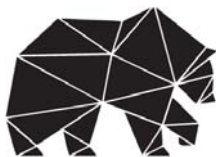




# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“



## Komplexná štúdia odhadu početnosti populácie medveďa hnedého (*Ursus arctos*) neinvazívnou metódou rozboru DNA zo vzoriek trusu



**Prof. Ing. Ladislav Paule, PhD.**  
**Ing. Diana Krajmerová, PhD.**  
**Ing. Jana Bakan, PhD.**  
**Doc. Dr. Tomáš Skrbinšek**  
**Ing. Peter Klinga, PhD.**  
**Mgr. Veronika Slivková**

**Lesnícka fakulta, Technická univerzita vo Zvolene**

**2015**



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

## 1. Úvod

Odhad veľkosti a hustoty populácie voľnežijúcich živočíchov patrí medzi základné informácie potrebné pre ich racionálne obhospodarovanie (v prípade poľovnej zveri) alebo efektívnu ochranu (v prípade chránených živočíchov). Tieto charakteristiky populácií voľne žijúcich živočíchov sa dajú pomerne obtiažne získať a ich odhady sú zaťažené pomerne veľkou chybou.

Spomedzi známych metód odhadu veľkosti a hustoty populácie sú genetické analýzy, napriek ich niektorým metodickým nedostatkom, považované za najpresnejšie a z hľadiska získania podkladového materiálu aj za najekologickejšie. Ich výsledkom nie je len získanie informácií o počte, ale o konkrétnych jedincoch podložených genotypmi, ktoré vylúčia akékoľvek duplicity v počte jedincov. Okrem toho pomocou genetických metód je možné získať informácie aj o pohlavnej štruktúre, ktoré sú potrebné pre modelovania vývoja početnosti a štruktúre populácie.

Odhad veľkosti populácie využívajúci CMR metódu (Capture – Mark – Recapture = odchyt – označenie – opätovný odchyt) bol metodicky rozpracovaný v posledných dvoch desaťročiach a využitý pri odhadoch veľkosti a štruktúry populácie u početných druhov voľne žijúcich živočíchov, najmä s kryptickým spôsobom života. CMR metóda založená na zbere neinvazívnych vzoriek bola použitá pri genetickej inventarizácii populácií medveďa hnedého v nasledovných európskych krajinách: Švédsko, Nórsko, Španielsko, Taliansko, Rakúsko, Slovinsko a Chorvátsko a zo zámorských krajín v USA, Japonsku a i. Metodicky sú rozpracované otázky zberu experimentálneho materiálu, genetických analýz neinvazívnych vzoriek ako aj matematického modelovania odhadu veľkosti populácie.

## 1. Metódy odhadu veľkosti populácie voľne žijúcich živočíchov

### Neinvazívne metódy zberu vzoriek pre genetické analýzy

Existujú tri spôsoby získania biologického materiálu z voľne žijúcich živočíchov:

1. **deštrukčný**, kedy je živočích za týmto účelom usmrtený (napr. pre štúdium alozýmov, cytogenetické štúdie, ale aj pre získanie DNA),

2. **nedeštrukčný**, ale **invazívny** – živočích je odchytený, je mu odobratá vzorka tkaniva alebo krvi a následne je vypustený,

3. **nedeštrukčný**, ale **neinvazívny** – zdroj DNA sa dá získať bez akéhokoľvek kontaktu a vyrušovania, teda bez potreby odchyty, manipulácie, alebo aj samotného pozorovania živočícha).

Zdrojom DNA môže byť v prípade neinvazívneho spôsobu zberu biologického materiálu srst', perie, trus, moč, parohy (zhody), zvlečená pokožka, vajcové škrupiny, vývržky dravcov a sov, alebo aj kosti v týchto vývržkoch. V prípade deštrukčného alebo nedeštrukčného, ale invazívneho spôsobu zberu biologického materiálu môžu byť zdrojom DNA tkanivá, kosti, krv, parohy, perie a i.



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

**Nedeštrukčný a neinvazívny** spôsob získavania experimentálneho materiálu sa uprednostňuje hlavne pri chránených živočíchoch, pretože zaručuje odber vzoriek pre genetické analýzy bez potreby usmrtenia živočíchov a bez ich vyrušovania. Pre genetické analýzy slúži najčastejšie trus, na povrchu ktorého sa nachádzajú bunky z epitelu črevného traktu, ktoré umožňujú následnú identifikáciu genotypu jedinca (donora).

Predpokladom úspešnej aplikácie CMR metódy pre odhad veľkosti populácie je zabezpečenie dostatočného počtu vzoriek, medzi ktorými sa nachádzajú jednak unikátne genotypy, t.j. také, ktoré sa zistili v množine vzoriek len raz, ale taktiež genotypy, ktoré sa v množine vzoriek zistili opakovane. Základnou tézou CMR metódy je zistenie vzťahu medzi narastajúcim počtom vzoriek a počtom jedincov (unikátnych genotypov). Všeobecné pravidlo pre spoľahlivý odhad veľkosti populácie pomocou CMR metódy je zabezpečenie počtu vzoriek, ktoré zodpovedá 2,5–3-násobku predpokladaného počtu jedincov. Ak predpokladáme, že počet jedincov medveďa hnedého na Slovensku sa pohybuje v intervale 800–1000 kusov, potom potrebný počet vzoriek sa bude pohybovať v intervale 2400–3000 kusov.

Druhým predpokladom úspešnej aplikácie CMR metódy je zber experimentálneho materiálu v uzavretom areáli (oblasti). Práve areál medveďa na Slovensku môžeme považovať za relatívne uzavretý, pretože jedine z Poľska a z Ukrajina sa predpokladá výskyt cezhraničných jedincov a keďže tento môže byť obojstranný neohrozí presnosť odhadu veľkosti populácie.

Tretím predpokladom úspešnej aplikácie CMR metódy je opakovanie zberu v čase, s cieľom zabezpečenie zberu čo najvyššieho počtu jedincov, ale aj čo najvyššieho počtu opakovane zachytených jedincov. Prvá etapa zberu vzoriek sa uskutočnila počas jesene 2013 a opakovanie sa uskutočnilo počas jari a jesene 2014; toto vytvorilo predpoklad jednak pre zabezpečenie dostatočného počtu vzoriek a spoľahlivé odhady veľkosti populácie. Pri opakovaní zberu počas jarých mesiacov bude potrebné obmedziť zber len na mesiace s nízkymi teplotami a prerušiť ho bezprostredne v termíne narastajúcich denných teplôt, pretože vysoké teploty degradujú DNA.

Ideálny design zberu predstavuje rovnomerná stratifikácia zberu v celom území (areáli). V prípade populácie medveďa na Slovensku nie je možné takýto design použiť, pretože v rámci areálu sa vyskytujú oblasti s nerovnomernou hustotou populácie a navyše, v rámci jednotlivých oblastí dochádza k výrazným sezónnym presunom medveďov počas leta a jesene za potravou a v jeseni (pred hibernáciou) k migrácii do pokojnejších oblastí a pod. Z tohto dôvodu sa použije oportunistický spôsob zberu, ktorý pri priestorovom a časovom pokrytí zberu v celom areáli sa presnosťou priblíži ideálnemu designu.

## 2. Vývoj veľkosti populácie medveďa hnedého na Slovensku

Presné historické údaje o počtoch medveďov na Slovensku a priľahlých oblastiach (pred rokom 1918) nám chýbajú. V rokoch 1900 až 1930 sú známe len počty odstrelených jedincov



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



## Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

v jednotlivých župách, pričom odstrel sa pohyboval od 20 do 60 jedincov, s rekordným odstrelom v roku 1926, ktorý predstavoval 95 jedincov.

Do konca I. svetovej vojny v dôsledku poľovníckeho tlaku, odlesňovania a iných ľudských aktivít sa počet medvedíov sústavne znižoval, čo malo za následok zmenšenie západokarpatského areálu a zmiznutie dnešnej časti východokarpatského areálu (Poloniny) (PASZLAVSKY 1918 in HELL & SLAMEČKA 1999; HARTL & HELL 1994; FINĐO *et al.* 2007). Pokračovanie poľovníckeho tlaku v období po prvej svetovej vojne viedlo k ďalšiemu znižovaniu počtu medvedíov a ich počet na konci dvadsiatych rokov sa odhadoval na 15–75 jedincov (ŽUFFA 1932; TOBIÁŠ 1933). V roku 1932, keď sa uzákonila celoštátna ochrana medveďa a počet jedincov sa odhadoval na 40 kusov, hlavne na strednom Slovensku. Zákaz lovu od roku 1932 ochránil zvyšky izolovanej populácie v Západných Karpatoch a umožnil jej prirodzený nárast v jadrovej časti areálu, avšak udalosti počas druhej svetovej vojny opäť zapríčinili krátkodobý pokles početnosti medvedíov (HELL & SLAMEČKA 1999). V päťdesiatych rokoch sa početnosť medvedíov na Slovensku odhadovala na 50–80 jedincov (TURČEK 1949), v roku 1953 odhadovala FERIANCOVÁ (1953) počet medvedíov na 200 a koncom koncom päťdesiatych rokov sa vyskytovalo na Slovensku cca 200 medvedíov (SABADOŠ & ŠIMIÁK 1981). V zmysle poľovníckej štatistiky narastal počet medvedíov z 270 (1964), na 455 (1974) a 635 v roku 1984.

Hustota populácie medvedíov bola najvyššia na strednom Slovensku (LZ Čierny Balog), kde pripadalo na 1000 ha lesnej plochy v priemere 2,26 jedincov, čo korešpondovalo sa maximálnymi prípustnými hustotami v Rumunsku (ALMAŞAN 1988) a v Bulharsku (GENOV & GANČEV 1987). Podobné hustoty sa zistili aj na ŠLP vo Zvolene a LZ Slovenská Ľupča (1,77, resp. 1,67 jedincov na 1000 ha).

Na základe zvýšených škôd na včelstvách, úrode a dobytku bol lov opäť povolený (JANÍK 1997). Napriek tomu početnosť medvedíov ďalej narastala. So zámerom brzdiť vývoj sa kvóta postupne zvyšovala, no veľkosť populácie rástla. Aj napriek tomu, že komisia ministerstva kultúry, ktorá stanovovala kvóty odstrelu, korigovala počty medvedíov, ktoré hlásili lesné závody a pri stanovovaní kvót sa počítalo s odlovením 50 % prírastku v danom roku, počty narastali v dôsledku pohlavnej nerovnováhy. V prvých 20 rokoch lovu medveďa sa ulovilo celkom xx samcov a xx samíc, v niektorých oblastiach trofejový lov eliminoval 80–90 0 veľkých starých samcov (JAMNICKÝ 1987). V dôsledku pohlavnej nerovnováhy v prospech samíc, boli ročné prírastky podstatne vyššie než by sa očakávalo pri pomere pohlavia 1 : 1.

S úmyslom zamerať sa na nedospelé jedince, zväčšiť pomer odstrelu samíc (bez mláďat) a chrániť zostávajúcich veľkých samcov, od roku 1980 štátna ochrana prírody začala zavádzať požiadavku plánu lovu pre hmotnostné kategórie, ktoré sa postupne sprísnilo (KASSA 1998). Opravením štrukturovaných plánov sa podarilo postupne znížiť podiel ulovených samcov medvedíov zo 79 % v rokoch 1958–1980 na 64 % v rokoch 1980–1991 (JANÍK 1997). Napriek tomu opatreniu pohlavná nerovnováha naďalej pretrvávala.

Vývoj početnosti populácie medvedíov od 80. rokov do súčasnosti na základe poľovníckej štatistiky sa dá rozdeliť do dvoch období – osemdesiate roky kedy nárast bol spôsobený pohlavnou nerovnováhou a súčasne korigovaný komisiou a po roku 1990 kedy korekcie



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



## Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

prestali fungovať a výsledky poľovníckej štatistiky predstavujú jednoduchú sumu hlásení jarných kmeňových stavov jednotlivých poľovníčkových revírov a v neposlednej rade aj zvýšené prírastky z dôvodu vyššej úživnosti prostredia (pestovanie kukurice v podhorských oblastiach a prikrmovanie raticovej zveri). Samozrejme, tento výsledok nezohľadňuje skutočnú veľkosť populácie a je značne nadhodnotený a to tak z hľadiska absolútnej početnosti, ako aj z celkovej hustoty populácie a hustoty v jednotlivých oblastiach. Na obr. Xx vidno vývoj početnosti populácie medvedíov podľa poľovníckej štatistiky Poľov 1-01 a vyrovnaný priebeh podľa expertných odhadov (RIGG & ADAMEC 2007).

