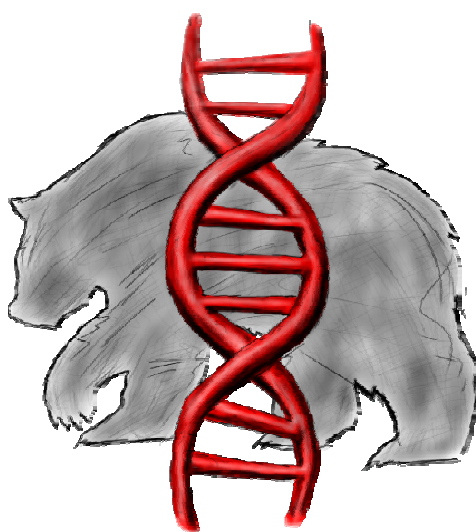


Univerza
v Ljubljani *Biotehniška*
fakulteta



PROJEKT

ANALIZA MEDVEDOV ODVZETIH IZ NARAVE IN GENETSKO-MOLEKULARNE RAZISKAVE POPULACIJE MEDVEDA V SLOVENIJI

ZAKLJUČNO POROČILO

I DEL: VARSTVENA GENETIKA IN OCENA ŠTEVILČNOSTI MEDVEDA 2007

TOMAŽ SKRBINŠEK, MAJA JELENČIČ, HUBERT POTOČNIK, PETER TRONTELJ, IVAN KOS

UNIVERZA V LJUBLJANI, BIOTEHNIŠKA FAKULTETA, ODDELEK ZA BIOLOGIJO

LJUBLJANA, NOVEMBER 2008

ANALIZA MEDVEDOV ODVZETIH IZ NARAVE IN GENETSKO-MOLEKULARNE RAZISKAVE POPULACIJE MEDVEDA V SLOVENIJI

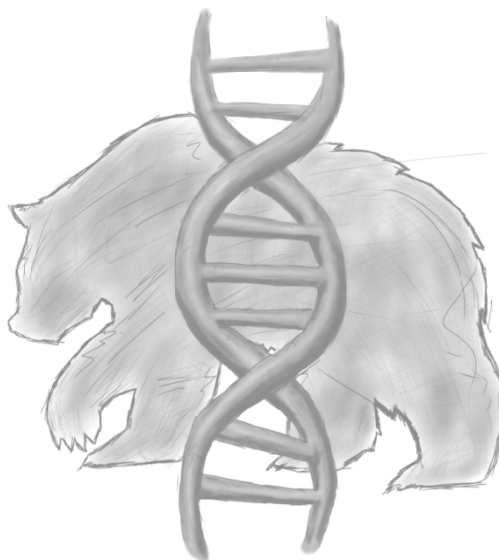
Zaključno poročilo, November 2008

Raziskavo je omogočila Agencija Republike Slovenije za okolje.

Zahvaljujemo se Lovski zvezi Slovenije, Zavodu za gozdove Slovenije in vsem sodelujočim lovskim družinam, zvezam lovskih družin, loviščem s posebnim namenom in območnim enotam Zavoda za gozdove Slovenije za pomoč pri izvedbi raziskave.

Gospodu Blažu Kržetu se zahvaljujemo za neprecenljivo pomoč pri organizaciji vzorčenja.

Največja zahvala pa gre vsem lovcem, gozdarjem in drugim, ki so sodelovali pri iskanju vzorcev. Brez njih ne bi mogli narediti nič.



ORGANIZACIJA POROČILA

I DEL: VARSTVENA GENETIKA IN OCENA ŠTEVILČNOSTI MEDVEDA 2007

TOMAŽ SKRBINŠEK, MAJA JELENČIČ, HUBERT POTOČNIK, PETER TRONTELJ, IVAN KOS

II DEL: ANALIZA VSEBINE PREBAVIL MEDVEDOV (*URSUS ARCTOS* L.) ODVZETIH IZ NARAVE V SLOVENIJI V LETIH 2006 – 2008

MIHA KROFEL, NIVES PAGON, PETRA ZOR, IVAN KOS

Uvod

Zdi se, da je medved vrsta, ki malo koga pusti ravnodušnega. Od debat v strokovnih in političnih krogih pa vse do debat za šankom ob kozarcu rujnega ima vsak o tem prebivalcu naših gozdov svoje mnenje. Vsaka upravljavska poteza je vedno pod drobnogledom, vsak nov dogodek vedno na naslovnica časopisov.

Tako širok javni interes pa ima tudi svoje posledice, saj so kakršne koli odločitve v zvezi z medvedom vedno pospremljene z negodovanjem dela javnosti. Če za odločitve ni zelo dobrih argumentov, se to kaj hitro prevesi v nasprotovanje, bodisi prisotnosti medveda ali odločitvam samim. Za medveda, ki je evropsko pomembna ogrožena vrsta in pomemben del naše naravne in kulturne dediščine, je tak razplet najslabši. Z medvedom ni vedno lahko živeti, njegov obstoj pa je popolnoma odvisen od tolerance ljudi, ki si z njim delijo življenski prostor. Če postane medved glavna dnevno politična tema in stalen vir konfliktov, se lahko ta toleranca kaj kmalu izgubi. Zato je toliko pomembnejše, da vse odločitve, ki posredno ali neposredno vplivajo na populacijo medveda, stojijo na čim trdnejših temeljih.

Hiter razvoj molekularne genetike nam je v zadnjem desetletju dal orodja, s katerimi se lahko lotimo vprašanj, ki so se včasih zdela nerešljiva. Tako smo se s podporo Agencije Republike Slovenije za okolje s temi orodji lotili problema, ki že vrsto let burka javnost: ocene številčnosti populacije medveda v Sloveniji.

Zastavljena naloga je izjemno zahtevna in je ne bi mogli izpeljati brez široke podpore velikega števila organizacij in posameznikov, ki so v njej nesebično sodelovali. Vloga Lovske zveze Slovenije in Zavoda za gozdove Slovenije je bila neprecenljiva. Vzorčenja, najbolj ključnega dela celotne raziskave, ne bi bilo mogoče izpeljati brez nesebične podpore lovcev, poklicnih lovcev lovišč s posebnim namenom, gozdarjev območnih enot ZGS in drugih prostovoljcev, ki jim ni bilo vseeno.

Ko smo septembra 2007 čakali na prve vzorce s terena, smo marsikatero noč bolj slabo spali. Če vzorcev ne bi bilo, bi imeli velik problem, celotna raziskava pa bi zelo neslavno in z veliko hrupa propadla. Izkazalo se je, da so bile skrbi odveč – sodelujoči so se izjemno izkazali in uspelo nam je izvesti zelo dobro vzorčenje, ki je kasneje botrovalo tudi dobrim rezultatom. Vzorčenje seveda ni bilo popolno – nič v življenju ni. Je pa bilo dovolj dobro in to je vse, kar smo potrebovali.

Poročilo, ki ga imate pred seboj, je tako plod dela več sto ljudi in ne samo avtorjev, ki smo pod njim podpisani. Vsak korak na poti do rezultatov je dokumentiran in predstavljen in vsak rezultat temelji na dejanskih podatkih s terena. Naključje in nepredvidljivost, edini stalnici v naravi, smo vključili s statističnimi metodami in se odražata v intervalih zaupanja ob vseh rezultatih.

Menimo, da smo s skupnimi močmi izpeljali eno najtemeljitejših tovrstnih raziskav v Evropi in svetu ter postavili dober temelj učinkovitemu upravljanju in varstvu medveda pri nas ter hkrati dodali pomemben kamenček v mozaik znanja o tej vrsti.

Avtorji

Želimo, da bi bili rezultati raziskave čim bolj uporabni. Poročilo je precej obsežno, zato smo pripravili »povzetek za uporabnike«, ki kondenzirano, kljub temu pa kar podrobno, obravnava ključna metodološka vprašanja in predstavi pomembnejše rezultate. Najdete ga za kazalom.

1. KAZALO VSEBINE

1.	Kazalo vsebine.....	i
2.	Kazalo tabel.....	v
3.	Kazalo slik.....	vii
4.	Povzetek za uporabnike	I
4.1.	Uvod.....	I
4.2.	Laboratorijske metode.....	I
4.3.	Analiza podatkov	II
4.4.	Rezultati.....	IV
4.4.1.	Neinvazivno vzorčenje 2007	IV
4.4.2.	Rezultati laboratorijskih analiz	VI
4.5.	Končna ocena številčnosti medvedov v Sloveniji za vzorčenje september – december 2007	X
4.6.	Genetska pestrost rjavega medveda v sloveniji - rezultati	XIII
5.	Materiali in metode.....	1
5.1.	Laboratorijske metode.....	1
5.1.1.	Organizacija laboratorijev, pretok ljudi in materiala.....	1
5.1.2.	Neinvazivni laboratorij	1
5.1.3.	Tkivni laboratorij.....	1
5.1.4.	PCR soba	1
5.1.5.	Soba z avtomatskim sekvenatorjem	2
5.2.	Hranjenje tkivnih vzorcev, izolacija DNA in hranjenje izolirane DNA	2
5.3.	Hranjenje neinvazivnih vzorcev, izolacija DNA in hranjenje izolirane DNA.....	2
5.4.	Genetski markerji, PCR in sledljivost vzorcev	2
5.4.1.	Genetski markerji	2
5.4.2.	PCR multipleksi.....	4
5.5.	Sledljivost vzorcev in preprečevanje zamenjave vzorcev.....	5
5.6.	Amplifikacija tkivnih vzorcev.....	6
5.7.	Amplifikacija neinvazivnih vzorcev	6

5.8.	Določanje genotipov	6
5.9.	Populacijsko – genetske metode in ocenjevani parametri.....	9
5.10.	Shranjevanje in obdelava rezultatov genotipizacije	11
5.11.	Iskanje vzorcev z istimi genotipi	12
5.12.	Modeliranje lova, označevanja in ponovnega ulova	13
5.12.1.	Modeli za zaprte populacije	14
5.12.2.	Modeli za odprte populacije.....	14
5.12.3.	Stopnja ujemanja (goodness-of-fit, GoF).....	14
5.13.	Korekcija učinka roba in izračun trenutne populacije.....	15
5.13.1.	Izpeljava korekcije efekta roba in izračuna trenutne populacije iz superpopulacije	15
5.13.2.	Korekcija ulovljivosti zaradi verjetnosti, da bo osebek zapustil območje vzorčenja	18
6.	Neinvazivno vzorčenje	19
6.1.	Priprava načrta vzorčenja.....	19
6.2.	Testiranje, oblikovanje in priprava materiala za vzorčenje.....	21
6.3.	Komunikacija z izvajalci vzorčenja in razdeljevanje materiala	22
6.4.	Komunikacija med vzorčenjem	23
6.5.	Vmesno pobiranje materiala in dostava dodatnega materiala	23
7.	Rezultati vzorčenja iztrebkov medveda	25
8.	Rezultati laboratorijskih analiz	27
8.1.	Neinvazivni vzorci	27
8.1.1.	Uspešnost amplifikacije DNA iz neinvazivnih vzorcev.....	27
8.1.2.	Število najdenih genotipov in spolno razmerje	28
8.2.	Tkivni vzorci	29
8.2.1.	Uspešnost amplifikacije, ocena napak	29
9.	Modeliranje ulova – ponovnega ulova in ocena velikosti populacije	31
9.1.	Priprava podatkov za CMR modeliranje	31
9.1.1.	Pregled podatkov.....	31
9.2.	Analiza gibanja živali in ocena $p(r)$	33

9.2.1.	Analiza premikanja osebkov	34
9.3.	Izdelava modelov ulova–ponovnega ulova (CMR) – splošna opažanja.....	37
9.4.	Testiranje modelov na območju, za katerega predvidevamo popolno zaprtost populacije	37
9.5.	Izdelava CMR modelov in ocena velikosti populacije po habitatnih krpah	41
9.6.	Podrobnejši pregled posameznih habitatnih krp.....	42
9.6.1.	Severozahodna Slovenija in avtocesta Ljubljana – Koper	42
9.6.2.	Območje Pivka – Brkini	44
9.6.3.	Območje Javorniki - Snežnik	46
9.6.4.	Območje Menišija – Racna gora	48
9.6.5.	Območje Velike gore in Goteniške gore.....	50
9.6.6.	Območje Suha krajina – Dobropolje	52
9.6.7.	Območje Suha krajina - Rog.....	54
9.6.8.	Območje Dolenjska vzhod	56
9.7.	Ocena številčnosti medvedov za celotno območje prisotnosti medveda v Sloveniji	59
9.7.1.	Test predpostavke o demografski zaprtosti in skladnosti modela (GOF).....	59
9.7.2.	Priprava podatkov	59
9.7.3.	Modeli ulova – ponovnega ulova	60
9.7.4.	Korekcija razlike med superpopulacijo in trenutno populacijo in korekcija nevzorčenega območja.....	62
10.	Končna ocena številčnosti medvedov v Sloveniji za vzorčenje september – december 2007.....	64
11.	Genetska pestrost rjavega medveda v sloveniji - rezultati	67
11.1.	Mere genske raznolikosti	67
11.1.1.	Frekvence alelov	68
11.1.2.	Genska diverziteta	70
11.1.3.	Garza Williamsonovi indeksi (GW indeks).....	73
11.1.4.	Vezavno neravnovesje lokusov	73
11.2.	Genetska pestrost rjavega medveda v Sloveniji - razprava	75
11.3.	Genska diverziteta medvedov v Sloveniji - sklepi.....	78
12.	VIRI.....	79

2. KAZALO TABEL

Tabela 1: Sekvence primerjev in barvila s katerimi so označeni. * F (Forward) – označuje primerje, ki se vežejo na matrično DNA na 5' koncu; R (Reverse) – pa primerje, ki se vežejo 3' koncu. **vsaka od barv označuje imena barv za fluorescentna barvila NED - rumena; VIC - zelena; 6FAM - modra; PET - rdeča.....3

Tabela 2: Število ujemanj po številu lokusov v tkivnih vzorcih ($N=498$) in pričakovano število ujemanj E(ujemanj) v ocenjeni celotni populaciji ($N^*=434$). Kot vidimo, lahko pričakujemo, da se različna medveda ne bosta ujemala na najmanj dveh lokusih, verjetnost, da bi se ujemala na več kot osmih lokusih, pa je zelo nizka..... 12

tabela 3: Rezultati simulacij vzorčenja celotne Slovenske populacije medvedov s pričakovanim intervalom zaupanja ter ocena potrebnega števila vseh vzorcev za robustno oceno..... 20

Tabela 4: Pregled števila nabranih vzorcev po sodelujoči organizaciji. Številke se razlikujejo od vmesnega poročila 3, ker je pri omenjenem poročilu prišlo do napake. Ker so se nam vzorci vračali po različnih poteh, smo kot kriterij vzeli organizacijo, v kateri je sodelujoči dobil material za vzorčenje.25

Tabela 5: Pregled uspešnosti in PCR problemov po lokusih za vzorce iztrebkov. Pogostost izpada alelov in lažnih alelov je izračunana za vzorce, ki so se uspešno amplificirali v PCR.27

Tabela 6: Pregled uspešnosti PCR, težav in ocena napak po lokusih za tkivne vzorce. 29

Tabela 7: Ocene števila medvedov v simuliranem zaprtem območju (uporabljeni dejanski podatki vzorčenja) in tem istem območju brez simulirane demografske zaprtosti. Območji za samce in samice sta različno veliki, tako da spolno razmerje ne odraža razmerja v populaciji. 39

Tabela 8: Razmerja med pričakovanimi in opaženimi migranti na simuliranem zaprtem območju..... 39

Tabela 9: Končen niz modelov za oceno številčnosti populacije medveda, urejen po AICc. Hugginsov model za zaprte populacije, modelov c <> p nismo upoštevali, ker nimajo biološkega smisla (in se tudi po AICc izkažejo kot neustrezni)..... 60

Tabela 10: Ocene ulovljivosti za najboljši model. Ulovljivost je visoka, kar zagotavlja nizek vpliv individualne heterogenosti ulovljivosti. 60

Tabela 11: Povprečenje modelov po Akaikovih utežeh. Variabilnost med modeli je zelo nizka.61

Tabela 12: Struktura ocene številčnosti medvedov in končna ocena številčnosti medvedov v Sloveniji ob začetku in koncu neinvazivnega vzorčenja jeseni 2007. N^* v tabeli pomeni ocenjena številčnost. 64

Tabela 13: Pregled števila najdenih genotipov, ocen superpopulacije (N^*_{SP}) in ocen trenutne populacije ($N^*_{t_0}$) po habitatnih krpah z oceno standardne napake vsakega parametra. Ocene števila in ocene napak za nevezorčeno območje so ekstrapolirane iz območja »Suha krajina – Rog« in so zato nezanesljive. Številke v prvem stolpcu se navezujejo na karto na Slika 30..... 66

Tabela 14: Ocene populacije medvedov in gostot po habitatnih krpah. Gostote so ocenjene kot število osebkov na 10.000 hektarjev (100 km²). Površine so podane v hektarjih. Ocene števila in ocene napak za nevezorčeno območje so ekstrapolirane iz območja »Suha krajina – Rog« in so zato nezanesljive. Ocene veljajo za obdobje vzorčenja med septembrom in decembrom 2007 in ni nujno, da opažene razporeditve odražajo stanje v drugih letnih časih in drugih letih. Številke v prvem stolpcu se navezujejo na karto na Slika 30..... 66

Tabela 15: Redki aleli na posameznem lokusu.	68
Tabela 16: Pogosti aleli na posameznem lokusu.....	69
Tabela 17: Osnovni parametri, ki opisujejo gensko diverziteto rjavih medvedov v Sloveniji.....	71
Tabela 18: Opažena in pričakovana heterozigotnost ter P-vrednosti izračunane v eksaktnem testu Hardy Weinbergovega ravnovesja	72
Tabela 19: Vezavno neravnovesje med pari lokusov v populaciji. + lokusa sta v vezavnem neravnovesju; – lokusa nista v vezavnem neravnovesju.....	74
Tabela 20: Genska in alelska diverziteta na osmih mikrosatelitskih lokusih nekaterih medvedjih populacij z različnih območij.	75

3. KAZALO SLIK

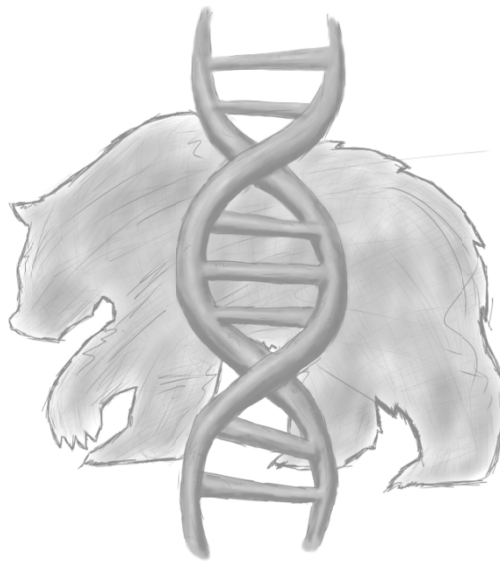
Slika 1: Razporeditev mikrosatelitskih lokusov v treh multipleksih. Na x osi je dolžina alelov, črte pri posameznem lokusu pa ponazarjajo razpon pričakovanih dolžin alelov. Barvni kvadrati ponazarjajo temperaturo vezave oligonukleotidov (annealing), pri kateri se lokus bolje amplificira – rdeče višja temperatura (~60°C), rumeno srednja (~55°C) in modro nižja temperatura (~50°C). Dva kvadrata vodoravno kažeta da se pri prvi (levi) temperaturi bolje amplificira kot pri drugi, dva kvadrata navpično pa kažeta, da se pri obeh temperaturah lokus amplificira podobno.	4
Slika 2: Razporeditev lokusov v neinvazivnem multipleksu.	5
Slika 3: Protokol in urejanje vzorcev za pripravo PCR.	6
Slika 4: Algoritem za sprejemanje in označevanje alelov v izpisu sekvenatorju v programu GeneMapper (v angleščini zaradi priprave znanstvenega članka).	7
Slika 5: Algoritem za zagotavljanje zanesljivosti genotipizacije neinvazivnih vzorcev (v angleščini zaradi priprave znanstvenega članka).	8
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 (Skrbinšek s sod., 2007).	13
slika 7: Območje vzorčenja 2007 z vrisanimi mejami lovišč.	19
slika 8: Pričakovano število vzorcev na 10 km ² (1000 ha) po lovišču.	21
slika 9: Paket za lovišče s paketi za posamezne sodelujoče, brošuro in pismom za gospodarja LD.	22
Slika 10: Lokacije neinvazivnih vzorcev, zbranih v vzorčenju 2007. Vidimo lahko razmeroma homogeno prostorsko razporeditev vzorcev z zgostitvijo proti osrednjemu delu območja medveda in redkejšimi vzorci proti robovom.	26
Slika 11: Razporeditev 1 × ujetih živali. V ozadju je prostorska gostota 1 × ujetih živali (kernel). Jasno se vidi gradient od meje s Hrvaško in od meje območja, ki ni bilo vzorčeno. Črte (izoprobe) kažejo ocenjeno verjetnost, da bo osebek zapustil območje vzorčenja. Zaradi različnih vzorcev gibanja se te ocene za samce in samice razlikujejo.	31
Slika 12: Časovni pregled vzorcev. Čas gre od leve proti desni, vsak vzorec je v svoji vrstici. Vodoravne črte povezujejo vzorce istih osebkov. Lahko vidimo, da je bila intenzivnost vzorčenja največja na začetku, potem pa je upadala. Naslednji dvig intenzivnosti lahko vidimo po osmem tednu, kmalu po drugem obisku sodelujočih ZLD.	32
Slika 13: Gibanje živali, zajetih v neinvazivno vzorčenje medvedov 2007. Črte povezujejo vzorce istega osebk.	33
Slika 14: Inveržno kumulativno število opaženih razdalj med pari točk istega osebk. manjših ali enakih razdalji na x osi. Črtkane črte označujejo 95% CI, pridobljen z neparametričnim bootstrapom (1000 iteracij). Pri predpostavki filopatije opisuje radije gibanja povprečnega osebk. Med samci in samicami se ti radiji znatno razlikujejo – pri samicah je mediana prehojenih razdalj približno 2000 m, pri samcih pa okrog 5500 metrov. Modra črta = 0,05, rdeča črta = 0.01.	34

Slika 15: Histogram razdalj med pari točk iste živali.	35
Slika 16: Primerjava distribucije opaženih razdalj pri samcih in samicah v časovnem oknu 90 dni. Pri samicah je mediana okrog 2000 m, pri samcih pa približno 5500 m (približki podani zaradi pozicijske natančnosti lokacij vzorcev, ki so zabeležene v kilometrski mreži).	35
Slika 17: Primerjava opaženih razdalj med pari vzorcev iste živali v 90, 60, 30 in 20 dnevni časovni oknih. Z večanjem širine časovnega okna sicer opazimo več zelo dolgih premikov, kar je razumljivo, saj večamo vzorec in imamo večjo verjetnost zaznavanja redkih dogodkov. Mediana in distribucija ostajata bolj ali manj isti.	36
Slika 18: Del populacije, za katerega predvidevamo demografsko zaprtost. Zaprti območji za samce in samice se razlikujeta (območji z p izhoda ≤ 0.05). Na ta način smo simulirali stanje na dejanski meji celotnega območja vzorčenja in testirali uporabljene metode.	38
Slika 19: Razdelitev območja vzorčenja na podobmočja. Kot kriterij smo uporabili razdeljenost prostora z rabo in cestami ter število opaženih prehodov medvedov. Številke območij ustrezajo številkam v tabeli 13 in tabeli 14.	41
Slika 20: Vzorčenje medveda v habitatni krpi zahodna Slovenija. Značilno je majhno število medvedov, visoka ulovljivost in najverjetneje močan vpliv avtoceste Ljubljana – Koper.	42
Slika 21: Karta vzorčenja za območje Pivka – Brkini. Na jugovzhodu območja je vidnih nekaj enkratnih ulovov živali, ki jih lahko pripisujemo precejšnji odprtosti območja proti Hrvaški in slabšemu vzorčenju na jugu habitatne krpe Javorniki – Snežnik.	44
Slika 22: Karta vzorčenja območja Javorniki – Snežnik. Vzorčenje se zdi zelo intenzivno na severu te habitatne krpe, nekoliko slabše pa je na južnem delu snežniške planote. Kljub temu je nekaj ponovnega ulova, območje brez vzorcev pa se ne zdi preveliko.	46
Slika 23: Karta vzorčenja medvedov za območje Menišija – Racna gora. Zaradi zelo dobro izpeljanega vzorčenja in precejšnje zaprtosti območja proti nevzorčenim območjem je v tej krpi ocena številčnosti zelo dobra.	48
Slika 24: Karta vzorčenja medvedov za območje Velike, Goteniške gore in Kolpskih sten. Del območja smo iz metodoloških razlogov izrezali kot »luknjo v vzorčenju« in ocenjevali posebej.	50
Slika 25: Karta vzorčenja medvedov za območje Suhe krajine in Dobropolja.	52
Slika 26: Karta vzorčenja medvedov za območje Suha krajina – Rog. Osrednji del območja ni bil vzorčen, tako da je na tem območju precejšnja »bela lisa« brez vzorcev. Ocene številčnosti medvedov so posledično slabe.	54
Slika 27: Karta vzorčenja za območje Dolenjska – vzhod. Ulovljivost je dobra. V območju je sicer malo medvedov, pa še ti večinoma migrirajo v sosednja območja.	56
Slika 28: Razdelitev območja vzorčenja na habitatne krpe s predpostavljeno homogeno gostoto medvedov in območja, na katerih je pričakovati vpliv migrantov – živali ki živijo na obeh straneh Slovensko – Hrvaške meje. Z rumeno je označeno nevzorčeno območje.	62
Slika 29: Pričakovani prispevek migrantov v habitatni krpi Javorniki – Snežnik, ocena za samce. Večji del prehajanja proti Menišiji so vzorci enega samca (35 lokacij).	63

Slika 30: Delitev območja vzočenja na habitatne krpe. Območja z višjo ocenjeno gostoto medvedov so obarvana temneje. Številke se navezujejo na Tabela 12 in Tabela 13.....	65
Slika 31: Število alelov in efektivno število alelov na posameznem lokusu v populaciji.	67
Slika 32: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost po lokusih.....	70
Slika 33: Garza Williamsonovi indeksi za posamezne lokuse	73
Slika 34: Število lokusov, s katerimi je posamezni lokus v vezavnem neravnovesju.	73

VARSTVENA GENETIKA IN OCENA
ŠTEVILČNOSTI MEDVEDA 2007

POVZETEK ZA UPORABNIKE



4. POVZETEK ZA UPORABNIKE

4.1. UVOD

Namen povzetka za uporabnike je strnjeno, vendar še vedno dovolj podrobno, predstaviti ključne dele poročila, pri tem pa dati poudarek rezultatom. Cilj je, da bi bilo poročilo kljub obsežnosti uporabno, da pa pri tem ne bi izpustili pomembnih metodoloških podrobnosti.

4.2. LABORATORIJSKE METODE

Organizacija laboratorijev, pretok ljudi in materiala

Da bi se izognili težavam s kontaminacijo, smo uvedli zelo stroga pravila glede gibanja materiala in ljudi med laboratoriji in tako fizično ločili kritične korake analize. Pri tem smo vzpostavili enosmeren pretok materiala med koraki analize in preprečili vnos visoko koncentrirane DNA v dele analitičnega procesa, kjer se dela z DNA v nizkih koncentracijah. Pri delu smo uporabljali zelo striktne protokole za preprečevanje in kontrolo kontaminacije in uporabljali nastavke za pipete z aerosolnimi barierami za vse kritične prenose tekočin. Vsak ključni korak analiz smo fotodokumentirali in v vsak korak laboratorijskega dela vključili sistem preverjanja, ki je omogočil zaznavo potencialnih napak.

Genetski markerji

Za analize tkiv smo uporabljali naslednje lokuse: G10B, G10C, G10D, G10J, G10L, G10M, G10P, G10X, UarMu10, UarMu23, UarMu50, UarMu51, UarMu59, UarMu05, UarMu09, UarMu11, UarMu15, UarMu26, UarMu61, G1A, G10H in Cxx20. Za določanje spola smo amplificirali lokus SRY, ki je vezan na Y spolni kromosom. Za analizo neinvazivnih vzorcev smo razvili zelo učinkovit multipleks z lokusi Mu09, Mu10, Mu15, Mu23, Mu50, Mu59, G10C, G10D, G10H, G10L, G10P, G10X in SRY.

Amplifikacija vzorcev in zanesljivo določanje genotipov

Pri tkivih smo celoten proces analiz kontrolirali z negativnimi kontrolami. Če rezultat ni bil zanesljiv, smo analizo ponovili. Za oceno napake smo načrtno »slepo« ponovili 10% vseh genotipizacij, v praksi pa smo zaradi multipleksiranja dejansko večkrat ponovili 35,4% vzorcev.

Postopek pri neinvazivnih vzorcih je bil podoben kot pri tkivnih vzorcih, s to razliko, da smo že v začetku vsak vzorec analizirali dvakrat, kasneje pa glede na uspešnost amplifikacije bodisi zavrgli, sprejeli rezultat kot dober oziroma še dodatno amplificirali do osemkrat (glej Slika 7). Za sprejemanje genotipa smo uporabljali metodo največjega verjetja (maximum likelihood). 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. Če se je genotip vzorca skladal z genotipom že znanega, zanesljivo genotipiziranega vzorca, smo genotip sprejeli, čeprav zanesljivost njegove genotipizacije še ni ustrezala navedenim kriterijem, ker je verjetnost, da bi bila dva vzorca enaka zaradi napak v genotipizaciji, praktično nična.

4.3. ANALIZA PODATKOV

Populacijsko – genetske metode in ocenjevani parametri

Genski polimorfizem smo za populacijo ocenili na 22 mikrosatelitskih lokusih s številom alelov na posameznem lokusu (A) ter opaženo (H_o) in pričakovano (H_e) heterozigotnostjo. Preverili smo, ali so lokusi v Hardy Weinbergovem ravnovesju, ali se dedujejo neodvisno drug od drugega in izračunali Garza Williamsonov indeks.

Shranjevanje in obdelava rezultatov genotipizacije

Zaradi ogromnih količin podatkov smo sprogramirali aplikacijo za urejanje in shranjevanje podatkov genotipizacije. Program omogoča vpis vseh podatkov o vzorcih in avtomatsko uvažanje rezultatov genotipizacije iz programa GeneMapper. Omogoča tudi izračun osnovnih populacijsko genetskih parametrov in primerjanje genotipov različnih vzorcev oz. iskanje enakih genotipov ter neposredno izdelavo vhodnih datotek za program MARK.

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. Pripravo podatkov in procesorsko bolj zahtevne analize smo naredili v statističnem programskem paketu R. Uporabljali smo modele za zaprte in za odprte populacije. Demografsko zaprtost smo poskušali doseči s časovno omejenim vzorčenjem. Predpostavko o zaprtosti populacije smo testirali s Pradelovim modelom. Če se je populacija obnašala kot zaprta, smo uporabili Hugginsov model za zaprte populacije, pri predpostavki odprtosti populacije pa smo uporabljali Schwartz-Arnasenovo parametrizacijo JS modela..

Hipotezo o enakomerni ulovljivosti smo testirali z modulom Capture v programu Mark. Rezultate Hugginsovega modela smo primerjali z rezultati M_h Chao, ki predvideva heterogenost ulovljivosti in je precej robusten na kršitve predpostavk. Če se rezultata nista znatno razlikovala, smo uporabili Hugginsov model, ki bolje uporablja podatke in je statistično močnejši.

Za uporabo modela je nujno, da je model primeren za analizo podatkov, kar zagotovimo z »goodness of fit« testih. Modele za zaprto populacijo smo testirali z median c-hat metodo v programu Mark. Za odprte modele smo testirali Cormack-Jolly-Seberjevo komponento verjetja po bootstrap in median c-hat metodah, prav tako v programu Mark.

Korekcija učinka roba in izračun trenutne populacije

Čeprav je območje vzorčenja razmeroma veliko, ima vseeno dolgo mejo s Hrvaško, ki je za medvede popolnoma odprta. Zaradi tega je prisoten učinek roba, ker živali med vzorčenjem vstopajo na območje vzorčenja in iz njega izstopajo. Tako s CMR modeli pravzaprav ocenimo velikost superpopulacije, torej populacije živali, ki tekom vzorčenja prehajajo na območje, na katerem bi lahko dobili njihov vzorec.

Dodaten problem je, ker osebk, ki so bližje odprti meji območja, niso ves čas prisotni v območju, kar manjša verjetnost, da bodo zajete v vzorčenje (ulovljivost) in povzroča razliko v ulovljivosti med posameznimi osebki – individualno heterogenost ulovljivosti.

Pri vzorčenju smo beležili tudi lokacije neinvazivnih vzorcev, kar nam da informacije o gibanju živali znotraj vzorčnega območja in časovnega okvira 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. To smo uporabili za oceno migracij iz in v območje v času vzorčenja in za modeliranje individualne ulovljivosti osebkov glede na oddaljenost njihovih vzorcev od roba območja vzorčenja.

4.4. REZULTATI

4.4.1. NEINVAZIVNO VZORČENJE 2007

Neinvazivno vzorčenje je bil ključen in najverjetneje najbolj tvegan del raziskave, zato smo načrtovanju, pripravi in organizaciji vzorčenja posvetili veliko pozornost. Vzorčenje smo načrtovali po celotnem območju stalne prisotnosti medveda v Sloveniji s pomočjo lovcev, gozdarjev in drugih prostovoljcev. Stopili smo v stik z Lovsko zvezo Slovenije in Zavodom za gozdove Slovenije. Oboji so izrazili pripravljenost za sodelovanje.

Načrt in organizacija vzorčenja

Z računalniškimi simulacijami smo ocenili število vzorcev, ki bi jih potrebovali za dobro oceno številčnosti medvedov, in število vzorcev, ki jih lahko v vsakem lovišču pričakujemo. Da bi zagotovili homogen napor vzorčenja po celotnem območju, je bila količina materiala, posredovana vsakemu lovišču, odvisna od površine gozda v lovišču in ne od števila pričakovanih vzorcev.

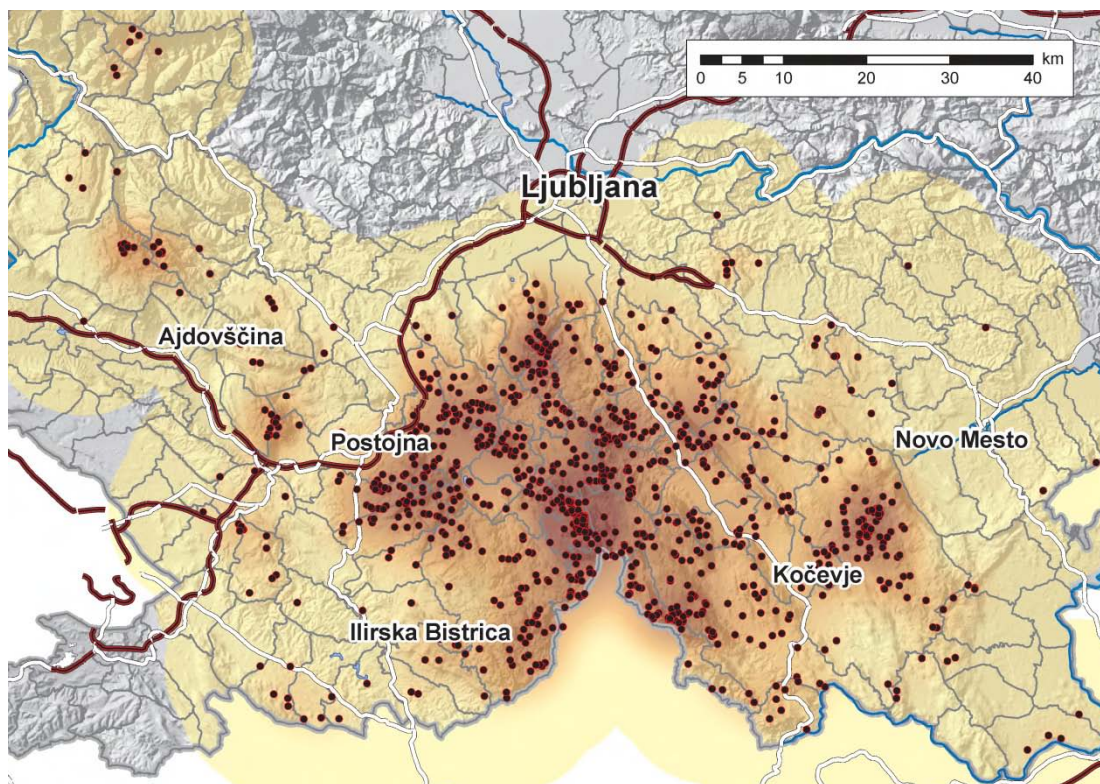
Za vsakega sodelujočega smo pripravili paket s tremi posodicami za odvzem vzorca, brošuro in grafitni svinčnikom. Paket je dovolj priročen, da gre enostavno v torbo, nahrbtnik ali večji žep. Vsako posodico smo sledili s pomočjo črtne kode.

Že na začetku poletja 2007 smo začeli z promocijsko kampanjo, da bi pritegnili čim večje število sodelujočih. Objavili smo tri članke v reviji Lovec, postavili spletno stran www.medvedi.si in imeli deset sestankov po zvezah lovskih družin in loviščih s posebnim namenom. Na sestankih smo tudi razdelili material za vzorčenje.

Vzorčenje in rezultati vzorčenja

Vzorčenje je trajalo od 7. septembra do 30. novembra 2007. V vzorčenju je sodelovalo 105 lovskih družin, šest območnih enot Zavoda za gozdove Slovenije in štiri lovišča s posebnim namenom. Na teren smo skupaj razdelili 5613 unikatno, s črtno kodo označenih posodic za vzorce. Odziv sodelujočih je bil zelo dober. Nekoliko je število najdenih vzorcev zmanjšan izjemno obilen obrod bukve, hrasta in kostanja, kar je najverjetneje povzročilo manjšo gibljivost medvedov in manjši obisk krmišč.

Skupaj je bilo nabranih 1057 neinvazivnih vzorcev medveda v 84 dnevih vzorčenja. Subjektivne ocene starosti vzorcev kažejo, da so vzorci zelo sveži – povprečna ocenjena starost vzorca je 2,17 dni ($SD = 1,51$) – kar ima velik vpliv na uspešnost genotipizacije. Po pričakovanjih je najdenih vzorcev več proti osrednjemu delu območja medveda in manj proti robovom.



Slika 1: Lokacije neinvazivnih vzorcev, zbranih v vzorčenju 2007. Vidimo lahko razmeroma homogeno prostorsko razporeditev vzorcev z zgoščitvijo proti osrednjemu delu območja medveda in redkejšimi vzorci proti robovom.

Sklepamo, da je bil napor vzorčenja razmeroma homogen po celotnem območju. Edina izjema je del lovišča LPN Medved in del lovišča LPN Snežnik Kočevska Reka, kjer najverjetneje vzorcev niso nabirali, zato so ta območja ostala nepovzorčena.

4.4.2. REZULTATI LABORATORIJSKIH ANALIZ

Laboratorijski del raziskave je bil po času in količini dela najbolj obsežen in je trajal od oktobra 2007 do septembra 2008.

Neinvazivni vzorci

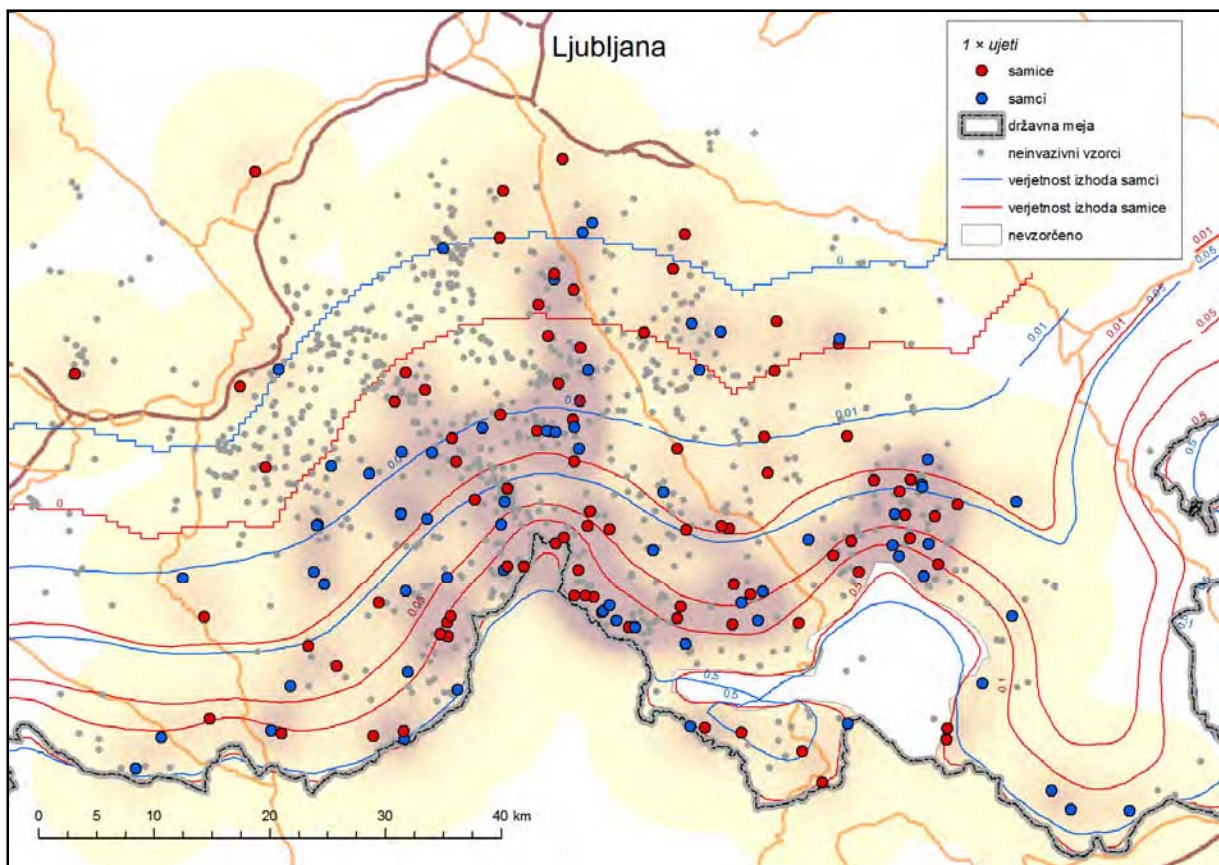
Uspešnost amplifikacije je kritična za uspeh študije – če je visoka, dobimo za isti napor in stroške več koristnih podatkov. Od 1057 zbranih neinvazivnih vzorcev smo jih 931 (88%) uspešno genotipizirali, kar je zelo dober rezultat.

