 %. Celková úspěšnost genotypizace u invazivních vzorků byla 83 % a u neinvazivních vzorků 46 %.

Tab. 5: Přehledová tabulka obsahující počty a procentuální vyjádření úspěšně zpracovaných vzorků ze kterých byl získán genotyp a neúspěšně zpracovaných vzorků. Dále je zde zobrazen celkový počet a procentuální zastoupení jednotlivých druhů invazivních a neinvazivních vzorků. Vzorky jsou seřazeny dle početnosti.

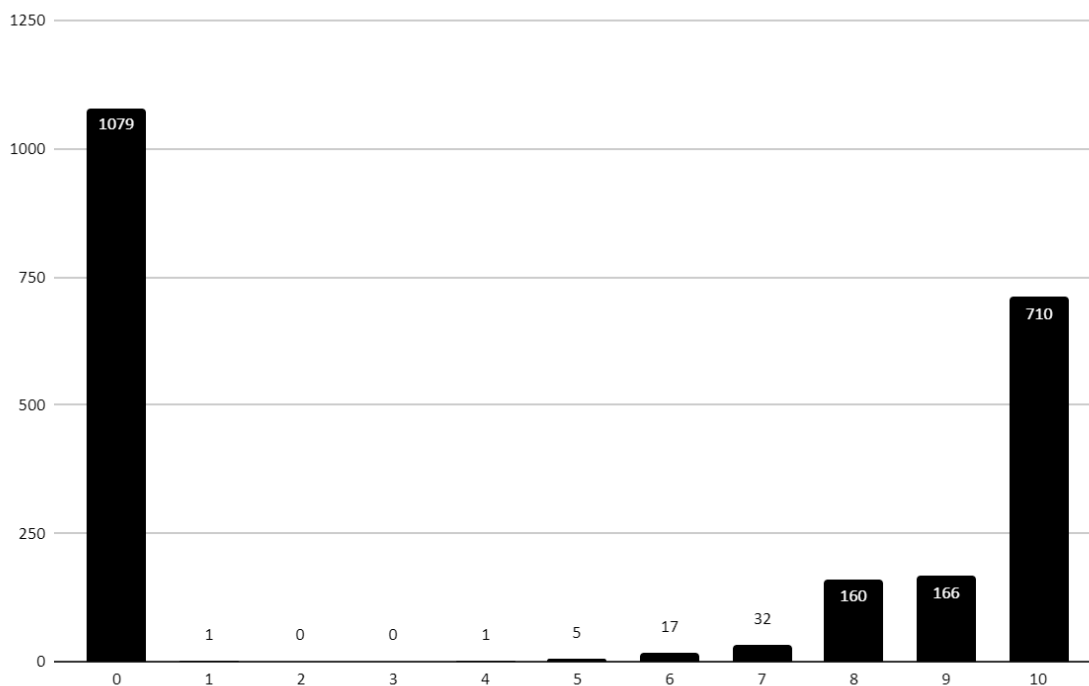
Druh vzorku	Úspěšně zpracované		Neúspěšně zpracované		Celkový počet	
	počet	procento	počet	procento	počet	procento
Trus	956	47 %	1070	53 %	2026	93 %
Tkáň	59	83 %	12	17 %	71	3 %
Srst	17	24 %	53	76 %	70	3 %
Krev	2	67 %	1	23 %	3	>1 %
Stěr	2	100 %	0	-	2	>1 %

Analýza genetických markerů

Na základě úspěšnosti amplifikace jednotlivých mikrosatelitových lokusů byla před získáním výsledných genotypů provedena detekce a vyřazení problémových lokusů. Lokusy G10X a Mu23, které se úspěšně amplifikovaly pouze v 11 % a v 35 % PCR a byly následně vyřazeny z dalších analýz (Tab. 6). Výsledný panel tedy obsahoval deset mikrosatelitových lokusů. U většiny úspěšných vzorků se podařilo amplifikovat všech deset lokusů (Obr. 10).

Tab. 6: Tabulka s procentuální úspěšností amplifikací u jednotlivých lokusů. Červeně jsou označeny vyřazené lokusy G10X a MU23.

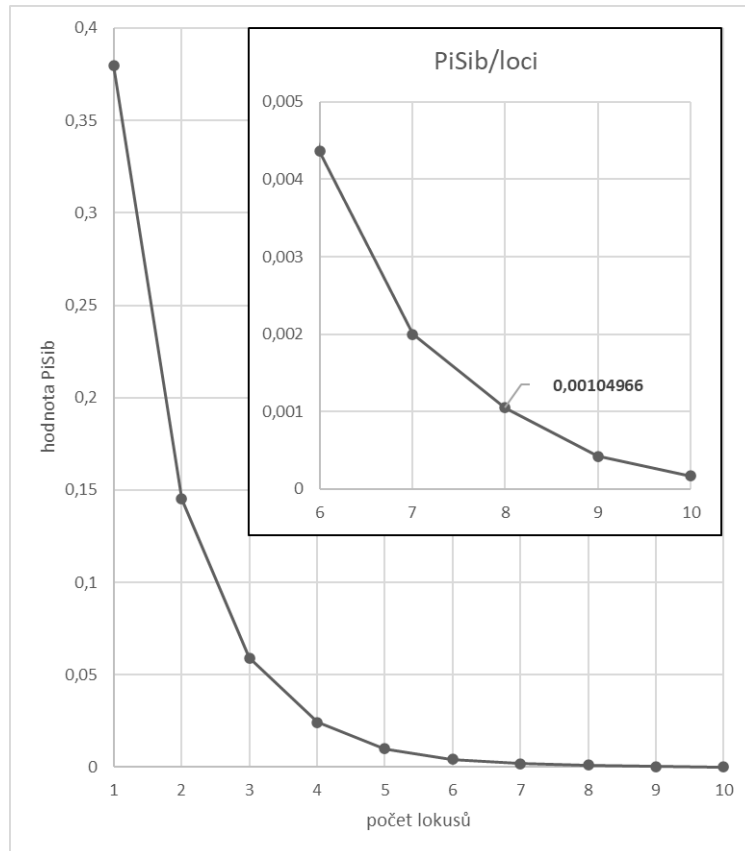
Lokus	MU50	MU10	G10X	G1D	G10H	G10C	G10P	MU09	MU59	MU23	MU15	G10L
Celkový počet genotypů	1057	1057	1057	1057	1057	1057	1057	1057	1057	1057	1057	1057
Úspěšná amplifikace lokusu (počet vzorků)	1055	1055	121	1049	822	1056	1056	1055	1053	369	769	1050
Úspěšná amplifikace lokusu (%)	100	100	11	99	78	100	100	100	100	35	73	99



Obr. 10: Graf počtu úspěšně amplifikovaných lokusů u zpracovaných vzorků.

Identifikace jedinců

Pro identifikaci jedinců byl panel lokusů vhodný pro nepříbuzné jedince $PI = 4 \times 10^{-9}$ i pro příbuzné jedince $PI_{Sib} = 1 \times 10^{-3}$. Ke spolehlivému rozlišení jedinců bylo na základě hodnoty PI_{Sib} potřeba 8 lokusů (Obr. 11). Hodnoty PI a PI_{Sib} pro jednotlivé lokusy jsou uvedeny v Tab. 7.

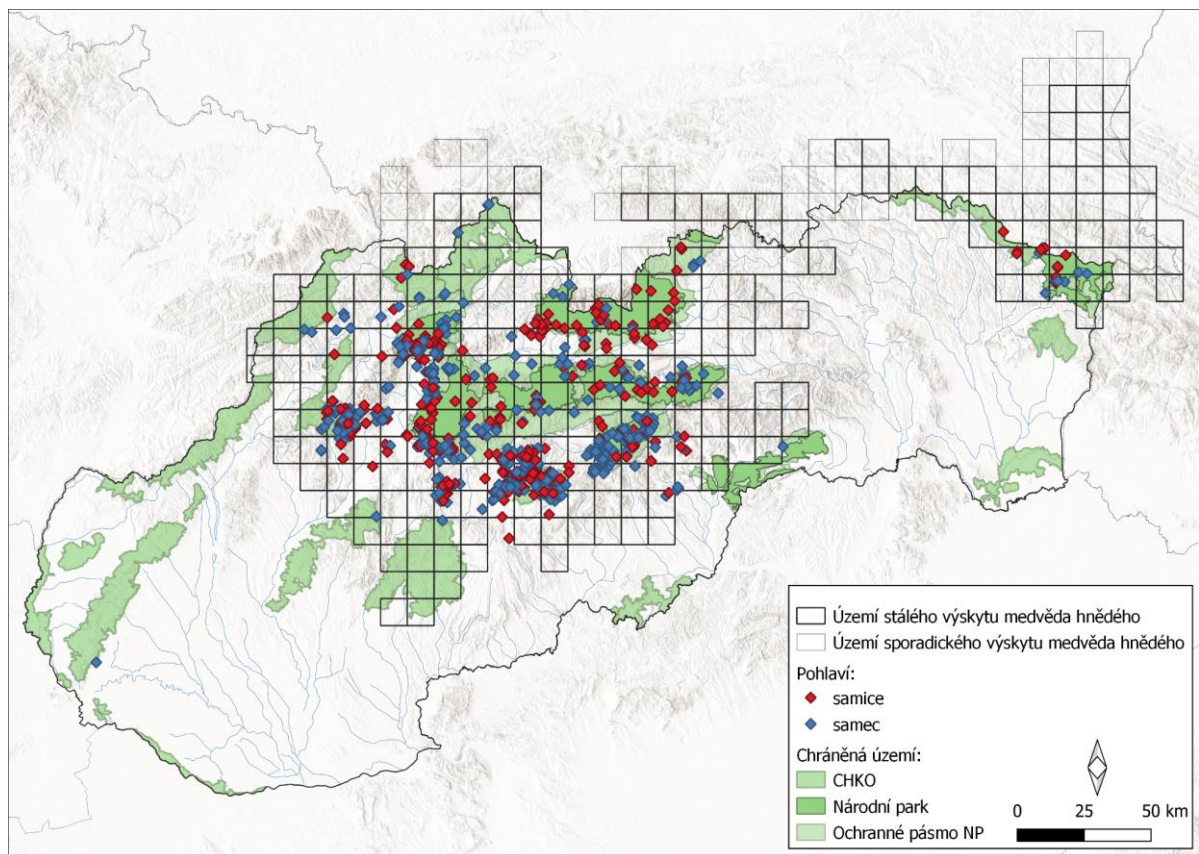


Obr. 11: Graf znázorňující závislost hodnoty PI_{Sib} pro daný počet lokusů. Nejdříve byly odebrány lokusy G10H a Mu15, u kterých byla úspěšnost amplifikace 78 % a 73 % (viz. Tab. 6). Následně byly odebrány lokusy od nejméně informativního dle analýz ze softwaru GIMLET.

Tab. 7: Hodnoty PI (probability of identity) a PIsib (probability of identity of siblings) pro jednotlivé lokusy. První lokus je nejvíce informativní.

Název lokusu	PI	PIsib
G1D	8.01E-02	3.80E-01
MU59	6.32E-03	1.45E-01
G10H	5.49E-04	5.69E-02
MU15	5.44E-05	2.31E-02
MU10	5.79E-06	9.40E-03
G10P	6.62E-07	3.88E-03
MU50	7.42E-08	1.61E-03
G10C	9.19E-09	6.96E-04
MU09	1.55E-09	3.19E-04
G10L	3.72E-10	1.68E-04

Z celého území bylo získáno celkem 1036 genotypů, z toho 632 unikátních. Celkově bylo získáno víc genotypů od samců (55 %), ale v rámci počtu jedinců byl poměr mezi pohlavími vyrovnán. Na Obr. 12 je znázorněna geografická poloha unikátních genotypů samců a samic. V datasetu bylo detekováno z celkového počtu 468 genotypů samic 315 jedinců s průměrnou frekvencí opětovného záchytu 1.5. U samců bylo detekováno z celkových 568 genotypů 317 jedinců s průměrnou frekvencí opětovného záchytu 1.8. Počty záchytů jsou uvedeny v Tab. 8.



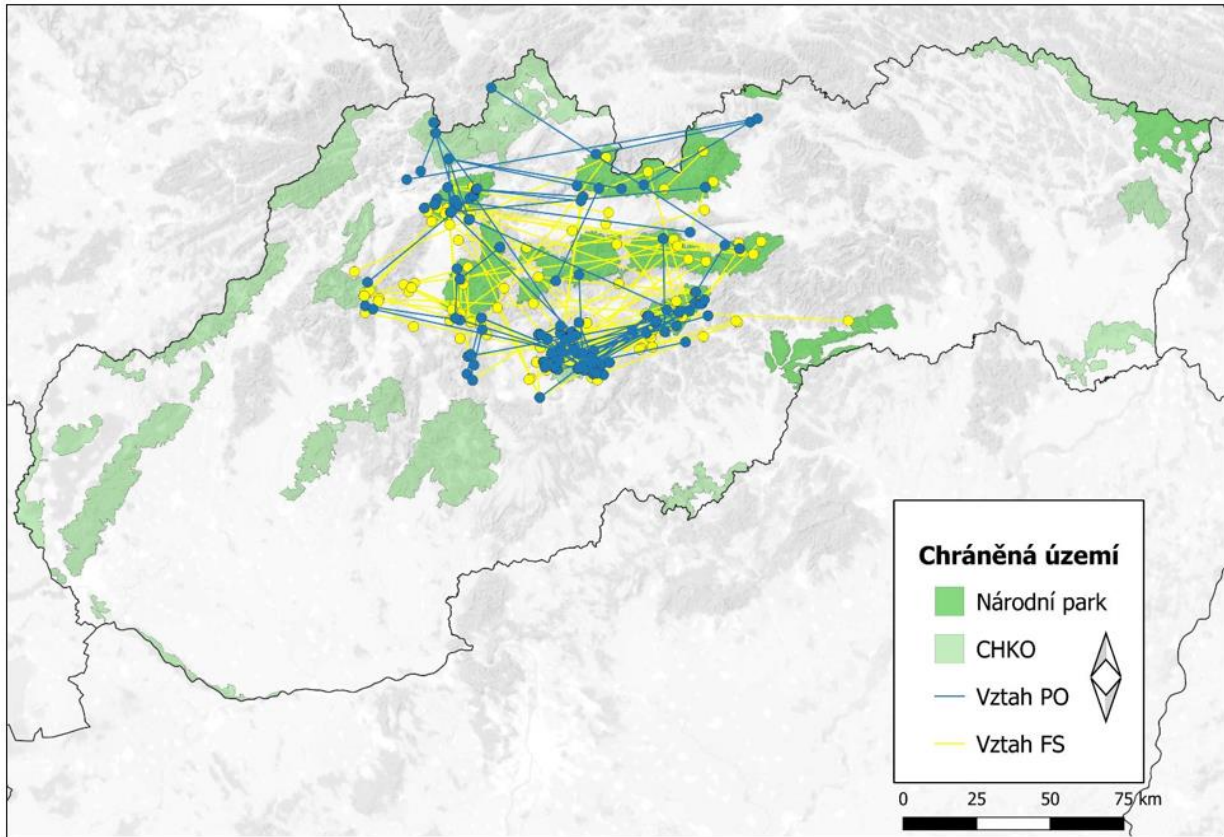
Obr. 12: Mapa znázorňující geografickou polohu unikátních genotypů medvěda hnědého na Slovensku za celé studované období, červenou značkou jsou vyobrazeny samice, modrou samci.

Tab. 8: Počet záchytů jedinců medvěda hnědého ve zkoumaném období na celém území Slovenska

Počet záchytů jedince	Počet jedinců	Počet genotypů
1	425	425
2	117	234
3	44	132
4	26	104
5	6	30
6	6	36
7	4	28
8	1	8
10	1	10
12	1	12
17	1	17
celkem	632	1036

Analýza příbuzenských vztahů

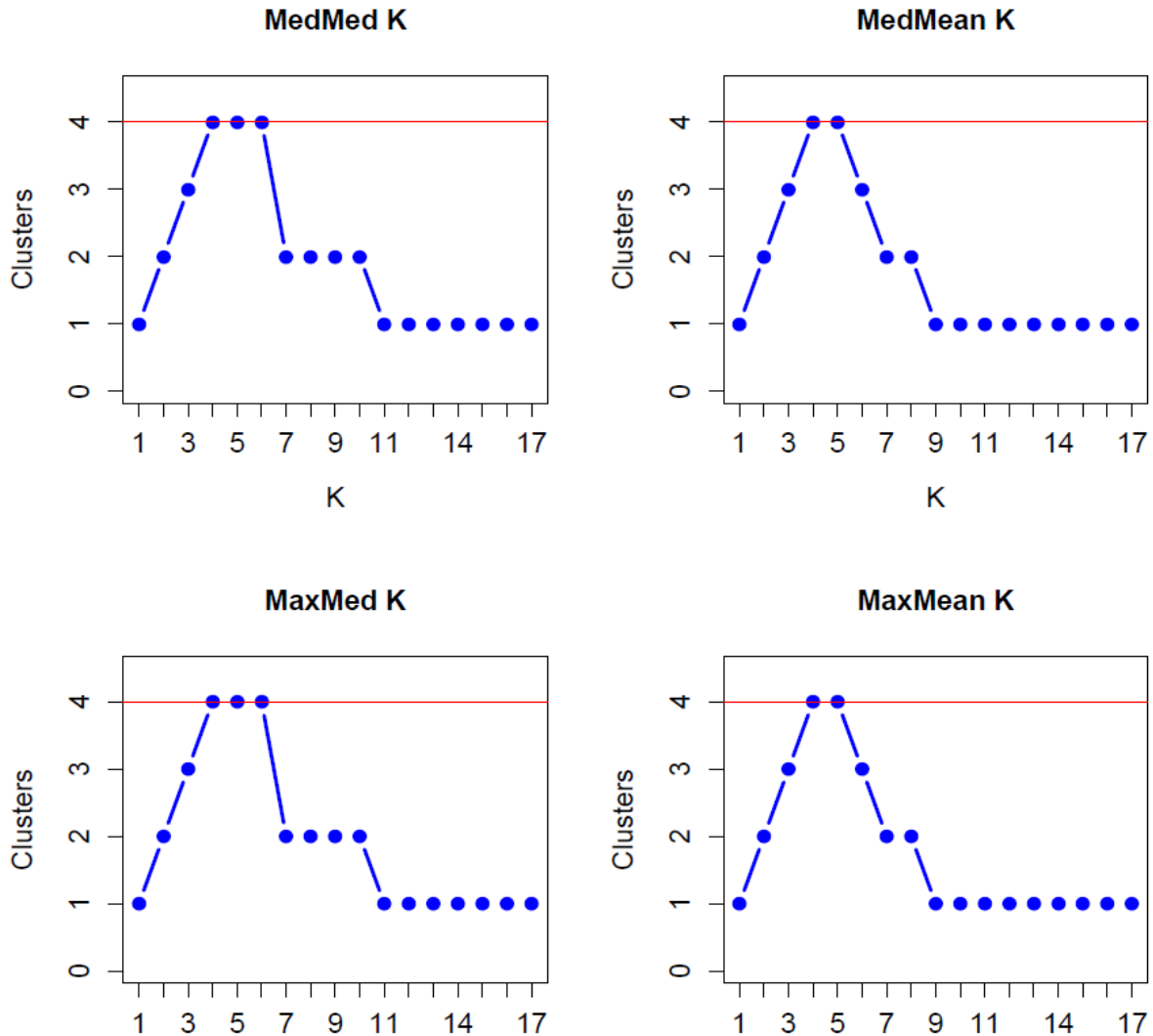
Dohromady bylo určeno 458 vztahů příbuznosti prvního stupně u kterých byl určen právě jeden příbuzenský vztah. Na Obr. 13 je znázorněna geografická poloha těchto příbuzných jedinců. Bylo určeno 125 jedinců se vztahem rodič–potomek (PO) a 186 jedinců pravých sourozenců (FS).



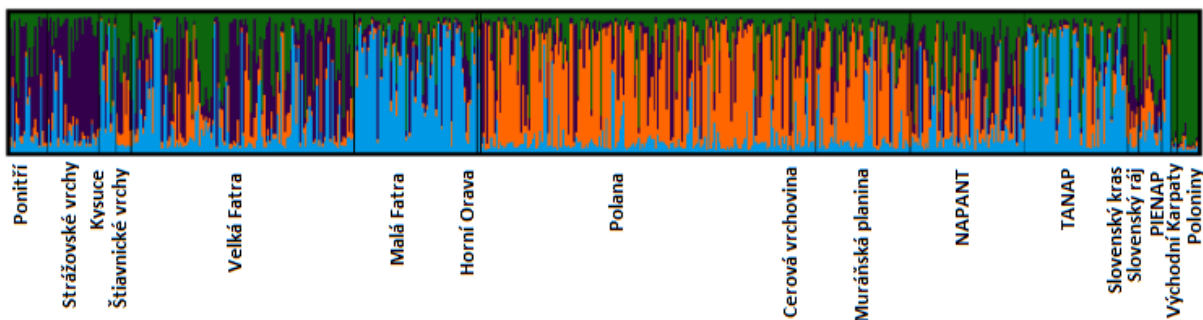
Obr. 13: Znázornění výsledků analýzy příbuzenských vztahů v softwaru ML-RELATE mezi jedinci medvěda hnědého. Body znázorňují jedince medvěda hnědého. Modrou barvou je znázorněn vztah rodič–potomek (PO). Žlutá barva znázorňuje vztah sourozenců (FS).

Populační genetika

Na základě výsledků klastrovací analýzy v softwaru STRUCTURE byl na základě statistik MedMed K, MedMean K, MaxMed K a MaxMean K dle Puechmaille (2016), které zohledňují nerovnoměrné vzorkování v rámci stanovených populací, určen nejpravděpodobnější počet klastrů $K = 4$. Tento počet byl stanoven na základě všech čtyř použitých metod (Obr. 14). Grafický výstup klastrovací analýzy je znázorněn na Obr. 15.

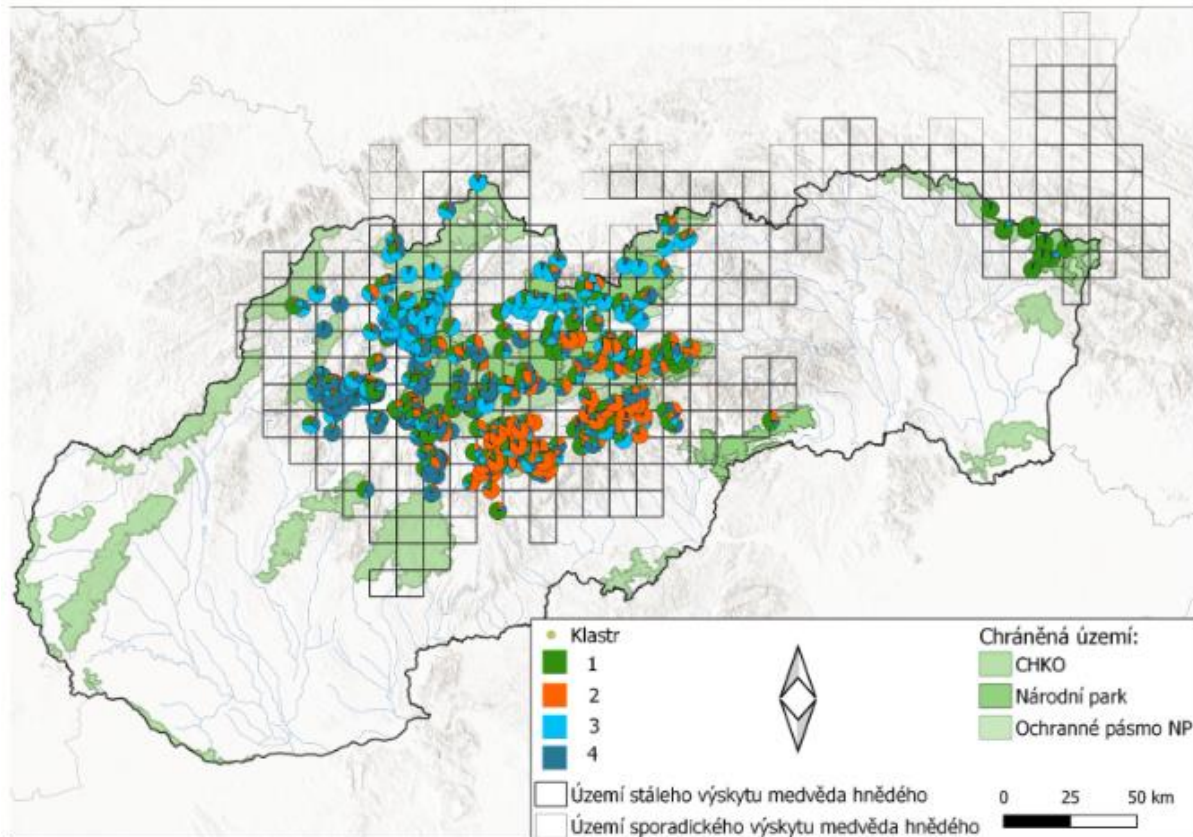


Obr. 14: Grafy hodnot MedMed K, MedMean K, MaxMed K a MaxMean K pro dataset individuálních genotypů medvěda hnědého (Puechmaile, 2016). Všechny hodnoty stanovily jako optimální K = 4.



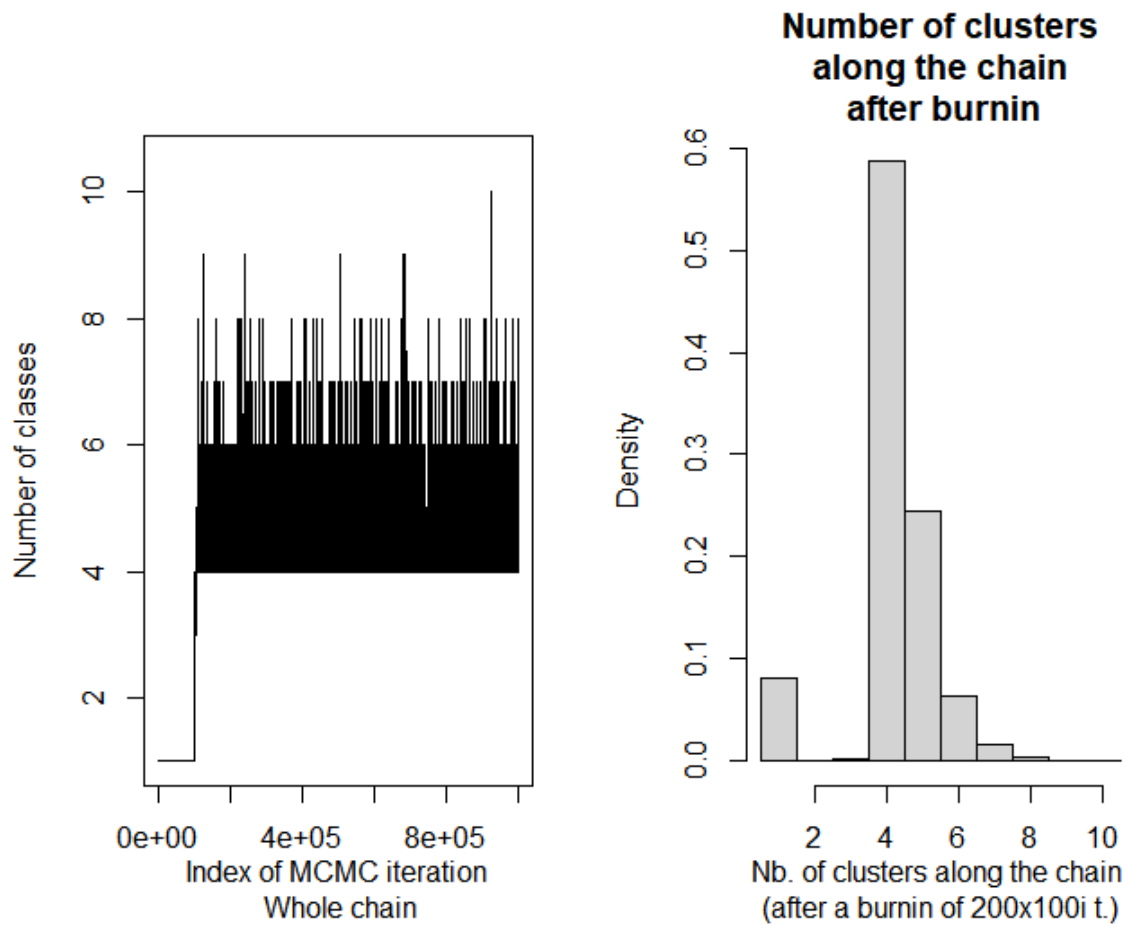
Obr. 15: Grafický výstup Bayesiánské klastrovací analýzy v softwaru STRUCTURE (Pritchard et al., 2000) pro K = 4 zpracovaný webovým softwarem CLUMPAK (Kopelman et al., 2015). Každý sloupec reprezentuje jeden ze zpracovaných genotypů jedinců medvěda hnědého. Jedinci byli pro účel analýzy rozděleny do 17 subpopulací na základě lokality sběru vzorků. Tyto lokality byly seřazeny od západu na východ.

