



Projekt »Varstvena genetika medveda, risa in jelenjadi v Sloveniji«

VARSTVENA GENETIKA MEDVEDA*

Končno poročilo



Tomaž Skrbinšek, Hubert Potočnik, Ivan Kos, Peter Trontelj

Ljubljana, Marec 2007

* Metodološki del poročila velja tudi za preučevanje genetike risa (*Lynx lynx*)

Raziskavo so finančno podprli:

Javna agencija za raziskovanje Republike Slovenije

Ministrstvo za okolje in prostor Republike Slovenije

Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano Republike Slovenije

Zavod Republike Slovenije za varstvo narave

Zahvale vsem, ki so pripomogli k uspehu raziskave:

Tonetu Marinčiču in njegovim lovcem iz LPN Jelen – Snežnik za neprecenljivo terensko pomoč.

Marku Jonožoviču in ostalim delavcem Zavoda za gozdove Slovenije za skrbno in vestno zbiranje vzorcev tkiv odvzetih medvedov, brez katerih ne bi bilo populacijsko genetskih raziskav.

Francu Kljunu za skrbništvo nad banko tkiv medvedov in vso ostalo pomoč

Vsem prostovoljcem, ki so nam pomagali pri vzorčenjih.

Evi Bellemain za pomoč pri prvih korakih v neinvazivni genetiki.

Đuri Huberu in Ivni Kocijan z Univerze v Zagrebu za pomoč pri vzpostavljanju mednarodnih stikov, sodelovanje in neprestano podporo.

Lisette Waits z Univerze v Idahu, ZDA, za gostoljubje, popolnoma neprecenljivo strokovno pomoč in skoraj enako neprecenljivo uporabo laboratorija.

Ljubljana, 26. marec 2007

1. Uvod

Karizmatične vrste, kot to medved nedvomno je, so vedno v žarometih javnega interesa. Nekateri jih obožujejo, drugi bi jih najraje iztrebili, nikogar pa ne pustijo ravnodušnega. Zaradi tega je upravljanje s takšno vrsto težek in velik zalogaj za vsakega upravljavca, saj se bo ne glede na odločitev zmeraj našel kdo, ki mu ta odločitev ne bo všeč. Ključno vlogo pri sprejemanju takšnih odločitev mora imeti znanost, saj lahko samo znanstveno preverjeni, verodostojni podatki omogočijo suverene, argumentirane odločitve, ki zagotavljajo ustreznost upravljanja in upravljavcu nudijo varnost pred neizogibnimi kritikami. V prihodnosti bo pri zagotavljanju takšnih podatkov genetika nedvomno imela pomembno vlogo. Mnoga vprašanja o številčnosti, populacijski dinamiki, spolni strukturi in podobnih pomembnih parametrih za upravljanje so bila nedolgo tega praktično nerešljiva in predmet bolj ali manj grobih ocen. Genetika nam lahko na ta vprašanja ponudi odgovore, dovoljuje pa nam tudi nova vprašanja, ki si jih prej nismo upali niti postaviti. Sama po sebi ne more nadomestiti vseh drugih metod, lahko pa prispeva izdaten delež v mozaiku znanj, s pomočjo katerih bomo to redko, zanimivo in ogroženo vrsto ohranili tudi za prihodnje rodove.

Genetika je naredila dolgo pot od zamudne, drage metode neuporabne za ekološke študije naravnih populacij do hitrega, poceni in večnamenskega orodja, ki ga poznamo danes. Že v zadnjih treh letih, kolikor traja naš projekt, smo bili priče občutnim spremembam in napredku. Analize, ki so nam leta 2005 vzele skoraj pol leta, lahko zdaj ponovimo v nekaj dneh, študije, o katerih si takrat nismo upali niti razmišljati, postajajo danes realnost. In zaenkrat ni nobenih znakov, da bi se ta trend kakorkoli upočasnjeval. Prav nasprotno, vse kaže, da genetika svojo pravo mesto in veljavo v ekoloških študijah šele začenja dobivati.

Cilji našega pilotskega projekta so bili realistični in jasni: usposobiti laboratorij, da bo ta sposoben opravljati analize neinvazivnih genetskih vzorcev, izbrati primerne genetske markerje, razviti in preizkusiti metode zbiranja vzorcev in se naučiti iz njih uspešno izolirati DNA, to DNA po tem zanesljivo genotipizirati in za konec oceniti številčnost medvedov na dveh manjših testnih površinah. Danes znamo bistveno več, imamo bistveno boljšo opremo in bi cilje zastavili neprimerno višje. Toda brez tega pilotskega projekta morali vso to pot vseeno v celoti prehoditi, tako da so izkušnje in znanje, ki smo jih pridobili, neprecenljive.

2. KAZALA

2.1. Kazalo vsebine

1. Uvod	1
2. Kazala	2
3. Povzetek za uporabnike	5
4. Oris poteka projekta in mednarodno sodelovanje	12
5. Vzorčenje, izolacija DNA in genotipizacija tkiv	13
6. Genska diverziteta in populacijsko – genetske značilnosti populacije rjavega medveda v severnih Dinaridih	15
7. Analiza neinvazivnih vzorcev	18
8. Neinvazivno genetsko vzorčenje	23
9. Spolna struktura	26
10. Ocene števila medvedov in gostote medvedov na vzorčnih območjih	28
11. Rezultati individualne prepoznave osebkov iz neinvazivnih vzorcev	33
12. Rezultati neinvazivnega vzorčenja in ocena velikosti superpopulacije za vzorčno območje LPN Jelen Snežnik (»Snežnik«)	35
13. Ocena populacijske gostote na vzorčnem območju »Snežnik«	39
14. Rezultati neinvazivnega vzorčenja in ocena velikosti superpopulacije za vzorčno območje »Glažuta«	41
15. Ocena populacijske gostote na vzorčnem območju »Glažuta«	43
16. Ocena številčnosti medvedov v širši habitatni krpi, ki zajema vzorčni območji Glažuta in Snežnik	44
17. Diskusija ocen številčnosti in populacijske gostote	46
18. Simulacije in analiza potrebnega truda za študijo celotne slovenske populacije medvedov z neinvazivnimi genetskimi vzorci	47
19. Reference	48

2.2. Kazalo slik

slika 1: Vezavno neravnovesje med pari mikrosatelitskih lokusov pri medvedih, odstreljenih v Sloveniji. S "+" so označeni pari, pri katerih test zazna neravnovesje ($p < 0,05$)	17
slika 2: Urejanje vzorcev za pripravo PCR reakcije	19
slika 3: Algoritem za sprejemanje in označevanje alelov v izpisu sekvenatorju v programu GeneMapper (v angleščini zaradi priprave znanstvenega članka)	20
slika 4: Algoritem za zagotavljanje zanesljivosti genotipizacije neinvazivnih vzorcev (v angleščini zaradi priprave znanstvenega članka)	21
slika 5: Območji vzorčenja neinvazivnih vzorcev	23
slika 6: Vizualizacija vzorcev v času ("odlovne zgodovine" osebkov) in sekundarna vzorčenja (intervali). Izsek je iz prvega primarnega vzorčenja na Glažuti (G1) od maja do julija 2004. ..	28
slika 7: Struktura klasičnega Pollockovega »Robust Design« modela (Cooch in White 2007). Primarna vzorčenja se nadalje delijo na sekundarna vzorčenja – časovne intervale znotraj primarnih vzorčenj. Tako se po klasičnem Pollockovem »Robust Design« modelu, ki ga smo ga uporabili tudi mi, parametri znotraj primarnih vzorčenj ocenjujejo po modelih za zaprte populacije, med primarnimi vzorčenji pa po modificiranih Cormack – Jolly – Seber modelih za odprte populacije.	30
slika 8: Območji vzorčenja, lokacije vzorcev iztrebkov in odvzeti »označeni« medvedi. Črte povezujejo vzorce istih osebkov. Vrisane tudi lokacije ostalih odvzetih medvedov (vir: Zavod za gozdove Slovenije) in lokacije vzorcev na Hrvaškem (vir: Ivna Kocijan)	34
slika 9: Graf časovne razporeditve vzorcev v vzorčenju v LPN Jelen Snežnik. Vidna so tri primarna vzorčenja, S1a, S1b in S2. Vertikalne črte delijo posamezna sekundarna vzorčenja znotraj primarnih vzorčenj.	35

slika 10: Lokacije genotipiziranih vzorcev iztrebkov medvedov. Črte povezujejo vzorce istih osebkov. Vrisane so tudi lokacije ostalih odvzetih medvedov (vir: Zavod za gozdove Slovenije) in lokacije vzorcev na Hrvaškem (vir: Ivna Kocijan)	36
slika 11: Probabilistična prispevna površina za samce za izračun populacijske gostote medvedov na vzorčnem območju »Snežnik«. Verjetnost, da medvedi prihajajo v vzorčenje pada od območja vzorčenja proti robu. Površine brez gozda imajo $P(d) = 0$. Za samice je z rdečo črto narisana samo meja območja Z za katero je verjetnost, da medvedi iz njega v časovnem oknu posamičnega vzorčenja prihajajo v območje vzorčenja, nezanemarljiva.	39
slika 12: Prostorska razporeditev vzorcev v vzorčenju na vzorčni površini Glažuta pomladi in jeseni 2004.....	41
slika 13: Prikaz časovnega poteka odlova – označevanja in ponovnega odlova medvedov z neinvazivnimi vzorci na vzorčnem območju »Glažuta«.	42
slika 14: Probabilistična površina za samce za izračun populacijske gostote medvedov na vzorčnem območju »Glažuta«. Verjetnost, da medvedi prihajajo v vzorčenje pada od območja vzorčenja proti robu. Površine brez gozda imajo $P(d) = 0$. Koncentrične črte povezujejo točke z isto $P(d)$	43
slika 15: Območje, na katerem lahko ocenimo število medvedov v letih 2004 in 2005.	44

2.3. Kazalo tabel

tabela 1: Vzorci zbrani za genetiko v letih 2004 – 2006 in število odvzetih medvedov v Sloveniji.	14
tabela 2: Parametri genske diverzitete populacije medvedov v severnih Dinaridih za 13 lokusov, $N=236$. H_o = opažena heterozigotnost, H_e = pričakovana heterozigotnost, $G-W$ = Garza—Williamsonov indeks.	15
tabela 3: Rezultati testa Hardy – Weinbergovega ravnovesja. H_o = opažena heterozigotnost, H_e = pričakovana heterozigotnost. Lokusi, ki kažejo znake odstopanja, so podčrtani.	16
tabela 4: Uspešnost genotipizacije vzorcev iztrebkov medvedov po vzorčenjih. Ocena starosti iztrebka je bila zabeležena za 88% iztrebkov. $G1$ = Glažuta pomlad 2004; $G2$ = Glažuta jesen 2004; $S1$ = Snežnik 2004; $S2$ = Snežnik 2005, izven = vzorci nabrani izven vzorčnih območij ($\chi^2 = 25,151$, $df = 4$, $p < 0,001$; vzorci izven niso zajeti v testu).	21
tabela 5: Uspešnost genotipizacije glede na ocenjeno starost iztrebka ($r = 0,949$; $p = 0,01$). Ocena starosti je bila zabeležena za 88% vzorcev.	22
tabela 6: Uspešnost amplifikacije iztrebkov po mesecih ($\chi^2 = 18,528$, $df = 8$, $p < 0,018$; trije vzorci niso imeli natančno določenega datuma, zato smo jih izvzeli iz analize).	22
tabela 7: Rezultati vzorčenja na vzorčni površini Glažuta. $G1$ = pomlad 2004, $G2$ = jesen 2004.	25
tabela 8: Rezultati vzorčenja na vzorčni površini Snežnik. $S1$ = 2004, $S2$ = 2005.	25
tabela 9: Ocena napak in pregled zanesljivosti določitve spola medvedov iz neinvazivnih vzorcev.	26
tabela 10: Spolna struktura populacije medvedov v Sloveniji. Standardno deviacijo in test H_0 o spolnem razmerju 1:1 smo ocenili po bootstrap metodi ($n = 10.000$).	27
tabela 11: Število različnih medvedov, ki smo jih našli v neinvazivnih vzorčenjih in prehajanje istih živali med vzorčenji. Prehajanja živali med obema območji vzorčenja nismo opazili. Za dodatni dve živali od katerih smo analizirali iztrebka vzorci niso bili najdeni na območjih organiziranih vzorčenj. $S1a$ = Snežnik, pomlad/poletje 04, $S1b$ = Snežnik, poletje/jesen 04; $S2$ = Snežnik, poletje/jesen 05; $G1$ = pomlad 04; $G2$ = jesen 04.	33
tabela 12: Pregled prehajanja živali med vzorčenji na vzorčnem območju »Snežnik«. $S1a$ = Snežnik, pomlad/poletje 04, $S1b$ = Snežnik, poletje/jesen 04; $S2$ = Snežnik, poletje/jesen 05.	35
tabela 13: Rezultati CMR modeliranja za posamezna vzorčenja na vzorčnem območju »Snežnik« (LPN Jelen). POPAN = Schwarz - Arnasonov JS model za odprte populacije, Huggins = Hugginsov model za zaprte populacije; RD = Pollockov Robust Design model (glej 10.1, stran 30). Ocene parametrov so znotraj seta modelov povprečene z Akaikovimi	

utežmi glede na podporo, ki jo ima posamezen model v podatkih. »Nepravilnosti« v seštevkih pri RD modelu so zaradi zaokroževanja.	37
tabela 14: Serija Robust Design modelov za vzorčno območje Snežnik. Modeli vključujejo vsa tri vzorčenja v en likelihood. Modeli so sortirani po Akaikovem informacijskem kriteriju (AICc) od modela, ki ima največ podpore v podatkih do modela, ki ima podpore najmanj.	38
tabela 15: Rezultati ocene populacijske gostote medvedov za vzorčno območje »Snežnik« (LPN Jelen Snežnik). Po najboljšem modelu (tabela 13) je številčnost superpopulacije na tem območju in posledično gostota v vseh treh vzorčenjih enaka. Gostoto za samce in samice skupaj smo dobili na dva različna načina – s seštevkom gostot po posameznem spolu in z modeliranjem prispevne površine za oba spola skupaj.	40
tabela 16: Prehajanje živali med vzorčenjema na Glažuti.	41
tabela 17: Rezultati ocene številčnosti superpopulacije na vzorčnem območju Glažuta. V vzorčenju G2 nismo mogli najti modela, s katerim bi ustrezno opisali CMR in nismo dobili uporabnih rezultatov. V vzorčenju G1 nismo mogli modelirati vsakega spola posebej, zato je podana samo ocena skupnega števila osebkov.	42
tabela 18: Rezultati ocene gostote populacije medvedov za vzorčno območje "Glažuta".	43
tabela 19: Izračun števila medvedov za območje Snežnika, Javornikov, Velike gore in Stojne leta 2004 (2005).	45
tabela 20: Rezultati ocene številčnosti superpopulacije in populacijskih gostot po vzorčnih območjih "Snežnik« (2004, 2005) in Glažuta (2004); primerjava ocene spolne strukture iz neinvazivnih genetskih vzorcev in ocene spolne strukture iz razmerja populacijskih gostot. ..	46
tabela 21: Rezultati simulacij vzorčenja celotne Slovenske populacije medvedov s pričakovanim intervalom zaupanja ter ocena potrebnega števila vseh vzorcev za robustno oceno.	47

3. POVZETEK ZA UPORABNIKE

Rezultati - vzorčenje, izolacija DNA in genotipizacija tkiv (stran 13)

O metodah več v 5.1 na strani 13.

V sodelovanju z ZGS smo zbrali večino (86,8 %) tkivnih vzorcev medvedov, ki so bili v letih od 2003 do 2006 v Sloveniji odvzeti iz populacije (tabela 1).

tabela 1: Vzorci zbrani za genetiko v letih 2004 – 2006 in število odvzetih medvedov v Sloveniji.

leto	samci /odvzem		samice /odvzem		neznano /odvzem		skupaj /odvzem	
2003	28	45	23	26	0	1	51	72
2004	49	49	28	29	0	2	77	80
2005	42	50	42	45	0	0	84	95
2006	60	64	50	59	1	2	111	125
skupaj	179	208	143	159	1	5	323	372

Ugotovili smo popolne genotipe za vseh 235 tkivnih vzorcev, ki smo jih imeli zbrane do junija 2006, na vseh trinajstih izbranih lokusih. En vzorec imamo genotipiziran na 12 lokusih. Preostalih 88 vzorcev, ki smo jih dobili do konca leta 2006, smo genotipizirali na petih od šestih lokusov, ki jih uporabljamo za prepoznavanje osebkov iz neinvazivnih vzorcev.

Rezultati – genska diverziteta in populacijsko genetske značilnosti populacije rjavega medveda v severnih Dinaridih (stran 15)

Za analize smo uporabili vzorce tkiv 236 medvedov, kar je za ogroženo živalsko vrsto dokaj velik vzorec. Tkiva so genotipizirana na 13 polimorfni mikrosatelitskih lokusih. Indeksi genske diverzitete so povzeti v tabeli 2.

tabela 2: Parametri genske diverzitete populacije medvedov v severnih Dinaridih za 13 lokusov, N=236. Ho = opažena heterozigotnost, He = pričakovana heterozigotnost, G-W = Garza—Williamsonov indeks.

	štev. efekt. št.				min.	maks.	razpon alelov	
Lokus	alelov	alelov	Ho	He	alel	alel	[(GT) _n]	G-W
G10B	8	3,523	0,727	0,718	132	154	12	0,615
G10C	8	3,824	0,722	0,740	91	109	10	0,727
G10D	6	4,415	0,781	0,775	168	182	8	0,667
G10J	5	3,191	0,624	0,688	78	92	8	0,556
G10L	4	2,704	0,662	0,632	153	163	6	0,571
G10M	6	3,940	0,709	0,748	204	218	8	0,667
G10P	8	4,855	0,786	0,796	147	175	15	0,500
G10X	10	6,348	0,855	0,844	132	154	12	0,769
Mu10	4	3,136	0,675	0,683	112	126	8	0,444
Mu23	8	4,965	0,786	0,800	142	156	10	0,727
Mu50	7	5,077	0,765	0,805	79	103	13	0,500
Mu51	4	2,510	0,551	0,603	115	125	6	0,571
Mu59	8	6,770	0,902	0,854	97	121	13	0,571
povprečje	6,615	4,251	0,734	0,745	-	-	9,923	0,607
s.d.	1,938	1,320	0,094	0,078	-	-	2,871	0,099

Zanimivi so Garza – Williamsonovi indeksi, ki nakazujejo možnost ozkega grla v preteklosti. Ti indeksi so okrog 1 v trajno stabilnih velikih populacijah, v majhnih populacijah pa gredo proti 0. Rezultati ustrezajo zapisom o zgodovini dinarske populacije medvedov, ki naj bi bila v začetku 20. stoletja zdesetkana na 30 - 40 osebkov.

Testirali smo tudi, ali so aleli v Hardy – Weinbergovem ravnovesju (tabela 3). Dva lokusa kažeta odstopanje, vendar je razlika med H_e in H_o razmeroma majhna.

Zanimivi so tudi testi vezavnega neravnovesja (linkage disequilibrium), saj so vsi lokusi v naši populaciji v vezavnem neravnovesju z več drugimi lokusi ($p < 0,05$; slika 1, graf 1). Mikrosatelitski lokusi, ki jih uporabljamo, bi se morali v veliki populaciji, ki se pari naključno, praviloma dedovati nevezano. Pri populacijah, ki imajo nizko efektivno velikost N_e , prihaja do parjenja osebkov, ki so med sabo razmeroma ozko sorodni, zaradi česar se vezavno ravnovesje ne more vzpostaviti. Efektivna velikost populacije, ki jo lahko interpretiramo kot število živali, ki se v idealizirani populaciji med seboj pari, je eden parametrov viabilnosti populacije. Na podlagi razmeroma visoke stopnje vezavnega neravnovesja med lokusi lahko sklepamo, da ima naša populacija medvedov razmeroma majhno efektivno velikost. Parameter bomo lahko z našimi podatki ocenili, ko bodo znani rezultati določanja starosti iz izbruskov zob, kar naj bi bilo kmalu (podatki Zavoda za Gozdove Slovenije).

Analiza neinvazivnih vzorcev (stran 18)

Z neinvazivno genetiko imamo v mislih genetske študije narejene s pomočjo neinvazivnega genetskega vzorčenja, pri katerem ne pridemo v neposreden stik s preučevanim osebkom. Kot vir osebkeve DNA uporabimo material, ki ga je žival pustila v okolju - največkrat iztrebek, dlako ali perje. Genetske analize neinvazivnega materiala so metodološko mnogo zahtevnejše od analiz »klasičnih« vzorcev tkiv. DNA je v takšnem vzorcu v zelo majhnih količinah in močno degradirana, zato je pri analizah potrebna posebna pazljivost.

Prva in kritična postavka je zagotoviti, da visoko koncentrirana DNA iz tkivnih vzorcev ali PCR produktov ne more priti v stik z neinvazivnim materialom. Zaradi tega smo popolnoma ločili »neinvazivni« laboratorij od laboratorijev, v katerih se dela s PCR produkti. V neinvazivnem laboratoriju smo opravljali izključno ekstrakcijo DNA iz neinvazivnih vzorcev in pripravo prvostopenjskih PCR. Med temi laboratoriji smo tudi omejili gibanje ljudi in materiala. Več o postopkih za preprečevanje kontaminacije v 7.1.1 na strani 18.