Tktivni vzorci - uspešnost amplifikacije, ocena napak

Na 22 polimorfni mikrosatelitskih lokusih in na Y spolni kromosom vezan SRY lokus smo genotipizirali 487 tkivnih vzorcev medvedov. Za 17 vzorcev (3,4%) nismo uspeli pridobiti popolnega genotipa. Ocenili smo skupno napako genotipov na podlagi ponovitev analiz (v povprečju smo ponovili 53,8% vzorcev). Napaka je bila nizka in pri 1,6% vzorcev lahko pričakujemo napako na enem izmed 22 lokusov. Verjetnost napake na dveh lokusih je zanemarljiva. Celoten delež napak v vseh podatkih je 0,07%, kar je sprejemljivo.

Pregled razporeditve genotipov

V neinvazivnih vzorcih smo v vzorčenju 2007 dobili 342 različnih genotipov. Še 12 genotipov, ki jih nismo srečali v neinvazivnih vzorcih, smo našli v tkivnih vzorcih medvedov, ki so poginili ali bili odstreljeni v času vzorčenja (N=26). Tako smo v vzorčenju našli skupaj 354 različnih medvedov, 159 (45%) samcev in 195 (55%) samic. V povprečju smo vsakega medveda ujeli 2,7 krat. Največ smo istega medveda ujeli 38 krat, 130 medvedov pa smo ujeli samo enkrat.



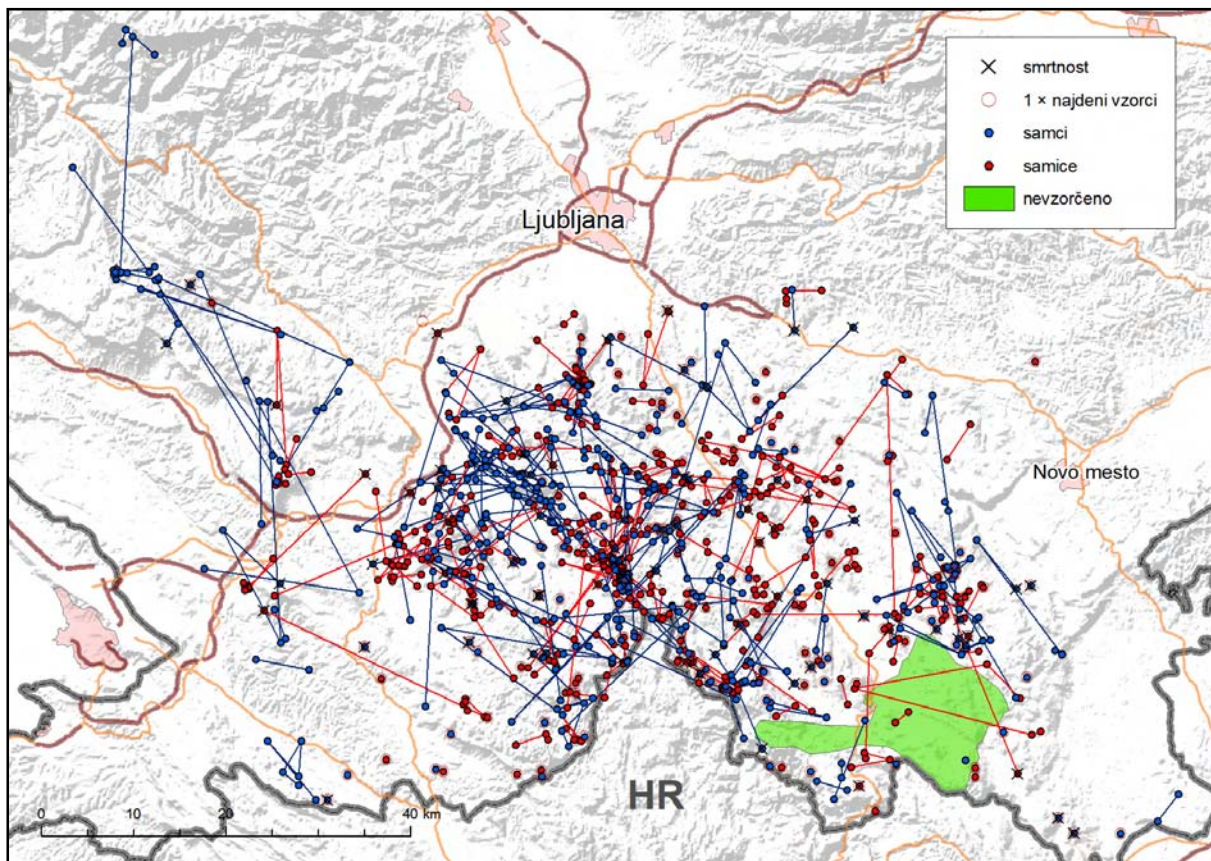
Slika 13: Razporeditev 1x ujetih živali. V ozadju je prostorska gostota 1x ujetih živali (kernelska metoda). Jasno se vidi gradient od meje s Hrvaško in od meje območja, ki ni bilo vzorčeno. Črte (izoprobe) kažejo ocenjeno verjetnost, da bo osebek zapustil območje vzorčenja. Zaradi različnih vzorcev gibanja se te ocene za samce in samice razlikujejo.

Število in razporeditev enkrat ulovljenih medvedov je dober indikator intenzivnosti vzorčenja (Slika 13). Pregled enkrat ulovljenih medvedov je pokazal, da je teh več ob hrvaški meji in ob nevzorčenem območju na Kočevskem, kar pomeni, da je v tem območju ulovljivost medvedov gotovo nižja. To je pričakovano, saj se z bližino roba območja večja verjetnost, da bo žival med vzorčenjem zapustila območje, na katerem lahko najdemo njen vzorec. Po drugi strani je v območju daleč od meje, zlasti na območju Menišije in severozahodnega dela Javornikov, malo enkrat ujetih živali, kar kaže na visoko intenzivnost vzorčenja na tem območju in majhen vpliv medvedov izven območja vzorčenja.

Časovni pregled podatkov (stran 32) kaže, da se je intenzivnost vzorčenja spreminjala. Največja je bila ob začetku vzorčenja in je nato padala. Naslednji dvig intenzivnosti lahko opazimo po osmih tednih, ko smo opravili drugi obisk sodelujočih ZLD.

Analiza premikanja osebkov

Modeliranje ulova-ponovnega ulova nam da število živali v superpopulaciji našega vzorčenega območja, torej število živali, ki so se v času vzorčenja gibale skozi območje. Vendar pa niso vse te živali čisto »slovenske«, saj imajo nekatere velik del svojega življenjskega prostora tudi na Hrvaškem in v določenem trenutku niso vse pri nas. Tu nam priskoči na pomoč poznavanje premikanja medvedov, s pomočjo katerega lahko ocenimo delež živali, ki si jih delimo s Hrvati. Tako lahko iz ocene superpopulacije dobimo oceno velikosti trenutne populacije.



Slika 13: Gibanje živali, zajetih v neinvazivno vzorčenje medvedov 2007. Črte povezujejo vzorce istega osebk.

Videti je, da se živali obnašajo filopatrično in da jih velika večina ostaja znotraj svojih domačih okolišev v časovnem oknu vzorčenja (3 mesece). Rezultati pa niso nujno tipični, ker je bila jesen 2007 izjemno bogata z gozdnimi plodovi in medvedom ni bilo potrebno delati dolgih premikov, da bi prišli do virov hrane. V drugačnih prehranskih razmerah se lahko ti vzorci gibanja spremenijo. Opazili smo tudi znatno razliko med vzorci gibanja samcev in samic, kjer so premiki samcev (mediana razdalj med lokacijami iste živali 5500 m) znatno daljši kot premiki samic (mediana 2000 m).

Testiranje CMR modelov na območju, za katerega predvidevamo popolno zaprtost populacije

Zaradi velikega območja vzorčenja smo lahko uporabljane korekcije ulovljivosti osebkov in učinka roba testirali na manjšem območju, kjer predpostavka o demografski zaprtosti populacije ni mogla biti znatno kršena. Rezultati dajejo podporo uporabi metod za celotno območje vzorčenja. Več na strani 37.

Izdelava CMR modelov in ocena velikosti populacije po habitatnih krpah

Ena izmed ključnih predpostavk za korekcijo superpopulacije je enakomerna gostota živali na celotnem območju superpopulacije (glej stran 15). Zaradi tega smo območje razdelili na manjša, čim bolj homogena območja – habitatne krpe glede na povezanost prostora in čim manjše število opaženih prehodov živali med habitatnimi krpami. Za vsako izmed območij smo po Hugginsovem modelu ocenili velikost superpopulacije, delež migrantov iz in v habitatno krpo in trenutno velikost populacije.

Modeliranje ulova-označevanja-ponovnega ulova medvedov za celotno območje prisotnosti medveda v Sloveniji

Za oceno številčnosti na celotnem območju vzorčenja smo uporabili Hugginsov model za zaprto populacijo. Odlovne intervale smo optimirali z markovskimi verigami, da smo imeli visoko ulovljivost ob čim manjši izgubi podatkov. Smrtnost smo modelirali kot izgubo ob odlovu. Kot individualne kovariante smo modelirali verjetnosti, da bo posamezna žival med vzorčenjem zapuščala območje. Zaprtost populacije smo testirali s Pradelovim modelom (parametrizacija s prirastkom in preživetjem), skladnost modela (goodness of fit) pa z median $c\text{-hat}$ metodo. Oba testa sta pokazala, da je model uporaben za naše podatke (navidežno preživetje = 0,994 in imigracija = 0,006; $c^{\wedge} = 1,352$; $SE(c^{\wedge}) = 0,022$).

V programu Mark smo izdelali niz dvanajstih modelov glede na poznavanje ozadja problema. Relativno podporo vsakega izmed modelov v podatkih smo preverili z Akaikovim informacijskim kriterijem (AICc). Za izračun končnih parametrov in ocen številčnosti smo povprečili rezultate posameznih modelov s pomočjo Akaikovih uteži. Oceno števila medvedov na območju, na katerem ni bilo vzorčenja, smo ekstrapolirali iz ocene populacijske gostote za habitatno krpo Suha krajina – Rog in prišteli celotni oceni.

Zaradi različnih populacijskih gostot medvedov smo za vsako habitatno krpo ocenili razliko med trenutno populacijo in superpopulacijo, potem pa glede na ocenjeno populacijsko gostoto v vsaki habitatni krpi izračunali uteži za korekcijo efekta roba za celotno populacijo.

Metodologija, uporabljena za končno oceno za celotno območje vzorčenja, je podrobneje predstavljena na straneh 31 do 42.

4.5. KONČNA OCENA ŠTEVILČNOSTI MEDVEDOV V SLOVENIJI ZA VZORČENJE SEPTEMBER – DECEMBER 2007

Končne ocene številčnosti medvedov so povzete v Tabela 15. Kot superpopulacija je mišljeno število vseh živali, ki so se med vzorčenjem gibale skozi območje medveda v Sloveniji. Kot trenutna populacija je mišljeno število živali, ki bi ga v posameznem trenutku lahko pričakovali v Sloveniji. Za ta parameter smo podali dve oceni: ob začetku vzorčenja, kar je dejanska ocena modeliranja, in ob koncu vzorčenja, kjer je odšteta zabeležena smrtnost medvedov v času vzorčenja. Do konca leta 2007 je v povozu vlaka poginil še en medved, ki ga v to oceno nismo šteli.

Tabela 12: Struktura ocene številčnosti medvedov in končna ocena številčnosti medvedov v Sloveniji ob začetku in koncu neinvazivnega vzorčenja jeseni 2007. N[^] v tabeli pomeni ocenjena številčnost.

	samice	samci	skupaj
Skupno število najdenih genotipov	195	159	354
N [^] superpopulacije vzorčenega območja	250.8	213.4	464.2
95% interval zaupanja	228 - 247	190 - 237	431 - 497
Standardna napaka	11.88	11.79	16.74
N [^] nevzorčeno območje*	10.7	8.8	19.5
95% interval zaupanja	8.7 - 12.8	7.4 - 10.2	17 - 22
Standardna napaka	1.0	0.7	1.3
N [^] superpopulacija + nevzorčeno območje	261.5	222.2	483.7
95% interval zaupanja	238 - 285	199 - 245	451 - 497
Standardna napaka	11.93	11.81	16.78
N [^] imigrantov	9.1	14.6	23.6
95% interval zaupanja	8 - 10	13 - 16	22 - 25
Standardna napaka	0.41	0.77	0.88
N[^] trenutne populacije ob začetku vzorčenja	252	208	460
95% interval zaupanja	229 - 276	184 - 231	427 - 493
Standardna napaka	11.94	11.83	16.81
Smrtnost medvedov v času vzorčenja	9	17	26
N[^] trenutne populacije ob koncu vzorčenja	243	191	434
95% interval zaupanja	225 - 271	176 - 220	394 - 475
Ocenjen delež migrantov v superpopulaciji	6,9%	13,1%	9,8%
Ocenjeno število migrirajočih osebkov	18	29	47

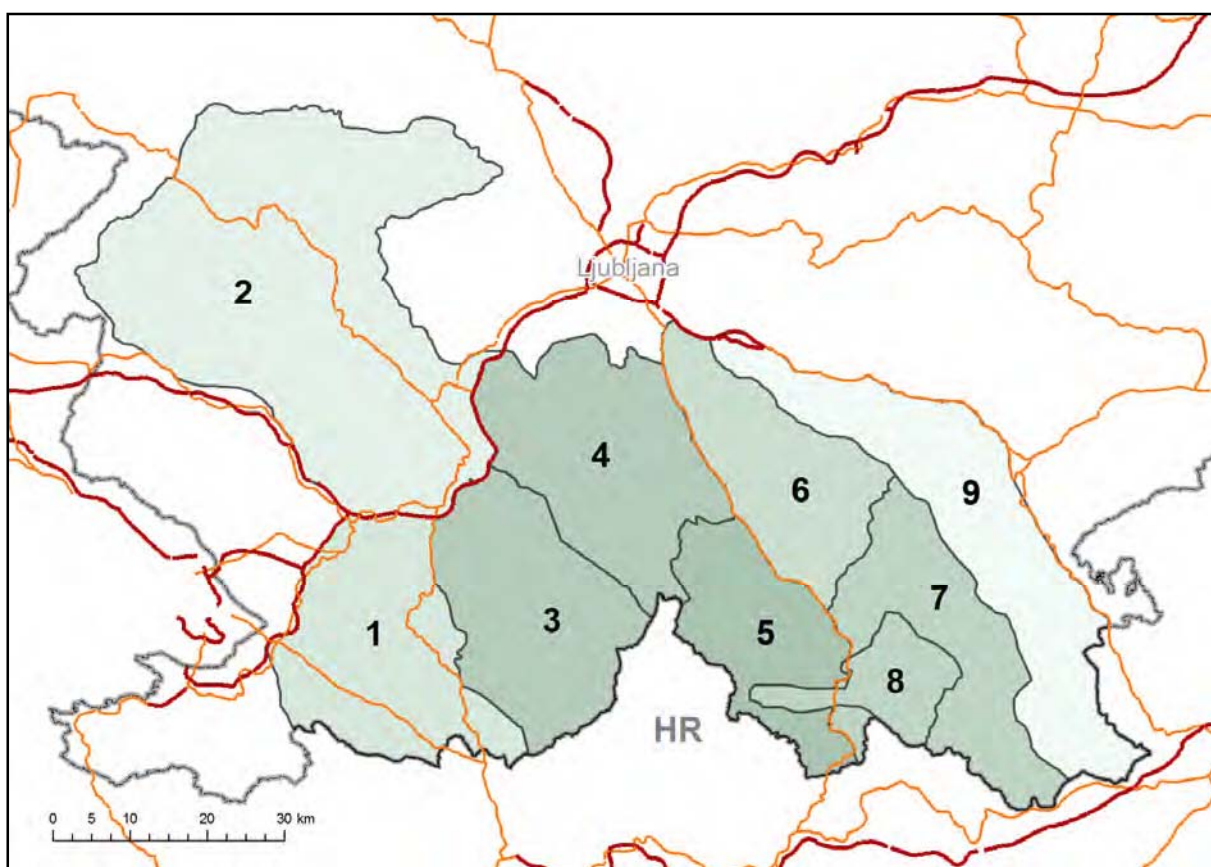
*ocenjen je del živali, ki niso zajete v superpopulacijo vzorčenega območja

Pri interpretaciji ocen je potrebno upoštevati obdobje, za katerega so narejene – konec leta 2007. Pomladi 2008 je prišla v populacijo nova kohorta mladičev, zato je bilo skupno število medvedov ustrezno večje. Tudi delež in pričakovano število migrantov sta ocenjena za trimesečno obdobje vzorčenja. To moramo interpretirati kot minimum – v daljšem časovnem obdobju je ta delež večji.

Dobljene ocene se dobro skladajo z drugimi podatki o medvedih. Ker vemo, da je bilo v vzorčenju opaženih 354 različnih živali, smo lahko popolnoma prepričani, da je bilo v superpopulaciji vsaj toliko medvedov. Po drugi strani pa smo v povprečju vsakega medveda ujeli 2,7 krat, kar pomeni, da se jih gotovo prav veliko ni moglo popolnoma izmuzniti vzorčenju. Po isti logiki mora biti ustrezen delež živali v populaciji označenih, kar lahko preverimo z genotipizacijo tkiv medvedov, umrlih po vzorčenju. Od 6. decembra 2007 do 20. maja

2008 smo prejeli 51 vzorcev tkiv odstreljenih ali poginulih medvedov in jih vključili v analizo. Od tega so štiri mladiči iz 2008, ki jih v vzorčenju 2007 še ni bilo, najmanj pet nepoznanih medvedov lahko pričakujemo zaradi migracije iz Hrvaške, 29 od preostalih 42 medvedov (69%) pa smo poznali iz nenvazivnega vzorčenja. Ob koncu vzorčenja je bilo v populaciji 328 označenih živali, kar je 76% ocenjene (preostale) populacije in se dobro sklada z deležem označenih živali v odstrelu.

Čeprav so ocene po posameznih habitatnih krpah manj zanesljive kot ocena za celotno območje, nam dajo vseeno koristne podatke o razporeditvi in gostotah medvedov v času vzorčenja. Kvalitete ocen se precej razlikujejo glede na intenzivnost vzorčenja in demografsko zaprtost/odprtost vsake habitatne krpe v območje, kjer ni bilo vzorčenja. Pri močno demografsko odprtih habitatnih krpah, kot je na primer območje Velika gora – Goteniška gora, temelji velik del ocene na korekcijah zaradi gibanja živali, zato so ocene standardnih napak in posledično intervala zaupanja manj nezanesljive.



Slika 2: Delitev območja vzorčenja na habitatne krpe. Območja z višjo ocenjeno gostoto medvedov so obarvana temneje. Številke se navezujejo na Tabela 16 in

Tabela 17.

Tabela 1: Pregled števila najdenih genotipov, ocen superpopulacije (N^{SP}) in ocen trenutne populacije (N^{t_0}) po habitatnih krpah z oceno standardne napake vsakega parametra. Ocene števila in ocene napak za nevzorčeno območje so ekstrapolirane iz območja »Suha krajina – Rog« in so zato nezanesljive. Številke v prvem stolpcu se navezujejo na karto na Slika 21.

št.	območje	N genot. samcev	N genot. samic	skupaj N genot.	N^{SP} samice	SE N^{SP} samice	N^{t_0} samice	SE N^{t_0} samice	N^{t_0} samci	SE N^{t_0} samci	N^{SP} samci	SE N^{SP} samci
1	Pivka - Brkini	9	6	15	9,05	2,34	8,03	2,08	11,93	2,41	15,18	3,07
2	Zahodna Slovenija	12	5	17	6,30	0,71	6,28	0,71	14,57	0,95	14,72	0,96
3	Javorniki - Snežnik	35	42	77	49,24	4,01	44,12	3,59	39,54	4,14	49,10	5,14
4	Menišija - Racna g.	41	58	99	63,70	2,28	58,01	2,08	36,76	0,96	44,10	1,15
5	Velika - Goteniška g.	39	39	78	50,27	6,28	41,33	5,16	37,73	3,74	52,72	5,23
6	Suha k. - Dobropolje	18	29	47	33,82	2,54	29,08	2,18	16,47	1,18	21,85	1,57
7	Suha k. - Rog	25	26	51	35,07	5,17	28,49	4,20	23,93	3,02	33,86	4,27
8	nevzorčeno	-	-		14,65	2,16	10,98	1,05	9,23	0,70	14,30	1,80
9	Dolenjska vzhod	5	5	10	5,52	0,93	4,81	0,81	5,65	0,59	7,42	0,78

Tabela 2: Ocene populacije medvedov in gostot po habitatnih krpah. Gostote so ocenjene kot število osebkov na 10.000 hektarjev (100 km²). Površine so podane v hektarjih. Ocene števila in ocene napak za nevzorčeno območje so ekstrapolirane iz območja »Suha krajina – Rog« in so zato nezanesljive. Ocene veljajo za obdobje vzorčenja med septembrom in decembrom 2007 in ni nujno, da opažene razporeditve odražajo stanje v drugih letnih časih in drugih letih. Številke v prvem stolpcu se navezujejo na karto na Slika 21.

št.	območje	ocena št. (95% CI)	samci/ samice	skupna gostota	gostota naravne p.	celotna površina	naravne površine	zanesljivost ocene
1	Pivka - Brkini	20 (12-28)	60% 40%	3,1	4,6	65106	43088	sprejemljiva
2	Zahodna Slovenija	21 (19-23)	70% 30%	1,2	1,5	173504	134809	zelo dobra
3	Javorniki - Snežnik	84 (71-96)	47% 53%	13,6	15,1	61482	55372	dobra
4	Menišija - Racna g.	95 (90-100)	39% 61%	14,0	18,9	67490	50132	zelo dobra
5	Velika - Goteniška g.	79 (63-95)	48% 52%	19,4	23,0	40828	34367	slaba
6	Suha k. - Dobropolje	46 (40-51)	36% 64%	9,5	13,2	48077	34607	dobra
7	Suha k. - Rog	52 (39-66)	46% 54%	10,3	12,1	51026	43429	slaba
8	nevzorčeno	20 (15-26)	46% 54%	10,8	12,1	18647	16747	zelo slaba
9	Dolenjska vzhod	10 (8-13)	54% 46%	1,4	2,2	75963	46829	dobra

Pri interpretaciji absolutnih števil je potrebna previdnost, nedvomno pa rezultati dobro odražajo relativna razmerja gostot medvedov v posameznih habitatnih krpah. Pri tem moramo še enkrat posebej poudariti, da so te ocene specifične za jesen 2007, ki je bila zaradi izjemnega obilja naravne hrane v gozdu gotovo odstopanje od celoletnega, pa tudi dolgoletnega sezonskega povprečja. Ta razporeditev medvedov v prostoru je verjetno posledica razporeditve virov hrane, v tem primeru zlasti obroda bukve, in ne odraža razporeditve v daljšem časovnem obdobju.

Na splošno menimo, da celotna ocena številčnosti medveda dobro odraža stanje v območju vzorčenja in je kot taka uporabna tako za upravljanje kot za modeliranje populacijske dinamike. Veliko število označenih osebkov v populaciji bo še vrsto let omogočalo sledenje populacijske dinamike. Ker pa so populacije prostoživečih živali dinamične, bi bilo smiselno oceno po tej metodologiji še kdaj ponoviti in morda razmišljati tudi o vzpostavitvi trajnega monitoringa s pomočjo neinvazivnih genetskih metod in modeliranja ulova-ponovnega ulova.

4.6. GENETSKA PESTROST RJAVEGA MEDVEDA V SLOVENIJI - REZULTATI

Na 22 polimorfni mikrosatelitskih lokusih in na Y spolni kromosom vezan SRY lokus smo genotipizirali 487 tkivnih vzorcev medvedov. Za 17 vzorcev (3,4%) nismo uspeli pridobiti popolnega genotipa.

Uporabljeni markerji so se pri severozahodni dinarski populaciji medvedov izkazali kot polimorfni. Število alelov na lokus je podobno številu alelov, ki so jih našli v raziskavah skandinavske, severno ameriških in cirkumpolarnih populacij medvedov.

Na vseh 22 lokusih smo ugotovili razmeroma visoko stopnjo heterozigotnosti ($H_e = 0,73$) in alelske diverzitete ($A = 6,73$) – glej stran 67. Za primerjavo z drugimi populacijami medvedov v svetu smo izračunali povprečno H_e in A za 8 lokusov: G1A, G10B, G10C, G10D, G10L, G10M, G10P in G10X. V Tabela 23 so podatki za primerjane populacije.

Tabela 3: Alelska diverziteta in heterozigotnost na osmih mikrosatelitskih lokusih nekaterih medvedjih populacij z različnih območij.

Populacija	Št. osebkov v vzorcu	A (SE)	H_e (SE)	Vir
<i>Alaska Range, Alaska</i>	28	-	0,78 (-)	Waits in sod., 2000
<i>Kluane, Yukon</i>	50	7,38 (0,56)	0,76 (0,025)	Paetkau in sod., 1998
<i>Richardson Mountains, NWT</i>	119	7,50 (0,63)	0,76 (0,030)	Paetkau in sod., 1998
<i>Brooks Range, Alaska</i>	148	7,63 (0,50)	0,75 (0,019)	Paetkau in sod., 1998
Slovenija (SZ Dinaridi)	487	7,13 (1,70)	0,74 (0,069)	Naša raziskava, 2008
<i>Skandinavija - NS</i>	108	6,13 (0,84)	0,70 (0,105)	Waits in sod., 2000
<i>Skandinavija - NN</i>	29	5,38 (1,41)	0,69 (0,071)	Waits in sod., 2000
<i>Flathead River, BC/MT</i>	40	6,50 (0,71)	0,69 (0,027)	Paetkau in sod., 1998
<i>Skandinavija - S</i>	156	5,00 (1,07)	0,68 (0,071)	Waits in sod., 2000
<i>Kuskokwim Range, Alaska</i>	55	6,13 (0,44)	0,68 (0,026)	Paetkau in sod., 1998
<i>Skandinavija - M</i>	88	5,50 (1,20)	0,67 (0,052)	Waits in sod., 2000
<i>East Slope, Alberta</i>	45	7,00 (0,82)	0,67 (0,062)	Paetkau in sod., 1998
<i>West Slope, Alberta</i>	41	6,38 (0,56)	0,68 (0,036)	Paetkau in sod., 1998
<i>Admiralty Island, Alaska</i>	30	-	0,63 (-)	Waits in sod., 2000
<i>Paulatuk Alaska</i>	58	5,75 (0,88)	0,65 (0,065)	Paetkau in sod., 1998
<i>Coppermine, NWT</i>	36	5,75 (1,03)	0,61 (0,073)	Paetkau in sod., 1998
<i>Yellowstone, MT/WY</i>	57	4,38 (0,60)	0,55 (0,081)	Paetkau in sod., 1998
<i>Baranof and Chicagof Is, Alaska</i>	35	-	0,49 (-)	Waits in sod., 2000
<i>Kodiak Island, Alaska</i>	34	2,13 (0,35)	0,27 (0,098)	Paetkau in sod., 1998
Črni medvedi				
<i>West Slope</i>	116	9,50 (0,91)	0,81 (0,017)	Paetkau in sod., 1998
<i>Newfoundland I.</i>	33	3,00 (0,33)	0,41 (0,055)	Paetkau in sod., 1998

Razlog za visoko gensko diverziteto slovenske populacije je smiselno iskati v povezavi s preostalim večjim delom populacije. Za potrditev tovrstne domnev bi morali primerjati skupine osebkov iz različnih delov Dinaridov, kar bi bilo v prihodnje tudi smiselno storiti.

Garza Williamsonovi indeksi v povprečju kažejo izgubo 30% alelov na lokusih nakazujejo prehod ozkega grla. Verjetno ga je populacija preživela konec 19. in v začetku 20. stoletja.

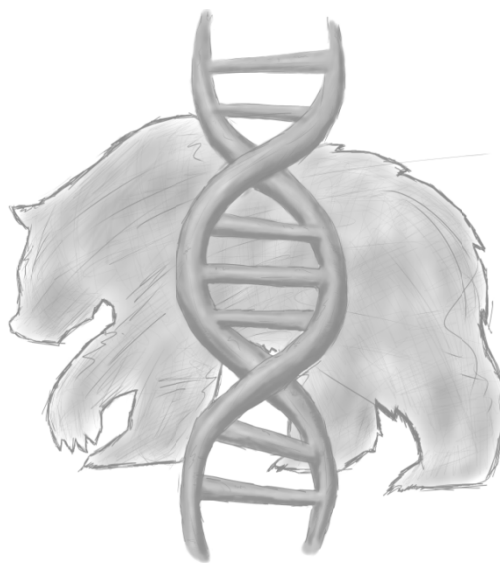
Glede na podobnost povprečne H_o in H_e lahko rečemo, da se osebki v populaciji z genetskega vidika parijo približno naključno.

Zanimive rezultate smo dobili pri testu vezavnega neravnovesja med pari lokusov. Vsak lokus je v povprečju v vezavnem neravnovesju z 18,1 lokusom (kar je 86,1%). Zdi se verjetno, da je kljub trenutno številčni populaciji za vezavno neravnovesje kriv učinek ustanovitelja (Founder efekt) ali ozko grlo v prejšnjih generacijah.

Za nadaljnje analize dinarske populacije medvedov bi bilo smiselno pridobiti informacije o genetski pestrosti medvedov z drugih delov dinarskega gorstva. Tako bi lahko ugotavljali ali prihaja do diferenciacije populacije z razdaljo. S pridobitvijo starosti iz narave odvzetih osebkov bo mogoče oceniti efektivno velikost populacije in preučiti sorodnost med osebki ter disperzijo mladih osebkov.

VARSTVENA GENETIKA IN OCENA
ŠTEVILČNOSTI MEDVEDA 2007

KONČNO POROČILO



5. MATERIALI IN METODE

5.1. LABORATORIJSKE METODE

5.1.1. ORGANIZACIJA LABORATORIJEV, PRETOK LJUDI IN MATERIALA

Neinvazivni genetski vzorci predstavljajo poseben izziv za organizacijo laboratorijev, saj je v njih koncentracija iskane DNA tako nizka, da bi že najmanjša kontaminacija s PCR produkti ali tkivno DNA druge živali povzročila napake v končnih rezultatih. Temu ustrezno je potrebno prilagoditi potek dela v laboratorijih in možnost kontaminacije zmanjšati na minimum.

Da bi se izognili težavam s kontaminacijo, smo uvedli zelo stroga pravila glede gibanja materiala in ljudi med laboratoriji in tako fizično ločili kritične korake analize. Pri tem smo vzpostavili enosmeren pretok materiala med koraki analize in preprečili vnos visoko koncentrirane DNA v dele analitičnega procesa, kjer se dela z DNA v nizkih koncentracijah.

5.1.2. NEINVAZIVNI LABORATORIJ

V neinvazivnem laboratoriju izvajamo izolacijo DNA iz neinvazivnih vzorcev (iztrebki, dlaka) in pripravo PCR reakcij iz tega materiala. To je najbolj občutljiv del analiz, zato imamo za ta laboratorij vpeljane najstrožje postopke za preprečevanje kontaminacije. Laboratorij se nahaja v drugem delu Biološkega središča kot ostali laboratoriji, tako da je fizična ločitev popolna.

Gibanje ljudi v ta laboratorij zelo omejujemo. Če je bila oseba v katerem koli prostoru, kjer bi lahko imela stik z visoko koncentrirano DNA preiskovane vrste, ta nima vstopa v neninvazivni laboratorij, dokler se ne stušira in preobleče.

Še strožja pravila veljajo za material in instrumente. V laboratorij smo prepovedali vnašanje kakršnega koli materiala in instrumentov iz laboratorijev, ki ležijo »po toku navzdol«. Zato neinvazivni laboratorij hkrati uporabljamo tudi kot skladišče potrošnega materiala in reagentov, pa tudi samih neinvazivnih vzorcev.

Ko se v laboratoriju dela, vse delovne površine in instrumente vsakodnevno dekontaminiramo z 10% natrijevim hipokloritom.

5.1.3. TKIVNI LABORATORIJ

V tkivnem laboratoriju izoliramo DNA iz tkiv in pripravljamo PCR reakcije iz tkivnih vzorcev. Gibanja ljudi ne omejujemo, prepovedujemo pa vnos PCR produktov, materiala in instrumentov iz PCR sobe ali laboratorija s sekvenatorjem. Vsa priprava PCR reakcij poteka v nadtlačni PCR komori.

Ta laboratorij uporabljamo tudi za shranjevanje tkivnih vzorcev.

5.1.4. PCR SOBA

V PCR sobi poteka amplifikacija DNA v verižni reakciji polimeraze in priprava PCR produktov za nanos na sekvenator. V njej tudi shranjujemo vse PCR produkte do zaključka analiz.

5.1.5. SOBA Z AVTOMATSKIM SEKVENATORJEM

Avtomatski sekvenator se nahaja na Oddelku za zootehniko na Rodici. Pretok materiala in ljudi poteka med tem laboratorijem in PCR sobo.

5.2. HRANJENJE TKIVNIH VZORCEV, IZOLACIJA DNA IN HRANJENJE IZOLIRANE DNA

Vzorke tkiv hranimo v 96% etanolu na -20°C. Pri prihodu vzorcev v laboratorij zamenjamo etanol in zagotovimo razmerja vzorec: etanol, ki omogočajo dolgotrajno hranjenje. Evidenco vseh vzorcev vodimo v relacijski bazi podatkov skupaj z njihovimi genotipi, ki so končni rezultat analize DNA.

DNA iz tkiv smo izolirali z izolacijskim kitom GeneElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (proizvajalec: Sigma). Izolirano DNA hranimo pri -20°C, saj je tako shranjena uporabna več let. Pri vseh prenosih tekočin, ki vsebujejo DNA, uporabljamo natanke za pipetiranje z aerosolnimi barrierami (filtri).

Izolacija in hranjenje tkivnih vzorcev in DNA izolirane iz njih poteka v tkivnem laboratoriju.

5.3. HRANJENJE NEINVAZIVNIH VZORCEV, IZOLACIJA DNA IN HRANJENJE IZOLIRANE DNA

DNA smo iz vzorcev iztrebkov izolirali izključno v neinvazivnem laboratoriju. Pri vseh kritičnih prenosih tekočin smo uporabljali nastavke za pipete z aerosolnimi barrierami. Za izolacijo smo uporabljali QIAmp DNA Stool Mini Kit (proizvajalec: Qiagen). Izolacije smo delali v serijah po 23 vzorcev in vsaki seriji dodali negativno kontrolo. Negativne kontrole so šle skozi celoten postopek ekstrakcije, kasnejših PCR amplifikacij in analize s sekvenatorjem, enako kot vzorci. S tem smo preverjali kontaminacijo, ki bi lahko nastala pri izolaciji DNA, pa tudi v kasnejših korakih analize.

Neinvazivne vzorce hranimo v 96% nedenaturiranem etanolu na -20°C v neinvazivnem laboratoriju. V istem laboratoriju na -20°C hranimo tudi DNA, izolirano iz njih.

5.4. GENETSKI MARKERJI, PCR IN SLEDLJIVOST VZORCEV

5.4.1. GENETSKI MARKERJI

V pilotskem projektu »Varstvena genetika medveda, risa in jelenjadi v Sloveniji«, ki smo ga izvajali med leti 2003 in 2007 (Skrbinšek s sod., 2007), smo izolirano DNA amplificirali na trinajstih polimorfnih mikrosatelitskih lokusih. Vsi lokusi imajo (GT)_n dinukleotidno repetitivno sekvenco. Lokusi G10B, G10C, G10D, G10J, G10L, G10M, G10P in G10X so klonirani iz genetske knjižnice črnega medveda (Paetkau in Strobeck 1994; Paetkau in sod., 1995). Lokusi UarMu10, UarMu23, UarMu50, UarMu51 in UarMu59 pa so klonirani iz genetske knjižnice rjavega medveda (Taberlet in sod., 1997; Bellemain in Taberlet, 2004). Za določanje spola smo amplificirali lokus SRY, ki je vezan na Y spolni kromosom (Bellemain in Taberlet, 2004).

Za boljši vpogled v genetsko stanje populacije slovenskih medvedov in kasnejše analize starševstva smo paleto mikrosatelitskih lokusov razširili na 22 in ohranili SRY. Dodali smo UarMu05, UarMu09, UarMu11, UarMu15, UarMu26, UarMu61, G1A, G10H, Cxx20. Tako smo 236 tkivnih vzorcev iz prejšnje študije dodatno

amplificirali še na novih mikrosatelitskih lokusih, vzorce dobljene kasneje pa na vseh 22 mikrosatelitskih in SRY lokusu.

Paleta markerjev, ki smo jih uporabili za neinvazivne vzorce, smo iz šestih lokusov, ki smo jih uporabljali v pilotskem projektu, razširili na 12 mikrosatelitskih lokusov in SRY lokus za določanje spola. Sicer je bila verjetnost, da bi imela dva medveda isti genotip, že s šestimi lokusi dovolj majhna, nam pa ti dodatni lokusi dajejo znatno večjo fleksibilnost, ker lahko tudi ob problemih z analizo posameznih lokusov (kar je pogost pojav pri neinvazivnih vzorcih) še vedno dobimo zanesljivo primerljiv genotip. Razširitev palete ne prinese skoraj nikakršnega dviga stroškov, ker vse lokuse multipleksiramo v eni PCR reakciji in analiziramo v eni analizi na sekvenatorju.

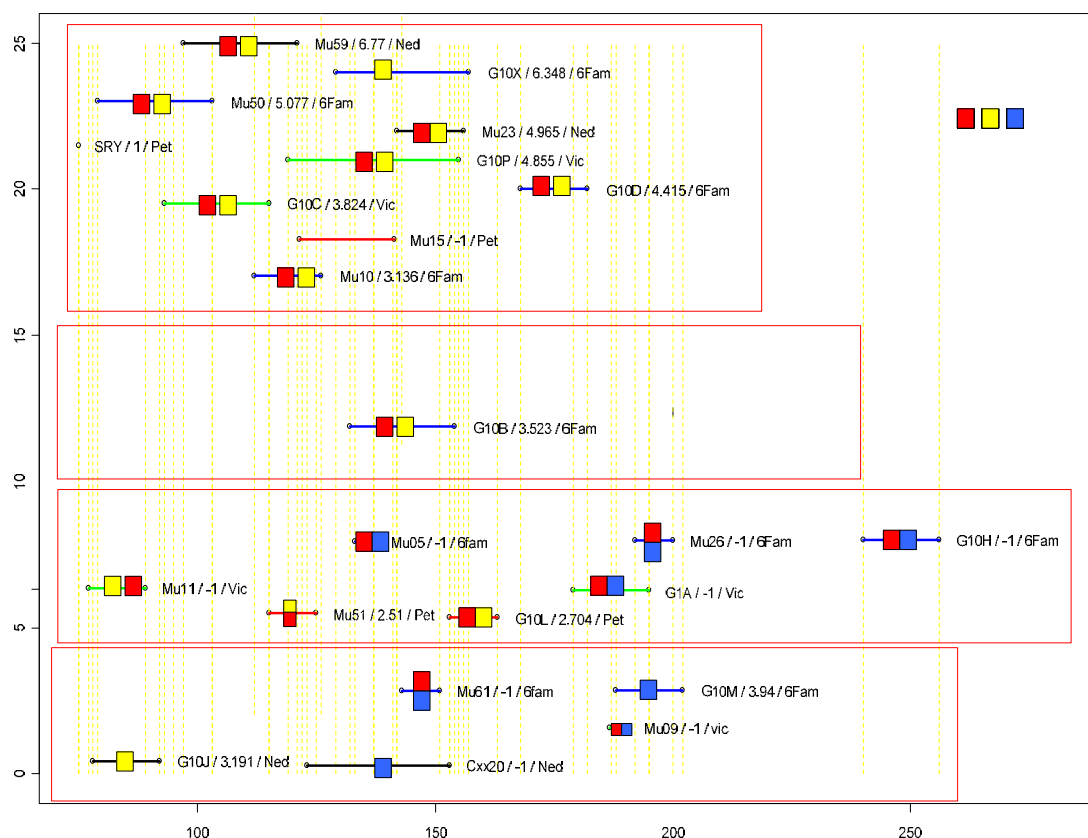
Vsak mikrosatelitski lokus smo namnožili s parom specifičnih oligonukleotidnih primerjev, od katerih je bil en označen s fluorescentnim barvilom. Uporabljali smo petbarvno kemijo, in sicer 6-FAM (modra), VIC (zelena), NED (rumena), PET (rdeča) in LIZ (oranžna). V vse PCR produkte smo dodali dolžinski standard GS500-Liz (Applied Biosystems), ki zavzema oranžni del spektra, torej je označen z LIZ. Tabela 4 prikazuje v naši raziskavi uporabljene sekvence primerjev in fluorescentna barvila, s katerimi je označen po eden izmed primerjev v paru. Večino primerjev smo dobili iz literature ali drugih laboratorijev, dva (G10C in Mu51) pa smo naredili sami.