Počty medvedíov na Slovensku podľa hlásení pre Európsku komisiu predstavovali v rokoch 2005–2010 okolo 800 kusov, čo by predstavovalo priemernú hustotu 5,6 jedincov na 100 km<sup>2</sup>. Najvyššia hustota sa predpokladá v regiónoch stredného Slovenska, v ktorých sa obnovila populácia. Z výsledkov sčítaní v Tatrách, Malej a Veľkej Fatre a na Poľane vyplýva, že chránené oblasti s kvalitnými biotopmi a relatívne nízkym ručením majú tendenciu mať najvyššiu hustotu populácie až 11 jedincov na 100 km<sup>2</sup>. V susediacich oblastiach je hustota spravidla nižšia, rovnako aj v okrajových častiach pohoria, kde je menšia lesnatosť a vyššia úroveň ľudskej činnosti (RIGG & ADAMEC 2007). Pre porovnanie, odhady priemernej hustoty populácie v Rumunsku sa pohybujú od 8 do 25 jedincov na 100 km<sup>2</sup> (SELARU & IONESCU 2005, v prípade prikrmovania až 50 jedincov na 100 km<sup>2</sup> (VAN MAANEN *et al.* 2006). V Chorvátsku kolíše priemerná hustota medvedíov od 5 jedincov na 100 km<sup>2</sup> v oblastiach s občasným výskytom až do 15–20 jedincov na 100 km<sup>2</sup> v najkvalitnejších biotopoch. Biologická únosná kapacita životného priestoru v Chorvátsku s rozlohou 12 000 km<sup>2</sup> (čo korešponduje s veľkosťou areálu v SR) sa odhaduje na 1100 medvedíov, sociálna kapacita je okolo 900 jedincov (DEČAK *et al.* 2005).

Nereálnosť údajov z poľovníckej štatistiky vidieť hlavne pri výpočte hustôt populácie na 100 km<sup>2</sup> (= 10 000 ha), kde sa hustoty podľa jednotlivých poľovníčkových revírov pohybujú na strednom Slovensku od 0,63 do 66,03 jedincov na 100 km<sup>2</sup>, pri priemernej hodnote 16,93.



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA

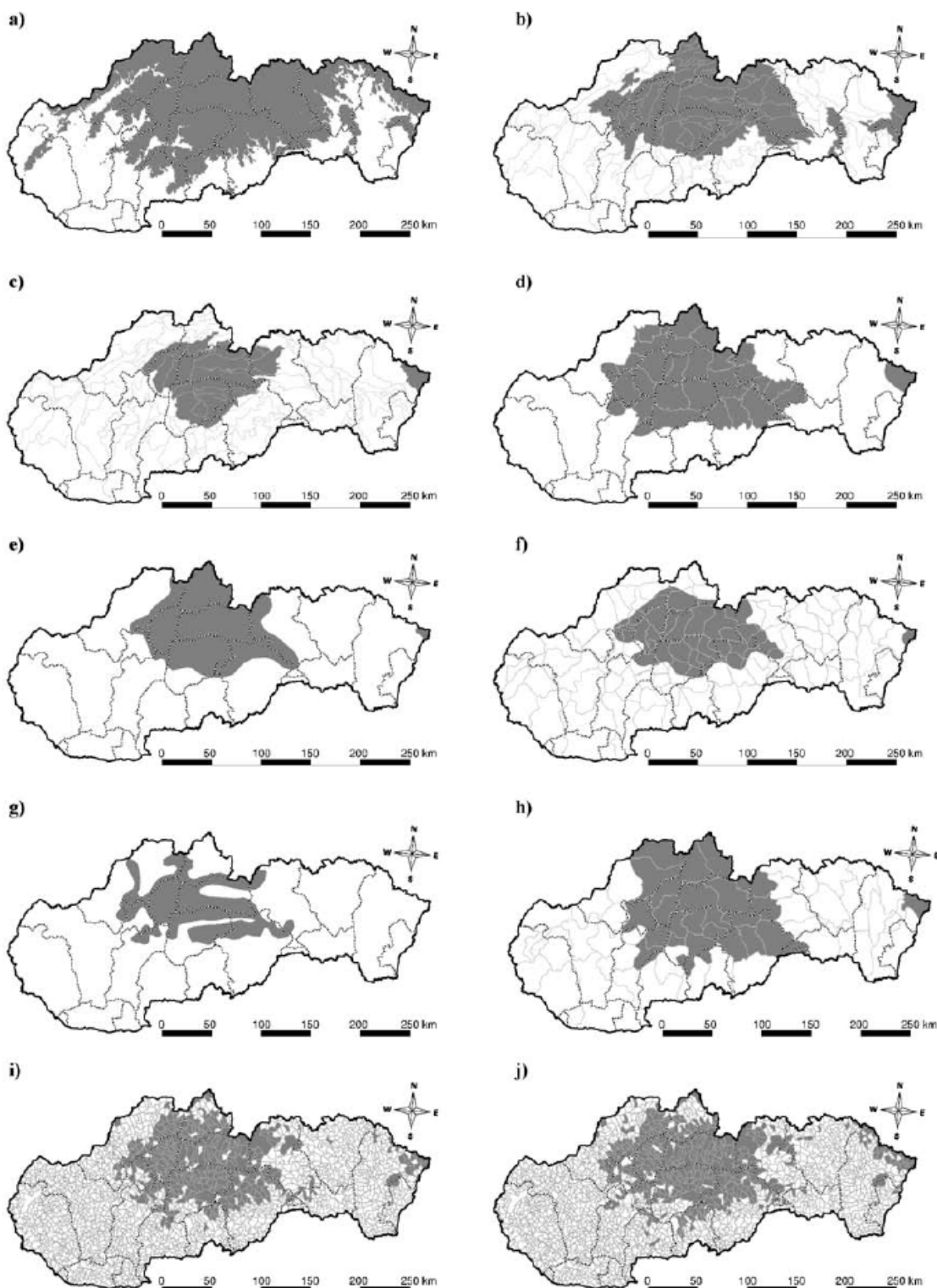


Fig. 1. Maps of bear distribution in Slovakia. a) 18/19th century (hypothesis); b) 19/20th century (MOLNÁR et al., 1984, ŠTOFIK et al., 2010); c) WWI.–WWII. (FERIANCOVÁ, 1955); d) 1953 (FERIANCOVÁ, 1955); e) 1968 (ŠKULTÉTY, 1970); f) 1972 (HELL and SLÁDEK, 1974); g) 1977 (SABADOŠ and ŠIMIÁK, 1981); h) 1980–1991 (HELL and SABADOŠ, 1993); i) 2002 (©NFC SR, 2011); j) 2010 (©NFC SR, 2011).

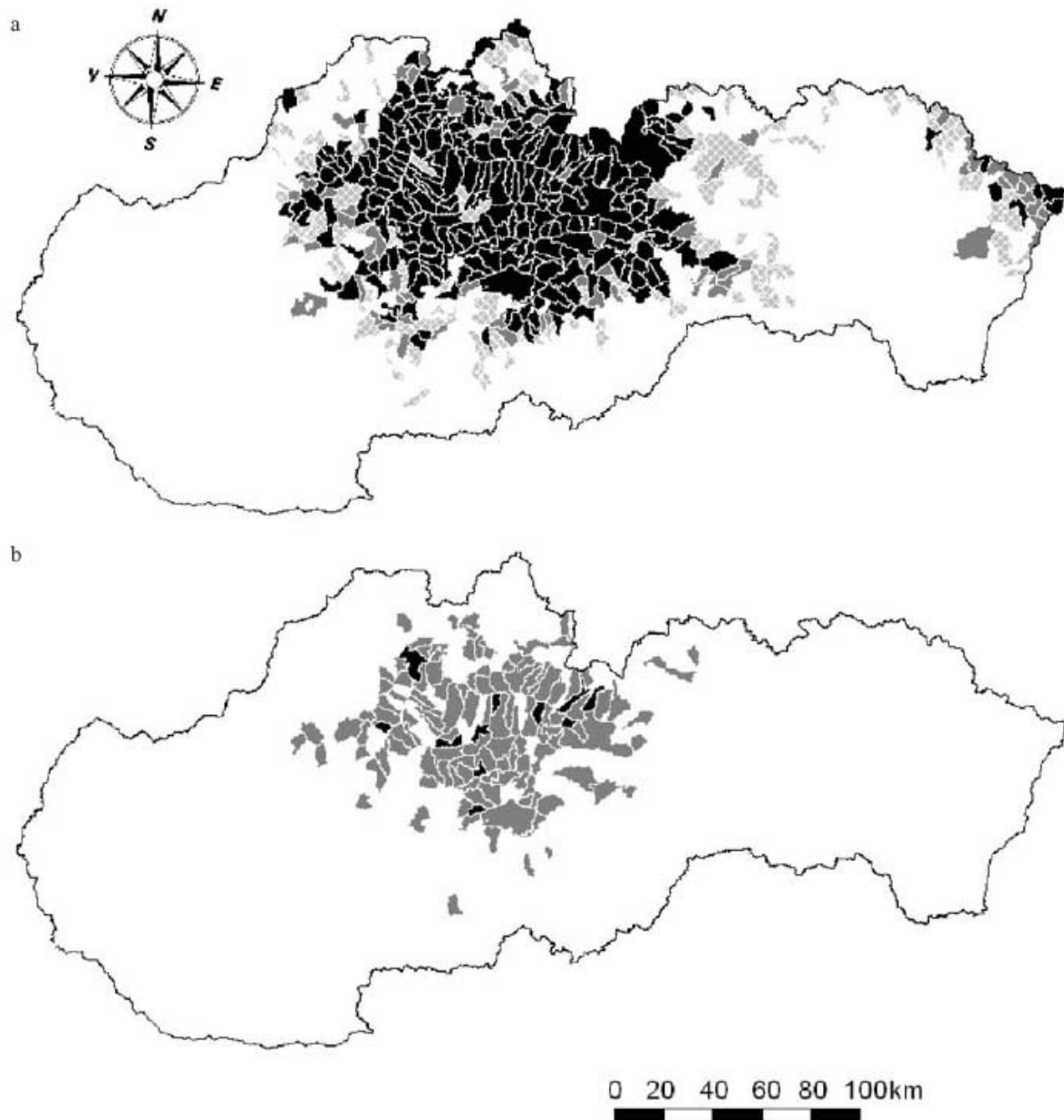


Fig. 2. State and management of the brown bear population in Slovakia (2002–2010). a) Occurrence stability S%: ■ = 100%, ■ = 67%, ▨ = 33%, b) kill rate: ■ <math>< 0.1 \text{ ps km}^{-2}</math>, ■ > 0.1 ps km<sup>-2</sup>.

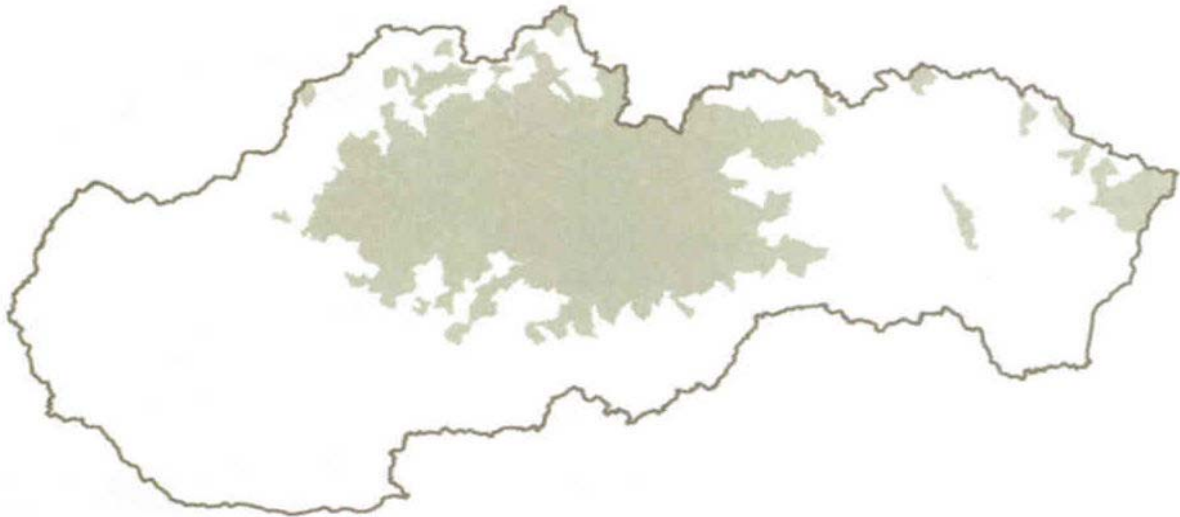


# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

## Metodika a design zberu experimentálneho materiálu

### Rozšírenie medveďa na Slovensku

Areál rozšírenia medveďa na Slovensku zaberá územie orografické celky stredného a severného Slovenska – Vysoké Tatry, Nízke Tatry, Malá a Veľká Fatra, Slovenské rudohorie, Kremnické vrchy, Štiavnické vrchy, Oravská Magura, Pilsko a Babia Hora a okrajovo sa vyskytuje na východnom Slovensku v Levočských vrchoch a Poloninách a na západnom Slovensku v Strážovských vrchoch a Vtáčniku (obr. 1).



Obr. 3. Rozšírenie medveďa hnedého na Slovensku v roku 2004 (FINĐO *et al.* 2007).

Areál rozšírenia medveďa odvodený z hlásení jarých kmeňových stavov medveďa v rokoch 2010–2012 podľa jednotlivých poľovníckych združení je na obr. 2. K vypracovaniu mapy rozšírenia medveďa na základe trojročných hlásení sme pristúpili z dôvodu odstránenia bielych miest v rámci areálu, pretože nie všetky poľovnícke združenia každoročne nahlásili prítomnosť medveďov. Vyrovnanie za trojročné obdobie považujeme za objektívnejšie, pretože zohľadňuje aj možnú migráciu medveďov medzi susediacimi poľovníckymi revírmi.