Za analitiko neinvazivnih vzorcev smo uporabljali paleto šestih mikrosatelitskih markerjev: G10L, UarMu10, UarMu23, UarMu50, UarMu51 in UarMu59. Za določanje spola smo uporabljali marker SRY. Primerji so nekoliko spremenjeni od originalne reference in optimizirani za genotipizacijo neinvazivnih vzorcev.

Določanje dolžine alelov, genotipizacija in zagotavljanje kakovosti genotipov (stran 19)

Razvili smo vrsto sistemov in protokolov za zagotavljanje zanesljivih genotipov z majhnim številom ponovitev. Več v točki 7.1.4.

Rezultati - uspešnost genotipizacije (stran 21)

Razvili smo več protokolov in metod tako pri vzorčenju kot pri analizah za zagotavljanje čim višjega uspeha genotipizacije iztrebkov. V primerjavi s podobnimi študijami po svetu je naša uspešnost med najvišjimi. Rezultati so povzeti v tabeli 4.

tabela 4: Uspešnost genotipizacije vzorcev iztrebkov medvedov po vzorčenjih. Ocena starosti iztrebka je bila zabeležena za 88% iztrebkov. G1 = Glažuta pomlad 2004; G2 = Glažuta jesen 2004; S1 = Snežnik 2004; S2 = Snežnik 2005, izven = vzorci nabrani izven vzorčnih območij ($\chi^2 = 25,151$, $df = 4$, $p < 0,001$; vzorci izven niso zajeti v testu).

vzorčenje	G 1	G 2	S 1	S 2	izven	skupaj
skupaj vzorcev	110	113	161	85	2	471
delujočih vzorcev	69	89	136	75	2	371
% delujočih	62.7%	78.8%	84.5%	88.2%	100.0%	78.8%
povp. starost (dni)	1.7	2.5	1.5	1.7	-	1.8

Ugotovili smo statistično značilen vpliv ocenjene starosti iztrebka in meseca vzorčenja na uspešnost genotipizacije (tabela 5, tabela 6), kar bo imelo velik vpliv na načrtovanje bodočih študij.

Neinvazivno genetsko vzorčenje - območji vzorčenja in organizacija vzorčenja (stran 23), rezultati

Vzorke smo nabirali v letih 2004 in 2005 na dveh vzorčnih površinah (slika 5). Prva vzorčna površina je območje med Ribnico, Sodražico, Loškim potokom in Kočevsko reko, veliko 170 km² (Glažuta). Druga vzorčna površina obsega LPN Jelen-Snežnik, med Cerkniskim jezerom, Starim trgom in Ilirsko Bistrico in je velika 270 km² (Snežnik). Na vzorčni površini Glažuta smo vzorčili raziskovalci Biotehniške fakultete in prostovoljci. Na vzorčni površini Snežnik so vzorčili poklicni lovci LPN Jelen Snežnik.

Na obeh površinah smo zbrali 469 vzorcev, ki so bili dovolj sveži, strokovno odvzeti in opremljeni z vsemi potrebnimi podatki. Rezultati posameznih vzorčenj so predstavljeni v tabeli 7 in tabeli 8.

Spolna struktura – metodologija, rezultati (stran 26)

Razmerje med spoloma je pomemben dejavnik reprodukcijskega potenciala populacije in posledično pomemben parameter za populacijsko modeliranje. Za določanje spola smo uporabljali marker SRY, ki je vezan na Y spolni kromosom, ki ga imajo samo samci. Tako dobimo pri samcih po amplifikaciji jasno viden 80 baznih parov dolg fragment, ki pri samicah manjka. Primerji so razviti specifično za zveri, zato je kontaminacija iz plena, ki je opisana v literaturi, malo verjetna.

Zanesljivost neinvazivnega določanja spola smo preverili z pari iztrebek–tkivo iste živali in z večkratnimi kvalitetskimi vzorci iste živali, ki smo jih uporabili kot referenčne osebkke za ocenjevanje napak (tabela 9). Spol smo lahko zanesljivo določili za 130 od 140 živali, ki smo jih zajeli v neinvazivno vzorčenje (tabela 10). Za deset osebkov spola nismo mogli določiti s sprejemljivo zanesljivostjo (tabela 9).

tabela10: Spolna struktura populacije medvedov v vzorcu iztrebkov. Standardno deviacijo in test H_0 o spolnem razmerju 1:1 smo ocenili po bootstrap metodi ($n = 10.000$).

zanesljivo določeni samci	56	43,08%
zanesljivo določene samice	74	56,92%
skupaj	130	100,00%
bootstrap SD		0,043
p (H_0 :samci:samice = 1:1)		0,076

Povprečna zanesljivost določitve spola je visoka, nad 99%. Vzorcev je precej in izvirajo iz dveh vzorčnih območij v dveh letih, zato sklepamo, da je vzorčenje reprezentativno. Do iste spolne strukture smo prišli tudi po drugi poti preko CMR modeliranja (glej 16, stran 44). Razlika med spoloma je statistično značilna z $\alpha = 0,076$.

Metodologija ocenjevanja velikosti superpopulacije na vzorčnih območjih (stran 28)

Število medvedov v posameznem vzorčenju smo ocenjevali z metodami ulova – označevanja – ponovnega ulova (Capture-Mark-Recapture, CMR). CMR modeliranje smo opravili v računalniškem programu MARK.

Izbiro CMR (Capture-Mark-Recapture) modelov smo prilagajali vzorčenju. Za vsako vzorčenje smo naredili nabor modelov in ocenili njihove parametre po metodi največjega verjetja (Maximum Likelihood, ML). Modele smo razvrstili po Akaikovem informacijskem kriteriju (AICc) od najnižjega proti najvišjemu. Kjer je bilo primerno, smo za dokončno oceno realnih parametrov uporabljali povprečenje modelov z uporabo Akaikovih uteži, ki obtežijo ocene parametrov posameznega modela s podporo, ki jo ima model v podatkih.

Uporabljali smo tri zelo različne načine modeliranja: Schwartz-Arnsenovo parametrizacijo Jolly-Seberjevega modela (POPAN) za odprte populacije, Hugginsov model za zaprte populacije in Pollockov »Robust design« model (slika 7), kjer so podatki to dovoljevali. Stopnjo ujemanja (goodness of fit, GoF) smo testirali po bootstrap metodi in, kjer je bilo mogoče, po metodi median c-hat.

Dobljene ocene številčnosti so ocene za **superpopulacijo**, torej za živali, ki se lahko zadržujejo tudi na širšem območju, kot je samo območje vzorčenja.

Metoda izračuna populacijske gostote (stran 30)

Razvili in opisali smo novo metodo za določanje populacijske gostote iz podatkov o velikosti superpopulacije in razdalj med lokacijami najdenih neinvazivnih vzorcev. Pripravljamo izviren znanstveni članek, v katerem metodo opisujemo.

Rezultati individualne prepoznavne osebkov iz neinvazivnih vzorcev (stran 33)

Na obeh vzorčnih površinah smo v celotni študiji nabrali 469 vzorcev primernih za genetiko, od katerih smo jih 373 uspešno genotipizirali (glej 8.2, stran 25). V neinvazivnih vzorcih smo "ulovili" 140 različnih živali (tabela 11), od tega imamo za 92 (65,71%) po dva ali več vzorcev. Dva analizirana neinvazivna vzorca sta najdena izven vzorčnih območij. Od "označenih" živali jih je bilo v Sloveniji do konca leta 2006 odstreljenih 31, štiri pa na Hrvaškem (Ivna Kocijan, neobjavljeni podatki). Večina tkivnih vzorcev, ki so jih hrvaški kolegi do zdaj analizirali, je iz Like in območij Gorskega Kotarja, ki so razmeroma daleč od naših območij vzorčenja, zato je tako nizek delež vzorcev pri nas označenih medvedov na Hrvaškem pričakovan. Medvedi, ki smo jih "označili" z genetskimi oznakami, so bili odvzeti iz populacije po praktično celotnem centralnem območju medveda v Sloveniji. Prostorska razporeditev vzorcev je prikazana na strani 34 (slika 8).

tabela 11: Število različnih medvedov, ki smo jih našli v neinvazivnih vzorčenjih in prehajanje istih živali med vzorčenji. Prehajanja živali med obema območji vzorčenja nismo opazili. Za dodatni dve živali od katerih smo analizirali iztrebka vzorci niso bili najdeni na območjih organiziranih vzorčenj. S1a = Snežnik, pomlad/poletje 04, S1b = Snežnik, poletje jesen 04; S2 = Snežnik, poletje/jesen 05; G1 = pomlad 04; G2 = jesen 04.

območje "Snežnik"								območje "Glažuta"			
vzorčenje	S1a		S1b		S2				G1	G2	
S1a	40							G1	30		
S1b	19		40					G2	16		44
S2	14		13		38			-	-	-	
80 različnih živali								58 različnih živali			
skupaj snežnik + glažuta = 138 različnih živali											

Ocena številčnosti superpopulacij in populacijskih gostot za obe vzorčni območji (LPN Jelen – Snežnik, vzorčno območje »Snežnik« stran 39; vzorčno območje »Glažuta« stran 41)

Čeprav je bilo na **Snežniku** vzorčenje kontinuirano, so se, verjetno kot posledica razporeditve dela v lovišču, izoblikovala tri jasna primarna vzorčenja, ki smo jih poimenovali S1a (pomlad/poletje 2004), S1b (poletje/jesen 2004) in S2 (poletje/jesen 2005) (slika 9). Precej živali iz posameznega vzorčenja smo ulovili tudi v vzorčenjih, ki so sledila (tabela 12).

Pri testih zaprtosti populacije se je izkazalo, da se populacija v vzorčenju S1a obnaša kot zaprta, v S1b pa kot odprta. V vzorčenju S2 se populacija obnaša kot zaprta, vendar samo, če odstranimo prvi sekundarni interval. Uporabili smo vse tri modele, opisane pri metodah (glej 10.1, stran 28). Testi stopnje ujemanja (GoF) kažejo, da so modeli primerni za naše podatke ($c\text{-hat} < 2$).

Tabela 13 prikazuje rezultate CMR modeliranja. Hugginsov model je pravzaprav primeren samo za vzorčenje S1a, kjer se populacija obnaša kot zaprta, za ostali dve vzorčeni pa je manj primeren. Sicer pa rezultati tega modela za celotno število živali ne odstopajo znatno od rezultatov dobljenih z ostalima dvema načinoma modeliranja, tako da lahko sklepamo, da predpostavka o zaprtosti populacije v nobenem vzorčenju ni močno kršena.

tabela 13: Rezultati CMR modeliranja za posamezna vzorčenja na vzorčnem območju »Snežnik« (LPN Jelen). POPAN = Schwarz - Arnasonov JS model za odprte populacije, Huggins = Hugginsov model za zaprte populacije; RD = Pollockov Robust Design model (glej 10.1, stran 28). Ocene parametrov so znotraj seta modelov povprečene z Akaikovimi utežmi glede na podporo, ki jo ima posamezen model v podatkih.

vzročenje		S1a	S1b	S2
trajanje vzorčenja(dni)		47	44	58
število vzorcev		57	64	71
odlovljenih živali		35	39	38
samic		19	24	19
samcev		16	15	19
zaprtost populacije		DA	NE	NE*
POPAN	N(samci)	31	30	31
	SE(Nsamci)	6,350	4,055	6,131
	N(samice)	31	31	30
	SE(Nsamice)	6,289	4,087	6,131
	N(skupaj)	62	61	61
	SE(skupaj)	8,937	5,757	8,671
Huggins	N(samci)	31	23	34
	SE(Nsamci)	9,518	4,789	8,793
	N(samice)	31	38	26
	SE(Nsamice)	6,781	7,216	4,013
	N(skupaj)	62	61	60
	SE(skupaj)	11,687	8,661	9,665
RD	N(samci)	29	29	29
	SE(Nsamci)	2,52	2,52	2,522
	N(samice)	31	31	31
	SE(Nsamice)	2,67	2,676	2,676
	N(skupaj)	60	60	60
	SE(skupaj)	3,671	3,676	3,677

Rezultati vseh treh modelov so zelo podobni. Največja verjetnost kršenja predpostavk je pri Hugginsovem modelu, ki predvideva zaprtost populacije. »Robust Design« model (tabela 14) od vseh modelov, ki smo jih uporabljali, najbolj izkorišča podatke, tako da so njegovi rezultati po pričakovanju najboljši. Ugotovimo lahko, da smo dobili dobro oceno velikosti superpopulacije medvedov na vzorčenem območju z ozkim intervalom zaupanja, ki se med leti 2004 in 2005 ni bistveno spreminjala: 60 medvedov, s 95% intervalom zaupanja od 53 do 67 medvedov.

Iz opaženih razdalj med lokacijami vzorcev istih osebkov znotraj časovnega okna 64 dni smo ocenili $P(d)$ (glej 10.1.2, stran 30) za samce, samice in za oba spola skupaj. Modelirali smo probabilistične površine za samce, za samice in za oba spola skupaj ter izračunali populacijsko gostoto (slika 11). Ker je ocena številčnosti superpopulacije v vseh treh vzorčenjih praktično enaka (tabela 13), smo podali eno oceno za vsa tri vzorčenja (tabela 16). Rezultati skupne ocene gostote za oba spola so zelo podobni ne glede na to ali smo prispevno površino modelirali za vsak spol posebej ali za oba spola skupaj.

Na vzorčnem območju **Glažuta**, kjer smo vzorčili raziskovalci z Biotehniške fakultete in prostovoljci, smo opravili dve intenzivni vzorčenji pomladi/poleti in jeseni 2004. Prostorska razporeditev vzorcev je prikazana na strani 41 (slika 12), časovna pa na strani 42 (slika 13).

Proces odlova, označevanja in ponovnega odlova smo poskusili modelirati s Hugginsovimi modelom za zaprte populacije in Schwarz – Aranasonovo parametrizacijo JS modela (POPAN) (glej stran 28).

Pri drugem vzorčenju na Glažuti nam ni uspelo zgraditi uporabnega modela. Vse kaže, da je bila prisotna močna individualna heterogenost ulovljivosti živali, tako da so testi GoF pokazali, da so modeli za odprte populacije neuporabni. Modeli za odprte populacije, ki bi vključevali individualno heterogenost ulovljivosti, še niso razviti. Populacija je bila sodeč po testih na zaprtost očitno odprta, tako da so bili modeli za zaprte populacije prav tako neuporabni. Zaradi tega uporabnega rezultata ocene številčnosti populacije in populacijske gostote v tem vzorčenju nismo dobili.

V prvem vzorčenju na Glažuti se je populacija obnašala kot zaprta populacija. Modela, kjer bi posebej modelirali samce in samice, nismo mogli prilagoditi podatkom, zato smo oba spola modelirali skupaj in dobili uporabne rezultate velikosti superpopulacije.

Rezultati ocen velikosti superpopulacije in populacijske gostote za obe območji so povzeti v tabeli 20. Treba je poudariti, da je **populacijska gostota biološko smiselno ocenjena izključno za poligone gozda** in ne za celoten prostor ter jo je potrebno tako razumeti.

tabela 20: Rezultati ocene številčnosti superpopulacije in populacijskih gostot po vzorčnih območjih; primerjava ocene spolne strukture iz neinvazivnih genetskih vzorcev in ocene spolne strukture iz razmerja populacijskih gostot.

vzorčna območja	Snežnik			Glažuta
	samice	samci	samci+samice	samci + samice
prispevna površina superpopulacije($A_{superpop}$)	445,95	566,68	474,21	336,75
SE ($A_{superpop}$)	6,53	30,35	8,82	8,82
število živali v superpopulaciji (N)	31	29	60	39
SE (N)	2,68	2,57	3,71	5,85
95% CI max	36	34	67	51
95% CI min	26	24	53	29
gostota (medvedov / 100 km² gozda)	7,02	5,17	12,75	11,65
SE (gostota)	0,61	0,53	0,82	1,77
95% CI max	8,22	6,22	14,34	15,12
95% CI min	5,82	4,12	11,15	8,17
gostota samci + samice (medvedov/100 km ² gozda)	Σ ocen po spolu: 12,19		12,75	11,65
	samice	samci		
spolna struktura iz neinvazivnega vzorčenja	56,9%	43,1%		
spolna struktura iz razmerja populacijskih gostot	57,58%	42,42%		

V študiji nam je uspelo z veliko zanesljivostjo in ozkim intervalom zaupanja oceniti velikost superpopulacije na dveh neodvisnih vzorčnih območjih z dvema različnim terenskima ekipama v vsega skupaj štirih vzorčenjih. Pri tem smo uporabljali več pristopov k modeliranju številčnosti superpopulacije in razvili popolnoma nov pristop ocenjevanja populacijske gostote s pomočjo lokacij neinvazivnih vzorcev. Pri tem se rezultati med seboj komplementarno dopolnjujejo in potrjujejo. Iz spolno specifičnih podatkov o gostoti smo izračunali tudi spolno strukturo za območje Snežnika (tabela 20), ki se odlično ujema s spolno strukturo dobljeno po popolnoma drugi poti neposredno iz spolnega razmerja živali odlovljenih v neinvazivnih vzorcih.

Ocena številčnosti medvedov v širši habitatni krpi, ki zajema območji vzorčenja (stran 44)

Ocene gostote populacije ne moremo širiti daleč izven območij vzorčenja, ker lahko zagrešimo zelo grobo napako, saj bi morali narediti nerealistično predpostavko, da so gostote po celotnem območju medveda v Sloveniji enake. Vendar pa lahko s podatki o gostoti ocenimo številčnost populacije v habitatnih krpah, v katerih ležita naši vzorčni območji (slika 15).

tabela 19: Izračun števila medvedov za območje Snežnika, Javornikov, Velike gore in Stojne leta 2004 (2005).

	km2	ha	%
celotna površina	1285,76	128576	100,0%
površina gozda	997,41	99741	77,6%
populacijska gostota (<i>D</i>)	12,48 medvedov / 100 km2 gozda		
SE(<i>D</i>)	1,07 medveda / 100 km2 gozda		
N	125 medvedov		
SE(<i>N</i>)	10,69 medvedov		
95% CI min	104 medvedov		
95% CI max	145 medvedov		

Vzorčili smo v treh letnih časih, dveh koledarskih letih in na dveh različnih območjih z različnimi terenskimi ekipami ter dobili zelo podobne ocene populacijske gostote. Celotno območje, za katero menimo, da lahko ocenimo številčnost, spada v prispevno območje vzorčenja. Območje je omejeno s poseljenimi dolinami in magistralnimi cestami, kar najverjetneje nekoliko poveča njegovo zaprtost. Zaradi navedenega se zdi predpostavka o enakomerni gostoti v tem območju utemeljena, kar nam omogoči oceno števila medvedov, ki so tam živeli leta 2004. Razmeroma dobro oceno velikosti superpopulacije nekoliko »pokvari« dodana variabilnost prispevne površine. Ta vpliv je odvisen od velikosti območij vzorčenja in postane pri velikem območju skoraj zanemarljiv. ANOVA test kaže, da so gostote enake ($f = 0,006$; $p = 0,999$), tako da smo izračunali povprečno gostoto in združili variance vseh vzorčenj, kjer smo kot stopnje prostosti posameznega vzorčenja uporabili število živali dejansko ujetih v vsakem vzorčenju.

Glede na podatke iz območja »Snežnik« v letu 2005 lahko sklepamo tudi, da se do leta 2005 gostota in s tem tudi številčnost najverjetneje nista bistveno spremenili. Rezultate ocene številčnosti povzema tabela 19.

Simulacije in analiza potrebnega truda za študijo celotne slovenske populacije medvedov z neinvazivnimi genetskimi vzorci (stran 47)

Pomemben del načrtovanja študije ocene številčnosti s pomočjo neinvazivnega vzorčenja je načrt vzorčenja, za katerega pa je spet ključni podatek število vzorcev, ki jih potrebujemo, da lahko populacijo ocenimo z želenim intervalom zaupanja. V programu MARK smo simulirali različne scenarije števila nabranih vzorcev in ugotavljali intervale zaupanja, ki jih lahko pričakujemo. V modelih smo simulirali 600 različnih živali, kar je glede na naše rezultate optimistična zgornja meja številčnosti populacije. Pri parametrizaciji simulacij smo bili previdni in smo uporabili znatno nižjo vrednost uspešnosti genotipizacij od uspešnosti v pilotski študiji. Simulirali smo analizo 600, 800 in 1000 delujočih vzorcev. Za vsako število vzorcev smo naredili po 1000 iteracij (tabela 21). Simulacije kažejo, da bi že s 600 delujočimi vzorci oziroma 857 vzorci skupno prišli do uporabne ocene velikosti populacije. Lahko pa pride do heterogenosti pri neenakomernem vzorčenju, ki lahko pomembno vpliva na rezultat. Najboljši način za zmanjševanje heterogenosti je povečanje ulovljivosti, to pomeni števila vzorcev, tako da bi morali v takšni širši študiji stremeti za vsaj 1100 do 1200 vzorci, saj bi s tem tudi v primeru individualne heterogenosti ulovljivosti zagotovili robustno oceno. V Sloveniji imamo visoko gostoto medvedov, dobro organizirane lovce in gozdarsko službo ter gosto prepleteno mrežo gozdnih cest, ki omogoča dostop do praktično vsakega dela medvedovega habitata. Zato ocenjujemo, da bi bila takšna širša študija ob zadostnem interesu omenjenih organizacij izvedljiva.