Při rozdělení populace medvěda hnědého dle $K = 4$ (Obr. 16) tvoří první genetický klastr jedinci z oblasti východního Slovenska zahrnující území CHKO Východní Karpaty a NP Poloniny. Do druhého klastru se oddělují jedinci z území NP Muráňská planina, CHKO Polana a NP Nízke Tatry (NAPANT). Do třetího klastru se odděluje jedinci z území NP Malá Fatra, CHKO Horní Orava, Tatranského NP (TANAP) a Pieninského NP (PIENAP). Do čtvrtého klastru se oddělují jedinci z území NP Velká Fatra a CHKO Strážovské vrchy.

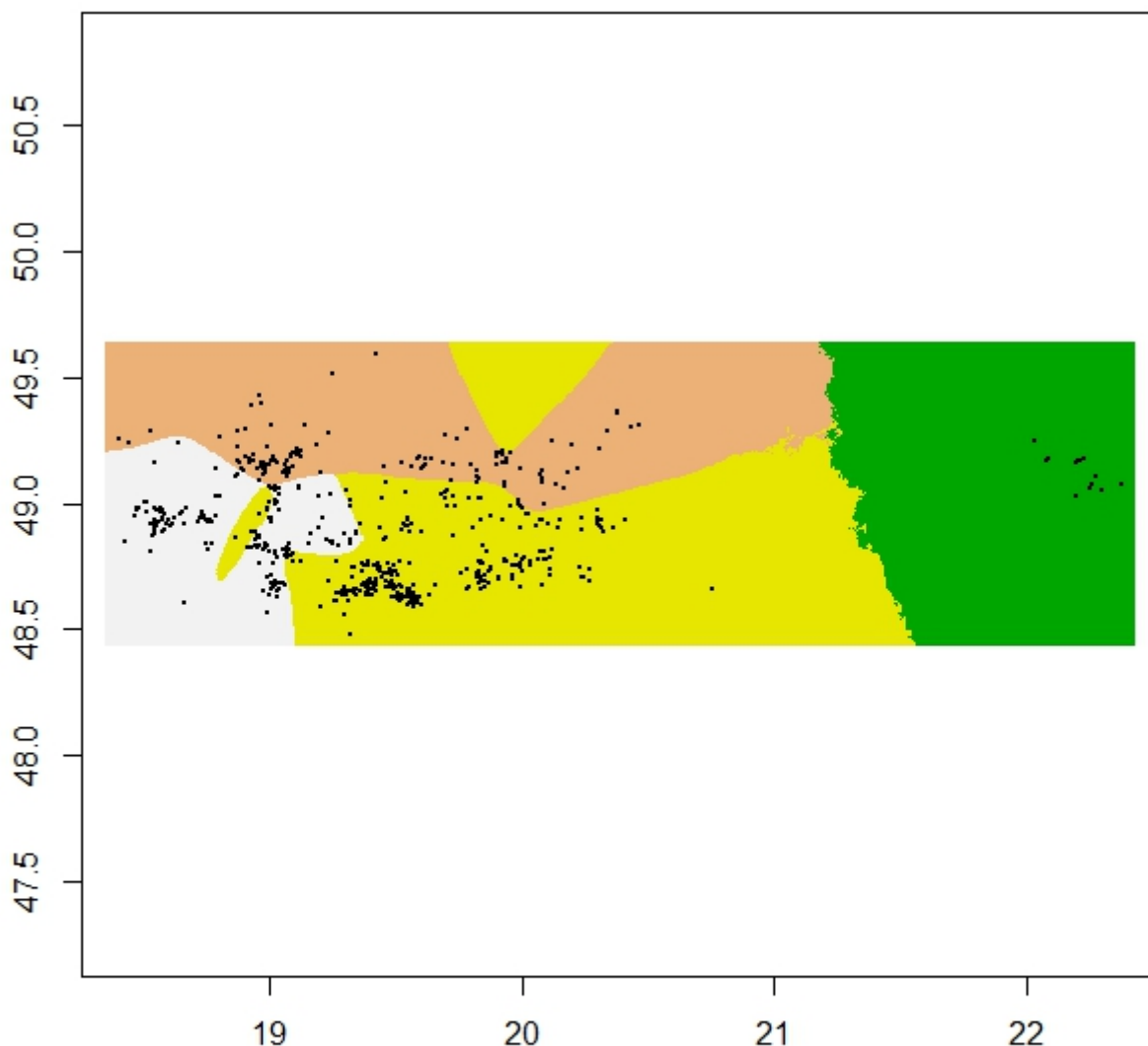


Obr. 16: Mapa zobrazující individuální genotypy medvěda hnědého rozdělené do čtyř klastrů na základě analýzy populační struktury v softwaru STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), na základě statistik MedMed K, MedMean K, MaxMed K a MaxMean K podle Puechmaile, 2016. Koláčkové grafy zobrazují individuální genotypy, úhly barevných výsečí znázorňují příslušnost k daným klastrům (q hodnoty).

Při prvotních analýzách pro nekorelovaný model program GENELAND vybral běh, který určil nejpravděpodobněji čtyři klastry (Obr. 17; Obr. 18). Zpřesňující analýza potvrdila počet čtyř klastrů v populaci.



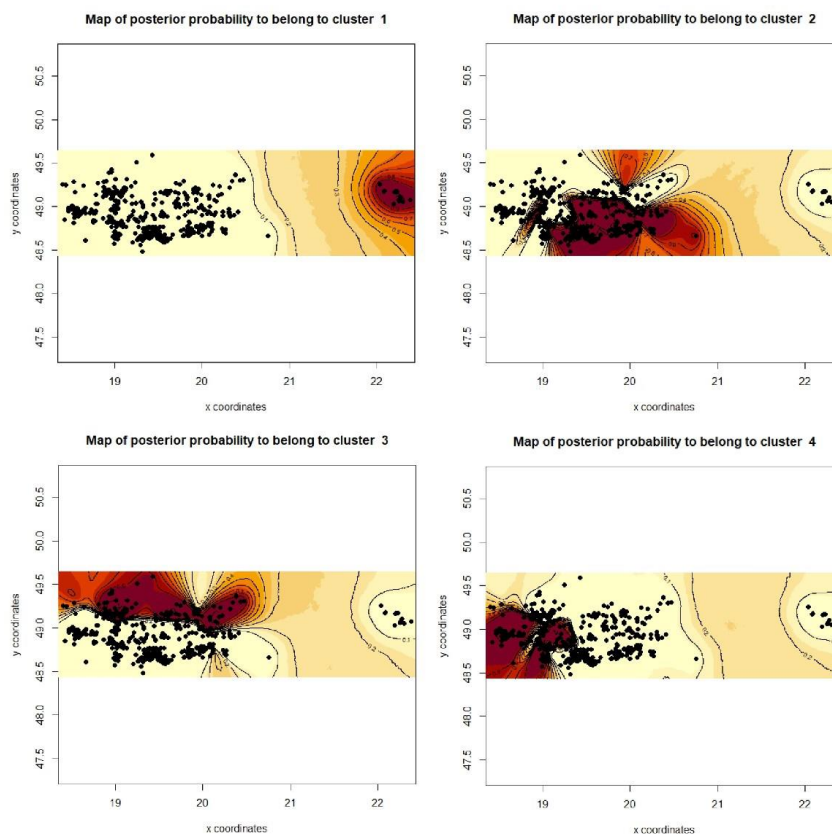
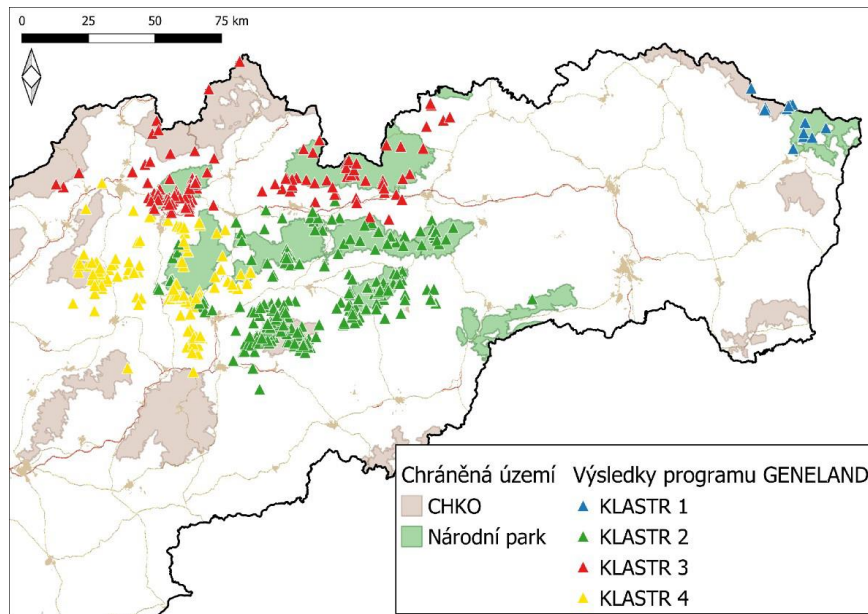
Obr. 17: Grafické znázornění výsledků analýzy v programu GENELAND, která slovenskou populaci medvědů s nejvyšší pravděpodobností rozdělila do čtyřech klastrů.



Estimated cluster membership

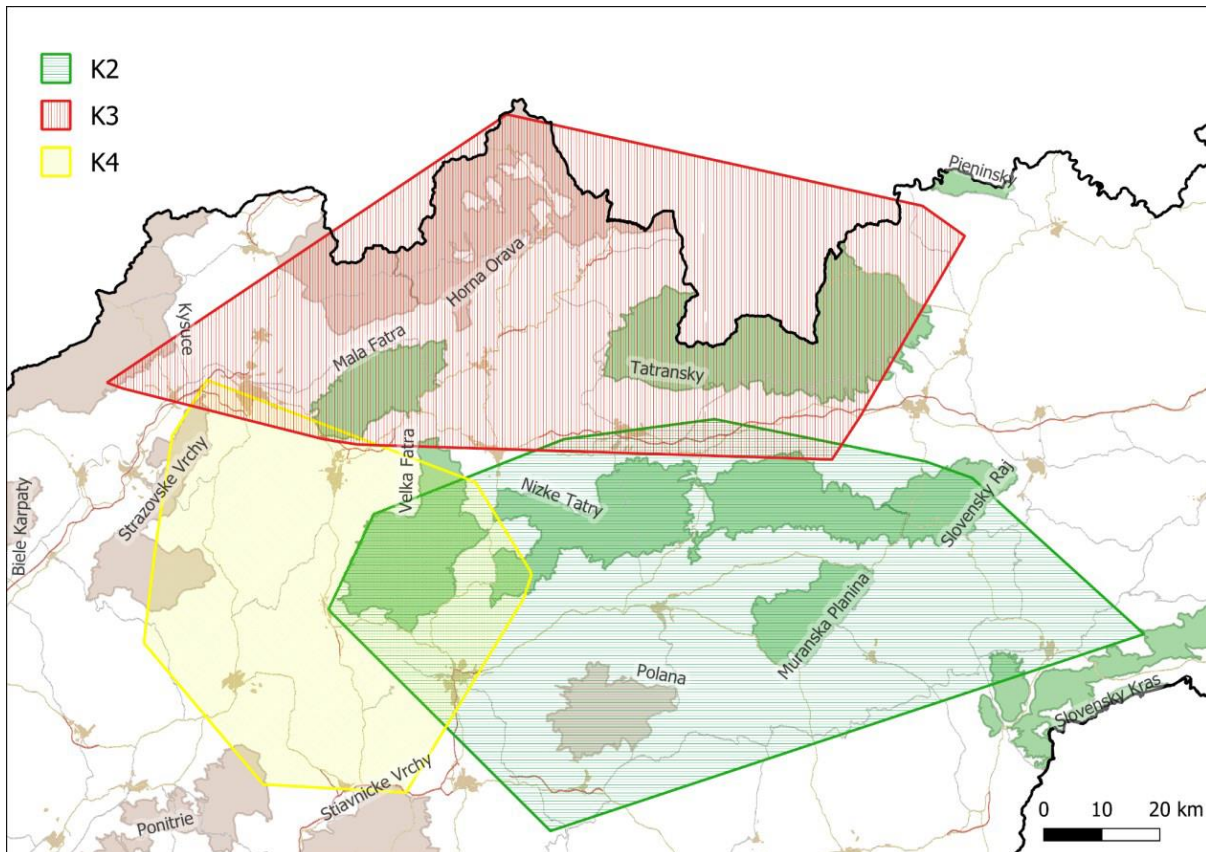
Obr. 18: Na ose x je vynesena zeměpisná délka, na ose y zeměpisná šířka. Barvami jsou znázorněny jednotlivé klastry, uvnitř jednotlivých klastrů jsou body (jedinci), kteří dle alelických frekvencí nejpravděpodobněji náležejí k danému klastru. Zelená barva představuje klastr K1, žlutou barvou je znázorněn klastr K2, oranžovou barvou klastr K3 a bílá barva představuje klastr K4.

První genetický klastr K1 se na základě rozdělení populace podle $K = 4$ odděluje na východním Slovensku (CHKO Východní Karpaty, NP Poloniny). Klastr K2 se rozkládá především na území CHKO Polana, NP Muráňská planina (tyto oblasti pokrývá celé), částečně v NP Slovenský ráj a okrajově v NP Slovenský kras. V západní části klastru K2 dochází k prolínání s klastrem K4, především v oblasti NP Velká Fatra. Klastr K3 se rozkládá v severní části areálu rozšíření druhu, zahrnuje CHKO Horní Orava, téměř celé území TANAPu a NP Malá Fatra, část území PIENAPu a CHKO Kysuce. Okrajově zasahuje i do oblasti NP Velká Fatra a CHKO Strážovské vrchy, kde dochází k překryvu s klastrem K4. V nejsevernější části NAPANTu se tento klastr překrývá s klastrem K2. Poslední klastr K4 zahrnuje především oblast CHKO Strážovské vrchy, NP Velká Fatra, okrajově pokrývá NAPANT, CHKO Ponitří a CHKO Štiavnické vrchy (Obr. 19).



Obr. 19: V horní části se nachází mapové zobrazení jednotlivých klastrů. Na mapě jsou znázorněny dálnice, silnice 1. třídy a významná sídla, které mohou tvořit migrační bariéry. Zbytek obrázku tvoří výsledky grafického zobrazení posteriorní pravděpodobnosti náležitosti k určitému klastru z programu GENELAND. Označení klastrů je pro obě části obrázku shodné.

Pro lepší grafické zobrazení byla v programu QGIS (QGIS Development Team 2021) provedena analýza minimální ohraničující geometrie, kde jako proměnná byly zvoleny jednotlivé body daného klastru a jako typ geometrie byl vybrán konvexní obal (Obr. 20). Výsledek je zobrazen pouze pro K2 až K4, K1 je odizolován na východním Slovensku a nedochází k překryvu s jinými klastry.



Obr. 20: Grafické zobrazení konvexního obalu okolo bodů jednotlivých klastrů. Zeleně K2, červeně K3 a žlutě K4 – stejné barevné znázornění jako na předchozím obrázku. Pro lepší orientaci jsou na mapě zobrazeny i chráněná území, dálnice, silnice 1. třídy a významná sídla.

Genetická diverzita populace

Informace o celkové genetické diverzitě jednotlivých lokusů jsou uvedeny v Tab. 9. Všechny mikrosatelitové lokusy byly polymorfní. Průměrný počet alel na lokus byl 8.9. Největší počet alel měl lokusu M59 (14), oproti tomu nejmenší počet alel měl lokusu G1D (6). Výsledky genetické analýzy ukazují, že se pozorovaná heterozygotnost pro různé lokusy pohybovala v rozmezí od 0.579 do 0.756 (v průměru 0.685) a byla menší oproti očekávané heterozygotnosti. Ta se pohybovala v rozmezí od 0.573 do 0.785 (v průměru 0.724). Průměrná hodnota koeficientu příbuzenského křížení byla 0.051. Průměrná frekvence nulových alel byla stanovena na hodnotu 0.028.

Tab. 9: Tabulka obsahující informace o genetické diverzitě jednotlivých lokusů. Tabulka zahrnuje počet alel (N_{AL}), počet jedinců (N_{ID}), pozorovanou heterozygotnost (H_O), očekávanou heterozygotnost (H_E), koeficient příbuzenského křížení (F_{IS}), frekvence nulových alel (F_{NUL}) a odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (P_{HWE})

Lokus	N_{AL}	N_{ID}	H_E	H_O	* P_{HWE}	F_{IS}	F_{NUL}
MU50	9	631	0.724	0.659	0.002	0.089	0.0506
MU10	9	632	0.735	0.717		0.025	0.0175
G1D	6	632	0.776	0.756		0.025	0.0136
G10H	10	535	0.764	0.746		0.024	0.0102
G10C	9	632	0.699	0.647	1.2E-09	0.074	0.0344
G10P	7	632	0.738	0.676	2.3E-04	0.085	0.0480
M09	7	632	0.675	0.653		0.032	0.0243
M59	14	632	0.785	0.712	9.3E-05	0.094	0.0528
M15	9	514	0.758	0.702		0.074	0.0417
G10L	9	632	0.573	0.579		-0.011	-0.0031
Celkem	8.9	610.4	0.723	0.685		0.051	0.028

* P-hodnoty < 0,05 jsou zobrazeny

Pro jednotlivé klastry byl určen počet alel, očekávaná heterozygotnost, pozorovaná heterozygotnost, a odchylka od HW rovnováhy (Tab. 10). U prvního klastru (K1) nebylo možné určit odchylku od HW rovnováhy z důvodu nízkého počtu jedinců.

Tab. 10: Tabulka obsahující informace o genetické diverzitě jednotlivých lokusů. Tabulka zahrnuje počet alel (N_{AL}), očekávanou heterozygotnost (H_E), pozorovanou heterozygotnost (H_O) a odchylku od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (P_{HWE}).

Lokus	K1				K2				K3				K4			
	N_{AL}	H_E	H_O	* P_{HWE}	N_{AL}	H_E	H_O	* P_{HWE}	N_{AL}	H_E	H_O	* P_{HWE}	N_{AL}	H_E	H_O	* P_{HWE}
MU50	2	0.520	0.846	N	8	0.686	0.664		6	0.781	0.713		8	0.680	0.575	3.5E-03
MU10	5	0.754	0.769	N	8	0.750	0.699		7	0.705	0.757		8	0.680	0.674	
G1D	6	0.760	0.846	N	6	0.776	0.805		6	0.789	0.765		6	0.723	0.646	
G10H	8	0.837	0.833	N	8	0.761	0.755		7	0.708	0.720		8	0.713	0.721	
G10C	5	0.563	0.538	N	7	0.702	0.634		7	0.622	0.632		6	0.681	0.686	
G10P	5	0.594	0.462	N	7	0.763	0.705		5	0.603	0.618		6	0.730	0.686	
M09	5	0.566	0.769	N	7	0.640	0.671		5	0.700	0.699		6	0.660	0.566	
M59	6	0.778	0.692	N	10	0.647	0.623		11	0.826	0.772		11	0.785	0.783	
M15	4	0.758	1.000	N	7	0.661	0.621		8	0.799	0.750		7	0.760	0.724	

G10L	5	0.738	0.692	N	6	0.651	0.651		7	0.504	0.559		7	0.453	0.469	
-------------	---	-------	-------	---	---	-------	-------	--	---	-------	-------	--	---	-------	-------	--

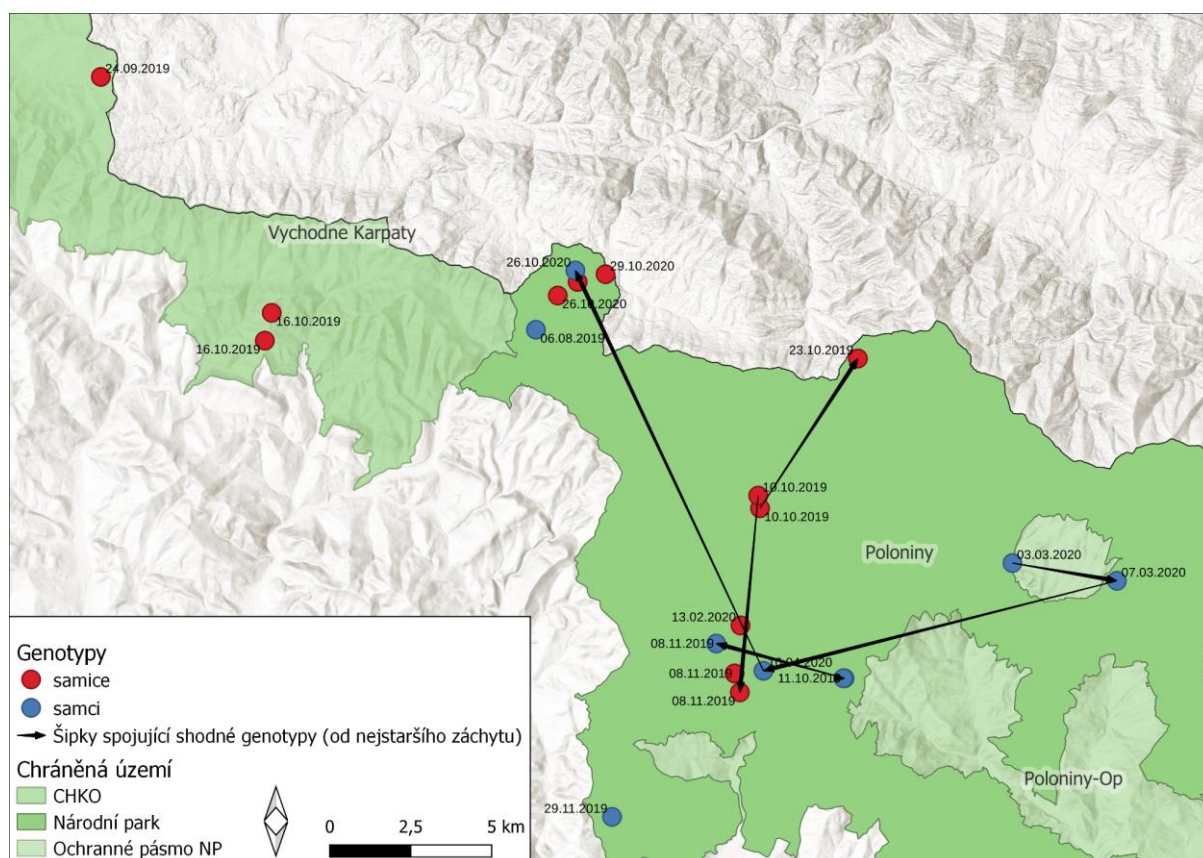
* P-hodnoty < 0,05 jsou zobrazeny; N-nespočteno

Demografie

Velikost populace

Východní Karpaty

Z východní části Slovenska se podařilo určit 21 genotypů a 14 jedinců, z toho 10 samic a 4 samce (Obr. 21). Většina vzorků pocházela z NP Poloniny, v CHKO Východní Karpaty byly získány tři unikátní genotypy samic.



Obr. 21: Mapa zobrazující 14 jedinců medvěda hnědého a jejich opětovné záchyty na území CHKO Východní Karpaty a NP Poloniny. Červenou barvou jsou označeny samice a modrou barvou samci. Každý bod znázorňuje genotyp a šipkou jsou spojeny shodné genotypy. Šipka směřuje od staršího záchytu k novějšímu záchytu jedince.

Odhady početnosti na základě CMR modelů

Západní Karpaty

Charakteristika období a uzavřenost populace

V období označeném jako první sezona bylo pro analýzy určeno 302 genotypů a 233 jedinců. V období označeném jako druhá sezona bylo pro analýzy určeno 696 genotypů a 412 jedinců.

Pomocí softwaru CLOSETEST byla uzavřenost populace ve zvoleném období podpořena modelem na základě heterogenity pravděpodobnosti záchytů, kde byla dle výsledné p hodnoty = 0.955 pro první sezonu, respektive p hodnoty = 0.989 pro druhou sezonu zamítnuta nulová hypotéza (Tab. 11). Uzavřenost populace byla podpořena i druhým modelem v tomto softwaru na základě časově specifické variace v pravděpodobnosti záchytu. Zde byly rovněž na základě p hodnot zamítnuty nulové hypotézy pro přírůstek i pro úbytek jedinců, jak pro první sezonu tak pro druhou sezonu. Pro srovnání byly testovány i obě sezony dohromady. V tomto případě nebyla zamítnuta nulová hypotéza a byl podpořen předpoklad otevřené populace.

Tab. 11: Výsledky testu uzavřenosti populace. V tabulce jsou zobrazeny p hodnoty statistiky komponentů testu uzavřenosti populace pro jednotlivé sezony zvlášť a pro obě sezony dohromady. Nízká p hodnota předpokládá otevřenost populace.

	1. sezona	2. sezona	1. a 2. sezona
Přírůstek jedinců	0.334	0.566	0.006
Úbytek jedinců	0.867	0.971	0

Odhad velikosti populace

V softwaru CAPWIRE byl u obou sezon na základě likelihood ratio testu zvolen jako vhodný model TIRM. V první sezoně byly získány vzorky z 233 jedinců, respektive 130 samic a 103 samců. Následně jsou uvedeny jednotlivé odhady početnosti s 95% intervaly spolehlivosti. Celkový odhad velikosti populace byl stanoven na 971 (932–1414) jedinců (Tab. 12). Pro samice byla stanovena velikost populace na 596 (469–910) jedinců a pro samce na 379 (336–588) jedinců. Ve druhé sezoně byly získány vzorky z 412 jedinců, respektive 186 samic a 226 samců. Celkový odhad velikosti populace byl stanoven na 1056 (1012–1275) jedinců. Pro samice byla stanovena velikost populace na 583 (580–833) jedinců a pro samce na 495 (479–603) jedinců.