Je potrebné poznamenať, že okrem súvislého areálu vo vyššie spomenutých orografických celkoch sa medveď vyskytuje aj v okrajových častiach areálu s tendenciou jeho rozširovania smerom na severozápadné Slovensko – Biele Karpaty a Javorníky, na východnom Slovensku – do oblasti Pienin, Čergovských vrchov a Braniska a na severovýchodnom Slovensku okrem jadrovej zóny v oblasti Nízkych Beskýd a Bukovských vrchov je tendencia rozširovania smerom na severozápad a do oblasti Vihorlatu a Popričného pozdĺž štátnej hranice s Ukrajinou. Šírenie smerom na juh stredného Slovenska je výrazné najmä v oblasti Štiavnických vrchov a Javoria, ako aj v oblasti Slovenského krasu.

Celková výmera poľovníckych revírov Slovenska s prítomnosťou medveďa predstavuje 1,227.087 hektárov.



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



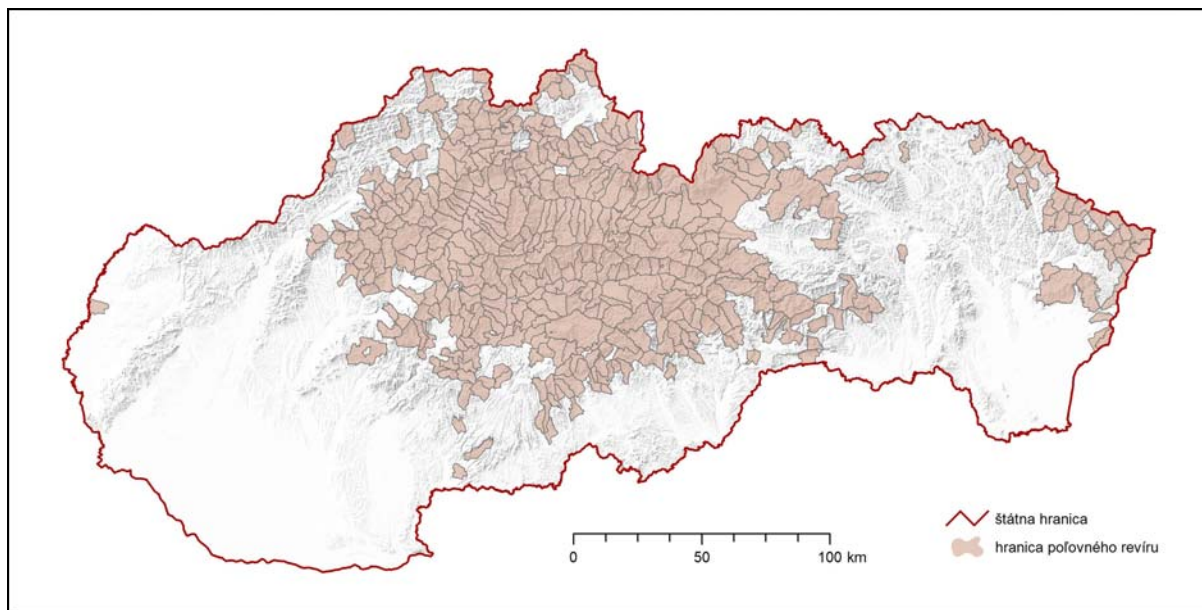
EURÓPSKA ÚNIA





## Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

Vzhľadom na to, že pre územie Slovenska neexistujú spoľahlivé údaje o počte a hustote výskytu medveďov v rámci celého areálu (stredné a severné Slovensko a Poloniny) boli pri návrhu designu zberu použité len o údaje jarných kmeňových stavov, ktoré sú podkladom pre Poľovnícku štatistiku. Počty jedincov medveďa hnedého na Slovensku podľa týchto podkladov sa zdajú byť značne nadhodnotenú, pretože reprezentujú len sumu hlásení poľovníckych združení k 31. marcu bežného roka a nezohľadňujú prekryvy jedincov medzi susednými poľovníckymi združeniami.



**Obr. 4.** Areál rozšírenia medveďa na Slovensku na základe jarných kmeňových stavov v rokoch 2010–2012. (Zdroj: NLC, Zvolen, 2013)

Na základe hlásenia jarných kmeňových stavov medveďov na Slovensku k 31.03.2013 by sa malo na Slovensku vyskytovať 2 077 medveďov, s priemernou hustotou 1,69 jedinca na 1000 hektárov. Populačná hustota medveďov podľa jednotlivých poľovníckych združení značne kolíše a pohybuje sa v intervale 0,07 až 6,60 jedincov na 1000 hektárov., resp. 0,7 až 66 jedincov na 100 km<sup>2</sup> (10 000 ha). Tieto rozdiely sú na jednej strane objektívne, pretože v jadrovej zóne existujú oblasti s vysokou populačnou hustotou (napr. Nízke Tatry a časť Slovenského Rudohoria), ale na druhej strane existujú aj subjektívne chyby vyplývajúce z nesprávnych odhadov. V niektorých prípadoch sa populačné hustoty dvoch susedných poľovníckych združení s rovnakými ekologickými podmienkami a porovnateľnými habitatmi rádo vo líšia, čo možno pripísať chybe v odhadoch početností.

Napriek tomuto metodickému nedostatku sme použili tieto údaje ako podklad pre design zberu a to z dvoch dôvodov:

- nahlásením počtov jedincov sa dá vytvoriť mapa poľovníckych združení s prítomnosťou medveďa, t.j. areál rozšírenia;
- predpokladáme, že relatívna hustota (t.j. počet jedincov na 1000 ha) je proporcionálna skutočnej hustote výskytu.



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

V prípade, že poľovné združenia výskyt medvedov nehlásili, použili sme „expertný odhad“ podľa hustoty výskytu medvedov v susedných poľovných združeniach, podobne aj na hraniciach výskytu sme použili „expertný odhad“.

Pri návrhu rozdelenia počtov skúmaviek v rámci celého areálu sme vychádzali zo štyroch množín zberačov:

- členovia poľovných združení,
- pracovníci Lesov SR, š.p.,
- pracovníci Štátnych lesov TANAPu,
- pracovníci Štátnej ochrany prírody SR.

V prípade prvej množiny dát základom bolo rozdelenie 7773 skúmaviek do poľovných združení s tým, že na každé združenie pripadol počet skúmaviek rovnajúci sa približne trojnásobku počtu medvedov hlásených podľa jarných kmeňových stavov. Tieto počty boli korigované podľa „expertného odhadu“ v prípade poľovných združení, ktoré nenahlásili počty medvedov do štatistiky, alebo poľovných združení na okraji areálu, kde predpokladáme výskyt.

V prípade druhej množiny zberačov sme vychádzali z počtu skúmaviek 3252, ktoré sme rozdelili medzi lesné správy (celkove 79 lesných správ v 20 odštepných závodoch), v rámci celého areálu medveďa. Základný počet pre lesnú správu bol 48 skúmaviek, s tým, že v prípade niektorých lesných správ na hranici výskytu sme tento počet znížili na 18.

Pre ochranné obvody Štátnych lesov TANAPu sme rozdelenie počtov skúmaviek uskutočnili analogickým spôsobom ako v prípade lesných správ Lesov SR, s tým, že ochranné obvody obdržali počty skúmaviek proporcionálne veľkosti ochranného obvodu a predpokladanému počtu jedincov, celkom 364 skúmaviek.

Tretiu množinu predstavovali pracovníci Štátnej ochrany prírody SR. V tomto prípade sa uskutočnilo rozdelenie počtov skúmaviek proporcionálne podľa veľkosti národného parku alebo chránenej krajinskej oblasti. Počty skúmaviek rozdelené pre pracovníkov Štátnej ochrany prírody SP predstavoval 1200.

Okrem týchto počtov sa rozdelilo 500 skúmaviek pre dobrovoľníkov (študenti Technickej univerzity, pracovníci Ústavu ekológie lesa SAV, Národného lesníckeho centra, súkromné osoby, a i.).

Celkom sa rozdelilo 13089 skúmaviek pre celé územie Slovenska s výskytom medveďa, teda počet vyšší než pôvodne predpokladala metodika. Stalo sa tak z dôvodu, že v priebehu vypracovávania rozdeľovníka skúmaviek a pomôcok pre zber sa vyskytli nepredvídané špecifické prípady, kde bolo potrebné modifikovať pokrytie okrajových častí areálu (bez hlásenia počtov medvedov do Poľovníckej štatistiky) a modifikovať pokrytie oblastí s väčšou hustotou medvedov. Z tohto dôvodu sa zvýšili aj počty zakúpených skúmaviek oproti plánovaným 10000 kusov. Úhrada zvýšeného počtu skúmaviek sa uskutočnila z prostriedkov Technickej univerzity.

## Logistika



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

Pre zabezpečenie hladkej distribúcie skúmaviek a pomôcok potrebných pre zber ako aj metodiky zberu sa na Slovensku uskutočnilo celkom 21 inštruktáží. Inštruktáže pre zberačov sa uskutočnili nasledovne:

- pre poľovních hospodárov poľovních združení,
- pre poľovních referentov odštepných závodov štátneho podniku Lesy SR,
- pre vedúcich ochranných lesných obvodov Štátnych lesov TANAPu,
- pre zoológov Štátnej ochrany prírody SR.

Celkový počet inštruktáží pre poľovních hospodárov, poľovních referentov OZ, vedúcich ochranných obvodov Štátnych lesov TANAPu a pracovníkov ŠOP SR bol 21. Miesta konania inštruktáží sú uvedené v tabuľke 5. Inštruktáže uskutočnili: Prof. Ing. L. Paule, PhD., Ing. D. Krajmerová, PhD. a Ing. J. Bakan, PhD.

Počas inštruktáží sa účastníkom z poľovních združení rozdelili skúmavky a pomôcky na zber vzoriek trusu. V prípade neúčasti zástupcov poľovních združení sa skúmavky a pomôcky distribuovali prostredníctvom Okresných poľovníckych komôr. Distribúcia pre lesné správy a ochranné obvody sa uskutočnila buď prostredníctvom odštepných závodov Lesov SR, š.p., resp. Štátnych lesov TANAPu. Distribúcia pre jednotlivé zložky Štátnej ochrany prírody SR sa uskutočnila prostredníctvom riaditeľstva Štátnej ochrany prírody SR v Banskej Bystrici.

Balíček potrebný na zber experimentálneho materiálu obsahoval 3 skúmavky vybavené nálepkou, 1 tužka, 1 mapa poľovného revíru, príručka (1 príručka na tri balíčky skúmaviek).

Zberači z lesných správ Lesov SR a ochranných obvodov Štátnych lesov TANAPu neobdržali mapy poľovních revírov, ale miesta zberu zaznamenávali podľa čísla porastu. Podobne ani pracovníci ŠOP SR neobdržali mapy, ale miesto zberu zaznamenávali súradnicami GPS.

V časopisoch *Poľovníctvo a rybárstvo* (9/2013) a *Lesník* (9/2013) boli uverejnené dva články:

- PAULE, L. & KRAJMEROVÁ, D., 2013: Pomôžte zrátať medvede. *Poľovníctvo a rybárstvo* **65**(9): 30–31.
- PAULE, L. & KRAJMEROVÁ, D., 2013: Genetika v službách medveďov. *Lesník* **12**(9): 10–11.

V týchto článkoch sa popísal projekt, načrtla sa metodika a zverejnila výzva na získanie spolupracovníkov z radov poľovníkov a lesníkov. Televízia Markíza, Televízia JOJ, Rádio Regina a TASR uverejnili príspevky avizujúce začiatok projektu. Významným počínom bolo zriadenie domácej stránky <http://www.tuzvo.sk/medvede>, ktorá predstavuje platformu pre komunikáciu medzi riešiteľmi projektu, spolupracujúcimi inštitúciami a dobrovoľníkmi zabezpečujúcimi zber trusu.

## Technika odberu experimentálneho materiálu

Zbierali sa čerstvé vzorky trusu, nie staršie ako 5 dní, ktoré neboli vystavené priamemu slnečnému žiareniu. Z jedného trusu sa odobrala vzorka iba do jednej skúmavky. Vzorky sa odobrali z povrchovej časti trusu, ktorá bola vystavená kontaktu so sliznicou čreva. Veľkosť vzorky trusu zodpovedala veľkosti lieskového orecha (1 cm<sup>3</sup>). Po odbere sa vzorka trusu



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



## Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

preniesla do 50 ml skúmavky s konzervačným roztokom (96 % etanol). Osvedčilo sa odobrať vzorky trusu pomocou dvoch vetvičiek, ktoré nájdeme na blízku, alebo podobného materiálu, ktorý sa po použití zahodí. Na každú vzorku sa použilo „nové náradie“, čím sa zamedzilo znečisteniu vzoriek DNA inou vzorkou a tým ich znehodnoteniu.

Príliš veľké vzorky trusu neboli vhodné, pretože konzervačný roztok bol menej účinný a kvalita získanej DNA sa znehodnotila.

Každá skúmavka sa opatrla etiketou (obr. 5), ktorú mal zberač starostlivo vypísať, aby sa dala vzorka identifikovať.

Údaje o vzorke trusu medveďa	
Dátum zberu	
Meno zberača	
Poľovný revír	
Miesto	<input type="checkbox"/> cesta
Porast	<input type="checkbox"/> krmovisko
Súradnice	<input type="checkbox"/> iné
Veľkosť trusu (zakrúžkuj)	Čerstvosť vzorky (zakrúžkuj)
malý    stredný    veľký	0   1   2   3   4   5   dni
Poznámky	
 Genetický výskum medveďov Lesnícka fakulta, Technická univerzita vo Zvolene	
 	

Obr. 5. Etiketa na skúmavkách

Trus sa po odbere vzorky označil alebo odstránil, aby z neho iný zberač neodoberal ďalšiu vzorku.