Tabela 4: Sekvence primerjev in barvila s katerimi so označeni. * F (Forward) – označuje primerje, ki se vežejo na matrično DNA na 5' koncu; R (Reverse) – pa primerje, ki se vežejo 3' koncu. **vsaka od barv označuje imena barv za fluorescentna barvila **NED** - rumena; **VIC** - zelena; **6FAM** - modra; **PET** - rdeča

Lokus	F primer	R primer	Vir
Cxx20	5'-AGCAACCCCTCCCATTACT-3'	5'- NED -TTGTCTGAATAGTCCTCTGCC-3'	Waits
G10B	5'-GCCTTTTAATGTTCTGTTGAATTTG-3'	5'- 6FAM -GACAAATCACAGAAACCTCCATCC-3'	Waits
G10C	5'- VIC -AAAGCAGAAGGCCTTGATTTCTG-3'	5'-GGGACATAAACACCGAGACAGC-3'	Waits; Skrbinšek
G10D	5'-ATCTGTGGGTTTATAGGTAC-3'	5'- 6FAM -CTACTCTTCCTACTCTTTAAGAG-3'	Taberlet
G10H	5'- 6FAM -CAACAAGAAGACCACTGTAA-3'	5'-AGAGACCACCAAGTAGGATA-3'	Taberlet, Waits
G10J	5'- NED -GATCAGATATTTTCAGCTTT-3'	5'-AACCCCTCACACTCCACTTC-3'	Waits
G10L	5'- PET -ACTGATTTTATTCACATTTCCC-3'	5'-GATACAGAAACCTACCATGCG-3'	Bellemain
G10M	5'- 6FAM -TTCCCTCATCGTAGGTTGTA-3'	5'-GATCATGTGTTTCCAAATAAT-3'	Waits
G10P	5'-TACATAGGAGGAAGAAAGATGG-3'	5'- VIC -AAAAGGCCTAAGCTACATCG-3'	Waits, Taberlet
G10X	5'- 6FAM -CCCTGGTAACCACAAATCTCT-3'	5'-TCAGTTATCTGTGAAATCAAAA-3'	Taberlet, Waits
G1A	5'- VIC -GACCTGCATACTCTCCTCTGATG-3'	5'-GCACTGTCTGCGTAGAAGTGAC-3'	Waits
Mu05	5'- 6FAM -AATCTTTTCACTTATGCCCA-3'	5'-GAAACTTGTATGGGAACCA-3'	Waits, Taberlet
Mu09	5'-AGCCACTTTGTAAGGAGTAGT-3'	5'- VIC -ATATAGCAGCATATTTTGGCT-3'	Taberlet
Mu10	5'-ATTGAGATTTATCAGTTTGACA-3'	5'- 6FAM -TCAGCATAGTTACACAAATCTCC-3'	Bellemain; Taberlet;
Mu11	5'- VIC -AAGTAATTGGTGAAATGACAGG-3'	5'-GAACCCCTCACCGAAAATC-3'	Taberlet
Mu15	5'- PET -CTGAATTATGCAATTAAACAGC-3'	5'-AAATAAGGGAGGCTTGGG T-3'	Taberlet
Mu23	5'- NED -TAGACCACCAAGGCATCAG-3'	5'-TTGCTTGCTAGACCACC-3'	Bellemain, Taberlet
Mu26	5'- 6FAM -GCCTCAAATGACAAGATTTTC-3'	5'-TCAATTAATAAGGAAGCAGC-3'	Taberlet
Mu50	5'-GTCTCTGTCAATTTCCCATC-3'	5'- 6FAM -AACCTGGAACAAAAATTAACAC-3'	Bellemain
Mu51	5'-AGCCAGAATCCTAAGAGACCT-3'	5'- PET -AAAGAGAAGGGACAGGAGTA-3'	Bellemain; Skrbinšek
Mu59	5'-GCTCCTTTGGGACATTGTAA-3'	5'- NED -TGACTGTCACCAGCAGGAG-3'	Bellemain
Mu61	5'- 6FAM -TCCACTGGAGGAAAAATC-3'	5'-CTGCTACCTTTTCATCAGCAT-3'	Taberlet
SRY	5'-GAACGCATTCTTGGTGTGGTC-3'	5'- PET -TGATCTCTGAGTTTGCATTTG-3'	Bellemain, Taberlet

5.4.2. PCR MULTIPLEKSI

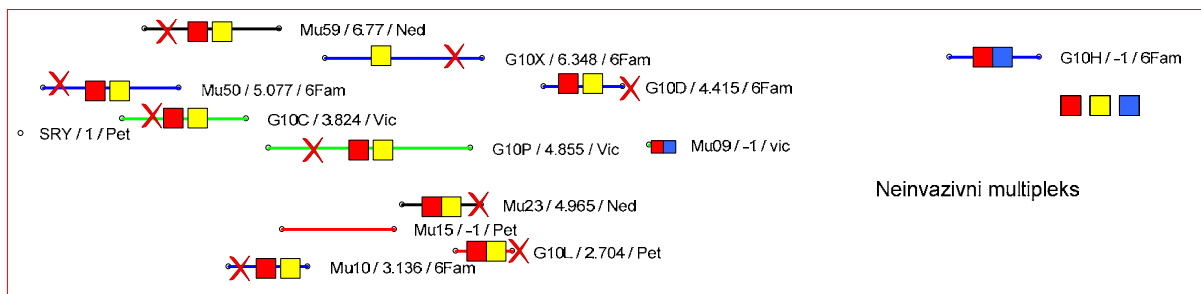
Ker smo imeli zelo veliko število vzorcev in markerjev, smo precej pozornosti posvetili optimizaciji analitike. Pri tem je ključno učinkovito multipleksiranje – pomnoževanje večih markerjev v eni PCR reakciji. Pri oblikovanju le-teh smo bili pozorni predvsem na optimalno temperaturo primerjev za vezavo na matrično DNA in prekrivanje mikrosatelitnih lokusov. Pomembno je, da so barvila znotraj enega multipleksa izbrana tako, da se fragmenti različnih lokusov, a enakih dolžin, ne pokrivajo.



Slika 3: Razporeditev mikrosatelitskih lokusov v treh multipleksih. Na x-osi je dolžina alelov, črte pri posameznem lokusu pa ponazarjajo razpon pričakovanih dolžin alelov. Barvni kvadrati ponazarjajo temperaturo vezave oligonukleotidov (annealing), pri kateri se lokus bolje amplificira – rdeče višja temperatura (~60°C), rumeno srednja (~55°C) in modro nižja temperatura (~50°C). Dva kvadrata vodoravno kažeta, da se pri prvi (levi) temperaturi bolje amplificira kot pri drugi, dva kvadrata navpično pa kažeta, da se pri obeh temperaturah lokus amplificira podobno.

Za amplifikacijo smo uporabljali Qiagen Multiplex PCR kit (Qiagen), ki se je že v pilotski študiji izkazal kot najbolj primeren. Pri analizi tkivne DNA smo v eni PCR sočasno amplificirali od pet do devet lokusov. Tako smo za amplifikacijo vseh 22 lokusov pripravili tri multiplekse.

Za analizo neinvazivnih vzorcev smo razvili zelo učinkovit multipleks. Z njem lahko v eni potezi analiziramo 12 mikrosatelitskih lokusov in SRY lokus za določanje spola. V multipleksu so lokusi Mu09, Mu10, Mu15, Mu23, Mu50, Mu59, G10C, G10D, G10H, G10L, G10P, G10X in SRY. Pri izbiri lokusov so bili kriteriji informativnost, kompatibilnost s prejšnjimi raziskavami, kompatibilnost z drugimi laboratoriji in izvedljivost. Na ta način smo za več velikostnih razredov povečali informativnost in fleksibilnost analiz, hkrati pa analize pospešili in znižali stroške.



Slika 4: Razporeditev lokusov v neinvazivnem multipleksu.

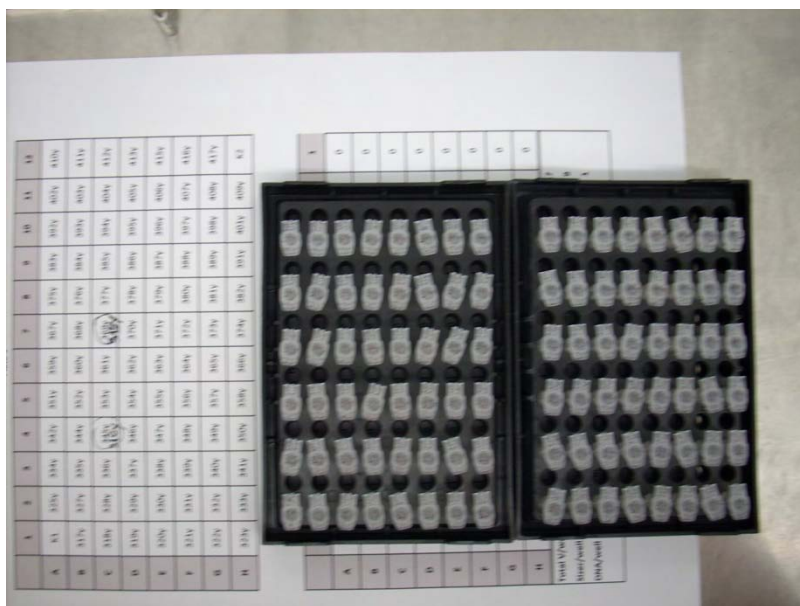
PCR smo izvajali s termociklerji Eppendorf MasterCycler EP Gradient.

5.5. SLEDLJIVOST VZORCEV IN PREPREČEVANJE ZAMENJAVE VZORCEV

Pri tako velikem številu vzorcev lahko kaj kmalu pride do napak zaradi človeškega faktorja (zamenjave vzorcev, napake pri pipetiranju), zato smo v vsak korak laboratorijskega dela uvedli sistem preverjanja, ki omogoča zaznavo napak. Alikvote DNA izolatov smo prenesli v 0,2 ml epruvete, ki smo jih pred pripravo PCR reakcije uredili v 8×12 stojalo z isto razporeditvijo kot na končni PCR plošči. Razporeditev vzorcev smo predhodno pripravili na računalniku in natisnili v protokol. Pred pipetiranjem smo urejene vzorce fotografirali, nato pa fotografijo primerjali z načrtovano razporeditvijo v protokolu. Vsa pipetiranja so bila izključno z osemkanalno pipeto, kar prav tako zmanjša možnost napake zaradi zamenjave vzorcev. Za vse prenose tekočin smo uporabljali nastavke za pipete z aerosolno bariero.

5.6. AMPLIFIKACIJA TKIVNIH VZORCEV

Pri tkivih smo na vsaki PCR plošči pomnoževali serijo 94 vzorcev in dve negativni kontroli. Ponovili smo vse amplifikacije vzorcev, katerih genotipi so bili nezanesljivi. Za oceno napake smo načrtno »slepo« ponovili 10% vseh genotipizacij, kot priporočajo Bonin in sod. (2004), vendar smo v praksi zaradi ponovitev vzorcev, ki so bili na posameznem lokusu slabo amplificirani, na ostalih pa zanesljivi, dejansko na vseh lokusih 2-krat ponovili 35,3% vzorcev, 3-krat 12,1%, 4-krat 12,1%. Največ smo posamezen lokus in vzorec ponovili šestkrat.



Slika 5: Protokol in urejanje vzorcev za pripravo PCR

5.7. AMPLIFIKACIJA NEINVAZIVNIH VZORCEV

Pripravo reakcij za amplifikacijo smo opravili v neinvazivnem laboratoriju. Postopek je bil podoben kot pri tkivnih vzorcih, z razliko da smo že v začetku vsak vzorec analizirali dvakrat, kasneje pa glede na uspešnost amplifikacije bodisi zavrgli, sprejeli rezultat kot dober oziroma še dodatno amplificirali do osemkrat (glej Slika 7).

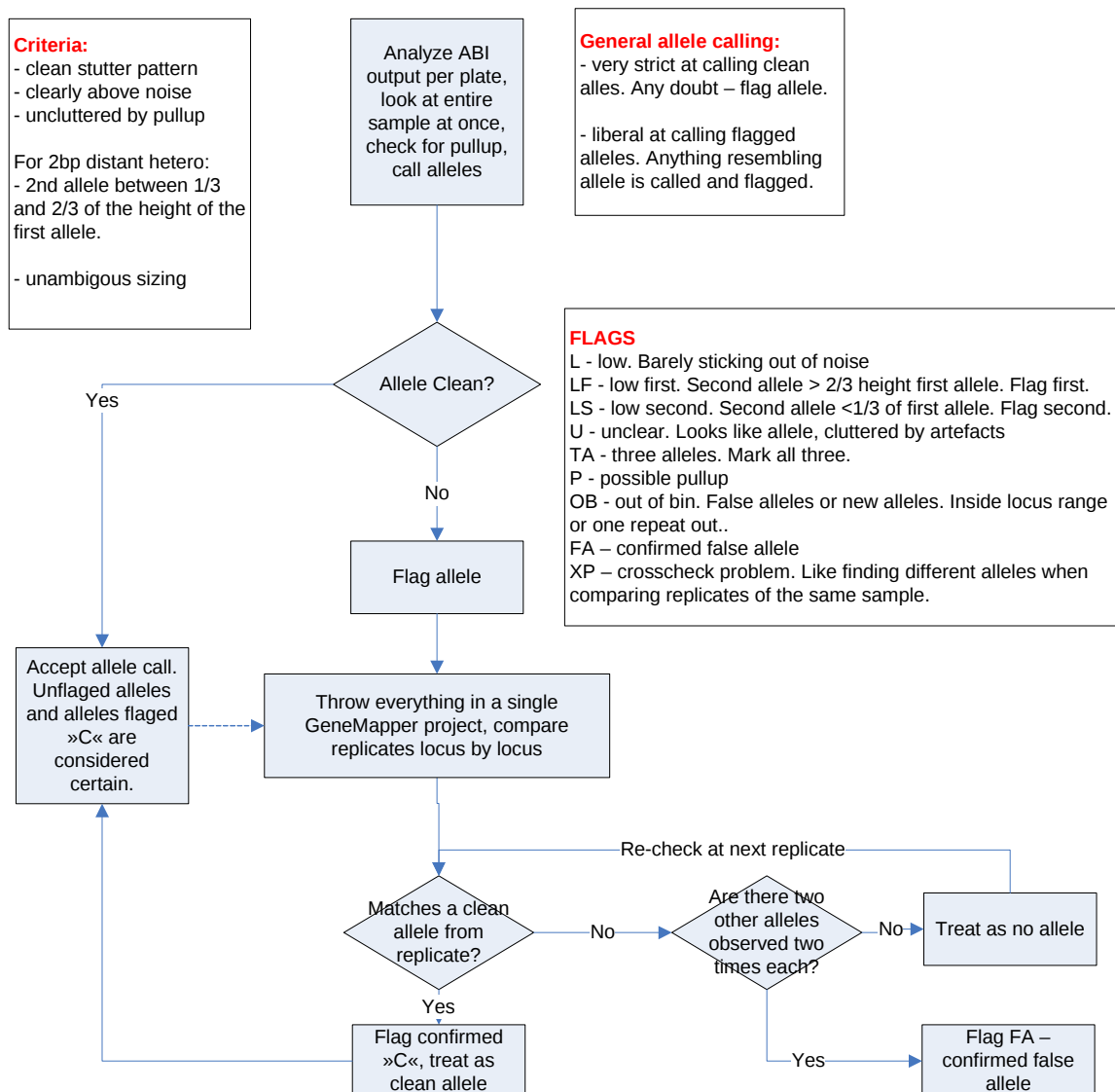
5.8. DOLOČANJE GENOTIPOV

Po končani PCR smo po 1 µl PCR produkta vsakega vzorca prenesli v mešanico 8,75 µl formamida (Applied Biosystems) in 0,25 µl dolžinskega standarda GS500-Liz (Applied Biosystems), ki smo jo predhodno razdelili v jamice PCR plošče. Vse skupaj smo 4 minute denaturirali v termociklerju pri temperaturi 95 °C. Takoj po končani denaturaciji smo PCR ploščo prenesli na led in počakali, da se je ohladila.

Dolžine alelov smo določali na 16 kapilarnem sekvenatorju ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Uporabljali smo 36 cm kapilare in POP7 polimer (Applied Biosystems).

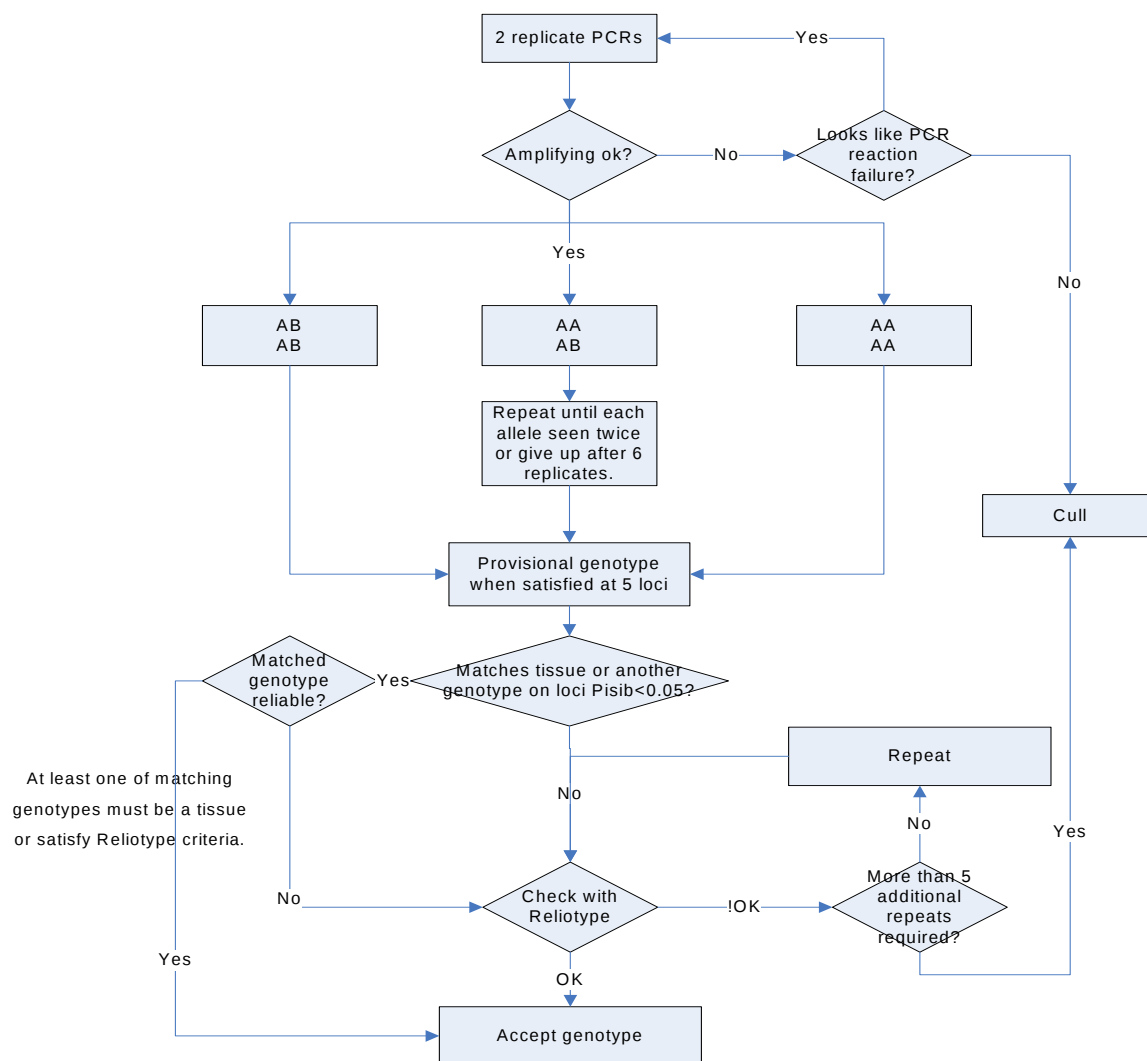
Izpise sekvenatorja smo analizirali s programskim orodjem GeneMapper. Delo nam je močno poenostavilo dejstvo, da smo lokuse že dobro poznali iz analize tkiv, kjer so izpisi mnogo čistejši. Razvili smo pristop označevanja alelov, ki poveča učinkovitost genotipizacije. Glavna problema genotipizacije neinvazivnih 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 6).



Slika 6: 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 7), ki pravzaprav nadgrajuje »multi-tube« pristop (Taberlet s sod., 1996). Pravzaprav gre za modifikacijo algoritma, ki so ga predlagali Frantz s sod. (2003) ter 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. Če se je genotip vzorca skladal z genotipom že znanega, zanesljivo genotipiziranega vzorca, smo genotip sprejeli, čeprav zanesljivost njegove genotipizacije še ni ustrezala navedenim kriterijem. Zaradi velikega števila lokusov in specifik napak genotipizacije (izjemna redkost lažnih alelov in pogostost izpada alelov) je verjetnost, da bi bila dva vzorca enaka zaradi napak v genotipizaciji, praktično nična.



Slika 7: Algoritem za zagotavljanje zanesljivosti genotipizacije neinvazivnih vzorcev (v angleščini zaradi priprave znanstvenega članka).

5.9. POPULACIJSKO – GENETSKE METODE IN OCENJEVANI PARAMETRI

Genski polimorfizem smo za populacijo ocenili na 22 mikrosatelitskih lokusih s številom alelov na posameznem lokusu (A) ter opaženo (H_o) in pričakovano (H_e) heterozigotnostjo. Preverili smo, ali so lokusi v Hardy Weinbergovem ravnovesju, ali se dedujejo neodvisno drug od drugega in izračunali Garza Williamsonov indeks.

Frekvence alelov, ki so pomembne za opis variabilnosti populacije in predstavljajo osnovo za ugotavljanje vrste drugih populacijsko genetskih parametrov, smo izračunali po enačbi:

Frekvenca alela i = št. kromosomov z alelom i / št. vseh kromosomov s tem lokusom v vzorcu

Heterozigotnost se nanaša na stanje, kjer ima posamičen osebek na nekem lokusu dva različna alela. Pravimo, da je heterozigot. V populacijski genetiki se pojem heterozigotnosti razširi na celotno populacijo, tj. skupina osebkov v populaciji, ki so na določenem lokusu heterozigotni. Ločimo opaženo in pričakovano heterozigotnost, kateri primerjamo v testu Hardy Weinbergovega ravnovesja. Opažena heterozigotnost (H_o) je heterozigotnost, ki smo jo dejansko opazili – razmerje med številom osebkov, ki so na lokusu heterozigotni in številom vseh pregledanih osebkov. Pričakovana (H_e) pa je heterozigotnost, kot bi jo pričakovali glede na opažene frekvence alelov pod predpostavko Hardy Weinbergovega ravnovesja. Heterozigotnost je dobro merilo stopnje genetske diverzitete na lokusu (Frankham in sod., 2002).

V neskončno velikih populacijah z naključnim parjenjem in v odsotnosti migracije, mutacije ter selekcije se frekvence genov in genotipov iz generacije v generacijo ne spreminjajo. Pravimo, da so frekvence alelov v **Hardy-Weinbergovem ravnovesju** (H-W ravnovesje). To se vzpostavi že po eni generaciji naključnega parjenja, če na populacijo ne delujejo zgoraj omenjeni dejavniki. Odstopanja od H-W ravnovesja nam omogočajo odkrivati parjenje v sorodstvu, fragmentacijo populacij, migracijo in selekcijo (Frankham in sod., 2002).

Testirali smo, ali so aleli v H-W ravnovesju, kar torej pomeni, da sta pričakovana in opažena heterozigotnost po lokusih enaki. Naredili smo eksaktni test z 1.000000 koraki v Markovski verigi. Test je analogen Fisherjevemu eksaktnemu testu (Excoffier in sod., 2005).

Za ugotavljanje populacijskih »ozkih grl« - drastičnih zmanjšanj številčnosti populacije v preteklosti (Garza in Williamson, 2001) smo uporabili **Garza-Williamsonov indeks**. Izračunali smo ga le za 20 lokusov, saj imata lokusa G10H in Mu23 točkovno mutacijo, ki spremeni vzorec ponavljanja alelov na lokusu, tako da ta več ne ustreza SMM (Stepwise Mutation Model). Ker je ta mutacijski model osnova za izračun Garza-Williamsonovega indeksa, le tega za omenjena lokusa nismo mogli izračunati.

Razmerje M je dejansko razmerje med številom alelov, ki jih na določenem lokusu po SMM pričakujemo in številom alelov, ki jih dejansko opazimo. To razmerje se v populaciji, ki je preživela populacijsko ozko grlo, zmanjša. Redki aleli se ob zmanjšanju populacije zaradi genetskega drifta izgubijo prej kot bolj pogosti aleli (Garza in Williamson, 2001). Na lokusih se na mestih, kjer so se redki aleli izgubili, pojavijo vrzeli (Excoffier in sod., 2005), ki jih po SMM ne bi smelo biti. Vrednost Garza Williamsonovega indeksa naj bi bila nižja pri populacijah, ki so nedavno preživele populacijsko ozko grlo (Excoffier in sod., 2005).

Vezavno neravnovesje lokusov (Linkage disequilibrium; LD) je nenaključno združevanje alelov z različnih lokusov v gamete. Izraža se ob naključnih dogodkih v majhnih populacijah, v populacijah, ki so šle skozi ozko grlo, po nedavni združitvi različnih populacij, zaradi selekcije (Frankham in sod., 2002) in parjenja v sorodstvu (Hedrick, 2005). Praviloma bi se morali aleli z različnih lokusov v veliki populaciji z naključnim parjenjem dedovati neodvisno (Frankham in sod, 2002), kar smo preverili s testom vezavnega neravnovesja.

Mera odklona od naključnega združevanja med aleli na različnih lokusih je koeficient vezavnega neravnovesja D . Definiran je kot razlika produkta frekvenc CIS gamet (A_1B_1 , A_2B_2 ; r in u) in produkta TRANS gamet (A_1B_2 , A_2B_1 ; s in t):

$$D = ru - st$$

V vezavnem ravnovesju je D enak 0. Najvišja vrednost D je 0,25 za CIS in najnižja -0,25 za TRANS gamete. Aleli z različnih lokusov frekvenc, ki jih pričakujemo v vezavnem ravnovesju, ne dosežejo v eni generaciji, ampak se jim le asimptotično približajo s stopnjo, ki je odvisna od frekvence rekombinacije lokusov.

$$D_t = D_0 (1 - c)^t$$

D_t ... D v populaciji t

D_0 ... D na začetku

c ... stopnja rekombinacije

Stopnja, s katero se D približuje 0, torej vezavnemu ravnovesju, je odvisna od tega, kako ohlapno sta lokusa med seboj povezana (Frankham in sod., 2002).

Kadar so geni v haploidnem stanju in je tako poznana gametična faza (haploidni organizmi, mtDNA, cpDNA, Y - kromosomi), lahko frekvence gamet in neravnovesje ocenimo neposredno. Za multiple heterozigote pa frekvenc gamet ni mogoče ugotoviti neposredno, saj ne moremo ugotoviti gametične faze. Vseeno pa je mogoče oceniti obseg vezavnega neravnovesja (Hedrick, 2005).

Kadar sta na lokusu več kot dva alela, je težje izraziti stopnjo povezave med lokusi. Koeficient vezavnega neravnovesja D je v tedaj razširjen kot (Hedrick, 2005):

$$D_{ij} = x_{ij} - p_i q_j$$

x_{ij} ... ocena frekvenc gamet $A_i B_j$

p_i, q_j ... oceni frekvenc za vsakega od alelov A_i in B_j

Obstaja več različnih načinov, kako pridobiti iskane informacije za gamete z večjim številom alelov (multiple alelske gamete). Ena od direktnih metod (Hill, 1975; Hedrick, 1987) je podana s statistiko:

$$Q = n \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^l \left(\frac{D_{ij}^2}{p_i q_j} \right)$$

k, l ... število alelov na lokusih A in B

n ... število vseh obstoječih gamet

$p_i, q_i \dots$ oceni frekvenc za vsakega od alelov A_i in B_j

Če je $D_{ij} = 0$, potem Q sledi χ^2 - distribuciji s $(k - 1)(l - 1)$ stopinjami prostosti. Ta pristop so različni avtorji razširili in posplošili za možnost ocenjevanja vezavnega neravnovesja za primere multiplih alelov dvojnih heterozigotov z neznano gametično fazo. Tako lahko z uporabo EM algoritma (Expectation of Maximization) ocenimo najbolj verjetne frekvence haplotipov, ki so odvisne od začetne točke (Hedrick, 2005).

Verjetnost opaženih podatkov D z dano frekvenco haplotipov p je v EM algoritmu podana kot:

$$L(D|p) = \sum_{i=1}^n \prod_{j=1}^{g_i} G_{ij}$$

$\sum$... upošteva vse posameznike n v vzorcu

$\prod$... upošteva vse možne genotipe g teh posameznikov

$G_{ij} = 2p_i p_j$, če $i \neq j$ oz. $G_{ij} = 2p_i^2$, če $i = j$

(p_i in q_i sta oceni frekvenc za vsakega od alelov A_i in B_j)

Vezavno neravnovesje med lokusi smo testirali s permutacijskim testom (s 1000 permutacijami), ki uporablja EM algoritem. Uporabljena metoda predvideva podatke z vezavnim neravnovesjem L_{H^*} po hipotezi, da so frekvence haplotipov produkti frekvenc alelov. Za podatke, ki so v vezavnem ravnovesju L_H , pa z uporabo EM oceni frekvence haplotipov. Test razmerja verjetij S je podan kot:

$$S = -2 \log (L_{H^*} / L_H)$$

Dobljena vrednost S praviloma sledi χ^2 - distribuciji, kjer sta $(k_1 - 1)(k_2 - 1)$ stopinje prostosti. (k - število alelov na določenem lokusu) (Excoffier in sod., 2005).

Informativnost mikrosatelitskih markerjev

O informativnosti lokusa nam največ pove efektivno število alelov (Frankham in sod., 2002), ki smo ga izračunali po spodnji enačbi:

$$n_e = \frac{1}{\sum p_i^2}$$

p_i ... frekvenca i -tega alela

To je število alelov, ki bi v primeru enakomernega pojavljanja, rezultiralo kot opažena homozigotnost. Je manjše od dejanskega števila alelov, razen če imajo vsi aleli enako frekvenco (Frankham in sod., 2002). To število korigira celotno število alelov glede na njihovo pogostost (Skrbinšek in sod., 2007).

5.10. SHRANJEVANJE IN OBDELAVA REZULTATOV GENOTIPIZACIJE

Zaradi ogromnih količin podatkov so programska orodja, ki smo jih uporabljali v pilotski študiji (Skrbinšek s sod., 2007) postala premalo učinkovita in nerodna za uporabo. Zaradi tega smo v programu Microsoft

Access 2007 sprogramirali aplikacijo za urejanje in shranjevanje podatkov genotipizacije. Program omogoča vpis vseh podatkov o vzorcih in avtomatsko uvažanje rezultatov genotipizacije iz programa GeneMapper, tako da so vsi podatki medsebojno povezani in enostavno dostopni. Program omogoča tudi analize alelske strukture po lokusih, analize napak genotipizacij, izračun osnovnih populacijsko genetskih parametrov in primerjanje genotipov različnih vzorcev oz. iskanje enakih genotipov. Omogoča tudi neposredno izdelavo vhodnih datotek za program MARK, ki smo ga uporabljali za modeliranje ulova-ponovnega ulova in ocene številčnosti.

5.11. ISKANJE VZORCEV Z ISTIMI GENOTIPI

Pri ugotavljanju, ali dva vzorca pripadata isti živali, imamo dve možnosti napake: dve različni živali lahko proglasimo za isto, ker imamo premajhno informativnost lokusov, lahko pa dva vzorca iste živali proglasimo za različna, ker smo naredili napako pri genotipizaciji. Prva težava je enostavno rešljiva z uporabo dovolj velikega števila dobro informativnih genetskih markerjev, medtem ko je problem »ustvarjanja« novih živali zaradi napak genotipizacije zelo resen in zahteva precejšnjo previdnost pri analizah.

Z večanjem števila lokusov postaja verjetnost, da bi dve živali imeli isti genotip, zanemarljiva, medtem ko verjetnost, da bo vsaj na enem lokusu napaka, raste. Pri dvanajstih lokusih, kolikor smo jih uporabili, postane verjetnost napake znatna.

V literaturi je najti priporočilo (Paetkau, 2004), da naj se uporabi čim manjše še zadovoljivo število lokusov (5-7), da je verjetnost »pomnoževanja« živali zaradi napak genotipizacije čim manjša. Vendar si na ta način zmanjšamo prožnost naših analiz, saj pogosto na posameznem lokusu ne dobimo zanesljivega genotipa, čeprav ostali lokusi ne delujejo.

Ker smo v raziskavi imeli tudi veliko število tkivnih vzorcev, smo lahko verjetnosti, da bi imela dva medveda določeno število lokusov enakih, empirično preverili.

Rezultate smo upoštevali pri primerjanju vzorcev. Če sta se vzorca razlikovala na manj kot petih lokusih, smo pričakovali, da gre za napako genotipizacije. V takem primeru smo primerjali elektroferograme, če pa to ni zadostovalo, smo ponovili amplifikacijo obeh vzorcev. V praksi je bilo takšnih primerov malo.

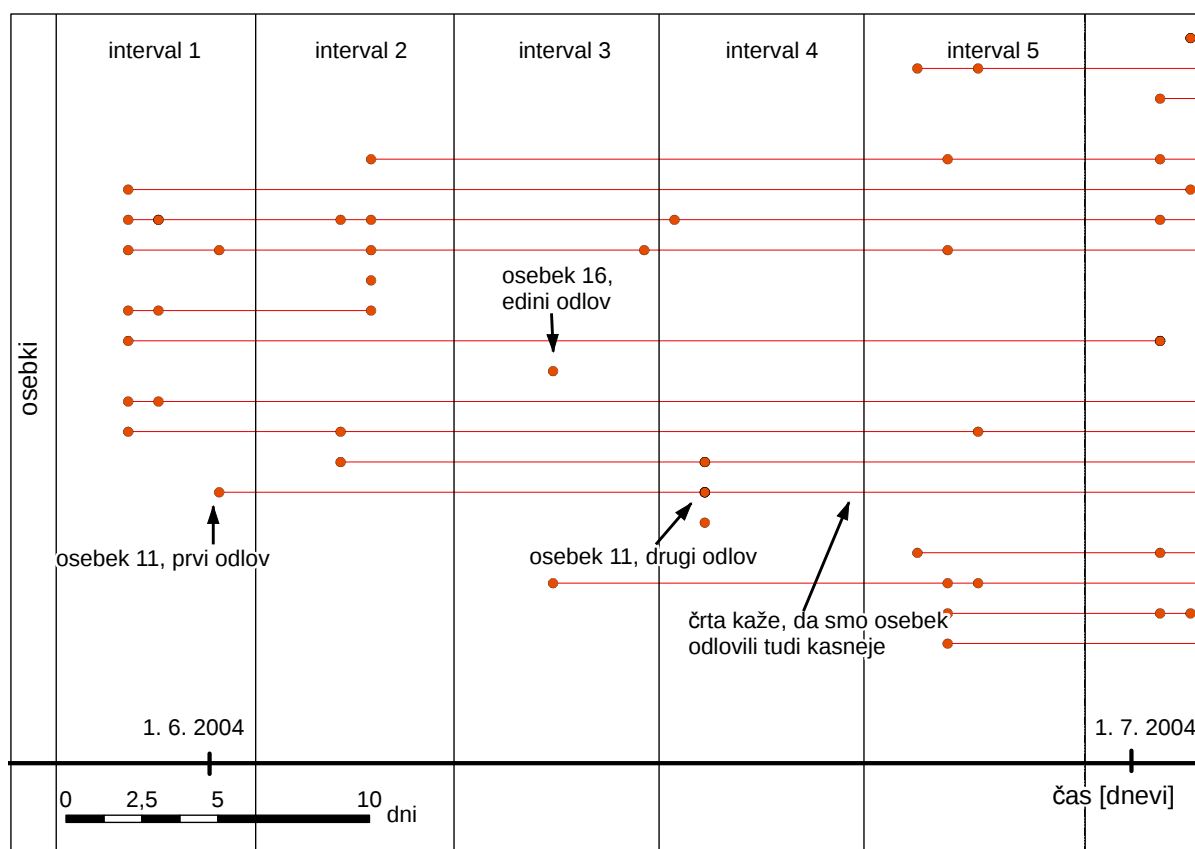
Tabela 5: Število ujemanj po številu lokusov v tkivnih vzorcih ($N=498$) in pričakovano število ujemanj $E(\text{ujemanj})$ v ocenjeni celotni populaciji ($N^*=434$). Kot vidimo, lahko pričakujemo, da se različna medveda ne bosta ujemala na najmanj dveh lokusih, verjetnost, da bi se ujemala na več kot osmih lokusih, pa je zelo nizka.

Enakih lokusov	N ujemanj	%	E(ujemanj)
12	0	0%	0.0
11	0	0%	0.0
10	1	0.21%	0.9
9	2	0.41%	1.8
8	5	1.03%	4.5
7	10	2.05%	8.9
6	20	4.11%	17.8
5	59	12.11%	52.6
4	68	13.96%	60.6

5.12. 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). Pripravo podatkov, urejanje odlovnih intervalov, bootstrap analize in podobno smo naredili v statističnem programskem paketu R (R Development Team, 2005).

Kritičen dejavnik pri ocenjevanju številčnosti živali s 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 8: 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 (Skrbinšek s sod., 2007).

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 osebkov smo povezali s črto in tako dobili vizualizacijo "odlovne zgodovine" (Capture History) vsakega osebkov (slika 8). To nam je olajšalo razumevanje procesa in izbiro vzorčnih intervalov.

Izbiri CMR (Capture-Mark-Recapture) modelov smo prilagajali podatkom. 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, korigiranem na velikost vzorca (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 glede na podporo, ki jo ima model v podatkih.

Uporabljali smo dva načina modeliranja:

5.12.1. MODELI ZA ZAPRTE POPULACIJE

Zaprta populacija pomeni, da v populacijo med vzorčenjem ni priliva (imigracija, rojstva) ali odliva (emigracija, smrtnost) osebkov. 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 nič 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 lahko upravičeno uporabili Hugginsov model za zaprte populacije (Huggins 1989).

Hipotezo o enakomerni ulovljivosti smo testirali z modulom Capture v programu Mark. Rezultate Hugginsovega modela smo primerjali z rezultati M_h Chao, ki predvideva heterogenost ulovljivosti in je precej robusten na kršitve predpostavk (Chao s sod., 1992). Če se rezultata nista znatno razlikovala, smo uporabili Hugginsov model, ki bolje uporablja podatke in je statistično močnejši.

5.12.2. MODELI ZA ODPRTE POPULACIJE

Pri modeliranju odprtih populacij sta priliv in odliv osebkov v/i 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 JS modela (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 najbolj ustreza biološki realnosti, saj medvedi med vzorčenjem območje, na katerem bi lahko našli njihov iztrebek, zapuščajo in vanj vstopajo. Težava je, ker ta model predvideva, da je vzorčenje trenutno v diskretnem odlovnem intervalu. Pri kontinuiranem vzorčenju, kot smo ga imeli mi, je ta zahteva gotovo kršena. 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 kjer se je populacija obnašala kot zaprta in rezultate primerjali z rezultati Hugginsovega modela.

5.12.3. 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. Modele za zaprto populacijo smo testirali z median c-hat metodo v programu Mark. Za odprte modele smo testirali Cormack-Jolly-Seberjevo komponento verjetja po bootstrap in median c-hat metodah, prav tako v programu Mark.

5.13. KOREKCIJA UČINKA ROBA IN IZRAČUN TRENUTNE POPULACIJE

Čeprav je območje vzorčenja razmeroma veliko, ima vseeno dolgo mejo s Hrvaško, ki je za medvede popolnoma odprta. Zaradi tega je prisoten učinek roba (»Edge Effect«), ker živali med vzorčenjem vstopajo na območje vzorčenja in iz njega izstopajo. Tako s CMR modeli pravzaprav ocenimo velikost superpopulacije, torej populacije živali, ki tekom vzorčenja prehajajo 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 trenutne številčnosti.

Dodaten problem je, ker osebk, ki so bližje odprti meji območja, niso ves čas prisotni v območju, kar manjša verjetnost, da bodo zajete v vzorčenje (ulovljivost) in povzroča razliko v ulovljivosti med posameznimi osebki – individualno heterogenost ulovljivosti.

Pri vzorčenju smo beležili tudi lokacije neinvazivnih vzorcev, kar nam da 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 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 pri dovolj velikem vzorcu po obeh metodah asimptotično prišli do istega rezultata. Logično 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 boljša 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.