4. ORIS POTEKA PROJEKTA IN MEDNARODNO SODELOVANJE

Čeprav smo dobili financiranje in zaposlili raziskovalca šele avgusta 2004, smo prve priprave za izvajanje projekta začeli že v aprilu in maju tistega leta. V tem času smo pripravili načrt študije in začeli z zbiranjem neinvazivnih vzorcev iztrebkov. Zbiranje vzorcev tkiv za genetiko v sodelovanju z Zavodom za gozdove Slovenije je bilo takrat že utečeno, saj smo z njim začeli že leta 2003. Z LPN Jelen Snežnik, ki deluje v okviru ZGS, smo se dogovorili za pomoč pri terenskem vzorčenju neinvazivnih vzorcev. Povezali smo se z ekipo prof. Đura Hubera iz Veterinarske fakultete Univerze v Zagrebu, ki se je prav tako pripravljala na začetek podobne študije in se srečali z dr. Evo Bellemain, ki je s podobnimi metodami preučevala populacijo medvedov na Švedskem. Skupaj smo uskladili metodologijo, s čimer smo zagotovili primerljivost in prenosljivost rezultatov ter se dogovorili za sodelovanje tudi v bodoče. V letu 2005 so se nam javili tudi raziskovalci z Univerze v Vidmu, ki so se začeli ukvarjati z genetiko medveda v obmejnem območju s Slovenijo v sosednji Italiji. Strinjali so se, da bodo uporabljali isto metodologijo genotipizacije kot raziskovalci v Sloveniji in na Hrvaškem, kar je primerljivost rezultatov razširilo še na njihovo območje in zdaj obsega tri države.

V letu 2004 smo izvedli dve intenzivni vzorčenji neinvazivnih vzorcev na območju Glažuta (med Ribnico, Loškim potokom in Kočevsko reko). Vzoredno s tem je potekalo vzorčenje s pomočjo poklicnih lovcev Zavoda za gozdove Slovenije iz LPN Jelen – Snežnik. Vzorčenje v LPN Jelen – Snežnik smo nadaljevali tudi v letu 2005.

Z laboratorijskimi analizami smo začeli konec leta 2004 in sicer najprej z analizami tkivnih vzorcev. Tako smo optimizirali PCR reakcije in spoznali mikrosatelitske markerje, s katerimi smo nameravali delati, kar je nujno potrebno za analitiko neinvazivnih vzorcev, v katerih je DNA bistveno slabše kvalitete in ki so zato mnogo zahtevnejši. Tako smo v prvi polovici 2005 analizirali vse vzorce tkiv, ki smo jih imeli takrat na voljo, s paletto sedmih markerjev za neinvazivne vzorce. V tem času smo organizirali tudi laboratorij za ekstrakcijo DNA iz neinvazivnih vzorcev. Ta mora biti ločen od drugih genetskih laboratorijev in v njem se je potrebno držati strogih protokolov za preprečevanje kontaminacije. Do konca leta 2005 smo opravili ekstrakcijo DNA iz vseh zbranih vzorcev iztrebkov in analizirali prvih 108 neinvazivnih vzorcev iztrebkov iz prvega vzorčenja na Glažuti v letu 2004.

Že takrat se je začel naš takratni sekvenator, ključni laboratorijski instrument za genetske analize, kazati kot nezadosten in znatno prepočasn za zahtevne analize neinvazivnega materiala. Zato smo konec leta 2005 navezali stik s skupino prof. dr. Lisette Waits z univerze »University of Idaho« iz ZDA, ki je ena izmed vodilnih raziskovalnih skupin na področju neinvazivnega vzorčenja in varstvene genetike v svetu. Med majem in junijem 2006 je Tomaž Skrbinšek opravil dvomesečni študijski obisk v njihovem laboratoriju v mestu Moscow v zvezni državi Idaho. Laboratorij je bil bistveno bolje opremljen od našega, tako da smo tam naredili tudi velik del laboratorijskih analiz. Paleti genetskih markerjev smo dodali še sedem polimorfnihi mikrosatelitskih markerjev, ki so bistveno izboljšali resolucijo pri študijah populacijske genetike naših medvedov. Pomembno je bilo tudi, da smo pridobili izkušnje in laboratorijske veščine za delo z neinvazivnimi vzorci, saj se delo s takšnim materialom precej razlikuje od dela z »navadnimi« genetskimi vzorci. Na splošno je bil študijski obisk v ZDA zelo uspešen in se razvija v trajno znanstveno sodelovanje z enim najboljših laboratorijev s tega področja na svetu. Obisku je sledilo intenzivno obdobje analiz podatkov, ki s tem poročilom še zdaleč ni končano, saj količina in kvaliteta podatkov omogočata še dodatne analize, veliko materiala pa je zelo zanimivega in ga bomo poskusili objaviti kot izvirne znanstvene članke.

5. VZORČENJE, IZOLACIJA DNA IN GENOTIPIZACIJA TKIV

5.1. Metode

Tkiva medvedov od leta 2003 dalje sistematično zbiramo v sodelovanju z Zavodom za gozdove Slovenije. Vzorce hranimo na -20°C v 99% etanolu in jih evidentiramo v relacijski bazi podatkov skupaj z njihovimi genotipi, ko opravimo analize.

Iz tkiv izoliramo DNA z izolacijskim kitom "GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit". DNA smo izolirali iz vseh zbranih vzorcev tkiv in jo hranimo na -20°C. Tako shranjena DNA je uporabna več let.

Izolirano DNA smo amplificirali na trinajstih polimorfnih mikrosatelitskih lokusih v PCR reakciji. Vsi lokusi imajo (GT)_n dinukleotidno repetitivno sekvenco. Lokusi G10B, G10C, G10D, G10J, G10L, G10M, G10P, G10X so klonirani iz genetske knjižnice črnega medveda (Paetkau in Strobeck 1994; Paetkau s sod. 1995). Lokusi UarMu10, UarMu23, UarMu50, UarMu51, UarMu59 so klonirani iz genetske knjižnice rjavega medveda (Taberlet s sod. 1997; Bellemain in Taberlet 2004). Amplificirali smo tudi SRY lokus vezan na spolni (Y) kromosom za določanje spola (Bellemain in Taberlet 2004). Za PCR amplifikacijo smo uporabljali Qiagen Multiplex PCR kit in hkrati amplificirali od dva do pet lokusov v isti reakciji, s čimer smo znatno pospešili in pocenili analitiko. Dolžine alelov smo določali na kapilarnem sekvenatorju ABI 3130xl oz. ABI 3130 (Applied Biosystems), kjer smo spet naenkrat analizirali od dva do sedem lokusov. Na začetku smo vzorce analizirali s starejšim gelskim sekvenatorjem ALF Express II (Amersham Biotech), vendar smo kasneje te analize ponovili s kapilarnim sekvenatorjem, ki je bistveno boljši in hitrejši. Vsako nezanesljivo genotipizacijo smo ponovili. Da bi ocenili napake pri genotipizaciji, smo »slepo« ponovili 10% vseh genotipizacij, kot priporočajo (Bonin s sod. 2004).

5.2. Rezultati

S v sodelovanju z ZGS smo zbrali večino (86,8 %) tkivnih vzorcev medvedov, ki so bili v letih od 2003 do 2006 v Sloveniji odvzeti iz populacije (tabela 1).

tabela 1: Vzorci zbrani za genetiko v letih 2004 – 2006 in število odvzetih medvedov v Sloveniji.

leto	samci /odvzem		samice /odvzem		neznano /odvzem		skupaj /odvzem	
2003	28	45	23	26	0	1	51	72
2004	49	49	28	29	0	2	77	80
2005	42	50	42	45	0	0	84	95
2006	60	64	50	59	1	2	111	125
skupaj	179	208	143	159	1	5	323	372

Še en dodatni vzorec smo imeli iz leta 1999, tako da je vseh vzorcev 324. Iz vseh vzorcev smo izolirali DNA. Tkiva, ki so obstojnejša od izolirane DNA, hranimo konzervirana v »genetski banki« in bodo pomemben vir znanja o naši medvedji populaciji tudi v bodoče.

Ugotovili smo popolne genotipe za vseh 235 tkivnih vzorcev, ki smo jih imeli zbrane do junija 2006, na vseh trinajstih izbranih lokusih. En vzorec imamo genotipiziran na 12 lokusih. Preostalih 88 vzorcev, ki smo jih dobili do konca leta 2006, smo genotipizirali na petih od šestih lokusov, ki jih uporabljamo za prepoznavanje osebkov iz neinvazivnih vzorcev. Ker na nov kapilarni sekvenator še čakamo (ARRS Paket opreme 13), smo te vzorce analizirali s sekvenatorjem ABI 3130 na inštitutu Rudjer Bošković v Zagrebu v sodelovanju s skupino z Veterinarske fakultete Univerze v Zagrebu. Med genotipi iz »slepov« ponovljenih vzorcev in genotipi iz analiz nismo našli nobenih odstopanj, zato lahko sklepamo, da je napak v genotipih zelo malo.

6. GENSKA DIVERZITETA IN POPULACIJSKO – GENETSKE ZNAČILNOSTI POPULACIJE RJAVEGA MEDVEDA V SEVERNIH DINARIDIH

6.1. Metode

Za ocene populacijsko-genetskih parametrov naše populacije medvedov smo uporabili genotipe tkivnih vzorcev odvzetih medvedov. Parametre smo ocenili s pomočjo programov Microsatellite Analyser (MSA) (Dieringer in Schlotterer 2003) in Arlequin (Excoffier s sod. 2005).

6.2. Rezultati

Za analize smo uporabili vzorce tkiv 236 medvedov, kar je za ogroženo živalsko vrsto dokaj velik vzorec. Tkiva so genotipizirana na 13 polimorfni mikrosatelitskih lokusih. Standardni indeksi genske diverzitete so povzeti v [tabela 2](#).

tabela 2: Parametri genske diverzitete populacije medvedov v severnih Dinaridih za 13 lokusov, N=236. Ho = opažena heterozigotnost, He = pričakovana heterozigotnost, G-W = Garza—Williamsonov indeks.

Lokus	štev. efekt. št.		Ho	He	min. alel	maks. alel	razpon alelov [(GT) _n]	G-W
	alelov	alelov						
G10B	8	3,523	0,727	0,718	132	154	12	0,615
G10C	8	3,824	0,722	0,740	91	109	10	0,727
G10D	6	4,415	0,781	0,775	168	182	8	0,667
G10J	5	3,191	0,624	0,688	78	92	8	0,556
G10L	4	2,704	0,662	0,632	153	163	6	0,571
G10M	6	3,940	0,709	0,748	204	218	8	0,667
G10P	8	4,855	0,786	0,796	147	175	15	0,500
G10X	10	6,348	0,855	0,844	132	154	12	0,769
Mu10	4	3,136	0,675	0,683	112	126	8	0,444
Mu23	8	4,965	0,786	0,800	142	156	10	0,727
Mu50	7	5,077	0,765	0,805	79	103	13	0,500
Mu51	4	2,510	0,551	0,603	115	125	6	0,571
Mu59	8	6,770	0,902	0,854	97	121	13	0,571
povprečje	6,615	4,251	0,734	0,745	-	-	9,923	0,607
s.d.	1,938	1,320	0,094	0,078	-	-	2,871	0,099

O informativnosti posameznega lokusa nam največ pove efektivno število alelov (Frankham s sod. 2002), ki celotno število alelov korigira glede na njihovo pogostost. S 6,6 alelov na lokus oz. 4,25 efektivnih alelov na lokus so analizirani lokusi razmeroma polimorfni. Zanimivi so Garza – Williamsonovi indeksi (Garza in Williamson 2001), ki nakazujejo možnost ozkega grla populacije. Ti indeksi so okrog 1 v trajno stabilnih velikih populacijah, v majhnih populacijah pa so nižji. Rezultati ustrezajo zapisom o zgodovini dinarske populacije medvedov, ki naj bi bila v začetku 20. stoletja zdesetkana na borih 30 - 40 osebkov (Simonič 1992), vendar lahko do takšne genetske slike pripeljejo tudi drugi populacijski dogodki, tako da ozkega grla s to metodo ne moremo potrditi.

Testirali smo tudi ali so aleli v Hardy-Weinbergovem ravnovesju. Izvedli smo Fisherjev eksaktni test s 100.000 koraki v Markovski verigi in s po 1000 dememorizacijskimi koraki ([tabela 3](#)).

tabela 3: Rezultati testa Hardy – Weinbergovega ravnovesja. H_o = opažena heterozigotnost, H_e = pričakovana heterozigotnost. Lokusi, ki kažejo znake odstopanja, so podčrtani.

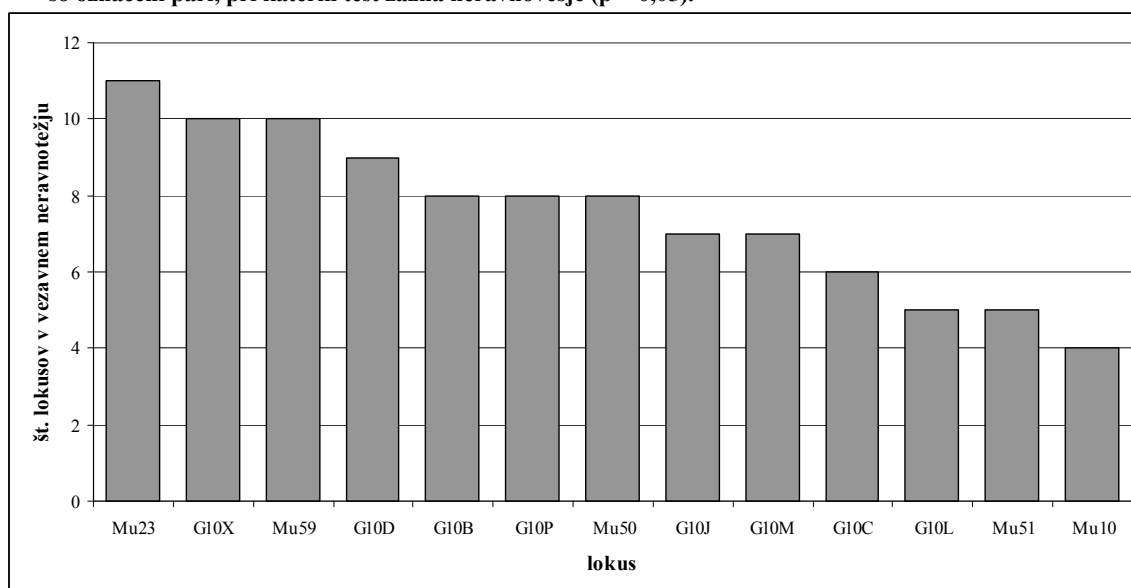
Lokus	H_o	H_e	P	s.d.
G10B	0.727	0.718	0.201	0.001
<u>G10C</u>	<u>0.722</u>	<u>0.740</u>	<u>0.057</u>	<u>0.001</u>
G10D	0.781	0.775	0.633	0.001
G10J	0.624	0.688	0.178	0.001
G10L	0.662	0.632	0.239	0.001
G10M	0.709	0.748	0.315	0.001
G10P	0.786	0.796	0.416	0.002
<u>G10X</u>	<u>0.855</u>	<u>0.844</u>	<u>0.058</u>	<u>0.001</u>
Mu10	0.675	0.683	0.963	0.001
Mu23	0.786	0.800	0.564	0.001
Mu50	0.765	0.805	0.906	0.001
Mu51	0.551	0.603	0.193	0.001
Mu59	0.902	0.854	0.297	0.001

Test preizkusi hipotezo H_0 da sta opažena in pričakovana heterozigotnost enaki, kar se pri Hardy – Weinbergovem ravnovesju pričakuje. Dva lokusa kažeta odstopanje, vendar je razlika med H_e in H_o razmeroma majhna.

Zanimivi so testi vezavnega neravnovesja (linkage disequilibrium). Vezavno neravnovesje smo testirali v programu Arlequin (Raymond in Rousset 1994) z 10.000 koraki v Markovski verigi in 1000 dememorizacijskimi koraki. Vsi lokusi v naši populaciji so v vezavnem neravnovesju z več drugimi lokusi. ($p < 0,05$; [slika 1](#), [graf 1](#)).

Lokus	G10B	G10C	G10D	G10J	G10L	G10M	G10P	G10X	Mu10	Mu23	Mu50	Mu51	Mu59
G10B	*	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+
G10C	+	*	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-
G10D	+	+	*	+	+	-	+	+	-	+	+	-	+
G10J	-	-	+	*	-	-	+	+	+	+	-	+	+
G10L	-	-	+	-	*	+	-	-	-	+	+	-	+
G10M	+	-	-	-	+	*	-	+	+	+	+	-	+
G10P	+	+	+	+	-	-	*	+	+	+	-	-	+
G10X	+	+	+	+	-	+	+	*	-	+	+	+	+
Mu10	-	-	-	+	-	+	+	-	*	+	-	-	-
Mu23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	-	+
Mu50	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	*	+	+
Mu51	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	*	+
Mu59	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	*

slika 1: Vezavno neravnovesje med pari mikrosatelitskih lokusov pri medvedih, odstreljenih v Sloveniji. S "+" so označeni pari, pri katerih test zazna neravnovesje ($p < 0,05$).



graf 1: Število lokusov, s katerimi je posamezni lokus v vezavnem neravnovesju ($p < 0,05$).

Mikrosatelitski lokusi, ki jih uporabljamo, bi se morali v veliki populaciji, ki se pari naključno, praviloma dedovati nevezano. Pri populacijah, ki imajo nizko efektivno velikost populacije N_e , prihaja do parjenja osebkov, ki so med sabo razmeroma ozko sorodni, zaradi česar se vezavno ravnovesje ne more vzpostaviti. Efektivna velikost populacije, ki jo lahko interpretiramo kot število živali, ki se v idealizirani populaciji med seboj pari, je pomemben parameter viabilnosti populacije. Na podlagi razmeroma visoke stopnje vezavnega neravnovesja med lokusi lahko sklepamo, da ima naša populacija medvedov razmeroma majhno efektivno velikost. Parameter bomo lahko z našimi podatki ocenili, ko bodo znani rezultati določanja starosti iz izbruskov zob, kar naj bi bilo kmalu (podatki Zavoda za Gozdove Slovenije).

7. ANALIZA NEINVAZIVNIH VZORCEV

Z neinvazivno genetiko imamo v mislih genetske študije narejene s pomočjo neinvazivnega genetskega vzorčenja, pri katerem ne pridemo v neposreden stik s preučevanim osebkom. Kot vir osebne DNA uporabimo material, ki ga je žival pustila v okolju - največkrat iztrebek, dlako ali perje. Metode so podobne forenzičnim in so se v zadnjih letih močno uveljavile v molekularno ekoloških raziskavah ogroženih vrst in/ali vrst, ki živijo prikrito življenje v nizkih populacijskih gostotah.

7.1. Metode

Genetske analize neinvazivnega materiala so metodološko mnogo zahtevnejše od analiz »klasičnih« vzorcev tkiv. V neinvazivnem vzorcu je DNA izpostavljena škodljivim vplivom fizičnih in bioloških dejavnikov okolja in materiala samega (npr. sonca, dežja, prebavnih encimov in mikroorganizmov...). Takšna DNA je v zelo majhnih količinah in močno degradirana (Taberlet s sod. 1996; Taberlet s sod. 1997), zato je pri analizah potrebna posebna pazljivost.

7.1.1. Ureditev laboratorijev

Pri analizi neinvazivnih vzorcev je ključnega pomena zagotoviti, da visoko koncentrirana DNA iz tkivnih vzorcev ali PCR produktov ne more priti v stik z neinvazivnim materialom. Zaradi tega smo fizično popolnoma ločili »neinvazivni« laboratorij od laboratorijev, v katerih se opravlja PCR amplifikacija, sekvenciranje in ekstrakcija DNA iz tkivnih vzorcev. V neinvazivnem laboratoriju smo opravljali izključno ekstrakcijo DNA iz neinvazivnih vzorcev in pripravo prvostopenjskih PCR reakcij. Delovne površine v laboratoriju smo redno čistili s čistilnimi sredstvi, ki razgrajujejo DNA. Prav tako smo omejili tudi gibanje ljudi in materiala med neinvazivnim laboratorijem in drugimi genetskimi laboratoriji, tako da raziskovalec po vstopu v laboratorij s koncentrirano DNA ni imel več vstopa v neinvazivni laboratorij dokler se ni preoblekel in oprhal. Material, ki je bil odnesen iz neinvazivnega laboratorija v laboratorij s koncentrirano DNA, se v neinvazivni laboratorij ni smel več vrniti.

7.1.2. Izolacija DNA iz neinvazivnih vzorcev

DNA smo iz vzorcev iztrebkov izolirali izključno v »neinvazivnem« laboratoriju. Pri vseh kritičnih prenosih tekočin smo uporabljali nastavke za pipete z aerosolnimi barierami. Za izolacijo smo uporabljali Qiagen QIAmp DNA Stool Mini Kit. Izolacije smo delali v serijah po 23 vzorcev, vsaki seriji pa smo dodali negativno kontrolo. Negativna kontrola je šla skozi celoten postopek ekstrakcije, kasnejših PCR amplifikacij in analize s sekvencatorjem, enako kot vsi ostali vzorci. S tem smo imeli kontrolo potencialne kontaminacije, ki bi lahko nastala pri izolaciji DNA, pa tudi v kasnejših analizah.