Skúmavka so vzorkou trusu sa uskladnila na chladnom a tmavom mieste až kým sa neodovzdala poľovnému hospodárovi, ktorý ich odovzdal Slovenskej poľovníckej komore, kde sme si ju vyzdvihli (pracovníci Technickej univerzity vo Zvolene). Prípadne nás zberači kontaktovali priamo a vzorky sme od nich prebrali osobne. Následne sa vzorky uchovali v chladničke pri 4 °C až do extrakcie DNA.

**Medveď:** Medveďí trus je pomerne dobre rozpoznateľný najmä podľa veľkosti, tvaru a zloženia. Má tvar hrubších šúľkov, ktoré sú často prelámané a oddelené, ležia však na jednej kope. Šúľky u dospelých jedincov sú hrubšie a širšie ako u psa a vlka (obr. 7). Trus z lesných plodov má často tvar kravského lajna. Obsah medvedieho trusu sa mení v závislosti od dostupnosti jednotlivých zložiek potravy. Jednotlivé zložky sú však dobre viditeľné, pretože k prežutiu potravy nedochádza tak dokonale ako u prežúvavcov. Na jar často obsahuje srst z kadáverov, korenky, neskôr hmyz, zelené časti rastlín. V lete sú prítomné semená lesných plodov, podľa ktorých je trus aj sfarbený. Na jeseň sú obvyklou súčasťou trusu medveďa bukvice a žalude. V oblastiach, kde sa zver prikrmuje, je bežnou zložkou trusu siláž, kukurica, či obilniny.



Investícia do Vašej budúcnosti



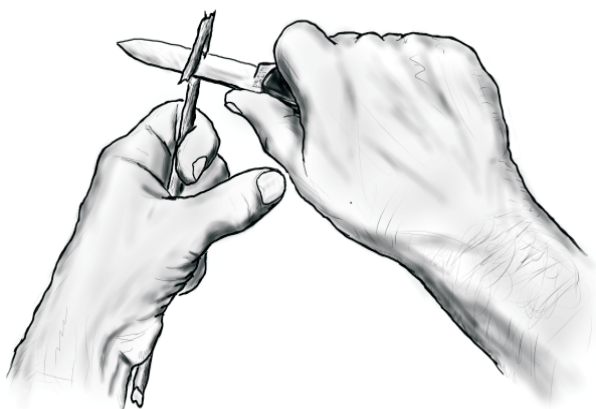
Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



Obr. 6. Trus medveďa



Obr. 7. Výroba špachtličky na odber trusu



Obr. 8. Odber vzorky trusu

## Zber vzoriek tkanív a srsti





# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

Vzorky tkanív z ulovených alebo inak usmrtených jedincov medveďov sa uchovávali v 96 % etanole. Predstavuje najvhodnejší spôsob uskladnenia vzoriek, ktoré sa rýchlo kazia (mäkké tkanivá, trus). Vzorky mäkkých tkanív je najlepšie skladovať v skúmavkách alebo iných odberových nádobách, ktoré sa dajú pevne uzatvoriť, s roztokom etanolu (= etylalkohol, alkohol) s vysokou koncentráciou (96%). Do skúmavky sa vkladá vzorka v tvare rezanca o dĺžke maximálne 1 cm. Objem vzorky by nemal presiahnuť 1/5 skúmavky, aby bola vzorka dobre zakonzervovaná, t.j. zo vzorky je pôsobením etanolu odstránená voda.

Vzorky srsti sa odoberali zo stromov, buď náhodne nájdených, alebo zo stromov na ktorých boli inštalované pasce (hair traps) na zber srsti vo forme slučky z ostnatého drôtu. Pasce na zber srsti sa inštalovali v blízkosti krmovísk a ako vnadidlo pre medvede sa použil bukový tér. Zber srsti sa uskutočnil v dvojtýždňových intervaloch, pričom po každom zbere sa z ostnatého drôtu odstránili všetky chlpy opálením plameňom zapaľovača. Vzorky srsti získané z pasce sa zberali pinzetou a do analýzy sa uskladnili v papierovej obálke.

## 3. Metodika laboratórnych analýz

### Extrakcia DNA

Extrakcia DNA prebiehala vo vyhradenom laboratóriu, určenom na manipuláciu s neinvazívnymi vzorkami. Vzorky trusu sa pripravili pomocou jednorazových laboratórnych pomôcok v dezinfikovanom laminárnom PCR boxe, aby sa zabezpečila ochrana vzoriek pred možnou kontamináciou. Aj samotná izolácia DNA sa uskutočnila v laminárnom PCR boxe po UV vyžiarení. Pri každej sade, t.j. 23 vzoriek sa použila aj negatívna kontrola, t.j. skúmavka bez vzorky na detekciu kontaminácie. Na izoláciu DNA z trusu sa použili izolačné kity „QIAamp DNA Stool Mini Kit“ a „QIAampFast DNA Stool Mini Kit“ (Qiagen), na izolovanie DNA z chlpov sa použila metóda podľa GLOWATZKI (2011) a tkanivá sa izolovali podľa modifikovanej metódy (DOYLE & DOYLE 1987), ktorá bola ďalej modifikovaná na extrakciu DNA zo živočíchov (OLIVEIRA *et al.* 2007).

### QIAamp DNA Stool Mini Kit

Menšia časť trusu sa vložila do 2 ml skúmavky a pridalo sa 1,6 ml ASL pufru. Skúmavky sa vortexovali, kým nebola zmes homogénna. Následne sa skúmavky centrifugovali počas troch minút, aby sa nečistoty a pevné časti trusu usadili v spodnej časti skúmavky. Do novej 2 ml skúmavky sa prepipetovalo 1,4 ml vrchnej časti, tzv. supernatant a pridala sa jedna InhibitEXT tableta. Obsah sa vortexoval počas jednej minúty a ďalšiu minútu sa zmes nechala postáť. Aby sa pevné časti z tablety usadili na dno skúmavky, celý obsah sa centrifugoval pri 14 000 otáčkach počas 3–6 minút. Ihneď po centrifugácii sa prepipetoval supernatant do novej 1,5 ml skúmavky. Nasledovala ďalšia centrifugácia počas 3 minút, aby sa všetky prípadne vyskytujúce pevné časti usadili. Do novej 2 ml skúmavky sa pridalo 25 µl proteinázy K a 600 µl vrchnej časti číreho centrifugovaného supernatantu. Pridalo sa 600 µl AL pufru a vortexovalo asi 15 sekúnd. Celá zmes sa inkubovala pri 70 °C počas 10 minút. Potom sa



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



## Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

pridalo 600 µl etanolu (96 %) a všetko sa dôkladne zvortexovalo. V ďalších krokoch sa používali filtračné skúmavky na zachytenie DNA na filtračnej membráne. Do označených 2 ml filtračných skúmaviek sa prepipetovalo 600 µl lyzátu z predchádzajúceho kroku, bez navlhčenia okraja skúmavky a centrifugovalo sa 1 minútu. Filtračná skúmavka sa premiestnila do novej 2 ml zbernej skúmavky a stará zberná skúmavka s filtrátom sa vyhodila. Znova sa prepipetovalo 600 µl lyzátu do filtračnej skúmavky a centrifugovalo sa 1 minútu. Filtračná skúmavka sa premiestnila do novej 2 ml zbernej skúmavky a stará zberná skúmavka s filtrátom sa vyhodila. Celý krok sa opakoval ešte jedenkrát. Takto zachytená DNA sa prečistila v dvoch nasledujúcich krokoch. Najprv sa do filtračnej skúmavky napipetovalo 500 µl AW1 pufru, centrifúgou sa odstránil pufor do zbernej skúmavky a filtračná skúmavka sa preložila do novej čistej zbernej skúmavky. Nasledovalo napipetovanie 500 µl AW2 pufru, centrifugovanie a preloženie filtračnej skúmavky do novej zbernej skúmavky. Predposledný krok spočíval v centrifugácii nasucho, teda bez pridania akejkoľvek zložky, aby sa odstránila prebytočná kvapalina z membrány s DNA, keďže kvapalina obsahuje etanol a etanol môže pôsobiť ako inhibítor PCR. Filtračná skúmavka sa naposledy premiestnila do 1,5 ml skúmavky a na membránu sa napipetovalo 200 µl AE pufru. Nechalo sa postáť a centrifugovalo sa 1 minútu. Filtračná skúmavka sa už mohla vyhodiť, lebo prečistená DNA sa odcentrifugovala do 1,5 ml skúmavky.

### QIAampFast DNA Stool Mini Kit

Tento izolačný kit využíva podobnú metodiku ako predchádzajúci, okrem použitia tabliet. Ak pufré AL a InhibitEX obsahovali zrazeniny, tieto sme zahriatím v mikrovlnnej rúre rozpustili. Menšia časť trusu sa vložila do 2 ml skúmavky a pridal sa zahriaty inhibitEX pufor v objeme 1 ml. Obsah skúmavky sa zvortexoval kým nebola zmes homogénna. Následne sa skúmavky centrifugovali počas jednej minúty, aby sa nečistoty a pevné časti trusu usadili v spodnej časti skúmavky. Do novej 2 ml skúmavky sa pridalo 25 µl proteínázy K, 600 µl vrchnej časti číreho odcentrifugovaného supenatantu a 600 µl AL pufru. Celá zmes sa inkubovala pri 70 °C počas 10 minút. Potom sa pridalo 600 µl 96 % etanolu a všetko sa dôkladne zvortexovalo. V ďalších krokoch sa používali filtračné skúmavky na zachytenie DNA na filtračnej membráne. Do označených 2 ml filtračných skúmaviek sa prepipetovalo 600 µl lyzátu z predchádzajúceho kroku, centrifugovalo sa 1 minútu. Filtračné skúmavky sa premiestnili do novej 2 ml zbernej skúmavky a staré zberné skúmavky s filtrátom sa vyhodili a celý tento krok sa opakoval ešte dvakrát. Takto zachytená DNA sa musela prečistiť a to sa vykonalo v dvoch krokoch. Najprv sa do filtračnej skúmavky napipetovalo 500 µl AW1 pufru. Pufor sa odcentrifugoval do zbernej skúmavky a filtračná skúmavka sa preložila do novej čistej zbernej skúmavky. Nasledovalo napipetovanie 500 µl AW2 pufru, centrifugovanie a preloženie filtračnej skúmavky do novej zbernej skúmavky. Predposledný krok spočíval v 3 minútovej centrifugácii nasucho, teda bez pridania akejkoľvek zložky, aby sa odstránila prebytočná kvapalina z membrány s DNA. Filtračná skúmavka sa naposledy premiestnila do 1,5 ml skúmavky a na membránu sa napipetovalo 200 µl ATE pufru, nechalo sa postáť a následne centrifugovalo 1 minútu. Filtračné skúmavky sa už mohli vyhodiť, lebo prečistená DNA sa odcentrifugovala do 1,5 ml skúmavky.



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

## Izolovanie DNA z chlпов podľa protokolu podľa Glowatzki

Korienky chlпов sa odstrihli a vložili do 200 ml skúmaviek, do ktorých sa napipetovalo 45  $\mu$ l lyzačného roztoku (10 mM Tris pH 8.3, 50 mM KCL, 0,5% Tween ) a 5  $\mu$ l proteinázy K. Zmes sa dôkladne zvortexovala a scentrifugovala, aby vlasové cibulky zostali ponorené v roztoku. Nasledovala inkubácia počas celej noci pri termocyklickom režime: 9 hodín pri 56 °C. Na druhý deň sa skúmavky centrifugovali a obsah s DNA sa prepipetoval do nových 200 ml skúmaviek.

## Modifikovaná metóda podľa DOYLE & DOYLE (1987), ktorá bola ďalej modifikovaná na extrakciu DNA zo živočíchov (OLIVEIRA *et al.* 2007)

Pri extrakcii DNA sa používal malý kúsok tkaniva (20–50 mg), alebo 500  $\mu$ l krvi, ktoré sa vložili do 2 ml skúmavky spolu s 500  $\mu$ l lyzačného roztoku (1M Tris pH 8,0; 0,05M EDTA pH8,0; 5M NaCl; 10% SDS, dH<sub>2</sub>O) a tiež sa pridalo 10  $\mu$ l proteinázy K. Zmes sa inkubovala pri 56 °C, 500 ot·min<sup>-1</sup> niekoľko hodín alebo cez noc, kým sa tkanivo úplne nezlyzovalo. V ďalšom kroku sa pridalo 500  $\mu$ l extrakčného roztoku (NaCl; 0,5M EDTA; 1M TRIS; PVP 40-T; CTAB;  $\beta$ -mercaptoethanol), ktorý sa skôr predohrial na 65 °C. Nasledovala inkubácia pri 65 °C počas 30 minút. Po uplynutí inkubačnej doby sa pridalo 200  $\mu$ l „mokrého“ chloroformu (chloroform; octan-1-ol) a centrifugovalo sa 5 minút pri 15 000 ot·min<sup>-1</sup>. Proteíny sa vyzrážali a usadili na dno skúmavky, supernatant sa odpipetoval do nových 1,5 ml skúmaviek. Pridalo sa 600  $\mu$ l izopropylalkoholu a skúmavky sa odložili na pol hodinu do mrazničky. V tomto kroku sa DNA vyzrážala. Následne sa skúmavky centrifugovali, aby sa vyzrážaná DNA usadila na dno, lebo v tomto kroku sa supernatant zo skúmavky odstraňuje vyliatím. Pridalo sa 1 ml WASH pufru (96 % etanol; 10M octan amónny), ktorým sa DNA prečistovala. Skúmavky sa nechali postáť 1 hodinu v chladničke. Centrifugáciou sa DNA usadila na dne skúmaviek a obsah skúmaviek sa vylial. Skúmavky sa vysušili a pridalo sa 100  $\mu$ l TE roztoku (1M REIS pH 7,4; 0,5M EDTA), v ktorom sa DNA rozpustila. DNA sa skladovala pri teplote 4°C až do začiatku analýz a pri –20 °C pri dlhodobom uskladnení.