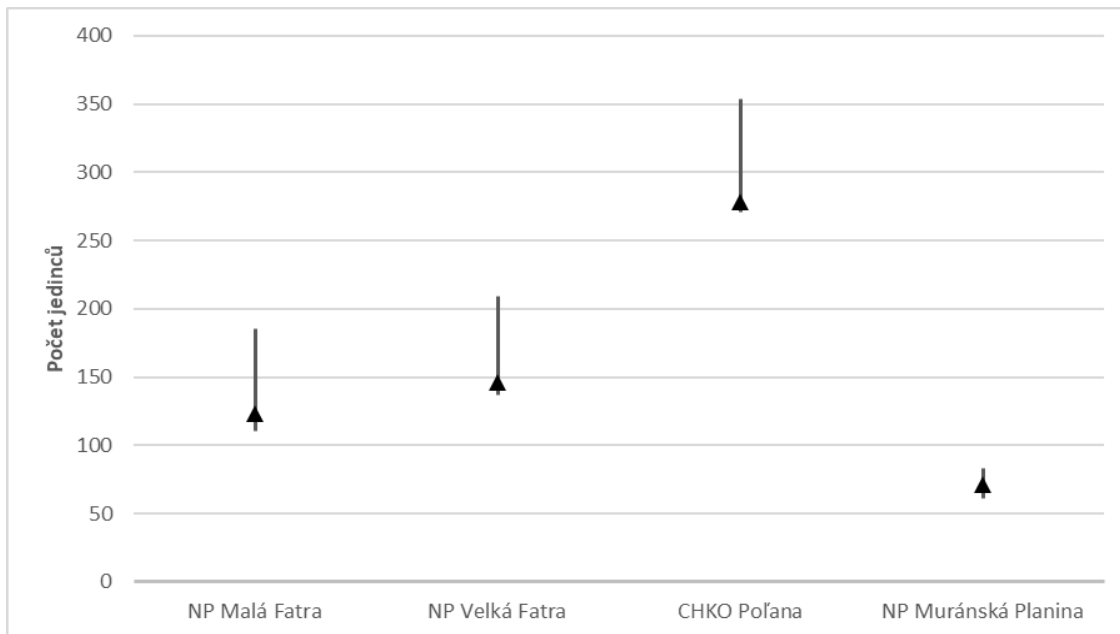
Tab. 12: Odhady velikosti populace medvěda hnědého získané pomocí softwaru CAPWIRE. V tabulce je uveden 95% interval spolehlivosti pro každý odhad velikosti populace, první sezona zahrnuje období od září 2019 do srpna 2020 a druhá sezona zahrnuje období od září 2020 do srpna 2021.

capwire	1. sezona	2. sezona
celkem	971 (932–1414)	1056 (1012–1275)
samice	596 (469–910)	583 (580–833)
samci	379 (336–588)	495 (479–603)

Pomocí softwaru CAPWIRE byl stanoven odhad velikosti populace i pro jednotlivé národní parky a chráněná krajinná území (Tab. 13). Na území CHKO Kysuce, Pieninského NP, NP Slovenský kras a CHKO Východní Karpaty byly identifikováni pouze jedinci bez opětovných záchytů. U většiny území byl na základě likelihood ratio testu vybrán pro odhad velikosti populace model ECM. Pro nejlépe ovzorkované území byl vytvořen graf (Obr. 22).

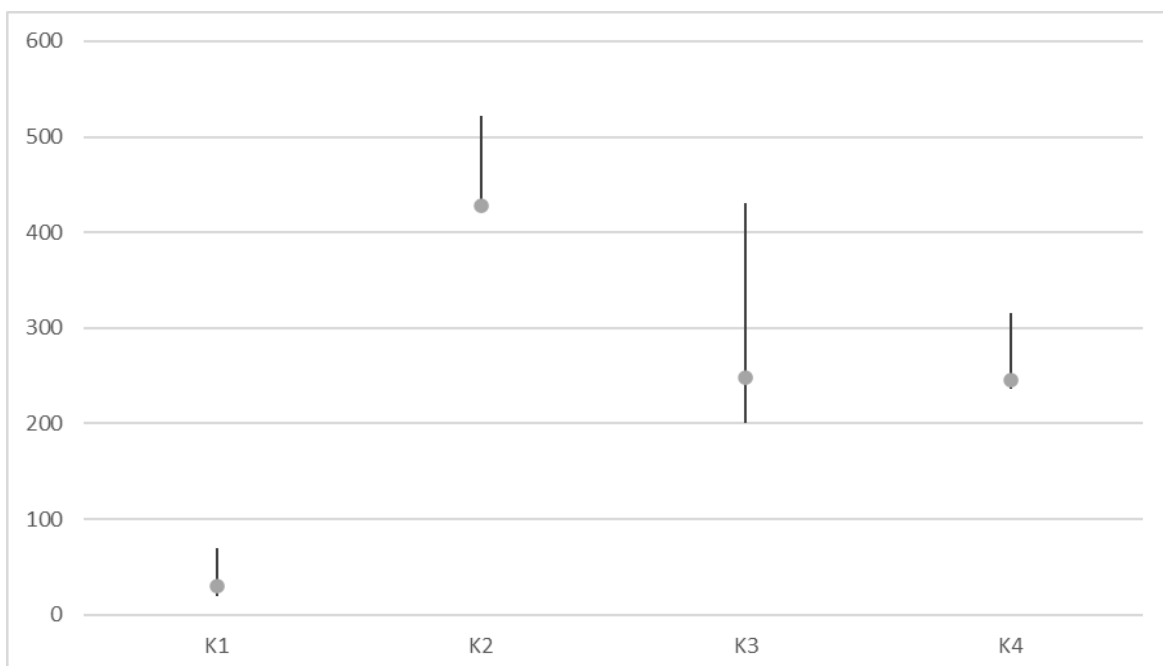
Tab. 13: Výsledky odhadů velikosti populace medvěda hnědého metodou CMR za pomoci softwaru CAPWIRE. V tabulce je uveden počet genotypů pro lépe ovzorkovanou sezonu v kompetenčních územích NP a CHKO, (1) označuje první sezonu, tedy období do září 2019 do srpna 2020 a (2) označuje druhou sezonu, tedy období od září 2020 do srpna 2021. Dále je v tabulce uveden počet jedinců pro toto období a model, který byl vybrán na základě likelihood ratio testu. U odhadů, které bylo možné stanovit jsou uvedeny 95% intervaly spolehlivosti.

Kompetenční území NP a CHKO	Počet genotypů	Počet jedinců	CAPWIRE Model	Odhad velikost populace	95% interval spolehlivosti
CHKO Polana (2)	251	126	TIRM	278	271–354
NP Velká Fatra (2)	128	56	TIRM	146	137–209
NP Muráňská planina (2)	89	41	ECM	71	61–83
NP Malá Fatra (2)	57	42	TIRM	123	110–185
NP Nízké Tatry (1)	42	37	-	-	-
TANAP (1)	21	16	-	-	-
CHKO Strážovské vrchy (2)	33	18	ECM	47	30–74
CHKO Ponitří (2)	23	9	ECM	56	33–119
NP Slovenský ráj (2)	26	11	ECM	14	12–18
CHKO Cerová vrchovina (2)	21	13	ECM	22	17–31
NP Poloniny (1)	14	8	-	-	-
CHKO Kysuce (1)	6	4	-	-	-
CHKO Štiavnické vrchy (2)	12	8	-	-	-
NP Slovenský kras (1)	4	4	-	-	-
Pieninský NP (1)	3	3	-	-	-
CHKO Východní Karpaty (1)	3	3	-	-	-
CHKO Horní Orava (1)	3	2	-	-	-



Obr. 22: Graf s odhady velikosti populace medvěda hnědého pomocí softwaru CAPWIRE za použití modelu TIRM pro území s největším počtem opětovných záchytů. Odhady byly vypočteny z dat pro druhou sezonu, tzn. období od září 2020 do srpna 2021 a jsou uvedeny s 95% intervalem spolehlivosti.

Na základě dat pro druhou sezonu byly pro obě pohlaví dohromady stanoveny odhady početnosti pro jednotlivé klastry (Obr. 23). Podle likelihood ratio testu byl pro všechny klastry zvolen jako vhodný model TIRM. Odhad početnosti pro první klast (K1) byl stanoven na 30 (20–69) jedinců, pro druhý klast (K2) na 428 (425–522) jedinců, pro třetí klast (K3) na 248 (201–431) jedinců a pro čtvrtý klast (K4) na 245 (236–315) jedinců.



Obr. 23: Graf s odhady velikosti populace medvěda hnědého pomocí softwaru CAPWIRE za použití modelu TIRM pro jednotlivé klastry určené na základě klastrovacích analýz. Odhady byly vypočteny z dat pro druhou sezonu, tzn. období od září 2020 do srpna 2021 a jsou uvedeny s 95% intervalem spolehlivosti.

Pro analýzu v programu MARK byl nejprve stanoven počet diskretních intervalů, přičemž první sezona byla rozdělena do 25 záchyťových událostí a druhá sezona byla rozdělena do 20 záchyťových událostí.

Pro subpopulaci medvěda hnědého v Západních Karpatech byly určeny odhady velikosti populace pro každou sezonu zvlášť. Hodnoty jednotlivých modelů pro první sezonu jsou uvedeny v Tab. 14 a pro druhou sezonu v Tab. 15. Odhady velikosti populace byly stanoveny pro celou subpopulaci a odděleně pro jednotlivá pohlaví. Pro všechny odhady byl vypočten 95% interval spolehlivosti (Tab. 16). V první sezoně byl celkový odhad velikosti populace stanoven na 1023 (799–1346) jedinců. Pro samice byla stanovena velikost populace na 557 (428–746) jedinců a pro samce na 466 (357–629) jedinců. Ve druhé sezoně byl celkový odhad velikosti populace stanoven na 1074 (787–1565) jedinců. Pro samice byla stanovena velikost populace na 594 (433–874) jedinců a pro samce na 480 (348–709) jedinců.

Tab. 14: Výsledky výběru modelu pro uzavřenou populaci v programu Mark pro první sezonu. V tabulce jsou pro jednotlivé modely uvedeny hodnoty Akaikého informačního kritéria a pravděpodobnost modelu.

Model	AICc	Δ AICc	AICc Weights	Model Likelihood
{Mh2}	2366.28	0	0.73927	1
{MORE}	2369.08	2.8001	0.18229	0.2466
{Mbh2}	2372.283	6.003	0.03675	0.0497
{M0}	2372.285	6.0045	0.03672	0.0497
{Mb}	2376.289	10.0086	0.00496	0.0067
{MtRE}	2399.19	32.9102	0	0
{MbRE}	2404.318	38.0376	0	0
{MtbRE}	2407.142	40.8618	0	0
{Mtb}	2418.809	52.5293	0	0
{Mtbh2}	2418.81	52.53	0	0
{Mt}	2420.442	54.1619	0	0
{Mth2}	2420.442	54.1619	0	0

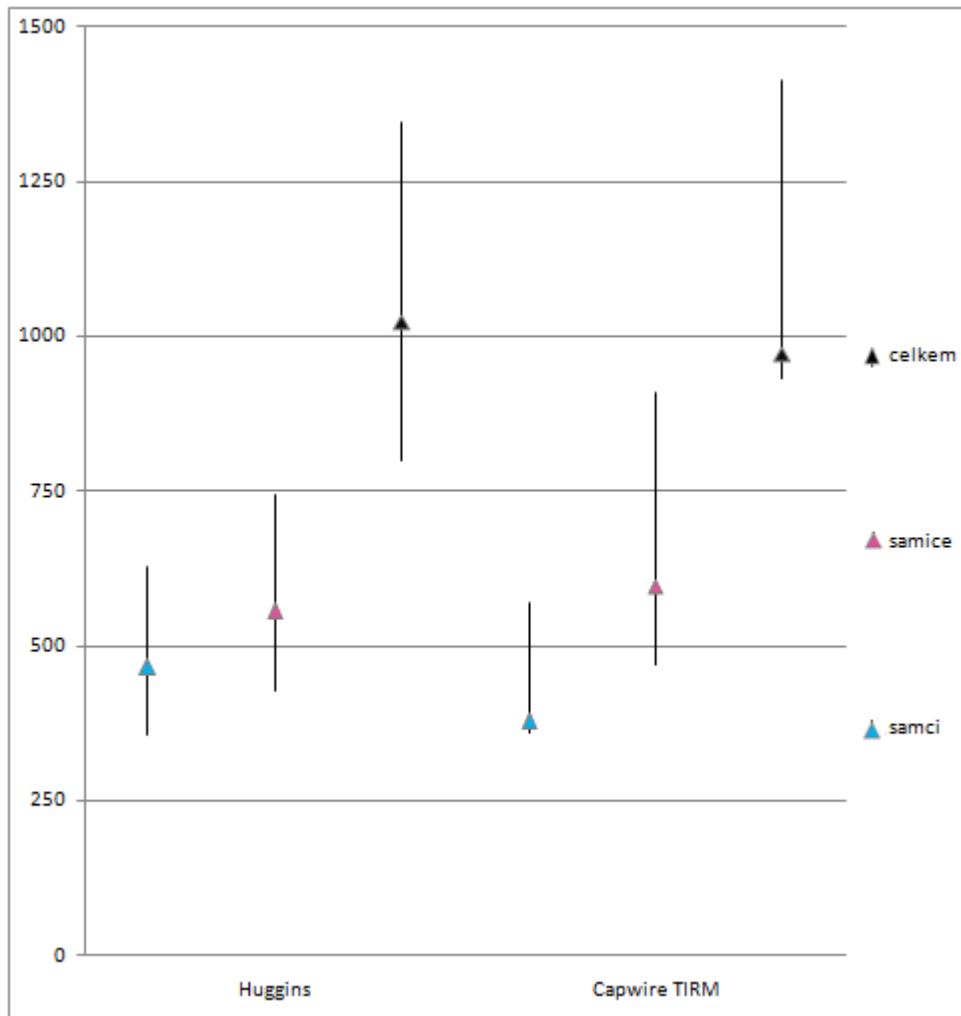
Tab. 15: Výsledky výběru modelu pro uzavřenou populaci v programu MARK pro druhou sezonu. V tabulce jsou pro jednotlivé modely uvedeny hodnoty Akaikeho informačního kritéria a pravděpodobnost modelu.

Model	AICc	Δ AICc	AICc Weights	Model Likelihood
{M0RE}	3695.405	0	0.90778	1
{Mb2}	3700.468	5.0637	0.07218	0.0795
{MtRE}	3703.581	8.1763	0.01522	0.0168
{Mt2}	3706.069	10.6641	0.00439	0.0048
{MbRE}	3712.396	16.9915	0.00019	0.0002
{M0}	3713.048	17.6439	0.00013	0.0001
{Mb}	3714.664	19.2590	0.00006	0.0001
{M2}	3715.191	19.7863	0.00005	0.0001
{MtRE}	3728.790	33.3855	0	0
{Mt}	3746.462	51.0574	0	0
{M2}	3746.462	51.0574	0	0
{Mt}	3747.991	52.5862	0	0

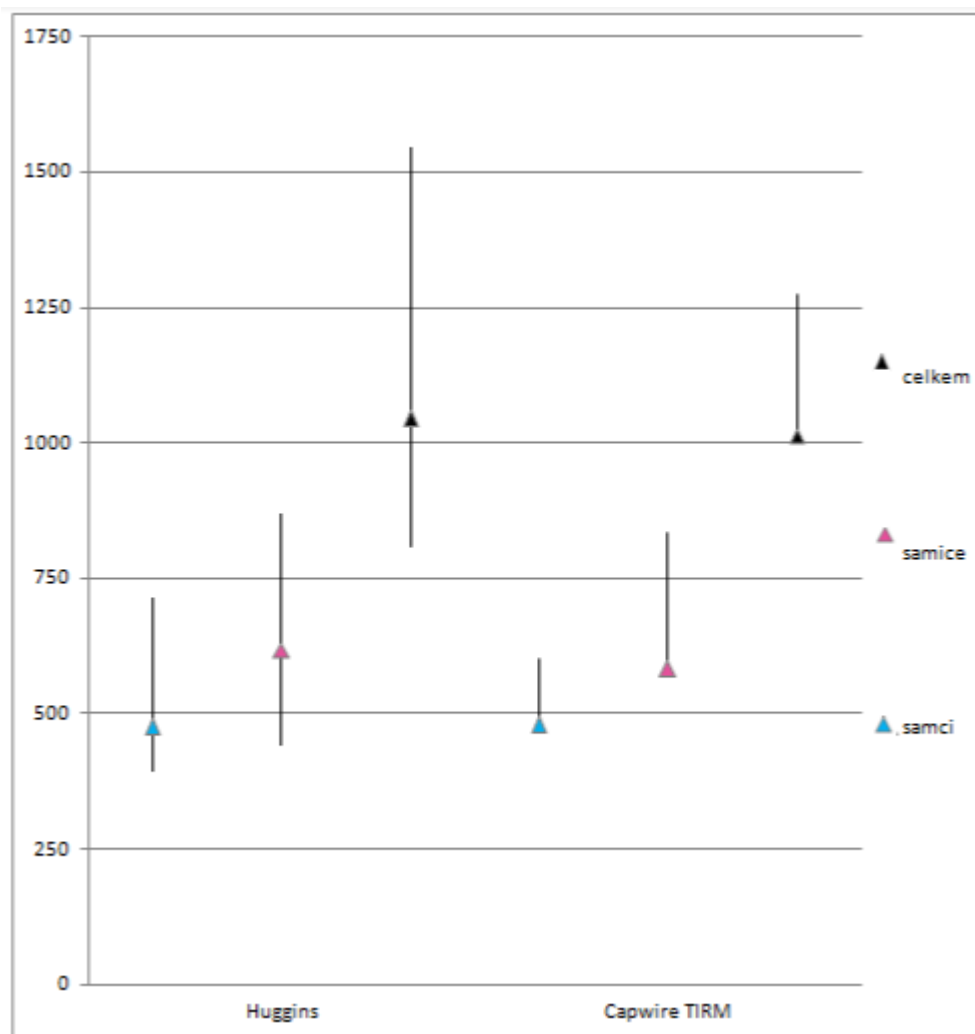
Tab. 16: Odhady velikosti populace medvěda hnědého získané pomocí softwaru MARK. V tabulce je uveden i 95% interval spolehlivosti pro každý odhad velikosti populace, první sezona zahrnuje období od září 2019 do srpna 2020 a druhá sezona zahrnuje období od září 2020 do srpna 2021.

MARK	1. sezona	2. sezona
celkem	1022 (799–1346)	1074 (787–1565)
samice	557 (428–746)	594 (433–874)
samci	466 (357–629)	480 (348–709)

Porovnání výsledných odhadů velikosti populace z programu MARK a CAPWIRE je pro první sezonu na Obr. 24 a pro druhou sezonu na Obr. 25.

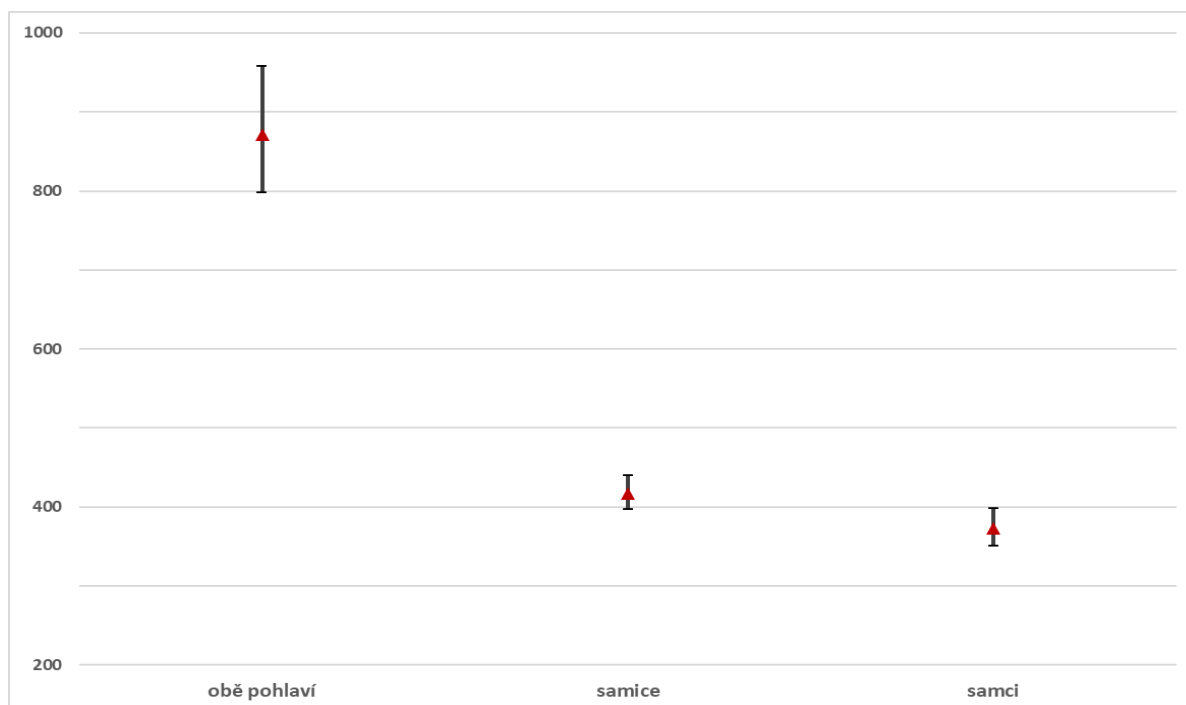


Obr. 24: Odhady velikosti populace medvěda hnědého, získané pomocí odlišných capture-recapture modelů. Na grafu jsou znázorněny odhady populační velikosti zvlášť pro samce, samice a celkový odhad pro první sezonu, tedy období od září 2019 do srpna 2020. Všechny odhady jsou uvedeny s 95% intervalem spolehlivosti.



Obr. 25: Graf zobrazující odhady velikosti populace medvěda hnědého, získané pomocí odlišných capture-recapture modelů. Na grafu jsou znázorněny odhady populační velikosti zvlášť pro samce, samice a celkový odhad pro druhou sezonu, tedy období od září 2020 do srpna 2021. Všechny odhady jsou uvedeny s 95% intervalem spolehlivosti.

Pomocí prostorově explicitního CMR přístupu byl pro druhou sezonu odhad velikosti populace pro obě pohlaví stanoven na 871 (798–958) jedinců. Pro samice byl stanoven odhad 418 (397–440) jedinců a pro samce 373 (351–398) jedinců (Obr. 26).



Obr. 26.: Grafické znázornění odhadů velikosti populace pro druhou sezonu pomocí balíčku SECR. Jsou znázorněny odhady pro celou populaci a pro jednotlivá pohlaví. Odhady jsou zobrazeny s 95% intervalem spolehlivosti.

Pomocí prostorově explicitního CMR přístupu byla na základě nulového modelu pro druhou sezonu stanovena hustota populace na 6.6 jedince/100 km² na ploše 13053.98 km², pro samice 6.1 jedince/100 km² a pro samce 3.1 jedince/100 km². Při použití pokročilejšího modelu byla denzita populace na vymezeném území určena na 7.7 jedince/100 km² pro obě pohlaví, odhady denzity pro samce a samice byli oproti nulovému modelu srovnatelné, nebo nižší (Tab. 17).

Tab. 17: Odhady hustoty populace určené pomocí balíčku SECR. Uvedené hodnoty jsou stanoveny pro 100 km².

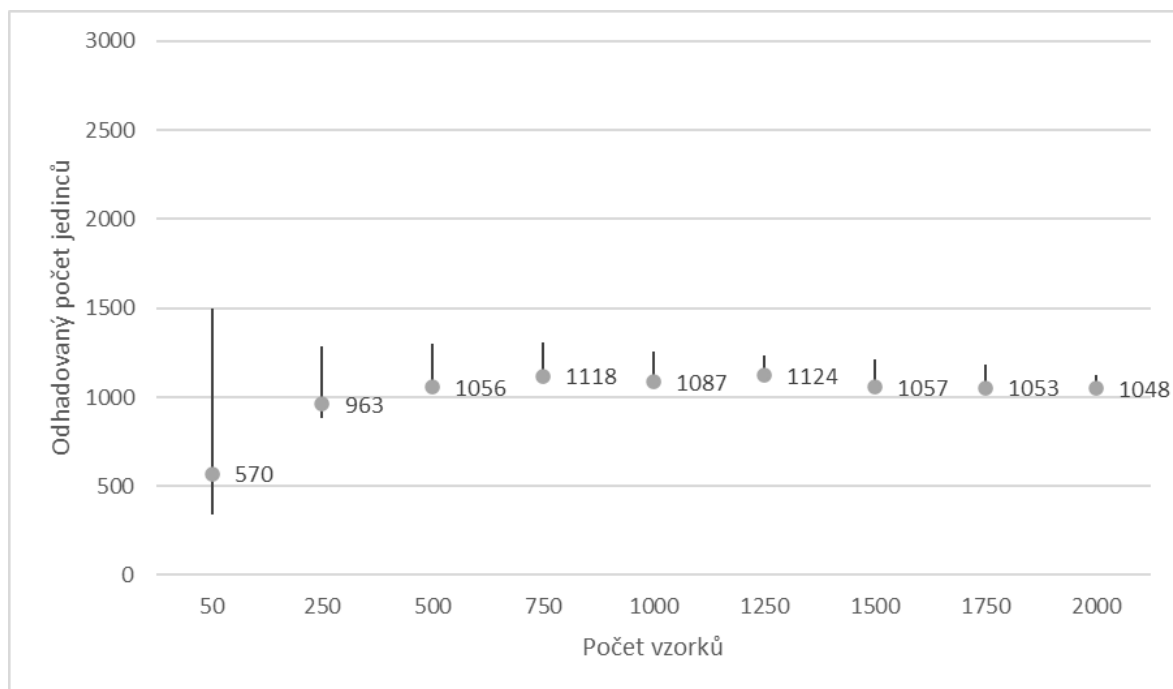
Nulový model	denzita/100 km²	lcl	ucl
obě pohlaví	6.6	5.7	7.7
samice	6.1	4.6	7.9
samci	3.1	2.6	3.7
Pokročilejší model	denzita/100 km²	lcl	ucl
obě pohlaví	7.7	6.2	9.6
samice	5.2	3.7	7.6
samci	3.4	2.5	4.5

lcl = spodní hranice odhadu; **ucl** = horní hranice odhadu

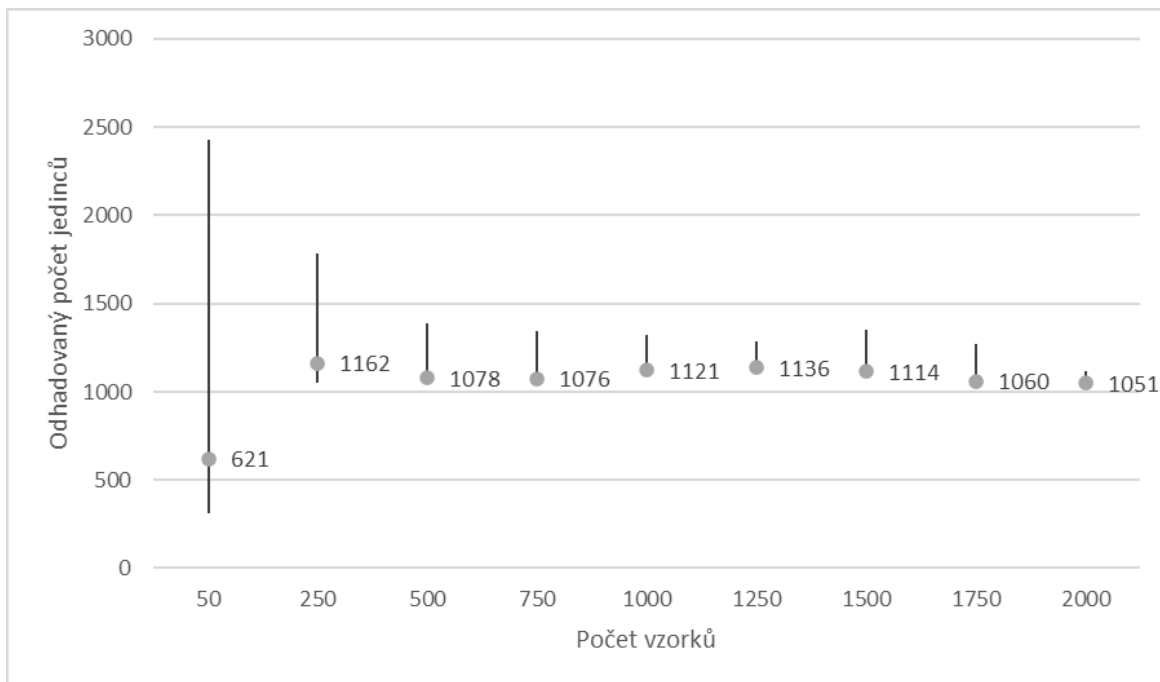
Testování správnosti odhadů velikosti populace pomocí simulací

Odhady pro populaci o velikosti 1000 jedinců s odlišným počtem vzorků na základě simulovaných dat byly oproti reálné velikosti populace mírně nadhodnocené a to od 500 vzorků

u uniformní distribuce (Obr. 27) a od 250 vzorků u gamma distribuce získané z parametrů na základě reálných dat (Obr. 28). S rostoucím počtem vzorků docházelo ke zmenšení konfidenčních intervalů.