7.1.3. Amplifikacija mikrosatelitskih lokusov iz neinvazivnih vzorcev

Za analitiko neinvazivnih vzorcev smo uporabljali paleta šestih mikrosatelitskih markerjev: G10L, UarMu10, UarMu23, UarMu50, UarMu51 in UarMu59. Za določanje spola smo uporabljali marker SRY. Primerji so nekoliko spremenjeni (po Bellemain in Taberlet 2004) in optimizirani za genotipizacijo neinvazivnih vzorcev.

Pri amplifikaciji smo uporabljali »polgnezdno« (semi-nested) PCR z multipleks preamplifikacijo (Bellemain in Taberlet 2004; Piggott s sod. 2004), ki znatno izboljša učinkovitost analitike. V prvostopenjski PCR (preamplifikacija) smo vse lokuse skupaj v eni reakciji amplificirali z neoznačenimi zunanjimi primerji. Uporabljali smo »touchdown« PCR protokol z 8 touchdown cikli in 21 cikli na optimalni temperaturi. Ta produkt smo nato uporabili kot osnovo za drugostopenjsko amplifikacijo, kjer smo ga ponovno amplificirali z notranjimi primerji, od katerih je bil po en primer v paru označen s fluorescentnim barvilom (NED, HEX, 6-FAM). Tudi v tej reakciji smo po več lokusov skupaj amplificirali v eni reakciji – Mu10 in Mu50; Mu23 in Mu59; Mu51, G10L in SRY. Amplifikacija je bila nadaljnjih 12 touchdown ciklov, ki jim je

sledilo 27 ciklov na optimalni temperaturi. Tako je bil dejansko vsak vzorec amplificiran približno 55 ciklov (v začetnih touchdown ciklih je amplifikacija zelo šibka). Reakcija je zelo občutljiva in lahko zazna že nekaj molekul iskane DNA, kar dodatno poudari potrebo po striktnih protokolih za preprečevanje kontaminacije.

Preizkušali smo več različnih sistemov PCR reagentov. Kot najboljši se je izkazal Qiagen Multiplex PCR kit, ki smo ga kasneje uporabljali skozi vso raziskavo.

Pripravo reakcij za preamplifikacijo smo opravili v neinvazivnem laboratoriju. Zaradi velike količine vzorcev in reakcij smo uvedli striktne protokole za preprečevanje zamešanja vzorcev. Vse reakcije smo naredili na PCR ploščah za 96 vzorcev. Alikvote DNA izolatov smo prenesli v 50 µL epruvete, ki smo jih pred pripravo PCR reakcije uredili v 8×12 stojalo z isto razporeditvijo kot na končni PCR plošči. Zaradi kontrole pravilnosti razporeditev vzorcev na plošči smo v začetku razporeditev zapisovali, kasneje pa smo začeli stojala rutinsko fotografirati ([slika 2](#)).



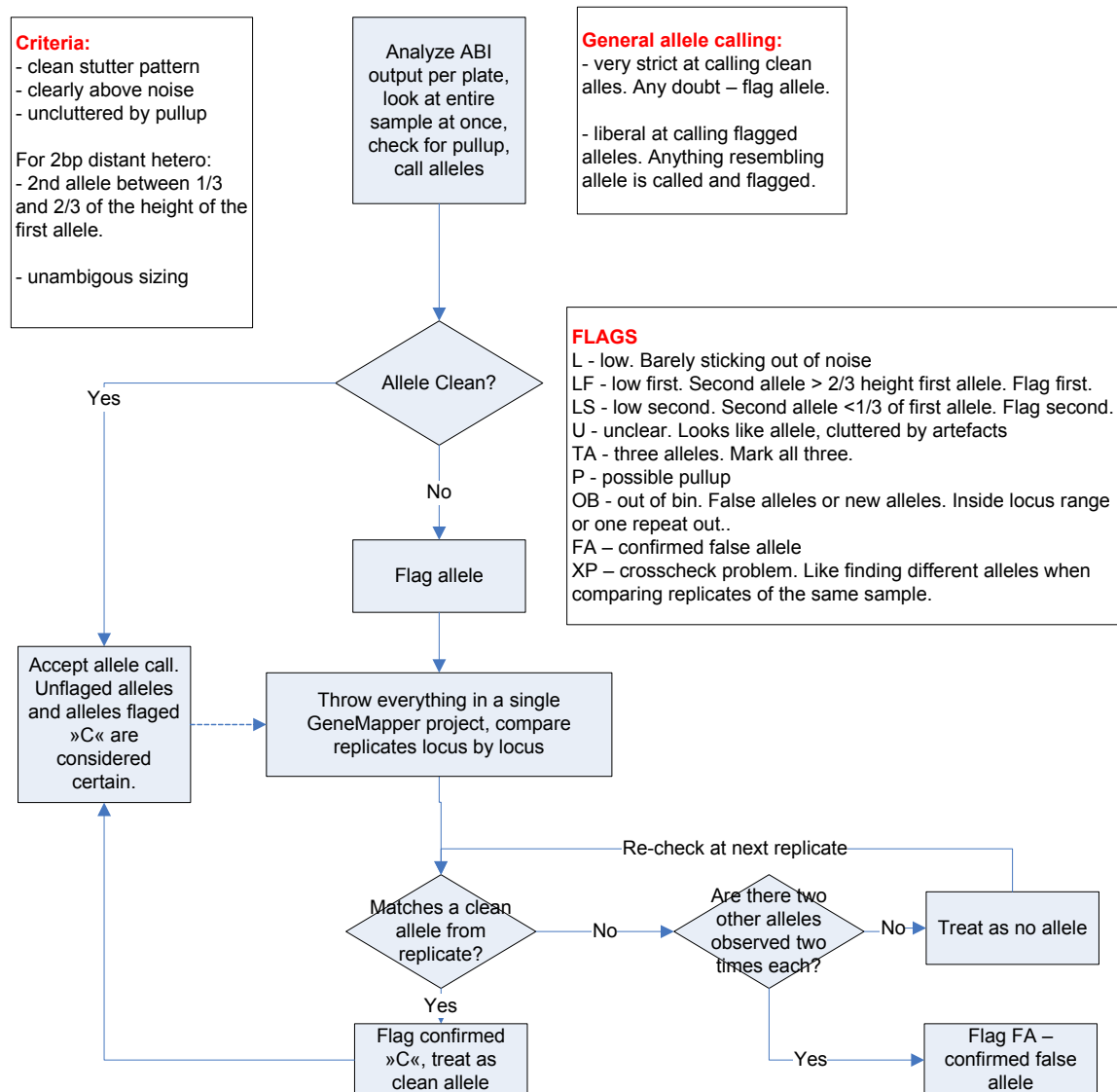
slika 2: Urejanje vzorcev za pripravo PCR reakcije.

Vse nadaljnje prenose tekočin smo delali z osemkanalno pipeto, kar je dodatno zmanjšalo verjetnost napak. Pri neinvazivnih vzorcih je za uspešno genotipizacijo potrebnih več amplifikacij. Pri ponovnih amplifikacijah smo vzorce na PCR ploščah drugače razporedili, tako da se napake zaradi zamenjave vzorcev ne bi mogle prenesti med amplifikacijami.

7.1.4. Določanje dolžine alelov, genotipizacija in zagotavljanje kakovosti genotipov

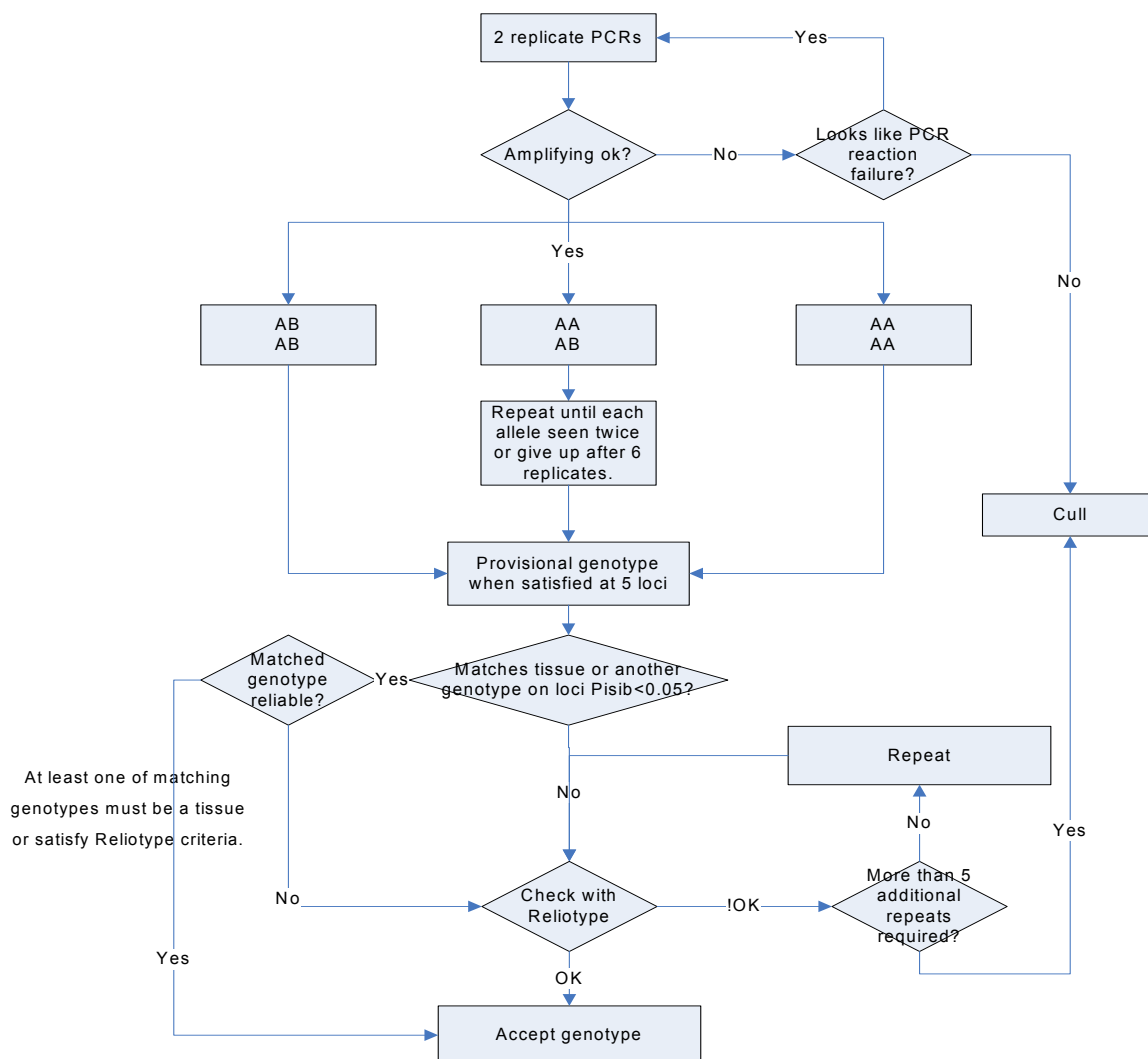
Dolžine alelov smo določali na kapilarnem sekvenatorju ABI 3130xl (Applied Biosystems). Ker smo poznali dolžine alelov iz tkiv, smo primerje označili z različnimi barvili tako, da smo lahko PCR produkte vseh lokusov preprosto zmešali in jih naenkrat analizirali v eni kapilari. Skupaj s PCR produkti smo dodali dolžinski standard GeneScan 350 ROX, s pomočjo katerega smo izmerili dolžino alelov.

Izpis sekvenatorja smo analizirali s programskim orodjem GeneMapper. Delo nam je močno poenostavilo dejstvo, da smo lokuse že dobro poznali iz analize tkiv, kjer so izpisi mnogo čistejši. Razvili smo pristop označevanja alelov, ki poveča učinkovitost genotipizacije. Glavna problema genotipizacije neinvazivnih vzorcev sta PCR artefakta izpad alelov (allelic dropout, ADO) in lažni aleli (false alleles, FA). Pogosto dobimo nezanesljiv izpis, ko se nam nek alel »zdi«, vendar vanj nismo prepričani – če so takšni aleli pravi, precenjujemo ADO in vnašamo napako v genotipizacijo, zaradi katere moramo opraviti več ponovitev celotnega postopka. Da bi se tega rešili, smo razvili algoritem označevanja in sprejemanja dvomljivih alelov ([slika 4](#)).



slika 3: Algoritem za sprejemanje in označevanje alelov v izpisu sekvenatorju v programu GeneMapper (v angleščini zaradi priprave znanstvenega članka).

Razvili smo tudi algoritem za sprejemanje genotipov (slika 4), ki pravzaprav nadgrajuje »multi-tube« pristop (Taberlet s sod. 1996). Pravzaprav gre za modifikacijo algoritma, ki so ga predlagali Frantz s sod. (2003) in Adams in Waits (2007). Za sprejemanje genotipa smo uporabljali metodo največjega verjetja (maximum likelihood), kot je implementirana v programu Reliotype (Miller s sod. 2002). Genotip smo sprejeli, če je bila verjetnost napake manjša od 0,02. Zaradi lažnih alelov smo postavili dodaten pogoj, da moramo vsak alel videti najmanj dvakrat. Dva genotipa iz različnih vzorcev smo sprejeli kot enaka, če sta bila identična na lokusih, ki dajo skupen PI_{sib} (verjetnost, da imata dva osebk iz istega legla enak genotip) manjši od 0,05 in da med njima ni nekompatibilnosti (da skupaj nimata na istem lokusu treh alelov).



slika 4: Algoritem za zagotavljanje zanesljivosti genotipizacije neinvazivnih vzorcev (v angleščini zaradi priprave znanstvenega članka).

Pogostnost posameznih PCR artefaktov smo dodatno ocenili s pomočjo programa Gimlet (Valiere 2002). Isti program smo skupaj s programom Genecap (Wilberg in Dreher 2004) uporabili tudi za primerjanje genotipov različnih vzorcev in iskanje enakih genotipov.

7.2. Rezultati

7.2.1. Uspešnost genotipizacije

Analizirali smo 471 vzorcev iztrebkov, zbranih v letih 2004 in 2005 (več o vzorčenju v 8, stran 23). Uspešnost genotipizacije se je med vzorčenji razlikovala (tabela 4).

tabela 4: Uspešnost genotipizacije vzorcev iztrebkov medvedov po vzorčenjih. Ocena starosti iztrebka je bila zabeležena za 88% iztrebkov. G1 = Glažuta pomlad 2004; G2 = Glažuta jesen 2004; S1 = Snežnik 2004; S2 = Snežnik 2005, izven = vzorci nabrani izven vzorčnih območij ($\chi^2 = 25,151$, $df = 4$, $p < 0,001$; vzorci izven niso zajeti v testu).

vzorčenje	G1	G2	S1	S2	izven	skupaj
skupaj vzorcev	110	113	161	85	2	471
delujočih vzorcev	69	89	136	75	2	371
% delujočih	62.7%	78.8%	84.5%	88.2%	100.0%	78.8%
povp. starost (dni)	1.7	2.5	1.5	1.7	-	1.8

Na terenu smo vizualno ocenjevali starost iztrebkov, ker smo predvidevali, da ta vpliva na verjetnost uspešne genotipizacije (tabela 5). Odnos je videti linearen, korelacija pa signifikantno negativna ($r = -0,949$; $p = 0,01$).

tabela 5: Uspešnost genotipizacije glede na ocenjeno starost iztrebka ($r = 0,949$; $p = 0,01$). Ocena starosti je bila zabeležena za 88% vzorcev.

starost (dni)	0	1	2	3	4-5	skupaj
skupaj	48	168	107	61	30	414
delujočih	45	138	84	48	18	333
delež	93.75%	82.14%	78.50%	78.69%	60.00%	80.4%

Uspešnost genotipizacije smo analizirali tudi po mesecih, v katerih so bili iztrebki nabrani. Uspešnost je bila znatno nižja v pomladanskih mesecih kot v drugih delih leta (tabela 6).

tabela 6: Uspešnost amplifikacije iztrebkov po mesecih ($\chi^2 = 18,528$, $df = 8$, $p < 0,018$; trije vzorci niso imeli natančno določenega datuma, zato smo jih izvzeli iz analize).

mesec	maj	jun	jul	avg	sept	okt	nov+dec	skupaj
število	46	102	53	52	118	70	27	468
delujočih	32	74	43	45	108	56	22	380
%	69.6%	72.5%	81.1%	86.5%	91.5%	80.0%	81.5%	81.2%
povp. starost (dni)	2.0	1.5	1.6	1.6	1.5	2.5	2.2	1.8

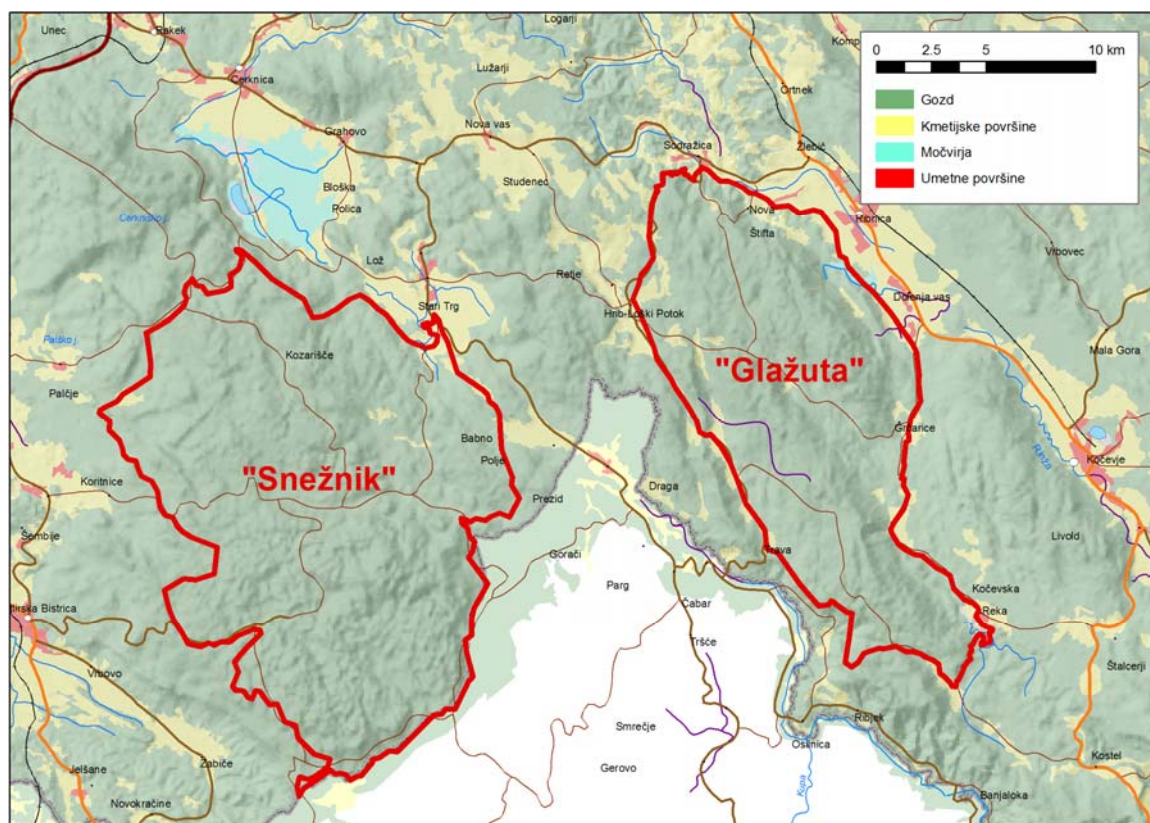
Vzroki za razlike niso popolnoma jasni in potrebujejo dodatne analize. So pa že drugi avtorji opazili, da je kvaliteta DNA v iztrebkih ob fizičnih dejavnikih odvisna tudi od prehrane živali (Murphy s sod. 2003), tako da obstaja možnost, da bi lahko bodisi specifična prehrana v maju in juniju ali specifične vremenske razmere negativno vplivale na uspešnost amplifikacije.

Na splošno je bila uspešnost genotipizacije podobna oz. višja kot v primerljivih študijah medvedov in drugih živalskih vrst po svetu (npr. Frantz s sod. 2003; Bellemain s sod. 2005)

8. NEINVAZIVNO GENETSKO VZORČENJE

8.1. Območji vzorčenja in organizacija vzorčenja

Vzorke smo nabirali v letih 2004 in 2005 na dveh vzorčnih površinah (slika 5). Prva vzorčna površina je območje med Ribnico, Loškim potokom in Kočevsko reko, veliko 170 km² (Glažuta). Druga vzorčna površina obsega LPN Jelen-Snežnik, med Cerkniškim jezerom, Starim trgom in Ilirsko Bistrico in je velika 270 km² (Snežnik).



slika 5: Območji vzorčenja neinvazivnih vzorcev.

Na vzorčni površini Glažuta smo vzorčili raziskovalci Biotehniške fakultete in prostovoljci. Na vzorčni površini Snežnik so vzorčili poklicni lovci LPN Jelen Snežnik, ki spada pod okrilje Zavoda za Gozdove Slovenije. Vzorčenje na tej površini je bilo kontinuirano med njihovimi rednimi obveznostmi v lovišču.