## Amplifikácia

Na amplifikáciu DNA sa použilo 13 mikrosatelitných markérov v jednom multiplexe – Mu10, Mu23, Mu50, Mu59, G10L, Mu9, Mu15 (BELLEMAIN & TABERLET 2004, TABERLET 1997), G10C, G10L, G1D, G10P, G10X (PAETKAU & STROBECK 1994, PAETKAU *et al.* 1995, PAETKAU 1998). Pohlavie jedinca sa určilo na základe analýzy lokusu SRY na chromozóme Y (prítomnosť alely značí samčie pohlavie). Zloženie reakčnej zmesi: 1,5  $\mu$ l DNA templátu, 2 x Qiagen Multiplex Hot Start Mix; 5 $\times$  Q Solution, 0,4–0,6  $\mu$ M fluorescenčne značených primerov (6-FAM = modrá, VIC = zelená, NED = žltá a PET = červená).



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA





# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

Tab.1. Použité mikrosatelitné merkéry.

Markér		Sekvencia primeru 5'–3'	Heterozygotnosť	Počet alel	Rozsah (bp)	Fluorescencia	Publikované
G10C	F	AAAGCAGAAGGCCTTGATTTCTG	0,7066	8	87–107	VIC	Paetkau <i>et al.</i> 1998
	R	GGGACATAAACACCGAGACAGC					
G10H	F	CAACAAGAAGACCACTGTAA	0,7736	8	222–258	6-FAM	Paetkau 1998
	R	AGAGACCACCAAGTAGGATA					
G10L	F	ACTGATTTTATTCACATTTCCC	0,6097	8	143–159	PET	Paetkau & Strobeck 1994
	R	GATACAGAAACCTACCCATGCG					
G10P	F	TACATAGGAGGAAGAAAGATGG	0,7444	8	147–167	VIC	Paetkau <i>et al.</i> 1998
	R	AAAAGGCCTAAGCTACATCG					
G10X	F	CCCTGGTAACCACAAATCTCT	0,57	8	134–148	6-FAM	Paetkau <i>et al.</i> 1998
	R	GATCTCAGTTATCTGTGAAATC					
G1D	F	ATCTGTGGGTTTATAGGTTACA	0,7871	6	167–179	6-FAM	Paetkau & Strobeck 1994
	R	CTACTCTTCTACTCTTTAAGAG					
Mu10	F	ATTCAGATTTTCATCAGTTTGACA	0,7558	9	112–132	6-FAM	Bellemain & Taberlet 2004
	R	TCAGCATAGTTACACAAATCTCC					
Mu15	F	CTGAATTATGCAATTAACAGC	0,72	7	117–129	PET	Taberlet 1997
	R	AAATAAGGGAGGCTTGGGT					
Mu23	F	TAGACCACCAAGGCATCAG	0,8281	8	142–160	NED	Bellemain & Taberlet 2004
	R	GCCTGTGTGCTATTTTATCC					
Mu50	F	GTCTCTGCATTTCCCATC	0,7131	8	78–102	6-FAM	Bellemain & Taberlet 2004
	R	AACCTGGAACAAAATTAACAC					
Mu59	F	GCTCCTTTGGGACATTGTAA	0,7739	13	90–122	NED	Bellemain & Taberlet 2004
	R	TGACTGTCACCAGCAGGAG					
Mu9	F	AGCCACTTTGTAAGGAGTAGT	0,6866	7	184–200	VIC	Bellemain & Taberlet 2004
	R	ATATAGCAGCATATTTTGGCT					
SRY	F	GAACGCATTCTTGGTGTGGTC	–	1	82	PET	Bellemain & Taberlet 2004
	R	TGATCTCTGAGTTTTGCATTTG					

Podmienky amplifikácie DNA v polymerázovej reťazovej reakcii: počiatočná denaturácia prebiehala 15 min pri 94 °C (aktivácia polymerázy), nasledovalo 35 cyklov: denaturácia 30 sekúnd pri 94 °C, hybridizácia 90 sekúnd pri 58 °C a extenzia 90 sekúnd pri 72 °C. Konečná extenzia prebiehala pri 60 °C 30 min. Pre každú sadu vzoriek sa použilo 1–4 negatívnych kontrol, kde miesto extraktu DNA bola použitá ultračistá voda kvôli detekcii kontaminácie. Rovnako sa použilo 1–4 pozitívnych kontrol, aby sa detekovala úspešnosť amplifikácie na známych vzorkách, ktoré slúžili aj ako alelický rebrík. Na amplifikáciu sa použili cykléry PTC200 (MJ Research), T personal (Biometra), GeneAmp® PCR System 9700 (AppliedBiosystems), iQ5 real-time PCR detection system (Bio-Rad).



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

Zmes pre fragmentačné analýzy v genetickom analyzátoze ABI 3130 sa vytvorila z 9,1  $\mu$ l formamidu (denaturačné činidlo), 0,1  $\mu$ l GeneScan™- 500LIZ (Applied Biosystems), čo je dĺžkový štandard, ktorý sa pridala na identifikáciu dĺžky každého fragmentu (alely) a 0,7  $\mu$ l PCR produktu. Táto zmes sa vkladala do prístroja v 96 jamkových platničkách, hneď potom, čo sa v cykléri denaturovala 3 min pri 95 °C. Produkty PCR sa vyhodnotili pomocou automatického kapilárneho genetického analyzátoza ABI 3130 (Applied Biosystems, USA). Výstup bol generovaný ako hrubý záznam v podobe grafu. Získané výsledky sa vyhodnocovali pomocou softvérového programu GeneMapper verzia 4 (Applied Biosystems), ktorý je súčasťou softvérovej výbavy genetického analyzátoza. Výstupom boli genotypy jednotlivých vzoriek v grafickom a tabuľkovom prevedení.

## 5. Výsledky

### 5.1 Popis dát

Pre analýzy genotypov slúžilo 2977 vzoriek trusu, vlasov, krvi a tkanív. Dáta boli zostavené v Excel formáte s informáciou o opakovaníach. K dispozícii boli tiež pôvodné dáta z Genemapperu, avšak označenia jednotlivých vzoriek neboli konzistentné a preto sa nemohli použiť pre import do databázy genotypov, ale boli použité pre overenie akýchkoľvek nepresností. Metadáta jednotlivých vzoriek (lokalita, dátum, typ vzorky atď) boli k dispozícii ako databáza vo formáte MS Access. Spolu bolo analyzovaných 12 mikrosatelitových lokusov (G10C, G10H, G10L, G10P, G10X, G1D, Mu10, Mu15, Mu23, Mu50, Mu59, and Mu9) a lokus pre určenie pohlavia (SRY).

Všetky dáta boli importované do databázy vo formáte MisBase MS Access (Skrbinšek, nepublikované).

### 5.2 Konsenzuálne genotypy a odhady spoľahlivosti

Konsenzuálne genotypy boli vyprodukované pre všetky vzorky naprieč všetkými opakovaniami, pri zohľadnení počtu opakovaní, kvality PCR a celkovej kvality vzoriek. Kvalitatívny ondex sa stanovil na základe metódy, ktorú navrhli MIQUEL *et al.* (2006). Celková spoľahlivosť genotypov bola stanovená programom Reliotype na základe maximum likelihood procedúry, ktorú navrhli MILLER *et al.* (2002) a implementovanej do MisBase databázy. Pre neinvazívne vzorky, každá alela mala byť zistená najmenej dva razy aby bola zaznamenaná v genotype, ale bola považovaná za „nespoľahlivú“ ak sa objavila len raz.

### 5.3 Procedúra párovania genotypov

Všetky genotypy (v tomto prípade použité ako genetické označenia) v databáze slovenských medvedov sa porovnávali na základe párovania s cieľom identifikácie jednotlivých jedincov. Jednoduchý alelický „dropout“ (MIQUEL *et al.* 2006) pre spoľahlivú zhodu sa pripustil v prípade ak celý panel amplifikovaného lokusu u oboch vzoriek dosiahol hodnotu  $PI_{sib}$  (pravdepodobnosť identického genotypu medzi súrodencami) maximálne 0,01 a  $PI$  (pravdepodobnosť identity nepríbuzných jedincov) dosiahla hodnotu maximálne 0,00001



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

(WAITS *et al.* 2001). Inkompatibilné genotypy (rôzne alely) neboli prípustné. Všetky takmer identické genotypy (t.j. najviac dva alelické „dropouty“ alebo nekompetibilné rozdiely medzi genotypmi) sme overovali manuálne v databáze pôvodných dát a metadátach vzoriek, a konečné rozhodnutie týkajúce sa zhody sa uskutočnilo na základe všetkých informácií.

## 5.4 Procedúra akceptácie genotypov

Všetky genotypy s kvalitatívnym indexom (QI) > 0,2 a s najmenej piatimi lokusmi s dobrými PCR produktami boli spracované porovnávacím algoritmom. Po aplikácii procedúry rozhodovacieho porovnávania, boli uskutočnené nasledovné kroky:

- **Zhodné vzorky:** ak najlepšie vzorka v porovnávanej skupine (vzorky pravdepodobne z toho istého jedinca) mali spoľahlivosť genotypov (REL) > 0,95 alebo dve vzorky v skupine mali (REL) > 0,90, všetky vzorky v skupine sa prijali.
- **Nezhodné vzorky:** neinvazívne vzorky, ktorých genotypy za nezhodovali so žiadnym z genotypov (jednotlivé zachytenia) s (REL) > 0,95 a (QI) > 0,5 boli prijaté. Všetky zostávajúce neinvazívne vzorky boli vylúčené z ďalšej analýzy. Všetky vzorky tkanív (vzorky s vysokou kvalitou DNA) s primeraným úspechom amplifikácie boli prijaté bez ďalšieho testovania odhadov spoľahlivosti.

## 5.5 Výsledky prípravy dát

Prvé overenia genotypov identifikovali kvalitatívne problémy v troch lokusoch G10H, G10X, Mu23 a Mu9. Tieto štyri lokusy boli predbežne vylúčené z ďalších analýz.  $PI_{sib}$  zostávajúcich lokusov bolo  $8,74E-04$ , a  $PI$   $2,21E-08$ , čo umožnilo získanie vhodného panelu pre označenie jedincov a to aj v prípade ak dva lokusy v porovnaní neamplifikovali.

Tab. 2. Parametre genetických markérov použitých v tejto štúdii.

Markér	A	$A_e$	$H_o$	$H_e$	PI	$PI_{sib}$	$N_{Samples}$
G10C	8	3,33	0,49	0,70	0,12	0,43	750
G10H*	8	4,28	0,65	0,77	0,09	0,39	730
G10L	8	2,58	0,39	0,61	0,21	0,50	747
G10P	9	3,90	0,55	0,74	0,11	0,40	750
G10X*	7	2,37	0,30	0,58	0,21	0,51	745
G1D	6	4,71	0,63	0,79	0,07	0,37	750
Mu10	8	4,04	0,57	0,75	0,10	0,40	748
Mu15	6	3,56	0,42	0,72	0,12	0,42	742
Mu23*	8	5,74	0,68	0,83	0,05	0,35	745
Mu50	7	3,51	0,53	0,71	0,12	0,42	749
Mu59	11	4,49	0,60	0,78	0,08	0,38	747
Mu9*	7	3,12	0,52	0,68	0,16	0,45	744
*Lokusy vynechané z ďalších výpočtov	7,00	3,35	0,46	0,65	0,10	0,37	Priemer