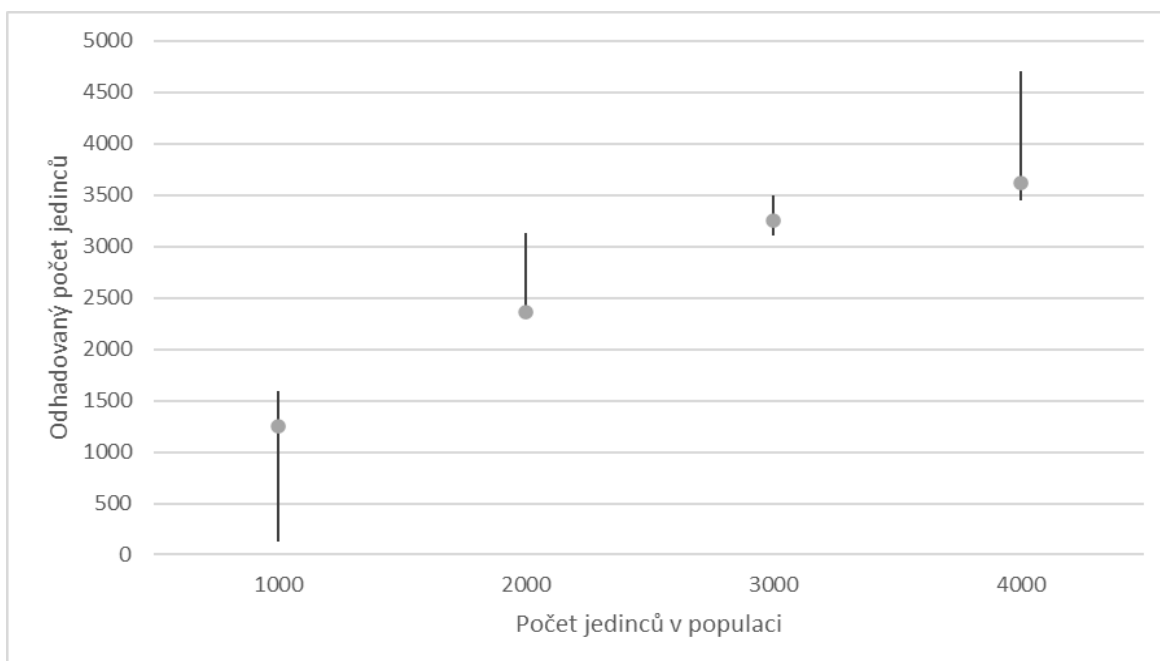


Obr. 27: Výsledky simulační studie na základě uniformní distribuce s pravděpodobností záchytu jedince 1-100%. Odhad velikosti populace pomocí softwaru CAPWIRE - model TIRM (osa y) z fixní velikostí populace 1000 jedinců a daného počtu vzorků (osa x).

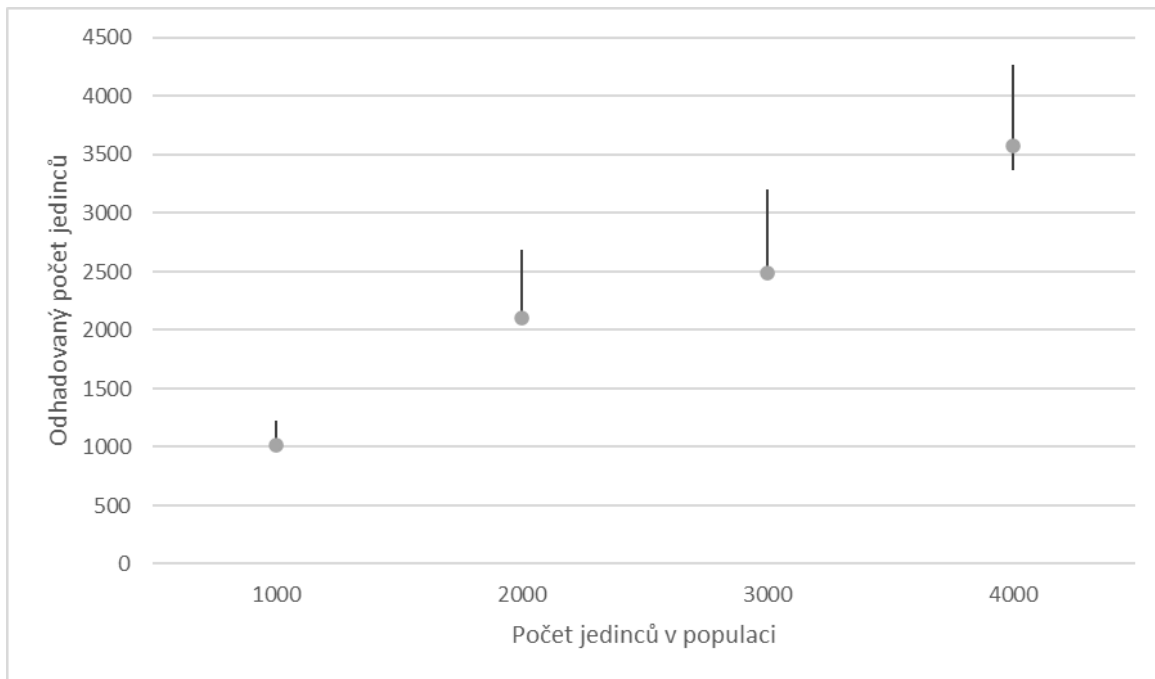


Obr. 28: Výsledky simulační studie na základě gamma distribuce z parametrů získaných na základě reálných dat. Odhad velikosti populace pomocí softwaru CAPWIRE - model TIRM (osa y) z fixní velikostí populace 1000 jedinců a daného počtu vzorků (osa x).

U simulací s fixním počtem vzorků a rozdílnou velikostí populace na základě uniformní distribuce (Obr. 29) byly stanoveny vyšší odhady početnosti než u simulační studie na základě gamma distribuce (Obr. 30). U obou distribucí dochází s rostoucí velikostí populace ke zvyšování výsledného odhadu početnosti.



Obr. 29: Výsledky simulační studie na základě uniformní distribuce s pravděpodobností záchytu jedince 1-100%. Odhad velikosti populace pomocí softwaru CAPWIRE - model TIRM (osa y) z fixní velikostí počtu vzorku a dané velikostí populace (osa x).



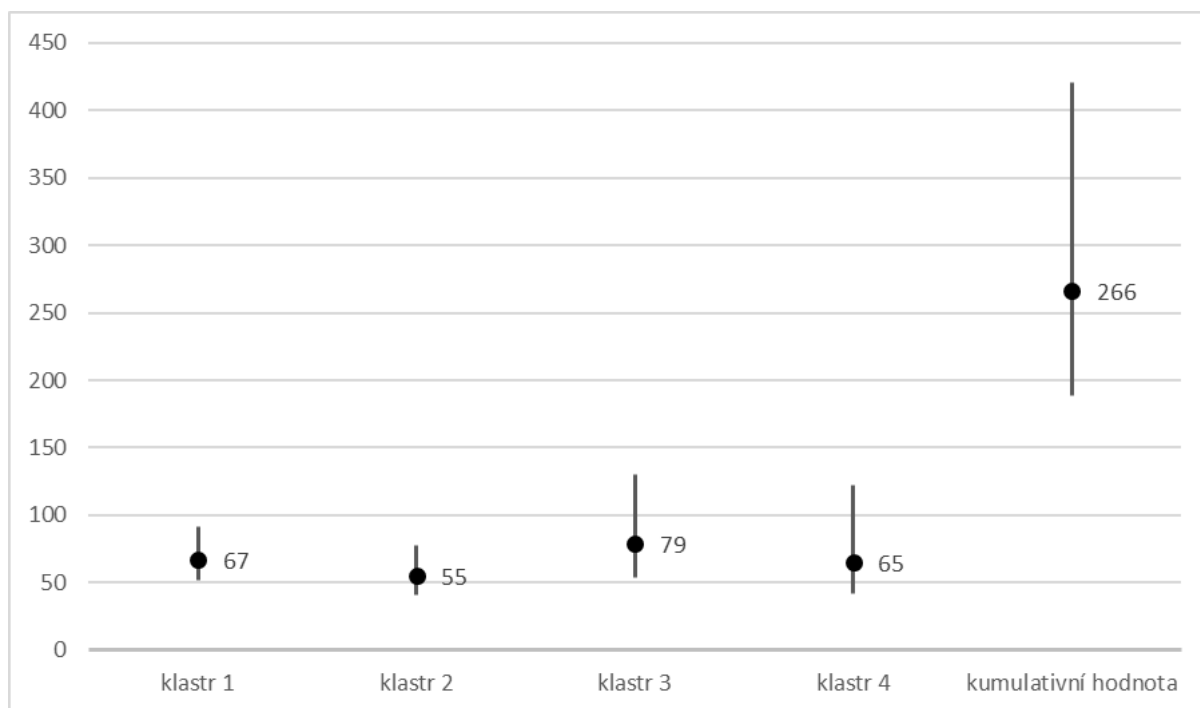
Obr. 30: Výsledky simulační studie na základě gamma distribuce z parametrů získaných na základě reálných dat. Odhad velikosti populace pomocí softwaru CAPWIRE - model TIRM (osa y) z fixní velikosti počtu vzorku a dané velikosti populace (osa x).

Efektivní velikost populace

Pomocí metody vazebné nerovnováhy byly stanoveny odhady efektivní velikosti populace pro jednotlivé klastry (Tab. 18). Výsledky s intervalem spolehlivosti jsou znázorněny na Obr. 31.

Tab. 18: Odhady efektivní velikosti populace medvěda hnědého získané pomocí metody vazebné nerovnováhy v softwaru LDNE. V tabulce je uveden i 95% interval spolehlivosti pro každý odhad efektivní velikosti populace.

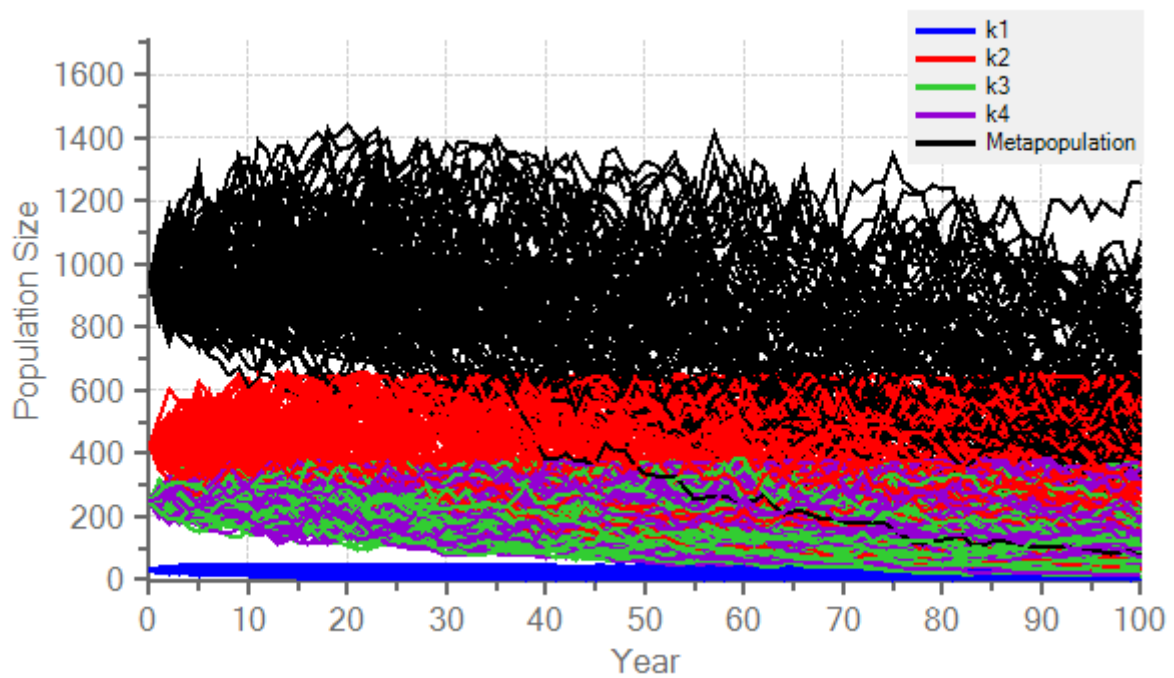
	N_e	Interval spolehlivosti
klastr 1	65	42–122
klastr 2	67	52–91
klastr 3	79	54–130
klastr 4	55	41–78
kumulativní hodnota	266	189–421



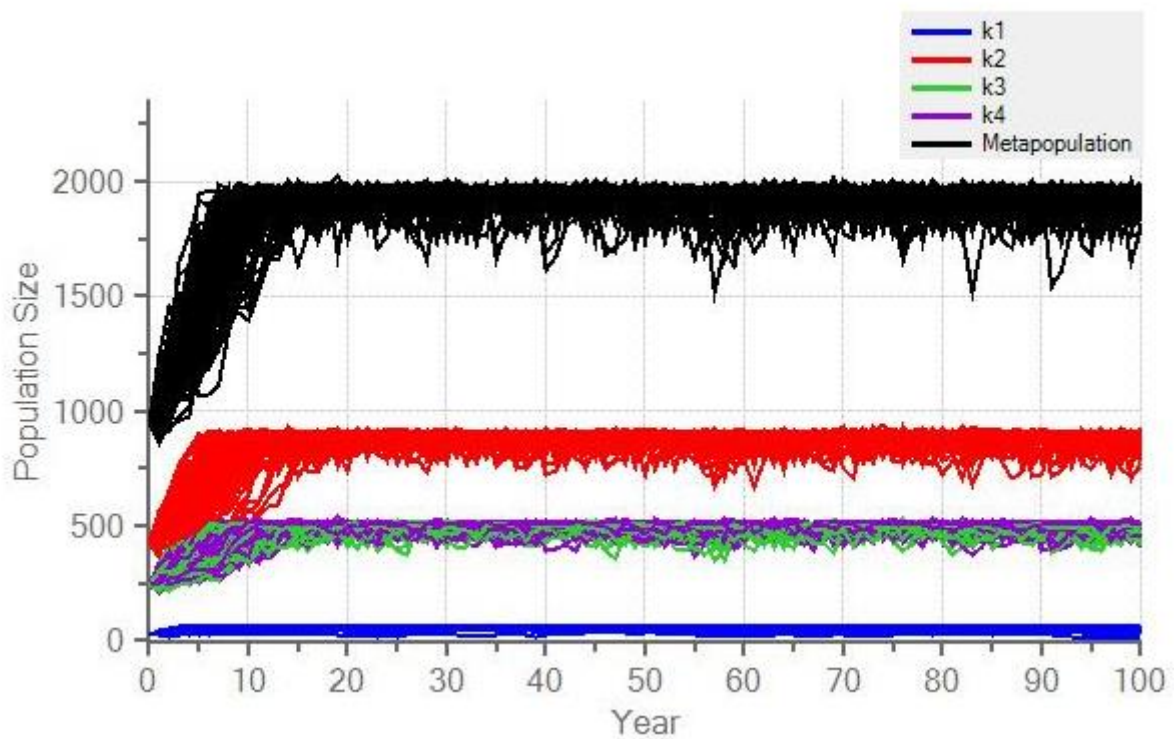
Obr. 31: Graf zobrazující odhady efektivní velikosti populace medvěda hnědého, získané pomocí metody vazebné nerovnováhy v softwaru LDNE. Na grafu je znázorněn celkový odhad efektivní velikosti populace a odhady pro jednotlivé klastry. Všechny odhady jsou uvedeny s 95% intervalem spolehlivosti.

Analýza životaschopnosti populace

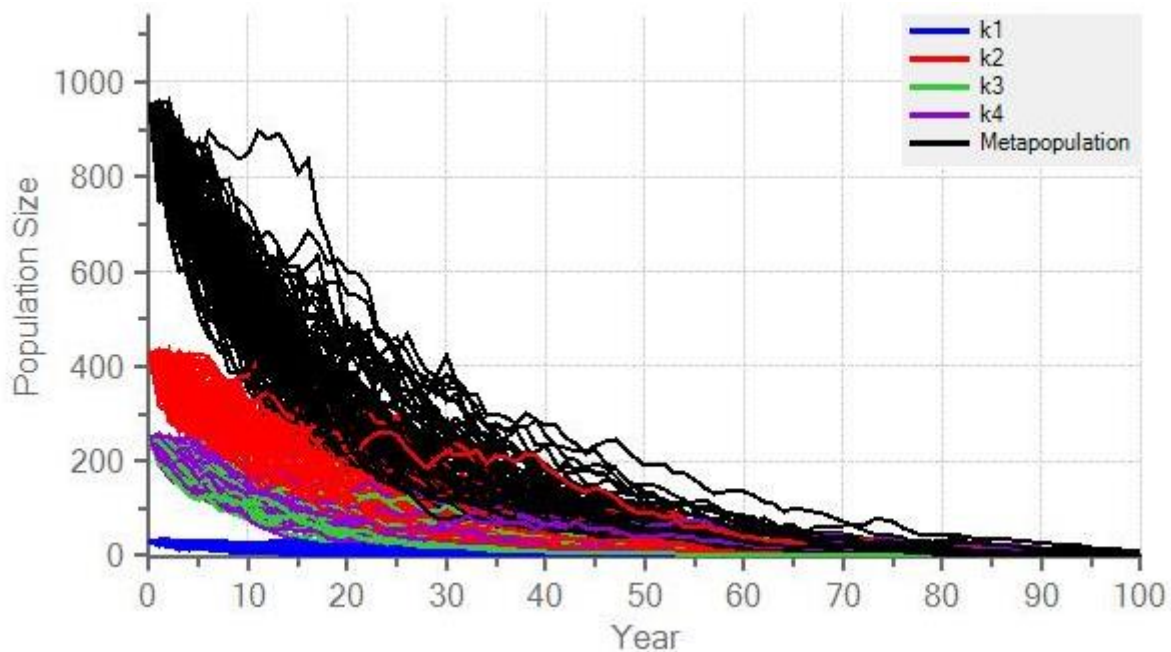
Na základě použitých demografických parametrů byly vytvořeny následující grafy. Na Obr. 32 byly použity průměrné hodnoty vstupních parametrů. Na tomto obrázku lze v průběhu času vidět mírně negativní vývoj populace. Pro Obr. 33 byly použity maximální hodnoty vstupních parametrů. Výsledky této populační predikce jsou omezeny hodnotami nosné kapacity prostředí, které byly stanoveny na dvojnásobek odhadů početnosti pro jednotlivé klastry. Pro analýzu životaschopnosti populace byly použity i minimální hodnoty vstupních parametrů. Výsledek predikce je znázorněn na Obr. 34. V tomto případě byl stanoven negativní populační trend s pravděpodobnou extinkcí v průběhu následujících 100 let.



Obr. 32: Výsledky modelu populační predikce medvěda hnědého při použití průměrných hodnot vstupních parametrů. Odhadovaná velikost populace (osa y) v průběhu let (osa x).



Obr. 33: Výsledky modelu populační predikce medvěda hnědého při použití maximálních hodnot vstupních parametrů. Odhadovaná velikost populace (osa y) v průběhu let (osa x).

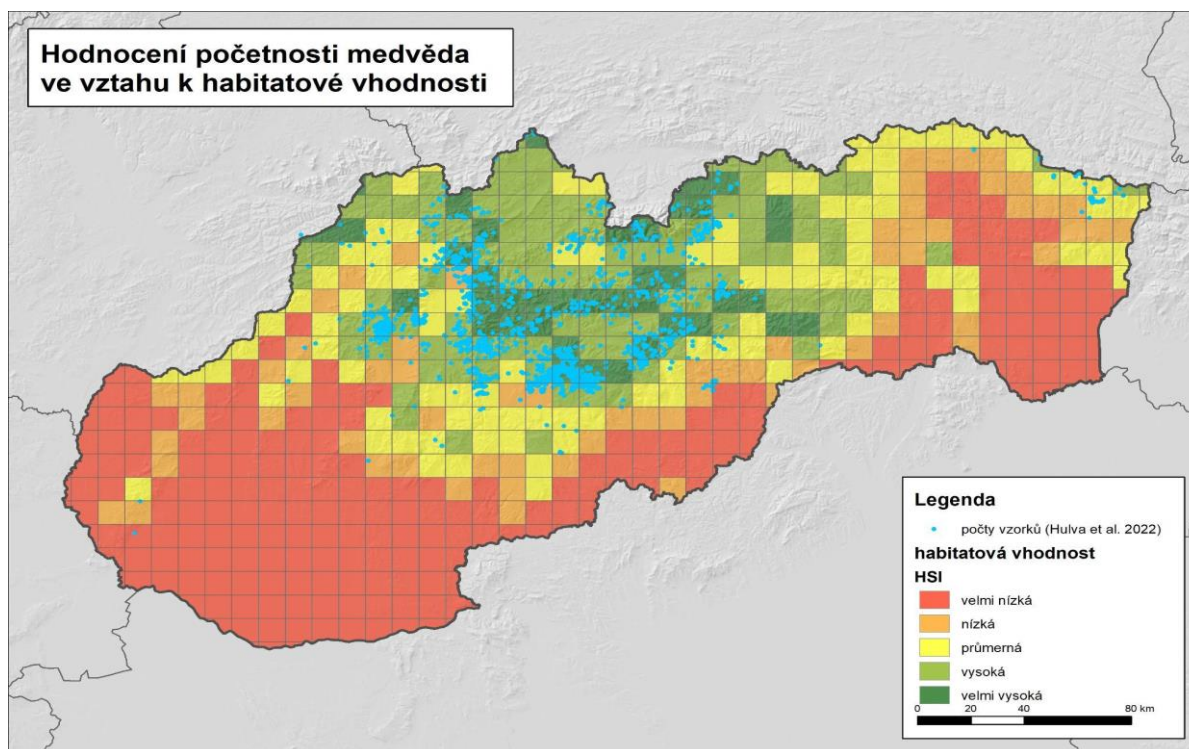


Obr. 34: Výsledky modelu populační predikce medvěda hnědého při použití minimálních hodnot vstupních parametrů. Odhadovaná velikost populace (osa y) v průběhu let (osa x).

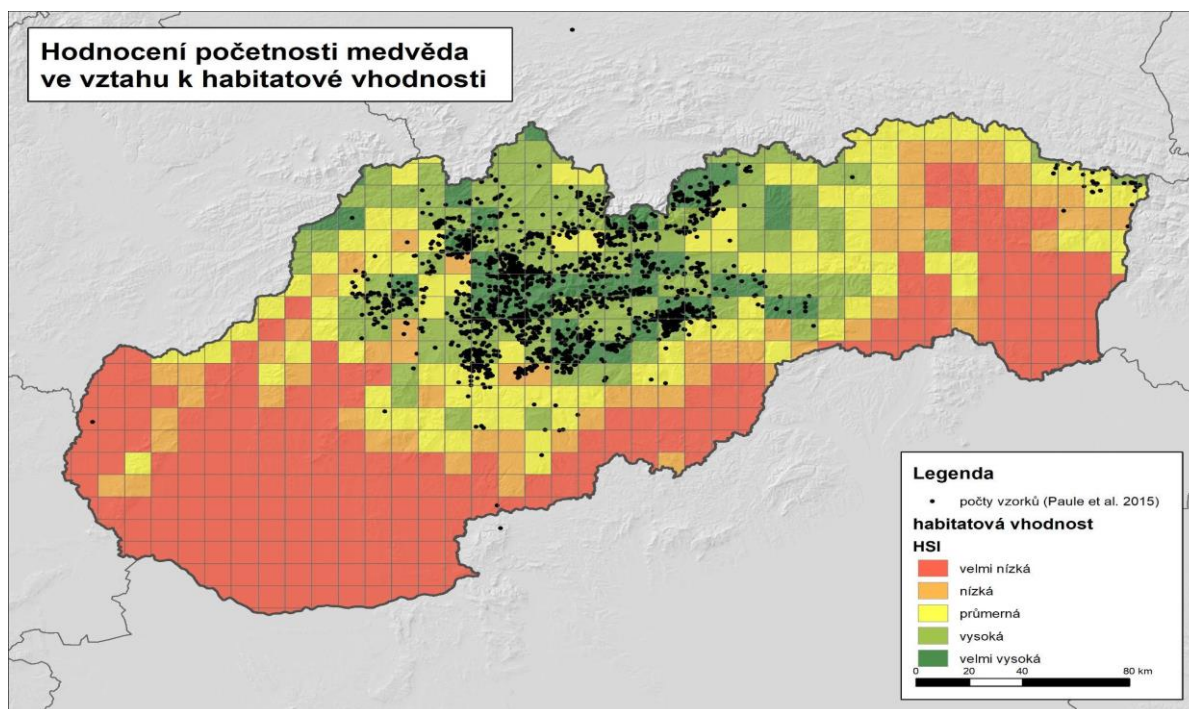
Změna velikosti populace

Porovnání distribuce vzorků

Pomocí habitatového modelování byla vytvořena podkladová vrstva mapy, která pomocí škály barev definuje vhodnost habitatu. Tmavě zelená a zelená barva představují velmi vysokou a vysokou vhodnost habitatu, např. klimaxové lesní ekosystémy a souvislý krajinný pokryv jednotlivých orografických celků. Žlutou barvou je zobrazena průměrná vhodnost habitatu, např. oblasti v podhůří jednotlivých orografických celků, kde se promítá vliv lidské činnosti. Nízkou a velmi nízkou vhodnost habitatu představuje oranžová a červená barva, jedná se např. o přirozené bariéry v podobě kotlin a údolí bez souvislého krajinného pokryvu, významné toky nebo antropogenní činností vzniklé krajinné prvky v podobě liniových staveb, zastavěných území nebo intenzivně obhospodařovaných oblastí. Na podkladovou vrstvu byly vizualizovány lokality sběru jednotlivých vzorků získaných v rámci této studie (Obr. 35) a během předchozí studie (Obr. 36).



Obr. 35: Mapa zobrazující vhodnost habitatu pro medvěda hnědého na území Slovenska. Byla použita EEA (European Environment Agency) síť 10x10 km. Vhodnost habitatu (HSI) je vyjádřena škálou barev, od červené barvy představující nejméně vhodný habitat po tmavě zelenou barvu, která zobrazuje nejvhodnější habitat pro výskyt. Modré body zobrazené na mapě představují lokality sběru jednotlivých vzorků, které byly získány během recentní studie.



Obr. 36: Mapa zobrazující vhodnost habitatu pro medvěda hnědého na území Slovenska. Byla použita EEA (European Environment Agency) síť 10x10 km. Vhodnost habitatu (HSI) je vyjádřena škálou barev, od červené barvy představující nejméně vhodný habitat po tmavě zelenou barvu, která zobrazuje nejvhodnější habitat pro výskyt. Černé body zobrazené na mapě představují lokality sběru jednotlivých vzorků, které byly získány během předchozí studie.

Populační hustota

Celková velikost kompetenčních území jednotlivých správ CHKO a NP, na kterých byl geneticky prokázán výskyt, činila 30 680 km², pro tuto oblast byla na základě počtu unikátních genotypů ze druhé sezony stanovena denzita 1 jedince na 100 km². Pro území Západních Karpat byl proveden výpočet denzity na základě počtu jedinců a odhadu početnosti z druhé sezony. Populační hustota byla pro tuto oblast určena na 4 jedince na 100 km² na základě unikátních genotypů a na 10 jedinců na 100 km² na základě odhadů početnosti (Tab. 19).

Tab. 19: Odhady populační hustoty medvěda hnědého pro uvedená území. Uvedený počet jedinců zahrnuje jedince z první a z druhé sezony, bez usmrcených jedinců. Populační hustota byla stanovena na základě počtu jedinců a na základě odhadu početnosti pomocí softwaru CAPWIRE a pomocí programu MARK za použití dat z druhé sezony (září 2020 až srpen 2021).