5.13.1. IZPELJAVA KOREKCIJE EFEKTA ROBA IN IZRAČUNA TRENUTNE POPULACIJE IZ SUPERPOPULACIJE

Predpostavimo, da je Z končna ploskev s površino z , po kateri se giblje N ($N > 0$) osebkov. Z razdelimo v M celic s površino a , tako da je $M = Z/a$. Osebk se premikajo po Z tako, da ostaja razporeditev osebkov v vsakem trenutku uniformna. Populacija je zaprta in noben osebek Z ne zapušča in vanjo ne prihaja. V tem primeru je gostota živali na enoto površine $D = N/z$. Če je razporeditev osebkov v Z uniformna, je število osebkov v vsaki celici:

$$N_c = D \cdot a = N \cdot a/z \quad (\text{enačba 1}).$$

V nekem časovnem oknu t , ki traja od t_0 do t_1 , lahko posamezen osebek razumemo kot prostorski fenomen znotraj njegovega domačega okoliša H s površino h in številom celic Mh , kjer ima vsaka celica neko nezanemarljivo verjetnost p , da se v določenem trenutku osebek nahaja v njej. Vsi osebki imajo enake domače okoliše. Če predpostavimo, da so osebki filopatrični, bo p padal po verjetnostni funkciji $p(r)$, ki opisuje verjetnost, da bomo osebek našli v razdalji r od centroida njegovega domačega okoliša, in bo odvisen od deleža celotne površine, v kateri bi se osebek lahko nahajal. Tako je verjetnost, da bo nek osebek I v nekem trenutku v neki celici A , $A \in H$, enaka:

$$p_A = p(r_{CA}) \cdot \frac{1}{Ma(r_{CA})} \quad (\text{enačba 2}) \text{ in velja}$$

$$\sum_{i=1}^{Mh} p_i = \sum_{i=1}^{Mh} p(r_{Ci}) \cdot \frac{1}{Ma(r_{Ci})} = 1 \quad (\text{enačba 3}),$$

kjer je r_{CA} razdalja A od centroida domačega okoliša osebkov in r_{Ci} razdalja celice i od centroida domačega okoliša osebkov. $Ma(r_{CA})$ je število celic okrog centroida v oddaljenosti r_{CA} , ki imajo enako vrednost $p(r)$ (enako verjetnost, da bo osebek premagal razdaljo do njih).

Če osebek I v časovnem oknu t razumemo kot površinski fenomen, lahko p_A razumemo kot delež osebkov I , ki se v t nahajajo v celici A (pričakovani delež t , v katerem se bo osebek nahajal v A). Tako lahko število osebkov v A opišemo kot seštevek »prispevkov« vseh osebkov v to celico:

$$N_A = \sum_{i=1}^N p(r_{C \rightarrow Ai}) \cdot \frac{1}{Ma(r_{C \rightarrow Ai})} \quad (\text{enačba 4}),$$

kjer je $r_{C \rightarrow Ai}$ razdalja celice A od centroida domačega okoliša živali i .

Ker je prostor homogen, je verjetnost, da bo žival, ki je ob t_0 v neki celici B prišla v t do celice A odvisna od verjetnosti, da osebek preide razdaljo med njima. Tako lahko modificiramo enačbo 2:

$$p_{B \rightarrow A} = p(r_{BA}) \cdot \frac{1}{Ma(r_{BA})} \quad (\text{enačba 5}),$$

kjer je $p_{B \rightarrow A}$ verjetnost, da bo osebek, ki je v celici B v t_0 prišel v celico A in r_{BA} razdalja med celicama. $p_{B \rightarrow A}$ lahko razumemo tudi drugače – kot delež osebkov, ki so v B v t_0 in so prišli v A do t_1 . Število živali, ki jih B prispeva v A je potem preprosto:

$$N_{B \rightarrow A} = p_{B \rightarrow A} \cdot N_B = p(r_{BA}) \cdot \frac{N_B}{Ma(r_{BA})} \cdot D \cdot a = p(r_{BA}) \cdot \frac{a \cdot D}{Ma(r_{BA})} \quad (\text{enačba 6}).$$

Tako lahko rečemo, da ima vsaka celica C svojo prispevno površino H_C , v kateri ima vsaka celica nezanemarljivo verjetnost, da bo osebek, ki je v njej ob t_0 v časovnem oknu t prišel v C – prispeva delež svojih osebkov v C .

Predpostavimo, da v Z leži manjše območje W ; $W \in Z$ s površino w . Pri tem je W znatno manjši od Z . Za W lahko opredelimo dva parametra:

Superpopulacijo, NSW , ki je število živali, ki se v časovnem oknu t pojavljajo v W ,

trenutno populacijo, NW , ki je število živali v W v določenem trenutku.

Trenutna populacija v W ob t_0 je enaka trenutni populaciji ob t_1 in je

$$NW_{t_0} = D \cdot w = NW_{t_1} \quad (\text{enačba 7}).$$

Delež živali, ki jih med t v neko celico A ; $A \in W$ prispeva območje O , za katero velja $O = Z - W$, lahko opredelimo kot seštevek prispevkov vsake celice i ; $i \in O$ v celico A :

$$P_{O \rightarrow A} = \sum_{i=0}^{M_O} p_{i \rightarrow A} = \sum_{i=0}^{M_O} \left(p(r_i) \cdot \frac{1}{Ma(r_i)} \right) \quad (\text{enačba 8}),$$

kjer je M_O število celic izven W . Tako je pričakovano število živali iz O v celici A

$$N_{O \rightarrow W} = N_A \cdot \sum_{i=0}^{M_O} p_{i \rightarrow A} = N_A \cdot \sum_{i=0}^{M_O} \left(p(r_i) \cdot \frac{1}{Ma(r_i)} \right) = D \cdot a \cdot \sum_{i=0}^{M_O} \left(p(r_i) \cdot \frac{1}{Ma(r_i)} \right) \quad (\text{enačba 9}).$$

Iz tega sledi, da je pričakovano število živali, ki so ob t_0 v O in bodo prišle v W v časovnem oknu t enako seštevku prispevkov iz vsake celice i ; $i \in O$ v vsako celico j ; $j \in W$:

$$Nin_W = D \cdot a \cdot \sum_{j=0}^{M_W} \left(\sum_{i=0}^{M_O} p_{ji \rightarrow W} \right) = D \cdot a \cdot \sum_{j=0}^{M_W} \sum_{i=0}^{M_O} \left(p(r_{ji}) \cdot \frac{1}{Ma(r_{ji})} \right) \quad (\text{enačba 10}),$$

kjer je M_W število celic v W in r_{ji} razdalja vsake celice i do celice j . Podobno lahko izpeljemo število živali, ki ga W prispeva navzven:

$$Nout_W = D \cdot a \cdot \sum_{j=0}^{M_O} \left(\sum_{i=0}^{M_W} p_{ji \rightarrow O} \right) = D \cdot a \cdot \sum_{j=0}^{M_O} \sum_{i=0}^{M_W} \left(p(r_{ji}) \cdot \frac{1}{Ma(r_{ji})} \right) \quad (\text{enačba 11}).$$

$Nout_W$ in Nin_W nista nujno enaka, ker gre za deleže (število) živali, ki so bile v določenem območju ob t_0 . Razlika med obema številoma je število živali, ki so migrirale začasno in se do t_1 vrnille v isto območje v katerem so bile ob t_0 .

Število živali v superpopulaciji je potem enako seštevku števila živali v W ob t_0 in števila živali, ki v času med t_0 in t_1 pridejo v območje W :

$$\begin{aligned} NSW &= NW_{t_0} + Nin_W = D \cdot w + D \cdot a \cdot \sum_{j=0}^{M_O} \sum_{i=0}^{M_W} \left(p(r_{ji}) \cdot \frac{1}{Ma(r_{ji})} \right) = \\ &= D \cdot \left(w + a \cdot \sum_{j=0}^{M_O} \sum_{i=0}^{M_W} \left(p(r_{ji}) \cdot \frac{1}{Ma(r_{ji})} \right) \right) \quad (\text{enačba 12}). \end{aligned}$$

Ker NSW običajno ocenimo s pomočjo ulova-ponovnega ulova, nas zanima D :

$$D = NSW / \left(w + a \cdot \sum_{j=0}^{M_O} \sum_{i=0}^{M_W} \left(p(r_{ji}) \cdot \frac{1}{Ma(r_{ji})} \right) \right) \quad (\text{enačba 13}),$$

iz česar po enačbi 7 dobimo trenutno število živali NW_{t_0} . Pri tem izraz v imenovalcu dejansko pomeni površino superpopulacije, če bi bila ta na zaprti, homogeni površini.

Verjetnost, da bomo osebek našli v razdalji r od centroida njegovega domačega okoliša, pada z r po verjetnostni funkciji $p(r)$. To verjetnostno funkcijo lahko ocenimo kot distribucijo opaženih razdalj, saj le-ta opisuje verjetnost premika osebkov za določeno razdaljo. Ker nas gibanje osebkov znotraj časovnega okna zanima kot popolnoma stohastičen proces in ne kot Markovska veriga, nas ne zanima sekvenčno gibanje osebkov v času in prostoru, ampak razdalje med vsemi pari opaženih točk iste živali znotraj časovnega okna t . Tako lahko $p(r)$ razumemo kot funkcijo distribucij opaženih parnih razdalj med neinvazivnimi vzorci iste živali:

$$p(r) = 1 - \frac{Nwlk_r}{Nwlk} \quad (\text{enačba 15}).$$

kjer $Nwlk_r$ predstavlja kumulativno število opaženih razdalj manjših ali enakih razdalji r , $Nwlk$ pa skupno število vseh opaženih razdalj.

5.13.2. KOREKCIJA ULOVLJIVOSTI ZARADI VERJETNOSTI, DA BO OSEBEK ZAPUSTIL OBMOČJE VZORČENJA

CMR modeli za zaprte populacije predvidevajo, da bo osebek celotno vzorčenje na območju vzorčenja in tako dostopen ulovu. V našem primeru je to kršeno za osebkke ob meji s Hrvaško, ker imajo ti del svojega domačega okoliša izven našega območja vzorčenja. Lokacija najdbe vzorca posameznega osebkka nam govori o verjetnosti, da se bo ta osebek del vzorčenja nahajal izven območja vzorčenja. To lahko za celico, v kateri je vzorec najden, izračunamo kot seštevek prispevkov te celice v vse celice nevzorčenega območja z modifikacijo enačbe 8. Tako smo kot dva individualna kovarianta modelirali povprečno verjetnost in minimalno verjetnost, da bo osebek iz točk, kjer je bil najden njegov vzorec, v vzorčenju nahajal izven območja vzorčenja. Pri tem povprečje opisuje središče domačega okoliša, minimum pa oddaljenost domačega okoliša od meje. Podporo modelov z obema, enim ali brez teh individualnih kovariantov smo preverili po AICc.

6. NEINVAZIVNO VZORČENJE

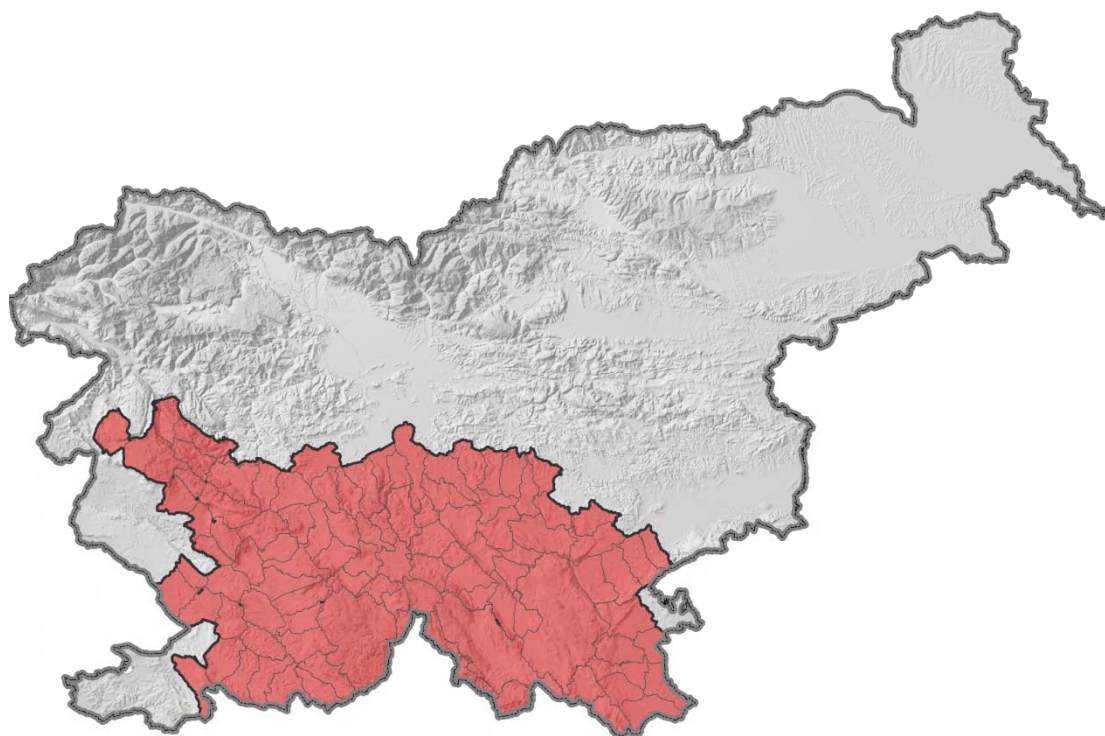
Neinvazivno vzorčenje je bil ključen in najverjetneje najbolj tvegan del celotne raziskave. Pri tem smo bili vezani na delo velikega števila prostovoljcev, napake pa bi se močno odrazile na končnem rezultatu in dejanski izvedbi raziskave. Zaradi tega smo načrtovanju, pripravi in organizaciji vzorčenja posvetili veliko pozornost.

6.1. PRIPRAVA NAČRTA VZORČENJA

Vzorčenje smo načrtovali po celotnem območju stalne prisotnosti medveda v Sloveniji. Po temeljitem premisleku smo se odločili, da bomo vzorčenje poskusili izpeljati s pomočjo ljudi, ki tudi drugače veliko časa preživijo v naravi, lovcev in gozdarjev. Odločili smo se, da bomo vzorčili iztrebke medvedov, ker je zbiranje vzorcev dlake logistično težje izvedljivo, ob tem pa zahteva več »sodelovanja« s strani medveda. Medved mora priti v past za dlako in več študij kaže, da se živali na takšne pasti navadijo in se jih sčasoma lahko začnejo izogibati.

Stopili smo v stik z Lovsko zvezo Slovenije in Zavodom za gozdove Slovenije. Oboji so izrazili pripravljenost za sodelovanje.

S pomočjo podatkov rednih štetij medvedov in pričakovanih relativnih gostot medvedov na območju vzorčenja (vir: dr. Klemen Jerina, Oddelek za gozdarstvo, BF, Univerza v Ljubljani, osebna komunikacija) smo pripravili karto lovišč, v katerih smo nato izvajali vzorčenje. Zajeli smo vsa lovišča, iz katerih imamo podatke o stalni prisotnosti medveda, pa tudi lovišča, v katerih je medved prisoten občasno (slika 9).



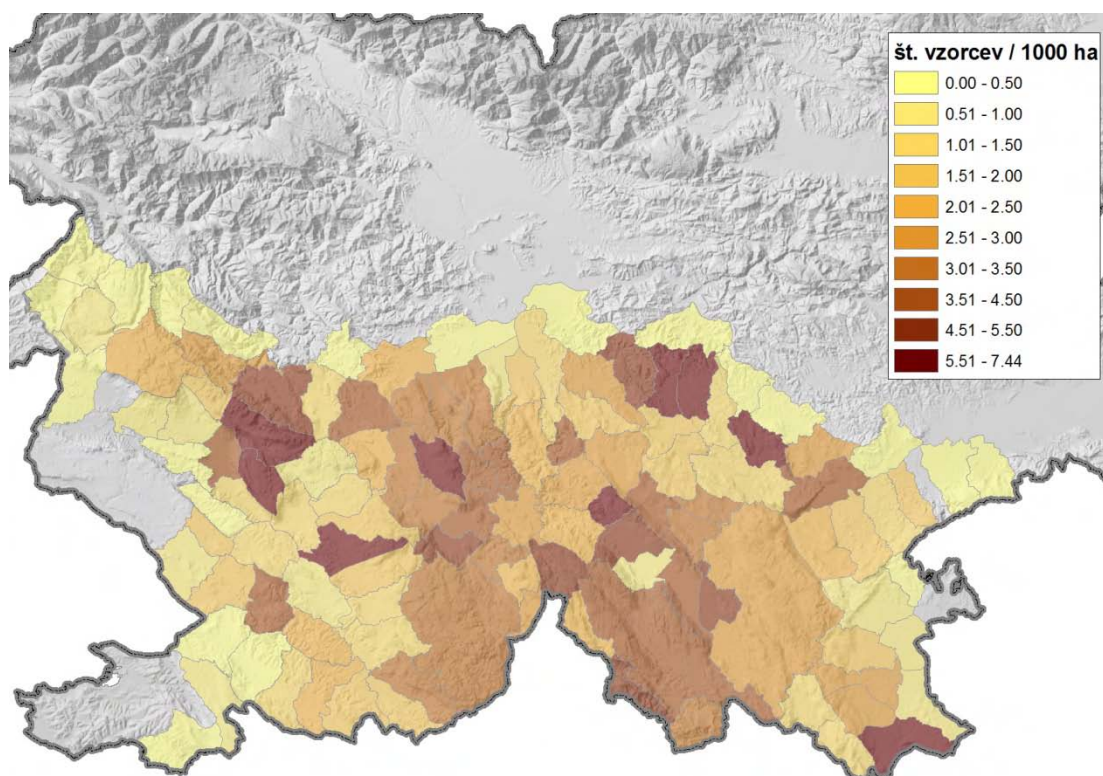
slika 9: Območje vzorčenja 2007 z vrisanimi mejami lovišč.

Že v pilotski študiji "Varstvena genetika medveda, jelenjadi in risa v Sloveniji" smo z računalniškimi simulacijami ocenili število vzorcev, ki bi jih potrebovali za dobro oceno številčnosti medveda na celotnem območju medveda v Sloveniji (tabela 6).

tabela 6: 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	575,57	625,34	8,0%
800	0,22	600,59	18,37	564,58	636,59	12,0%
600	0,17	601,57	27,84	547,01	656,14	18,1%
Število vzorcev	1000,00	800,00	600,00			
delež delujočih	70%	70%	70%			
interval zaupanja (CI)	8%	12%	18%			
potrebnih vzorcev	1429	1143	857			

Na podlagi tega in hipotetične najvišje številčnosti medvedov (600 osebkov) smo ocenili število vzorcev, ki bi jih morali dobiti po posameznem lovišču, pa tudi število vzorcev, ki bi jih morali dobiti po enoti površine gozda v posameznem območju (slika 10). Za dobro oceno številčnosti bi potrebovali homogen napor vzorčenja po celotnem območju (kar je predpostavka večine modelov). To smo poskusili zagotoviti tako, da je bila količina materiala, posredovana vsakemu lovišču, odvisna od površine gozda v lovišču in ne od števila pričakovanih vzorcev. Kljub temu pa smo morali zagotoviti, da bodo v loviščih, iz katerih pričakujemo največ vzorcev, imeli dovolj materiala. Na podlagi teh izračunov smo se odločili, da bomo vsem loviščem posredovali po eno posodico za vzorce na kvadratni kilometer gozda v lovišču.



slika 10: Pričakovano število vzorcev na 10 km² (1000 ha) po lovišču.

6.2. TESTIRANJE, OBLIKOVANJE IN PRIPRAVA MATERIALA ZA VZORČENJE

Ker je v vzorčenju sodelovalo zelo veliko število prostovoljcev, je bilo potrebno material za vzorčenje pripraviti čim bolj enostavno in pregledno. Vsak prostovoljec je moral dobiti jasna navodila in vse, kar je potreboval za pravilen odvzem vzorca. Ob tem smo morali vse čim bolj oblikovati in predstaviti, da smo pokazali primerno resnost, saj smo lahko le tako pričakovali tudi resnost sodelujočih.

Prvi in ključni problem so bile posodice za vzorce. Pri teh je ključna zahteva, da dobro tesnijo, da so neobčutljive na mehanske obremenitve, odporne na alkohol in da so dovolj poceni.

V ožjem izboru smo imeli osem posodic več različnih proizvajalcev. Vsako od teh smo testirali z mehanično obremenitvijo 98 kg, ki smo jo aplicirali prečno na posodico. Testirali smo tudi preobremenjevanje pokrovčka pri zapiranju, posodice pa smo tudi pustili napolnjene z alkoholom pod šipo na soncu v avtomobilu ob vročem dnevu (kar je verjeten scenarij na terenu).

Edina posodica, ki je prenesla vse teste, je posodica proizvajalca Greiner. Ker je tudi ena izmed cenejših med testiranimi posodicami, smo se odločili, da jo uporabimo.

Navodila za vzorčenje smo pripravili v obliki brošure, ki jo je dobil vsak sodelujoči. V njej je kratko predstavljena raziskava in podrobno opisan postopek odvzema vzorca. Brošura je primerno majhna, da gre v žep. Natisnili smo jo v nakladi 1500 izvodov.

Material za posameznega sodelujočega smo pripravili v obliki paketov, ki vsebujejo tri posodice za odvzem vzorca, brošuro in grafitni svinčnik za zapisovanje podatkov neposredno na posodico. Paket je dovolj priročen, da gre enostavno v torbo, nahrbtnik ali večji žep (slika 11).



slika 11: Paket za lovišče s paketi za posamezne sodelujoče, brošuro in pismom za gospodarja LD.

Za vsako sodelujoče lovišče smo pripravili škatlo z vsem potrebnim materialom, rezervnim materialom in pismom za gospodarja LD – vodjo lovišča (priloga 2).

Poskrbeli smo tudi za sledenje materiala. Vsako posodico smo opremili s črtno kodo in tako smo za vsako vedeli, v katero lovsko družino smo jo poslali. Ta sistem sledenja smo naprej uporabljali pri evidentiranju vzorcev, ko so se posodice vračale, pa tudi naprej v analizah.

6.3. KOMUNIKACIJA Z IZVAJALCI VZORČENJA IN RAZDELJEVANJE MATERIALA

Takoj ob začetku projekta smo stopili v kontakt z LZS in ZGS. Obe organizaciji sta izrazili pripravljenost za sodelovanje in nudili vso potrebno pomoč.

Čim več informacij smo želeli posredovati čim širši javnosti, zlasti pa lovcem. Že v poletni številki revije Lovec, ki jo prejemajo vsi slovenski lovci, smo objavili članek, kjer smo povedali, da bomo izvajali vzorčenje. V septembrski številki smo objavili dva članka, enega s predstavitvijo rezultatov pilotske študije in enega z vabilom za sodelovanje.

Lovska zveza Slovenije, zlasti gospod Blaž Krže, se je zelo angažirala pri obveščanju svojih članov o raziskavi in vključevanju v njo. Tako so organizirali sestanke z gospodarji lovskih družin po zvezah lovskih družin (ZLD). Na vsakem sestanku smo imeli Powerpoint prezentacijo in razdelili material za vzorčenje. Sestanke smo imeli:

- 14. 8. 2007: ZLD Kočevje (v Ribnici in Kočevju)
- 16. 8. 2007: ZLD Bela Krajina (v Črnomlju)
- 16. 8. 2007: ZLD Novo Mesto (v Novem Mestu)
- 17. 8. 2007: ZLD Cerknica (v Cerknici)
- 17. 8. 2007: ZLD Postojna – Ilirska Bistrica (v Pivki)
- 20. 8. 2007: ZLD Divača (V Divači)
- 21. 8. 2007: ZLD Ljubljana (v Ljubljani)

5. 9. 2007: ZLD Gorica (v Novi Gorici)

Odziv gospodarjev je bil zelo dober. Izrazili so veliko zanimanje in pripravljenost za sodelovanje.

Z Zavodom za gozdove Slovenije smo se dogovorili o sodelovanju lovišč s posebnim namenom (LPN Jelen, LPN Medved, LPN Snežnik Kočevska Reka, LPN Ljubljanski vrh). Organizirali so sestanke z vodji lovišč in poklicnimi lovci, kjer smo predstavili raziskavo in razdelili material:

4. 9. 2007: LPN Medved, LPN Snežnik Kočevska Reka (v Kočevski Reki)

5. 9. 2007: LPN Jelen, LPN Ljubljanski vrh

Tudi v LPN-jih sta se zdela odziv in pripravljenost na sodelovanje dobra.

Z ZGS smo podpisali tudi dogovor o sodelovanju gozdarjev iz območnih enot ZGS. V vse OE ZGS v območju medveda smo poslali škatle z materialom za vzorčenje in spremna pisma.

Postavili smo spletno stran www.medvedi.si, ki smo jo reklamirali v člankih v Lovcu in ki je navedena v brošurah. Na njej je precej informacij o vzorčenju, metodologiji in rezultatih. Stran je postavljena dinamično in smo jo imeli namen redno dopolnjevati, kar pa zaradi časovnih omejitev ni vedno uspevalo. Ob koncu projekta smo na njej objavili vse rezultate projekta, dolgoročen namen pa je, da bi postala osrednja stran za obveščanje javnosti o raziskovanju medveda v Sloveniji.

6.4. KOMUNIKACIJA MED VZORČENJEM

Med samim vzorčenjem smo poskušali ostati v stiku z izvajalci vzorčenja, zlasti lovskimi družinami. Tako smo v zadnjih tednih septembra po telefonu poklicali vse kontaktne osebe LD in jih izprašali prej določen nabor vprašanj o poteku vzorčenja in interesu lovcev. Odgovore smo zabeležili. Na ta način smo želeli dvigniti motivacijo (da ne »pozabijo« na nas), hkrati pa tudi pridobiti podatke s terena o poteku vzorčenja.

6.5. VMESNO POBIRANJE MATERIALA IN DOSTAVA DODATNEGA MATERIALA

Že v prvih sestankih po zvezah LD v avgustu smo se dogovorili za datume ponovnih sestankov z namenom prevzema nabranih vzorcev in razdeljevanja dodatnega materiala LD, ki bi jim materiala zmanjkalo.

Na sestankih smo predstavnike LD povprašali o odzivu lovcev in poteku vzorčenja. Razdelili smo tudi vprašalnike (priloga 3), s katerimi smo želeli izvedeti kaj o parametrih, ki bi lahko vplivali na ulovljivost medvedov (verjetnost, da posameznega medveda zaznamo v vzorčenju).

Sestanke smo izvedli po naslednjem vrstnem redu:

10. 10. 2007: ZLD Kočevje (v Ribnici in Kočevju)

11. 10. 2007: ZLD Bela Krajina (v Črnomlju)

11. 10. 2007: ZLD Novo Mesto (v Novem Mestu)

12. 10. 2007 ZLD Cerknica (v Grahovem)

12. 10. 2007: ZLD Postojna – Ilirska Bistrica (v Pivki)

15. 10. 2007: ZLD Divača (V Divači)

15. 10. 2007: ZLD Gorica (v Ajdovščini)

16. 10. 2007: ZLD Ljubljana (v Ljubljani)

Kontaktne osebe OE ZGS in LPN smo kontaktirali po telefonu in se dogovorili za predajo vzorcev.

Po končanem vzorčenju smo v decembru ponovno obiskali vse sodelujoče organizacije in prevzeli zbrane vzorce in preostali neporabljen material.

7. REZULTATI VZORČENJA IZ TREBKOV MEDVEDA

Vzorčili smo od 7. septembra do 30. novembra 2007, čeprav smo manjše število vzorcev dobili tudi v tednih pred in po tem roku. V vzorčenju je sodelovalo 105 lovskih družin (LD), 6 območnih enot Zavoda za gozdove Slovenije (OE-ZGS) in štiri lovišča s posebnim namenom (LPN). Na teren smo skupaj razdelili 5613 unikatno, s črtno kodo označenih posodic za vzorce.

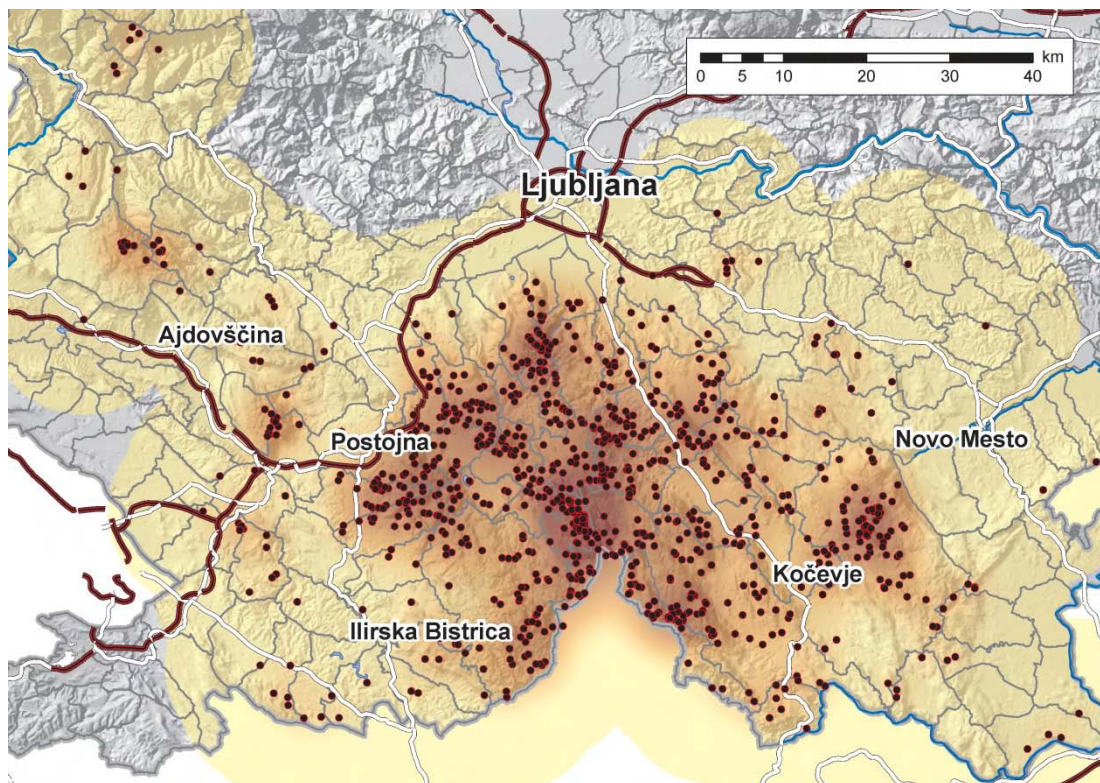
Odziv sodelujočih ocenjujemo kot zelo dober. Nekoliko je problematično dejstvo, da je bil v času vzorčenja izjemno obilen obrod bukve, hrasta in kostanja, kar je najverjetneje povzročilo manjšo gibljivost medvedov. Prav tako medvedi niso kazali zanimanja za obiskovanje krmišč, saj so očitno imeli več kot dovolj naravne hrane v gozdu. Od praktično vseh sodelujočih smo dobili informacije, da je bilo vzorce težje najti, kot so pričakovali. Kot primerjavo lahko vzamemo pilotsko raziskavo, ki smo jo izvajali v letih 2004 in 2005 (Skrbinšek s sod., 2007). Če izpustimo LD Iga Vas, kjer so na enem samem krmišču pobrali 53 vzorcev, je bilo medveda po krmiščih zelo malo zaznati, saj smo s krmišč dobili le 15% vzorcev. Nasprotno smo v pilotski raziskavi na krmiščih pobrali skoraj 35% vzorcev. Delež vzorcev nabranih po cestah je podoben v obeh raziskavah (36% vzorčenje 2007, 39% 2004/05), medtem ko je delež vzorcev, najdenih »drugje« (gozdne vlake, brezpotja) v sedanji raziskavi mnogo večji (49% vzorčenje 2007, 26% v raziskavi 2004/05). Iz tega lahko sklepamo, da so se sodelujoči potrudili in iskali vzorce (iztrebek je mnogo težje najti v brezpotju kot na krmišču), toda medvedov na krmišča preprosto ni bilo.

Skupaj je bilo nabranih 1057 neinvazivnih vzorcev medveda v 84 dnevih vzorčenja, kar smatramo za uspeh, sploh glede na obilen obrod plodonosnega drevja. Subjektivne ocene starosti vzorcev kažejo, da so vzorci zelo sveži (povprečna ocenjena starost vzorca 2,17 dni (SD = 1,51), kar ima velik vpliv na uspešnost genotipizacije (Skrbinšek s sod., 2007).

Tabela 7: Pregeled števila nabranih vzorcev po sodelujoči organizaciji. Številke se razlikujejo od vmesnega poročila 3, ker je pri omenjenem poročilu prišlo do napake. Ker so se nam vzorci vračali po različnih poteh, smo kot kriterij vzeli organizacijo, v kateri je sodelujoči dobil material za vzorčenje.

organizacija	število vzorcev	%
Lovske družine	822	77.77%
LPN Jelen	67	6.34%
LPN Medved	55	5.20%
LPN Snežnik – K. Reka	25	2.37%
LPN Ljubljanski Vrh	2	0.19%
LPN Žitna Gora	5	0.47%
OE-ZGS	81	7.66%
Skupaj	1057	100%

Podobno kot s številom zbranih vzorcev smo lahko zadovoljni z njihovo prostorsko razporeditvijo (Slika 12).



Slika 12: Lokacije neinvazivnih vzorcev, zbranih v vzorčenju 2007. Vidimo lahko razmeroma homogeno prostorsko razporeditev vzorcev z zgoščitvijo proti osrednjemu delu območja medveda in redkejšimi vzorci proti robovom.

Po pričakovanjih je najdenih vzorcev več proti osrednjemu delu območja medveda in manj proti robovom. Ker sklepamo, da je bil napor vzorčenja razmeroma homogen po celotnem območju, sklepamo, da razporeditev vzorcev dobro ponazarja razširjenost in gostoto populacije medveda v Sloveniji. Edina izjema je del lovišča LPN Medved in del lovišča LPN Snežnik Kočevska Reka, kjer najverjetneje vzorcev niso nabirali, zato so ta območja ostala nepovzorčena. Število nabranih vzorcev po organizacijah predstavlja Tabela 7. Ker so vzorci potovali po različnih poteh, smo kot kriterij vzeli organizacijo, od katere je sodelujoči dobil material (posodico) za vzorčenje. V primeru LPN-jev številke ne pomenijo celotnega števila vzorcev nabranih na njihovem območju, ker so tam vzorce nabrali tudi drugi sodelujoči.

8. REZULTATI LABORATORIJSKIH ANALIZ

Laboratorijski del raziskave je bil po času in količini dela najbolj obsežen in je trajal od oktobra 2007 do septembra 2008. Razdelimo ga lahko v tri glavne dele: optimizacija PCR protokolov in organizacija analiz, ekstrakcija DNA in genotipizacija.

8.1. NEINVAZIVNI VZORCI

8.1.1. USPEŠNOST AMPLIFIKACIJE DNA IZ NEINVAZIVNIH VZORCEV

Uspešnost amplifikacije je kritična za uspeh študije – če je visoka, dobimo za isti napor in stroške več koristnih podatkov.

V pilotski študiji smo opazili, da je uspešnost genotipizacije iztrebka odvisna od ocenjene starosti iztrebka in letnega časa vzorčenja (Skrbinšek s sod., 2007). Uspešnost je bila sprejemljiva do ocenjene starosti iztrebka štiri dni, kasneje pa je začela hitro padati, tako da smo dali sodelujočim navodila, naj ne pobirajo iztrebkov, ki se jim zdijo starejši od štirih dni. Prav tako je bila uspešnost najvišja jeseni, čemur smo prilagodili tudi naše vzorčenje.

Od 1057 zbranih neinvazivnih vzorcev smo jih 931 (88%) uspešno genotipizirali. Uspešnost genotipizacije iztrebkov se pri različnih živalskih vrstah običajno giblje od 40% - 60%. Poznamo le eno objavljeno študijo, v kateri je bila uspešnost 75% (Bellemain, 2004).

Tabela 8 povzema rezultate PCR amplifikacij in genotipizacij neinvazivnih vzorcev po posameznem markerju.

Tabela 8: Pregled uspešnosti in PCR problemov po lokusih za vzorce iztrebkov. Pogostost izpada alelov in lažnih alelov je izračunana za vzorce, ki so se uspešno amplificirali v PCR.

marker	izpad alelov	lažni aleli	% uspešnih PCR	delež uspešnih genotipizacij	N vzorcev	N vzorcev s pozitivno PCR	N amplifikacij po amplificiranem vzorcu	N amplifikacij / vse vzorce
G10C	9.97%	0.43%	87.62%	90.57%	1053	951	3.32	3.01
Mu50	10.49%	0.21%	89.08%	90.57%	1053	951	3.32	3.01
G10X	12.53%	0.81%	86.42%	90.29%	1053	948	3.33	3.01
Mu10	9.60%	0.40%	87.05%	90.29%	1053	948	3.33	3.01
G10P	11.94%	0.55%	85.69%	90.19%	1053	947	3.33	3.01
G10D	13.21%	0.34%	84.83%	90.00%	1053	945	3.34	3.01
Mu15	11.43%	0.33%	86.13%	90.00%	1053	945	3.34	3.01
G10L	10.03%	0.22%	86.19%	89.90%	1053	944	3.35	3.01
Mu09	9.11%	0.39%	82.01%	89.81%	1053	943	3.35	3.01
Mu23	10.48%	0.27%	83.09%	89.71%	1053	942	3.35	3.01
Mu59	10.53%	0.56%	84.80%	89.62%	1053	941	3.36	3.01
G10H	11.37%	0.44%	78.28%	88.38%	1053	928	3.40	3.01
Vsi markerji	10.05%	0.38%	81.56%	86.43%	1053		3.61	3.01

8.1.2. ŠTEVILO NAJDENIH GENOTIPOV IN SPOLNO RAZMERJE

V neinvazivnih vzorcih smo v vzočenju 2007 dobili 342 različnih genotipov. Še 12 genotipov, ki jih nismo srečali v neinvazivnih vzorcih, smo našli v tkivnih vzorcih medvedov, ki so poginili ali bili odstreljeni v času vzorčenja (N=26). Tako smo v vzorčenju našli skupaj 354 različnih medvedov, 159 (45%) samcev in 195 (55%) samic.

8.2. TKIVNI VZORCI

8.2.1. USPEŠNOST AMPLIFIKACIJE, OCENA NAPAK

Na 22 polimorfni mikrosatelitskih lokusih in na Y spolni kromosom vezan SRY lokus smo genotipizirali 487 tkivnih vzorcev medvedov. Za 17 vzorcev (3,4%) nismo uspeli pridobiti popolnega genotipa.

Da bi razumeli zanesljivost analiz, moramo nujno oceniti napako, s katero imamo opraviti v podatkih. Pri še tako dobrem laboratorijskem delu dobimo v rezultatih iz čisto objektivnih razlogov napake, katerih pogostost moramo oceniti.

Tabela 9: Pregled uspešnosti PCR, težav in ocena napak po lokusih za tkivne vzorce.

Marker	izpad alelov	lažni aleli	% uspešnih PCR	delež uspešnih genotipizacij	N vzorcev	N vzorcev s pozitivno PCR	N amplifikacij po amplificiranem vzorcu	N amplifikacij / vse vzorce	% večkrat amplificiranih	N pričakovanih napak
Cxx20	0,00%	0,00%	97,52%	99,40%	499	496	1,38	1,37	31%	0,00
G10B	0,00%	0,00%	97,90%	99,20%	498	494	1,74	1,72	51%	0,00
G10C	0,12%	0,00%	96,66%	99,40%	498	495	1,75	1,74	52%	0,28
G10D	0,24%	0,00%	96,31%	99,20%	498	494	1,76	1,74	52%	0,57
G10H	1,54%	0,00%	95,35%	99,00%	499	494	1,65	1,64	51%	3,70
G10J	0,00%	0,00%	98,09%	99,40%	499	496	2,01	2,00	66%	0,00
G10L	0,09%	0,00%	89,81%	99,60%	499	497	2,61	2,60	77%	0,10
G10M	0,00%	0,00%	96,39%	98,80%	499	493	2,02	2,00	66%	0,00
G10P	0,00%	0,12%	96,66%	99,60%	498	496	1,75	1,74	52%	0,28
G10X	0,12%	0,00%	95,85%	99,00%	498	493	1,76	1,74	52%	0,29
G1A	0,00%	0,00%	96,82%	99,20%	499	495	1,65	1,64	52%	0,00
Mu05	0,13%	0,00%	97,43%	99,40%	499	496	1,65	1,64	52%	0,30
Mu09	0,30%	0,00%	96,50%	99,40%	499	496	1,38	1,37	31%	1,04
Mu10	0,00%	0,00%	96,91%	99,00%	498	493	2,10	2,08	67%	0,00
Mu11	0,00%	0,00%	97,80%	99,60%	499	497	1,64	1,64	52%	0,00
Mu15	0,15%	0,00%	95,78%	99,60%	499	497	1,38	1,38	31%	0,52
Mu23	0,10%	0,00%	97,29%	99,60%	498	496	2,08	2,08	67%	0,16
Mu26	0,13%	0,00%	94,61%	97,80%	499	488	1,67	1,64	51%	0,31
Mu50	0,00%	0,00%	97,20%	99,40%	498	495	2,09	2,08	67%	0,00
Mu51	0,00%	0,00%	98,06%	99,60%	498	496	2,08	2,07	67%	0,00
Mu59	0,30%	0,00%	97,39%	99,60%	498	496	2,08	2,08	67%	0,49
Mu61	0,00%	0,00%	97,52%	99,40%	499	496	1,38	1,37	31%	0,00
Vsi lokusi	0,14%	0,01%	94,04%	99,28%			1,93	1,80	53,79%	
Pričakovano število vzorcev z eno napako										8,04
% vzorcev z napako na enem lokusu										1,61%
% napak v vseh podaktih (vsi lokusi, vsi vzorci)										0,07%

Ker smo analizo velikega števila vzorcev večkrat ponovili (bodisi sistematično zaradi ocene napak ali zaradi problematične genotipizacije posameznega lokusa v multipleksu), smo lahko dobro ocenili napako, ki jo še

pričakujemo v podatkih. Vsaka genotipizacija je bila načrtno narejena neodvisno. Najdene napake smo naknadno popravili. Za vzorce, ki so bili analizirani samo enkrat, smo napako ocenili (Tabela 9).

Ocenili smo, da lahko pričakujemo v podatkih osem vzorcev, ki imajo po eno napako (najverjetneje izpad alela) na enem lokusu. Verjetnost napake na dveh lokusih ali napake v večkrat ponovljenih vzorcih je zanemarljiva. Napaka je dovolj majhna, da ne bi smela imeti nobenega vpliva na rezultate populacijsko-genetskih analiz.