Investícia do Vašej budúcnosti



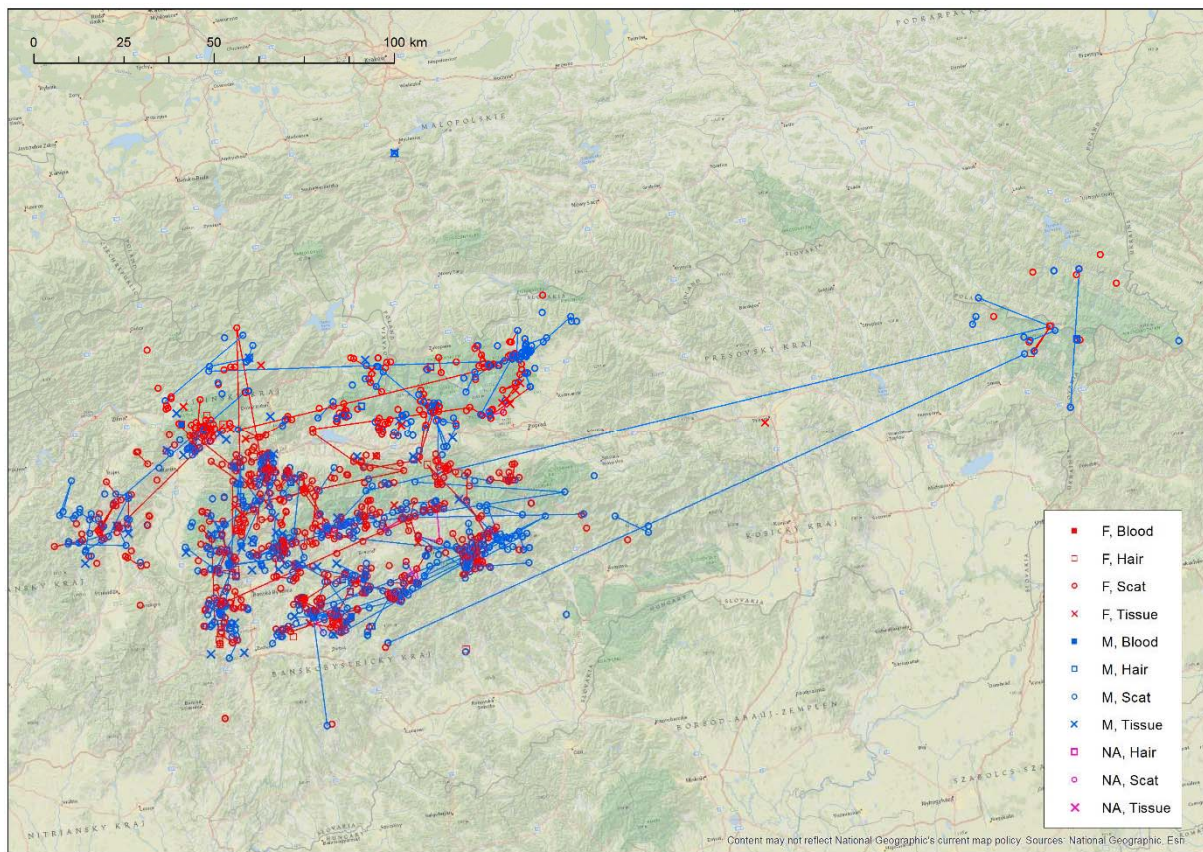
Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA

	1,64	0,68	0,08	0,06	0,04	0,04	SD
--	------	------	------	------	------	------	----

V celkovom súbore 1834 vzoriek sme identifikovali 831 jedincov s použiteľnými spoľahlivými genotypmi. Vzorky, ktoré boli získané pred začiatkom štúdia abundancie boli vynechané z modelovania CMR (neboli subjektom toho istého procesu Capture – Mark – Recapture). Genotypy 1143 vzoriek boli slabé a boli vylúčené z ďalšej analýzy. 74 vzoriek malo chýbajúce metadáta alebo to boli vzorky z Poľska, prípadne zozbierané pre iný účel a teda navhodné pre CMR analýzu. Priestorové rozmiestnenie vzoriek poukázalo na dobré priestorové pokrytie študovaného územia a dobrú separáciu vzoriek v dvoch oblastiach s výskytom medveďa – jednu na strednom Slovensku a jednu na východnom Slovensku (obr. 9). Zistilo sa, že dva jedince migrovali medzi oboma oblasťami počas trvania tejto štúdie, čo indikuje, že medzi oblasťami existuje určitá výmena génov.



Obr. 9. Priestorové rozmiestnenie vzoriek zozbieraných pre túto štúdiu. Čiary spájajú vzorky toho istého jedinca v chronologickom poradí.

## 5.6 Modelovanie Capture – Mark – Recapture

CMR modelovanie nám umožňuje prekonať spornú otázku v každej štúdii populačnej abundancie: explicitne odhadnúť počet nedetekovaných jedincov v pokuse a pre tieto odhady



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

určiť intervaly spoľahlivosti. Existujú niektoré kritické predpoklady, ktoré musia byť pre správnu funkciu týchto modelov splnené:

- a) Všetky jedince (v našom prípade úspešné identifikácie genetického označenia jedincov vo vzorke) musia byť súčasťou toho istého Mark – Recapture procesu (t.j. žiadna vzorka by nemala byť získaná v roku pred začiatkom alebo po skončení pokusu),
- b) Nemala by existovať heterogenita zachytenia medzi jedincami alebo mala by byť popísateľná merateľnými parametrami (napr. pohlavie jedincov, obdobie ... – tieto predpoklady sú v niektorých modeloch prípustné). Štatisticky najsilnejšie modely majú dodatkový predpoklad populačnej uzavretosti populácie v období trvania pokusu (bez mortality, alebo nedetekovanej mortality, bez prijímania nových jedincov, bez emigrácie a bez imigrácie). Všetky vyššie uvedené predpoklady sa môžu v prípade akejkoľvek štúdie s divými živočíchmi do určitej miery narušiť, pri modelovaní ich musíme testovať a musíme sa ubezpečiť, že modely použité pre analýzu sú skutočne pre daný typ experimentálnych dát adekvátne. Konečná kvalita výsledkov závisí výlučne na odchýlke dát od týchto predpokladov a na počte opakovane získaných vzoriek (recaptures) (intenzita výberu). Všeobecným pravidlom je, že vysoký podiel opätovne zachytených jedincov umožňuje vysokú presnosť a nevychýlené odhady veľkosti populácie a to aj v prípade ak sú niektoré predpoklady (v primeranej miere) narušené. Nízky stupeň opätovného zachytenia poskytuje menej spoľahlivé výsledky.

## 5.7 Proces Mark – Recapture

V nasledovnom grafe je znázornený proces Mark – Recapture (obr. 2 Apendix)



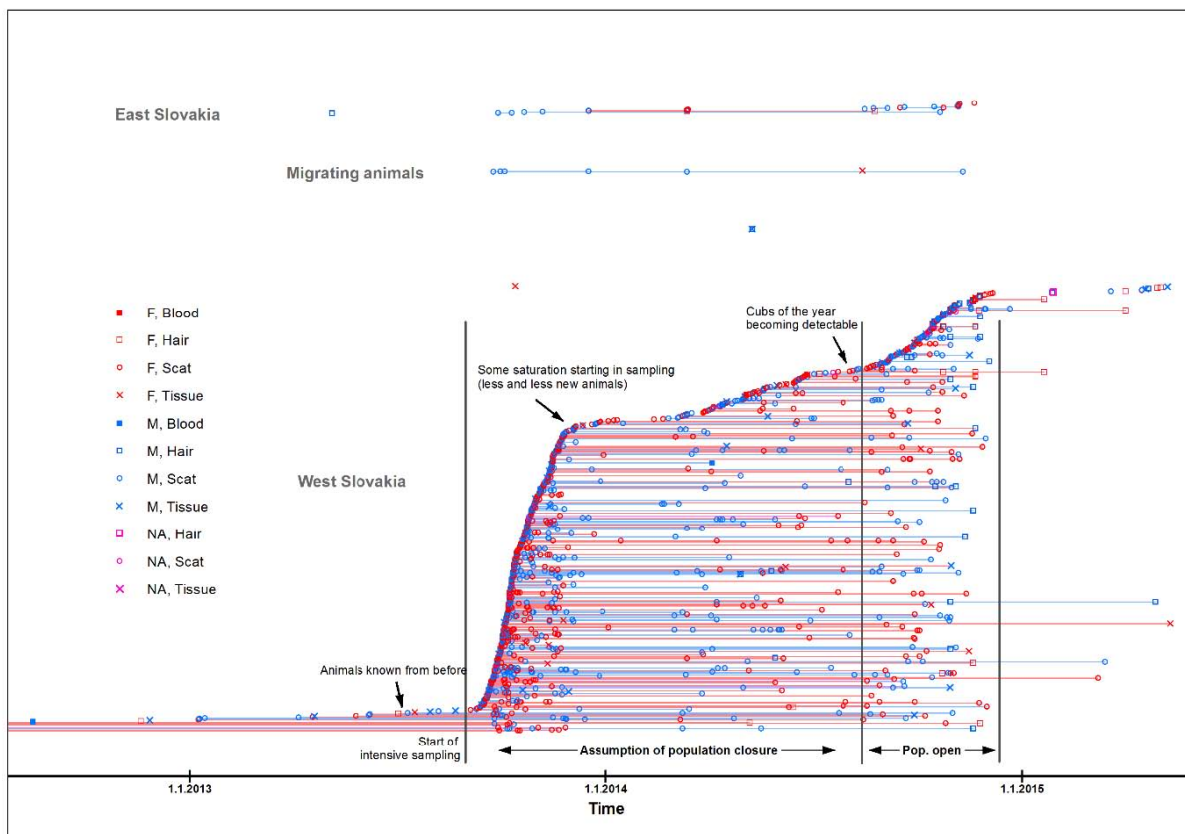
Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



**Obr. 10.** Graf procesu Mark – Recapture. Každý znak je vzorka, línie spájajú viacnásobné vzorky z toho istého jedinca. Časová os prebieha zľava doprava.

Prevažná väčšina vzoriek bola nazberaná na strednom Slovensku. Intenzívny zber vzoriek započal v septembri 2013 a vzorky, ktoré sa získali pred týmto obdobím sa nepoužili pre výpočty procesu Mark – Recapture a boli vylúčené z ďalších analýz. Problémom súboru dát je, že vo výberovej vzorke sú aj prírastky, čo čiastočne môže narušiť predpoklad uzavretosti populácie požadovaný pre väčšinu modelov Mark – Recapture určených pre odhady abundancie. Vizuálna inšpekcia Mark – Recapture grafu (obr. 10) poukazuje na indikáciu saturácie (menej nových zachytení a viac opakovaných zachytení na konci roku 2013 a potom narušenie saturácie na konci leta 2014. Naznačuje to, že medveďatá bolo možné už zachytiť a do tohto obdobia by bolo možné považovať populáciu za demograficky uzavretú.

## 5.8 Modely uzavretej populácie pre medvede stredného Slovenska

Populáciu medvedov zo stredného Slovenska môžeme považovať za pomerne uzavretú na základe Mark – Recapture grafu (obr. 10). Vzorky získané pre tento model boli zozbierané medzi 04.09.2013 (začiatok intenzívneho zberu vzoriek) a 25.08.2014 (vysoká pravdepodobnosť detekovania tohoročných mláďat, ako to je viditeľné Mark – Recapture



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

grafu. Uzavretosť populácie bola testovaná na základe paralelného výpočtu pre jedince získané do 01.04.2014, kde bolo takmer nemožné získať vzorky mláďat z tohto roku.

## 5.9 Testovanie uzavretia populácie

Pre testovanie uzavretosti populácie sme použili Pradleove modely s parametrizáciou prežívania a prísunu jedincov. Vytvorili sme a priori modelový súbor z dát do apríla 2014 (bez očakávania detekcie mláďat vyplývajúcej z biológie druhu) a do augusta 2014 (bez tohtoročného prírastku podľa Mark – Recapture grafu. Pretože modely indikovali prísun jedincov (imigráciu) a nedetekovanú mortalitu (emigráciu) ( $dAICc > 10$  pre modely kde parametre prežívania a fekundity boli považované za rovné 1 alebo 0) odhady týchto parametrov sa ukázali byť zanedbateľnými ( $\Phi = 0,996, 0,994–0,998$  95% CI;  $f = 0,001, 0,0006–0,0022$  95% CI). Toto poskytlo podporu pre predpoklad uzavretej populácie medveďov zo stredného Slovenska.

## 5.10 Dáta mark – recapture a modely pre Stredné a Východné Slovensko

Pre modely uzavretej populácie zo stredného Slovenska sme použili 1100 vzoriek s dobrými genotypmi zozberaných v období 04.09.2013 až 25.08.2014. Detekovali sme 260 samcov v 415 zacytenciach (podiel opätovného zacytenia 1,60) a 356 samíc v 478 zacytenciach (podiel opätovného zacytenia 1,34). Podiel opakovaných zacytení bol pomerne nízky, pričom u samíc bol nižší, než u samcov.

### Východné Slovensko

Počet vzoriek a počet zacytených medveďov na východnom Slovensku bol nízky. Celkom sa podarilo zacytiť 19 rozdielnych jedincov v 34 vzorkách so spoľahlivými genotypmi. Počas prvého obdobia, kedy bolo možné populáciu považovať za uzavretú sa zacytilo 8 jedincov. S ohľadom na celkove malý počet jedincov je problematické skonštruovať relevantný Mark – Recapture model. Avšak, s ohľadom na relatívne dobré rozmiestnenie nazberaných vzoriek (obr. 9) a opakované zacytenia, dá sa očakávať, že počet jedincov v tejto oblasti Slovenska bude raltívne nízky.

## 5. 11 Program MARK

Príprave dát, ktoré sa hodia pre analytické nástroje programu MARK (White & Burnham 1999), si vyžadujú usporiadanie dát podľa zberových segmentov, čo nebol prípad nášho súboru dát, pretože sa zber uskutočňoval priebežne. Algoritmus spätných Markovovských reťazcov bol naprogramovaný v štatistickom prostredí R (TEAM 2010), ktorý umožňuje separáciu dát v diskretných intervaloch, pri optimalizácii zacytenia aminimalizácii straty dát. Použili sme Hugginsove modely (HUGGINS 1989) (vrátane modelov, ktoré zahrňujú heterogenitu zacytenia a chybnú identifikáciu z dôvodu chybného gentyfovania). Skunštruovali sme a priori modelový súbor, stanovené parametre a hodnoty získané AICc. Hodoty AICc sa použili pre výber modelového súboru medzi rôznymi prístupmi (bez heterogenity / heterogenita / chybná klasifikácia). Použili sme model priemerujúci Akaikeho



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

váhy (BURNHAM & ANDERSON 2002) pre zhrnutie neistoty vyplývajúcej z výberu modelu pri získaní konečných výsledkov.