Oblast	Počet jedinců	Velikost populace CAPWIRE	Velikost populace MARK	Velikost území (km ²)	Populační hustota (jedinec/100 km ²) (počet jedinců)	Populační hustota (jedinec/100 km ²) (CAPWIRE)	Populační hustota (jedinec/100 km ²) (MARK)
kompetenční území s prokázáním výskytem	392	-	-	30 680	1	-	-
území výskytu v Západních Karpatech	389	1056	1074	11 108	4	10 (9–12)	10 (7–14)

Populační hustota byla stanovena také pro jednotlivá území v kompetenci ŠOP. Pro výpočet denzity byl u všech území použit počet unikátních genotypů z lépe ovzorkované sezony. Pro ta území, kde bylo možné provést odhad početnosti díky dostatečnému počtu vzorků, byla odhadnuta populační hustota i z těchto údajů (Tab. 20).

Tab. 20: Tabulka zobrazuje populační hustoty medvěda hnědého pro uvedená území. Jako území je brána kompetenční oblast daného NP nebo CHKO dle ŠOP SR. V tabulce je uveden celkový počet jedinců za sezonu ve které se podařilo určit více jedinců a odhadovaná velikost populace pomocí softwaru CAPWIRE na základě dat z druhé sezony (září 2020 až srpen 2021). V tabulce je uvedena denzita vypočtena z počtu jedinců z lépe ovzorkované sezony (1), a denzita vypočtena z odhadované velikosti populace na daném území (2).

Kompetenční území NP a CHKO	Počet jedinců	Počet jedinců CAPWIRE	Velikost území (ha)	Jedinec/100 km² (1)	Jedinec/100 km² (2)
CHKO Polana	126	278	211823	6	13 (13–17)
NP Velká Fatra	56	146	136746	4	11 (10–15)
NP Muráňská planina	41	71	101925	4	7 (6–8)
NP Malá Fatra	42	123	102766	4	12 (11–18)
NP Nízké Tatry	37	97	192282	2	-
TANAP	16	152	243087	1	-
CHKO Strážovské vrchy	18	47	121500	1	4 (2–6)
CHKO Ponitří	9	56	517277	0	1 (1–2)
NP Slovenský ráj	11	14	109802	1	1 (1–2)
CHKO Cerová vrchovina	13	22	268351	0	1
NP Poloniny	8	-	77303	1	-
CHKO Kysuce	4	-	120988	0	-
CHKO Štiavnické vrchy	8	-	276260	0	-
NP Slovenský kras	4	-	241320	0	-
Pieninský NP	3	-	138047	0	-
CHKO Východní Karpaty	3	-	121531	0	-
CHKO Horní Orava	2	-	79792	0	-

Diskuze

Analýza genetických markerů

Ve srovnání se studií, která používala stejný výsledný panel markerů je úspěšnost genotypizace v této studii nižší přibližně o 15 % (Paule, 2015), tyto hodnoty ale nejsou přímo srovnatelné – v předchozí práci byly za úspěšné vzorky považovány takové, u kterých se amplifikovalo alespoň pět lokusů.

Úspěšnost genotypizace neinvazivních vzorků, tedy vzorků trusu a srsti byla přibližně 46 %. Procentuální úspěšnost genotypizace z neinvazivních vzorků medvěda hnědého se v rámci různých studií pohybuje v rozmezí od 17.5 % do 81 % (Frosch et al., 2014; Pérez et al., 2009; Pylidis et al., 2021; Taberlet et al., 1997). Při odhlédnutí od rozdílů v definici úspěšného vzorku může být celková úspěšnost genotypizace ovlivněna typem a stářím neinvazivních vzorků.

Kvalita a kvantita extrahované DNA může být ovlivněna mnoha faktory v terénu, zahrnující podmínky prostředí, zejména teplotu nebo relativní vlhkost a dobou, kterou byl vzorek těmto podmínkám vystaven (Agetsuma-Yanagihara et al., 2017; Frosch et al., 2014; Murphy et al., 2007; Piggott 2004; Solberg et al., 2006; Stenglein et al., 2010a; Stetz et al., 2015).

U vzorků trusu byla úspěšnost 47 % a je srovnatelná s některými studii medvěda hnědého (Bellemain et al., 2007; Pérez et al., 2009). Bylo zjištěno, že úspěšnost genotypizace u vzorků trusu rychle klesá z maximální hodnoty 94 % pro vzorky s odhadovaným stářím 0 dní, na minimální hodnotu 13 % u vzorků s odhadovaným stářím pět dní (Skrbinšek, 2020). Důležitý faktor, který má vliv na výslednou úspěšnost představuje také potrava (Broquet & Petit, 2004; Murphy et al., 2003). Při příjmu většího podílu živočišné potravy se ve vzorcích vyskytuje melanin, který inhibuje extrakci DNA a následně ovlivňuje PCR (Ramón Laca et al., 2015). U vzorků trusu složených pouze z rostlin je úspěšnost amplifikace vysoká (Murphy et al., 2003).

U vzorků srsti byla výsledná úspěšnost genotypizace poměrně nízká, konkrétně 24 %. Úspěšnost genotypizace srsti medvěda hnědého v jiných studiích se pohybovala v rozmezí od 70 % do 85.4 % (Ciucci et al., 2015; Frosch et al., 2014; Kendall et al., 2009; Lorenzini et al., 2004; Pérez et al., 2009). Srovnatelně vysoké úspěšnosti genotypizace vzorků srsti bylo dosaženo i u jiných druhů medvědů, např. medvěda baribala (*Ursus americanus* Pallas, 1780) nebo medvěda malajského *Helarctos malayanus* (Raffles, 1821) (Latham et al., 2012; Tee et al., 2020). Naproti tomu i u medvěda hnědého může úspěšnost genotypizace srsti dosahovat nižších hodnot (Taberlet et al., 1997). Poměrně nízká úspěšnost genotypizace u vzorků srsti v této práci je způsobená nedostatečnou kvalitou vzorků. Většina vzorků měla pouze minimum chlupových folikul, které jsou, jako jediná část z celé srsti, použity k extrakci DNA. V porovnání se studií Kendall et al. (2009), kde byla úspěšnost genotypizace 70 %, byly pro analýzu vybrány pouze vzorky, které měly minimálně 11 chlupových folikul.

Vzorky srsti pro tuto práci byly sbírány oportunisticky ze značkovacích stromů a ve většině případů nemohlo být určeno po jak dlouhou dobu byly vystaveny podmínkám prostředí. U vzorků srsti dochází k rychlé degradaci DNA, a proto je potřeba vzorky analyzovat co nejdříve (Skrbinšek, 2017). Ve studiích s vyšší úspěšností byly k izolaci DNA použity vzorky získané ze systematického sběru srsti, kde jsou vzorky srsti získávány převážně z chlupových pastí, které jsou rozmístěny na daném území a jsou v pravidelných intervalech kontrolovány (Gardner et al., 2010; Kendall et al., 2009; Tee et al., 2020). Úspěšnost genotypizace vzorků srsti z oportunistického sběru vzorků je nižší než ze systematického sběru vzorků (De Barba et al., 2010).

Celková výsledná úspěšnost genotypizace u neinvazivních vzorků medvěda hnědého byla ve srovnání s genotypizací ostatních velkých šelem na Slovensku nejvyšší (46 %). U vlka obecného (*Canis lupus* Linnaeus, 1758) byla úspěšnost 42.6 % (Veselovská, 2023) a u rysa ostrovida *Lynx lynx* (Linnaeus, 1758) byla úspěšnost 27 % (Ungrová, 2021).

U lokusu G10X a MU23 byla velmi nízká úspěšnost amplifikace. Problémy u těchto lokusů se vyskytly i v jiných studiích (Kovach et al., 2003; Schwartz et al., 2007, Skrbínšek et al., 2012; Paule, 2015). Jako možný faktor nízké úspěšnosti amplifikace byla uvažována annealingová teplota (Kovach et al., 2003). Modifikace termálního protokolu ale nevedly ke zvýšení úspěšnosti amplifikace. Tyto lokusy proto byly stejně jako v předchozí studii medvěda hnědého na Slovensku vyřazeny z dalších analýz (Paule, 2015).

Identifikace jedinců

Celkový počet identifikovaných jedinců je ovlivněn počtem získaných genotypů. Při identifikaci jedinců je důležité zaměřit se na to, aby nedošlo k nadhodnocení nebo naopak podhodnocení jejich počtu. K podhodnocení počtu jedinců může dojít pokud genetické markery, které byly použity nemají dostatečnou variabilitu a nelze na jejich základě spolehlivě rozlišit všechny jedince (Creel et al., 2003; McKelvey et al., 2004; Waits et al., 2001; Woods et al., 1999). Další faktor, který může snížit počet jedinců je příliš velký počet povolených mismatchů při analýzách identit (Creel et al., 2003). Naopak k nadhodnocení počtu jedinců, může dojít při příliš malém počtu tolerovaných mismatchů při analýzách identit. V takovém případě může docházet k falešné interpretaci genotypizačních chyb a vzorky jednoho jedince jsou považovány za vzorky samostatných jedinců (Creel et al., 2003; Miller et al., 2002; Taberlet et al., 1997). Problémům se dá zamezit vybráním dostatečně variabilních markerů (Woods et al., 1999) a pomocí nastavení adekvátního počtu lokusů s mismatchem (Creel et al., 2003).

Ve srovnání s předchozí studií populace medvěda hnědého na Slovensku (Paule, 2015) byla míra opětovného záchytu vyšší, a to u samců i u samic. Celková míra opětovný záchytů u samců byla 1.8 respektive 2.06 při porovnání analogického období, tedy od začátku září do konce srpna. Celková míra opětovných záchytů u samic byla 1.51 respektive 1.68. Míra opětovného záchytu v minulé studii byla u samců 1.60 a u samic 1.34. Tento rozdíl mohl být způsoben odlišnou metodikou při analýze identit, kdy byla v předcházející studii povolena pouze jedna neshoda v genotypech oproti dvou neshodám v této studii. Povolení nízkého nebo nulového počtu lokusů s mismatchem může vést k výraznému nadhodnocení počtu jedinců (Creel et al., 2003). V této studii byl počet lokusů s mismatchem, pro nalezení optimálního

počtu unikátních genotypů, stanoven pomocí R balíčku ALLELEMATCH. Optimum bylo stanoveno na dva mismatche. Pokud by byl při analýze identit povolen pouze jeden mismatch, zvýšil by se počet genotypů, které odpovídají více než jednomu jedinci. Při použití tohoto nastavení by tedy byly multipleMatch genotypy nesprávně určeny za unikátní jedince a došlo by tak k nadhodnocení jejich počtu. Při explorativní analýze s daty pro druhou sezonu a tolerancí nastavenou na jeden mismatch dospěl CAPWIRE k výsledku 1129 (1098–1345).

Dalším faktorem, který mohl ovlivnit výsledný počet jedinců, a tedy i míru opětovných záchyťů, bylo celkové nastavení parametrů analýz. Analýza mikrosatelitů se vyznačuje určitým podílem expertních (a tedy subjektivních) rozhodnutí, např. při interpretaci primárních dat – chromatogramů. Pro přímé srovnání obou studií bude nutné zpracování starších dat pomocí stejné pipeline od stadia chromatogramů.

Počet získaných genotypů byl vyšší u samců (54.6 %) než u samic (45.4 %). To nemusí reflektovat reálný stav poměru pohlaví ve studované populaci, protože pravděpodobnost záchyty u jednotlivých pohlaví nemusí být stejná a poměr pohlaví mezi určenými jedinci byl poměrně vyrovnaný. Poměr mezi pohlavími bývá u medvědů rozdílný a často je získáván vyšší počet vzorků u samců (Bellemain et al., 2007; Kendall et al., 2009).

Na sníženou pravděpodobnost detekce vzorků samic mají vliv zejména březí samice a samice s mláďaty, která mají vliv na pohyblivost samice. Březí samice zimují po nejdelší časový úsek a z tohoto důvodu je pravděpodobnost jejich detekce nízká začátkem jara a koncem podzimu (Whittington et al., 2015). Samice s mláďaty snižují svou pohyblivost a areál výskytu v době páření ve snaze o zamezení ztrát mláďat v důsledku infanticidy. Pravděpodobně z tohoto důvodu si také vybírají území, která se nepřekrývají se samci a špatně dostupná stanoviště, která jsou hustě zalesněná a hůře dostupná. V takových oblastech je detekce trusu problematictější (Belleiman et al., 2005; Dahle & Swenson, 2003c). Tyto faktory mohly ovlivnit výsledný poměr mezi pohlavími.

Analýza příbuzenských vztahů

Některé ze vztahů prvního řádu byly detekovány mezi jedinci ovzorkovanými ve větších vzdálenostech. Příbuznost jedinců je patrná například mezi oblastmi NP Muráňská planina a CHKO Polana. To je v dobré shodě s výsledky klastrovacích analýz, ve kterých tyto oblasti spadaly do jednoho klastru.

Populační genetika

Metoda dle Puechmaille (Puechmaille 2016) při analýze dat zohledňuje rovnoměrnost vzorkování ve studovaném území a nemělo by například docházet k rozdělení intenzivně vzorkovaných subpopulací, nebo ke sloučení subpopulací, ve kterých byl celkový počet vzorků nízký. Na základě srovnání metod se zdá, že je tato metoda pro analýzu datasetu použitého v rámci této práce relevantnější, než metoda dle Evanno (Evanno et al., 2005), při které není zohledněno rozdělení datasetu do subpopulací.

Podobně jako výsledky ze studie Straka et al. (2012) i výsledky získané v rámci této studie naznačují historické oddělení východokarpatské a západokarpatské populace medvědů a dále také rozdělení západokarpatské populace do subpopulací. Toto rozdělení může být

způsobeno oddělením dvou linií po radikálním snížení velikosti populace v průběhu 19. století a také zvyšujícím se vlivem antropogenních překážek.

I když klasická bayesiánská klastrovací analýza poskytuje poměrně spolehlivé informace i o jemných změnách v genetické struktuře, populační struktura volně žijících populací může být ovlivněna migrací, změnou velikosti populace v čase nebo bariérami, které mohou ovlivňovat genový tok (Corander et al., 2008). Neprostorová bayesiánská klastrovací analýza může být ovlivněna, pokud není vzorkování v prostoru rovnoměrně uspořádáno (Rosenberg et al., 2005). Pro získání co nejdůvěryhodnějších informací o populační struktuře se jeví jako spolehlivá metoda propojení klasických neprostorových metod s metodami prostorového bayesiánského klastrování (Chen et al., 2007).

Se snižující se mírou konektivity mezi jednotlivými populacemi stoupá pravděpodobnost přiřazení vzorku do správného klastru. V případě, že mezi subpopulacemi existují jednoduché bariéry (například liniové stavby) a recentní konektivita pomocí migrantů mezi subpopulacemi je omezená, je GENELAND ideálním nástrojem pro zkoumání populační struktury (Chen et al., 2007).

Z výsledků je patrné, že významnou antropogenní překážkou genového toku mezi jednotlivými subpopulacemi je v rámci této studie dálnice D1 a silnice první třídy E50. Toto zjištění podporují i výsledky studie ze Slovenského území, kdy bylo na základě telemetrických dat zjištěno, že jedinci medvěda hnědého nepřekračují silnice, na kterých je provoz více než 5000 aut během 24 hodin, nebo překračují silnice spíše v noci, ale za předpokladu, že provoz není silnější než 5000 aut během 24 hodin v případě samců a 4000 aut během 24 hodin v případě samic (Findo et al., 2019, Skuban et al., 2017).

Největší překážkou genového toku se zdá být území, které se nachází mezi západokarpatskou a východokarpatskou populací, kde byla zdokumentována vysoká rezistence habitatu pro medvěda. Tato oblast je charakterizována významnými údolími mezi jednotlivými orografickými celky s tím související intenzivně využívanou zemědělskou krajinou. Konektivita mezi těmito územími byla pravděpodobně přerušena na počátku 20. století a kvůli nevhodnému habitatu pro stálý výskyt medvědů nebyla do dnešní doby zcela obnovena (Findo et al., 2007). Částečná konektivita prostředí může být zachována v polské části Karpat, v místech, kde je kontinuální krajinný pokryv a nízká pravděpodobnost střetu s lidmi (Ziółkowska et al., 2016). Toto tvrzení podporuje i genetické zachycení několika jedinců v TANAPu, u nichž byla určena genetická příslušnost k východokarpatskému klastru. Další přirozenou bariéru genového toku mezi jednotlivými subpopulacemi tvoří údolí řeky Váh.

Genetická diverzita populace

Genetická diverzita u populace medvěda hnědého na území Slovenské republiky, stanovená na základě analýzy jaderných mikrosatelitových lokusů, je poměrně vysoká ve srovnání s nízkými hodnotami heterozygotnosti, kterou vykazují izolované evropské populace medvěda hnědého v Apeninách nebo Kantábrii. Slovenská populace medvěda hnědého vykazuje podobné hodnoty heterozygotnosti jako populace vyskytující se na území s dobrým stavem ochrany a celistvou krajinou, jakými jsou například populace ve Finsku nebo Rumunsku (Tab. 21). Výsledná hodnota celkové pozorované heterozygotnosti zjištěná v této práci je shodná s pozorovanou heterozygotností $H_o = 0.69$, která byla zjištěna u populace medvěda

hnědého na území Slovenska v roce 2012 (Straka et al., 2012) a pohybuje se v rozmezí hodnot heterozygotnosti $H_o = 0.63\text{--}0.73$ stanovených u medvěda hnědého na území Slovenska ve studii z roku 2006 (Janiga et al., 2006). Ačkoliv byla zjištěna poměrně vysoká genetická diverzita, která se nachází v rozsahu běžně pozorovaném u jiných populací medvěda hnědého, měl by být v budoucnu kladen důraz na udržení populační velikosti, obnovení konektivity krajiny a zalesnění stanovišť z důvodu zachování genového toku mezi jednotlivými subpopulacemi a tím i genetické variability.

Tab. 21: Srovnání genetické diverzity na mikrosatelitových lokusech u různých populací medvěda hnědého. Tabulka zahrnuje očekávanou heterozygotnost (H_e) a pozorovanou heterozygotnost (H_o). Dále je v tabulce uveden počet vzorků (N_s), celkový počet použitých lokusů (N_l)/počet shodných lokusů s naší studií (N_{sl}) a průměrný počet alel na lokus (A).

Území	H_e	H_o	N_s	N_l / N_{sl}	A	Zdroj
Rumunské Karpaty	0.81	0.72	33	9/5	7.8	Zachos et al., 2008
Finsko	0.79	0.77	70	17/8	7.3	Tammeleht et al., 2010
Estonsko	0.68	0.66	62	17/8	5.4	Tammeleht et al., 2010
Dinaridy, Chorvatsko	0.75	0.73	156	12/7	7.6	Kocijan et al., 2011
Makedonie	0.72	0.75	14	18/7	5.8	Karamanlidis et al., 2012
Slovenské Karpaty	0.7	0.69	167	13/7	5.7	Straka et al., 2012
Apeniny	0.44	0.4	30	12/7	-	Lorenzini et al., 2004
Kantábie, Španělsko	0.45	0.44	39	18/8	3.3	Pérez et al., 2009

U některých lokusů byla zjištěna odchylka od HW rovnováhy. To může být způsobeno například křížením příbuzných jedinců. Dalším faktorem, který ovlivňuje HW rovnováhu, je geografická struktura populace. V populaci mohou geografické bariéry bránit náhodnému páření mezi jedinci a tím může docházet ke snížení celkové heterozygotnosti. Na Hardy-Weinbergovu rovnováhu má také vliv genetický drift, který působí silněji v malých populacích.

Demografie

Velikost populace

Východní Karpaty

Z území Východních Karpat bylo získáno poměrně malé množství vzorků, ze kterých se podařilo určit 14 jedinců. Pro takto malý dataset je obtížné použít modely pro odhad velikosti populace. Vzhledem k tomu, že se zde i přes nízký počet vzorků objevily opětovné záchyty můžeme soudit, že populační velikost medvěda hnědého v této oblasti bude pravděpodobně relativně nízká. Získané výsledky jsou v dobrém souladu se studií, která proběhla na území NP Poloniny a ve které bylo pomocí neinvazivní genetiky a stopování identifikováno 15 jedinců medvěda hnědého (Straka et al., 2013).

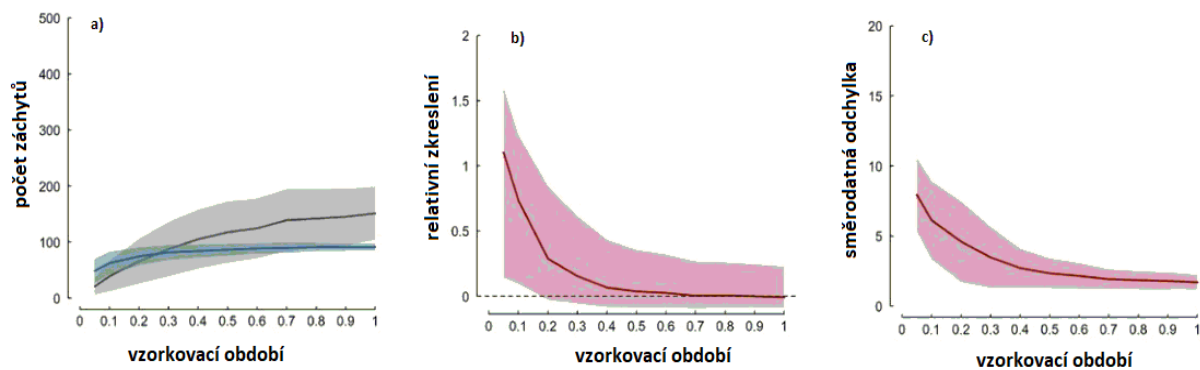
Odhady početnosti na základě CMR modelů

Západní Karpaty

Charakteristika období a uzavřenost populace

Vzorkování oblasti Západních Karpat bylo dostatečné pro provedení demografických analýz a v obou sezonách bylo možné pozorovat opakující se trendy ve vzorkování. Na začátku první sezony byl patrný nárůst počtu jedinců, který byl způsoben počátkem intenzivního neinvazivního vzorkování. Následné zpomalení nárůstu bylo způsobena méně intenzivním vzorkováním v zimním období, kdy jsou medvědi méně aktivní. V počátku druhé sezony došlo opět k nárůstu unikátních genotypů, následovala stagnace v prosinci až únoru způsobena sníženou aktivitou medvědů. Od března byl patrný další nárůst nových jedinců způsobený vyšší aktivitou medvědů a aktivnějším sběrem vzorků. Na přelomu dubna a května skončilo intenzivní neinvazivní vzorkování, aby nebyla zahrnuta mláďata a byl dodržen předpoklad uzavřenosti populace, a v tomto období bylo analyzováno jen několik tkáňových vzorků.

Uzavřenost populace by měla být posouzena na základě výsledků statistických testů s přihlédnutím k biologii zkoumaného druhu (Otis et al., 1978). V této studii tedy byly pro odhady velikosti populace použity pro každou sezonu vzorky získané z období od začátku září do konce dubna následujícího roku. V tomto období se předpokládá, že nedojde k získání vzorků mláďat, která by se ještě měla nacházet v brlozích nebo v jejich těsné blízkosti (Steyaert et al., 2012). Díky tomu by nemělo dojít k porušení předpokladu uzavřenosti populace v důsledku natality. Vzhledem k relativně malému počtu získaných vzorků byla snaha o co nejmenší ztrátu dat a obě vzorkovací sezóny byly, jako v předchozí studii medvěda hnědého na Slovensku (Paule, 2015), prodlouženy do konce srpna. Podle Dupont et al. (2019) bylo na základě studie vlivu délky vzorkovacího období na odhad velikosti populace zjištěno, že prodloužení vzorkovacího období vede ke zvýšení přesnosti odhadů velikosti populace a ke snížení relativního zkreslení a směrodatné odchylky u těchto odhadů (Obr. 37).



Obr. 37: Znárodnění změn velikosti daných parametrů v závislosti na délce vzorkovacího období. Na grafu a) je šedě označen celkový počet záchytů a modře je označen počet jedinců. Na grafu b) je červeně označeno relativní zkreslení v odhadu velikosti populace a na grafu c) je červeně označena směrodatná odchylka v odhadu velikosti populace. Plnou čarou jsou znázorněny střední hodnoty a světlejší oblasti kolem představují 95% interval spolehlivosti (Dupont et al., 2019, graficky upraveno).

Dalším z faktorů ovlivňujících uzavřenost populace je mortalita (Otis et. al., 1987). Antropogenní mortalita (legální odstřel jedinců, úhyn způsobený pytláctvím) může mít negativní vliv na vývoj velikosti populace (Creel et al., 2015; Liberg et al., 2012). Přírozená mortalita nevede ke zkreslení výsledků odhadů velikosti populace (Seber, 1986). Deset tkáňových vzorků pocházelo z jedinců u kterých byla provedena eutanázie nebo odstřel, zbylých třicet pět vzorků pocházelo ze srážek s dopravními prostředky nebo příčina smrti nebyla uvedena. Také na základě mysliveckých statistik patří odstřel mezi minoritní příčiny úhynu jedinců (Tab. 22). Všechny tkáňové vzorky byly zahrnuty do datasetu pro analýzy odhadu velikosti populace. Tato metodika byla použita i v již publikovaných demografických studiích velkých šelem (Roffler et. al., 2019; Paule, 2015; Skrbinšek et al., 2019).

Tab. 22: Myslivecké statistiky úhynu medvěda hnědého v období 2019–2021 (Národní lesnické centrum, 2019; Národní lesnické centrum, 2020; Národní lesnické centrum, 2021)

Rok	Plán odstřelu	Odstřel	Úhyn	Celkem
2019	5	4	28	33
2020	0	3	13	16
2021	0	6	48	55
Celkem	5	13	89	104

I přesto, že předpoklad uzavřenosti v přirozené populaci není nikdy zcela platný (Otis et al., 1978), předpokládáme, že během námi zkoumaných období nedošlo v počáteční populaci k neznámým změnám a populaci medvěda hnědého považujeme za relativně spolehlivě uzavřenou. Demografická uzavřenost byla podpořena několika statistickými testy, kde byl zjištěn zanedbatelný nárůst a úbytek jedinců. Geografická uzavřenost byla podpořena statistickými testy a také rozdělením jedinců z Východních a Západních Karpat do odlišných klastrů na základě Bayesiánské klastrovací analýzy. Vzhledem k tomu, že z území Slovenska

nejsou dostupné informace o průchodnosti krajiny pro velké šelmy mezi Západními a Východními Karpaty, nelze určit zda zde může být vytvořena migrační bariéra. Během celého studovaného období však na základě genetického monitoringu nebyly zaznamenány žádné zpětné záchyty (přesuny stejných jedinců) mezi těmito oblastmi. Propojení těchto populací by mohlo být realizované přes část Karpat na polsko-slovenském pomezí. Bylo zjištěno, že na území Polska se dostávají asymetricky jedinci ze Západních Karpat a celkově genový tok není velký (Matosiuk et al., 2018).

Odhad velikosti populace

CMR modely umožňují odhadnout počet jedinců a přiřadit tomuto odhadu interval spolehlivosti. Pro spolehlivé výsledky těchto modelů je zásadní splnění určitých předpokladů. Prvním předpokladem je uzavření populace během období, kdy byly vzorky získány. Druhým předpokladem je stejná pravděpodobnost prvního a každého další záchyty jedince. A posledním předpokladem je, že pro všechny jedince v populaci je pravděpodobnost záchyty stejná. Tento předpoklad může být u některých modelů porušen, pokud je heterogenita v záchytech popsitelná měřitelnými parametry (Bellemain et al., 2005; Lindberg 2012; White et al., 1982). U volně žijících živočichů je obtížné splnit všechny předpoklady CMR modelů a často jsou do určité míry porušeny. Výsledná kvalita odhadů početnosti závisí na odchylce od těchto předpokladů (Kendall et al., 1999; Miller et al., 2005).