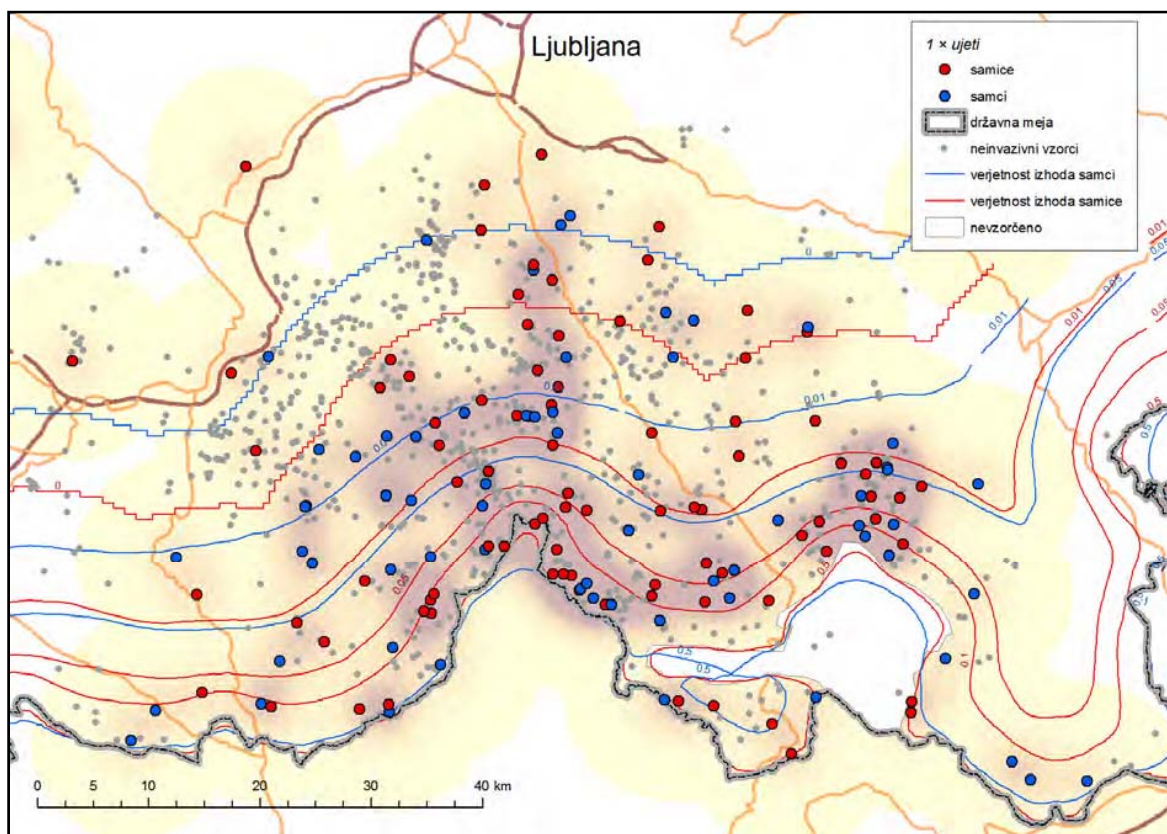
Najpogostejša zaznana napaka je bila, da smo lažni alel (FA) potrdili kot pravi alel. Večkrat nam je težave povzročal tudi lokus G10H, ki se nahaja na delu, kjer se pogostokrat pojavijo težave z dolžinskim standardom in tako ne moremo določiti natančne dolžine alelov, hkrati pa ima tudi točkovno mutacijo, ki mu spremeni mikrosatelitski vzorec. Na tem lokusu (v primerjavi z ostalimi) največjo napako (1,54%) pričakujemo zaradi izpada alelov (alelic drop out). Največji delež napake odpade prav na ta lokus. Na lokusu G10P pa je največja možnost napake (0,12%) zaradi potrditve lažnih alelov (FA) kot pravih. Ker ima lokus težavo z adenilacijo (artefakt PCR zaradi nepopolnega dodajanja končnega adenina amplificiranemu fragmentu DNA), je tako pri večini vzorcev treba dobro razmisliti, kaj je pravzaprav pravi alel.

9. MODELIRANJE ULOVA – PONOVRNEGA ULOVA IN OCENA VELIKOSTI POPULACIJE

9.1. PRIPRAVA PODATKOV ZA CMR MODELIRANJE

9.1.1. PREGLED PODATKOV

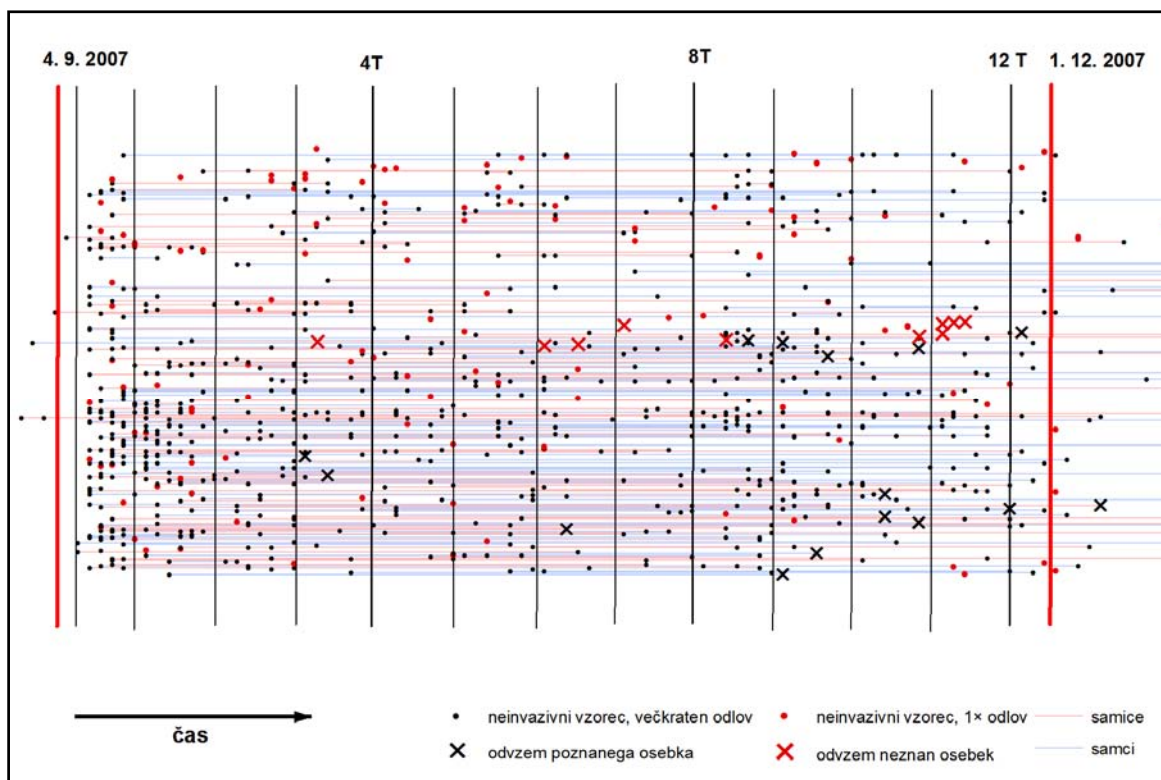
Že po hitrem pregledu podatkov smo lahko ugotovili, da je ulovljivost dobra. Skupaj s tkivi medvedov, ki so poginili ali bili odstreljeni v času vzorčenja, smo imeli 957 uporabnih vzorcev, našli pa smo 354 različnih genotipov. V povprečju smo vsakega medveda ujeli 2,7 krat. Največ smo istega medveda ujeli 38 krat, 130 medvedov pa smo ujeli samo enkrat.



Slika 13: Razporeditev 1× ujetih živali. V ozadju je prostorska gostota 1 × ujetih živali (kernel). Jasno se vidi gradient od meje s Hrvaško in od meje območja, ki ni bilo vzorčeno. Črte (izoprobe) kažejo ocenjeno verjetnost, da bo osebek zapustil območje vzorčenja. Zaradi različnih vzorcev gibanja se te ocene za samce in samice razlikujejo.

Število in razporeditev enkrat ulovljenih medvedov je dober indikator intenzivnosti vzorčenja (Slika 13). Pregled enkrat ulovljenih medvedov je pokazal, da je teh več ob hrvaški meji in ob nevzorčenem območju na Kočevskem, kar pomeni, da je v tem območju ulovljivost medvedov gotovo nižja. To je pričakovano, saj se z bližino roba območja večja verjetnost, da bo žival med vzorčenjem zapustila območje, na katerem lahko najdemo njen vzorec. Po drugi strani je v območju daleč od meje, zlasti na območju Menišije in severozahodnega dela Javornikov malo enkrat ujetih živali, kar kaže na visoko intenzivnost vzorčenja na tem območju in majhen vpliv medvedov izven območja vzorčenja.

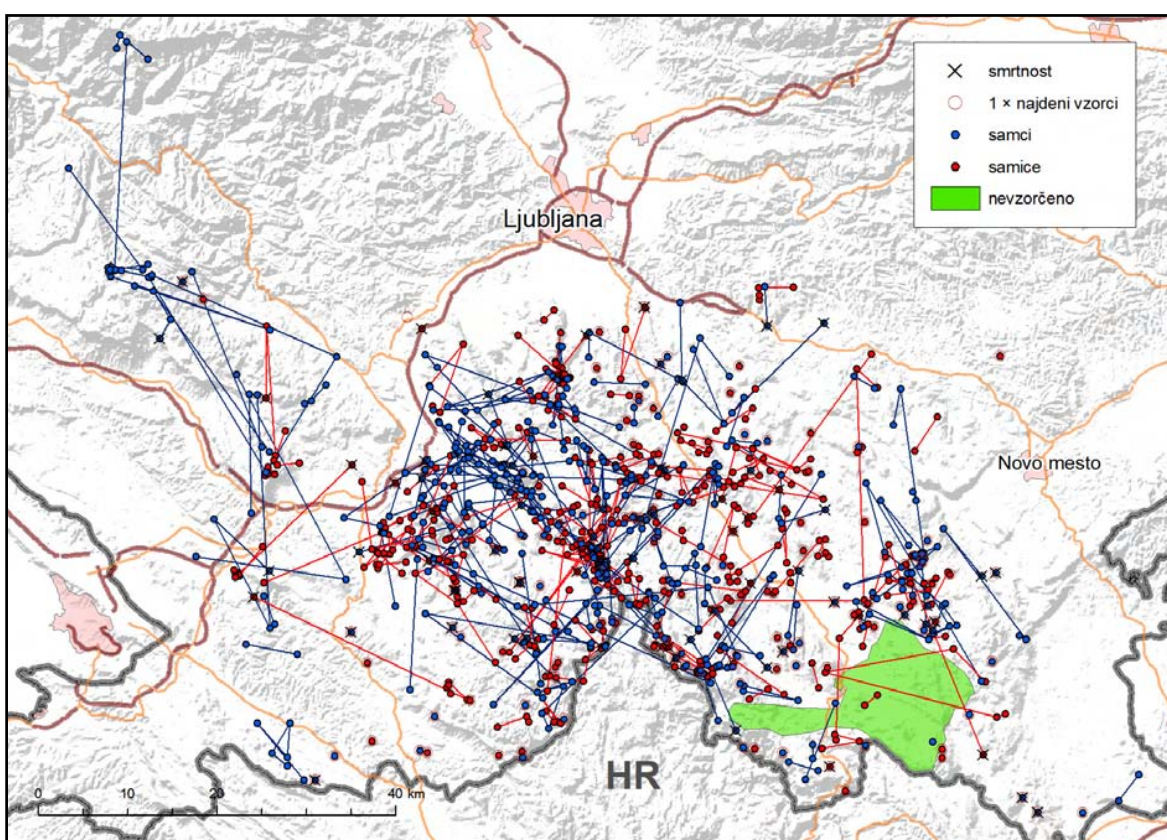
Časovni pregled podatkov (Slika 14) kaže, da se je intenzivnost vzorčenja spreminjala. Največja je bila ob začetku vzorčenja in je nato padala. Naslednji dvig intenzivnosti lahko opazimo po osmih tednih, ko smo opravili drugi obisk sodelujočih ZLD. Očitno je motivacija sodelujočih s časom upadala, kar je pri tako velikem številu sodelujočih pričakovano, vseeno pa smo ta padec motivacije ublažili z nenehno komunikacijo med vzorčenjem.



Slika 14: Časovni pregled vzorcev. Čas gre od leve proti desni, vsak vzorec je v svoji vrstici. Vodoravne črte povezujejo vzorce istih oseb. Lahko vidimo, da je bila intenzivnost vzorčenja največja na začetku, potem pa je upadala. Naslednji dvig intenzivnosti lahko vidimo po osmem tednu, kmalu po drugem obisku sodelujočih ZLD.

9.2. ANALIZA GIBANJA ŽIVALI IN OCENA $P(R)$

Neinvazivno genetsko vzorčenje ima v svoji prostorski komponenti nekaj podobnosti z radiotelemetrijo, vendar pa deluje nekoliko drugače od nje. Pri radiotelemetriji imamo veliko število lokacij za (običajno) 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 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 osebka, neinvazivno vzorčenje pa bolje opiše variabilnost med osebki. Kje in kdaj postane katera metoda boljša, 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.

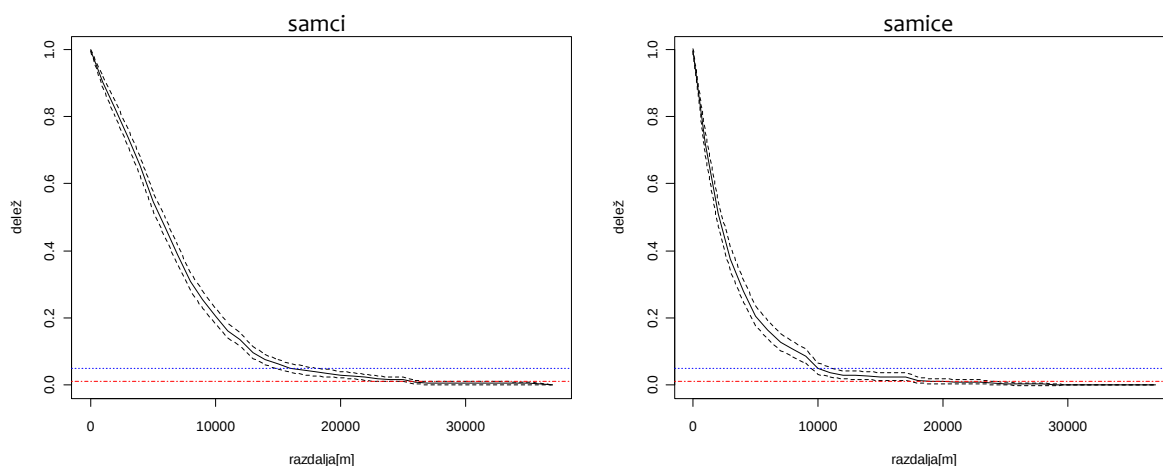


Slika 15: Gibanje živali, zajetih v neinvazivno vzorčenje medvedov 2007. Črte povezujejo vzorce istega osebka.

9.2.1. ANALIZA PREMIKANJA OSEBKOV

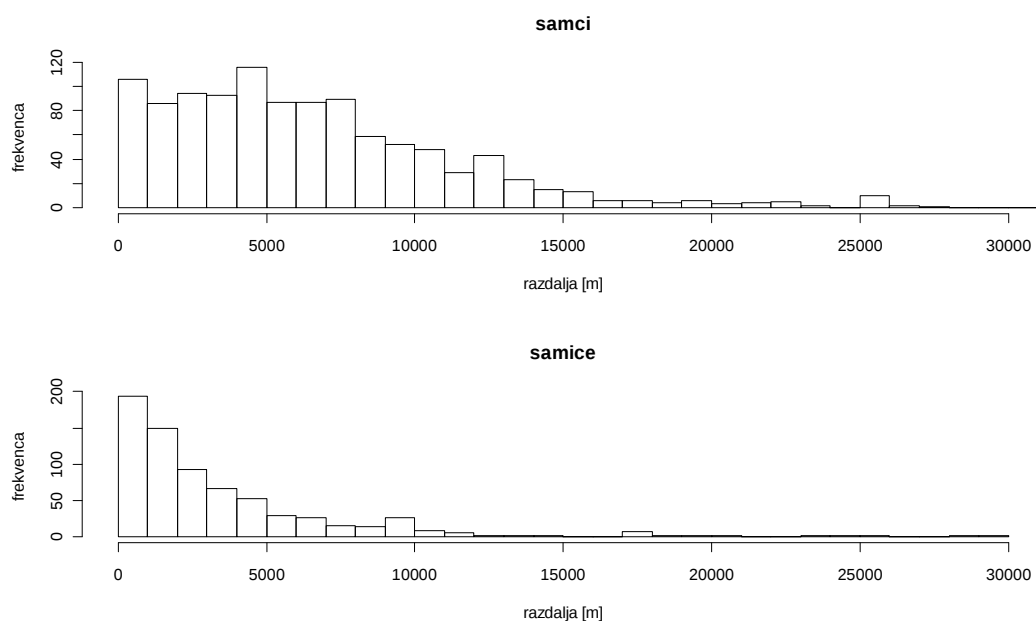
Modeliranje ulova-ponovnega ulova nam da število živali v superpopulaciji našega vzorčenega območja, torej število živali, ki so se v času vzorčenja gibale skozi območje. Vendar pa niso vse te živali čisto »slovenske«, saj imajo nekatere velik del svojega življenjskega prostora tudi na Hrvaškem in v določenem trenutku niso vse pri nas. Tu nam priskoči na pomoč poznavanje premikanja medvedov, s pomočjo katerega lahko ocenimo delež živali, ki si jih delimo s Hrvati. Tako lahko iz ocene superpopulacije dobimo oceno velikosti trenutne populacije.

Za vsak osebek smo izračunali razdalje med pari točk, na katerih smo našli njegov vzorec. Za korekcijo avtokorelacije smo dali pogoj, da morajo biti vzorci vsaj štiri dni narazen. Za vse osebe smo potem izračunali kumulativne opažene razdalje med točkami do neke razdalje, kar nam opisuje verjetnost, da bo nek povprečen osebek prišel do te točke znotraj časovnega okna vzorčenja (glej stran 18 in Slika 16).

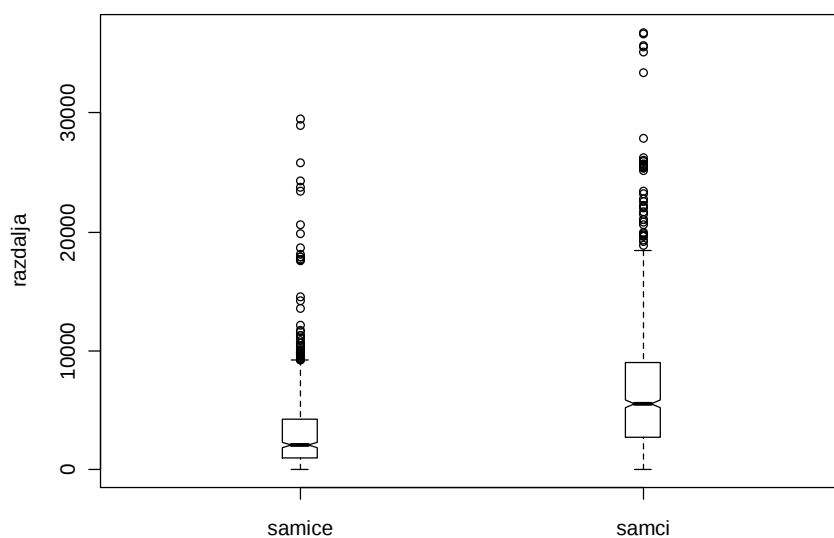


Slika 16: Inverzno kumulativno število opaženih razdalj med pari točk istega osebkov manjših ali enakih razdalji na x osi. Črtkane črte označujejo 95% CI, pridobljen z neparametričnim bootstrapom (1000 iteracij). Pri predpostavki filopatije opisuje radije gibanja povprečnega osebkov. Med samci in samicami se ti radiji znatno razlikujejo – pri samicah je mediana prehojenih razdalj približno 2000 m, pri samcih pa okrog 5500 metrov. Modra črta = 0,05, rdeča črta = 0,01.

Pri hipotezi filopatije bi pričakovali, da se živali gibljejo znotraj nekega domačega okoliša. Pri tem bodo tudi v daljšem času ostale v tem domačem okolišu, lahko jih pa najdemo kjerkoli v njem. Če je gibanje naključno, bo v posameznem trenutku največja verjetnost, da osebek najdemo blizu centroida območja, proti robovom pa bo ta verjetnost padala. Če bi naključno jemali lokacije osebkov v času za vsak par točk in izračunali razdalje med njimi, bi moral imeti histogram unimodalno obliko. Modus bi moral biti razmeroma blizu nič, distribucija bi pa morala imeti dolg rep proti desni.

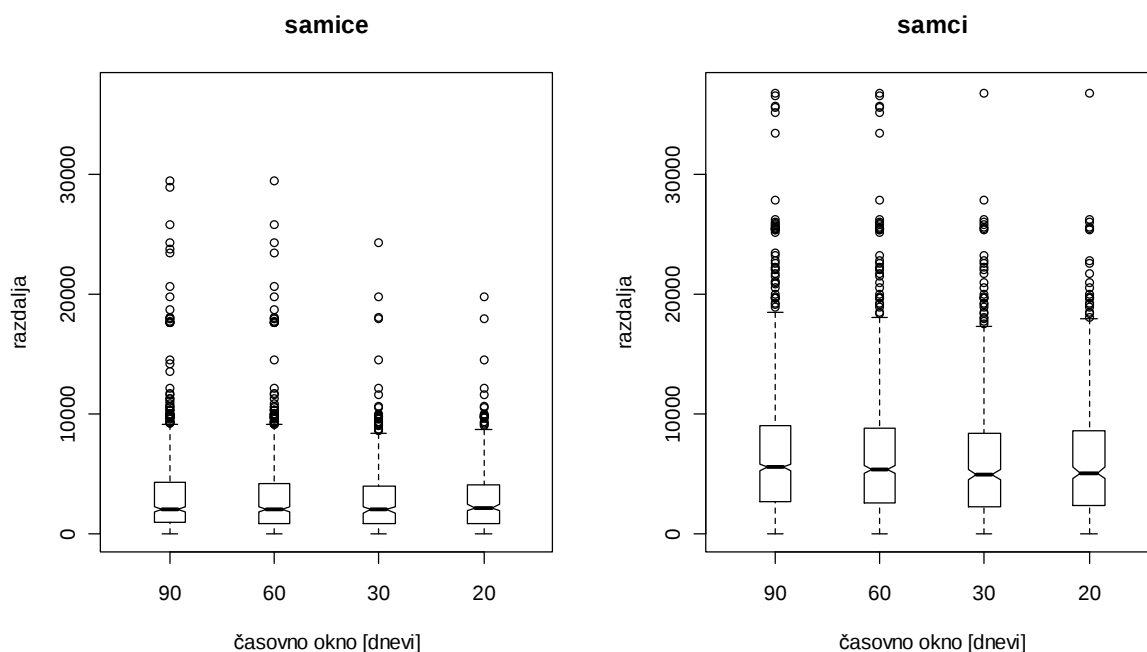


Slika 17: Histogram razdalj med pari točk iste živali.



Slika 18: Primerjava distribucije opaženih razdalj pri samcih in samicah v časovnem oknu 90 dni. Pri samicah je mediana okrog 2000 m, pri samcih pa približno 5500 m (približki podani zaradi pozicijske natančnosti lokacij vzorcev, ki so zabeležene v kilometrski mreži).

Če bi bila predpostavka filopatričnosti kršena, bi morali z daljšanjem časovnega okna, v katerem gledamo razdalje med pari točk, dobiti vedno več daljših razdalj. Pri filopatriji bi morala distribucija opaženih razdalj ostati ista ne glede na časovno okno, kar je opaziti v naših podatkih (Slika 19).



Slika 19: Primerjava opaženih razdalj med pari vzorcev iste živali v 90, 60, 30 in 20 dnevni časovni oknih. Z večanjem širine časovnega okna sicer opazimo več zelo dolgih premikov, kar je razumljivo, saj večamo vzorec in imamo večjo verjetnost zaznavanja redkih dogodkov. Mediana in distribucija ostajata bolj ali manj isti.

Lahko rečemo, da se živali obnašajo filopatrično in da jih velika večina ostaja znotraj svojih domačih okolišev v časovnem oknu vzorčenja (3 mesece). Rezultati pa niso nujno tipični, ker je bila jesen 2007 izjemno bogata z gozdnimi plodovi in medvedom ni bilo potrebno delati dolgih premikov, da bi prišli do virov hrane. V drugačnih prehranskih razmerah se lahko ti vzorci gibanja spremenijo.

9.3. IZDELAVA MODELOV ULOVA-PONOVNEGA ULOVA (CMR) – SPLOŠNA OPAŽANJA

Pri oceni populacije z modeliranjem ulova-ponovnega ulova (CMR) imamo dva glavna problema:

- heterogenost ulovljivosti (zaradi prostorsko neenakomerne vzorčenja in začasnega odhajanja živali na nevzorčeno območje)
- trajna emigracija in imigracija preko meje območja vzorčenja.

Prava odprtost populacije zaradi trajne migracije je najverjetneje zanemarljiva. Celotno vzorčenje je bilo kratko in analize razdalj med vzorci iste živali kažejo veliko stopnjo filopatričnosti.

Večji problem predstavlja začasno odhajanje živali iz območja vzorčenja. Ko odidejo, postane njihova ulovljivost enaka nič, tako da lahko zaradi tega dobimo heterogenost ulovljivosti. Ob tem pa v naravi verjetno dejansko obstajajo individualne razlike v ulovljivosti med osebkami. V kratkem časovnem oknu ima lahko zaradi avtokorelacije (npr. zadrževanja nekaj dni v bližini nekega krmišča) nek osebek znatno višjo ulovljivost (verjetnost, da bomo njegov vzorec našli) kot kak drug osebek. Ker je ključna predpostavka modelov, da je ulovljivost znotraj posamezne kategorije (v našem primeru spola) in znotraj posameznega vzorčnega intervala homogena, bi lahko prekratki odlovni intervali povzročili individualno heterogenost ulovljivosti (različno ulovljivost posameznih osebkov) in s tem napačno oceno velikosti superpopulacije. Klasična rešitev za individualno heterogenost je večanje ulovljivosti. Če vzamemo dovolj dolg odlovni interval, bo sicer katera izmed živali ujeta večkrat, druga samo enkrat, nasploh pa se bo verjetnost ulova homogenizirala.

Težava dolgih odlovnih intervalov je, da se del podatkov izgublja, saj se večkratni ulov iste živali v istem intervalu šteje kot en ulov te živali. Zaradi tega smo v analitičnem okolju R sprogramirali optimizacijski algoritem, kjer smo s pomočjo Markovskih verig našli razporeditev odlovnih intervalov z dovolj veliko ulovljivostjo v posameznem intervalu in minimalno izgubo podatkov.

Korekcijo zmanjšane ulovljivosti zaradi učinka roba smo opisali na strani 18.

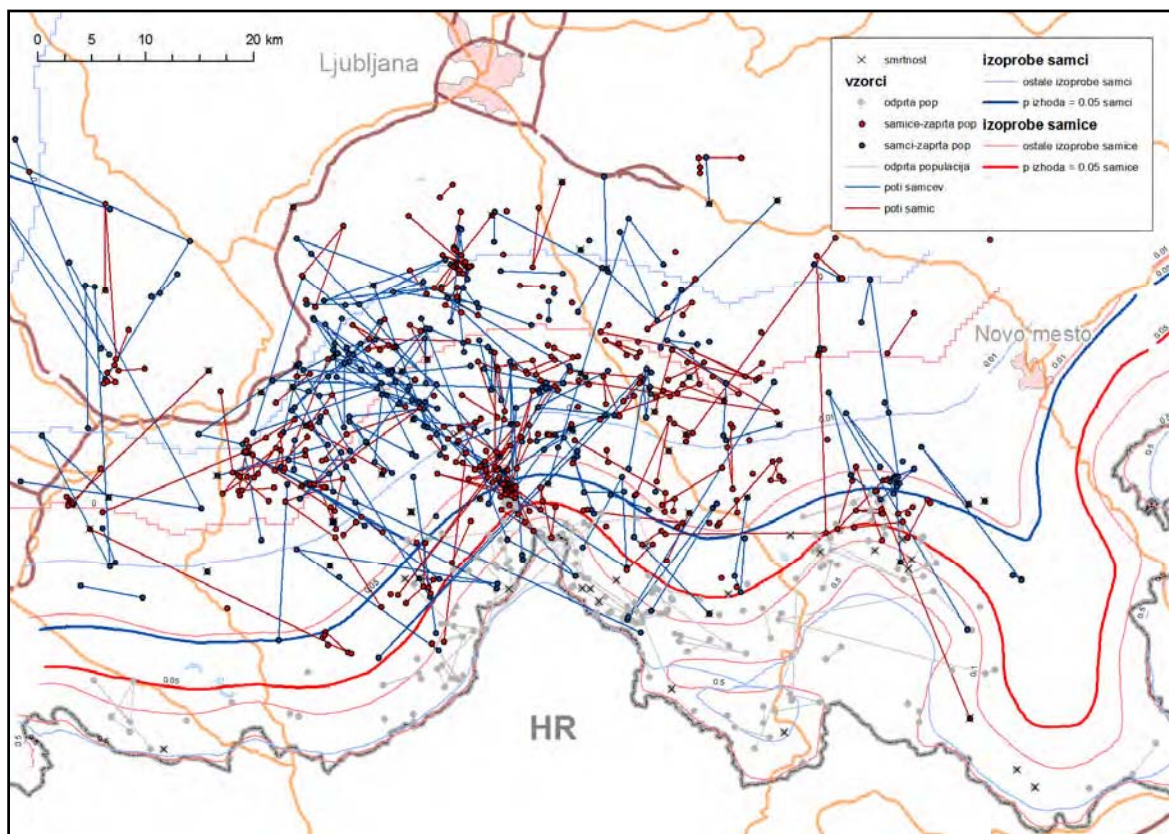
Ker je vzorčenje potekalo kontinuirano, je kršena predpostavka večine odprtih modelov, da je vzorčenje v posameznem intervalu trenutno. Vpliv te kršitve je težko oceniti, vendar so bili v našem vzorčenju odlovni intervali razmeroma kratki (5-10 dni), tako da verjetno ni znoten. Pri modelih za zaprte populacije ta predpostavka ni kritična.

9.4. TESTIRANJE MODELOV NA OBMOČJU, ZA KATEREGA PREDVIDEVAMO POPOLNO ZAPRTOST POPULACIJE

Ker je območje vzorčenja veliko, je pričakovati, da živali, ki so daleč od odprtega roba območja vzorčenja, tega območja ne bodo zapuščale. Če v podatke za CMR analizo upoštevamo tudi vzorce živali iz »zaprtega« območja, ki smo jih našli izven tega območja, dobimo dejansko zaprto populacijo in lahko brez resnih kršitev predpostavk uporabimo modele za zaprte populacije. Če potem vzamemo samo vzorce najdene v tem »zaprtem« območju, pa lahko testiramo, koliko kršenje predpostavk o zaprtosti vpliva na rezultate. Pravzaprav simuliramo situacijo, ki jo imamo z odprtostjo populacije proti Hrvaški, s to razliko, da vzorčimo tudi na drugi strani »meje«.

Po postopku opisanem pri metodah (stran 15) smo za vsako celico površine izračunali predviden vpliv nevzorčenega območja, na katerem so prisotni medvedi. Pri tem smo kot površino, ki vpliva na vzorčno območje, upoštevali samo celice z ekstenzivno rabo (gozd, grmičevje, naravna travnišča). Podatke o rabi prostora smo dobili iz GIS sloja CORINE 2000.

Na podlagi tega smo lahko izdelali območja, za katera je pričakovan vpliv medvedov iz nevzorčenih območij manjši od 5%. Izdelali smo dve taki območji: za samce in za samice. Samci imajo znatno večje radije premikanja od samic (glej stran 33), zato so tudi vplivna območja večja in zaprta območja manjša.



Slika 20: Del populacije, za katerega predvidevamo demografsko zaprtost. Zaprti območji za samce in samice se razlikujeta (območji z p izhoda ≤ 0.05). Na ta način smo simulirali stanje na dejanski meji celotnega območja vzorčenja in testirali uporabljene metode.

Kot običajno smo naredili nabore modelov, ocenili parametre in jih razvrstili glede na AICc. Za oceno smo uporabili najboljši model. Testirali smo dva tipa modeliranja: Hugginsov model za zaprto populacijo in Schwartz-Arnasonovo parametrizacijo Jolly-Seberjevega modela (POPAN) za odprto populacijo. Z mejo zaprtega območja smo simulirali mejo vzorčenja in primerjali ocene populacij, če smo vključili v modeliranje vzorce živali iz »zaprtega območja«, najdene izven tega območja (simulirana zaprta populacija), oziroma če teh vzorcev nismo vključili (simulirana odprta populacija).

Tabela 10: Ocene števila medvedov v simuliranem zaprtem območju (uporabljeni dejanski podatki vzorčenja) in tem istem območju brez simulirane demografske zaprtosti. Območji za samce in samice sta različno veliki, tako da spolno razmerje ne odraža razmerja v populaciji.

model	Huggins	POPAN
samci zaprta	126(120-139)	127(120-141)
samci odprta	129 (119-150)	164(122-206)
samice zaprta	174 (165-188)	193 (179-216)
samice odprta	176(165-194)	201(161-242)
skupaj zaprta	301 (286-316)	321 (299-341)
skupaj odprta	305 (285-325)	365 (307-324)

Za zaprto populacijo je gotovo najbolj primeren Hugginsov model, ki mu lahko pri oceni simulirane zaprte populacije popolnoma zaupamo, saj praktično ni kršena nobena njegova bistvena predpostavka. Zanimivo je, da tudi pri oceni tega območja kot odprte situacije (tako kot dejansko delamo za celo območje, kjer z druge strani meje nimamo vzorcev kot v tej simulaciji) po Hugginsovem modelu dobimo praktično identičen rezultat.

Nekoliko slabše se odreže POPAN model, zato ta model za naše potrebe verjetno ni najbolj primeren.

Naslednja stvar, ki smo jo testirali s simuliranim zaprtim območjem, je bila ocena korekcije superpopulacije, ki je tudi pomemben dejavnik končne ocene. Podobno kot pri dejanski oceni številčnosti medvedov v Sloveniji smo zaprto območje razdelili v manjša območja, na katerih pričakujemo razmeroma homogeno gostoto medvedov. Potem smo izračunali pričakovano število migrantov iz tega območja in ga primerjali z dejansko opaženim številom migrantov (Tabela 11).

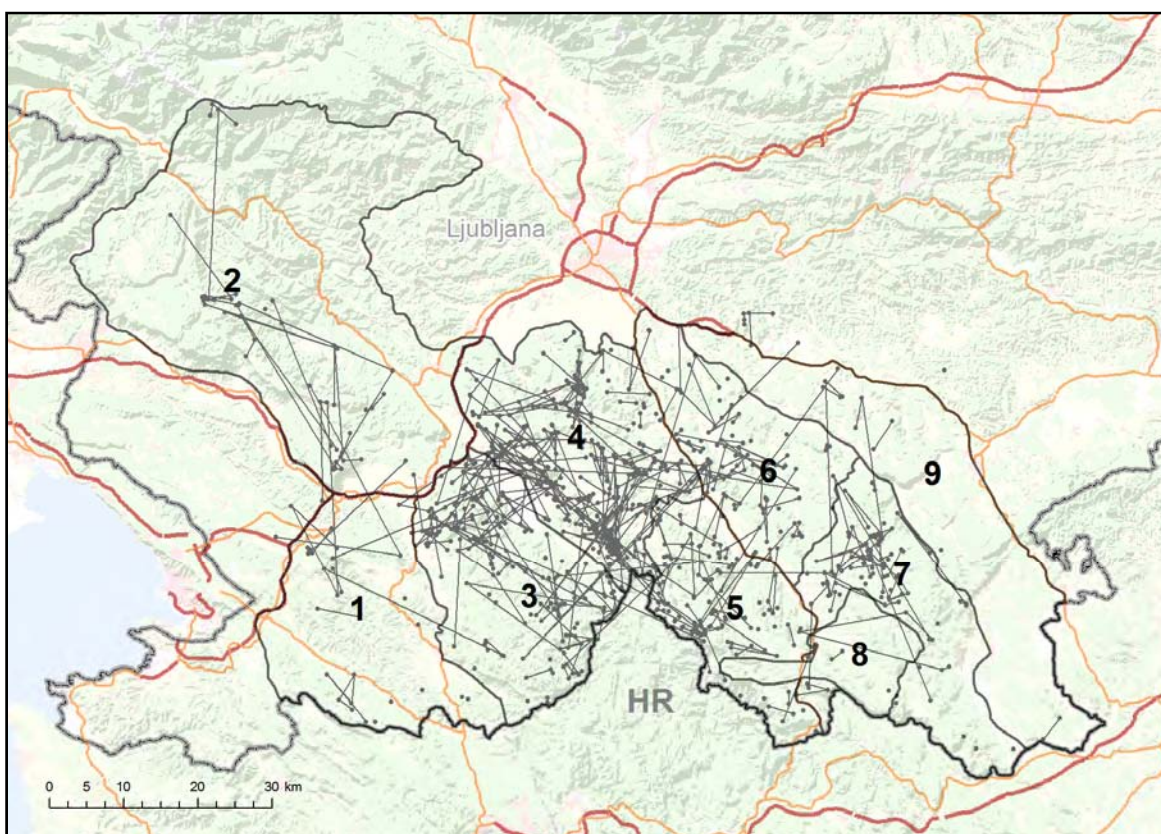
Tabela 11: Razmerja med pričakovanimi in opaženimi migranti na simuliranem zaprtem območju.

	samci	samice
različnih živali	101	145
ocena populacije	126 (120-139)	174 (165-188)
pričakovano št. opaženih migrantov	13,9	7,19
opaženo število migrantov	18	9
ocenjeno skupno število migrantov	17 (16-19)	8 (8-9)

Vidimo lahko, da se pričakovana in opažena števila migrantov razmeroma dobro ujemajo, kar podpira uporabljeno metodo za korekcijo superpopulacije.

9.5. IZDELAVA CMR MODELOV IN OCENA VELIKOSTI POPULACIJE PO HABITATNIH KRPAH

Ena izmed ključnih predpostavk za korekcijo superpopulacije je enakomerna gostota živali na celotnem območju superpopulacije (glej stran 15). Zaradi tega smo območje razdelili na manjša, čim bolj homogena območja – habitatne krpe. Glavna kriterija sta bila povezanost prostora znotraj območja, prisotnost razmejitve prostora med območji (na primer večja območja kmetijskih in umetnih površin, večje ceste) in čim manjše število opaženih prehodov živali med habitatnimi krpami. Razmejitve so v precejšnji meri subjektivne, kljub temu se pa zdi, da kar dobro opisujejo razdelitev prostora z vidika medveda v času vzorčenja. Ocene po posameznih območjih so manj zanesljive kot ocena za celotno območje, vseeno pa ponazarjajo razporeditev živali po prostoru v času vzorčenja. Variance korekcije superpopulacije nismo ocenjevali, zato so intervali zaupanja za ocene trenutne številčnosti nekoliko podcenjeni. Posebej je potrebno poudariti, da so **ocene specifične za obdobje vzorčenja med septembrom in decembrom 2007**. Zaradi specifičnih prehranskih razmer jeseni 2007 ni nujno, da opažene razporeditve odražajo stanje v drugih letnih časih in drugih letih z nižjim obrodом plodonosnega drevja.



Slika 21: Razdelitev območja vzorčenja na podobmočja. Kot kriterij smo uporabili razdeljenost prostora z rabo in cestami ter število opaženih prehodov medvedov. Številke območij ustrezajo številkam v Tabela 16 in

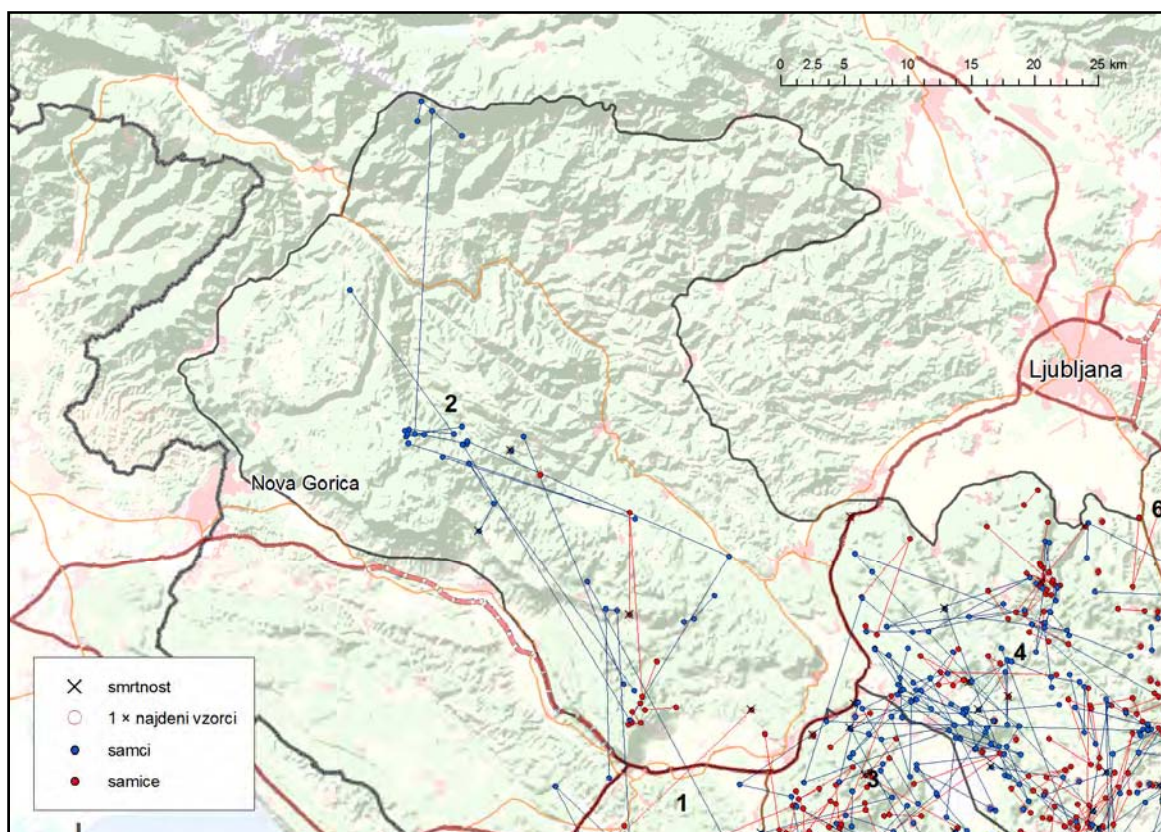
Tabela 17.