## 5.12 Modely Chao Mh a Mth

Tieto modely sú koncepčne odlišné od skupiny Hugginsových modelov, pretože nie sú založené na prístupe GLM. Nemôžu explicitne použiť mortalitu a štatisticky sú menej účinné; môžu však poskytnúť relatívne nevychýlené výsledky a bezpečné miery pre porovnanie výsledkov s inými modelmi.

## 5.13 Modely Capwire

Tieto relatívne jednoduché modely majú výhodu využitia priebežného zberu údajov, čo je prípad nášho pokusu. Poskytujú modely, ktoré umožňujú určitú mieru heterogenity zachytenia pri zbere vzoriek a nástroje pre výber model medzi modelom ktorý počíta s heterogenitou a modelom, ktorý nepočíta s heterogenitou. Pred spustením týchto modelov sme zo súboru vylúčili autokorelované vzorky – kritérium pre tento krok bolo odstránenie vzoriek z toho istého jedinca zozberaného v ten istý deň v okruhu 1 km od inej vzorky toho istého jedinca, jedna vzorka z páru bola vylúčená zo súboru.

## 5.14 Výber modelu MARK

Výber modelu MARK jasne vybral skupinu modelov, ktorá počíta s heterogenitou zachytenia (Tab. 2) indikujúcou určitú hladinu nevysvetliteľnej heterogenity zachytenia v dátach. Najlepšie modely tiež zahrňovali premenlivosť úspešných zachytení v čase (interval zberu) a pohlavie jedincov. Vyrovnanie modelu sa dá považovať za zmysluplné ( $c^{\wedge} = 1,13-1,35$ ). Modely ktoré počítali s genotypovými chybami boli na druhej strane slabšie podporené (delta AICc > 17).

Tab 3. Výsledky výberu modelu v programe MARK

Model	AICc	Delta AICc	AICc váhy	Pravdepodobnosť modelu	Num. Par
Hugg_Het2.p=c(t.sex),pi(sex)	4205,29	0,00	0,854620	1,000000	26
Hugg_Het2.p=c(t),pi(sex)	4208,91	3,62	0,139590	0,163300	17
Hugg_Het2.p=c(t),pi(.)	4215,79	10,51	0,004470	0,005200	16
Hugg_Het2.p=c(t.sex),pi(.)	4218,45	13,17	1,18E-03	1,40E-03	20
Hugg_MISS.p=c(t.sex)alpha(sex)	4222,87	17,58	1,30E-04	2,00E-04	16
Hugg_p(sex)c(sex)	4232,65	27,37	0,00E+00	0,00E+00	4
Hugg_MISS.p=c(t)alpha(sex)	4233,24	27,95	0,00E+00	0,00E+00	9
Hugg_p=c(t)	4233,62	28,33	0,00E+00	0,00E+00	14
Hugg_Phi(t)c(t)	4251,42	46,13	0,00E+00	0,00E+00	12
Hugg_p(.)c(.)	4255,98	50,70	0,00E+00	0,00E+00	2
Hugg_Het2.p=c(t),pi(.)	4256,01	50,73	0,00E+00	0,00E+00	7
Hugg_p=c(sex)	4256,96	51,67	0,00E+00	0,00E+00	2
Hugg_Het2.p=c(t),pi(sex)	4260,03	54,74	0,00E+00	0,00E+00	9

*Hugg\_Het2 = Hugginsova heterogenita pi, p a c; Hugg = Hugginsovo p a c; Hugg\_MISS = Hugginsov model w/ s chybnou identifikáciou*



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA

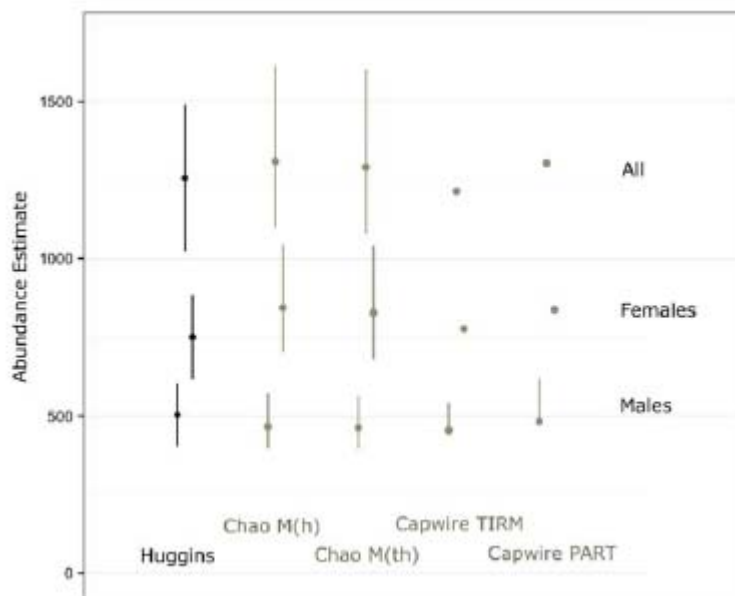


## 5.15 Odhady početnosti

Modely Capwire, podobne ako modely MARK, ukázali značnú podporu pre použitie modelov, ktoré zahrňajú heterogenitu. Z toho istého dôvodu sme použili tiež modely Mh a Mth podľa Chao, pretože heterogenita sa ukázala ako významná vlastnosť nášho súboru dát. Konečné výsledky sú uvedené v tab. 4 a na obrázku 11.

Tab. 4. Výsledky odhadov veľkosti populácie medveďa hnedého na Strednom Slovensku pomocou CMR modelovania. Modely CAPWIRE boli vypočítané osobitne pre samcov, samice a spolu, zatiaľčo Hugginsove a Chao modely boli vypočítané v jednom modeli pre osobitné odhady pre každé pohlavie. Pre konečný odhad veľkosti populácie navrhujeme použiť model CAPRWIRE TIRM.  $N^{\wedge}$  = odhad abundancie,  $CI_d$  AND  $CI_u$  = dolný a horný interval spoľahlivosti.

Model	Samce			Samice			Spolu		
	$N^{\wedge}$	$CI_d$	$CI_u$	$N^{\wedge}$	$CI_d$	$CI_u$	$N^{\wedge}$	$CI_d$	$CI_u$
Hugginsova heterogenita	504	404	604	752	619	885	1256	1023	1489
Chao M(h)	466	397	572	843	702	1043	1309	1099	1615
Chao M(th)	463	396	563	828	682	1040	1291	1078	1603
<b>Capwire TIRM</b>	<b>455</b>	<b>438</b>	<b>542</b>	<b>778</b>	*	*	<b>1214</b>	*	*
Capwire PART	483	477	621	837	839	1019	1303	*	*



Obr. 11 Odhady veľkosti populácie získané rôznymi Capture – Mark – Recapture modelmi. V prípade modelov Capwire sú uvedené len bodové odhady.

Zo všetkých použitých modelov sú štatisticky najspoľahlivejšie Hugginsov model heterogenity, ktorý poskytuje dobré vyrovnanie a odhady početnosti sa môžu použiť ako



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

konečný výsledok tejto analýzy. Na základe tohto modelu sa v rokoch 2013–2014 odhadla celková početnosť 1256 medvedov (1023–1489 95% CI). Tento počet zahrňuje aj medveď všetky usmrtené medvede v tomto období (uložené a usmrtené pri dopravných kolíziách) a nezahrňuje mláďatá z roku 2014. Odhadnutý pomer pohlavia je vychýlený v prospech samíc (59,9 % samíc a 40,1 % samcov), veľmi podobný odhad, ktorý sme získali pri priamom počítaní unikátnych genotypov.

## Diskusia

Odhad veľkosti populácie u divo žijúcich živočíchov je obtiažny a zo všetkých existujúcich metód najspoľahlivejšou a najpresnejšou je použitie molekulárnej genetiky. V každom prípade získanie spoľahlivých odhadov je sprevádzané veľkou pracnosťou. V tomto prípade sa dá aplikovať tiež zákonitost' zmenšujúcej sa návratnosti – zatiaľčo počet použiteľných vzoriek v tejto štúdii mohol byť väčší a intervaly spoľahlivosti mohli byť menšie, podstatne väčšie počty vzoriek získaných v krátkom období by poskytli marginálne lepšie výsledky, než tie ktoré by sme získali navýšením počtu vzoriek o niekoľko stoviek.

Hlavným problémom nášho súboru dát bola nízka miera opakovaného zachytenia, neočakávane spôsobená nízkou úspešnosťou genotypovania a veľkým počtom jedincov v populácii. Nízka úroveň opätovného zachytenia vedie k vysokej heterogenite pravdepodobnosti zachytenia, pretože niektoré medvede (napr. žijúce v blízkosti dobre motivovaného zberača, ktorý nazberal veľa vzoriek) majú väčšiu pravdepodobnosť zachytenia (zistené z nazberaných dát). Avšak dáta, sú stále postačujúce pre získanie zmysluplne presných a pravdepodobne nevychýlených výsledkov.

Analýza pomerne nízkej úspešnosti izolácie je obtiažna. V podobnej štúdii s medveďmi v Slovinsku (Skrbinšek *et al.* 2010) bola zaznamenaná veľká premenlivosť vo výťažnosti vzoriek v závislosti od mesiaca zberu, potravy a čerstvosti vzoriek. Podobne aj ďalšie štúdie (Bellemain *et al.* 2004; Solberg *et al.* 2006) zaznamenali nízku úspešnosť izolácie, takže môžeme prijať výsledok, že úspech izolácie a amplifikácie je špecifický pre sledovanú oblasť a druh, a v niektorých prípadoch nespĺňa naše očakávania.

Hlavný metodologický problém je použitie modelov, ktoré počítajú s heterogenitou zachytenia vs. modelov, ktoré s ňou nepočítajú. Modely, ktoré nepočítajú sú silne vychýlené v prípade ak je v dátach prítomná heterogenita zachytenia. Vzhľadom na to, že v našom súbore sme zaevidovali heterogenitu zachytenia, výsledky týchto modelov by sa nemali použiť a preto ich ani neuvádzame. Heterogenita zachytenia je vážnym problémom pre odhad veľkosti populácie, ale modely, ktoré ju zohľadňujú môžu korigovať spôsobené odchýlky, avšak presnosť týchto modelov je nižšia a jej výsledkom sú väčšie intervaly spoľahlivosti.

Získali sme aj vzorky, ktoré však pochádzali z obdobia, kedy sme mohli považovať populáciu za uzavretú. Tieto sme nemohli použiť pre typ modelov s uzavretou populáciou. Využijeme ich v prípade ďalšieho modelovania demograficky otvorených populácií.

Výsledky prezentujú odhady, ktoré sú výsledkom rôznych prístupov (tab. 3 a obr. 4). Hlavnou myšlienkou bolo odskúšanie koncepcne rozdielných modelov pre odhad veľkosti



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



## Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

populácie, čo sa podarilo splniť, pretože výsledky rozdielných modelov vykazujú vysoký stupeň zhody. Modely abundancie Capwire TIRM by boli najspoľahlivejšie, pretože dáta sa odchyľujú v najmenšom počte predpokladov a tento model využíva dáta najefektívnejším spôsobom, avšak boli navrhnuté pre malý počet jedincov – do niekoľkých stoviek (Miller *et al.* 2005). Pre veľké súbory nie sú k dispozícii procedúry pre stanovenie intervalov spoľahlivosti. Z tohto dôvodu sme uviedli iba bodové odhady.

Získané odhady poskytujú spoľahlivý odhad veľkosti populácie medvedov na Slovensku, ktorý môže slúžiť ako základ pre plán starostlivosti o medveďa. Odhad považujeme za nevychýlený a intervaly spoľahlivosti zopovedajú presnosti, ktorá sa očakáva v populáciách divo žijúcich živočíchov s veľkým areálom. Najdôležitejším prínosom tejto štúdie je, že je to prvý spoľahlivý údaj o veľkosti populácie medvedov na Slovensku a každý údaj o vývoji počtu medvedov na Slovensku v budúcnosti sa bude porovnávať s týmito odhadmi. Budúca genetická inventarizácia a ďalšie by sa mali uskutočniť v pravidelných časových intervaloch, aby sa zabezpečil menežment populácie medveďa na vedeckých základoch.

Monitoring populácie medveďa navrhnutý v Programe starostlivosti o medveďa hnedého na Slovensku by mal zahŕňať ďalšie parametre populácie ako, napr. podiel reprodukujúcich samíc, počet mláďat, mortalitu mláďat v prvom roku a i., ktoré sú potrebné pre modelovanie rastu populácie. Ďalším krokom by malo byť rozdelenie populácie do oblastí, ktoré by nemali byť identické so samosprávnym členením Slovenska a ani s pohoriami), ale mali by vychádzať z oblastí vyššej koncentrácie medvedov (ako napr. Turiec, Liptov, Poľana a pod.) a pre tieto upresniť program starostlivosti v závislosti od hustoty populácie a škôd spôsobených medveďom.