Na základě výsledků statistických testů uzavřenosti populace můžeme říci, že byl s velkou pravděpodobností předpoklad uzavřenosti populace splněn. Vzhledem k neinvazivnímu získávání vzorků, které nevede k behaviorální reakci jedinců, předpokládáme že byla stejná pravděpodobnost pro získání prvního záchyty i opětovných záchyť. Předpoklad, který implikuje stejnou pravděpodobnost záchyť u všech jedinců mohl být vzhledem k odlišné míře opětovných záchyty mezi samci a samicemi do určité míry porušen. Jedná se ale o heterogenitu popsitelnou měřitelnými parametry, se kterou můžeme pracovat. Heterogenita mezi jednotlivci může vzniknout v důsledku faktorů jako je věk a reprodukční stav, které nelze rozpoznat na základě zde použitých markerů (Boulanger et al., 2008). Odhady velikosti populace proto byly vypočteny zvláště i pro jednotlivá pohlaví.

Pro analýzy v programu MARK je nutné rozdělení vzorků do diskretních záchyťových událostí. Pro design záchyťových událostí není stanovena ucelená metodika. Například u studií, ve kterých trvá vzorkování kratší dobu, může být toto vzorkování rozděleno po týdnech (Bellemain et al., 2005; Kindberg et al., 2011; Solberg et al., 2006). Je vhodnější, aby samotné vzorkování probíhalo v diskretních intervalech, než aby probíhalo kontinuálně (Lindberg, 2012). U vysoce mobilních savců se však často setkáváme s kontinuálním sběrem vzorků.

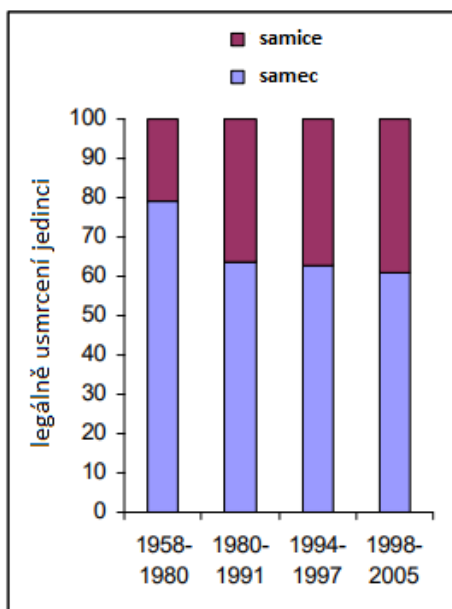
Pro rozdělení kontinuálního vzorkování v této studii do diskretních záchyťových intervalů byla testována závislost mezi parametry odhadu velikosti populace na počtu záchyťových událostí. Pro výpočet odhadů velikosti populace v první sezoně bylo použito 25 záchyťových událostí. Při tomto počtu záchyťových událostí byl vypočten nejmenší interval spolehlivosti, díky čemuž bylo předpokládáno, že je odhad velikosti populace nezkreslený (Jensen, 1989). Na základě těchto předpokladů byl stanoven i počet záchyťových událostí pro druhou sezonu, která byla výsledně rozdělena do 20 záchyťových událostí. V programu MARK byl pro výsledný odhad velikosti populace vybrán ve všech případech pouze jeden model, protože vždy pouze jeden model dosahoval hodnoty $\Delta AICc < 2$ (Anderson & Burnham, 2002).

V této studii byly provedeny odhady velikosti populace pro dvě sezony. Výsledky z programu MARK a softwaru CAPWIRE pro danou sezonu konvergují. U první sezony jsou celkové odhady velikosti menší, pravděpodobně kvůli celkově nižšímu počtu vzorků i počtu opětovných záchytů. Přesnost výsledků se zvyšuje také s počtem opětovných záchytů. Při nízkém počtu opětovných záchytů CMR modely poskytují méně spolehlivé výsledky (Luikart et al., 2010; Miller et al., 2005). Odhady velikosti populace na základě dat z druhé sezony považujeme za spolehlivější vzhledem k většímu počtu vzorků i opětovných záchytů. Intenzivní vzorkování ve druhé sezoně skončilo v květnu, takže na základě biologie druhu lze předpokládat, že výsledný odhad nebyl zkreslen v důsledku natality.

Odhad velikosti populace medvěda hnědého v Západních Karpatech pomocí prostorově explicitních modelů byl srovnatelný s odhady provedenými v programech CAPWIRE a MARK. Na základě hodnoty Akaikeho informačního kritéria byl stanoven nejpravděpodobnější model h2, který předpokládá heterogenitu v pravděpodobnosti záchytu jedince a přítomnost nezachycených skupin (Pledger, 2000).

Ačkoliv je odhad denzity populace vytvořený pomocí balíčku SECR srovnatelný s literaturou (Rigg & Adamec, 2007), pro výpočet byl nejprve použit základní nulový model, který předpokládá homogenitu vzorkování a stejnou pravděpodobnost detekce každého jedince. Tyto předpoklady však nebyly splněny. Při využití pokročilejšího modelu, který předpokládá heterogenitu denzity v rámci studovaného území, výsledná denzita by byla pro obě pohlaví vyšší (viz. Tab. 17), nicméně se dá předpokládat různá denzita výskytu v jednotlivých oblastech studovaného území, což je v dobré shodě s odhady velikosti populací v jednotlivých CHKO a NP. Pro přesnější odhady denzity v jednotlivých částech areálu výskytu by bylo potřeba do analýz použít více proměnných, například telemetrická data nebo údaje o vzorkovacím úsilí. Dále je nutné brát v potaz započítání zastavěných území a území, která jsou nevhodná pro výskyt druhu. Pokud by byla tato území odečtena z celkové plochy polygonu vytvořeného na základě lokalit sběru jednotlivých vzorků, výsledná populační hustota by byla vyšší.

Větší odhady velikosti populace u samic oproti samcům i širší intervaly spolehlivosti těchto odhadů v obou sezonách pravděpodobně souvisí zejména s menším počtem opětovných záchytů u samic. Rozdíl v počtu samců a samic v populaci může být způsobený nižší mírou legálního lovu v minulosti (Štofík et al., 2013). Na Obr. 38 lze pozorovat, že procentuální podíl legálně usmrcených samců v průběhu času klesl ze 79 % na 62 %, ale stále tvořil větší část oproti legálně usmrceným samicím (Rigg & Adamec, 2007). Počet usmrcených samic (tkáňových vzorků) byl nižší i v této studii.



Obř. 38: Graf znázorňující procentuální poměr legálně usmrčených jedinců medvěda hnědého od roku 1958 do roku 2005 (Rigg & Adamec 2007, upraveno)

Publikované odhady velikosti populace medvěda hnědého na Slovensku se liší v závislosti na zdroji. Podle oficiální zprávy pro Evropskou komisi byl na Slovensku v roce 2005 odhadovaný počet 700–900 jedinců. V roce 2010 byl odhadovaný počet 800–1100 jedinců (Kaczensky et al., 2013). Na základě myslivecké statistiky byl v roce 2019 odhadovaný počet 2631 jedinců medvěda hnědého. V roce 2020 odhadovaný počet vzrostl na 2760 jedinců a v roce 2021 na 2997 jedinců (Národní lesnické centrum, 2019; Národní lesnické centrum, 2020; Národní lesnické centrum, 2021). Odhady velikosti populace pomocí mysliveckých statistik jsou mnoha autory považovány za nadhodnocené vzhledem k tomu, že domovské okrsky medvědů zasahují do více honiteb, dochází proto k opakovanému započítání stejných jedinců (Kubala et al., 2017; Rigg & Adamec, 2007). Rigg a Adamec uvádí, že na území Slovenska docházelo pomocí těchto statistik k nadhodnocení početnosti až o 88 % oproti expertním odhadům (Rigg & Adamec, 2007).

Výsledky demografických analýz v této práci byly porovnány s předchozími výsledky odhadů velikosti populace medvěda hnědého pomocí genetického monitoringu na tomto území (Paule, 2015). Na základě tohoto výzkumu byla v letech 2013–2014 odhadnuta celková početnost medvěda hnědého na 1256 jedinců (1 023–1 489). Do tohoto odhadu byly zahrnuty i vzorky uhynulých jedinců v daném období. Odhad velikosti populace na základě minulé studie je vyšší než odhad, který byl stanoven v této studii. I přesto, že obě studie byly provedeny za použití stejných mikrosatelitových lokusů a demografické analýzy byly provedeny pomocí stejných programů nelze vzhledem k odlišné metodice porovnávat výsledky absolutně.

Pro ověření relevantnosti stanovených odhadů velikosti populace pro jednotlivé oblasti, byly výsledky srovnány s aktuálními výsledky klasického monitoringu z území NP Muráňská planina a NP Malá Fatra (ŠOP SR, 2022 pers. comm.). Na základě odhadů byla početnost medvěda hnědého na území NP Muráňská planina stanovena na 71 (61–81) jedinců. Pomocí klasického monitoringu byl počet stanoven přibližně na 80 jedinců. Pro území v kompetenci NP Malá Fatra byl v této studii stanoven počet medvědů na 123 (110–185) jedinců. Na základě

klasického monitoringu byl stanoven počet přibližně na 73 jedinců na území NP a jeho ochranného pásma. Z ostatních území nebyly informace o početnosti medvěda hnědého dostupné.

Testování správnosti odhadů pomocí simulací

Simulace naznačují, že pozorovaná data odpovídají velikosti populace okolo 1000 jedinců, při simulovaném výběru z hypotetické větší populace dospívají použité modely k vyšším odhadům, než byly získány z empirických dat.

Při simulacích odhadů početnosti pro populaci o velikosti 1000 jedinců na základě rozdílného počtu získaných vzorků jsou jednotlivé odhady v dobré shodě. Modely za použití simulací pro danou populaci dospěly k podobným výsledkům s počtem vzorků od 250 do 2000. To ukazuje, proč vzorky 302 genotypů (první sezona) a 696 genotypů (druhá sezona) dospívají k podobným odhadům početnosti. S vyšším počtem vzorků se nemění správnost daných odhadů, ale zvyšuje se jejich přesnost. Dochází tedy ke zmenšování konfidenčních intervalů. Častým argumentem v laické diskusi o CMR je hypotéza, že menší množství vzorků povede k podhodnocení výsledné početnosti. Provedené simulace naznačují, že správnost odhadu konverguje k reálné hodnotě už u počtu vzorků odpovídající ca 25% reálné velikosti populace. Odhady založené na počtu vzorků odpovídajícímu 25–100% velikosti populace jsou dokonce mírně nadhodnocené oproti reálné velikosti populace - což se dá vztáhnout i na výsledky této studie.

Efektivní velikost populace a minimální životaschopná populace

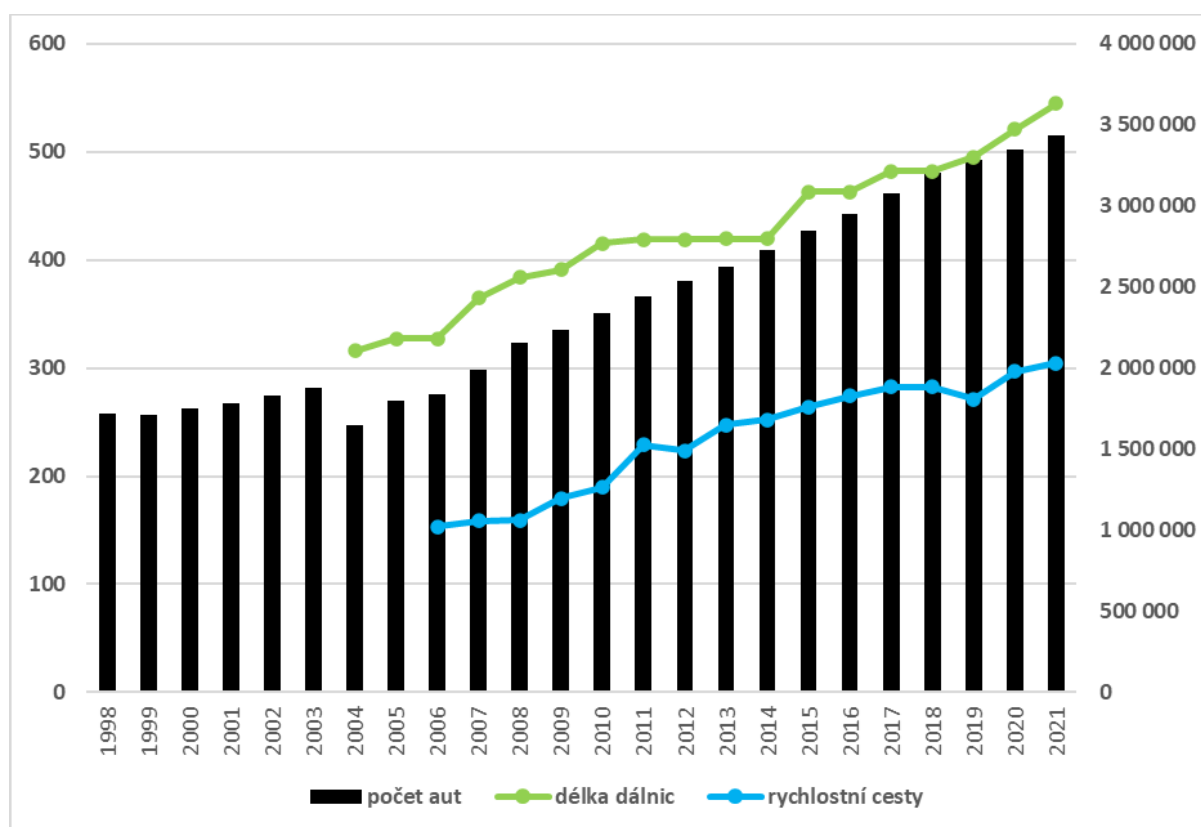
Cenzní velikost populace se může v případě velkých šelem odrážet v aplikované sféře ochrany přírody, jako je human-wildlife konflikt. Nicméně efektivní velikost populace je důležitějším parametrem než cenzní velikost z hlediska životaschopnosti populace. Populace medvěda hnědého na Slovensku v minulosti ovšem prošla výrazným bottleneckem a je tedy možné, že to je hlavní faktor, který stojí za nižší efektivní velikostí populace ve srovnání s cenzní velikostí populace (Luikart et al., 2010). Spojení informací o cenzní a efektivní velikosti by v budoucnu mohlo přispět k efektivnímu managementu populace medvěda hnědého na Slovensku. Pro management druhu je také zásadní koncept minimální životaschopné populace. Stanovení konkrétní prahové hodnoty je obtížné, mnoho empirických studií ale uvádí hodnotu 1000 jedinců. Z této perspektivy je zřejmé, že cenzní populace medvěda hnědého na Slovensku není příliš vzdálená této hodnotě a efektivní velikost populace je pravděpodobně výrazněji nižší. Vzhledem k její pravděpodobné izolaci vlivem fragmentace krajiny by měla být věnována pozornost ochraně této populace za účelem snížení vlivu systematických i stochastických faktorů a rizika vzniku extinkčního víru. Také by měla být vyvinuta snaha o zvýšení konektivity krajiny pro zajištění genového toku a zachování genetické variability nejen této populace.

Analýza životaschopnosti populace

Analýza životaschopnosti populace zahrnuje prognózy budoucího vývoje, zde je správným přístupem zvážení alternativních scénářů co se týče vstupních parametrů a jejich důsledků. Výsledky potvrzují situaci popsanou pomocí efektivní velikosti populace. Při

průměrných populačních parametrech zahrnuje predikce do budoucna mírný pokles populační velikosti.

Při odhadu vývoje některých populačních parametrů je vhodné zvážit dosavadní trendy. Co se týče mortality, stoupá počet jedinců usmrcených vlivem dopravy. Mezi roky 1994-2006 vlivem kolize s dopravními prostředky ročně uhynulo v průměru 3.5 jedince (Rigg & Adamec 2007), v období mezi lety 2007-2019 bylo v průměru ročně zaznamenáno již 9.8 jedinců uhynulých vlivem střetu s dopravními prostředky (Kalaš 2020). Tento více než dvojnásobný nárůst průměrného ročního počtu případů kolize medvědů s dopravními prostředky pravděpodobně souvisí s rozvojem dopravy (Obr. 39), například v období od roku 1998 do roku 2021 se počet osobních aut na Slovensku téměř zdvojnásobil (Štatistický úrad 2023). Vliv na trendy mortality může mít např. i zlepšující se vybavení lovců atd.



Obr. 39: Graf zobrazující vybrané atributy rozvoje dopravy na Slovensku (Štatistický úrad 2023). Délka dálnic a rychlostních cest je zobrazena na hlavní svislé ose, počet aut je zobrazen na vedlejší svislé ose. U všech zobrazených množin je patrný nárůst během sledovaného času.

Natalita a velikost populace souvisí s nosnou kapacitou prostředí. Toto stabilní ekvilibrium (K) představuje maximální velikost populace, která je pro dané prostředí z hlediska vnějších zdrojů “únosná”. Pokud je tedy hustota populace vyšší než K, je zvýšená míra mortality a naopak (Tkadlec 2008). Medvěd má v prostředí Evropy vztah ke komplexnímu prostředí a klimaxovým lesním ekosystémům (Pérez-Girón et al., 2022), může tak hrát roli indikátorového druhu stavu přírody. Jeho vymizení na velké části území Evropy je součástí procesu vymírání megafaun s nedozírnými ekologickými následky (Galetti et al., 2018). Podrobná diskuse tohoto tématu je však nad rámec této studie.

Trofická nika medvěda jako velkého všežravce je velmi komplexní a zahrnuje ekologické vazby s řadou druhů rostlin, hub, bezobratlých i obratlovců i složitý vztah s prostředím a roli klíčového druhu. Jako příklad se dá uvést konzumace plodů, např. dubu (*Quercus sp.*), buku (*Fagus sylvatica*) nebo lísky (*Corylus avellana*) (Bojarska & Selva 2013; Kavčič et al., 2015, Skuban et al., 2016). Z hlediska reprodukčního úspěchu a přežití je pro medvědy kritické podzimní období hyperfágie, při kterém získávají zásoby na zimu (Hertel et al., 2018; Di Domenico et al., 2012). V případě samic v této době také dochází ke zmenšování teritorií, většímu překryvu domovských okrsků (Schulte et al., 2021) a u obou pohlaví ke změně vzorců chování kvůli nepřírozeným zdrojům potravy (Selva et al., 2017; De Angelis et al., 2021).

Nosná kapacita prostředí se může během času v závislosti na dostupných vnějších zdrojích měnit, např. vlivem fenologie i díky hospodaření v krajině (lesnictví, zemědělství, myslivost aj.), které ovlivňují potravní ekologii a prostorové chování. Příkladem mohou být myslivecká místa na příkrmování a vnaďení zvěře. Jako problematická se jeví např. místa na příkrmování zvěře, kde je k dispozici vysokonutriční potrava v podobě obilovin (Kavčič et al., 2015, Skuban et al. 2016). V místech s intenzivním zimním příkrmováním může docházet k ovlivnění období hibernace, kdy medvědi navštěvují mnohem častěji příkrmovací místa a zkracuje se čas strávený v brlohu (Krofel et al., 2017). Analýza příslušných faktorů prostředí probíhá nad rámec této studie.

Lze konstatovat, že koncept “přemnožení”, který se v souvislosti s medvědy objevuje v médiích, je velmi problematický. Zaprvé ekologická definice tohoto pojmu zahrnuje vztah k nosné kapacitě prostředí, která se v případě tak komplexní potravní niky stanovuje velmi obtížně. Zadruhé tato teze nepočítá s přirozenými autoregulačními mechanismy, typickými pro populace vrcholových predátorů. U medvědů se jedná například o infanticidu ze strany samců nebo vlastnosti typické pro K-strategii - dlouhověkost, pozdější nástup pohlavní dospělosti, dlouhá doba péče o mláďata apod. (Wallach et al., 2015).

Změna velikosti populace

Stanovení trendů změn velikosti populace nebylo přímým cílem studie. K takovým odhadům bude potřeba srovnání s výsledky předchozí studie provedené podobnou metodou, které zatím není možné kvůli odlišnostem v metodice. Datasetsy obou prací jsou nicméně homologické co se týče použitých markerů a analogické co se týče základního nastavení metod (vymezení sezón, statistický přístup CMR modelování). Nastavení některých parametrů bylo ale na základě statistických power analýz zvoleno odlišně. Příkladem je flitrování kvality dat. Další rozdíl spočívá v počtu tolerovaných mismatchů u identity analýzy, který je u novější studie 2 (na základě analýz v software ALLELEMATCH), u starší studie 1, což mohlo vést k nadhodnocení počtu jedinců ve starší oproti novější studii. Odhad v programu CAPWIRE pro starší studii dospěl k číslu 1214 (konfidenční interval nebylo možno stanovit), oproti 1056 (1012–1275) v novější studii. Ani tak tedy získaná data neukazují změnu velikosti studované populace ve zkoumaném období odlišitelnou od statistické chyby.

Rozdíly v distribuci vzorků v různých studiích jsou ovlivněny zejména a) potenciálním rozdílným vzorkovacím úsilím a b) potenciálními rozdíly v distribuci druhu. Vzhledem k tomu,

že vzorkovací úsilí (viz např. Skrbinšek et al., 2019, Berezowska-Cnota et al., 2023) ani v jedné studii nebylo měřeno, explicitní odlišení obou faktorů zatím není možné.

Lokální změny v distribuci druhu

V posledních dekádách dochází také k dramatickým změnám v krajině jako jsou kůrovcová těžba, změny zemědělského hospodaření, změny v příkrmování zvěře - např. ukončení krmení jádrovým krmivem, vnazení přebytky ze supermarketů, změny turismu (např. v souvislosti s opatřeními proti šíření Covid-19), jak ukazuje i empirická evidence z jednotlivých CHKO.

Co se týče hodnot změn velikosti populace z jiných období a území, historický výskyt medvěda v Evropě ještě na konci 15. století zasahoval na území téměř celého kontinentu s výjimkou Islandu a některých středomořských ostrovů (Obr. 40). Do současnosti se celosvětové rozšíření zmenšilo o 1.11×10^7 km² (Morrison et al., 2007), především kvůli ztrátě vhodných habitatů a pronásledování člověkem (Swenson et al., 2000).



Obr. 40: Tmavě šedou barvou je znázorněno historické rozšíření medvěda hnědého v Evropě (Swenson et al., 2000).

Na základě dostupných dat o početnosti se však zdá, že v současné době je většina evropských populací díky ochranné legislativě stabilní nebo mírně rostoucí (Chapron et al., 2014), ale některé silně izolované populace, jako je například populace alpská, apeninská nebo kantabrijská jsou podle kritérií IUCN hodnoceny jako kriticky ohrožené nebo ohrožené (McLellan et al., 2016, 2017).

Hypotézy o rychlosti růstu populace medvěda je potřeba posuzovat s přihlédnutím k empirickým hodnotám pro jiné druhy savců. Příkladem může být růst lidské populace, který se ještě do začátku 70. let 20. století jevil jako “hyperexponenciální” (Cohen 1995), přesto činil v době největších ročních přírůstků ca 2.2 %. Tento nárůst navíc zpomalil a na začátku 21. století činil jen 1.2%, což souvisí s negativně závislostí populačního růstu na hustotě populace a příslušné negativní zpětné vazbě (viz např. Berryman 2002 a následující kapitoly).

Populační hustota

Na základě počtu jedinců z druhé sezony byla populační hustota pro oblast s prokázaným výskytem medvěda hnědého v Západních Karpatech (11 108 km²) stanovena na 4 jedince na 100 km². V této oblasti byla také vypočtena denzita na základě odhadů velikosti populace pomocí softwaru CAPWIRE a programu MARK, která činila 10 jedinců na 100 km². Denzita populace medvěda hnědého na území Slovenska, stanovena na základě odhadů početnosti, je vyšší než celková denzita karpatské populace (Tab. 23), ale srovnatelná s denzitou rumunské subpopulace, která se pohybuje v rozmezí 7.5-14.8 jedinců na 100 km² (Popescu et al., 2017)

Tab. 23: Populační hustota jednotlivých populací medvěda hnědého dle Kaczensky et al. (2021).

Populace	Počet jedinců	Areal (km ²)	Populační hustota jedinec /100 km ²
Skandinávská	2825	252 900	1.1
Karelská	1660	148 000	1.1
Baltská	700	40 700	1.7
Karpatská	7630	113 000	6.8
Východobalkánská	468–665	21 800	2.1–3
Dinárská + Pindos	3950	90 000	4.4
Apeninská	45–69	8 000	0.6–0.9
Alpská	49–69	6 000	0.8–1.2
Pyrenejská	30	3 600	0.8
Kantabrijská	321–335	8 800	3.6–3.8

Populační hustota v jádrových oblastech území jako je NP Malá Fatra, NP Velká Fatra nebo NP Poloniny se na základě minulých odhadů pohybovala v rozmezí 5–11 jedinců na 100 km² (Rigg & Adamec, 2007). Aktuální informace o populační hustotě medvěda hnědého v konkrétních oblastech se nám s výjimkou NP Malá Fatra nepodařilo získat. Pro NP Malá Fatra byla za pomoci dlouhodobého terénního monitoringu určena průměrná denzita na 16.1 (4.8–28) jedinců/100 km² (Kalaš, 2017). Tato denzita je vyšší než námi stanovena denzita na základě odhadu početnosti pro toto území. To může být způsobeno tím, že v této studii bylo jako areál výskytu medvěda bráno kompetenční území NP Malá Fatra, kde pravděpodobně není tak vysoká denzita jako v jádrové oblasti. Pro účely terénního monitoringu byla zahrnuta většinová část NP Malá Fatra, která zahrnovala území o rozloze 225 km².

Změny chování medvědů, human wildlife conflict

Soužití medvědů a lidí je klasickým příkladem „human-wildlife conflict“ (např. Harker & Bates 2007, Karamanlidis et al., 2011). Prezentované výsledky nijak nepopírají skutečnost, že medvěd může být člověku nebezpečný, ani nebagatelizují obavy veřejnosti. Výsledky studie

s tímto tématem příliš nesouvisí, protože obecně neexistuje u daného druhu jednoduchý vztah mezi cenzní velikostí populace a agresivním chováním vzhledem k člověku. Např. v případě kosatek z oblasti Gibraltaru dochází k útokům na lodě při velmi malé velikosti populace (uvádí se 39 jedinců). Obrovský rozdíl v populační hustotě člověka a medvěda má za následek, že i malá změna prostorového chování lidské populace významně ovlivňuje pravděpodobnost interakce mezi oběma druhy. Řada parametrů lidské populace se ovšem mění velmi dramaticky, odkud pochází i označení Velké Zrychlení (Great Acceleration) pro fázi antropocénu od ca. 50. let 20. století (Steffen et al., 2015). Mezi příslušné změny patří i observation bias daný rozvojem moderních komunikačních technologií. Kromě chování lidí v přírodě (Bombieri et al., 2019) je potřeba brát v úvahu reakci druhu na antropogenní změny v prostředí (vznik tzv. human habituated a food conditioned jedinců, Herrero et al., 2005). Zde kromě reaktivních intervencí jsou klíčová preventivní a proaktivní opatření. Podrobná diskuse tohoto tématu je však nad rámec této studie.

Poděkování

Studie byla vypracována na základě dat, jejichž vznik byl financován ze zakázky “Zisťovanie početnosti veľkých šeliem a zisťovanie stupňa hybridizácie vlka dravého na základe analýz DNA.” Tato zakázka byla součástí projektu “Realizácia programov starostlivosti o veľké šelmy na Slovensku.” Sběr vzorků v terénu zajistila Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky (ŠOP SR). Poděkování za terénní práci (více než 30 vzorků) patří Eduardu Apfelovi, Andreji Hruzovi, Robertu Jančíkovi, Milanu Rejkovi, Štefanu Renčovi, Radovanu Reťkovskému, Romanu Ryboši, Veronice Štetiarové, Michalu Turkovi a dalším zaměstnancům ŠOP SR. Propojení genetických dat s habitatovými modely bylo uskutečněno na základě spolupráce se skupinou RNDr. Dušana Romportla, Ph.D., především díky sdílení dat zpracovaných Mgr. Kristýnou Vlkovou.