Za vsako izmed območij smo po Hugginsovem modelu ocenili velikost superpopulacije in trenutno velikost populacije. Kvalitete ocen so različne od območja do območja, kar je odvisno od demografske odprtosti območja in intenzivnosti vzorčenja.

9.6. PODROBNEJŠI PREGLED POSAMEZNIH HABITATNIH KRP

9.6.1. SEVEROZAHODNA SLOVENIJA IN AVTOCESTA LJUBLJANA – KOPER

Značilnost te habitatne krpe v vzorčenju 2007 je nizka številčnost medvedov iz zelo dobra ulovljivost. Spolno razmerje je obratno kot na Dolenjskem in Notranjskem, saj imamo tukaj v populaciji 70% samcev in samo 30% samic. Kaže se tudi učinek bariere, ki ga povzroča avtocesta Ljubljana – Koper, saj gostota medvedov drastično pade. V prostoru, ki se sicer zvezno nadaljuje v »dinarski« smeri JV-SZ, se naenkrat pojavi meja. Na eni strani imamo močno populacijo medvedov, na drugi strani pa nekaj posameznih osebkov, od tega več kot dve tretjini samcev. Vzorčenje na zahodni strani avtoceste je bilo dobro, kar vidimo po visokem deležu večkratnih ulovov. Med območjem zahodno od avtoceste in osrednjim delom populacije v Javornikih in na Menišiji nismo zaznali niti enega prehoda. Zaznali smo pet prehodov preko avtoceste proti Primorski, glede na lokacije verjetno v okolici Nanosa. Očitno predstavlja avtocesta za medveda precejšnjo prostorsko oviro in ločuje Dinaride, eno najpomembnejših zatočišč ogroženih živalskih vrst v Evropi, od alpskega prostora.

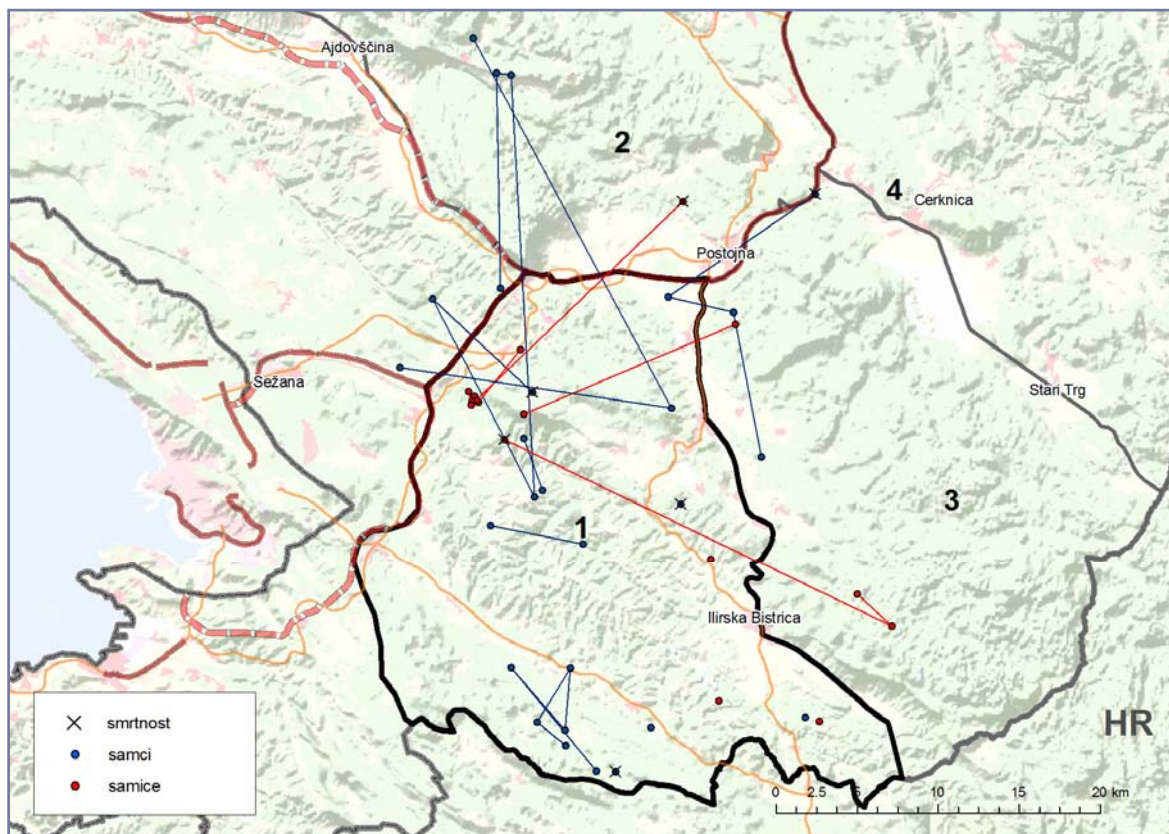


Slika 22: Vzorčenje medveda v habitatni krpi zahodna Slovenija. Značilno je majhno število medvedov, visoka ulovljivost in najverjetneje močan vpliv avtoceste Ljubljana – Koper.

Območje	Zahodna Slovenija
Številka območja	2
Ocena trenutne številčnosti (95% interval zaupanja)	21 (19-23)
Spolno razmerje samci samice	70% 30%
Gostota celotna površina [osebkov / 10.000 ha]	1.2
Gostota naravna površina [osebkov / 10.000 ha]	1.5
Celotna površina [ha]	173504
Naravne površine [ha]	134809
Kvaliteta ocene številčnosti	zelo dobra
Ujetih samcev	12
Ujetih samic	5
Skupaj različnih genotipov	17
Ocena superpopulacije samice ($N^{\wedge} SP$)	6.30
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samice	0.71
Ocena superpopulacije samci ($N^{\wedge} SP$)	14.72
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samci	0.96
Ocena trenutne številčnosti samice ($N^{\wedge} t_0$)	6.28
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samice	0.71
Ocena trenutne številčnosti samci ($N^{\wedge} t_0$)	14.57
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samci	0.95

9.6.2. OBMOČJE PIVKA – BRKINI

Območje je bilo v času vzorčenja razmeroma redko poseljeno z medvedi. Podobno kot v habitatni krpi zahodne Slovenije je spolno razmerje precej premaknjeno v smeri samcev. Ulovljivost na jugu te habitatne krpe je bila verjetno nekoliko nižja, območje ima dolgo mejo s Hrvaško in tako lahko opazimo več enkratnih ulovov.

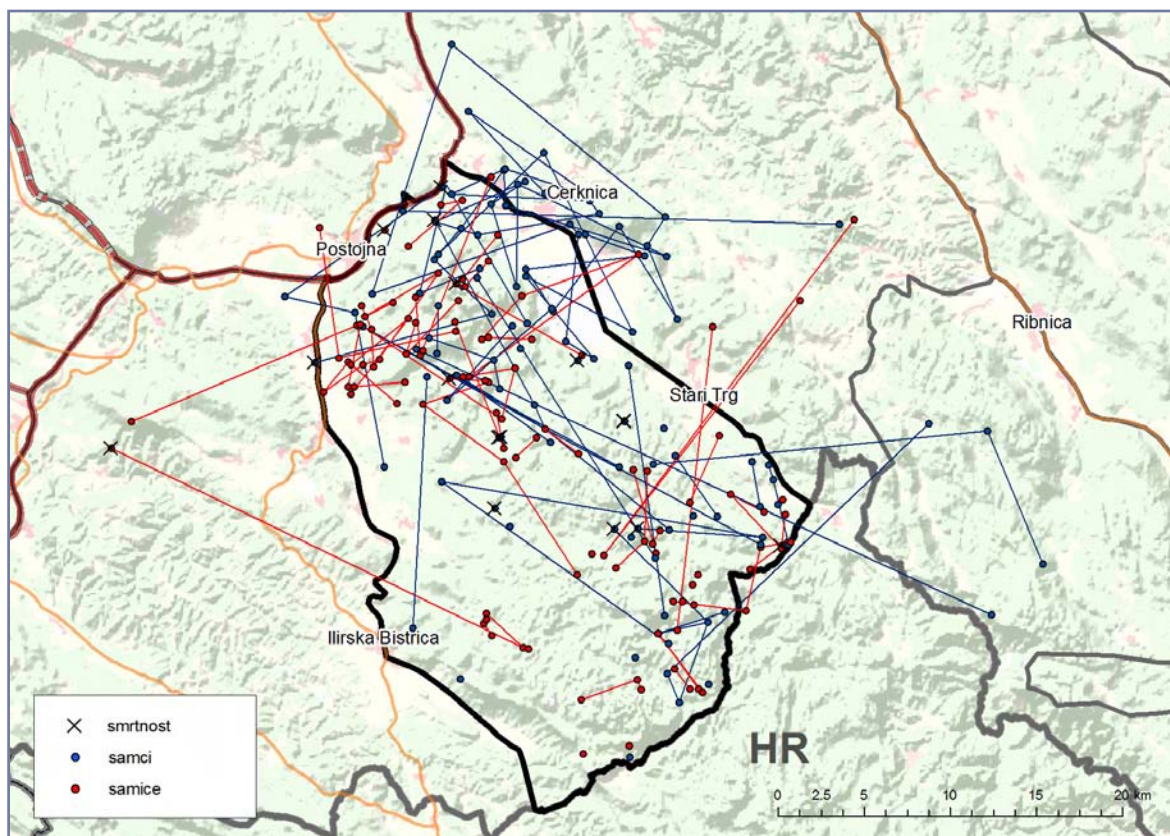


Slika 23: Karta vzorčenja za območje Pivka – Brkini. Na jugovzhodu območja je vidnih nekaj enkratnih ulovov živali, ki jih lahko pripisujemo precejšnji odprtosti območja proti Hrvaški in slabšemu vzorčenju na jugu habitatne krpe Javorniki – Snežnik.

Območje	Pivka - Brkini
Številka območja	1
Ocena trenutne številčnosti (95% interval zaupanja)	20 (12-28)
Spolno razmerje samci samice	60% 40%
Gostota celotna površina [osebkov / 10.000 ha]	3.1
Gostota naravna površina [osebkov / 10.000 ha]	4.6
Celotna površina [ha]	65106
Naravne površine [ha]	43088
Kvaliteta ocene številčnosti	sprejemljiva
Ujetih samcev	9
Ujetih samic	6
Skupaj različnih genotipov	15
Ocena superpopulacije samice ($N^{\wedge} SP$)	9.05
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samice	2.34
Ocena superpopulacije samci ($N^{\wedge} SP$)	15.18
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samci	3.07
Ocena trenutne številčnosti samice ($N^{\wedge} t_0$)	8.03
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samice	2.08
Ocena trenutne številčnosti samci ($N^{\wedge} t_0$)	11.93
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samci	2.41

9.6.3. OBMOČJE JAVORNIKI - SNEŽNIK

Območje je bilo v času vzorčenja gosto poseljeno z medvedi, morda z izjemo skrajnih zahodnih pobočij proti Pivki in Ilirski Bistrici, kjer je vzorcev manj, še vedno pa je razmeroma dober ponoven ulov. V severnem delu območja se zdi vzorčenje intenzivnejše in enkrat ulovljenih živali skorajda ni. Južni del snežniške planote se zdi dokaj slabo povzorčen. Ker je območje dovolj majhno in je vseeno zaznati nekaj ponovnega ulova, tega območja nismo obravnavali kot luknje v vzorčenju. Ocena številčnosti za območje je razmeroma dobra, spolna struktura pa je premaknjena v prid samic.

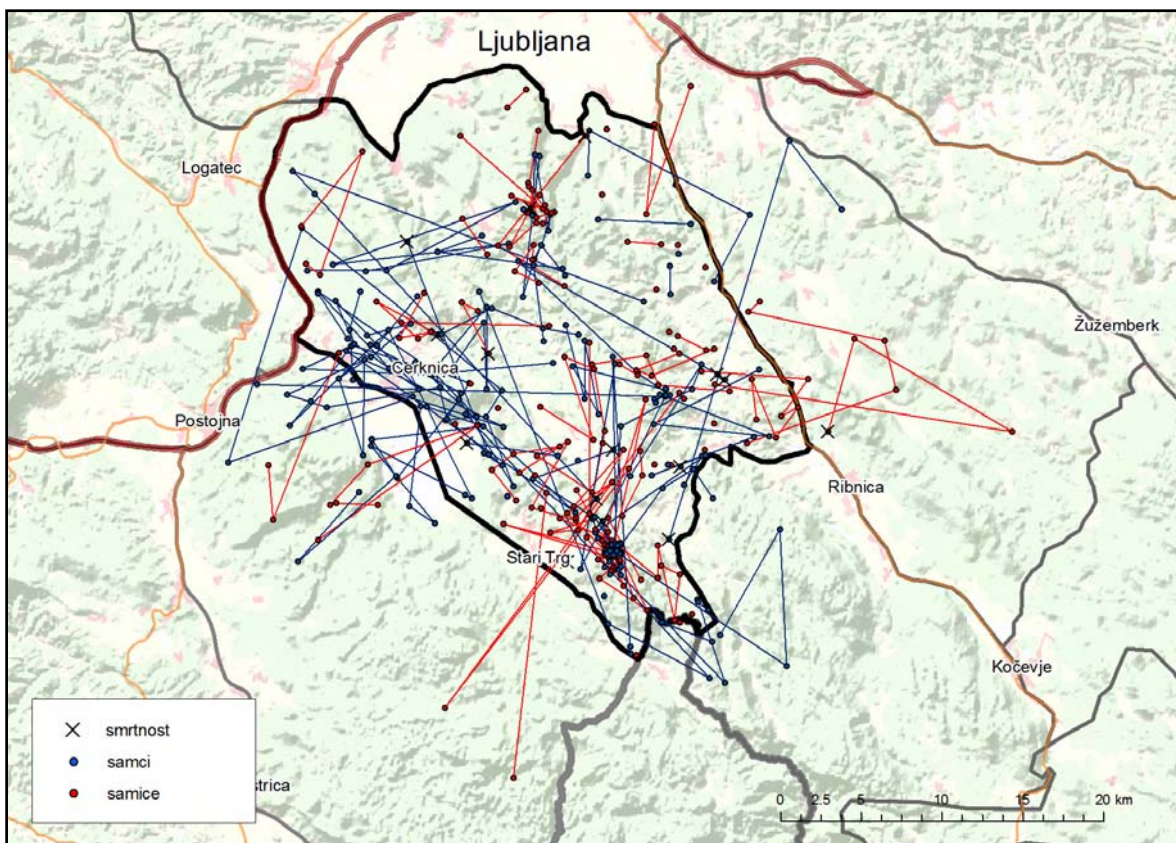


Slika 24: Karta vzorčenja območja Javorniki – Snežnik. Vzorčenje se zdi zelo intenzivno na severu te habitatne krpe, nekoliko slabše pa je na južnem delu snežniške planote. Kljub temu je nekaj ponovnega ulova, območje brez vzorcev pa se ne zdi preveliko.

Območje	Javorniki - Snežnik
Številka območja	3
Ocena trenutne številčnosti (95% interval zaupanja)	84 (71-96)
Spolno razmerje samci samice	47% 53%
Gostota celotna površina [osebkov / 10.000 ha]	13.6
Gostota naravna površina [osebkov / 10.000 ha]	15.1
Celotna površina [ha]	61482
Naravne površine [ha]	55372
Kvaliteta ocene številčnosti	dobra
Ujetih samcev	35
Ujetih samic	42
Skupaj različnih genotipov	77
Ocena superpopulacije samice ($N^{\wedge} SP$)	49.24
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samice	4.01
Ocena superpopulacije samci ($N^{\wedge} SP$)	49.10
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samci	5.14
Ocena trenutne številčnosti samice ($N^{\wedge} t_0$)	44.12
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samice	3.59
Ocena trenutne številčnosti samci ($N^{\wedge} t_0$)	39.54
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samci	4.14

9.6.4. OBMOČJE MENIŠIJA – RACNA GORA

To območje je izjemno dobro povzorčeno in razmeroma zaprto proti Hrvaški, zato je ocena številčnosti medvedov tukaj zelo dobra. Malo medvedov je bilo ujetih samo enkrat in dobimo zanimiv paradoks, da je ocenjena trenutna številčnost nižja od števila dejansko opaženih medvedov. Rezultat je razumljiv, če upoštevamo, da smo »ulovili« veliko večino medvedov, ki se je gibala skozi območje, vsi ti medvedi pa niso bili v območju stalno prisotni, zato bi jih bilo nekorektno v celoti šteti k trenutni številčnosti. Podobno kot v ostalih osrednjih habitatnih krpah medveda je spolno razmerje premaknjeno v prid samic. Zanimiva posebnost je velika količina vzorcev zbranih na jugu tega območja v LD Iga vas, kjer je bilo nabranih skoraj 97 vzorcev, večina v okolici enega krmišča. Skupaj je bilo v tem lovišču, velikem slabih 3000 ha, najdenih 21 različnih genotipov. Območje leži na stičišču prehodov med velikimi habitatnimi krpami, s čimer bi lahko razložili tako veliko število različnih medvedov. Še ena zanimivost je medved, ki se je gibal na območju okrog Cerknice, med Cajnarji, Grahovim, Cerkniškim jezerom in Rakovim Škocjanom, ulovili smo ga pa 38 krat.

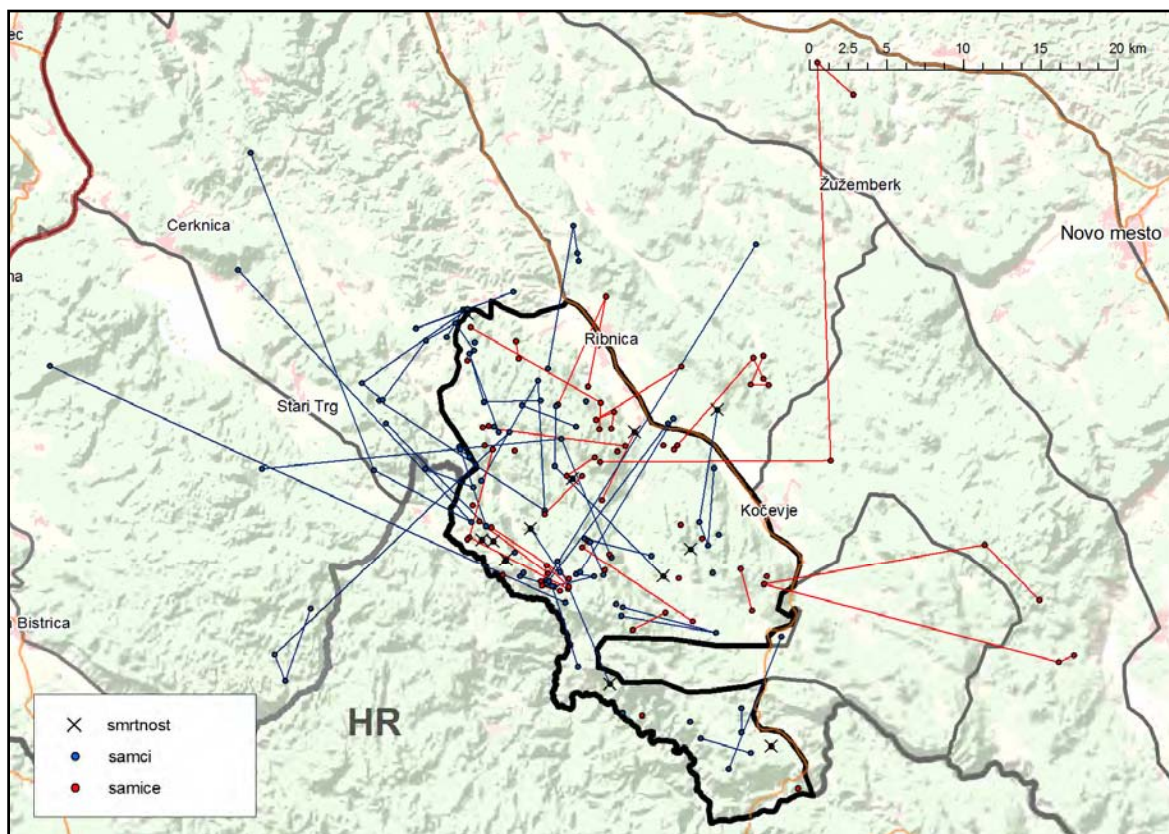


Slika 25: Karta vzorčenja medvedov za območje Menišija – Racna gora. Zaradi zelo dobro izpeljanega vzorčenja in precejšnje zaprtosti območja proti nevzorčenim območjem je v tej krpi ocena številčnosti zelo dobra.

Območje	Menišija - Racna g.
Številka območja	4
Ocena trenutne številčnosti (95% interval zaupanja)	95 (90-100)
Spolno razmerje samci samice	39% 61%
Gostota celotna površina [osebkov / 10.000 ha]	14.0
Gostota naravna površina [osebkov / 10.000 ha]	18.9
Celotna površina [ha]	67490
Naravne površine [ha]	50132
Kvaliteta ocene številčnosti	zelo dobra
Ujetih samcev	41
Ujetih samic	58
Skupaj različnih genotipov	99
Ocena superpopulacije samice ($N^{\wedge} SP$)	63.70
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samice	2.28
Ocena superpopulacije samci ($N^{\wedge} SP$)	44.10
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samci	1.15
Ocena trenutne številčnosti samice ($N^{\wedge} t_o$)	58.01
Standardna napaka $N^{\wedge} t_o$ samice	2.08
Ocena trenutne številčnosti samci ($N^{\wedge} t_o$)	36.76
Standardna napaka $N^{\wedge} t_o$ samci	0.96

9.6.5. OBMOČJE VELIKE GORE IN GOTENIŠKE GORE

Na tem območju je bila med vzorčenjem gostota medvedov visoka. Vzorčenje je bilo v severnem delu te habitatne krpe dobro, proti jugu pa na delu območja zelo pomanjkljivo, tako da smo ga iz metodoloških razlogov izrezali kot luknjo v vzorčenju. Za to območje je ocena številčnosti razmeroma slaba, širina intervala zaupanja pa je podcenjena zaradi velike odprtosti območja tako proti Hrvaški kot proti velikemu nevzorčenemu območju v Kočevskem Rogu. Zaradi tega moramo tako visoko oceno gostote vzeti z dobršno mero previdnosti.

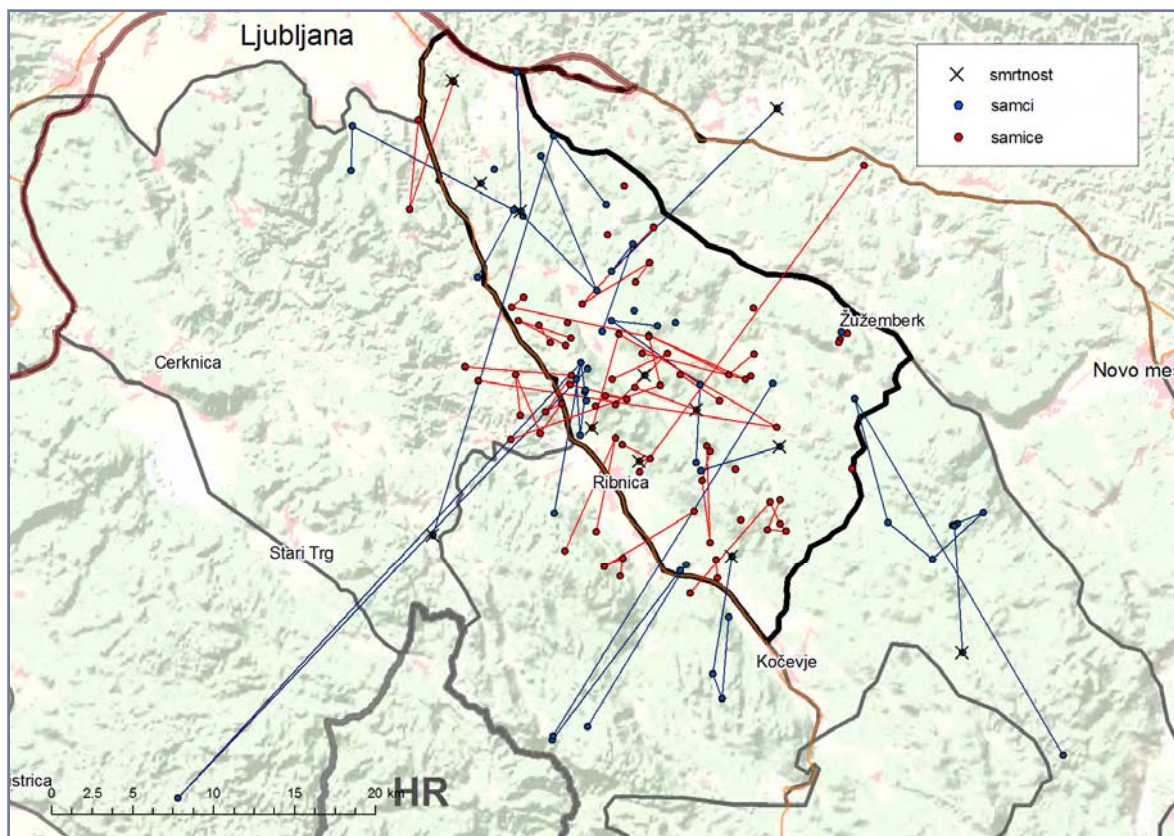


Slika 26: Karta vzorčenja medvedov za območje Velike, Goteniške gore in Kolpskih sten. Del območja smo iz metodoloških razlogov izrezali kot »luknjo v vzorčenju« in ocenjevali posebej.

Območje	Velika g. - Goteniška g.
Številka območja	5
Ocena trenutne številčnosti (95% interval zaupanja)	79 (63-95)
Spolno razmerje samci samice	48% 52%
Gostota celotna površina [osebkov / 10.000 ha]	19.4
Gostota naravna površina [osebkov / 10.000 ha]	23.0
Celotna površina [ha]	40828
Naravne površine [ha]	34367
Kvaliteta ocene številčnosti	slaba
Ujetih samcev	39
Ujetih samic	39
Skupaj različnih genotipov	78
Ocena superpopulacije samice ($N^{\wedge} SP$)	50.27
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samice	6.28
Ocena superpopulacije samci ($N^{\wedge} SP$)	52.72
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samci	5.23
Ocena trenutne številčnosti samice ($N^{\wedge} t_0$)	41.33
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samice	5.16
Ocena trenutne številčnosti samci ($N^{\wedge} t_0$)	37.73
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samci	3.74

9.6.6. OBMOČJE SUHA KRAJINA – DOBREPOLJE

Območje je daleč od meje s Hrvaško in nevzorčenega območja v Rogu, tako da je ocena številčnosti medvedov dobra. Jugovzhodna meja območja je bila določena tako, da nevzorčeno območje ne bi smelo imeti znatnega vpliva.



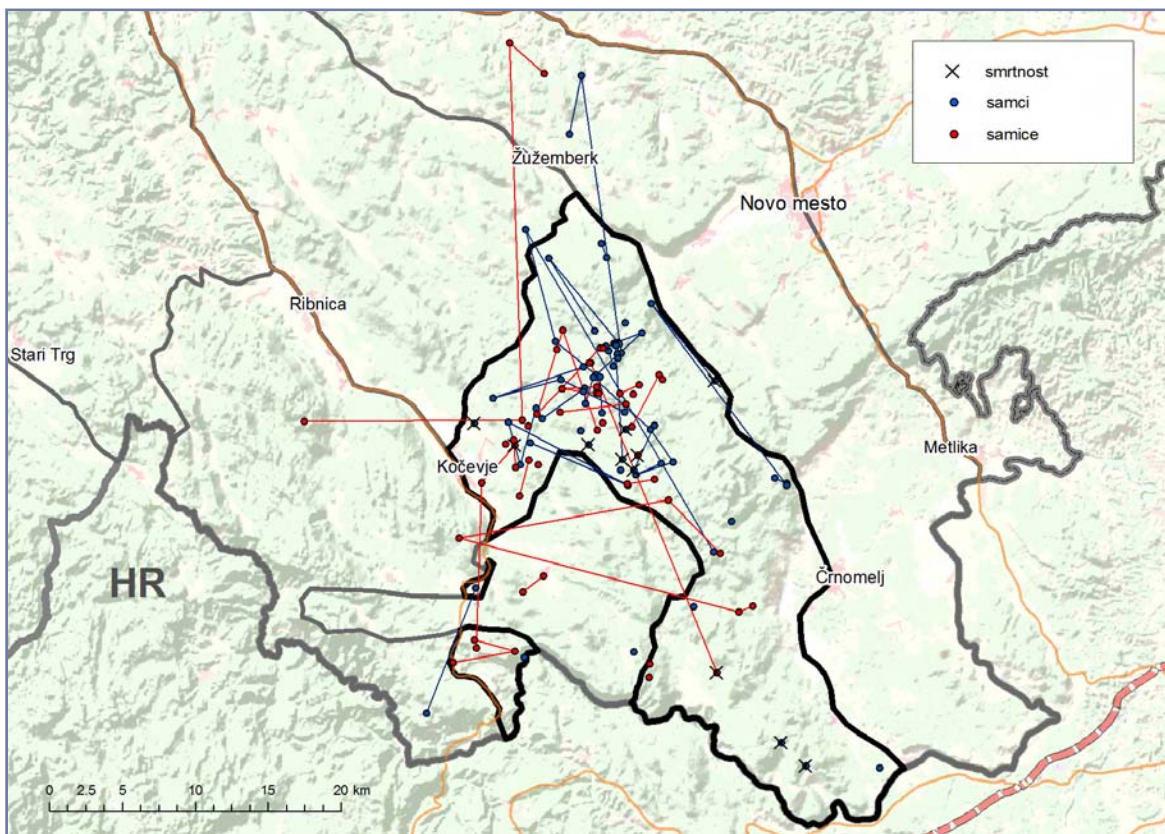
Slika 27: Karta vzorčenja medvedov za območje Suhe krajine in Dobrepolja.

Območje	Suha k. - Dobropolje
Številka območja	6
Ocena trenutne številčnosti (95% interval zaupanja)	46 (40-51)
Spolno razmerje samci samice	36% 64%
Gostota celotna površina [osebkov / 10.000 ha]	9.5
Gostota naravna površina [osebkov / 10.000 ha]	13.2
Celotna površina [ha]	48077
Naravne površine [ha]	34607
Kvaliteta ocene številčnosti	dobra
Ujetih samcev	18
Ujetih samic	29
Skupaj različnih genotipov	47
Ocena superpopulacije samice (N^{SP})	33.82
Standardna napaka N^{SP} samice	2.54
Ocena superpopulacije samci (N^{SP})	21.85
Standardna napaka N^{SP} samci	1.57
Ocena trenutne številčnosti samice (N^{t_0})	29.08
Standardna napaka N^{t_0} samice	2.18
Ocena trenutne številčnosti samci (N^{t_0})	16.47
Standardna napaka N^{t_0} samci	1.18

9.6.7. OBMOČJE SUHA KRAJINA - ROG

Na tem območju imamo največjo težavo z vzorčenjem, saj v velikem delu območja nihče ni nabiral vzorcev. Na severu te habitatne krpe je bilo vzorčenje dobro. Kljub temu pa imamo zelo veliko število osebkov, ki so bili ujeti samo enkrat (glej stran 31). Ker je v tem delu območja hrvaška meja razmeroma daleč, si to lahko razlagamo samo s pritokom medvedov iz nevzorčenega območja. Protu jugu je vzorcev prav tako malo, vendar lahko zaradi večje heterogenosti vzorčenja (območje pokriva šest lovskih družin) sklepamo, da je vzrok temu majhno število medvedov. Podobna slika je v Beli krajini proti vzhodu, kar to predpostavko dodatno potrjuje. Kljub temu pa je v skrajnem južnem delu tega območja samo en vzorec iztrebka in trije odstreljeni medvedi, kar da misliti, da je bilo tudi na jugu te habitatne krpe vzorčenje razmeroma slabo.

Ocena številčnosti za to območje je posledično slaba in jo je potrebno uporabljati še previdneje kot ocene za ostala območja. Gostota medvedov v severnem in južnem delu območja se najverjetneje precej razlikujeta, vendar zaradi težav z vzorčenjem boljše razporeditve območij nismo mogli najti. Gotovo je v severnem delu gostota medvedov višja in v južnem nižja od ocenjene.

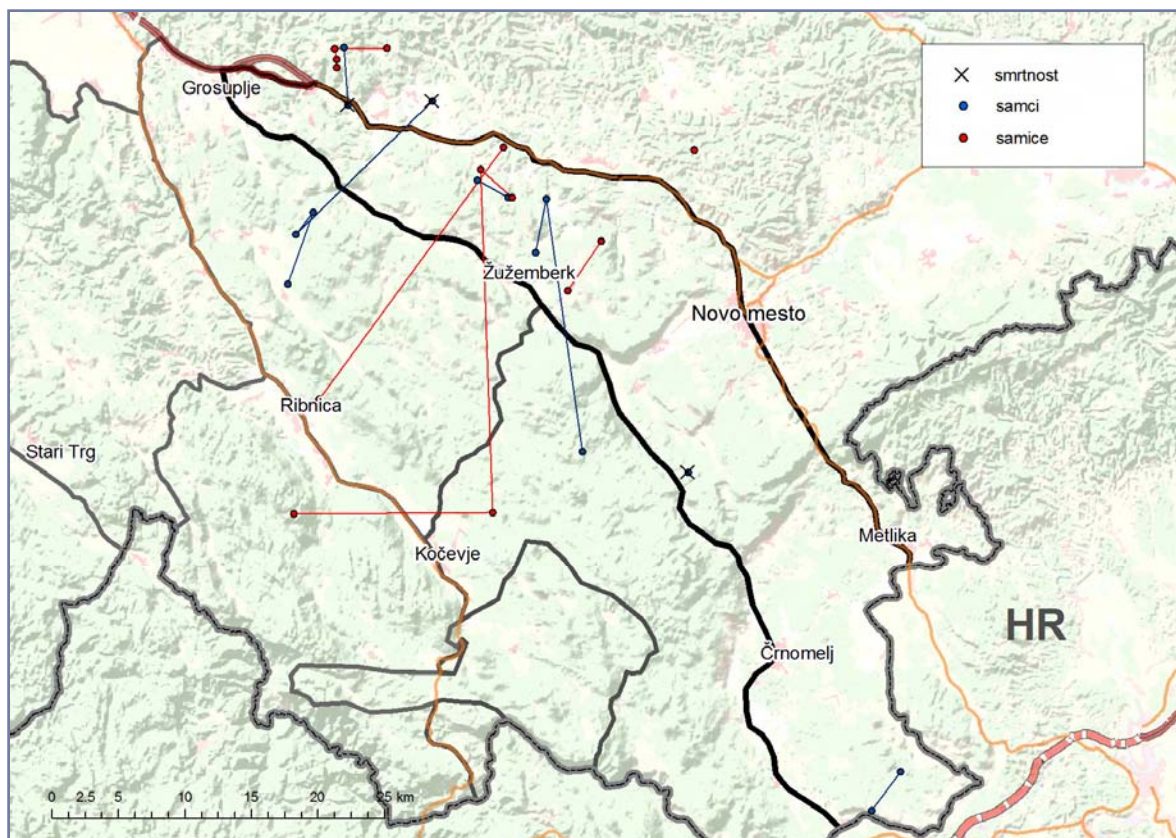


Slika 28: Karta vzorčenja medvedov za območje Suha krajina – Rog. Osrednji del območja ni bil vzorčen, tako da je na tem območju precejšnja »bela lisa« brez vzorcev. Ocene številčnosti medvedov so posledično slabe.

Območje	Suha k. - Rog
Številka območja	7
Ocena trenutne številčnosti (95% interval zaupanja)	52 (39-66)
Spolno razmerje samci samice	46% 54%
Gostota celotna površina [osebkov / 10.000 ha]	10.3
Gostota naravna površina [osebkov / 10.000 ha]	12.1
Celotna površina [ha]	51026
Naravne površine [ha]	43429
Kvaliteta ocene številčnosti	slaba
Ujetih samcev	25
Ujetih samic	26
Skupaj različnih genotipov	51
Ocena superpopulacije samice (N^{SP})	35.07
Standardna napaka N^{SP} samice	5.17
Ocena superpopulacije samci (N^{SP})	33.86
Standardna napaka N^{SP} samci	4.27
Ocena trenutne številčnosti samice (N^{t_0})	28.49
Standardna napaka N^{t_0} samice	4.20
Ocena trenutne številčnosti samci (N^{t_0})	23.93
Standardna napaka N^{t_0} samci	3.02

9.6.8. OBMOČJE DOLENJSKA VZHOD

V tej habitatni krpi je bilo v obdobju vzorčenja prisotnih malo medvedov, pa še ti so večinoma migrirali v sosednja območja. Ocena številčnosti je razmeroma dobra in večina medvedov je bila ulovljenih večkrat, tako da je bilo vzorčenje najverjetneje dobro.



Slika 29: Karta vzorčenja za območje Dolenjska – vzhod. Ulovljivost je dobra. V območju je sicer malo medvedov, pa še ti večinoma migrirajo v sosednja območja.

Območje	Dolenjska vzhod
Številka območja	9
Ocena trenutne številčnosti (95% interval zaupanja)	10 (8-13)
Spolno razmerje samci samice	54% 46%
Gostota celotna površina [osebkov / 10.000 ha]	1.4
Gostota naravna površina [osebkov / 10.000 ha]	2.2
Celotna površina [ha]	75963
Naravne površine [ha]	46829
Kvaliteta ocene številčnosti	dobra
Ujetih samcev	5
Ujetih samic	5
Skupaj različnih genotipov	10
Ocena superpopulacije samice ($N^{\wedge} SP$)	5.52
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samice	0.93
Ocena superpopulacije samci ($N^{\wedge} SP$)	7.42
Standardna napaka $N^{\wedge} SP$ samci	0.78
Ocena trenutne številčnosti samice ($N^{\wedge} t_0$)	4.81
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samice	0.81
Ocena trenutne številčnosti samci ($N^{\wedge} t_0$)	5.65
Standardna napaka $N^{\wedge} t_0$ samci	0.59

9.7. OCENA ŠTEVILČNOSTI MEDVEDOV ZA CELOTNO OBMOČJE PRISOTNOSTI MEDVEDA V SLOVENIJI

Superpopulacijo za celotno območje medveda v Sloveniji smo ocenili s Hugginsovimi modeli, ki se je izkazal za najboljšega pri simulaciji zaprtega območja. Testirali smo zelo široko paleto pristopov k modeliranju in pripravi podatkov in izbrali najbolj primerne za naše podatke. Celotnega postopka zaradi obsežnosti tukaj ne bomo opisovali, bomo pa podrobneje predstavili metode, ki smo na koncu uporabili, da smo dobili končne rezultate.

9.7.1. TEST PREDPOSTAVKE O DEMOGRAFSKI ZAPRTOSTI IN SKLADNOSTI MODELA (GOF)

Predpostavko demografske zaprtosti smo testirali s Pradelovim modelom za preživetje in prirastek (survival and recruitment). Ob demografski zaprtosti mora biti preživetje 1 in prirastek 0. Ti dve hipotezi lahko testiramo s primerjavo AICc in LR testom alternativnih modelov. Smrtnost medvedov med vzorčenjem smo modelirali kot izgubo ob odlovu in jo tako izključili iz ocen parametrov.

Test ne potrjuje popolne demografske zaprtosti. Lahko pričakujemo, da nekatere živali vseeno dispergirajo in ne ustrezajo predpostavki filopatrije. S korekcijo efekta roba prav gotovo tudi nismo odstranili vse individualne heterogenosti ulovljivosti. Zaradi velikega vzorca pa lahko pričaujemo, da bodo testi zaznali že zelo majhna odstopanja od predpostavk.

S Pradelovim modelom smo ocenili dejansko zaznano imigracijo in navidezno preživetje (v našem primeru verjetnost, da osebek ne emigrira). Oba parametra sta zelo blizu predpostavk (preživetje = 0,994 in imigracija = 0,006) in tako lahko sklepamo, da je predpostavka o zaprtosti populacije dovolj dobro podprta, da lahko uporabimo modele za zaprto populacijo.

Skladnost modela s podatki (Goodness of Fit - GOF) smo ocenili po Median c-hat metodi za naš splošen model $c = p(\text{spol}, t)$. Ocena kaže na zelo dobro skladnost ($\hat{c} = 1,352$; $SE = 0,022$). $\hat{c} = 1$ pomeni popolno ujemanje modela s podatki. Do približno $\hat{c} = 3$ je še model uporaben za opis podatkov.

GOF testi za modele z individualnimi kovarianti, ki so se izkazali kot najboljši modeli za naše podatke, ne obstajajo. Ker so modeli, v katerih upoštevamo individualne kovariante, pravzaprav nadgradnja našega splošnega modela, menimo, da je uporabljen test zaprtosti populacije uporaben, rezultati dobljeni s testiranim modelom pa se ne razlikujejo znatno od rezultatov, ki jih dobimo z izbranim najboljšim modelom.