Pri vsakem vzorcu iztrebka medveda smo beležili naslednje podatke:

- datum in uro najdbe
- ime in priimek osebe, ki je vzorec našla
- koordinate najdenega iztrebka
- vizualno oceno starosti iztrebka
- vremenske razmere v času, ko je iztrebek predvidoma ležal v okolju
- opis mesta najdbe iztrebka
- opis vsebine iztrebka
- ocena velikosti iztrebka

Za vse sodelujoče smo pripravili predavanja, kjer smo predstavili cilje projekta in metodologijo. Razložili smo, kako se vizualno ocenjuje starost iztrebka in podali navodilo, naj za genetiko zbirajo samo vzorce, za katere ocenijo, da niso starejši kot pet dni. Vsak je dobil tudi knjižico z natančnimi navodili za nabiranje in označevanje vzorcev, obrazci za vpis podatkov o vzorcu in 1:25.000 oz. 1:35.000 zemljevidi vzorčnega območja z vrisano kilometrsko mrežo. Prav tako so dobili material za odvzem vzorcev. Za prostovoljce, ki so se med posameznimi terenskimi dnevi menjavali, smo vsakič na terenu pripravili deset minutno predavanje, kjer smo na kratko razložili metodologijo vzorčenja in obnašanje pri srečanju z medvedom.

8.2. Rezultati vzorčenj

Na obeh površinah smo zbrali 469 vzorcev, ki so bili dovolj sveži, strokovno odvzeti in opremljeni z vsemi potrebnimi podatki.

Na vzorčni površini Glažuta smo organizirali dve intenzivni vzorčenji (v besedilu G1 in G2), pomladi in jeseni 2004 (tabela 7). Vzorčenje smo organizirali v rednih tedenskih intervalih, ki smo jih po potrebi prilagajali glede na vremenske razmere. Beležili smo tudi starejše vzorce, ki jih nismo smatrali primerne za genetske analize in pobirali celotne iztrebke za analize prehrane (ki niso predmet tega projekta).

tabela 7: Rezultati vzorčenja na vzorčni površini Glažuta. G1 = pomlad 2004, G2 = jesen 2004.

vzorčenje	G1	G2	skupaj
od	21.05.04	10.09.04	-
do	11.07.04	05.12.04	-
trajanje (dni)	51	86	137
vzorcev	170	175	348
vzorcev za genetiko	110	114	224
uspešna genotipizacija	70	89	162
% uspešnosti	63.6%	78.1%	72.3%

Pomladansko vzorčenje je uspelo bolje kot jesensko, čeprav je bila uspešnost genotipizacije pomladanskih vzorcev nižja. V jesenskem vzorčenju smo imeli težave z vremenom, našli smo manj vzorcev v posameznem terenskem dnevu, tako da se je trajanje celotnega vzorčenja zavleklo.

V LPN Jelen-Snežnik je vzorčenje potekalo v letih 2004 in 2005 (tabela 8). Potekalo je med rednim delom v lovišču in ni bilo organizirano v intenzivna vzorčna obdobja. Kljub temu so se oblikovala obdobja, ko je bilo vzorčenje intenzivnejše (12, stran 35).

tabela 8: Rezultati vzorčenja na vzorčni površini Snežnik. S1 =2004, S2 = 2005.

vzorčenje	S1	S2	skupaj
od	20. 05. 04	01. 04. 05	
do	13. 11. 04	28. 10. 05	
trajanje (dni)	177	210	387
vzorcev	161	85	246
uspešna genotipizacija	136	75	211
% uspešnosti	84.5%	88.2%	85.8%

9. SPOLNA STRUKTURA

Razmerje med spoloma je pomemben dejavnik reprodukcijskega potenciala populacije in posledično pomemben parameter za populacijsko modeliranje.

9.1. Metodologija določanje spola iz neinvazivnih vzorcev

Za določanje spola smo uporabljali SRY marker (Bellemain in Taberlet 2004), ki je vezan na Y spolni kromosom, ki ga imajo samo samci. Tako dobimo pri samcih po amplifikaciji jasno viden 80 baznih parov dolg fragment, ki pri samicah manjka. Primerji so razviti specifično za zveri, zato je kontaminacija iz plena, ki je opisana v literaturi (Murphy s sod. 2003), malo verjetna. SRY marker smo amplificirali v isti PCR skupaj z lokusoma Mu51 in G10L, ki smo ju uporabljali za genotipizacijo iztrebkov (glej 7.1.3, stran 18), tako da smo imeli pozitivno kontrolo reakcije PCR.

Težava pri uporabi SRY markerja je, da je amplifikacija specifična samo za samce. Če SRY vrha v izpisu ni, je to lahko zato, ker je osebek samica, ali pa zato, ker je prišlo do napake v PCR. Ta problem je še zlasti poudarjen pri neinvazivnih vzorcih, kjer je pogostost napak zelo visoka. Zaradi tega je bistvenega pomena ugotoviti zanesljivost določanja spola in oceniti verjetnost napak.

V naših podatkih smo od velikega števila osebkov dobili več kot en vzorec, precej pa smo dobili tudi parov iztrebek – tkivo (tabela 9). Pri tkivih smo razen določitve spola mrtvega medveda, ki so jo naredili na terenu, spol določili tudi z genetiko in lahko določitev spola smatramo za zanesljivo. Potem smo s pomočjo teh parov iztrebek–tkivo postavili kriterije za popolnoma zanesljivo določitev spola iz iztrebkov (najmanj dva jasna SRY vrha v najmanj dveh vzorcih za samce, najmanj sedem dobrih PCR amplifikacij brez SRY vrha v najmanj dveh vzorcih za samice). Osebkke, za katere smo tako zanesljivo določili spol, smo uporabili za referenco in kontrolirali zanesljivost določitve spola iz enega samega iztrebka. Na ta način smo za veliko večino vzorcev spol lahko določili z zanesljivostjo najmanj 98%.

tabela 9: Ocena napak in pregled zanesljivosti določitve spola medvedov iz neinvazivnih vzorcev.

	N	%
število osebkov	140	100,00%
število os. z vzor. tkiva	35	25,00%
število os. z >1 vzorcem	92	65,71%
število referenčnih osebkov	81	57,86%
narobe določen spol pri posamez. neinv. vzorcih z referenco		
samec, prepričljiv SRY		0,00%
samec - neprepričljiv SRY		6,90%
samica - prepričljiv SRY		1,76%
samica - neprepričljiv SRY		12,07%
prag za sprejem določitve spola		0,98
osebki brez določitve spola	2	1,43%
osebki z zanesljivostjo določitve spola 0.88 - 0.98	8	5,71%
število osebkov z zanesljivo določenim spolom	130	92,86%
povprečna zanesljivost končne določitve spola	130	99,72%

9.2. Rezultati določitve spola in spolna struktura populacije

Spol smo lahko zanesljivo določili za 130 od 140 živali, ki smo jih zajeli v neinvazivno vzorčenje (tabela 10). Za deset osebkov spola nismo mogli določiti s sprejemljivo zanesljivostjo (tabela 9).

tabela 10: Spolna struktura populacije medvedov v Sloveniji. Standardno deviacijo in test H_0 o spolnem razmerju 1:1 smo ocenili po bootstrap metodi (n = 10.000).

zanesljivo določeni samci	56	43,08%
zanesljivo določene samice	74	56,92%
skupaj	130	100,00%
bootstrap SD		0,043
p (H_0 :samci:samice = 1:1)		0,076

Ker je v vzorcu skoraj gotovo zajetih več kot 10% populacije, smo standardno deviacijo določili z neparametrično bootstrap metodo z 10.000 iteracijami. Z isto metodo smo testirali H_0 , da je spolno razmerje v populaciji 1:1 ($p=0.076$). Obstaja statistična podpora hipotezi, da je v populaciji več samic kot samcev, kar lahko pomembno vpliva na njen reprodukcijski potencial. Vzorčili smo na dveh različnih območjih preko dveh let, tako da je vzorec nedvomno dober in ocena uporabna za populacijsko modeliranje. Do spolne strukture smo prišli tudi po drugi poti skozi CMR modeliranje (glej 16, stran 44).

10. OCENE ŠTEVILA MEDVEDOV IN GOSTOTE MEDVEDOV NA VZORČNIH OBMOČJIH

10.1. Metode

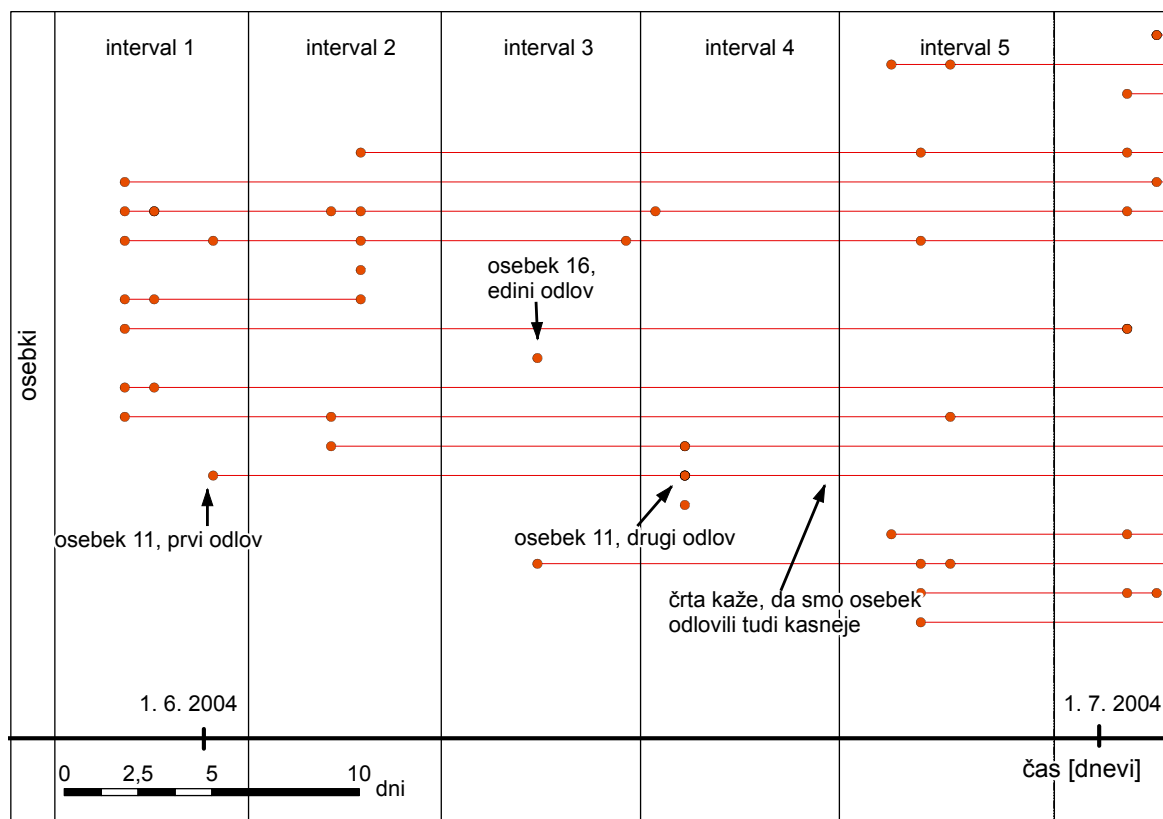
Metode genotipizacije in zagotavljanja zanesljivosti genotipov so podrobno opisane v točki 7.1 na strani 18. Metode vzorčenja in območja vzorčenja so opisane v 8.1 na strani 23.

Mesta najdbe vzorca vsakega osebka smo izrisali v geografskem informacijskem sistemu ArcGIS Desktop (ESRI), ki smo ga uporabljali tudi za druge prostorske analize. Za računanje razdalj med vzorci, Jackknife in Bootstrap metode smo napisali programe v programskem jeziku VBA.

10.1.1. Modeliranje lova, označevanja in ponovnega ulova

Število medvedov v posameznem vzorčenju smo ocenjevali z metodami ulova, označevanja in ponovnega ulova (Capture – Mark – Recapture, CMR). CMR modeliranje smo opravili v programu MARK (White in Burnham 1999).

Kritičen dejavnik pri ocenjevanju številčnosti živali z CMR metodami je vzorčenje, ki mora biti izpeljano dosledno in mora kolikor je mogoče upoštevati predpostavke modelov, ki jih uporabimo za modeliranje procesa odlova, označevanja in ponovnega odlova. Prednost CMR modeliranja je, da lahko uporabnost modelov, kršenje nekaterih predpostavk in intervale zaupanja testiramo in ocenimo.



slika 6: Vizualizacija vzorcev v času ("odlovne zgodovine" osebkov) in sekundarnega vzorčenja (intervali). Izsek je iz prvega primarnega vzorčenja na Glažuti (G1) od maja do julija 2004.

Časovne strukture vzorčenj smo izrisali v programu ArcGIS Desktop, kjer je vsak osebek dobil celoštevilčno koordinato na Y osi, na X osi pa smo ponazorili čas v dnevih od 1. 1. 2004. Najdbe vzorca istega osebk smo povezali s črto in tako dobili vizualizacijo "odlovne zgodovine"

(Capture History) vsakega osebk (slika 6). To nam je omogočilo, da smo vzorce organizirali v primarna vzorčenja in odlovne intervale znotraj primarnih vzorčenj (sekundarna vzorčenja).

Izbiro CMR (Capture—Mark – Recapture) modelov smo prilagajali vzorčenju. Za vsako vzorčenje smo naredili nabor modelov in ocenili njihove parametre po metodi največjega verjetja (Maximum Likelihood, ML). Modele smo razvrstili po Akaikovem informacijskem kriteriju (AICc) od najnižjega proti najvišjemu. Kjer je bilo primerno, smo za dokončno oceno realnih parametrov uporabljali povprečenje modelov z uporabo Akaikovih uteži, ki obtežijo ocene parametrov posameznega modela s podporo, ki jo ima model v podatkih.

Uporabljali smo tri načine modeliranja:

Modeli za zaprte populacije

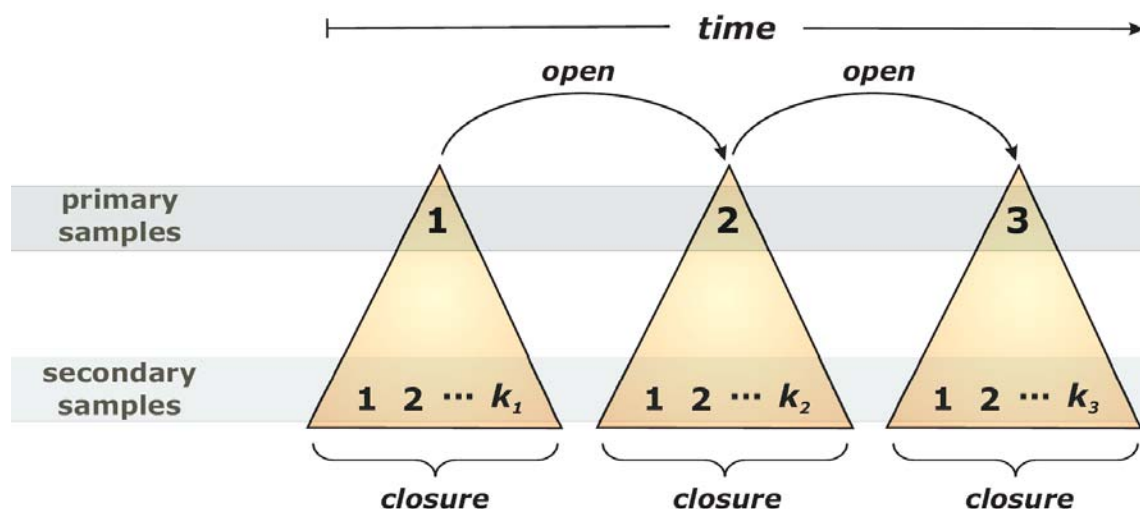
Zaprta populacija pomeni, da v populacijo med vzorčenjem ni priliva (imigracija, rojstva) ali odliva (emigracija, smrtnost). To smo poskušali doseči s časovno zaprtostjo vzorčenja, kjer so bili vzorci intenzivno zbirani znotraj krajšega časovnega intervala. Predpostavko o zaprtosti populacije smo testirali s Pradelovim modelom (Pradel 1996), kjer smo navidezna rojstva f (rojstva + imigracije) fiksirali na 0 in navidezno preživetje Φ (verjetnost, da žival preživi in ostane v območju vzorčenja) na ena ter potem to primerjali z modelom, kjer smo f in Φ ocenili po ML. Če se AICc modelov znatno ne razlikuje ($\Delta AICc < 2$), sta modela enakovredna in lahko sklepamo, da je populacija zaprta. Hipotezo o enakosti modelov smo dodatno testirali z »Likelihood ratio« testom. Če se je populacija obnašala kot zaprta, smo uporabili Hugginsov model za zaprte populacije (Huggins 1989).

Modeli za odprte populacije

Pri modeliranju odprtih populacij sta priliv in odliv osebkov v/iz populacije vključena v verjetje (Likelihood) modela. Ti modeli so večinoma izpeljanke Jolly – Seberjevega modela (JS) (Jolly 1965; Seber 1965). Pri modeliranju smo uporabljali Schwartz – Arnsenovo parametrizacijo (Schwarz in Arnason 1996), implementirano v POPAN modulu programa MARK. Parametrizacija ima v verjetju modela zajet parameter N , ki predstavlja velikost superpopulacije – populacije živali, ki bi lahko prišle v območje vzorčenja. Verjetnost tega se ocenjuje s parametrom verjetnosti vstopa živali v območje (P_{ent}). Konceptualno ta model verjetno najbolje ustreza biološki realnosti, ker medvedi med vzorčenjem območje, na katerem bi lahko našli njihov vzorec, zapuščajo in vanj vstopajo. Če se populacija obnaša kot zaprta, bi morala biti tako ocenjena velikost superpopulacije enaka oceni velikosti populacije z modelom za zaprto populacijo. Zato smo ta model uporabili tudi za vsa vzorčenja, kjer se je populacija obnašala kot zaprta in rezultate primerjali z rezultati Hugginsovega modela.

»Robust Design« modeli

Ta tip modelov, ki ga je prvi opisal (Pollock 1982) in ki so ga kasneje še precej nadgradili, vključuje vzorčenje na dveh časovnih skalah - primarna in sekundarna vzorčenja (slika 7). Smatra se, da je populacija znotraj primarnih vzorčenj zaprta, med primarnimi vzorčenji pa lahko potekajo procesi populacijske dinamike.



slika 7: Struktura klasičnega Pollockovega »Robust Design« modela (Cooch in White 2007). Primarna vzorčenja se nadalje delijo na sekundarna vzorčenja – časovne intervale znotraj primarnih vzorčenj. Tako se po klasičnem Pollockovem »Robust Design« modelu, ki ga smo ga uporabili tudi mi, parametri znotraj primarnih vzorčenj ocenjujejo po modelih za zaprte populacije, med primarnimi vzorčenji pa po modificiranih Cormack – Jolly – Seber modelih za odprte populacije.

Če imamo dovolj dobre podatke za njihovo uporabo, so »Robust Design« modeli verjetno najboljši modeli, ki jih imamo trenutno na voljo. Ocene so precej odporne na več kršitev predpostavk, zlasti individualno heterogenost verjetnosti odlova, ki je največji problem pri ocenah številčnosti. Če je priliv in odliv v/iz populacije v posameznem primarnem vzorčnem obdobju naključen, kar je v našem primeru razumna predpostavka, so ocene odporne tudi na kršitev predpostavke o zaprtosti populacije v primarnih vzorčenjih (Kendall s sod. 1999).

Stopnja ujemanja (goodness-of-fit, GoF)

Za uporabo modela je nujno, da je model primeren za analizo podatkov, kar zagotovimo z »goodness of fit« testi. Pri modelih za zaprto populacijo smo uporabili Capture modul v MARKu. Za odprte modele smo testirali Cormack-Jolly-Seberjevo komponento verjetja po bootstrap in median c-hat metodah. Za Robust Design modele zaenkrat ni razvitih dobrih GoF metod, tako da smo uporabili rezultate GoF testov za primarna vzorčenja kot merodajne.

10.1.2. Izračun populacijske gostote

Pri ocenah populacije na tako majhnem območju vzorčenja, kot smo ga imeli, je poudarjen učinek roba (»Edge Effect«), ker živali vstopajo in izstopajo na območje vzorčenja. Tako dejansko s CMR modeli ocenimo velikost superpopulacije, torej živali, ki bi lahko prišle na območje, na katerem bi lahko dobili njihov vzorec. Velikost superpopulacije lahko sicer razmeroma robustno modeliramo in ocenimo, še vedno pa ne vemo, na kako veliko območje se ta številka nanaša, kar je ključen podatek za oceno populacijske gostote.