Podíl autorů

Převážná část laboratorních analýz a zpracování chromatogramů byla proveda Mgr. Nikolou Tkáčovou a Mgr. Janou Šrutovou, přispěli i Mgr. Veronika Kornová a Ing. Petr Matějů, pod vedením doc. Pavla Hulvy a dr. Barbory Černé Bolfikové. Demografické a populačně genetické analýzy byly provedeny týmem autorů pod vedením doc. Pavla Hulvy.

Seznam literatury

- Adams, J. R., and L. P. Waits. 2006. "An efficient method for screening faecal DNA genotypes and detecting new individuals and hybrids in the red wolf (*Canis rufus*) experimental population area". *Conservation Genetics* vol. 8 (issue 1): 123-131.
- Agetsuma-Yanagihara, Y., E. Inoue, and N. Agetsuma. 2017. "Effects of time and environmental conditions on the quality of DNA extracted from fecal samples for genotyping of wild deer in a warm temperate broad-leaved forest". *Mammal Research* vol. 62 (issue 2): 201-207.
- Akaike, H. 1974. "A new look at the statistical model identification". *IEEE Transactions on Automatic Control* vol. 19 (issue 6): 716-723.
- Anderson, D. R., and K. P. Burnham. 2002. "Avoiding Pitfalls When Using Information-Theoretic Methods". *The Journal of Wildlife Management* vol. 66 (issue 3): 912-918.
- Anijalg, P., S. Ho, J. Davison, M. Keis, E. Tammeleht, K. Bobowik, ... and U. Saarma. 2018. "Large-scale migrations of brown bears in Eurasia and to North America during the Late Pleistocene". *Journal of Biogeography* vol. 45 (issue 2): 394-405.
- Anijalg, P., J. Remm, E. Tammeleht, M. Keis, H. Valdmann, and U. Saarma. 2020. "Ongoing recovery of a brown bear population from a century-old severe bottleneck: insights from population genetic and spatially explicit analyses". *Conservation Genetics* vol. 21 (issue 1): 27-40.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. 1st. Cambridge, Massachusetts: Harvard University Press.
- Baláž E. 2002. "Ekológia medveďa hnedého (*Ursus arctos* L.) v Západných Tatrách a na Poľane". Diplomová práca. Technická univerzita vo Zvolene.
- Baláž E. 2003. "Možnosti predchádzania vzniku synantropných jedincov medveďa hnedého. In: Komplexné riešenie problému synantropných medveďov (*Ursus arctos*)". *Zborník z konferencie, Nová Sedlica*. 7 – 16.
- Beja-Pereira, A., R. Oliveira, P. C. Alves, M. K. Schwartz, and G. Luikart. 2009. "Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics". *Molecular Ecology Resources* vol. 9 (issue 5): 1279-1301.
- Bellemain, E., M. A. Nawaz, A. Valentini, J. E. Swenson, and P. Taberlet. 2007. "Genetic tracking of the brown bear in northern Pakistan and implications for conservation". *Biological Conservation* vol. 134 (issue 4): 537-547.
- Bellemain, E., J. E. Swenson, and P. Taberlet. 2006. "Mating Strategies in Relation to Sexually Selected Infanticide in a Non-Social Carnivore: the Brown bear". *Ethology* vol. 112 (issue 3): 238-246.
- Bellemain, E., J. E. Swenson, D. Tallmon, S. Brunberg, and P. Taberlet. 2005. "Estimating Population Size of Elusive Animals with DNA from Hunter-Collected Feces: Four Methods for Brown Bears". *Conservation Biology* vol. 19 (issue 1): 150-161.
- Bellemain, E., and P. Taberlet. 2004. "Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces". *Molecular Ecology Notes* vol. 4 (issue 3): 519-522.
- Benschop, C., H. Haned, and T. Sijen. 2013. "Consensus and pool profiles to assist in the analysis and interpretation of complex low template DNA mixtures". *International Journal of Legal Medicine* vol. 127 (issue 1): 11-23.

- Berezowska-Cnota, T., Konopiński M. K., Bartoń K., Bautista C., Revilla E., Naves J., ... and N. Selva. 2023. 'Individuality Matters in Human–Wildlife Conflicts: Patterns and Fraction of Damage-Making Brown Bears in the North-Eastern Carpathians'. *Journal of Applied Ecology* vol. 60(issue 6): 1127–38.
- Berryman, A. A. 2002. "Population Cycles Causes and Analysis". *Population Cycles*: 3-28.
- Blouin, M. S. 2003. "DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations". *Trends in Ecology & Evolution* vol. 18 (issue 10): 503-511.
- Bojarska, K., and N. Selva. 2013. "Correction factors for important brown bear foods in Europe". *Ursus* vol. 24 (issue 1): 13-15.
- Bombieri, G., J. Naves, V. Penteriani, N. Selva, A. Fernández-Gil, J. V. López-Bao, ... and M. M. Delgado. 2019. "Brown bear attacks on humans: a worldwide perspective". *Sci Rep* vol. 9 issue (1): 1–10.
- Boulanger, J., G. C. White, B. N. McLellan, J. Woods, M. Proctor, and S. Himmer. 2002. "A Meta-Analysis of Grizzly Bear DNA Mark-Recapture Projects in British Columbia, Canada: Invited Paper." *Ursus* vol. 13 (issue 2): 137–52.
- Boulanger, J., K. C. Kendall, J. B. Stetz, D. A. Roon, L. P. Waits, and D. Paetkau. 2008. "Multiple data sources improve DNA-based Mark-Recapture population estimates of grizzly bears". *Ecological Applications* vol. 18 (issue 3): 577-589.
- Bray, S., J. Austin, J. Metcalf, K. Østbye, E. Østbye, S.-E. Lauritzen, ... and A. Cooper. 2013. "Ancient DNA identifies post-glacial recolonisation, not recent bottlenecks, as the primary driver of contemporary mtDNA phylogeography and diversity in Scandinavian brown bears". *Diversity and Distributions* vol. 19 (issue 3): 245-256.
- Broquet, T., and E. Petit. 2004. "Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics". *Molecular Ecology* vol. 13 (issue 11): 3601-3608.
- Bunnell F. L., and D. E. N. Tait. 1985. "Mortality rates of North American bears". *Arctic* vol. 38 (issue 4): 316 – 323.
- Burnham, K. P., and D. R. Anderson. 1998. "Practical Use of the Information-Theoretic Approach". *Model Selection and Inference*: 75-117.
- Caballero, A. 1994. "Developments in the prediction of effective population size". *Heredity* vol. 73 (issue 6): 657-679.
- Carothers, A. D. 1971. "An Examination and Extension of Leslie's Test of Equal Catchability". *Biometrics* vol. 27 (issue 3): 615-630.
- Carroll, E. L., S. J. Childerhouse, R. M. Fewster, N. J. Patenaude, D. Steel, G. Dunshea, L. Boren, and C. S. Baker. 2013. "Accounting for female reproductive cycles in a superpopulation capture–recapture framework". *Ecological Applications* vol. 23 (issue 7): 1677-1690.
- Çilingir, F., Ç. Akin Pekşen, H. Ambarlı, P. Beerli, and C. Bilgin. 2016. "Exceptional maternal lineage diversity in brown bears (*Ursus arctos*) from Turkey". *Zoological Journal of the Linnean Society* vol. 176 (issue 2): 463-477.
- Ciucci, P., V. Gervasi, L. Boitani, J. Boulanger, D. Paetkau, R. Prive, and E. Tosoni. 2015. "Estimating abundance of the remnant Apennine brown bear population using multiple noninvasive genetic data sources". *Journal of Mammalogy* vol. 96 (issue 1): 206-220.

- Clark, Tim. 2013. *Coexisting with large carnivores: Lessons from Greater Yellowstone*. 1st ed. Washington: Island Press; Illustrated edition.
- Cohen, J. E. 1995. "How Many People Can the Earth Support?: The Answers Depend as Much on Social, Cultural, Economic and Political Choices as They Do on Constraints Imposed by Nature". *The Sciences* vol. 35 (issue 6): 18-23.
- Cooch, E. 2008. Program MARK," A gentle introduction". <<http://www.phidot.org/software/mark/index.html>>
- Corander, J., J. Sirén, and E. Arjas. 2008. "Bayesian spatial modeling of genetic population structure." *Computational Statistics* vol. 23: 111-129.
- Creel, S., M. Becker, D. Christianson, E. Dröge, N. Hammerschlag, M. Hayward, ... and P. Schuette. 2015. "Questionable policy for large carnivore hunting". *Science* vol. 350 (issue 6267): 1473-1475.
- Creel, S., G. Spong, J. L. Sands, J. Rotella, J. Zeigle, L. Joe, ... and D. Smith. 2003. "Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes". *Molecular Ecology* vol. 12 (issue 7): 2003-2009.
- Dahle, B., and J. E. Swenson. 2003. "Factors influencing length of maternal care in brown bears (*Ursus arctos*) and its effect on offspring". *Behavioral Ecology and Sociobiology* vol. 54 (issue 4): 352-358.
- Dahle, B., and J. E. Swenson. 2003. "Seasonal range size in relation to reproductive strategies in brown bears *Ursus arctos*". *Journal of Animal Ecology* vol. 72 (issue 4): 660-667.
- Darimont, C. T., P. C. Paquet, A. Treves, K. A. Artelle, and G. Chapron. 2018. "Political populations of large carnivores". *Conservation Biology* vol. 32 (issue 3): 747-749.
- Davidson, G. A., D. A. Clark, B. K. Johnson, L. P. Waits, and J. R. Adams. 2014. "Estimating cougar densities in northeast Oregon using conservation detection dogs". *The Journal of Wildlife Management* vol. 78 (issue 6): 1104-1114.
- Davison, J., S. Y. W. Ho, S. C. Bray, M. Korsten, E. Tammelleht, M. Hindrikson, ... and U. Saarma. 2011. "Late-Quaternary biogeographic scenarios for the brown bear (*Ursus arctos*), a wild mammal model species". *Quaternary Science Reviews* vol. 30 (issue 4): 418-430.
- Davoli, F., K. Schmidt, R. Kowalczyk, and E. Randi. 2013. "Hair snaring and molecular genetic identification for reconstructing the spatial structure of Eurasian lynx populations". *Mammalian Biology* vol. 78 (issue 2): 118-126.
- De Angelis, D., D. Huber, S. Reljic, P. Ciucci, J. Kusak, and J. Hopkins. 2021. "Factors affecting the home range of Dinaric-Pindos brown bears". *Journal of Mammalogy* vol. 102 (issue 2): 481-493.
- De Barba, M., L. P. Waits, P. Genovesi, E. Randi, R. Chirichella, and E. Cetto. 2010. "Comparing opportunistic and systematic sampling methods for non-invasive genetic monitoring of a small translocated brown bear population". *Journal of Applied Ecology* vol. 47 (issue 1): 172-181.
- Di Domenico, G., E. Tosoni, L. Boitani, and P. Ciucci. 2012. "Efficiency of scat-analysis lab procedures for bear dietary studies: The case of the Apennine brown bear". *Mammalian Biology* vol. 77 (issue 3): 190-195.
- Dou, H., H. Yang, L. Feng, P. Mou, T. Wang, J. Ge, and A. L. Roca. 2016. "Estimating the Population Size and Genetic Diversity of Amur Tigers in Northeast China". *PLOS ONE* vol. 11 (issue 4).

- Draper, J. P., L. P. Waits, J. R. Adams, Ch. L. Seals, T. D. Steury, and T. Y. Chiang. 2017. "Genetic health and population monitoring of two small black bear (*Ursus americanus*) populations in Alabama, with a regional perspective of genetic diversity and exchange". *PLOS ONE* vol. 12 (issue 11).
- Dupont, P., C. Milleret, O. Gimenez, R. Bischof, and M. Auger-Méthé. 2019. "Population closure and the bias-precision trade-off in spatial capture–recapture". *Methods in Ecology and Evolution* vol. 10 (issue 5): 661-672.
- Ebert, C., J. Sandrini, B. Welter, B. Thiele, and U. Hohmann. 2021. "Estimating red deer (*Cervus elaphus*) population size based on non-invasive genetic sampling". *European Journal of Wildlife Research* vol. 67 (issue 2): 27-40.
- Emerson, B., and G. Hewitt. 2005. "Phylogeography". *Current Biology* vol. 15 (issue 10): 367-371.
- Efford, M. 2011. "Estimation of population density by spatially explicit capture–recapture analysis of data from area searches". *Ecology* vol. 92 (issue 12): 2202-2207.
- Efford, M. 2023. *SECR: Spatially explicit capture-recapture models*. R package version 4.5.10, <https://CRAN.R-project.org/package=secr>.
- Egbert, A. L., A. W. Stokes, and A. L. Egbert. 1976. "The Social Behaviour of Brown Bears on an Alaskan Salmon Stream". *Bears: Their Biology and Management* vol. 3 (issue 41): 41-56.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. "Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study". *Molecular ecology* vol. 14 (issue 8): 2611-2620.
- Find'o, S., M. Skuban and M. Koreň. 2007. "Brown bear corridors in Slovakia". *Carpathian Wildlife Society*.
- Find'o, S., M. Skuban, M. Kajba, J. Chalmers, and M. Kalaš. 2019. "Identifying attributes associated with brown bear (*Ursus arctos*) road-crossing and roadkill sites". *Canadian Journal of Zoology* vol. 97 (issue 2): 156-164.
- Frank, S. C., M. Leclerc, F. Pelletier, F. Rosell, J. E. Swenson, R. Bischof, ... and A. Zedrosser. 2017. "Sociodemographic factors modulate the spatial response of brown bears to vacancies created by hunting". *Journal of Animal Ecology* vol. 87 (issue 1): 247-258.
- Frankham, R., C. Bradshaw, and B. Brook. 2014. "Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability analyses". *Biological Conservation* vol. 170 (issue 3): 56-63.
- Frosch, Ch., A. Dutsov, D. Zlatanova, K. Valchev, T. E. Reiners, K. Steyer, ... and C. Nowak. 2014. "Noninvasive genetic assessment of brown bear population structure in Bulgarian mountain regions". *Mammalian Biology* vol. 79 (issue 4): 268-276.
- Galetti, M., M. Moleon, P. Jordano, M.M. Pires, P.R. Guimaraes Jr., T. Pape, ... J.C. Svenning. 2018. "Ecological and evolutionary legacy of megafauna extinctions". *Biological Reviews* vol. 93 (issue 2): 845-862.
- Galpern, P., M. Manseau, P. Hettinga, K. Smith, and P. Wilson. 2012. "Allelematch: an R package for identifying unique multilocus genotypes where genotyping error and missing data may be present". *Molecular Ecology Resources* vol. 12 (issue 4): 771-778.
- Gardner, B., J. A. Royle, M. T. Wegan, R. E. Rainbolt, and P. D. Curtis. 2010. "Estimating Black Bear Density Using DNA Data From Hair Snares". *Journal of Wildlife Management* vol. 74 (issue 2): 318-325.

- Gervasi, V., P. Ciucci, J. Boulanger, M. Posillico, C. Sulli, S. Focardi, ... and L. Boitani. 2008. "A Preliminary Estimate of The Apennine Brown Bear Population Size Based on Hair-Snag Sampling and Multiple Data Source Mark–Recapture Huggins Models". *Ursus* vol. 19 (issue 2): 105-121.
- Gervasi, V., P. Ciucci, J. Boulanger, E. Randi, and L. Boitani. 2012. "A multiple data source approach to improve abundance estimates of small populations: The brown bear in the Apennines, Italy". *Biological Conservation* vol. 152: 10-20.
- Gervasi, V., P. Ciucci, F. Davoli, J. Boulanger, L. Boitani, and E. Randi. 2010. "Addressing challenges in non-invasive capture-recapture based estimates of small populations: a pilot study on the Apennine brown bear". *Conservation Genetics* vol. 11 (issue 6): 2299-2310.
- Gervasi, V., and P. Ciucci. 2018. "Demographic projections of the Apennine brown bear population *Ursus arctos marsicanus* (Mammalia: Ursidae) under alternative management scenarios." *The European Zoological Journal* vol. 85 (issue 1): 242-252.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 1.2): "A Computer Program to Calculate F-Statistics". *Journal of Heredity* vol. 86 (issue 6): 485–486.
- Guillot, G., F. Mortier, and A. Estoup. 2005. "GENELAND: a computer package for landscape genetics." *Molecular ecology notes* vol.5 (issue 3): 712-715.
- Guillot, G., F. Santos, and A. Estoup. 2008. "Analysing georeferenced population genetics data with GENELAND: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface". *Bioinformatics* vol. 24 (issue 11): 1406-1407.
- Guillot, G., R. Leblois, A. Coulon, and A. C. Frantz. 2009. "Statistical methods in spatial genetics". *Molecular ecology* vol. 18 (issue 23): 4734-4756.
- Graur, D., and W. H. Li. 2000. *Genome Evolution: a statistical approach*. 2nd. Oxford: Oxford University Press.
- Guthery, F. S. 2003. "Model selection and multimodel inference: a practical information-theoretic approach". *Wildl Manage* vol. 67 (issue 2): 655–656.
- Gray, T. N. E., T. N. C. Vidya, S. Potdar, D. K. Bharti, and P. Sovanna. 2014. "Population size estimation of an Asian elephant population in eastern Cambodia through non-invasive mark-recapture sampling". *Conservation Genetics* vol. 15 (issue 4): 803-810.
- Harker, D., and D. Bates. 2007. "The Black Bear Hunt in New Jersey: A Constructionist Analysis of an Intractable Conflict". *Society & Animals* vol. 15 (issue 4): 329-352.
- Herrero S., T. Smith, T. D. DeBruyn, K. Gunther, and C. A. Matt. 2005. "Brown bear habituation to people—safety, risks, and benefits". *Wildl Soc Bull* vol. 33 (issue 1): 362–373.
- Hertel, A. G., R. Bischof, O. Langval, A. Mysterud, J. Kindberg, J. E. Swenson, and A. Zedrosser. 2018. "Berry production drives bottom-up effects on body mass and reproductive success in an omnivore". *Oikos* vol. 127 (issue 2): 197-207.
- Hoban S., M. Bruford, J. D’Urban Jackson, M. Lopes-Fernandes, M. Heuertz, P. A. Hohenlohe, ... and L. Laikre. 2020. "Genetic diversity targets and indicators in the CBD post-2020 global biodiversity framework must be improved." *Biological Conservation* vol. 248: 108654.
- Hell, P., and K. Sabadoš. 1995. "Niektoré parametre západokarpatskej populácie medveďa hnedého (*Ursus arctos*) v roku 1992.(Some parameters of the Western-Carpathians population of brown bear (*Ursus arctos*) in 1992.). *Folia venatoria* vol. 25: 97-104.

- Hewitt, G. 2000. "The genetic legacy of the Quaternary ice ages". *Nature* vol. 405 (issue 6789): 907-913.
- Höss, M., M. Kohn, S. Pääbo, F. Knauer, and W. Schröder. 1992. "Excrement analysis by PCR". *Nature* vol. 359 (issue 6392): 199-199.
- Chapron, G., P. Kaczensky, J. Linnell, M. von Arx, D. Huber, H. Andrén, ... and L. Boitani. 2014. "Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes". *Science* vol. 346 (issue 6216): 1517-1519.
- Charlesworth, B. 2009. "Effective population size and patterns of molecular evolution and variation". *Nature Reviews Genetics* vol. 10 (issue 3): 195-205.
- Chen, C., E. Durand, F. Forbes, and O. François. 2007. "Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: a new computer program and a comparison study". *Molecular Ecology Notes* vol. 7 (issue 5): 747-756.
- Jakubiec Z. 2001. Niedźwiedź brunatny *Ursus arctos* L. w Polskiej części Karpat. Polska Akademia Nauk, Kraków. 108 s.
- Jamieson, I. G., and F. W. Allendorf. 2012. How does the 50/500 rule apply to MVPs?. *Trends in ecology & evolution* vol. 27 (issue 10): 578-584.
- Janiga, M., M. Fečková, J. Korňan, M. Kalaš, I. Labudíková, K. Matiaško, and P. Londa. 2006. "Preliminary results on genetic tracking of the Brown Bear (*Ursus arctos*) individuals in the Malá Fatra National Park (Slovakia)". *Oecologia Montana* vol. 15 (issue 2): 24-26.
- Jensen, A. L. 1989. "Confidence Intervals for Nearly Unbiased Estimators in Single-Mark and Single-Recapture Experiments". *Biometrics* vol. 45 (issue 4): 1233-1237.
- Kaczensky, P., G. Chapron, M. von Arx, D. Huber, H. Andrén, and J. Linnell. 2013. "Status, management and distribution of large carnivores – bear, lynx, wolf and wolverine – in Europe; Part 2 (Country summaries)". IUCN/SSC Large Carnivore Initiative for Europe.
- Kaczensky, P., D. C. Linnell, D. Huber, M. Von Arx, A. Henrik, U. Breitenmoser, and L. Boitani. 2021. "Distribution of large carnivores in Europe 2012 - 2016: Distribution maps for Brown bear, Eurasian lynx, Grey wolf, and Wolverine". Dryad, Dataset
- Kalaš, M. 2017. "Organizované priame pozorovania medveďa hnedého (*Ursus arctos*) v oblasti národného parku Malá Fatra". *Zborník Výskum a ochrana Malej Fatry*. 76-81
- Kalaš, M. 2020. "Mortalita medveďa hnedého (*Ursus arctos*) na Slovensku spôsobená dopravou v rokoch 2007-2019". *ZOOLOGICKÉ DNY Olomouc 2020* 91-92
- Kalinowski, S. T., M. L. Taper, and T. C. Marshall. 2007. "Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment." *Molecular Ecology* vol 16 (issue 5): 1099-1106.
- Kalinowski, S. T., A. P. Wagner, and M. L. Taper. 2006. "ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship". *Molecular Ecology Notes* vol. 6 (issue 2): 576-579.
- Karamanlidis, A. A., A. Sanopoulos, L. Georgiadis, and A. Zedrosser. 2011. "Structural and economic aspects of human-bear conflicts in Greece". *Ursus* vol. 22 (issue 2): 141-151.
- Karamanlidis, A. A., M. Straka, E. Drosopoulou, M. de Gabriel Hernando, I. Kocijan, L. Paule, and Z. Scouras. 2012. "Genetic diversity, structure, and size of an endangered brown bear population

- threatened by highway construction in the Pindos Mountains, Greece". *European Journal of Wildlife Research* vol. 58 (issue 3): 511-522.
- Kavčič, I., M. Adamič, P. Kaczensky, M. Krofel, M. Kobal, and K. Jerina. 2015. "Fast food bears: brown bear diet in a human-dominated landscape with intensive supplemental feeding". *Wildlife Biology* vol. 21 (issue 1): 1-8.
- Kendall, K. C., J. B. Stetz, J. Boulanger, A. C. Macleod, D. Paetkau, and G. C. White. 2009. "Demography and Genetic Structure of a Recovering Grizzly Bear Population". *Journal of Wildlife Management* vol. 73 (issue 1): 3-17.
- Kendall, K. C., T. A. Graves, J. A. Royle, A. C. Macleod, K. S. McKelvey, J. Boulanger, and J. S. Waller. 2019. "Using bear rub data and spatial capture-recapture models to estimate trend in a brown bear population". *Scientific Reports* vol. 9 (issue 1): 268-276.
- Kendall, W. L. 1999. "Robustness of closed capture–recapture methods to violations of the closure assumption". *Ecology* vol. 80 (issue 8): 2517-2525.
- Kindberg, J., J. E. Swenson, G. Ericsson, E. Bellemain, Ch. Miquel, and P. Taberlet. 2011. "Estimating population size and trends of the Swedish brown bear *Ursus arctos* population". *Wildlife Biology* vol. 17 (issue 2): 114-123.
- Kocijan I., A. Galov, H. Cetkovic, J. Kusak, T. Gomerčič and D. Huber. 2011: "Genetic diversity of Dinaric brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia with implications for bear conservation in Europe". *Mammalian Biology Zeitschrift für Säugetierkunde* vol. 76 (issue 5): 615-621.
- Kohn, M., F. Knauer, A. Stoffella, W. Schröder, and S. Pääbo. 1995. "Conservation genetics of the European brown bear - a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences". *Molecular Ecology* vol. 4 (issue 1): 95-104.
- Kopelman, N. M., J. Mayzel, M. Jakobsson, N. A. Rosenberg, and I. Mayrose. 2015. "CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K". *Molecular Ecology Resources* vol. 15 (issue 5): 1179–1191.
- Koreň, M., S. Find'ová, M. Skuban, and M. Kajba. 2011. "Habitat suitability modelling from non-point data: the case study of brown bear habitat in Slovakia". *Ecological Informatics* vol. 6 (issue 5): 296-302.
- Kovach, A. I., and R. A. Powell. 2003. "Effects of body size on male mating tactics and paternity in black bears, *Ursus americanus*". *Canadian Journal of Zoology* vol. 81 (issue 7): 1257-1268.
- Krofel, M., M. Špacapan, and K. Jerina. 2017. "Winter sleep with room service: denning behaviour of brown bears with access to anthropogenic food". *Journal of Zoology* vol. 302 (issue 1): 8-14.
- Kubala, J., P. Smolko, F. Zimmermann, R. Rigg, B. Tým, T. Il'ko, ... and U. Breitenmoser. 2017. Robust monitoring of the Eurasian lynx *Lynx lynx* in the Slovak Carpathians reveals lower numbers than officially reported. *Oryx* vol. 53 (issue 3): 548–556.
- Lacy, R. C. 1993. "VORTEX: a computer simulation model for population viability analysis." *Wildlife research* vol. 20 (issue 1): 45-65.
- Latham, E., J. B. Stetz, I. Seryodkin, D. Miquelle, and M. L. Gibeau. 2012. "Non-invasive genetic sampling of brown bears and Asiatic black bears in the Russian Far East: A pilot study". *Ursus* vol. 23 (issue 2): 145-158.