### 6. Literatúra

1. ALMAŠAN, H., Poľovné hospodárstvo v RSR. *In:* Hell, P. a kol.: Poľovníctvo v štátoch RVHP. Príroda, Bratislava.
2. AMSTRUP, S.C., McDONALD, T.L. & MANLY, B.F.J., 2005: Handbook of Capture-Recapture Analysis. Princeton University Press, Princeton and Oxford, 313 pp.
3. BELLEMAIN, E. & TABERLET, P., 2004: Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) feces. *Molecular Ecology*, **4**: 519–522.
4. BELLEMAIN, E., SWENSON, J.E., TALLMON, D.A., BRUNBERG, S., TABERLET, P., 2004: Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: comparing four methods for brown bears. *Conservation Biology* **19**: 150–161.
5. BORCHERS, D.L., BUCKLAND, S.T. & ZUCCHINI, W., 2002: Estimating Animal Abundance. Closed Populations. Springer-Verlag, London, 314 pp.
6. BURNHAM, K.P. & ANDERSON, D.R., 2002: Model Selection and Multimodel Inference. New York.
7. DEČAK, D., FRKOVIĆ, A., GRUBEŠIĆ, M., HUBER, D., IVIČEK, B., KULIC, B., SERTIĆ, D. & ŠTAHAN, Ž. (2005). *Brown bear management plan for the Republic of Croatia*. Ministry of Agriculture, Forestry and Water Management, Department for Hunting, and Ministry of Culture, Department for Nature Protection, Zagreb, Croatia. 90 pp.



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



## Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

8. DOYLE, J.J. & DOYLE, J.L., 1987: A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* **19**: 11–15.
9. FERIANCOVÁ, Z., 1955: Rozšírenie niektorých vzácnych druhov cicavcov na Slovensku. *Práce II sekcie SAV, séria biologická* **1(3)**: 1–40.
10. FINĎO, S., SKUBAN, M. & KOREŇ, M. 2007: Brown bear corridors in Slovakia. Identification of critical segments of the main road transportation corridors with wildlife habitats. Carpathian Wildlife Society, 68 pp.
11. GENOV, P. & GANČEV, R., 1987: Der Braunbär in Bulgarien (*Ursus arctos* L, 1758) – Verbreitung, Anzahl, Schäden. *Zeitschrift für Jagdwissenschaften* **33**: 145–153.
12. GRABAN, J., KISKOVÁ, J., PEPICH, P. & RIGG, P., 2013: Genetic analysis for geographic isolation comparison of brown bears living in the periphery of the Western Carpathians Mountains with bears living in other areas. *Open Journal of Genetics* **3(3)**:174–182. ISSN 2162-4453.
13. HARTL, G.B. & HELL, P., 1994: Maintenance of high levels of allelic variation in spite of a severe bottleneck in population size: the brown bear (*Ursus arctos*) in the Western Carpathians. *Biodiversity and Conservation* **3(6)**: 546–554.
14. HELL, P. & BEVILAQUA, F. 1988: Das Zusammenleben des Menschen mit dem Braunbären (*Ursus arctos*) in den Westkarpaten. *Zeitschrift für Jagdwissenschaften* **34(3)**: 153–163.
15. HELL, P. & SLAMEČKA, J., 1999: Medveď v slovenských Karpatoch a vo svete. Bratislava: PaRPRESS, 148 pp.
16. HELL, P. & SABADOŠ, K., 1993: Zhodnotenie úlovkov medveďov hnedých v západných Karpatoch v rokoch 1980–1991 [Evaluation of the bag of brown bear in the Western Carpathians during 1980 to 1991]. *Folia venatoria* **23**: 183–200.
17. HELL, P. & SABADOŠ, K., 1995: Niektoré parametre západokarpatskej populácie medveďa hnedého (*Ursus arctos*) v roku 1992 [Some parameters of Western-Carpathians population of brown bears (*Ursus arctos*) in 1992]. *Folia venatoria* **25**: 97–104.
18. HOLBOVÁ, M., 2013: Genetická diverzita a odhad veľkosti populácie medveďa hnedého (*Ursus arctos*) vo Východných Karpatoch. Lesnícka fakulta TU vo Zvolene, 103 str.
19. HUGGINS, R.M., 1989: On the statistical analysis of capture experiments. *Biometrika* **76**: 133–140.
20. JAMNICKÝ, J. 1987: Formy komunikácie medveďa hnedého (*Ursus arctos* L.). *Folia venatoria* **17**: 151–167.
21. JAMNICKÝ, J. 1993: Lov medveďa hnedého a vlka obyčajného na Slovensku pred sto rokmi. *Folia venatoria* **23**: 221–229.
22. JANÍK, M., 1997: Biogeography, demography and management of *Ursus arctos* in the Western Carpathians. — International Conference on Bear Research and Management **9(2)**: 125–128.
23. JANÍK, M., VOSKÁR, J. & BUDAY, M., 1986: Súčasný rozšírenie medveďa hnedého (*Ursus arctos*) v Československu [Present distributin of the brown bear (*Ursus arctos*) in Czechoslovakia]. *Folia venatoria* **16**: 331–352.
24. KASSA, M., 1998: Analýza lovu medveďa hnedého (*Ursus arctos*) na Slovensku. *Chránené územia Slovenska* **38**: 20–22.



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



## Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

25. MILLER, C., JOYCE, P. & WAITS, L.P., 2002: Assessing allelic dropout and genotype reliability using maximum likelihood. *Genetics* **160**: 357–366.
26. MILLER, C., JOYCE, P. & WAITS, L.P., 2005: A new method for estimating the size of small populations from genetic mark-recapture data. *Molecular Ecology* **14**: 1991–2005.
27. MIQUEL, C., BELLEMAIN, E., POILLOT, J., Bessi re, J., Durand, A., Taberlet, P., 2006: Quality indexes to assess the reliability of genotypes in studies using noninvasive sampling and multiple-tube approach. *Molecular Ecology Notes* **6**: 985–988.
28. OLIVEIRA, C.G., MARTINEZ, R.A. & GAIOTTO, F.A., 2007: DNA extraction from bristles and quills of *Chaetomys subspinosus* (Rodentia: Erethizontidae) using a novel protocol. *Genetic and Molecular Research* **6**: 657–666.
29. PAETKAU, D., 2003: An empirical exploration of data quality in DNA based population inventories. *Molecular Ecology* **12**: 1375–1387.
30. PAETKAU, D., CALVERT, W., STIRLING, I. & STROBECK, C., 1995: Microsatellite analysis structure of population structure in Canadian polar bears. *Molecular Ecology* **4**: 347–354.
31. PAETKAU, D. & STROBECK, C., 1994: Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* **3**: 489–495.
32. PASZLAWSZKY, J., 1918: *Mammalia*. In: Fauna Regni Hungariae. Budapest.
33. PAULE, L. & KRAJMEROVÁ, D. 2008: Zber a uskladňovanie vzoriek pre DNA analýzy. In: Paule, L., Urban, P. & G m ry, D., eds.) 2005: Genetika poľovnej zveri a voľne žijúcich živočíchov. Arbora Publishers, Zvolen, 37–46.
34. PAULE, L. 2008: Genetická diverzita, diferenciácia, tok g nov a syst m parenia u voľne žijúcich živočíchov. In: Paule, L., Urban, P. & G m ry, D., eds.) 2005: Genetika poľovnej zveri a voľne žijúcich živočíchov. Arbora Publishers, Zvolen, 55–64.
35. PAULE, L. 2008: Poľovna zver, voľne žijuce živočichy a ochranarska genetika. In: Paule, L., Urban, P. & G m ry, D., eds.) 2005: Genetika poľovnej zveri a voľne žijúcich živočíchov. Arbora Publishers, Zvolen 7–16.
36. PEPICH, P., KRAJMEROVÁ, D. & SANIGA, M., 2014: Using noninvasive DNA sampling to estimate abundance and some genetic properties of the brown bear (*Ursus arctos*) in Strazovske vrchy Mts. *Folia oecologica* **41**(2): 184–194. ISSN 1336-5266.
37. PRADEL, R., 1996: Utilization of capture-mark-recapture for the study of recruitment and population growth rate. *Biometrics* **52**: 703–709.
38. RIGG, R. & ADAMEC, M., 2007: Status, Ecology and Management of the Brown Bear (*Ursus arctos*) in Slovakia. Slovak Wildlife Society. 128 p.
39. SABADOŠ, K. & ŠIMIÁK, M., 1981: Rozšírenie a poľovne obhospodarovanie medveďa hnedého (*Ursus arctos* L.) na Slovensku [Distribution and management of the brown bear (*Ursus arctos* L.) in Slovakia]. *Folia venatoria* **10–11**: 15–49.
40. ŒELARU, N. & IONESCU, O., 2005: Stav a manažment hnedého medveďa v Rumunsku. In: Zborník referátov z medzinárodnej konferencie Levice, 12.03.2005. Výskumný ústav živočíšnej výroby, Nitra: 27–34.



Investicia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionalný rozvoj



EURÓPSKA UNIA



## Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

41. SKUBAN, M., 2011: Dem Braunbären auf der Spur ... Lebensweise, Geschichte, Mythen. Leopold Stocker Verlag, Graz, 320 pp.
42. SOLBERG, K.H., BELLEMMAIN, E., DRAGESET, O.M., TABERLET, P., SWENSON, J.E., 2006: An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biological Conservation* 128: 158–168.
43. ŠTOFÍK, J., BUČKO, J., GIČ, M. & SANIGA, M., 2013: Time and spatial trends in the brown bear *Ursus arctos* population in Slovakia (1900–2010). *Folia oecologica* 40: 117–129.
44. ŠTOFÍK, J., 2013: Ekológia a etológia medveďa hnedého (*Ursus arctos*) v pohorí Bukovských lesov. Fakulta ekológie a environmentalistiky, Technická univerzita, Zvolen, 161 s.
45. STRAKA, M., 2011: Genetic diversity and differentiation of brown bear (*Ursus arctos*) populations in Carpathians. Lesnícka fakulta TU vo Zvolene, 106 str.
46. STRAKA, M., FINĎO, S., ŠTOFÍK, J. & PAULE, L., 2009: Využitie vzoriek trusu a srsti pri štúdiu populácií medveďa hnedého. *Acta Facultatis Forestalis* 51(1): 19–29.
47. STRAKA, M., PAULE, L. & KRAJMEROVÁ, D., 2008: Metodika pre odhad početnosti populácie medveďa hnedého (*Ursus arctos*) metódou neinvazívneho odberu vzoriek. Pp. 165–170. In: Adamec, M., Urban, P. & Adamcová, M. (eds.): Výskum a ochrana cicavcov na Slovensku VIII. Zborník referátov z konferencie (Zvolen 12.–13. 10. 2007). Štátna ochrana prírody SR Banská Bystrica, 248 pp.
48. STRAKA, M., PAULE, L., FINĎO, S. & ŠTOFÍK, J., 2009: Využitie vzoriek trusu a srsti pri štúdiu populácií medveďa hnedého. *Acta Facultatis Forestalis, Zvolen* 51 (Suppl. 1): 19–29.
49. STRAKA, M., PAULE, L., IONESCU, O., ADAMEC, M. & ŠTOFÍK, J., 2012: Microsatellite diversity and structure of Carpathian brown bears (*Ursus arctos*): consequences of human caused fragmentation. *Conservation Genetics* 13(1): 153–164.
50. STRAKA, M., PAULE, L., ŠTOFÍK, J., IONESCU, O. & ADAMEC, M., 2011: Genetic differentiation of Carpathian brown bear (*Ursus arctos*) populations reflects the human caused isolation. *Beiträge für Wild- und Jagdforschung* 36: 77–86. ISBN-10: 3788808519; ISBN-13: 978-3788808518.
51. STRAKA, M., VICIAN, V. & PAULE, L., 2009: Metódy individuálnej identifikácie s využitím genetických markérov – medveď hnedý ako modelový živočích. *Chránené územia Slovenska* 79: 8–12.
52. TABERLET, P., CAMARRA, J.J., GRIFFIN, S., UHRES, E., HANOTTE, O., WAITS, L.P., DUBOIS-PAGANON, C., BURKE, T. & BOUVET, J., 1997: Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6: 869–876.
53. TEAM RDC (2010) R: A language and environment for statistical computing.
54. TOBIÁŠ, J., 1933: Bears in Turiec region [in Slovak]. *Lovec* 6: 4–8.
55. TURČEK, F., 1949: O súčasnom stave veľkých šeliem na Slovensku. *Poľovnícky obzor* 4(11): 162–164. Súčasný stav veľkých mäsožravcov na Slovensku
56. ŽUFFA, A., 1932: Game in Tatras (in Slovak). *Lovec* 21: 1–2.
57. WAITS, L.P., LUIKART, G. & TABERLET, P., 2001: Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: Cautions and guidelines. *Molecular Ecology* 10: 249–256.



Investícia do Vašej budúcnosti



Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj



EURÓPSKA ÚNIA



# Projekt „Výskum a monitoring populácií veľkých šeliem a mačky divej na Slovensku“

58. WHITE, G.C. & BURNHAM, K.P., 1999: Program MARK: Survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* **46**: 120–138.



Investícia do Vašej budúcnosti



Ministerstvo životného prostredia  
Slovenskej republiky



EURÓPSKA ÚNIA

Tento projekt je spolufinancovaný z Európskeho fondu pre regionálny rozvoj