Pri zbiranju neinvazivnih vzorcev smo beležili tudi njihove lokacije, kar nam posreduje določene informacije o gibanju živali znotraj našega vzorčnega območja in znotraj časovnega okvirja vzorčenja. Če je razmerje med premiki živali in velikostjo območja dovolj veliko in če takšnih premikov zabeležimo dovolj, lahko predpostavimo, da gibanje živali znotraj vzorčnega območja dobro opiše gibanje živali nasploh. Klasično se problemi rabe prostora živalske vrte rešujejo z radiotelemetrijo. Neinvazivno genetsko vzorčenje v svoji prostorski komponenti ni toliko različno, vendar pa deluje nekoliko drugače od radiotelemetrije. Pri radiotelemetriji imamo veliko število lokacij za majhno število živali. Nasprotno pa imamo pri neinvazivnem genetskem vzorčenju veliko število živali in majhno število lokacij za posamezno žival. Če bi ene ali druge podatke želeli uporabiti za opis gibanja »povprečne živali«, bi intuitivno pri dovolj velikem vzorcu po obeh metodah asimptotično prišli do istega rezultata. Logično pa lahko sklepamo, da pri majhnih vzorcih radiotelemetrija bolje opiše variabilnost znotraj posameznega osebk,

neinvazivno vzorčenje pa bolje opiše variabilnost med osebki. Kje in kdaj postane katera metoda boljše je odvisno od razmerij med tema dvema variabilnostma in od velikosti vzorca, nedvomno pa sta obe metodi znotraj svojih omejitev uporabni za opis načina kako »povprečna« žival uporablja prostor.

Žival lahko znotraj določenega časovnega okna razumemo kot verjetnosten ploskovni fenomen, kjer ima celotna ploskev $\mathbf{Z}$ verjetnost 1, da se žival nahaja v njej, vsak njen del pa neko nezanemarljivo verjetnost $\mathbf{P}$, da se bo žival znotraj časovnega okna nahajala prav v njem. Takšna probabilistična površina je, intuitivno, odvisna od distribucije razdalj med opaženimi lokacijami živali znotraj časovnega okna, ki med seboj niso avtokorelirane. Verjetnost, da bo žival znotraj časovnega okna prisotna na določeni točki v prostoru pada z oddaljenostjo od točke, kjer smo žival dejansko zaznali. Intuitivno bi morala padati kot funkcija distribucije opaženih razdalj, saj je od tega neposredno odvisna verjetnost premika živali za določeno razdaljo. Gibanje živali znotraj časovnega okna nas zanima kot popolnoma stohastičen proces in ne kot Markovska veriga. Zaradi tega razdalje ne pomenijo sekvenčnega gibanja živali v času in prostoru, ampak razdalje med pari opaženih točk posamezne živali znotraj časovnega okna. Tako lahko verjetnost $\mathbf{P_c}$, da bo žival znotraj časovnega okna šla skozi določeno celico $\mathbf{C}$ opredelimo kot funkcijo verjetnosti, bo premagala razdaljo $\mathbf{d}$ do te celice, $\mathbf{P(d)}$, ter razmerja med površino celice $\mathbf{A_c}$ in površino celotne probabilistične ploskve z verjetnostjo 1, $\mathbf{A(Z)}$:

$$P_c = P(d) \cdot \frac{A_c}{A(Z)}$$

Pri tem je $\mathbf{P(d)}$ funkcija distribucije opaženih razdalj med neinvazivnimi vzorci iste živali $\mathbf{d}$.

$$P(d) = 1 - \frac{\sum_{i=1}^d N_i}{N},$$

kjer izraz v števcu predstavlja kumulativno število opaženih razdalj do razdalje $\mathbf{d}$.

Ko ocenjujemo superpopulacijo, se ta ocena pravzaprav nanaša na vso površino, za katero je nezanemarljiva verjetnost, da živali z nje prehajajo v naše območje vzorčenja, kjer je prispevek vsake celice te površine enak verjetnosti, da bo žival iz nje prišla v naše območje vzorčenja, kar pa je pravzaprav naš parameter $\mathbf{P_c}$. Ker je verjetnost, da bo žival premagala razdaljo med to zunanjo celico in območjem vzorčenja odvisna izključno od parametra $\mathbf{P(d)}$, pri katerem je spremenljivka samo razdalja med celicama, je ta verjetnost enaka verjetnosti, da bo žival iz območja vzorčenja prišla do te zunanje celice. S pomočjo $\mathbf{P(d)}$ lahko na podlagi razdalje vsake celice od območja vzorčenja ocenimo verjetnost, da bi medvedi iz nje lahko v našem časovnem oknu prišli na območje vzorčenja. Produkt te verjetnosti z velikostjo celice pa je pravzaprav enak njenemu prispevku k ocenjeni superpopulaciji – prispevek celic na samem območju vzorčenja je enak njihovi površini ($\mathbf{P(d)} = 1$) in glede na obliko distribucije razdalj pada z razdaljo od območja vzorčenja, dokler ne postane zanemarljiv.

Ker je

$$A_Z = \sum_{i=1}^{N_{celic}} A_{ci}$$

in

$$\sum_{i=1}^{N_{celic}} P_{ci} = 1$$

lahko gostoto živali potem enostavno izračunamo kot

$$D = \frac{N_{spop}}{A_{spop}} = \frac{N_{spop}}{\sum_{i=1}^{N_{celic}} P(d)_i \cdot A_{ci}},$$

pri čemer je N_{celic} število celic, za katere je $P(d) > 0$. A_z je v tem primeru celotna površina, za katero obstaja nezanemarljiva verjetnost, da bodo živali z nje prišle na območje vzorčenja v danem časovnem obdobju. N_{spop} je ocenjena velikost superpopulacije, A_{spop} pa velikost A_z , če bi bila $P(d)$ po celotni površini Z homogena.

Metoda je nova in jo nameravamo opisati v znanstvenem članku, tako da še nismo popolnoma testirali vseh njenih lastnosti. Ne glede na to pa so prvi rezultati videti spodbudni. Trenutno je težava, ker še ne razumemo natančno pri kakšnem razmerju med velikostjo območja vzorčenja in velikostjo domačega okoliša živali znotraj preučevanega časovnega okna je metoda še vedno zanesljiva. Namreč, pričakovati je, da bo pri majhnem območju vzorčenja in velikih domačih okoliših živali znotraj časovnega okna prišlo do primanjkljaja zaznanih daljših premikov, kar bi posledično obremenilo ocene $P(d)$ z napako in pripeljalo do precenjene vrednosti gostote populacije. Ker je mediana premikov pri naših podatkih v primerjavi z velikostjo vzorčnih območij razmeroma majhna in ker je prispevek ekstremnih vrednosti zaradi majhnih $P(d)$ majhen, sklepamo, da je metoda za naše potrebe uporabna.

Izračunali smo razdalje med lokacijami neinvazivnih vzorcev istih osebkov v 63 dnevnem časovnem oknu (kar ustreza dolžini vzorčenja in času pred vzorčenjem, ko bi lahko žival še odložila iztrebek in bi ga mi zajeli v vzorčenje). Razdalje smo izračunali ločeno za samce in samice. Ker dejanskega časa odlaganja iztrebka ne vemo, smo kot prostorsko avtokorelirane vzorce določili vse vzorce pri katerih je razlika v času najdbe manj kot tri dni in ki so manj kot 500 metrov narazen. Vse takšne vzorce smo izključili iz analize. V geografskem informacijskem sistemu (GIS) smo naredili minimalna konveksna poligona (MCP) iz lokacij najdb neinvazivnih vzorcev v vsakem območju. Na podlagi tega smo izračunali probabilistično prispevno površino glede na razdaljo vsake celice od roba MCP poligona $P(d)$. Ker se kot primaren medvedov habitat smatra gozd in se na drugih površinah pojavlja bolj izjemoma, prispevka negozdnih površin nismo upoštevali (njihov $P(d) = 0$). Potem smo $P(d)$ v vsaki celici množili z njeno površino in vse celice sešteli, kar nam je dalo površino za izračun gostote medvedov v posameznem vzorčenju. Varianco smo izračunali po dvotretjinski Jackknife metodi, kjer smo pri vsakem izračunu prispevne površine naključno izključili 1/3 vseh razdalj, s 1000 iteracijami. Varianco gostote, ki je odvisna tako od variance prispevne površine kot variance ocenjene velikosti superpopulacije smo izračunali po Bootstrap metodi z 10.000 iteracijami.

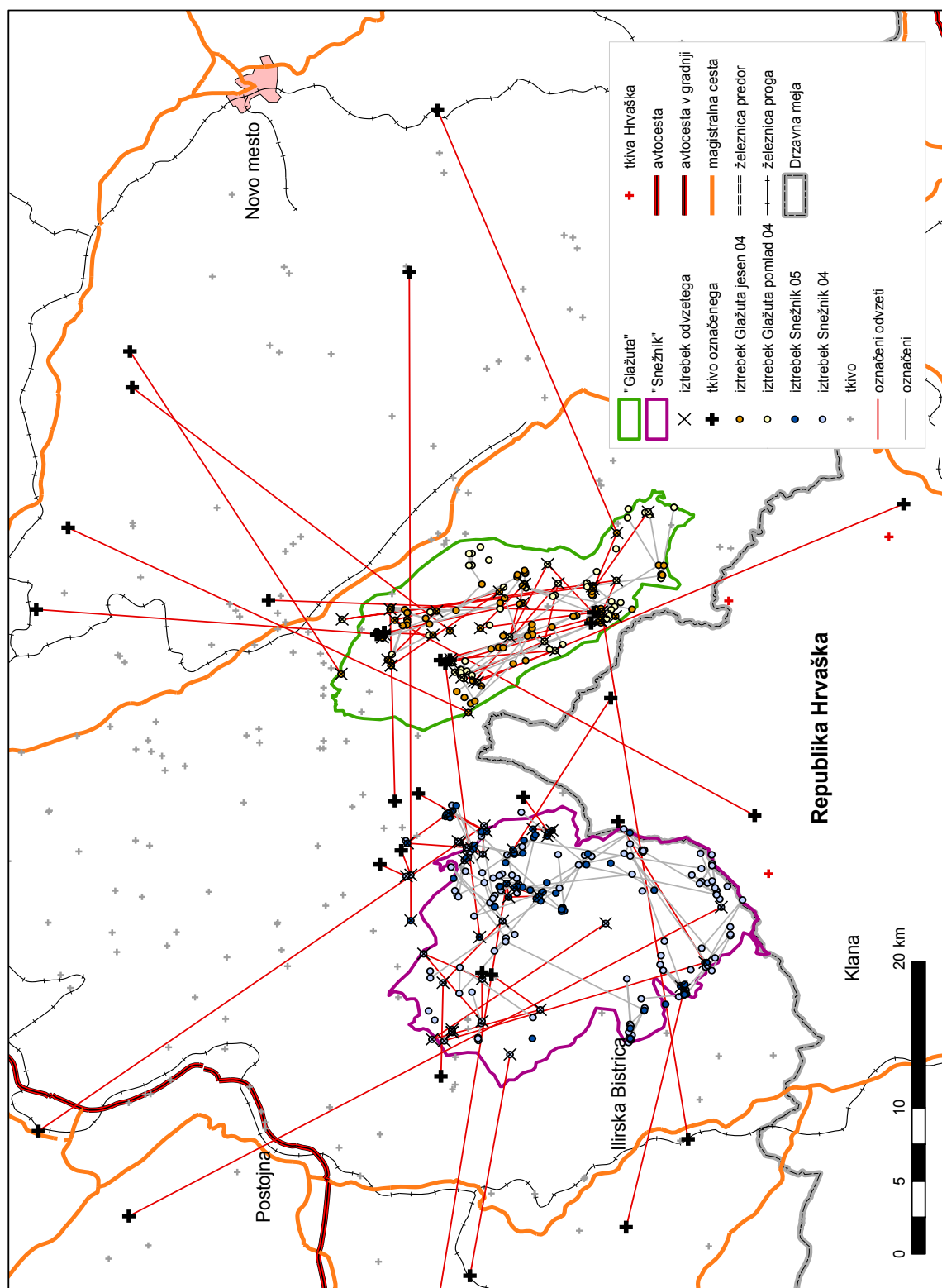
11. REZULTATI INDIVIDUALNE PREPOZNAVE OSEBKOV IZ NEINVAZIVNIH VZORCEV

Na obeh vzorčnih površinah smo v celotni študiji nabrali 469 vzorcev primernih za genetiko, od katerih smo jih 373 uspešno genotipizirali (glej 8.2, stran 25). V neinvazivnih vzorcih smo "ulovili" 140 različnih živali, od tega imamo za 92 (65,71%) po dva ali več vzorcev. Od "označenih" živali jih je bilo v Sloveniji do konca leta 2006 odstreljenih 31, štiri pa na Hrvaškem (Ivna Kocijan, neobjavljeni podatki). Večina tkivnih vzorcev, ki so jih hrvaški kolegi do zdaj analizirali, je iz Like in območij Gorskega Kotarja, ki so razmeroma daleč od naših območij vzorčenja, zato je tako nizek delež vzorcev pri nas označenih medvedov na Hrvaškem pričakovan. Medvedi, ki smo jih "označili" z genetskimi oznakami, so bili odvzeti iz populacije po praktično celotnem centralnem območju medveda v Sloveniji. Prostorska razporeditev vzorcev je prikazana na strani 34 (slika 8).

Zanimivo je, da neinvazivnih vzorcev živali, označenih na enem območju, na drugem območju nismo našli, tako da je bilo prehajanja živali med območjema v času vzorčenja verjetno razmeroma malo. To potrjuje tudi dejstvo, da smo precej živali iz posamičnega vzorčenja našli tudi v naslednjih vzorčenjih na istem območju (tabela 11).

tabela 11: Število različnih medvedov, ki smo jih našli v neinvazivnih vzorčenjih in prehajanje istih živali med vzorčenji. Prehajanja živali med obema območji vzorčenja nismo opazili. Za dodatni dve živali od katerih smo analizirali iztrebka vzorci niso bili najdeni na območjih organiziranih vzorčenj. S1a = Snežnik, pomlad/poletje 04, S1b = Snežnik, poletje jesen 04; S2 = Snežnik, poletje/jesen 05; G1 = pomlad 04; G2 = jesen 04.

območje "Snežnik"								območje "Glažuta"		
vzorčenje	S1a	S1b	S2			G1	G2			
S1a	40				G1	30				
S1b	19	40			G2	16	44			
S2	14	13	38		-	-	-			
80 različnih živali					58 različnih živali					
skupaj snežnik + glažuta = 138 različnih živali										



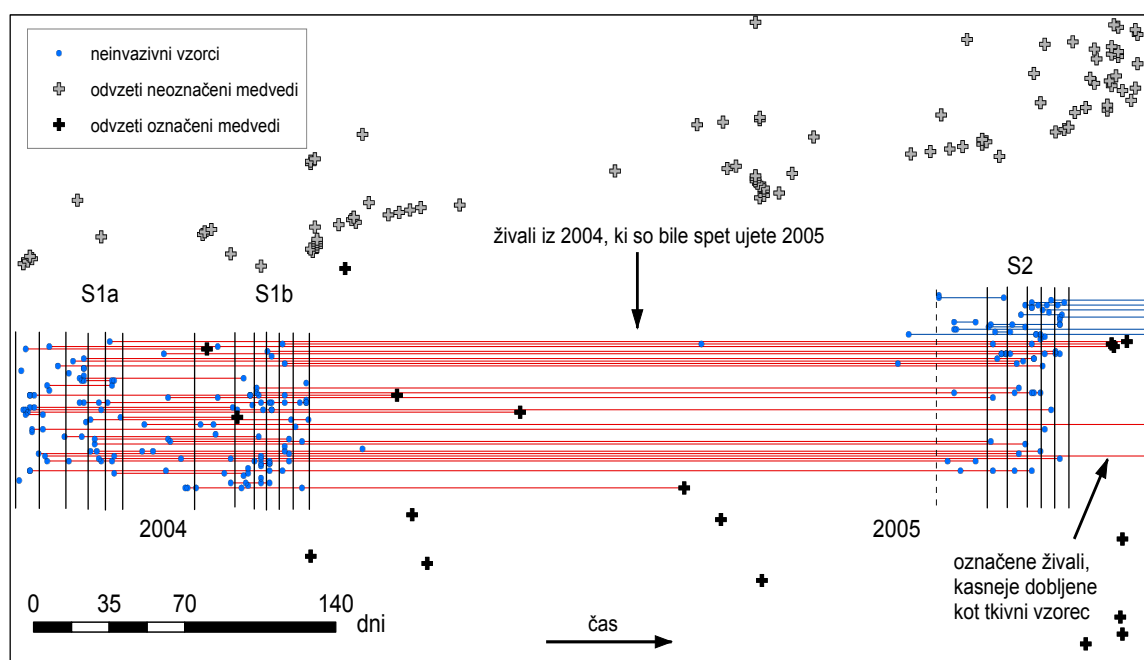
slika 8: Območji vzorčenja, lokacije vzorcev iztrebkov in odvzeti »označeni« medvedi. Črte povezujejo vzorce istih osebkov. Vrisane tudi lokacije ostalih odvzetih medvedov (vir: Zavod za gozdove Slovenije) in lokacije vzorcev na Hrvaškem (vir: Ivna Kocijan)

12. REZULTATI NEINVAZIVNEGA VZORČENJA IN OCENA VELIKOSTI SUPERPOPULACIJE ZA VZORČNO OBMOČJE LPN JELEN SNEŽNIK (»SNEŽNIK«)

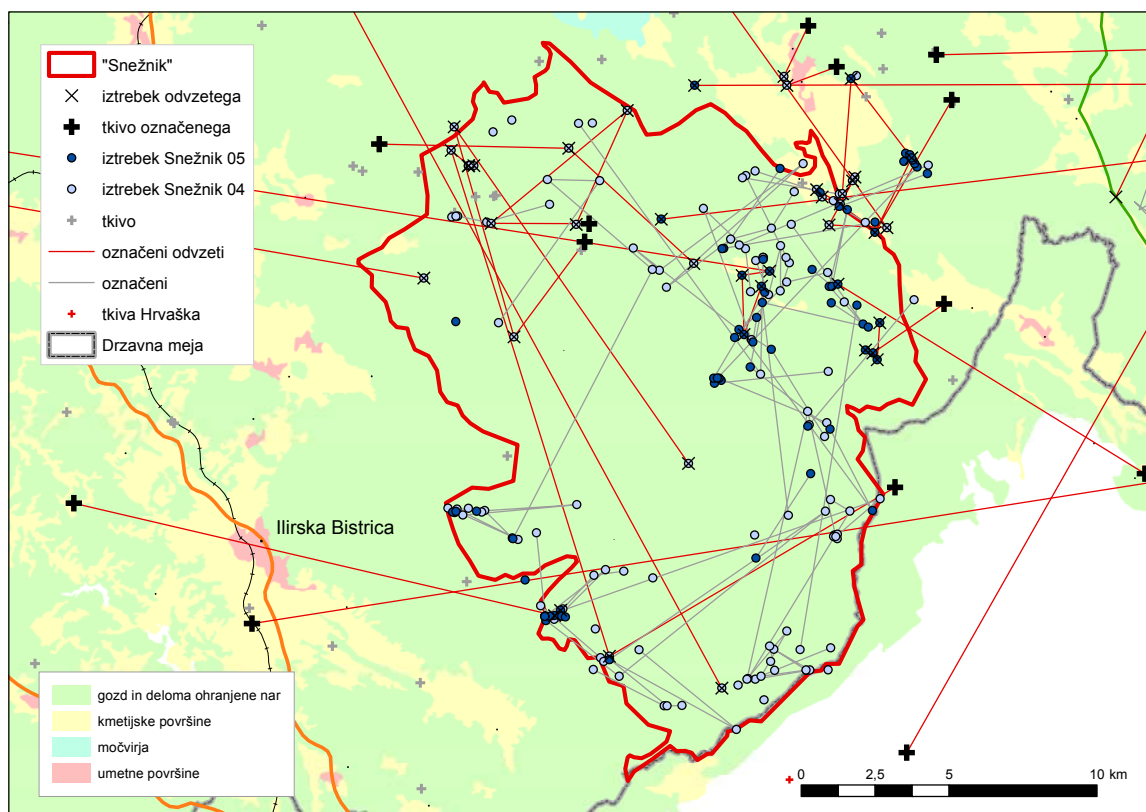
Čeprav je bilo na Snežniku vzorčenje kontinuirano, so se, verjetno kot posledica razporeditve dela v lovišču, izoblikovala tri jasna primarna vzorčenja, ki smo jih poimenovali S1a (pomlad/poletje 2004), S1b (poletje/jesen 2004) in S2 (poletje/jesen 2005) (slika 9). Precej živali iz posameznega vzorčenja smo ulovili tudi v vzorčenjih, ki so sledila (tabela 12).

tabela 12: Pregled prehajanja živali med vzorčenji na vzorčnem območju »Snežnik«. S1a = Snežnik, pomlad/poletje 04, S1b = Snežnik, poletje/jesen 04; S2 = Snežnik, poletje/jesen 05.

območje "Snežnik"			
vzorčenje	S1a	S1b	S2
S1a	40		
S1b	19	40	
S2	14	13	38
odlovljeni v S1a in S2, ne pa v S1b			
6			
odlovljeni v vseh treh vzorčenjih			
8			
odlovljeni v S1a ali S1b in v S2 (prehod 2004 - 2005)			
19			
80 različnih živali			



slika 9: Graf časovne razporeditve vzorcev v vzorčenju v LPN Jelen Snežnik. Vidna so tri primarna vzorčenja, S1a, S1b in S2. Vertikalne črte delijo posamezna sekundarna vzorčenja znotraj primarnih vzorčenj.



slika 10: Lokacije genotipiziranih vzorcev iztrebkov medvedov. Črte povezujejo vzorce istih osebkov. Vrisane so tudi lokacije ostalih odvzetih medvedov (vir: Zavod za gozdove Slovenije) in lokacije vzorcev na Hrvaškem (vir: Ivna Kocijan)

Vzorci so videti prostorsko sprejemljivo homogeno razporejeni (slika 10).