- Lee, S. M., and A. Chao. 1994. "Estimating Population Size Via Sample Coverage for Closed Capture-Recapture Models". *Biometrics* vol. 50 (issue 1): 88-97.
- Lenko P. 2006. "Veľké šelmy v Západných Tatrách". *Naše poľovníctvo III (1)*. 16 – 17.
- Li, Y. L., and J. X. Liu. 2018. "STRUCTURESELECTOR: A web-based software to select and visualize the optimal number of clusters using multiple methods". *Molecular Ecology Resources* vol. 18 (issue 1): 176–177.
- Liberg, O., G. Chapron, P. Wabakken, H. Ch. Pedersen, N. T. Hobbs, and H. Sand. 2012. "Shoot, shovel and shut up: cryptic poaching slows restoration of a large carnivore in Europe". *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* vol. 279 (issue 1730): 910-915.
- Lindberg, M. S. 2012. "A review of designs for capture–mark–recapture studies in discrete time". *Journal of Ornithology* vol. 152 (issue 2): 355-370.
- Lonsinger, R. C., P. M. Lukacs, E. M. Gese, and L. P. Waits. 2019. "Empirical comparisons of abundance estimators for two sympatric carnivores using noninvasive genetic sampling". *Wildlife Biology* vol. 20 (issue 1): 1-9.
- López-Bao, J. V., R. Godinho, R. G. Rocha, G. Palomero, J. C. Blanco, F. Ballesteros, and J. Jiménez. 2020. "Consistent bear population DNA-based estimates regardless molecular markers type". *Biological Conservation* vol. 248: 865-876.
- Lorenzini, R., M. Posillico, S. Lovari, and A. Petrella. 2004. "Non-invasive genotyping of the endangered Apennine brown bear: a case study not to let one's hair down". *Animal Conservation* vol. 7 (issue 2): 199-209
- Luikart, G., N. Ryman, D. A. Tallmon, M. K. Schwartz, and F. W. Allendorf. 2010. "Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches". *Conservation Genetics* vol. 11 (issue 2): 355-373.
- Lukacs, P. M., and K. P. Burnham. 2005. "Review of capture-recapture methods applicable to noninvasive genetic sampling". *Molecular Ecology* vol. 14 (issue 13): 3909-3919.
- Mapový portál KIMS: Kompetencie ŠOP. (2014). Mapový portál KIMS Štátnej ochrany prírody SR, <<http://webgis.biomonitoring.sk/>>
- Matosiuk, M., W. Śmietana, M. Czajkowska, L. Paule, J. Štofík, D. Krajmerová, ... and M. Ratkiewicz. 2018. "Genetic differentiation and asymmetric gene flow among Carpathian brown bear (*Ursus arctos*) populations—Implications for conservation of transboundary populations". *Ecology and Evolution* vol. 9 (issue 3): 1501-1511.
- McKelvey, K. S., M. K. Schwartz, and R. DeWoody. 2004. "Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions: problems and new solutions". *Journal of Wildlife Management* vol. 68 (issue 3): 439-448.
- McLellan, B. N., M. F. Proctor, D. Huber, and S. Michel. (IUCN SSC Bear Specialist Group). 2016. "Brown Bear (*Ursus arctos*) Isolated Populations (Supplementary Material to *Ursus arctos* Redlisting account)". *The IUCN Red List of Threatened Species 2016*.
- McLellan, B. N., M. F. Proctor, D. Huber, and S. Michel. 2017. "*Ursus arctos*". *The IUCN Red List of Threatened Species 2017*

- McLoughlin, P. D., S. H. Ferguson, and F. Messier. 2000. "Intraspecific Variation in Home Range Overlap with Habitat Quality: A Comparison among Brown Bear Populations". *Evolutionary Ecology* vol. 14 (issue 1): 39-60.
- Méndez, T. P., J. Naves, J. F. Vázquez, A. Fernández-Gil, J. Seijas, J. Albornoz, ... and A. Domínguez. 2014. "Estimating the population size of the endangered Cantabrian brown bear through genetic sampling". *Wildlife Biology* vol. 20 (issue 5): 300-309.
- Meyer D., A. Zeileis, and K. Hornik. 2023. vcd: Visualizing Categorical Data. *R package version 1.4-11* <<https://CRAN.R-project.org/package=vcd>>
- Miller, C. R., P. Joyce, and L. P. Waits. 2002. "Assessing Allelic Dropout and Genotype Reliability Using Maximum Likelihood". *Genetics* vol. 160 (issue 1): 357-366.
- Miller, C. R., P. Joyce, and L.P. Waits. 2005. "A new method for estimating the size of small populations from genetic mark-recapture data". *Molecular Ecology* vol. 14 (issue 7): 1991-2005.
- Morrison, J., W. Sechrest, E. Dinerstein, D. Wilcove, and J. Lamoreux. 2007. "Persistence of Large Mammal Faunas as Indicators of Global Human Impacts". *Journal of Mammalogy* vol. 88(issue 6), 1363-1380.
- Morton, J. M., G. C. White, G. D. Hayward, D. Paetkau, and M. P. Bray. 2016. "Estimation of the brown bear population on the Kenai Peninsula, Alaska". *The Journal of Wildlife Management* vol. 80 (issue 2): 332-346.
- Murphy, M. A., K. C. Kendall, A. Robinson, and L. P. Waits. 2007. "The impact of time and field conditions on brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA amplification". *Conservation Genetics* vol. 8 (issue 5): 1219-1224.
- Murphy, M. A., L. P. Waits, and K. C. Kendall. 2003. "The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*)". *Molecular Ecology* vol. 12 (issue 8): 2261-2265.
- Národné lesnícke centrum. (2019). Poľovnícka štatistická ročenka Slovenskej republiky 2019, Zvolen
- Národné lesnícke centrum. (2020). Poľovnícka štatistická ročenka Slovenskej republiky 2020, Zvolen
- Národné lesnícke centrum. (2021). Poľovnícka štatistická ročenka Slovenskej republiky 2021, Zvolen
- Okániková, Z., D. Romportl, A. Kluchová, V. Hlaváč, M. Strnad. K. Vlková, ... and C. R. Papp. 2021. "Methodology for identification of ecological corridors in the Carpathian countries by using large carnivores as umbrella species." Danube Transnational Programme ConnectGREEN Project "Restoring and managing ecological corridors in mountains as the green infrastructure in the Danube basin". State Nature Conservancy of the Slovak Republic, Banská Bystrica.
- Olejarz, A., J. Aspi, I. Kojola, V. Nivala, A. K. Niskanen, and J. Harmoinen. 2022. "Ain't Nothing like Family—Female Brown Bears Share Their Home Range with Relatives". *Diversity* vol. 14 (issue 1): 120-131.
- Otis, D. L., P. Kenneth, G. C. White, and D. Anderson. 1978. "Statistical Inference from Capture Data on Closed Animal Populations.". *Wildlife Monographs* vol. 62 (issue 3): 3-135.
- Paetkau, D. 2003. "An empirical exploration of data quality in DNA-based population inventories". *Molecular Ecology* vol. 12 (issue 6): 1375-1387.
- Paetkau, D., and C. Strobeck. 1994. "Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations". *Molecular Ecology* vol. 3 (issue 5): 489-495.

- Paetkau, D., L. P. Waits, P. L. Clarkson, L. Craighead, E. Vyse, R. Ward, and C. Strobeck. 1998. "Variation in Genetic Diversity across the Range of North American Brown Bears". *Conservation Biology* vol. 12 (issue 2): 418-429.
- Paule L., 2015: "Odhad veľkosti populácie medveďa hnedého na Slovensku na základe genetických analýz." Pp.: 73-84. In: Lešová A. & Antal V. (eds.), Ochrana a manažment veľkých šeliem na Slovensku. Banská Bystrica: Štátna ochrana prírody SR.
- Pennell, M. W., C. R. Stansbury, L. P. Waits, and C. R. Miller. 2013. "CAPWIRE: A R package for estimating population census size from non-invasive genetic sampling". *Molecular Ecology Resources* vol. 13 (issue 1): 154–157.
- Perez, I., E. Geffen, and O. Mokady. 2006. "Critically Endangered Arabian leopards *Panthera pardus nimr* in Israel: estimating population parameters using molecular scatology". *Oryx* vol. 40 (issue 3): 295-301.
- Pérez, T., F. Vázquez, J. Naves, A. Fernández, A. Corao, J. Albornoz, and A. Domínguez. 2009. "Non-invasive genetic study of the endangered Cantabrian brown bear (*Ursus arctos*)". *Conservation Genetics* vol. 10 (issue 2): 291-301.
- Pérez-Girón, J. C., E. R. Díaz-Varela, P. Álvarez, O. H. Palacios, F. Ballesteros, and J. V. López-Bao. 2022. "Linking landscape structure and vegetation productivity with nut consumption by the Cantabrian brown bear during hyperphagia". *Science of The Total Environment* vol. 813 (issue 2).
- Phillips, S. J., M. Dudík, and R. E. Schapire. 2016. MAXENT software for modeling species niches and distributions (Version 3.4.1). <http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/. Accessed on 2023-6-14.>
- Piggott, M. P. 2004. "Effect of sample age and season of collection on the reliability of microsatellite genotyping of faecal DNA". *Wildlife Research* vol. 31 (issue 5): 485-493.
- Pollock, K. H. 1976. "Building Models of Capture-Recapture Experiments". *The Statistician* vol. 25 (issue 4): 253-259.
- Popescu, V. D., R. Iosif, M. I. Pop, S. Chiriac, G. Bouroș, and B. J. Furnas. 2017. "Integrating sign surveys and telemetry data for estimating brown bear (*Ursus arctos*) density in the Romanian Carpathians". *Ecology and Evolution* vol. 7 (issue 18): 7134-7144.
- Pledger, S. 2000. "Unified maximum likelihood estimates for closed capture–recapture models using mixtures". *Biometrics* vol. 56 (issue 2): 434-442.
- Pompanon, F., A. Bonin, E. Bellemain, and P. Taberlet. 2005. "Genotyping errors: causes, consequences and solutions". *Nature Reviews Genetics* vol. 6 (issue 11): 847-859.
- Preatoni, D., A. Mustoni, A. Martinoli, E. Carlini, B. Chiarenzi, S. Chiozzini, ... and G. Tosi. 2005. "Conservation of brown bear in the Alps: space use and settlement behavior of reintroduced bears". *Acta Oecologica* vol. 28 (issue 3): 189-197.
- Pritchard, J. K., and W. Wen. 2004. "Documentation for STRUCTURE software: Version 2.3. "
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. "Inference of population structure using multilocus genotype data". *Genetics* vol. 155 (issue 2): 945–959.
- Puechmaille, S. J., and E. J. Petit. 2007. "Empirical evaluation of non-invasive capture-mark-recapture estimation of population size based on a single sampling session". *Journal of Applied Ecology* vol. 44 (issue 4): 843-852.

- Puechmaille, S. J. 2016. "The program STRUCTURE does not reliably recover the correct population structure when sampling is uneven: Subsampling and new estimators alleviate the problem". *Molecular Ecology Resources* vol. 16 (issue 3): 608–627.
- Pylidis, Ch., P. Anijalg, U. Saarma, D. A. Dawson, N. Karaiskou, R. Butlin, ... and T. A. Burke. 2021. "Multisource noninvasive genetics of brown bears (*Ursus arctos*) in Greece reveals a highly structured population and a new matrilineal contact zone in southern Europe". *Ecology and Evolution* vol. 11 (issue 11): 6427-6443.
- QGIS Development Team. 2021. QGIS Geographic Information System. <<https://www.qgis.org>>
- Ramón-Laca, A., L. Soriano, D. Gleeson, and J. A. Godoy. 2015. "A simple and effective method for obtaining mammal DNA from faeces". *Wildlife Biology* vol. 21 (issue 4): 195-203.
- Randi, E., L. Gentile, G. Boscagli, D. Huber, and H. Roth. 1994. "Mitochondrial DNA sequence divergence among some west European brown bear (*Ursus arctos* L.) populations. Lessons for conservation". *Heredity* vol. 73 (issue 5): 480-489.
- Reed, J. M., L. S. Mills, J. B. Dunning Jr, E. S. Menges, K. S. McKelvey, R. Frye, ... and P. Miller. 2002. "Emerging issues in population viability analysis." *Conservation biology* vol. 16 (issue 1): 7-19.
- Rigg, R., and M. Adamec. 2007. Status, ecology and management of the brown bear (*Ursus arctos*) in Slovakia. *Slovak Wildlife Society, Liptovský Hrádok*, 128.
- Robinson, S. J., L. P. Waits, I. D. Martin, and S. A. Network. 2007. " *Evaluation of Genetic Structure Among Black Bears (Ursus americanus) in Kenai Fjords National Park and the Kenai Peninsula, Alaska: Final Report 2007*". National Park Service.
- Robinson, S. J., L. P. Waits, and I. D. Martin. 2009. "Estimating abundance of American black bears using DNA-based capture–mark–recapture models". *Ursus* vol. 20 (issue 1): 1-11.
- Roffler, G. H., J. N. Waite, K. L. Pilgrim, K. E. Zarn, and M. K. Schwartz. 2019. "Estimating abundance of a cryptic social carnivore using spatially explicit capture–recapture". *Wildlife Society Bulletin* vol. 43 (issue 1): 31-41.
- Rosenberg, N. A., S. Mahajan, S. Ramachandran, C. Zhao, J. K. Pritchard and M. W. Feldman. 2005. Clines, clusters, and the effect of study design on the inference of human population structure. *PLoS genetics* vol 1 (issue 6): e70.
- Saarma, U., S. Y. W. Ho, O. G. Pybus, M. Kaljuste, I. L. Tumanov, I. Kojola, ... and A. M. Rõkov. 2007. "Mitogenetic structure of brown bears (*Ursus arctos* L.) in northeastern Europe and a new time frame for the formation of European brown bear lineages. " *Molecular Ecology* vol. 16 (issue 2): 401–413.
- Sabadoš, K., and M. Šimiak. "Distribution and hunting management of the brown bear (*Ursus arctos* L.) in Slovakia." *Folia Venatoria* vol. 10 (issue 11): 15-35.
- Seber, G. A. F. 1986. "A Review of Estimating Animal Abundance". *Biometrics* vol. 42 (issue 2): 267-292.
- Selva, N., C. S. Teitelbaum, A. Sergiel, T. Zwijacz-Kozica, F. Zięba, K. Bojarska, and T. Mueller. 2017. "Supplementary ungulate feeding affects movement behavior of brown bears". *Basic and Applied Ecology* vol. 24 (issue 3): 68-76.

- Seryodkin, I. V., J. Paczkowski, M. Y. Borisov, and Y. K. Petrunenko. 2017. "Home ranges of brown bears on the Kamchatka peninsula and Sakhalin Island". *Contemporary Problems of Ecology* vol. 10 (issue 6): 599-611.
- Schaffer, W. M. 1981. "Ecological Abstraction: The Consequences of Reduced Dimensionality in Ecological Models". *Ecological Monographs* vol. 51 (issue 4): 383-401.
- Schulte, L., D. De Angelis, N. Babic, and S. Reljić. 2021. "Very Small Home Ranges of Two Gravid European Brown Bears during Hyperphagia". *Animals* vol. 11 (issue 12): 1-12.
- Schwartz, M., D. Tallmon, and G. Luikart. 1998. "Review of DNA-based census and effective population size estimators". *Animal Conservation* vol. 1 (issue 4): 293-299.
- Schwartz, M., G. Luikart, and R. Waples. 2007. "Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management". *Trends in ecology & evolution* vol. 22 (issue 1): 25-33.
- Schwartz C. C., K. A. Keating, H. V. Reynolds, V. G. Barnes, R. A. Sellers, J. E. Swenson, ... and S. Herrero. 2003. "Reproductive maturation and senescence in the female brown bear". *Ursus* vol. 14:109–119.
- Schwartz, C. C., S. D. Miller, and M. Haroldson. 2003. Grizzly bear. (*Ursus arctos*). Wild Mammals of North America: Biology, Management, and Conservation. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, Maryland.
- Skrbinšek, T. 2015. "Genotyping quality assessment, genotype cleanup and population abundance estimates for a study of brown bears in Slovakia using noninvasive genetic sampling". 1-17, nepublikováno.
- Skrbinšek, T. 2020. "Effects of different environmental and sampling variables on the genotyping success in field-collected scat samples: a brown bear case study". *Acta Biol. Slov* vol. 63 (issue 2): 89-98.
- Skrbinšek, T., M. Konec, Š. Hočevar, E. Pazhenková, and A. Gonev. 2021. "Analysis of noninvasive genetic samples from brown bears (*Ursus arctos*) from the transboundary prespa basin. 2021." *Report*: 1-27.
- Skrbinšek, T., R. Luštrik, A. Majić-Skrbinšek, H. Potočnik, F. Kljun, M. Jelenčič, ... and P. Trontelj. 2019. "From science to practice: genetic estimate of brown bear population size in Slovenia and how it influenced bear management". *European Journal of Wildlife Research* vol. 65 (issue 2): 247-261.
- Skrbinšek, T., M. Jelenčič, L. Waits, I. Kos, and P. Trontelj. 2010. "Highly efficient multiplex PCR of noninvasive DNA does not require pre-amplification". *Molecular Ecology Resources* vol. 10 (issue 3): 495-501.
- Skrbinšek, T., M. Jelenčič, L. Waits, I. Kos, K. Jerina, and P. Trontelj. 2012. "Monitoring the effective population size of a brown bear (*Ursus arctos*) population using new single-sample approaches". *Molecular Ecology* vol. 21 (issue 4): 862-875.
- Skrbinšek, T., M. Jelenčič, R. Luštrik, M. Konec, B. Boljte, K. R. Jerina, ... and Đ. Huber. 2017. "Genetic estimates of census and effective population sizes of brown bears in Northern Dinaric Mountains and South-eastern Alps". LIFE DINALP BEAR project report *Rep. Life*.
- Skuban, M., S. Find'o, and M. Kajba. 2016. "Human impacts on bear feeding habits and habitat selection in the Poľana Mountains, Slovakia". *European Journal of Wildlife Research* vol. 62: 353-364.

- Skuban, M., S. Find'o, M. Kajba, M. Koreň, J. Chamera, and V. Antal. 2017. "Effects of roads on brown bear movements and mortality in Slovakia". *European Journal of Wildlife Research* vol. 63 (issue 5): 82.
- Slovenská poľovnícka komora. 2023. "Počet členov SPK". <<https://www.polovnickakomora.sk/sk/clenstvo-v-spk/clenska-zakladna/1907-pocet-clenov-spk.html>>.
- Solberg, K. H., E. Bellemain, O. M. Drageset, P. Taberlet, and J. E. Swenson. 2006. "An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size". *Biological Conservation* vol. 128 (issue 2): 158-168.
- Stanley, T. R., and K. P. Burnham. 1999. A closure test for time-specific capture-recapture data. *Environmental and Ecological Statistics* vol. 6 (issue 2): 197-209.
- Stanley, T. R., and J. D. Richards. 2005. "Software Review: A program for testing capture–recapture data for closure". *Wildlife Society Bulletin* vol. 33 (issue 2): 782-785.
- Steffen, W., W. Broadgate, L. Deutsch, O. Gaffney, and C. Ludwig. 2015. "The trajectory of the Anthropocene: The Great Acceleration". *The Anthropocene Review* vol. 2 (issue 1): 81-98.
- Stenglein, J. L., M. De Barba, D. E. Ausband, and L. P. Waits. 2010a. "Impacts of sampling location within a faeces on DNA quality in two carnivore species". *Molecular Ecology Resources* vol. 10 (issue 1): 109-114.
- Stenglein, J. L., L. P. Waits, D. E. Ausband, P. Zager, and C. M. Mack. 2010b. "Efficient, Noninvasive Genetic Sampling for Monitoring Reintroduced Wolves". *Journal of Wildlife Management* vol. 74 (issue 5): 1050-1058.
- Stetz, J. B., T. Seitz, and M. A. Sawaya. 2015. "Effects of Exposure on Genotyping Success Rates of Hair Samples from Brown and American Black Bears". *Journal of Fish and Wildlife Management* vol. 6 (issue 1): 191-198.
- Steyaert, S., A. Endrestøl, K. Hackländer, J. Swenson, and A. Zedrosser. 2012. "The mating system of the brown bear *Ursus arctos*". *Mammal Review* vol. 42 (issue 1): 12-34.
- Støen, O., E. Bellemain, S. Sæbø, and J. Swenson. 2005. "Kin-related spatial structure in brown bears *Ursus arctos*". *Behavioral Ecology and Sociobiology* vol. 59 (issue 2): 191-197.
- Stonorov, D., and A. W. Stokes. 1972. "Social Behavior of the Alaska Brown Bear". *Bears: Their Biology and Management* vol. 2 (23): 232-242.
- Straka, M., L. Paule, O. Ionescu, J. Štofík, and M. Adamec. 2012. "Microsatellite diversity and structure of Carpathian brown bears (*Ursus arctos*): consequences of human caused fragmentation". *Conservation Genetics* vol. 13 (issue 1): 153-164.
- Straka M., J. Štofík, and L. Paule. 2013. "Inventory of brown bears in the Poloniny National Park (Slovakia) by combination of snow tracking and genetic identification of individuals". *Rocz Bieszczadzkie* vol. 21 (issue 1): 234–247.
- Sugiura, N. 2007. "Further analysis of the data by Akaike's information criterion and the finite corrections". *Communications in Statistics - Theory and Methods* vol. 7 (issue 1): 13-26.
- Swenson, J. E. 2000. "Action plan for the conservation of the brown bear in Europe (*Ursus arctos*)". No 18-114. *Council of Europe*.
- Swenson, J. E., P. Taberlet, and E. Bellemain. 2011. "Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos*". *Mammal Review* vol. 41 (issue 2): 87-98.

- Štatistický úrad, S. 2023. "DATAcube". <<https://datacube.statistics.sk>>
- Štofik, J., J. Bučko, M. Gič, and M. Saniga. 2013. "Time and spatial trends in the brown bear *Ursus arctos* population in Slovakia (1900–2010)". *Folia oecologica* vol. 40 (issue 1): 117-129.
- Taberlet, P. 1996. "Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR". *Nucleic Acids Research* vol. 24 (issue 16): 3189-3194.
- Taberlet, P., and J. Bouvet. 1992. "Génétique de l'Ours brun des Pyrenees (*Ursus arctos*): Premiers résultats". *Comptes rendus del'Académie des sciences. Série 3, Sciences de la vie* vol. 314 (issue 1): 15-21.
- Taberlet P., and J. Bouvet. 1994. "Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe". *Proceedings of the Royal Society* vol. 25 (issue 13): 195-200.
- Taberlet, P., J. J. Camarra, S. Griffin, E. Uhrès, O. Hanotte, L. P. Waits, ... and J. Bouvet. 1997. "Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population". *Molecular Ecology* vol. 6 (issue 9): 869-876.
- Taberlet, P., and G. Luikart. 1999. "Non-invasive genetic sampling and individual identification". *Biological Journal of the Linnean Society* vol. 68 (1-2): 41-55.
- Taberlet, P., J. E. Swenson, F. Sandegren, and A. Bjarvall. 1995. " Localization of a Contact Zone between Two Highly Divergent Mitochondrial DNA Lineages of the Brown Bear *Ursus arctos* in Scandinavia". *Conservation Biology* vol. 9 (issue 5): 1255–1261.
- Tallmon, D. A., E. Bellemain, J. E. Swenson, P. Taberlet, and R. DeWoody. 2004. "Genetic monitoring of scandinavian brown bear effective population size and immigration". *Journal of Wildlife Management* vol. 68 (issue 4): 960-965.
- Tammeleht, E., J. Remm, M. Korsten, J. Davison, I. Tumanov, A. Saveljev, ... and U. Saarma. 2010. "Genetic structure in large, continuous mammal populations: the example of brown bears in northwestern Eurasia". *Molecular Ecology* vol. 19 (issue 24): 5359-5370.
- Tee, T. L., W. L. Lai, T. K. Ju Wei, O. Z. Shern, F. T. van Manen, S. P. Sharp, ... and S. Ratnayeke. 2020. "An evaluation of noninvasive sampling techniques for Malayan sun bears". *Ursus* vol. 20 (issue 31e16): 1-12.
- Tkadlec, E. 2008. *Populační ekologie: struktura, růst a dynamika populací*. 1. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci.
- Tosoni, E., L. Boitani, G. Mastrantonio, R. Latini, and P. Ciucci. 2017. "Counts of unique females with cubs in the Apennine brown bear population, 2006–2014". *Ursus* vol. 28 (issue 1): 1-14.
- Tsaparis, D., N. Karaiskou, Y. Mertzanis, and A. Triantafyllidis. 2014. "Non-invasive genetic study and population monitoring of the brown bear (*Ursus arctos*) (Mammalia: Ursidae) in Kastoria region – Greece". *Journal of Natural History* vol. 49 (5-8): 393-410.
- Tumendemberel, O., M. Proctor, H. Reynolds, J. Boulanger, A. Luvsamjamba, T. Tserenbataa, ... and D. Paetkau. 2015. "Gobi bear abundance and inter-oases movements, Gobi Desert, Mongolia". *Ursus* vol. 26 (issue 2): 129-142.
- Tumendemberel, O., J. M. Tebbenkamp, A. Zedrosser, M. F. Proctor, E. J. Blomberg, D. J. Morin, ... and L. P. Waits. 2021. "Long-term monitoring using DNA sampling reveals the dire demographic status of the critically endangered Gobi bear". *Ecosphere* vol. 12 (issue 8): 96-111.

- Tumendemberel, O., A. Zedrosser, M. Proctor, H. Reynolds, J. Adams, J. Sullivan, ... and T.-Y. Chiang. 2019. "Phylogeography, genetic diversity, and connectivity of brown bear populations in Central Asia". *PLOS ONE* vol. 14 (issue 8): 531-544.
- Ungrová, L. 2021. "Ochranařská genetika rysa ostrovida v Západních Karpatech". Diplomová práce. Univerzita Karlova
- Valdiosera, C., N. García, C. Anderung, L. Dalén, E. Crégut-Bonnoure, R.-D. Kahlke, ... and I. Barnes. 2007. "Staying out in the cold: glacial refugia and mitochondrial DNA phylogeography in ancient European brown bears". *Molecular Ecology* vol. 16 (issue 24): 5140-5148.
- Valière, N. 2002. GIMLET: " A computer program for analysing genetic individual identification data". *Molecular Ecology Notes* vol. 2 (issue 3): 377–379.
- Vanpé, C., B. Piédallu, P. Y. Quenette, J. Sentilles, G. Queney, S. Palazón, ... and O. Gimenez. 2021. "Estimating abundance of a recovering transboundary brown bear population with capture-recapture models". *bioRxiv*
- Veselovská, L. 2023. "Populačná genetika vlka dravého v Západných Karpatoch". Diplomová práce. Univerzita Karlova.
- Vlková K., V. Zýka, C. R. Papp, and D. Romportl. 2022. "An ecological network of large carnivores as a key tool for protecting landscape connectivity in the Carpathians". *Journal of Maps* p. 391.
- Waits, L. P., G. Luikart, and P. Taberlet. 2001. "Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines". *Molecular Ecology* vol. 10 (issue 1): 249-256.
- Wallach, A. D., I. Izhaki, J. D. Toms, W. J. Ripple, and U. Shanas. 2015. "What is an apex predator?". *Oikos* vol. 124 (issue 11): 1453-1461
- Waples, R. and Ch. Do. 2008. "LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium". *Molecular ecology resources* vol. 8 (issue 4): 753-756.
- White, G. C. 1982. "Capture-recapture and removal methods for sampling closed populations". Los Alamos National Laboratory.
- White, G. C., and K. P. Burnham. 1999. " Program MARK: survival estimation from populations of marked animals". *Bird Study* vol. 46 (issue 1): 120–139.
- White, G. C., W. L. Kendall, and R. J. Barker. 2006. "Multistate Survival Models and Their Extensions in Program MARK". *Journal of Wildlife Management* vol. 70 (issue 6): 1521-1529.
- Whittington, J., M. A. Sawaya, and M. S. Boyce. 2015. "A Comparison of Grizzly Bear Demographic Parameters Estimated from Non-Spatial and Spatial Open Population Capture-Recapture Models". *PLOS ONE* vol. 10 (issue 7).
- Wirsing, A. J., T. P. Quinn, C. J. Cunningham, J. R. Adams, A. D. Craig, and L. P. Waits. 2018. "Alaskan brown bears (*Ursus arctos*) aggregate and display fidelity to foraging neighborhoods while preying on Pacific salmon along small streams". *Ecology and Evolution* vol. 8 (issue 17): 9048-9061.
- Woods, J. G., D. Paetkau, D. Lewis, B. N. McLellan, M. Proctor, and C. Strobeck. 1999. "Genetic Tagging of Free-Ranging Black and Brown Bears". *Wildlife Society Bulletin* vol. 27 (issue 3): 616–627.
- Wright, S. 1931. "Evolution in Mendelian populations". *Genetics* vol. 16 (issue 2): 97-159.

Zachos, F. E., M. Otto, R. Unici, R. Lorenzini, and G. B. Hartl. 2008. "Evidence of a phylogeographic break in the Romanian brown bear (*Ursus arctos*) population from the Carpathians". *Mammalian Biology* vol. 73 (issue 2): 93-101.

Zhan, X., M. Li, Z. Zhang, B. Goossens, Y. Chen, H. Wang, ... and F. Wei. 2006. "Molecular censusing doubles giant panda population estimate in a key nature reserve". *Current Biology* vol. 16 (issue 12): 451-452.

Ziółkowska, E., K. Ostapowicz, V. C. Radeloff, T. Kuemmerle, A. Sergiel, T. Zwijacz-Kozica, ... and N. Selva. 2016. "Assessing differences in connectivity based on habitat versus movement models for brown bears in the Carpathians". *Landscape Ecology* vol. 31: 1863-1882.