9.7.2. PRIPRAVA PODATKOV

Odlovne intervale smo optimizirali s pomočjo Markovskih verig (glej stran 37), tako da smo imeli dovolj veliko ulovljivost (okrog 0,3 v vsakem odlovnem intervalu) in ob tem izgubili čim manj podatkov. Tako smo vse vzorce uredili v sedem odlovnih intervalov, ki so pokrili celotno obdobje vzorčenja.

Za vsak osebek smo izračunali kot individualne kovariante verjetnost zapuščanja območja (glej stran 18). V Microsoft Access bazi, ki jo uporabljamo tudi za vso ostalo rokovanje s podatki, smo sprogramirali orodja za izdelavo odlovnih zgodov in pripravo vhodnih datotek za program Mark, kar nam je omogočilo hitro testiranje zelo širokega nabora različnih postavitev odlovnih intervalov.

9.7.3. MODELI ULOVA – PONOVRNEGA ULOVA

Pripravili smo apriori set modelov, jih uredili v programu Mark, ocenili parametre in jih uredili po Akaikovem informacijskem kriteriju (AICc).

Tabela 12: Končen niz modelov za oceno številčnosti populacije medveda, urejen po AICc. Hugginsov model za zaprte populacije, modelov c <> p nismo upoštevali, ker nimajo biološkega smisla (in se tudi po AICc izkažejo kot neustrezni).

Model	AICc	Delta AICc	Weights	Model Likelihood	Num. Par	Deviance
{c=p(sex.t.log(minpexc))}	3007,9	0,00	0,49	1,00	16	2975,7
{c=p(sex.t.Nvzorcev.log(minpexc).log(avgpexc))}	3008,5	0,54	0,38	0,76	18	2972,2
{c=p(sex.t.Nvzorcev.log(minpexc))}	3012,0	4,05	0,06	0,13	18	2975,7
{c=p(sex.Nvzorcev.log(minpexc))std}	3013,1	5,15	0,04	0,08	6	3001,1
{c=p(sex.Nvzorcev.log(minpexc).log(avgpexc))std}	3013,6	5,68	0,03	0,06	8	2997,6
{c=p(Nvzorcev.log(minpexc).log(avgpexc))std}	3020,8	12,81	0,00	0,00	4	3012,7
{c=p(sex.log(minpexc).log(avgpexc))std}	3021,5	13,53	0,00	0,00	6	3009,4
{c=p(sex.Nvzorcev.log(avgpexc))std}	3038,2	30,22	0,00	0,00	6	3026,1
{c=p(sex.t)}	3051,0	43,04	0,00	0,00	14	3022,8
{c=p(.)}	3063,2	55,30	0,00	0,00	1	3061,2
{c=p(sex)}	3063,8	55,87	0,00	0,00	2	3059,8
{c=p(t)}	3071,2	63,25	0,00	0,00	7	3057,1

Ulovljivost je bila visoka (0,2 – 0,4), kar je ključno za zmanjševanje problemov zaradi individualne heterogenosti ulovljivosti.

Tabela 13: Ocene ulovljivosti za najboljši model. Ulovljivost je visoka, kar zagotavlja nizek vpliv individualne heterogenosti ulovljivosti.

Samci		Samice	
Inteval	p	Inteval	p
1	0,302	1	0,321
2	0,279	2	0,282
3	0,233	3	0,286
4	0,246	4	0,273
5	0,333	5	0,273
6	0,381	6	0,194
7	0,394	7	0,186

Tabela 14: Povprečenje modelov po Akaikovih utežeh. Variabilnost med modeli je zelo nizka.

Derived Parameter 1 – SAMCI			
Model	Weight	Estimate	Standard Error
{c=p(sex,t,log(minpexc))}	0,49175	213,3692769	11,7722608
{c=p(sex,t,Nvzorcev,log(minpexc),log(avg	0,37590	213,3989563	11,7790846
{c=p(sex,t,Nvzorcev,log(minpexc))}	0,06479	213,3696780	11,7725614
{c=p(sex,Nvzorcev,log(minpexc))std}	0,03742	214,4138434	11,9890100
{c=p(sex,Nvzorcev,log(minpexc),log(avgpe	0,02877	214,4444369	11,9962528
{c=p(Nvzorcev,log(minpexc),log(avgpexc))	0,00081	217,5023881	10,5333312
{c=p(sex,log(minpexc),log(avgpexc)std)}	0,00057	214,6170640	12,0324251
Weighted Average		213,4545314	11,7885411
Unconditional SE			11,7921932
95% CI for Weighted Average Estimate is 190,3418328 to 236,5672300			
Percent of Variation Attributable to Model Variation is 0,06%			
Derived Parameter 2 – SAMICE			
Model	Weight	Estimate	Standard Error
{c=p(sex,t,log(minpexc))}	0,49175	250,3452325	11,7575242
{c=p(sex,t,Nvzorcev,log(minpexc),log(avg	0,37590	251,8760938	12,1995485
{c=p(sex,t,Nvzorcev,log(minpexc))}	0,06479	250,3456722	11,7499856
{c=p(sex,Nvzorcev,log(minpexc))std}	0,03742	250,6761884	11,8136855
{c=p(sex,Nvzorcev,log(minpexc),log(avgpe	0,02877	252,2066669	12,2612043
{c=p(Nvzorcev,log(minpexc),log(avgpexc))	0,00081	247,8490774	9,7752729
{c=p(sex,log(minpexc),log(avgpexc)std)}	0,00057	252,6969033	12,3430020
Weighted Average		250,9859508	11,9385073
Unconditional SE			11,9650252
95% CI for Weighted Average Estimate is 227,5345014 to 274,4374002			
Percent of Variation Attributable to Model Variation is 0,44%			

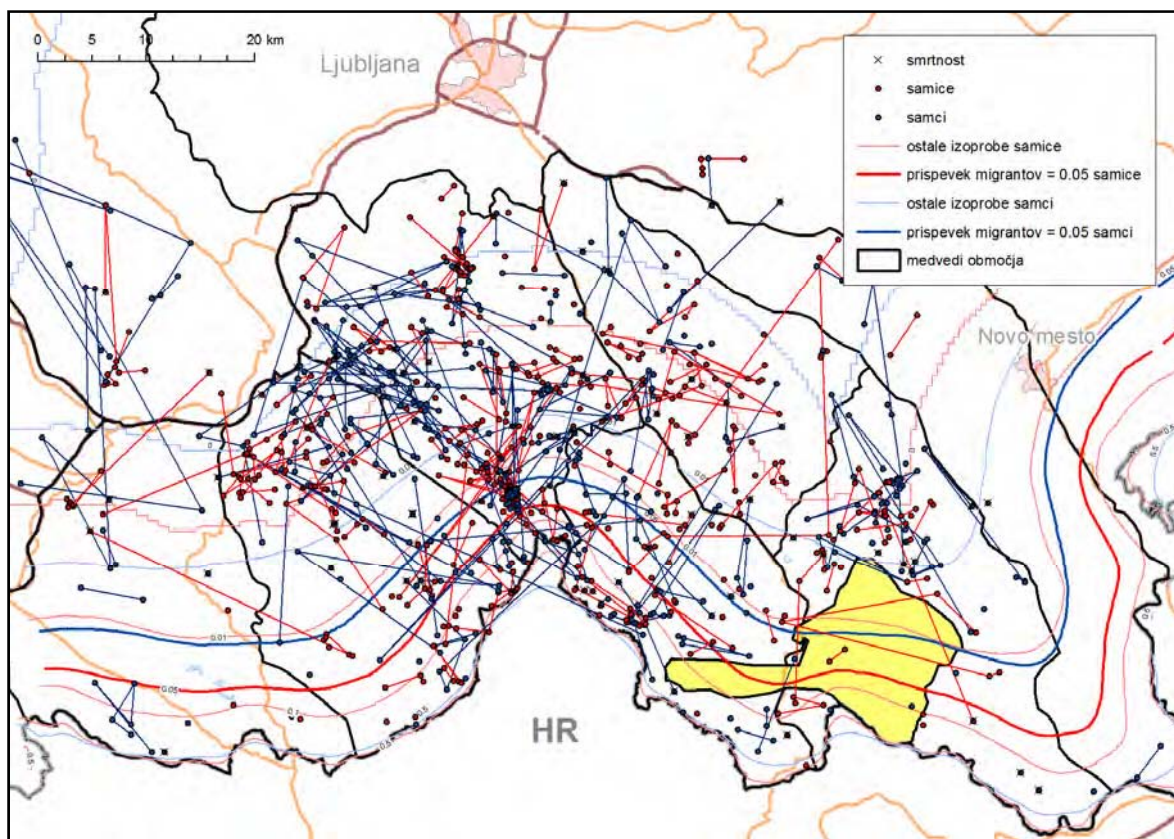
Tako je končna ocena superpopulacije medvedov v Sloveniji v jeseni 2007 za samce 213 živali s standardno napako 11,79 (190 – 237) in za samice 251 živali s standardno napako 11,96 (228 – 274).

9.7.4. KOREKCIJA RAZLIKE MED SUPERPOPULACIJO IN TRENUTNO POPULACIJO IN KOREKCIJA NEVZORČENEGA OBMOČJA

Modeli ulova in ponovnega ulova nam dajo oceno superpopulacije, torej vseh medvedov, ki se med vzorčenjem gibljejo skozi območje vzorčenja. Trenutna populacija je pričakovano število živali v območju vzorčenja v nekem trenutku. Za oceno razlike med obema smo uporabili metodo za oceno deleža migrantov, opisano na strani 15.

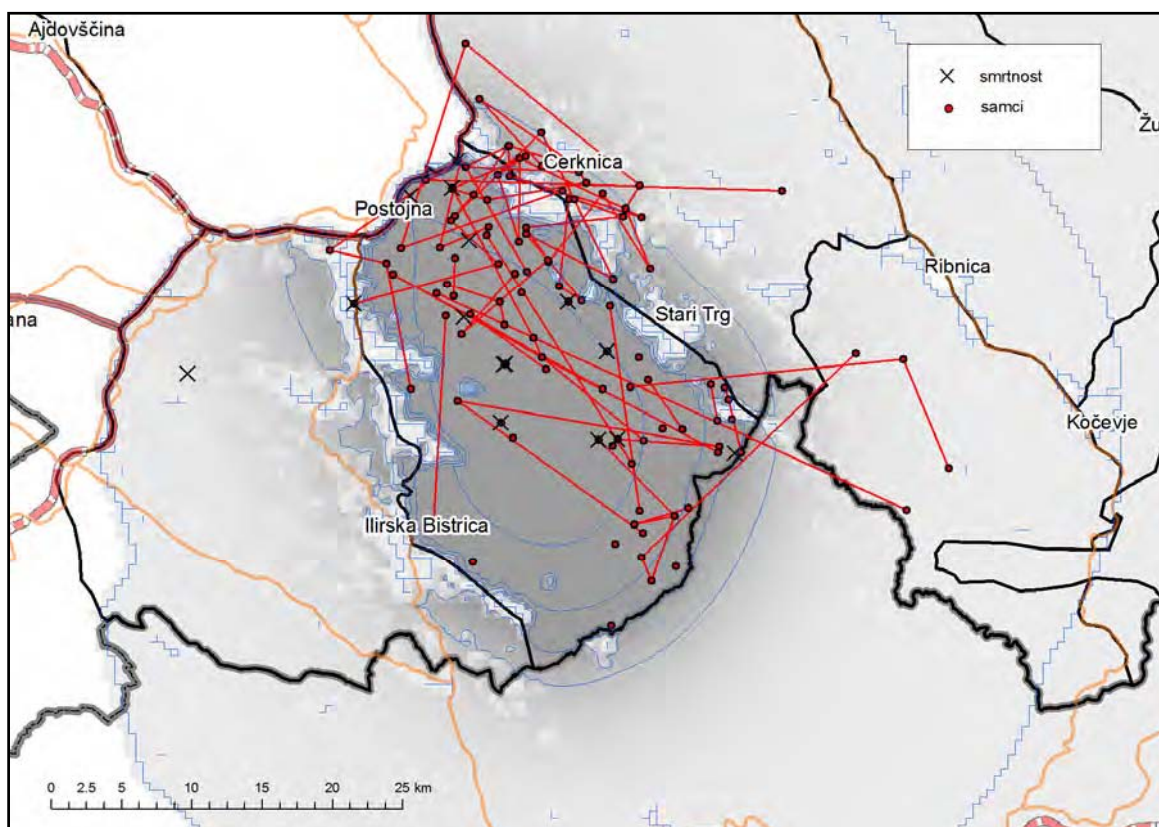
Dodaten problem je predstavljala »luknja« v vzorčenju na Kočevskem, kjer na velikem območju z najverjetneje visoko gostoto medvedov ni nihče pobiral vzorcev. Število medvedov v tem nevzorčenem območju smo ocenili z ekstrapolacijo ocen za sosednje območje Suha krajina – Rog. Potem smo na podlagi podatkov o gibanju medvedov ocenili, kakšen delež teh medvedov smo že zajeli v oceni superpopulacije. Ostalo smo prišteli oceni za superpopulacijo.

Ključna predpostavka za oceno deleža migrantov je homogena gostota v celotnem območju, vzorčenem in nevzorčenem, ki nanj vpliva (v praksi v bližini meje vzorčenega območja). To v našem primeru za celotno vzorčeno območje gotovo ne drži, saj se gostote že v njem zelo razlikujejo. Zaradi tega smo uporabili opisano delitev v habitatne krpe. Izbrane habitatne krpe se nadaljujejo preko hrvaške meje v dinarski smeri SZ-JV, tako da lahko predpostavimo, da je gostota medvedov v njih tudi na drugi strani meje enaka.



Slika 30: Razdelitev območja vzorčenja na habitatne krpe s predpostavljeno homogeno gostoto medvedov in območja, na katerih je pričakovati vpliv migrantov – živali ki živijo na obeh straneh Slovensko – Hrvaške meje. Z rumeno je označeno nevzorčeno območje.

Za vsako izmed habitatnih krp smo za vsako njeno celico izračunali pričakovani prispevek migrantov iz drugih krp (te podatke smo uporabili za oceno trenutne številčnosti v vsaki habitatni krpi) in preko meje območja vzorčenja (Slika 31). Potem smo na podlagi ocenjene številčnosti obtežili prispevek migrantov preko Hrvaško – Slovenske meje v vsaki habitatni krpi in te uteži uporabili za korekcijo celotne superpopulacije medvedov v Sloveniji. Varianca ocenjenih premikov živali, ki smo jo ocenili po bootstrap metodi (glej stran 34), ima zelo majhen vpliv na varianco ocene migracij in varianco končne ocene številčnosti, zato smo jo zanemarili.



Slika 31: Pričakovan prispevek migrantov v habitatni krpi Javorniki – Snežnik, ocena za samce. Večji del prehajanja proti Menišiji so vzorci enega samca (35 lokacij).

10. KONČNA OCENA ŠTEVILČNOSTI MEDVEDOV V SLOVENIJI ZA VZORČENJE SEPTEMBER – DECEMBER 2007

Končne ocene številčnosti medvedov so povzete v Tabela 15. Kot superpopulacija je mišljeno število vseh živali, ki so se med vzorčenjem gibale skozi območje medveda v Sloveniji in ima prišteto ocenjeno število živali v območju na Kočevskem, v katerem ni bilo vzorčenja. Kot trenutna populacija je mišljeno število živali, ki bi ga v posameznem trenutku lahko pričakovali v Sloveniji. Za ta parameter smo podali dve oceni: ob začetku vzorčenja, kar je dejanska ocena modeliranja in ob koncu vzorčenja, kjer je odšteta zabeležena smrtnost medvedov v času vzorčenja. Do konca leta 2007 je v povozu vlaka poginil še en medved, ki ga v to oceno nismo šteli.

Tabela 15: Struktura ocene številčnosti medvedov in končna ocena številčnosti medvedov v Sloveniji ob začetku in koncu neinvazivnega vzorčenja jeseni 2007. N[^] v tabeli pomeni ocenjena številčnost.

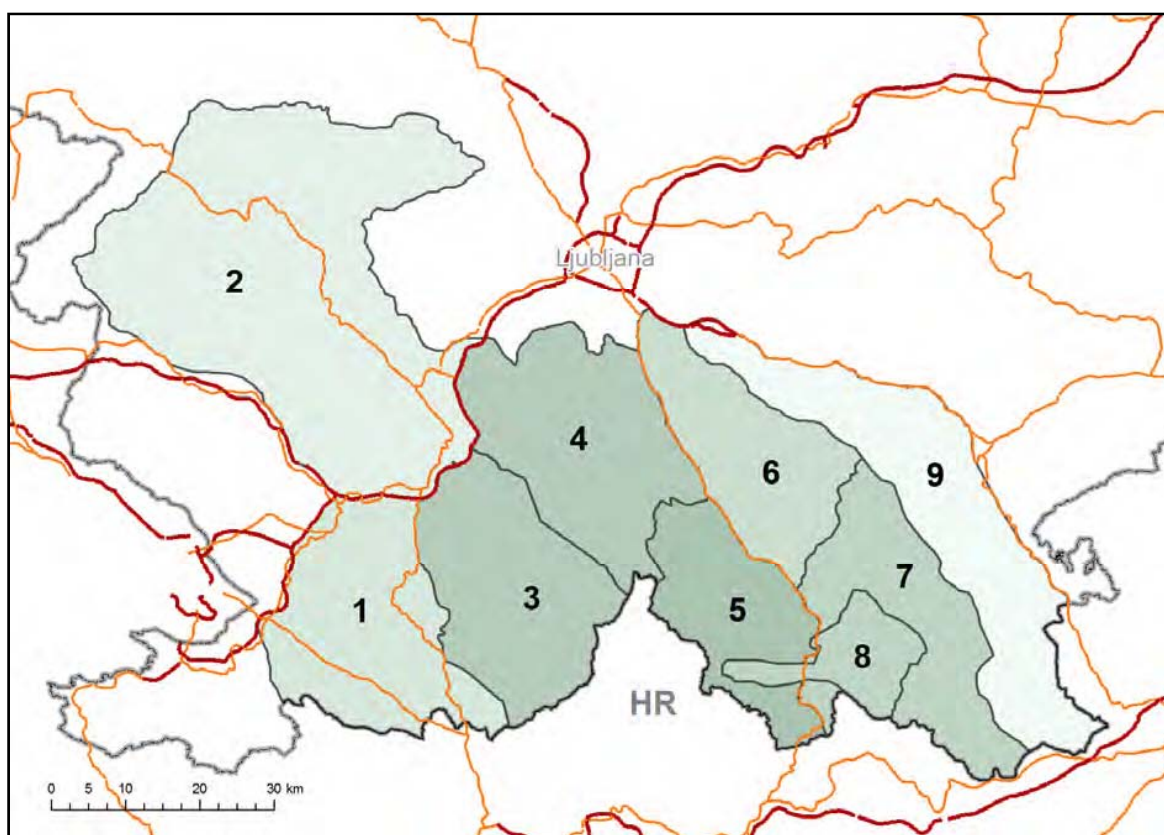
	samice	samci	skupaj
Skupno število najdenih genotipov	195	159	354
N [^] superpopulacije vzorčenega območja	250,8	213,4	464,2
95% interval zaupanja	228 - 247	190 - 237	431 - 497
Standardna napaka	11,88	11,79	16,74
N [^] nevzorčeno območje*	10,7	8,8	19,5
95% interval zaupanja	8,7 - 12,8	7,4 - 10,2	17 - 22
Standardna napaka	1,0	0,7	1,3
N [^] superpopulacija + nevzorčeno območje	261,5	222,2	483,7
95% interval zaupanja	238 - 285	199 - 245	451 - 497
Standardna napaka	11,93	11,81	16,78
N [^] imigrantov	9,1	14,6	23,6
95% interval zaupanja	8 - 10	13 - 16	22 - 25
Standardna napaka	0,41	0,77	0,88
N[^] trenutne populacije ob začetku vzorčenja	252	208	460
95% interval zaupanja	229 - 276	184 - 231	427 - 493
Standardna napaka	11,94	11,83	16,81
Smrtnost medvedov v času vzorčenja	9	17	26
N[^] trenutne populacije ob koncu vzorčenja	243	191	434
95% interval zaupanja	225 - 271	176 - 220	394 - 475
Ocenjen delež migrantov v superpopulaciji	6,9%	13,1%	9,8%
Ocenjeno število migrirajočih osebkov	18	29	47

*ocenjen je del živali, ki niso zajete v superpopulacijo vzorčenega območja

Pri interpretaciji ocen je potrebno upoštevati obdobje, za katerega so narejene – konec leta 2007. Pomladi 2008 je prišla v populacijo nova kohorta mladičev, zato je bilo skupno število medvedov ustrezno večje. Tudi delež in pričakovano število migrantov sta ocenjena za trimesečno obdobje vzorčenja. To moramo interpretirati kot minimum – v daljšem časovnem obdobju se lahko ta delež znatno poveča. V vsakem trenutku moramo upoštevati, da »slovenska« populacija medvedov ni populacija po klasični definiciji, ampak zgolj severozahodni del mnogo večje dinarske populacije rjavega medveda. Slovensko – Hrvaška meja ne predstavlja medvedu nobene ovire.

Dobljene ocene se dobro skladajo z drugimi podatki o medvedih. Ker vemo, da je bilo v vzorčenju opaženih 354 različnih živali, smo lahko popolnoma prepričani, da je bilo v superpopulaciji vsaj toliko medvedov. Po drugi strani pa smo v povprečju vsakega medveda ujeli 2,7 krat, kar pomeni, da se jih gotovo prav veliko ni moglo popolnoma izmuzniti vzorčenju. Po isti logiki mora biti ustrezen delež živali v populaciji označenih, kar lahko preverimo s kontrolo odstrela po zaključenem vzorčenju. Od 6. decembra 2007 do 20. maja 2008 smo prejeli 51 vzorcev tkiv odstreljenih ali poginulih medvedov in jih vključili v analizo. Od tega so štirje mladiči iz 2008, ki jih v vzorčenju 2007 še ni bilo, najmanj pet nepoznatih medvedov lahko pričakujemo zaradi migracije iz Hrvaške, 29 od preostalih 42 medvedov (69%) pa smo poznali iz nenvazivnega vzorčenja. Ob koncu vzorčenja je bilo v populaciji 328 označenih živali, kar je 76% ocenjene (preostale) populacije in se dobro sklada z deležem označenih živali v odstrelu.

Čeprav so ocene po posameznih habitatnih krpah manj zanesljive kot ocena za celotno območje, nam dajo vseeno koristne podatke o razporeditvi in gostotah medvedov v času vzorčenja. Kvalitete ocen se precej razlikujejo glede na intenzivnost vzorčenja in demografsko zaprtost/odprtost vsake habitatne krpe v območje kjer ni bilo vzorčenja. Pri močno demografsko odprtih habitatnih krpah, kot je na primer območje Velika gora – Goteniška gora, temelji velik del ocene na ocenah gibanja živali, zato so ocene standardnih napak in posledično intervala zaupanja manj zanesljive.



Slika 32: Delitev območja vzorčenja na habitatne krpe. Območja z višjo ocenjeno gostoto medvedov so obarvana temneje. Številke se navezujejo na Tabela 16 in

Tabela 17.

Pri interpretaciji absolutnih števil je potrebna previdnost, nedvomno pa rezultati dobro odražajo relativna razmerja gostot medvedov v posameznih habitatnih krpah. Pri tem moramo še enkrat posebej

poudariti, da so te ocene specifične za jesen 2007, ki je bila zaradi izjemnega obilja naravne hrane v gozdu gotovo odstopanje od celoletnega, pa tudi dolgoletnega sezonskega povprečja. Ta razporeditev medvedov v prostoru je verjetno posledica razporeditve virov hrane, v tem primeru zlasti obroda bukve, in ne odraža razporeditve v daljšem časovnem obdobju.

Tabela 16: Pregled števila najdenih genotipov, ocen superpopulacije ($N^{\wedge} SP$) in ocen trenutne populacije ($N^{\wedge} t_0$) po habitatnih krpah z oceno standardne napake vsakega parametra. Ocene števila in ocene napak za nevzorčeno območje so ekstrapolirane iz območja »Suha krajina – Rog« in so zato nezanesljive. Številke v prvem stolpcu se navezujejo na karto na Slika 32.

št.	območje	N genot. samcev	N genot. samic	skupaj N genot.	$N^{\wedge} SP$ samice	SE $N^{\wedge} SP$ samice	$N^{\wedge} t_0$ samice	SE $N^{\wedge} t_0$ samice	$N^{\wedge} t_0$ samci	SE $N^{\wedge} t_0$ samci	$N^{\wedge} SP$ samci	SE $N^{\wedge} SP$ samci
1	Pivka - Brkini	9	6	15	9,05	2,34	8,03	2,08	11,93	2,41	15,18	3,07
2	Zahodna Slovenija	12	5	17	6,30	0,71	6,28	0,71	14,57	0,95	14,72	0,96
3	Javorniki - Snežnik	35	42	77	49,24	4,01	44,12	3,59	39,54	4,14	49,10	5,14
4	Menišija - Racna g.	41	58	99	63,70	2,28	58,01	2,08	36,76	0,96	44,10	1,15
5	Velika - Goteniška g.	39	39	78	50,27	6,28	41,33	5,16	37,73	3,74	52,72	5,23
6	Suha k. - Dobropolje	18	29	47	33,82	2,54	29,08	2,18	16,47	1,18	21,85	1,57
7	Suha k. - Rog	25	26	51	35,07	5,17	28,49	4,20	23,93	3,02	33,86	4,27
8	nevzorčeno	-	-		14,65	2,16	10,98	1,05	9,23	0,70	14,30	1,80
9	Dolenjska vzhod	5	5	10	5,52	0,93	4,81	0,81	5,65	0,59	7,42	0,78

Tabela 17: Ocene populacije medvedov in gostot po habitatnih krpah. Gostote so ocenjene kot število osebkov na 10.000 hektarjev (100 km²). Površine so podane v hektarjih. Ocene števila in ocene napak za nevzorčeno območje so ekstrapolirane iz območja »Suha krajina – Rog« in so zato nezanesljive. Ocene veljajo za obdobje vzorčenja med septembrom in decembrom 2007 in ni nujno, da opažene razporeditve odražajo stanje v drugih letnih časih in drugih letih. Številke v prvem stolpcu se navezujejo na karto na Slika 32.

št.	Območje	ocena št. (95% CI)	samci/ samice	skupna gostota	gostota naravne p.	celotna površina	naravne površine	zanesljivost ocene
1	Pivka - Brkini	20 (12-28)	60% 40%	3,1	4,6	65106	43088	sprejemljiva
2	Zahodna Slovenija	21 (19-23)	70% 30%	1,2	1,5	173504	134809	zelo dobra
3	Javorniki - Snežnik	84 (71-96)	47% 53%	13,6	15,1	61482	55372	dobra
4	Menišija - Racna g.	95 (90-100)	39% 61%	14,0	18,9	67490	50132	zelo dobra
5	Velika - Goteniška g.	79 (63-95)	48% 52%	19,4	23,0	40828	34367	slaba
6	Suha k. - Dobropolje	46 (40-51)	36% 64%	9,5	13,2	48077	34607	dobra
7	Suha k. - Rog	52 (39-66)	46% 54%	10,3	12,1	51026	43429	slaba
8	nevzorčeno	20 (15-26)	46% 54%	10,8	12,1	18647	16747	zelo slaba
9	Dolenjska vzhod	10 (8-13)	54% 46%	1,4	2,2	75963	46829	dobra

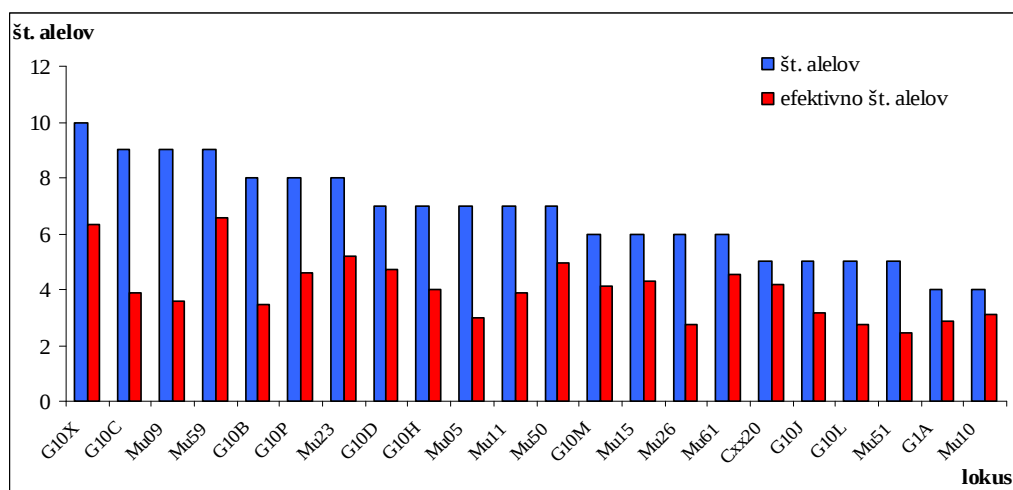
Na splošno menimo, da celotna ocena številčnosti medveda dobro odraža stanje v območju vzorčenja in je kot taka uporabna tako za upravljanje kot za modeliranje populacijske dinamike. Veliko število označenih osebkov v populaciji bo še vrsto let omogočalo sledenje populacijske dinamike. Ker pa so populacije prostoživečih živali dinamične, bi bilo smiselno oceno po tej metodologiji še kdaj ponoviti in morda razmišljati tudi o vzpostavitvi trajnega monitoringa s pomočjo neinvazivnih genetskih metod in modeliranja ulova-ponovnega ulova.

11. GENETSKA PESTROST RJAVEGA MEDVEDA V SLOVENIJI - REZULTATI

Na 22 polimorfni mikrosatelitskih lokusih in na Y spolni kromosom vezan SRY lokus smo genotipizirali 487 tkivnih vzorcev medvedov. Za 17 vzorcev (3,4%) nismo uspeli pridobiti popolnega genotipa.

11.1. MERE GENSKE RAZNOLIKOSTI

Na vseh lokusih smo dobili skupaj 148 različnih alelov. Število alelov na lokusih se giblje od 4 do 10. Povprečno število alelov na lokus je 6,7, povprečno število učinkovitih alelov na lokus pa 4,0. Iz Slike 33 je razvidno, da ima največ alelov lokus G10X. Najbolj informativen pa je vseeno lokus Mu59, ki ima najvišje število učinkovitih alelov (G10X ima 3 zelo redke alele). Najmanj informativen lokus je Mu51 s skupaj petimi aleli (z dvema zelo redkima in dvema zelo pogostima aleloma).



Slika 33: Število alelov in efektivno število alelov na posameznem lokusu v populaciji.

11.1.1. FREKVENCE ALELOV

V populaciji smo na vseh 22 lokusih dobili 43 alelov (29,1%), ki se pojavljajo s frekvenco manjšo od 0,053 (alel smo opazili 50 krat ali manj, kar je 10,3% opažanj ali manj) (Tabela 18). Največ takšnih alelov ima lokus G10C, Cxx20 pa tako redkih alelov nima. V povprečju ima lokus 2,05 redkih alelov.

Tabela 18: Redki aleli na posameznem lokusu.

Lokus	Redki aleli	Število redkih alelov
Cxx20	-	0
G10B	144, 154	2
G10C	89, 95, 105, 107, 109	5
G10D	178	1
G10H	221, 233, 257	3
G10J	90, 92	2
G10L	159, 163	2
G10M	214, 218	2
G10P	173, 175	2
G10X	138, 150, 154	3
G1A	186	1
Mu05	127, 139, 141	3
Mu09	194, 196, 198, 206	4
Mu10	126	1
Mu11	82, 86, 94	3
Mu15	123, 125	2
Mu23	142	1
Mu26	190, 198, 200	3
Mu50	101, 103	2
Mu51	127	1
Mu59	117	1
Mu61	153	1
SKUPAJ	-	43

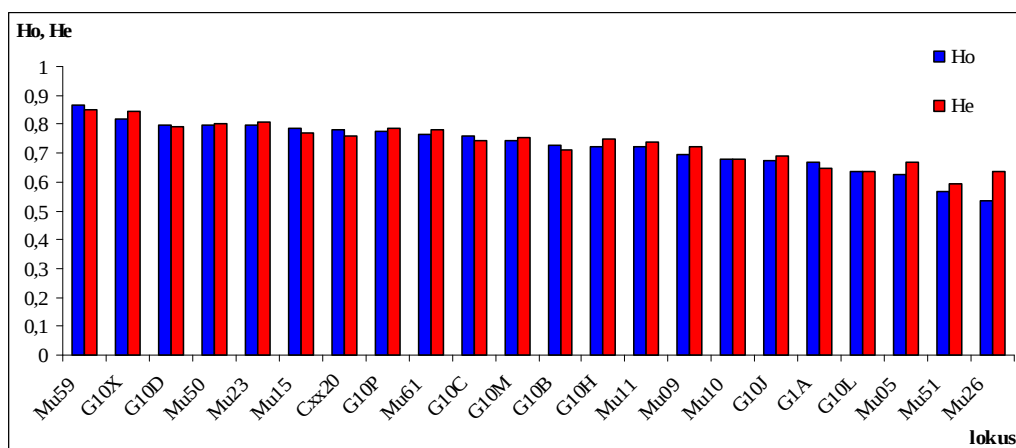
Dobili smo 15 alelov (Tabela 19), ki se pojavljajo s frekvenco 0,35 ali več (vsaj 324 opažanj oz. 66,7%). Opaziti jih je bistveno manj kakor redkih, saj smo v tem primeru dobili le 10,1% alelov. V povprečju ima vsak lokus 0,64 tako pogostih alelov. Najpogostejši alel je na lokusu Mu26, ki smo ga opazili kar 487 krat. Tako visoko frekvenco lahko pripišemo homozigotnosti osebkov.

Tabela 19: Pogosti aleli na posameznem lokusu

<i>Lokus</i>	<i>Pogosti aleli</i>	<i>Število pogostih alelov</i>
Cxx20	-	0
G10B	146	1
G10C	103	1
G10D	-	0
G10H	256	1
G10J	88	1
G10L	161	1
G10M	216	1
G10P	167	1
G10X	-	0
G1A	180	1
Mu05	135	1
Mu09	192	1
Mu10	112	1
Mu11	-	0
Mu15	-	0
Mu23	-	0
Mu26	182	1
Mu50	-	0
Mu51	119, 123	2
Mu59	-	0
Mu61	-	0
SKUPAJ	-	15

11.1.2. GENSKA DIVERZITETA

Vrednosti opažene heterozigotnosti po lokusih H_o so med 0,54 in 0,87 (Tabela 20). Večina lokusov ima opaženo heterozigotnost H_o sicer nad 0,6. Samo za lokusa Mu26 in Mu50 je nižja, vendar pa ni manjša od 0,5 (Slika 34). Na lokusih Cxx20, G10B, G10C, G10D, G1A, Mu15 in Mu59 je opažena heterozigotnost celo malenkostno višja od pričakovane. Povprečna vrednost opažene heterozigotnosti na vseh lokusih je 0,72, pričakovane pa 0,73.



Slika 34: Opažena (H_o) in pričakovana (H_e) heterozigotnost po lokusih.

Tabela 20: Osnovni parametri, ki opisujejo gensko diverziteto rjavih medvedov v Sloveniji

Lokus	št. alelov	efektivno št.alelov	H_o	H_e	min. alel	maks. alel	razpon alelov [(GT) _n]	GW indeksi
Cxx20	5	4,177	0,778	0,760	121	141	10	0,455
G10B	8	3,452	0,730	0,710	130	154	12	0,615
G10C	9	3,869	0,761	0,743	89	109	10	0,818
G10D	7	4,721	0,798	0,790	168	182	7	0,875
G10H	7	3,994	0,672	0,690	221	257	-	-
G10J	5	3,192	0,674	0,687	78	92	7	0,625
G10L	5	2,762	0,639	0,638	153	163	5	0,833
G10M	6	4,090	0,744	0,756	204	218	7	0,750
G10P	8	4,592	0,778	0,784	147	175	14	0,533
G10X	10	6,351	0,818	0,843	132	154	11	0,833
G1A	4	2,851	0,669	0,650	180	190	5	0,667
Mu05	7	2,994	0,624	0,668	127	141	7	0,875
Mu09	9	3,587	0,694	0,723	174	206	16	0,529
Mu10	4	3,125	0,680	0,680	112	126	7	0,500
Mu11	7	3,855	0,723	0,740	80	94	7	0,875
Mu15	6	4,319	0,787	0,769	117	131	7	0,750
Mu23	8	5,186	0,749	0,770	142	156	-	-
Mu26	6	2,739	0,537	0,634	182	200	9	0,600
Mu50	7	4,968	0,796	0,800	79	103	12	0,539
Mu51	5	2,453	0,566	0,593	115	127	6	0,714
Mu59	9	6,588	0,866	0,850	97	121	12	0,692
Mu61	6	4,545	0,764	0,780	141	153	6	0,857
povprečje	6,727	4,019	0,720	0,730	-	-	10,318	0,697
s.d.	1,695	1,105	0,082	0,069	-	-	6,399	0,141

* H_o in H_e – opažena in pričakovana heterozigotnost; min in maks alel – najmanjša in največja dolžina alela na lokusu; razpon alelov ((dolžina najdaljšega alela - dolžina najkrajšega)/dolžina motiva); GW – Garza Williamsonov indeks

Za populacijo so statistično značilna odstopanja od Hardy Weinbergovega ravnovesja na treh lokusih (Tabela 21): G10B ($P = 0,00531$), G10X ($P = 0,04951$) in Mu26 ($P < 0,00001$).

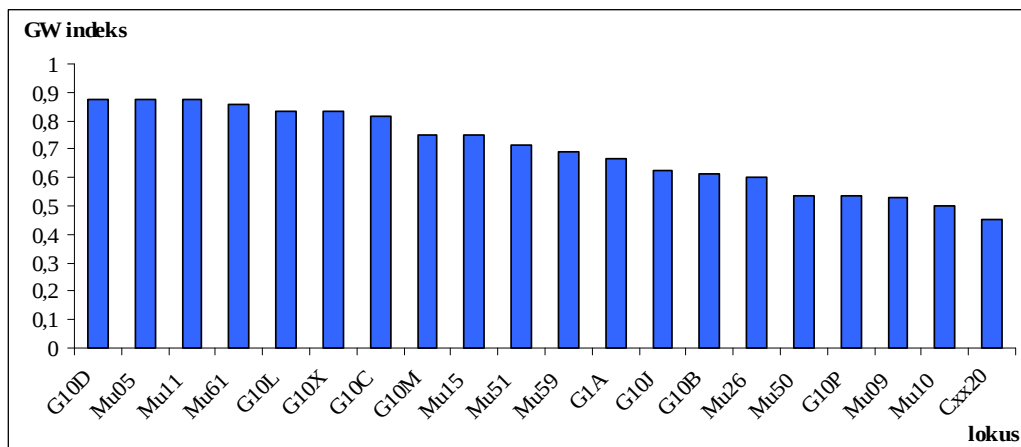
Tabela 21: Opažena in pričakovana heterozigotnost ter P-vrednosti izračunane v eksaktnem testu Hardy Weinbergovega ravnovesja

Lokus	H_o	H_e	Vrednost - P	S.D.
Cxx20	0,778	0,760	0,91186	0,00065
G10B	0,730	0,710	0,00531	0,00024
G10C	0,761	0,743	0,14234	0,00103
G10D	0,798	0,790	0,79782	0,00101
G10H	0,672	0,690	0,12411	0,00081
G10J	0,674	0,687	0,44305	0,00105
G10L	0,639	0,638	0,09094	0,00066
G10M	0,744	0,756	0,24941	0,00098
G10P	0,778	0,784	0,20403	0,00099
G10X	0,818	0,843	0,04951	0,00057
G1A	0,669	0,649	0,14879	0,00081
Mu05	0,623	0,668	0,11130	0,00088
Mu09	0,694	0,723	0,26803	0,00092
Mu10	0,680	0,680	0,93879	0,00088
Mu11	0,723	0,740	0,17968	0,00124
Mu15	0,787	0,769	0,24263	0,00100
Mu23	0,749	0,770	0,69308	0,00093
Mu26	0,537	0,634	0,00000	0,00000
Mu50	0,796	0,800	0,72565	0,00106
Mu51	0,566	0,593	0,05300	0,00075
Mu59	0,866	0,850	0,94706	0,00057
Mu61	0,764	0,780	0,70872	0,00105

* Obarvana so statistično značilna odstopanja H_o od H_e ($P < 0,05$).

11.1.3. GARZA WILLIAMSONOVI INDEKSI (GW INDEKS)

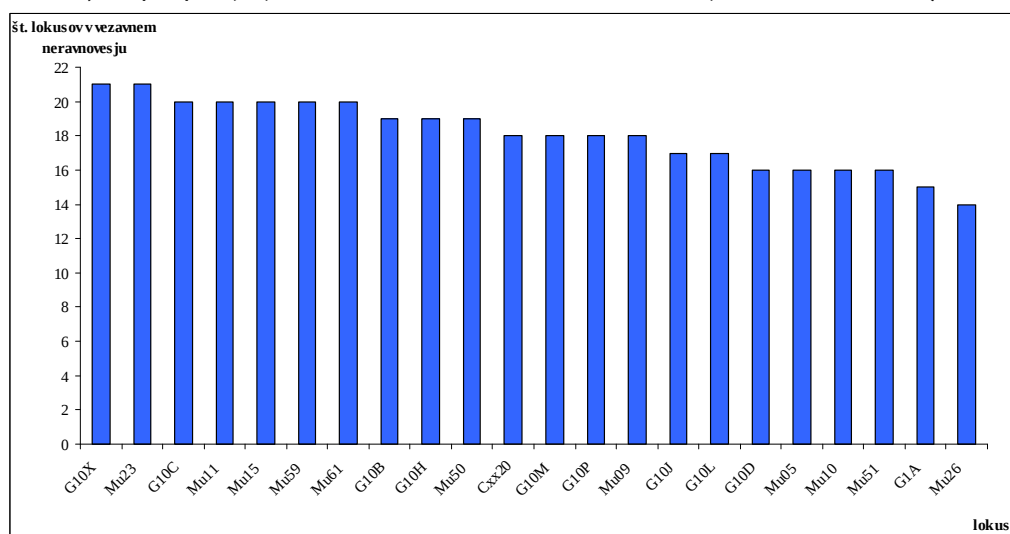
GW indekse smo izračunali le za 20 lokusov. Lokusa G10H in Mu23 imata, kot smo že omenili v opisu uporabljenih metod, točkovno mutacijo, ki spremeni vzorec ponavljanja alelov na lokusu, tako da ta ne ustreza več SMM. Ker je ta mutacijski model osnova za izračun Garza-Williamsonovega indeksa, le tega za omenjena lokusa nismo mogli izračunati. Najnižji GW indeks ima lokus Cxx20 (0,45). Nižje vrednosti indeksa od 0,6 imajo še lokusi G10P (0,53), Mu09 (0,53), Mu10 (0,50), Mu26 (0,60) in Mu50 (0,54). Najvišji indeks pa imata lokusa G10D in Mu11 (0,88) (slika 14). Povprečni GW indeks je 0,70.