12.1. Ocena velikosti superpopulacije

Modeliranja procesa odlova, označevanja in ponovnega odlova smo se lotili z več popolnoma različnimi pristopi za zaprte in odprte populacije (glej 10.1, stran 28). Pri testih zaprtosti populacije se je izkazalo, da se populacija v vzorčenju S1a obnaša kot zaprta, v S1b pa kot odprta. V vzorčenju S2 se populacija obnaša kot zaprta, vendar samo, če odstranimo prvi sekundarni interval. Zaradi varčnosti uporabe podatkov tega nismo storili, ampak smo se raje odločili uporabiti modele za odprte populacije.

Testi skladnosti modelov (GoF) kažejo, da so modeli primerni za naše podatke ($c\text{-hat} < 2$).

tabela 13 prikazuje rezultate CMR modeliranja. Hugginsov model je pravzaprav primeren samo za vzorčenje S1a, kjer se populacija obnaša kot zaprta, za ostali dve vzorčenji pa je manj primeren. Sicer pa rezultati tega modela ne odstopajo znatno od rezultatov dobljenih z ostalima dvema načinoma modeliranja, tako da lahko sklepamo, da predpostavka o zaprtosti populacije v nobenem vzorčenju ni močno kršena.

tabela 13: Rezultati CMR modeliranja za posamezna vzorčenja na vzorčnem območju »Snežnik« (LPN Jelen). POPAN = Schwarz - Arnasonov JS model za odprte populacije, Huggins = Hugginsov model za zaprte populacije; RD = Pollockov Robust Design model (glej 10.1, stran 28). Ocene parametrov so znotraj seta modelov povprečene z Akaikovimi uteži glede na podporo, ki jo ima posamezen model v podatkih. »Nepravilnosti« v seštevkih pri RD modelu so zaradi zaokroževanja.

vzročanje		S1a	S1b	S2
trajanje vzorčenja(dni)		47	44	58
število vzorcev		57	64	71
odlovljenih živali		35	39	38
samic		19	24	19
samcev		16	15	19
zaprtost populacije		DA	NE	NE*
POPAN	N(samci)	31	30	31
	s (Nsamci)	6,350	4,055	6,131
	N(samice)	31	31	30
	s (Nsamice)	6,289	4,087	6,131
	N(skupaj)	62	61	61
	s (skupaj)	8,937	5,757	8,671
Huggins	N(samci)	31	23	34
	s (Nsamci)	9,518	4,789	8,793
	N(samice)	31	38	26
	s (Nsamice)	6,781	7,216	4,013
	N(skupaj)	62	61	60
	s (skupaj)	11,687	8,661	9,665
RD	N(samci)	<u>29</u>	<u>29</u>	<u>29</u>
	s (Nsamci)	2,62	2,57	2,52
	N(samice)	<u>31</u>	<u>31</u>	<u>31</u>
	s (Nsamice)	2,76	2,71	2,56
	N(skupaj)	<u>61</u>	<u>61</u>	<u>60</u>
	s (skupaj)	3,81	3,73	3,60

V vzorčenju S1a, kjer je populacija zaprta, dobimo s tem modelom identične rezultate kot s POPAN modelom, kar je tudi logično. POPAN model je popolnoma primeren za naše podatke in daje robustne rezultate. Za vsako vzorčenje smo naredili z vsakim modelom naredili serijo modelov različne kompleksnosti (isto smo naredili s Hugginsovim modelom) in vedno je imel najboljši model isti parameter za število samic in samcev. Ker so imeli tudi drugi modeli v seriji določeno podporo v podatkih, smo končne rezultate za določen model in vzorčenje dobili s povprečenjem s pomočjo Akaikovih uteži glede na podporo, ki jo ima določen model iz serije v podatkih (glej tabela 14 za primer pri modelu Robust Design).

»Robust Design« model (tabela 14) od vseh modelov, ki smo jih uporabljali, najbolj izkorišča podatke, tako da so njegovi rezultati po pričakovanju najboljši. Pri tem sistemu modeliranja dejansko modeliramo vsa tri vzorčenja v enem modelu. Tak model je posledično bolj kompleksen, ampak tudi operira z bistveno več podatki kot modeli za posamična vzorčenja.

tabela 14: Serija Robust Design modelov za vzorčno območje Snežnik. Modeli vključujejo vsa tri vzorčenja v en likelihood. Modeli so sortirani po Akaikovem informacijskem kriteriju (AICc) od modela, ki ima največ podpore v podatkih do modela, ki ima podpore najmanj.

model	AICc	Delta AICc	AICc utež	verjetnost modela	št. parametrov	devianca
{S(.)gammaRnd(.)p=c(.)N(.)}	355,64	0,0	0,518	1,000	4	313,866
{S(.)gammaRnd(.)p=c(.)N(s)}	357,38	1,7	0,217	0,419	5	313,485
{S(ses)gammaRnd(.)p=c(.)N(s)}	358,74	3,1	0,110	0,213	6	312,690
{S(s)gammaRnd(s)p=c(.)N(.)}	359,05	3,4	0,094	0,182	6	313,001
{S(ses)gammaRnd(s)p=c(.)N(s)}	360,84	5,2	0,039	0,074	7	312,620
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(.)N(.)}	362,76	7,1	0,015	0,029	8	312,337
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(.)N(s)}	364,61	9,0	0,006	0,011	9	311,956
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(.)N(ses1+2(s)ses3(s))}	368,75	13,1	0,001	0,001	11	311,565
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(sex)N(ses1+2(s)ses3(s))}	370,95	15,3	0,000	0,001	12	311,453
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(sex)N(ses*s)}	375,11	19,5	0,000	0,000	14	310,899
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1(.).session2-3(s))N(ses*s)}	375,32	19,7	0,000	0,000	16	306,275
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1,2(.).session3(s))N(ses*s)}	377,13	21,5	0,000	0,000	16	308,083
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1(.).session2-3(*s))N(ses*s)}	377,59	22,0	0,000	0,000	15	310,976
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1(.).ses2(F(2t)M(.))ses3(s))N(ses*s)}	377,67	22,0	0,000	0,000	17	306,162
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(session*s)N(ses*s)}	377,68	22,0	0,000	0,000	17	306,165
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1(.).ses2(F(.).M(2t))ses3(s))N(ses*s)}	377,78	22,1	0,000	0,000	17	306,269
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1,3(.).session2(s))N(ses*s)}	378,22	22,6	0,000	0,000	16	309,171
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1(s)ses2(s)ses3(F(.).M(t))N(ses*s)}	384,67	29,0	0,000	0,000	22	300,341
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1(s)ses2(s)ses3(t*s))N(ses*s)}	397,63	42,0	0,000	0,000	27	299,591
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1(s)ses2(F(.).M(t))ses3(t*s))N(ses*s)}	410,47	54,8	0,000	0,000	32	297,733
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1(s)ses2,3(t*s))N(ses*s)}	421,88	66,2	0,000	0,000	37	293,355
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(ses1(F(.).M(t))ses2,3(t*s))N(ses*s)}	424,94	69,3	0,000	0,000	41	282,911
{S(s*s)gammaRnd(s)p=c(t*s*s)N(ses*s)}	435,30	79,7	0,000	0,000	45	278,904

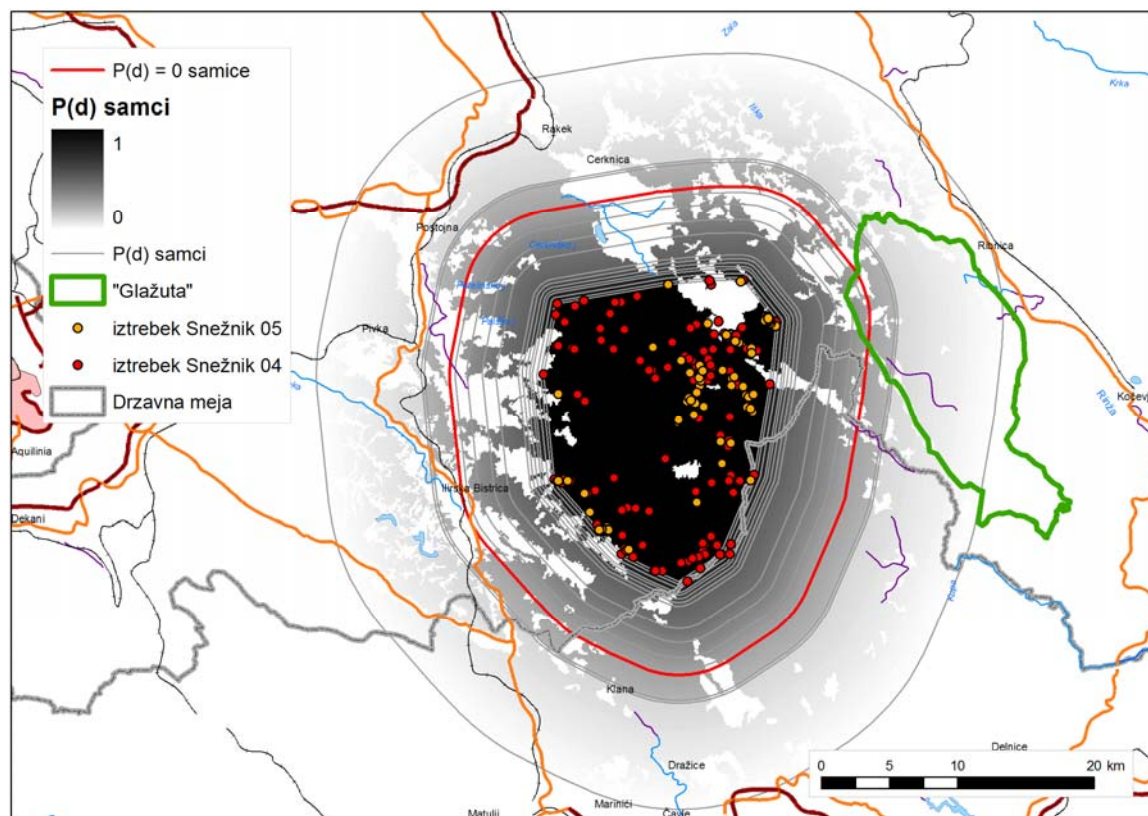
Prvi model v tabeli, ki ima 52% podpore v podatkih, modelira število živali vsakega spola v vsakem vzorčenju kot en parameter. Drugi model z 22% podporo modelira število živali kot enako med vzorčenji ampak različno med spoloma. Najboljši model, ki predvideva kakršne koli razlike v številu živali med posameznimi vzorčenji, ima manj kot 0,1% podpore v podatkih. Zato lahko upravičeno sklepamo, da se število medvedov zajetih v vzorčenje in zaradi enakega območja vzorčenja posledično tudi gostota medvedov na območju LPN Jelen Snežnik v letih 2004 in 2005 nista spreminjala.

Če primerjamo rezultate različnih modelov s popolnoma različnimi pristopi k modeliranju (tabela 13) opazimo, da so rezultati zelo podobni. Razlike med modeli so večje pri ocenah številčnosti po spolu kot pri ocenah celotne številčnosti, kar je za pričakovati, saj je za posamezen spol manj podatkov kot za oba spola skupaj. Ugotovimo lahko, da smo dobili dobro oceno velikosti superpopulacije medvedov na vzorčenem območju z ozkim intervalom zaupanja, ki se med leti 2004 in 2005 ni bistveno spreminjala – 60 medvedov, s 95% intervalom zaupanja od 53 do 67 medvedov.

13. OCENA POPULACIJSKE GOSTOTE NA VZORČNEM OBMOČJU »SNEŽNIK«

Iz opaženih razdalj med lokacijami vzorcev istih osebkov znotraj časovnega okna 63 dni smo ocenili $P(d)$ za samce, samice in za oba spola skupaj.

Modelirali smo probabilistične površine za samce, za samice in za oba spola skupaj ter izračunali populacijsko gostoto (slika 11).



slika 11: Probabilistična prispevna površina za samce za izračun populacijske gostote medvedov na vzorčnem območju »Snežnik«. Verjetnost, da medvedi prihajajo v vzorčenje pada od območja vzorčenja proti robu. Površine brez gozda imajo $P(d) = 0$. Za samice je z rdečo črto narisana samo meja območja Z za katero je verjetnost, da medvedi iz njega v časovnem oknu posamičnega vzorčenja prihajajo v območje vzorčenja, nezanemarljiva.

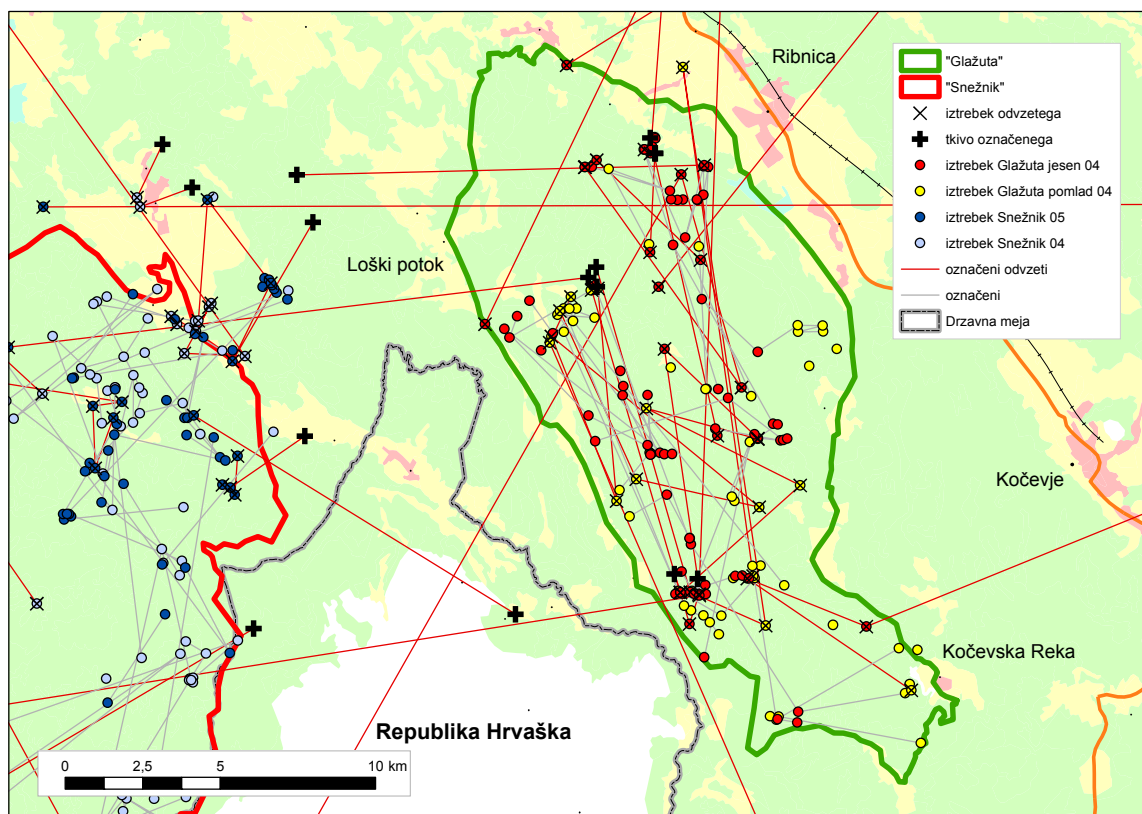
Ker je ocena številčnosti superpopulacije v vseh treh vzorčenjih praktično enaka (tabela 13), smo podali eno oceno za vsa tri vzorčenja (tabela 15). Pri tem smo prispevno površino superpopulacije modelirali tako posebej za samce in samice kot skupaj za oba spola. Rezultati skupne ocene gostote za oba spola so zelo podobni ne glede na način modeliranja prispevne površine.

tabela 15: Rezultati ocene populacijske gostote medvedov za vzorčno območje »Snežnik« (LPN Jelen Snežnik). Po najboljšem modelu (tabela 13) je številčnost superpopulacije na tem območju in posledično gostota v vseh treh vzorčenjih enaka. Gostoto za samce in samice skupaj smo dobili na dva različna načina – s seštevkem gostot po posameznem spolu in z modeliranjem prispevne površine za oba spola skupaj.

vzorčno območje	Snežnik		
	samice	samci	samci+samice
prispevna površina superpopulacije($A_{superpop}$)	445,95	566,68	474,21
SE ($A_{superpop}$)	6,53	30,35	8,82
število živali v superpopulaciji (N)	<u>31</u>	<u>29</u>	<u>60</u>
SE (N)	2,68	2,57	3,71
95% CI max	36	34	67
95% CI min	26	24	53
<u>gostota (medvedov / 10 km²)</u>	<u>0,70</u>	<u>0,52</u>	<u>1,27</u>
SE (gostota)	0,06	0,05	0,08
95% CI max	0,82	0,62	1,43
95% CI min	0,58	0,41	1,11
gostota samci + samice	Σ ocen po spolu: <u>1,22</u>		<u>1,27</u>
	samice	samci	
spolna struktura iz neinvazivnega vzorčenja	56,9%	43,1%	
spolna struktura iz razmerja populacijskih gostot	57,58%	42,42%	

14. REZULTATI NEINVAZIVNEGA VZORČENJA IN OCENA VELIKOSTI SUPERPOPULACIJE ZA VZORČNO OBMOČJE »GLAŽUTA«

Na vzorčnem območju Glažuta, kjer smo vzorčili raziskovalci z Biotehniške fakultete in prostovoljci, smo opravili dve intenzivni vzorčenji pomladi/poleti in jeseni 2004. Prostorska razporeditev vzorcev (slika 12) kaže razmeroma homogeno pokritost z »luknjo« v severozahodnem delu območja. Ta površina je bila vzorčena s podobno intenzivnostjo kot ostalo območje, vendar je na njej manj cest in ni krmišč za medvede, zato vzorcev nismo našli.



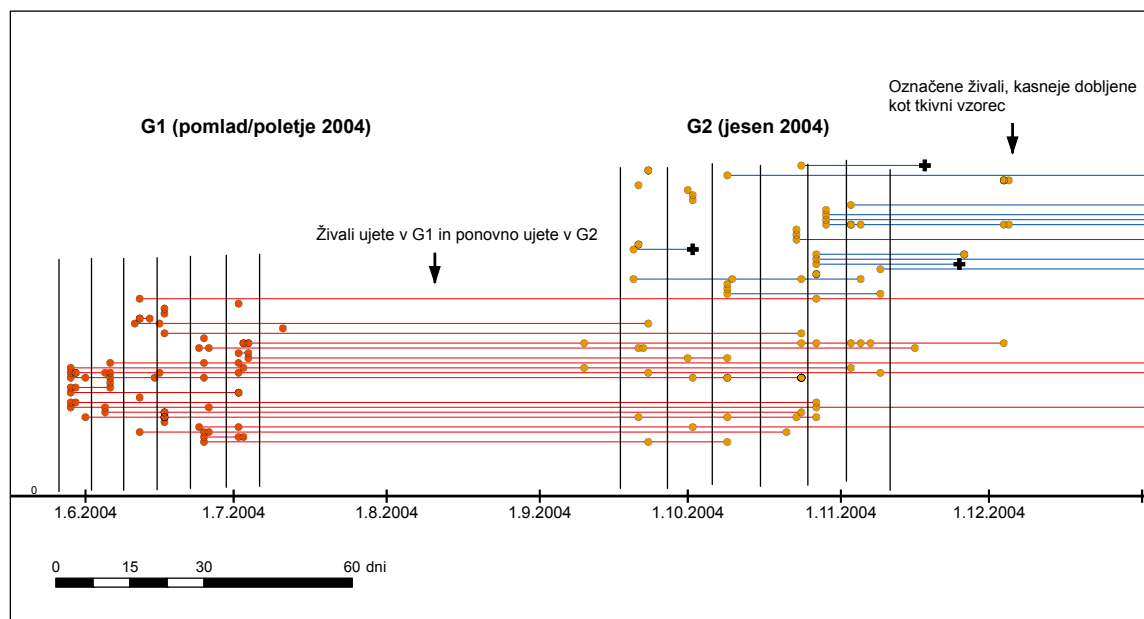
slika 12: Prostorska razporeditev vzorcev v vzorčenju na vzorčni površini Glažuta pomladi in jeseni 2004.

V jesenskem vzorčenju (G2) smo v vzorcih ujeli več živali kot v pomladanskem vzorčenju (tabela 16). Tudi trajanje samega vzorčenja je bilo precej daljše, saj se je celotno zbiranje vzorcev razvleklo na več mesecev (slika 13).

tabela 16: Prehajanje živali med vzorčenjema na Glažuti.

vzorčenje	G1	G2
G1	30	
G2	16	44

Proces odlova – označevanja in ponovnega odlova smo poskusili modelirati s Hugginsovim modelom za zaprte populacije in Schwarz – Aranasonovo parametrizacijo JS modela (POPAN) (glej stran 28).



slika 13: Prikaz časovnega poteka odlova – označevanja in ponovnega odlova medvedov z neinvazivnimi vzorci na vzorčnem območju »Glažuta«.

Pri drugem vzorčenju na Glažuti nam ni uspelo narediti uporabnega modela. Vse kaže, da je bila prisotna močna heterogenost ulovljivosti posameznih živali, tako da so GoF testi pokazali, da so modeli za odprte populacije neuporabni. Modeli za odprte populacije, ki bi vključevali individualno heterogenost ulovljivosti še niso razviti. Populacija je bila sodeč po testih na zaprtost očitno odprta, tako da so bili modeli za zaprte populacije prav tako neuporabni. Zaradi tega uporabnega rezultata ocene številčnosti populacije in populacijske gostote v tem vzorčenju nismo dobili.

V prvem vzorčenju se je populacija obnašala kot zaprta populacija. Modela, kjer bi posebej modelirali samce in samice, nismo mogli prilagoditi podatkom, zato smo oba spola modelirali skupaj in dobili uporabne rezultate velikosti superpopulacije (tabela 17).

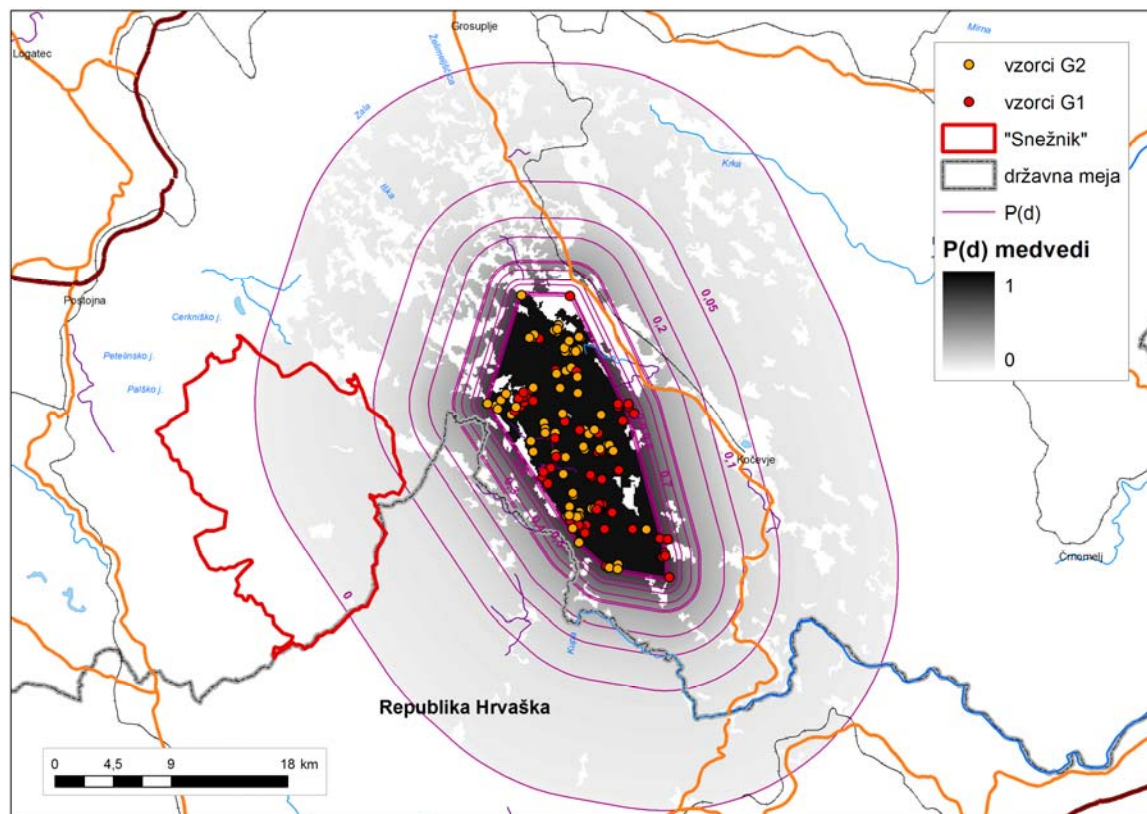
tabela 17: Rezultati ocene številčnosti superpopulacije na vzorčnem območju Glažuta. V vzorčenju G2 nismo mogli najti modela, s katerim bi ustrezno opisali CMR in nismo dobili uporabnih rezultatov. V vzorčenju G1 nismo mogli modelirati vsakega spola posebej, zato je podana samo ocena skupnega števila osebkov.

vzročanje		G1 (pomlad)	G2(jesen)
trajanje vzorčenja(dni)		36	50
število vzorcev		67	77
odlovljenih živali		29	43
samice		19	25
samcev		10	17
zaprtost populacije		DA	NE
POPAN	N(skupaj)	39	-
	SE(skupaj)	5,853	-
HUGGINS	N(skupaj)	38	-
	SE(skupaj)	4,763	-

Ker se populacija v G1 obnaša kot zaprta, bi bila uporaba Hugginsovega modela primerna. Ocena tega modela ima tudi manjšo napako, vendar smo se raje konzervativno odločili uporabiti oceno POPAN modela, kjer je manjša verjetnost kršitve predpostavk.

15. OCENA POPULACIJSKE GOSTOTE NA VZORČNEM OBMOČJU »GLAŽUTA«

Za oceno gostote populacije smo uporabili isti postopek kot pri Snežniku in iste ocene $P(d)$, vendar samo za oba spola skupaj (slika 14, tabela 18).



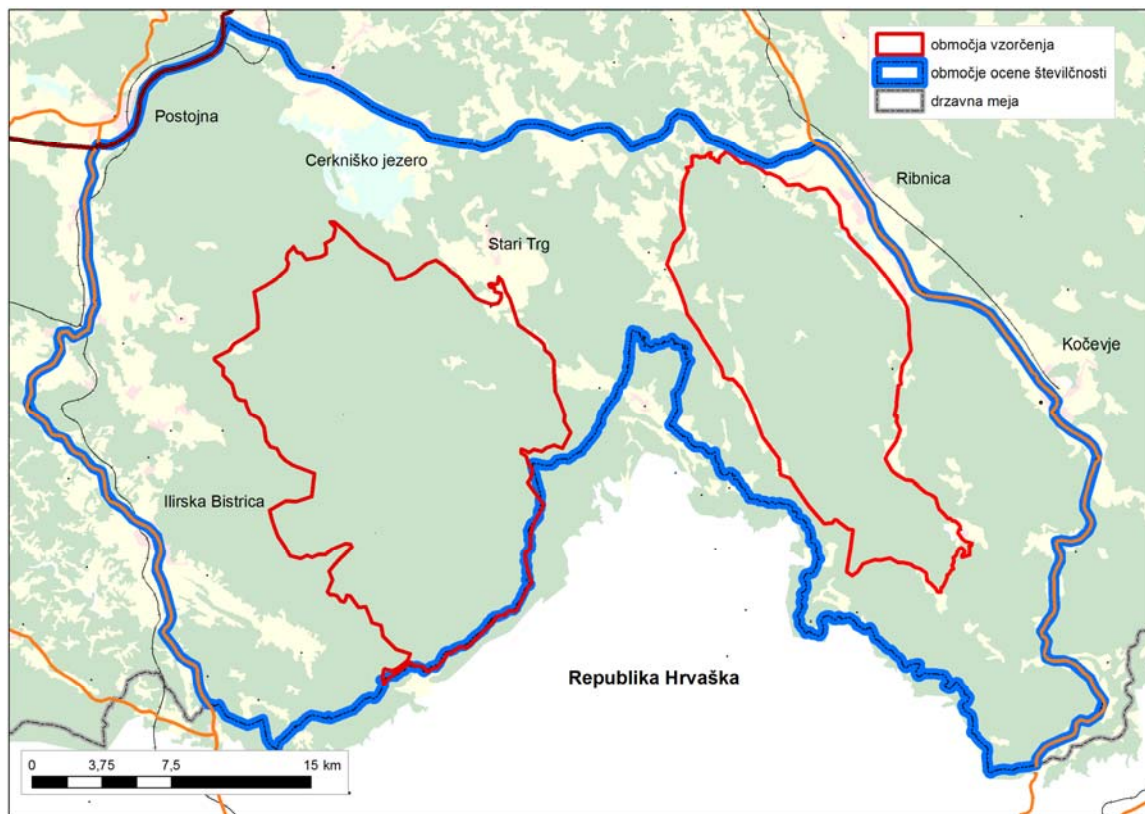
slika 14: Probabilistična površina za samce za izračun populacijske gostote medvedov na vzorčnem območju »Glažuta«. Verjetnost, da medvedi prihajajo v vzorčenje pada od območja vzorčenja proti robu. Površine brez gozda imajo $P(d) = 0$. Koncentrične črte povezujejo točke z isto $P(d)$.

tabela 18: Rezultati ocene gostote populacije medvedov za vzorčno območje "Glažuta".

vzorčno območje Glažuta	samci + samice
prispevna površina superpopulacije ($A_{superpop}$)	336,75
SE($A_{superpop}$)	8,82
število živali v superpopulaciji (N)	39
SE (N)	5,85
95% CI max	51
95% CI min	29
gostota (medvedov / 10 km²)	1,16
SE(gostota)	0,18
95% CI max	1,51
95% CI min	0,82

16. OCENA ŠTEVILČNOSTI MEDVEDOV V ŠIRŠI HABITATNI KRPI, KI ZAJEMA VZORČNI OBMOČJI GLAŽUTA IN SNEŽNIK

Ocene gostote populacije ne moremo širiti daleč izven območij vzorčenja, ker lahko zagrešimo zelo grobo napako, saj bi morali narediti nerealistično predpostavko, da so gostote po celotnem območju medveda v Sloveniji enake. Vendar pa lahko s podatki o gostoti ocenimo številčnost populacije v širši habitatni krpi, v kateri sta naši vzorčni območji (slika 15).



slika 15: Območje, na katerem lahko ocenimo število medvedov v letih 2004 in 2005.

Vzorčili smo v treh letnih časih, dveh koledarskih letih in na dveh različnih območjih z različnimi terenskimi ekipami in dobili praktično identične ocene gostote. Celotno območje, za katero menimo, da lahko ocenimo številčnost, spada v prispevno območje vzorčenj. Območje je omejeno s poseljenimi dolinami in magistralnimi cestami, kar najverjetneje nekoliko poveča njegovo zaprtost. Zaradi navedenega se zdi predpostavka o enakomerni gostoti v tem območju utemeljena, kar nam omogoči oceno števila medvedov, ki so tam živeli leta 2004. Glede na podatke iz območja »Snežnik« v letu 2005 pa lahko sklepamo tudi, da se do leta 2005 gostota in s tem tudi številčnost najverjetneje nista bistveno spremenili. Rezultate ocene številčnosti povzema [tabela 19](#).

tabela 19: Izračun števila medvedov za območje Snežnika, Javornikov, Velike gore in Stojne leta 2004 (2005).

	km2	ha	%
celotna površina	1285,76	128576	100,0%
površina gozda	997,41	99741	77,6%
populacijska gostota (<i>D</i>)	12,48 medvedov / 100 km2 gozda		
SE(<i>D</i>)	1,07 medveda / 100 km2 gozda		
N	125 medvedov		
SE(<i>N</i>)	10,69 medvedov		
95% CI min	104 medvedov		
95% CImax	145 medvedov		

Razmeroma dobro oceno velikosti superpopulacije nekoliko »pokvari« dodana variabilnost prispevne površine. Ta vpliv je odvisen od velikosti območij vzorčenja in postane pri velikem območju skoraj zanemarljiv. ANOVA test kaže, da so gostote enake ($f = 0,006$; $p = 0,999$), tako da smo izračunali povprečno gostoto in združili variance vseh vzorčenj, kjer smo kot stopnje prostosti posameznega vzorčenja uporabili število živali dejansko ujetih v vsakem vzorčenju.

Pri oceni je potrebno povedati, da je zaradi biasa, ki ga povzroča primanjkljaj daljših premikov v analizi premikov (glej stran 30), ocena gostote in posledično številčnosti verjetno nekoliko višja od dejanske vrednosti, tako da je zgornja meja intervala zaupanja verjetno nekoliko previsoka.

17. DISKUSIJA OCEN ŠTEVILČNOSTI IN POPULACIJSKE GOSTOTE

V študiji nam je uspelo z veliko zanesljivostjo in ozkim intervalom zaupanja oceniti velikost superpopulacije na dveh neodvisnih vzorčnih območjih v štirih vzorčenjih (tabela 20). Pri tem smo uporabljali več pristopov k modeliranju številčnosti superpopulacije in razvili popolnoma nov pristop ocenjevanja populacijske gostote s pomočjo lokacij neinvazivnih vzorcev.

Rezultati se med seboj komplementarno dopolnjujejo in potrjujejo. Na vzorčnem območju "Snežnik" smo v treh popolnoma ločenih vzorčenjih z modeliranjem po treh različnih metodah dobili identično oceno številčnosti superpopulacije in posledično populacijske gostote. Na vzorčnem območju »Glažuta« smo spet z drugim osebjem na terenu in drugačnim režimom vzorčenja prišli do skoraj identične populacijske gostote. Dodatna potrditev pa je ocena spolne strukture, saj smo po dveh neodvisnih poteh, neposredno iz neinvazivnih vzorcev in posredno iz razmerja populacijskih gostot samcev in samic v treh vzorčenjih na območju »Snežnik« prišli do zelo podobnega rezultata. Našteto nam vliva zaupanje v metodologijo, ki smo jo uporabili, novo razvito metodo določanja populacijske gostote in naše delo v tem projektu nasploh.

tabela 20: Rezultati ocene številčnosti superpopulacije in populacijskih gostot po vzorčnih območjih "Snežnik« (2004, 2005) in Glažuta (2004); primerjava ocene spolne strukture iz neinvazivnih genetskih vzorcev in ocene spolne strukture iz razmerja populacijskih gostot.

vzorčna območja	Snežnik			Glažuta
	samice	samci	samci+samice	samci + samice
prispevna površina superpopulacije($A_{superpop}$)	445,95	566,68	474,21	336,75
SE ($A_{superpop}$)	6,53	30,35	8,82	8,82
število živali v superpopulaciji (N)	<u>31</u>	<u>29</u>	<u>60</u>	<u>39</u>
SE (N)	2,68	2,57	3,71	5,85
95% CI max	36	34	67	51
95% CI min	26	24	53	29
<u>gostota (medvedov / 100 km² gozda)</u>	<u>7,02</u>	<u>5,17</u>	<u>12,75</u>	<u>11,65</u>
SE (gostota)	0,61	0,53	0,82	1,77
95% CI max	8,22	6,22	14,34	15,12
95% CI min	5,82	4,12	11,15	8,17
gostota samci + samice (medvedov/100 km ² gozda)	Σ ocen po spolu: 12,19		12,75	11,65
	samice	samci		
spolna struktura iz neinvazivnega vzorčenja	56,9%	43,1%		
spolna struktura iz razmerja populacijskih gostot	57,58%	42,42%		

18. SIMULACIJE IN ANALIZA POTREBNEGA TRUDA ZA ŠTUDIJO CELOTNE SLOVENSKE POPULACIJE MEDVEDOV Z NEINVAZIVNIMI GENETSKIMI VZORCI

Pomemben del načrtovanja študije ocene številčnosti s pomočjo neinvazivnega vzorčenja je načrt vzorčenja, za katerega pa je spet ključni podatek število vzorcev, ki jih potrebujemo, da lahko populacijo ocenimo z želenim intervalom zaupanja.

V programu MARK smo simulirali različne scenarije števila nabranih vzorcev in ugotavljali intervale zaupanja, ki jih lahko pričakujemo. V modelih smo simulirali 600 različnih živali, kar je glede na naše rezultate optimistična zgornja meja številčnosti populacije. Pri parametrizaciji simulacij smo bili previdni in smo uporabili znatno nižjo vrednost uspešnosti genotipizacij od uspešnosti v pilotski študiji. Simulirali smo analizo 600, 800 in 1000 delujočih vzorcev. Za vsako število vzorcev smo naredili po 1000 iteracij.

tabela 21: Rezultati simulacij vzorčenja celotne Slovenske populacije medvedov s pričakovanim intervalom zaupanja ter ocena potrebnega števila vseh vzorcev za robustno oceno.

št. iteracij	1000					
št. osebkov	600					
odlovnih obdobj	6					
simuliran model	Huggins, p=c(.)					
model za ocen.	Huggins, p=c(.)					
št. vzorcev	p	N^(osebkov)	SE(N^)	95% interval zaupanja		CI%
1000	0,28	600,46	12,70	<u>575,57</u>	<u>625,34</u>	<u>8,0%</u>
800	0,22	600,59	18,37	<u>564,58</u>	<u>636,59</u>	<u>12,0%</u>
600	0,17	601,57	27,84	<u>547,01</u>	<u>656,14</u>	<u>18,1%</u>
Število vzorcev	1000,00	800,00	600,00			
delež delujočih	70%	70%	70%			
interval zaupanja (CI)	8%	12%	18%			
potrebnih vzorcev	1429	1143	857			

Simulacije kažejo, da bi že s 600 delujočimi vzorci oziroma 857 vzorci skupno prišli do uporabne ocene velikosti populacije. Individualne heterogenosti ulovljivosti, ki je največji problem ocen številčnosti, v pilotski študiji nismo opazili in je tudi v večji študiji zaradi medvedov samih ne pričakujemo. Lahko pa pride do heterogenosti pri neenakomernem vzorčenju, zato je ključnega pomena zagotoviti dobro, homogeno vzorčenje po celotnem območju študije. Najboljši način za zmanjševanje heterogenosti je povečanje ulovljivosti, to pomeni števila vzorcev. Zaradi tega bi morali v takšni širši študiji stremeti za vsaj 1100 do 1200 vzorci, saj bi s tem tudi v primeru individualne heterogenosti ulovljivosti zagotovili robustno oceno.

V Sloveniji imamo visoko gostoto medvedov, dobro organizirane lovce in gozdarsko službo ter gosto prepleteno mrežo gozdnih cest, ki omogoča dostop do praktično vsakega dela medvedovega habitata. Zato ocenjujemo, da bi bila takšna širša študija ob zadostnem interesu omenjenih organizacij brez nadaljnega izvedljiva.

19. REFERENCE

1. Adams JR, Waits LP. 2007. 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* 8(1):123-31.
2. Bellemain E, Swenson JE, Tallmon D, Brunberg S, Taberlet P. 2005. Estimating Population Size of Elusive Animals with DNA from Hunter-Collected Feces: Four Methods for Brown Bears. *Conservation Biology* 19(1):150-61.
3. Bellemain E, Taberlet P. 2004. Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Molecular Ecology Notes* 4(3):519-22.
4. Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* 13(11):3261-73.
5. Cooch E, White G. 2007. Program MARK, "A gentle introduction". 5 ed. <http://www.phidot.org/software/mark/docs/book/>.
6. Dieringer D, Schlotterer C. 2003. microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes* 3(1):167-9.
7. Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
8. Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press. 1 p.
9. Frantz AC, Pope LC, Carpenter PJ, Roper TJ, Wilson GJ, Delahay RJ, Burke T. 2003. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology* 12(6):1649-61.
10. Garza JC, Williamson EG. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10(2):305-18.
11. Huggins RM. 1989. On the statistical analysis of capture experiments. *Biometrika* 76:133-40.
12. Jolly GM. 1965. Explicit estimates from capture-recapture data with both death and immigration - Stochastic model. *Biometrika* 52:225-47.
13. Kendall WL, Pollock KH, Brownie C. 1999. A likelihood-based approach to capture-recapture estimation of demographic parameters under the robust design. *Biometrics* 51:293-308.
14. Miller C, Joyce P, Waits LP. 2002. Assessing Allelic Dropout and Genotype Reliability Using Maximum Likelihood. *Genetics* 160:357-66.

15. Murphy MA, Waits LP, Kendall KC. 2003. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology* 12(8):2261-5.
16. Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure of Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347-54.
17. Paetkau D, Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489-95.
18. Piggott M, Bellemain E, Taberlet P, Taylor AC. 2004. A Multiplex Pre-Amplification Method that Significantly Improves Microsatellite Amplification and Error Rates for Faecal DNA in Limiting Conditions. *Conservation Genetics* 5(3):417-20.
19. Pollock KH. 1982. A Capture-Recapture Design Robust to Unequal Probability of Capture. *Journal of Wildlife Management* 46(3):752-7.
20. Pradel R. 1996. Utilization of capture-mark-recapture for the study of recruitment and population growth rate. *Biometrics* 52:703-9.
21. Raymond M, Rousset F. 1994. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-3.
22. Schwarz CJ, Arnason AN. 1996. A general methodology for the analysis of open-model capture recapture experiments. *Biometrics* 52:59-64.
23. Seber GAF. 1965. A note on the multiple recapture census. *Biometrika* 52:249-59.
24. Simonič A. 1992. The legal protection of the brown bear in Slovenian territory - past and present, and some suggestions for the future. *Zbornik posvetovanja o rjavi medvedu v deželah Alpe - Adria*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo, Ljubljana, Slovenia; p 43-76.
25. Taberlet P, Camarra JJ, Griffin S, Uhres E, Hanotte O, Waits LP, Dubois-Paganon C, Burke T, Bouvet J. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6(9):869-76.
26. Taberlet P, Griffin S, Goossens B, Questiau S, Manceau V, Escaravage N, Waits LP, Bouvet J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucl Acids Res* 24(16):3189-94.
27. Valiere N. 2002. gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2(3):377-9.
28. White GC, Burnham KP. 1999. Program MARK: Survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46(Supplement):120-30.
29. Wilberg MJ, Dreher BP. 2004. Genecap: a program for analysis of multilocus genotype data for non-invasive sampling and capture-recapture population estimation. *Molecular Ecology Notes* 4(4):783-5.