Slika 35: Garza Williamsonovi indeksi za posamezne lokuse

11.1.4. VEZAVNO NERAVNOVESJE LOKUSOV

V populaciji je vezavno neravnovesje med lokusi visoko (slika 15 in slika 16), saj je vsak izmed 22 lokusov v vezavnem neravnovesju s 14 ali več lokusi (66,7% vseh lokusov). Tako sta G10X in Mu23 v vezavnem neravnovesju z vsemi preostalimi 21 lokusi. Z najmanj lokusi je v vezavnem neravnovesju lokus Mu26 (14 lokusov). V povprečju je vsak lokus v vezavnem neravnovesju z 18,1 lokusom (86,1% vseh lokusov).



Slika 36: Število lokusov, s katerimi je posamezni lokus v vezavnem neravnovesju.

Tabela 22: Vezavno neravnovesje med pari lokusov v populaciji. + lokusa sta v vezavnem neravnovesju; – lokusa nista v vezavnem neravnovesju

Lokus	Cxx20	G10B	G10C	G10D	G10H	G10J	G10L	G10M	G10P	G10X	G1A	Mu05	Mu09	Mu10	Mu11	Mu15	Mu23	Mu26	Mu50	Mu51	Mu59	Mu61
Cxx20	*	+	+	–	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G10B	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+
G10C	+	+	*	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G10D	–	+	+	*	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+	+	–
G10H	+	+	+	+	*	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G10J	–	+	–	+	+	*	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+	+	+	+
G10L	+	+	+	–	–	+	*	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+
G10M	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	+	–	+	+
G10P	+	+	+	+	+	+	–	+	*	+	+	+	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+
G10X	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
G1A	–	–	+	+	–	+	+	+	+	+	*	+	–	+	+	+	+	+	–	–	+	+
Mu05	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	*	+	–	+	+	+	+	–	–	–	+
Mu09	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	–	+	*	–	+	+	+	+	+	+	+	+
Mu10	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	–	–	*	–	+	+	–	+	+	+	+
Mu11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	*	+	+	+	+	+	+	+
Mu15	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+	+
Mu23	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+	+	+
Mu26	+	–	+	–	+	–	+	–	–	+	+	+	+	–	+	+	+	*	+	–	+	+
Mu50	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	+	*	+	+	+
Mu51	+	+	+	+	+	+	–	–	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	+	*	+	+
Mu59	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	*	+
Mu61	+	+	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	*

11.2. GENETSKA PESTROST RJAVEGA MEDVEDA V SLOVENIJI - RAZPRAVA

Mikrosatelitski markerji, ki smo jih uporabili v raziskavi, so se pri severno-zahodni dinarski populaciji medvedov izkazali kot zelo polimorfni. Število alelov na lokus je podobno številu alelov, ki so jih našli v raziskavah skandinavske (Waits in sod., 2000), severno ameriških (Paetkau in sod., 1998) in cirkumpolarnih (Paetkau in sod., 1999) populacij medvedov.

Na vseh 22 lokusih smo ugotovili razmeroma visoko stopnjo genske variabilnosti ($H_e = 0,73$) in alelske diverzitete ($A = 6,73$). Za primerjavo z drugimi populacijami medvedov v svetu smo izračunali povprečno H_e in A za 8 lokusov: G1A, G10B, G10C, G10D, G10L, G10M, G10P in G10X. V Tabela 23 so podatki za primerjane populacije.

Tabela 23: Genska in alelska diverziteta na osmih mikrosatelitskih lokusih nekaterih medvedjih populacij z različnih območij.

Populacija	Št. osebkov v vzorcu	A (SE)	H_e (SE)	Vir
Alaska Range, Alaska	28	-	0,78 (-)	Waits in sod., 2000
Kluane, Yukon	50	7,38 (0,56)	0,76 (0,025)	Paetkau in sod., 1998
Richardson Mountains, NWT	119	7,50 (0,63)	0,76 (0,030)	Paetkau in sod., 1998
Brooks Range, Alaska	148	7,63 (0,50)	0,75 (0,019)	Paetkau in sod., 1998
Slovenija (SZ Dinaridi)	487	7,13 (1,70)	0,74 (0,069)	Naša raziskava, 2008
Skandinavija - NS	108	6,13 (0,84)	0,70 (0,105)	Waits in sod., 2000
Skandinavija - NN	29	5,38 (1,41)	0,69 (0,071)	Waits in sod., 2000
Flathead River, BC/MT	40	6,50 (0,71)	0,69 (0,027)	Paetkau in sod., 1998
Skandinavija - S	156	5,00 (1,07)	0,68 (0,071)	Waits in sod., 2000
Kuskokwim Range, Alaska	55	6,13 (0,44)	0,68 (0,026)	Paetkau in sod., 1998
Skandinavija - M	88	5,50 (1,20)	0,67 (0,052)	Waits in sod., 2000
East Slope, Alberta	45	7,00 (0,82)	0,67 (0,062)	Paetkau in sod., 1998
West Slope, Alberta	41	6,38 (0,56)	0,68 (0,036)	Paetkau in sod., 1998
Admiralty Island, Alaska	30	-	0,63 (-)	Waits in sod., 2000
Paulatuk Alaska	58	5,75 (0,88)	0,65 (0,065)	Paetkau in sod., 1998
Coppermine, NWT	36	5,75 (1,03)	0,61 (0,073)	Paetkau in sod., 1998
Yellowstone, MT/WY	57	4,38 (0,60)	0,55 (0,081)	Paetkau in sod., 1998
Baranof and Chicagof Is, Alaska	35	-	0,49 (-)	Waits in sod., 2000
Kodiak Island, Alaska	34	2,13 (0,35)	0,27 (0,098)	Paetkau in sod., 1998
Črni medvedi				
West Slope	116	9,50 (0,91)	0,81 (0,017)	Paetkau in sod., 1998
Newfoundland I.	33	3,00 (0,33)	0,41 (0,055)	Paetkau in sod., 1998

Opazimo lahko, da je H_e za 8 mikrosatelitskih lokusov nekoliko večja kot za vseh 22. Glede na to, da naj bi konec 19. stoletja v Sloveniji živelo le okoli 30-40 osebkov rjavega medveda, ima v primerjavi s skandinavsko populacijo in s populacijo iz Yellowstona presenetljivo visoko stopnjo genske diverzitete.

Tudi ti dve populaciji sta bili namreč močno zdesetkani. V Skandinaviji je populacija razdeljena na 4 subpopulacije in v vsaki od njih se je okoli leta 1930 v povprečju ohranilo le 35 osebkov. Podatki o morebitnem prehodu ozkega grla bi bili bolj primerljivi, če bi imeli podatke za celotno dinarsko populacijo, katere del je tudi slovenska (Swenson in sod., 2000). Medvedi iz Yellowstona pa so izolirani od leta 1920. Velikost populacije so leta 1972 ocenili na 139 medvedov. Populacija je izgubila od 15 do 20% H_e (Waits in sod., 2000). Tako imajo v primerjavi z njimi že skandinavski medvedi visoko stopnjo genske diverzitete (Waits in sod., 2000). Waitsova in sod. (2000) razlog za ohranitev visoke genske diverzitete v skandinavski populaciji vidijo v tem, da je šla skandinavska populacija skozi ozko grlo razdeljena v štiri subpopulacije in da je na vsako od njih neodvisno vplival genetski drift, ki je v vsaki naključno ohranil različne kombinacije alelov. Če so neodvisnim učinkom genetskega drifta sledili hitri porasti v številčnosti populacije in genski pretok med subpopulacijami, se je v populaciji ohranila visoka genska diverziteteta. Nasprotno pa je pri populaciji v Yellowstonu pojavil samo en učinek genetskega drifta, ki je bil dolgo zelo izražen (številčnost populacije je bila dolgo časa nizka). Podobno, vendar še bolj ekstremno sliko vidimo pri otoških populacijah Kodiak, Baranof in Chichagof, ki so precej daleč od celine. V takšnih primerih je poleg genetskega drifta tudi močan učinek ustanovitelja (Founder effect), saj je te populacije najverjetneje osnovalo zelo majhno število osebkov (Paetkau in sod., 1998).

Po dosedanjih raziskavah ima dinarska populacija dva haplotipa mtDNA, ki jih ni v drugih evropskih populacijah (Taberlet in sod., 1994). Ne vemo pa, ali v dinarski populaciji obstajajo subpopulacije, tako kot v Skandinaviji. Pričakovali bi lahko določeno stopnjo diferenciacije populacije zaradi geografske razdalje, težko pa bi pričakovali geografsko jasno opredeljeno strukturo. Za tovrstne raziskave bi morali primerjati skupine osebkov iz različnih delov Dinaridov, kar bi bilo v prihodnje smiselno storiti.

Ne glede na to, da je trenutno večji del dinarske populacije z genetskega vidika še neraziskan, je smiselno iskati razlog za visoko gensko diverziteteto slovenskega dela populacije v povezavi s preostalim, večjim delom dinarske populacije. Medvedi iz Slovenije nenehno prehajajo na Hrvaško in obratno, kar je znano iz podatkov telemetrije že od leta 1986 (Krže, 1988). To nam sicer potrjujejo tudi podatki o velikosti domačih okolišev, ki se gibljejo v rangi velikosti za samce 99-575 km² in samice 58-108 km² (Kaczensky in Knauer, 2000) in pa tudi podatki iz študije 2004, kjer so Skrbinšek in sod. pridobili podatke iz sosednje Hrvaške o smrtih medvedov, katerih iztrebki so bili najdeni v Sloveniji. Slovenska populacija medvedov je torej povezana s hrvaško, ki je ocenjena na okoli 400 medvedov na območju velikem 9 800 km² in so pod podobno upravljalno shemo kot v centralnem območju v Sloveniji (Huber in sod., 2000). Glede na to, da so Dinaridi eden izmed največjih nefragmentiranih gozdnih kompleksov v Srednji Evropi in glede na to, da je bila večina dinarskih držav združena v Jugoslavijo (podobno upravljanje s populacijo v velikem delu območja), lahko podobne migracije in povezave med populacijami v posameznih državah pričakujemo vzdolž celotnega dinarskega gorstva. Če prihaja do določene stopnje genetske diferenciacije z razdaljo, lahko visoko gensko diverziteteto razlagamo tudi z ohranjanjem različnih genotipov v različnih delih populacije - subpopulacijah, zaradi različnih učinkov genetskega drifta v vsakem od njih, ko je bila številčnost populacije nizka in genskim pretokom v obdobju visoke številčnosti.

Visoki povprečni vrednosti H_o in H_e ne nakazujeta prehoda ozkega grla (Cornuet in Luikart, 1996). Drugače pravijo Garza Williamsonovi indeksi. Vrednost razmerja M se zmanjša, v primerih zmanjšanja številčnosti populacije. Da se vrednost indeksa približa vrednosti 1, je potrebnih nekaj 100 generacij (Garza in Williamson, 2001). Glede na to, da indeksi v povprečju kažejo izgubo 30%, na nekaterih lokusih (Cxx20, G10P, Mu09, Mu10, Mu50) pa celo izgubo približno polovice redkih alelov in če upoštevamo podatke o nihanju velikosti populacije za Slovenijo ter za druge države, ki so na območju Dinaridov in so bile v preteklosti pod podobno upravljalno shemo kot Slovenija je bilo ozko grlo najverjetneje konec 19.

in v začetku 20. stoletja. Po ocenah je takrat npr. slovenski del populacije štel le okoli 30-40 osebkov (demografsko ozko grlo) (Krže, 1988). Populacija naj bi številčno začela naraščati po koncu 2 svetovne vojne. V tako majhni populaciji se običajno zmanjša tudi efektivna velikost populacije (genetsko ozko grlo). Takrat se ojača genetski drift in posledično prihaja do izgube redkejših alelov (Garza in Williamson, 2001). Pri ozkih grlih je, vsaj toliko kot število živali v populaciji, pomembno tudi trajanje ozkega grla (kako dolgo je številčnost nizka), saj je pri dolgotrajnem ozkem grlu drift dolgo visok in prihaja do izgube alelov (Frankham in sod., 2002).

Glede na podobnost povprečne H_o in H_e lahko rečemo, da se z genetskega vidika osebkovi v populaciji parijo približno naključno (Frankham in sod., 2002). Kljub temu pa imajo trije lokusi v celotni populaciji statistično značilno odstopanje od Hardy Weinbergovega ravnovesja, ki je na lokusu Mu26 še posebej izrazito ($P = 0$). To kaže na možnost vpliva nekaterih za populacijo bolj ali manj neugodnih dejavnikov (nenaključno parjenje, migracija, mutacija, majhnost populacije). Teh odstopanj na drugih lokusih in posledično povprečni H_o verjetno ne zaznamo, ker so učinki zgoraj naštetih dejavnikov na populacijo majhni (Frankham in sod., 2002). Za razlago lahko postavimo več različnih hipotez. Odstopanje je lahko posledica delovanja genetskega drifta v majhni populaciji. Lahko se pojavi kot posledica spolne selekcije, ki samcem z večjo reprodukcijsko uspešnostjo omogoča večji prenos svojih genov (alelov) v naslednjo generacijo, kar lahko v primeru njegove specifičnosti na določenem lokusu, močno spremeni frekvenco pojavljanja določenega alela. Podobno situacijo lahko pričakujemo v primeru imigracije že manjšega števila prav tako reprodukcijsko uspešnih samcev iz neke druge populacije npr. iz Rodopov, Stara planine ali Karpatov. Vendar pa so takšne migracije v današnjem času malo verjetne. Tudi v primeru, da znotraj dinarske populacije obstaja diferenciacija populacije z geografsko razdaljo, bi lahko zaradi migracij samcev zaznali odstopanje od Hardy Weinbergovega ravnovesja.

Zanimive rezultate smo dobili pri testu vezavnega neravnovesja med pari lokusov. Ugotovili smo, da je dedovanje vsakega lokusa povezano v povprečju z dedovanjem 18 izmed 21 preostalih preučevanih. Vsak lokus je v povprečju v vezavnem neravnovesju z 18,1 lokusom (kar je 86,1%). V velikih populacijah z naključnim parjenjem ne bi smelo biti korelacij med pojavljanjem alelov na dveh nevtralnih lokusih, razen v primeru, kadar sta lokusa fizično skupaj na kromosomu (Leberg, 2005). Skoraj nemogoče je, da bi bilo vseh 22 lokusov na enem kromosomu. Bolj verjetna se zdi možnost, da je kljub trenutno številčni populaciji za vezavno neravnovesje kriv učinek ustanovitelja (Founder efekt) ali ozko grlo v prejšnjih generacijah. Če je bila v bližnji preteklosti efektivna velikost populacije (N_e) majhna, je lahko učinek še vedno opazen zaradi močnega povezovanja lokusov, parjenja v sorodstvu ali drugih dejavnikov, ki lahko povzročijo zakasnitev vezavnega neravnovesja (Hedrick, 2005). Na velikost N_e imajo precejšen učinek fragmentacija, izolacija, strategije izkoriščanja in translokacije (premestitev) populacije (Leberg, 2005). Jerina in Adamič (2008) navajata, da kot posledica izredno intenzivnega odstrela in deloma drugih antropogeno pogojenih vektorjev smrtnosti (npr. promet), starost 4 leta doseže le okoli 20%, starost 6 let pa 10% osebkov. Od tega starost 6 let dočaka okoli 10% samcev in 15% samic, kar pomeni, da majhen del populacije doseže reproduktivni razred. Ker vemo, da se njuna ocena velikosti slovenske populacije od leta 1998 do 2003 giblje od 244 do 316 osebki, lahko iz teh podatkov sklepamo na majhno N_e , kar se dobro sklada z našimi ugotovitvami. Glede na to, da je poznavanje N_e populacije eden pomembnejših parametrov za oblikovanje plana upravljanja z ogroženimi vrstami (Leberg, 2005), bi jo bilo v prihodnje smiselno natančneje oceniti.

11.3. GENSKA DIVERZITETA MEDVEDOV V SLOVENIJI - SKLEPI

Uporabljeni mikrosatelitski markerji so polimorfni. Število alelov na lokus je primerljivo s številom alelov, ki so jih našli tudi v nekaterih drugih populacijah medvedov.

Na vseh 22 lokusih smo ugotovili razmeroma visoko stopnjo genske variabilnosti in alelske diverzitete. Razlog za visoko gensko diverziteto slovenske populacije je smiselno iskati v povezavi s preostalim večjim delom populacije. Za potrditev tovrstne domnev bi morali primerjati skupine osebkov iz različnih delov Dinaridov, kar bi bilo v prihodnje tudi smiselno storiti.

Garza Williamsonovi indeksi v povprečju kažejo izgubo 30% alelov na lokusih nakazujejo prehod ozkega grla. Verjetno ga je populacija preživela konec 19. in v začetku 20. stoletja.

Glede na podobnost povprečne H_o in H_e lahko rečemo, da se osebki v populaciji z genetskega vidika parijo približno naključno.

Ugotovili smo, da je dedovanje lokusov medsebojno izjemno povezano. Zdi se verjetno, da je kljub trenutno številčni populaciji za vezavno neravnovesje kriv učinek ustanovitelja (Founder effect) ali ozko grlo v prejšnjih generacijah.

Za nadaljnje analize dinarske populacije medvedov bi bilo smiselno pridobiti informacije o genetski pestrosti medvedov z drugih delov dinarskega gorstva. Tako bi lahko ugotavljali ali prihaja do diferenciacije populacije z razdaljo. S pridobitvijo starosti iz narave odvzetih osebkov bo mogoče oceniti efektivno velikost populacije in preučiti sorodnost med osebki ter disperzijo mladih osebkov.

12. VIRI

1. Abdi H. 2007. Bonferroni and Sidak corrections for multiple comparisons. V: Encyclopedia of Measurement and Statistics. N.J. Salkind (ed.). Thousand Oaks, CA: Sage. <http://www.utdallas.edu/~herve/Abdi-Bonferroni2007-pretty.pdf>
2. 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.
3. Baloloux F., Lugon-Moulin N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155-165
4. 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.
5. Bellemain E, Taberlet P. 2004. Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. *Molecular Ecology Notes* 4(3):519-22.
6. Bellemain E., 2004. PhD thesis: 111 str.
7. Bellemain E., Taberlet P. 2004. Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) feces. *Molecular Ecology Notes*, 4, 3: 519-522.
8. 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.
9. Chao, A., Lee, S-M and Jeng, S-L 1992. Estimating population size for capture-recapture data when capture probabilities vary by time and individual animal. *Biometrics* 48, 201-16.
10. Cooch E, White G. 2007. Program MARK, "A gentle introduction". 5 ed. <http://www.phidot.org/software/mark/docs/book/>.
11. Cornuet J.M., Luicart G. 1996. Descriptin and Power Analysis of Two Tests for Detecting Recent Population Bottlenecks From Allele Frequency Data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
12. 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.
13. Dieringer D., Schlotterer C. 2003. MICROSATELLITE ANALYSER (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3: 167-169
14. 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.
15. Excoffier L., Laval G., Schneider S. 2005. Arlequin ver 3.1. An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. User manual.
16. Frankham R., Ballou J. D., Briscoe D. A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, New York, 617 str.
17. 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.
18. Garza J.C., Williamson E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology*, 10: 305-318
19. Hancock J. M. 1999. Microsatellites and other simple sequences: genomic context and mutational mechanisms. V: Microsatellites. Evolution and applications. Goldstein D. B., Schlottere C. (eds.). New York, Oxford University Press, Inc.: 1-9

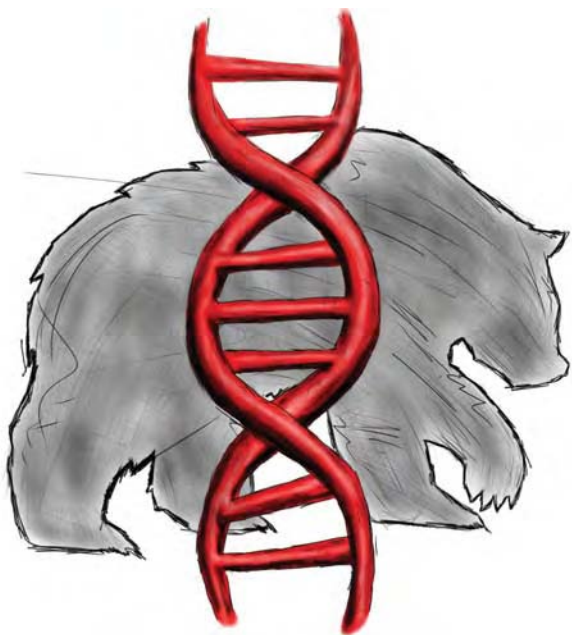
20. Hartl D.L., Clark A.G. 1997. Principles of Population Genetics. 3rd ed. Sunderland, MA, Sinauer Associates Inc.: 542 str.
21. Hedrick P.W. 2005. Genetic of popoulations. 3rd ed. Sudbury, MA, Jones and Bartlett Publishers: 737 str.
22. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
23. http://www.natura2000.gov.si/uploads/tx_library/medved.pdf (15. avg. 2008)
24. Huber Đ., Frković A., Štahan Ž., Kusak J., Majić A. 2000. Present status and management of large carnivores in Croatia. . V: Living with Bears. A large European Carnivore in a Shrinking World. Kryštufek B., Flajšman B., Griffiths H. I. (eds.). Ljubljana, Ecological Forum of the Liberal Democracy of Slovenia in cooperation with the Liberal Academy, 207-227
25. Huggins RM. 1989. On the statistical analysis of capture experiments. Biometrika 76:133-40.
26. Jarne, P. Lagoda P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. Tree, 11, 10: 424-429.
27. Jerina K., Adamič M. 2008. Analiza odvzetih rjavih medvedov iz narave v Sloveniji v obdobju 2003-2006, na podlagi starosti določene s pomočjo brušenja zob. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo in obnovljive gozdne vire:
28. Jerina K., Debeljak M., Džeroski S., Kobler A., Adamič M. 2003. Modeling the brown bear population in Slovenia. A tool in the conservation management of treatedened species. Elsevier. Ecological modelling., 170: 453-469
29. Jolly GM. 1965. Explicit estimates from capture-recapture data with both death and immigration - Stochastic model. Biometrika 52:225-47.
30. Jonozovič M., 2003. Strokovno izhodišče za vzpostavlanje omrežja NATURA 2000. Medved (Ursus arctos). 65 str.
31. Kaczensky P. 2000. Project medved. Study area. V: Co-existence of brown bears and men in the cultural landscape of Slovenia. Kaczensky P. (ed.). Final report of the FWF project P 11529-BIO: 10 str.
32. Kaczensky P. in Gossow H. 2000. Project medved. Introduction. V: Co-existence of brown bears and men in the cultural landscape of Slovenia. Kaczensky P. (ed.). Final report of the FWF project P 11529-BIO: 10 str.
33. Kaczensky P., Knauer F. 2000. Habitat use of bears in a multi-use landscape in Slovenia. V: Co-existence of brown bears and men in the cultural landscape of Slovenia. Kaczensky P. (ed.). Final report of the FWF project P 11529-BIO: 41 str.
34. Kalinowski ST. 2002. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances? Heredity, 88: 62-65
35. Kendall WL, Pollock KH, Brownie C. 1999. A likelihood-based approach to capture-recapture estimation of demographic parameters under the robust design. Biometricks 51:293-308.
36. Kryštufek B. 2003. Sesalci - Mammalia. V: Živalstvo Slovenije. Sket B., Gogala M., Kuštor V. (ur). Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 595 str.
37. Krže B. 1988. V: Zveri II. Medvedi - Ursidae, psi - Canidae, mačke - Felidae. Kryštufek B., Brancelj A., Krže B., Čop J. (ur). Lovska zveza Slovenije, Ljubljana: 23-62
38. Leberg P. 2005. Genetic approaches for estimating the effective size of populations. Journal of wildlife management 69, 4: 1385-1399
39. Miller C, Joyce P, Waits LP. 2002. Assessing Allelic Dropout and Genotype Reliability Using Maximum Likelihood. Genetics 160:357-66.
40. 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.

41. Paetkau D, Calvert W, Stirling I, Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure of Canadian polar bears. *Molecular Ecology* 4:347-54.
42. Paetkau D, Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489-95.
43. Paetkau D., Amstrup S.C., Born E.W., Calvert W., Derocher A.E., Garner G.W., Messier F., Stirling I., Taylor M.K., Wiig ?, Strobeck C. 1999. Genetic structure of the world's polar bear populations. *Molecular Ecology*, 8: 1571-1584
44. Paetkau D., Calvert W., Stirling I., Strobeck C. 1995. Microsatellite analysis of population structure of Canadian polar bears. *Molecular Ecology*, 4: 347-354
45. Paetkau D., Strobeck C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3: 489-495
46. Paetkau D., Waits L.P., Clarkson P.L., Craighead L., Vyse E., Ward R., Strobeck C. 1998. Variation in Genetic Diversity across the Range of North American Brown Bears. *Conservation Biology*, 12, 2: 418-429
47. Paetkau D. 2004. The optimal number of marker in genetic capture-mark-recapture studies. *Journal of Wildlife Management*, 68 (3):449-452
48. Pages M., Calvignac S., Klein C., Paris M., Hughes S., Hänni C. 2008. Combined analysis of fourteen nuclear genes refines the Ursidae phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 73-83
49. Pearse D. E., Crendall K. A. 2004. Beyond FST: Analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, 5: 585-602.
50. 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.
51. Pollock KH. 1982. A Capture-Recapture Design Robust to Unequal Probability of Capture. *Journal of Wildlife Management* 46(3):752-7.
52. Pradel R. 1996. Utilization of capture-mark-recapture for the study of recruitment and population growth rate. *Biometrics* 52:703-9.
53. R Development Core Team (2005). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
54. Raymond M, Rousset F. 1994. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49:1280-3.
55. Raymond M., Rousset F. 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 49, 6: 1280-1283
56. Schreve D.C., Currant A.P. 2003. The Pleistocene history of the brown bear with particular reference to the western palaearctic. V: *Living with Bears. A large European Carnivore in a Shrinking World*. Kryštufek B., Flajšman B., Griffiths H. I. (eds.). Ljubljana, Ecological Forum of the Liberal Democracy of Slovenia in cooperation with the Liberal Academy, 27-39
57. Schwarz CJ, Arnason AN. 1996. A general methodology for the analysis of open-model capture recapture experiments. *Biometrics* 52:59-64.
58. Seber GAF. 1965. A note on the multiple recapture census. *Biometrika* 52:249-59.
59. 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 rjavem medvedu v deželah Alpe - Adria*. Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za gozdarstvo, Ljubljana, Slovenia; p 43-76.

60. Simonič A. 2003. Conservation strategy for the brown bear in Slovenia. V: Living with Bears. A large European Carnivore in a Shrinking World. Kryštufek B., Flajšman B., Griffiths H. I. (eds.). Ljubljana, Ecological Forum of the Liberal Democracy of Slovenia in cooperation with the Liberal Academy, 295-321
61. Skrbinšek T., Potočnik H., Kos I., Trontelj P., 2007. Varstvena genetika medveda. Končno poročilo projekta "Varstvena genetika medveda, risa in jelenjadi v Sloveniji", Ljubljana, 49 str.
62. Strategija upravljanja z rjavim medvedom (*Ursus arctos*) v Sloveniji. 2002. www.mop.gov.si/fileadmin/mop.gov.si/pageuploads/podrocja/okolje/pdf/strategija_rjavi_medved_2002.pdf (7. mar. 2008)
63. Sweson J.E., Gerstl N., Dahle B., Zedrosser A. 2000. Action plan for the conservation of the brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. Council of Europe, Strassburg, France.
64. 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.
65. 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.
66. Taberlet P., Bouvet J. 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Biological sciences*, 255, 1344: 195-200
67. Taberlet P., Camarra J.J., Griffin S., Uhres E., Hanotte O., Waits L.P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J. 1997. Noninvasive genetic tracking of endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, 6, 9: 869-876
68. Turk I. 2003. Humans and carnivores in Slovenia during the upper pleistocene. Interactions between neanderthals and the cave bear. V: Living with Bears. A large European Carnivore in a Shrinking World. Kryštufek B., Flajšman B., Griffiths H. I. (eds.). Ljubljana, Ecological Forum of the Liberal Democracy of Slovenia in cooperation with the Liberal Academy, 43-57
69. Valiere N. 2002. gimlet: a computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes* 2(3):377-9.
70. Waits L., Taberlet P., Swenson J.E., Sandegren F., Franzén R. 2000. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctos*). *Molecular Ecology*, 9:421-431
71. White GC, Burnham KP. 1999. Program MARK: Survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study* 46(Supplement):120-30.
72. 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.
73. Zedrosser A., Dahle B., Swenson J.E., Gerstel N. 2001. Status and management of the brown bear in Europe. *Ursus* 12: 9-20

Priloga 1: Brošura za vzorčenje

Navodila

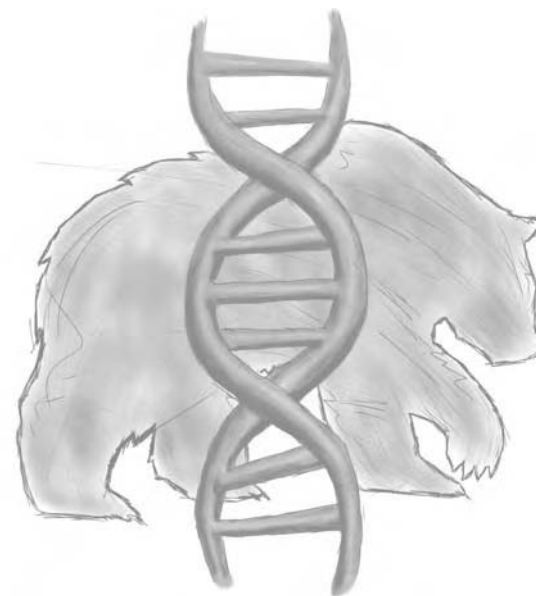


**Za sodelovanje pri raziskavi
medvedov s pomočjo genetike**

*Projekt "Analiza medvedov odvzetih iz narave in genetsko-
molekularne raziskave populacije medveda v Sloveniji"*

*Raziskavo financira Ministrstvo za okolje in prostor
Republike Slovenije.*

*Raziskavo izvaja Oddelek za biologijo Biotehniške fakultete,
Univerza v Ljubljani.*



Spoštovani,

veseli nas, da ste se odločili sodelovati pri raziskavi slovenskih medvedov.

Glavni cilj raziskave je kredibilno in čim natančneje odgovoriti na vse pogostejše vprašanje: koliko medvedov pravzaprav imamo? Upamo, da bomo s tem lahko pripomogli k reševanju vedno pogostejših konfliktov med medvedom in ljudmi, ki z njim živijo.

Tu pa se raziskava ne ustavi. Poskušali bomo dobiti tudi druge vpoglede v življenje te zanimive vrste. Svoja vprašanja o medvedih v vašem lovišču si lahko zastavite tudi vi in mogoče bomo lahko na njih v okviru raziskave skupaj odgovorili.

Uporabljali bomo najsodobnejše genetske metode. Metode smo temeljito preizkusili in lahko dajo zelo dobre rezultate. Toda ti rezultati so odvisni od kritičnega dejavnika: od števila in kakovosti zbranih vzorcev. Pri tem pa smo popolnoma odvisni od vas in drugih ljudi, ki jim ni vseeno in ki so pripravljeni pomagati.

Vaša pomoč je neprecenljiva! Hvala!

Tomaž Skrbinšek,
Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta,
Univerza v Ljubljani

1

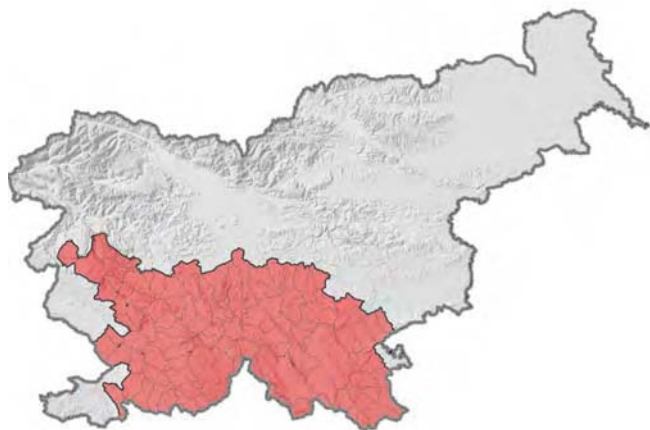
Vzorčenje in medvedi

Neinvazivno genetsko vzorčenje pomeni zbiranje genetskih podatkov preko materiala, ki ga žival pusti v okolju. Iz iztrebka lahko tako preberemo individualen genotip živali - kot nekakšen genetski prstni odtis. Kadarkoli kasneje bomo dobili iztrebek te iste živali, bomo vedeli, da pripada prav njej in ko bo žival odstreljena, jo bomo lahko prepoznali.

To je znatno enostavneje in bolj zanesljivo kot označevanje živali z drugimi metodami - samo pomislite na delo, ki bi bilo potrebno za označitev enega samega medveda z ušesno markico! Vse kar potrebujemo za zanesljivo genetsko označbo je iztrebek, posodica za odvzem vzorca in pet minut časa.



2



V raziskavi nameravamo zbirati vzorce po celotnem območju stalne prisotnosti medveda v Sloveniji - skoraj 600.000 ha. Za dobro oceno bi potrebovali približno 1200 vzorcev, načeloma pa velja: več vzorcev, boljša ocena! Vzorci morajo biti zbrani v istem časovnem obdobju, z enakomernim naporom po celotni površini. Vzorčenje bomo začeli **7. septembra 2007** in ga predvidoma izvajali do **30. novembra 2007**.

Zakaj bi sodelovali?

Glavna pridobitev raziskave bo dobra ocena številčnosti medvedov v Sloveniji. Ima pa sodelovanje tudi **dodatne prednosti za sodelujoče**. Po pošti vam bomo poslali rezultate analiz za vzorce, ki nam jih boste poslali in zemljevid, na katerem bo prikazano, kje vse smo še našli vzorce "vaših" medvedov - bodisi iztrebke ali tkiva, če je bil medved odstreljen. Če bomo imeli sredstva, bomo z analizami tkiv nadaljevali tudi kasneje in boste lahko odstrel oziroma izgube vaših medvedov spremljali preko naše spletne strani. Zelo bomo veseli, če boste v vzorčenju našli tudi kak svoj interes, recimo ker vas bo kaj posebej zanimalo o medvedih v vašem lovišču (na katera krmišča hodi kateri medved, ali je medved, ki je povzročal škode tisti, ki je bil odstreljen...). Če nam boste svoje pobude ali želje glede tega sporočili, bomo naredili vse, da jih pri analizah upoštevamo.



Odvzem vzorca iztrebka

Odvzem vzorca je enostaven in vzame nekaj minut. Povzamemo ga lahko v šestih korakih, ki so podrobneje opisani na naslednjih straneh.

- 1 Prepoznamo iztrebek medveda**
... prepričamo se, da je iztrebek medvedov.
- 2 Vzamemo vzorec**
... s površine iztrebka, primerno količino.
- 3 Ocenimo starost iztrebka**
... pobiramo sveže iztrebke - do pet dni.
- 4 Zapišemo podatke**
... brez podatkov je vzorec neuporaben!
- 5 Označimo iztrebek**
... da ga ne bo pobral še kdo drug!
- 6 Shranimo in dostavimo vzorce**
... na lovsko družino ali do raziskovalcev.

5

Iztrebki medveda

1

Medvedove iztrebke običajno enostavno prepoznamo, kljub temu pa lahko pride do napak. Najlažje bomo iztrebke zanesljivo prepoznali, če se vprašamo o **velikosti, vsebini in obliki**.

Velikost: velikost iztrebka medveda je lahko različna - pri velikih medvedih je lahko iztrebek velik skoraj kot manjši iztrebek krave, pri mladiču jeseni pa približno kot iztrebek psa.

Vsebina: vsebina je odvisna od prehrane in je prav tako lahko zelo različna - koruza, trava, mrhovina, sadje (zelo pogosto jeseni), ose, mravlje, žir... Značilno je, da je **vsebina dokaj slabo prebavljena** in lahko vidimo večje delce hrane.

Oblika: Iztrebek je običajno na enem kupu. **Ni** oblikovanih "paketkov" kot pri divjem prašiču.

Pogoste pomote

Divji prašič: Pri divjem prašiču je hrana prav tako slabo prebavljena, vendar je iztrebek oblikovan v značilne "pakete", česar pri medvedu ni.

Jelenjad: Zamenjava je mogoča, če pri iztrebku jelenjadi ni vidna struktura (poletni iztrebek).

6



Pri jelenjadi je vsebina vedno zelo fino predelana, pri medvedu pa vedno vidimo delce hrane, ki jih lahko prepoznamo (listi trav, cela zrna koruze itd).

Volk: Ločevanje ni vedno enostavno. Iztrebek volka je poln dlake, večinoma jelenjadi ali srnjadi. Iztrebek medveda je pogostejše na kupu, iztrebek volka pa v "klobasah". Iztrebek volka ima tudi značilen, močan vonj. Če niste prepričani, poberite iztrebek in napišite opombo!

Pes: Ni dlake, rastlinskega materiala je običajno malo. Včasih lahko opazimo tudi hrano za pse.

Ocena starosti iztrebka

2

Ocena starosti iztrebka je pomembna, ker lahko preko nje ocenimo kvaliteto DNA v iztrebku in naredimo načrt analize.

Pobiramo sveže iztrebke, ki se nam **zdiijo stari največ pet dni**.

Ocena starosti iztrebka seveda ni nikoli natančna, videz iztrebka pa je odvisen od vremenskih razmer in vsebine. Smo pa pri pilotski študiji opazili, da znamo ljudje starost iztrebka dobro oceniti "po zdravi pameti". Ocena starosti nam je v veliko pomoč pri analizah.

Nekaj napotkov:

Svež iztrebek že na prvi pogled zgleda sveže. Ima vonj, ki je odvisen od vsebine (po sveži travi ali zeliščih, jabolkah, močno smrdeč po mrhovini, skoraj brez vonja pri koruzi ali žiru itd). Zgleda vlažno in pogosto bolj ali manj sluzavo. V notranjosti še ni žužek in njihovih ličink. Če v vsebini prevladujejo zelene rastline, je vsebina zelene barve. Pri takih "travnatih" iztrebkih postaja vsebina sčasoma vse bolj črna.

Srednje star iztrebek še vedno izgleda sveže. Vonj je manj intenziven, še vedno pa značilen za vsebino. Lahko so prisotne žuželke, ki so prišle iz okolja. Po nekaj dneh lahko najdemo tudi že ličinke žuželk (običajno so videti kot beli "črvi"). Iztrebek po treh do štirih dneh ni več videti sluzav. Če je vreme suho in vroče, iztrebek pa na soncu, je lahko že po enem dnevu suh, še vedno pa bo imel nekaj vonja.

Star iztrebek izgubi večino vonja in ni več sluzav. Lahko je prisotnih še kaj žuželk ali ličink, pogosto pa za njimi ostanejo samo luknjice in "tunelčki". Običajno je tak iztrebek suh, čeprav ga lahko namoči dež. Zelo stari iztrebki imajo vonj po zemlji. **Starih iztrebkov ne pobiramo!**



9

Vzamemo vzorec

3

Vzorec **vzamemo s površine iztrebka, po možnosti del, ki ni v stiku s tlemi**. Na tem mestu se iztrebek hitreje izsuši in je zato DNK bolje ohranjen. Če vidimo vrh iztrebka (zašiljeni konec, ki je prišel ven na koncu), vzamemo vzorec od tam.

Če je bil iztrebek izpostavljen močnemu dežju, poskušamo vzeti vzorec s čim manj spranega mesta.



10

Če je na iztrebku **sluz**, jo vzamemo, saj je v njej vedno dosti DNK.

Vzamemo **za lešnik velik vzorec** in ga damo v posodico z raztopino za shranjevanje vzorca. **Pazimo, da vzorca ne vzamemo preveč**, ker ga drugače raztopina za vzorce ne bo mogla dobro konzervirati.



Vzorec najlažje odvezamemo z dvema vejicama, ki ju najdemo v okolju ali podobnim materialom, ki ga lahko brez škode odvržemo. Odvzem je najenostavnejši, če vejici poševno prirežemo.

Za vsak vzorec uporabimo novo "orodje", da preprečimo medsebojno onesnaženje vzorcev!

11

Zabeležimo podatke

4

Na etiketo na posodici zabeležimo:

Datum najdbe vzorca.

Ime in priimek nabiralca vzorca, da vam bomo znali poslati podatke o vaših vzorcih oziroma, da vas bomo lahko poklicali, če nam kaj ne bo jasno.

Lovišče, kjer ste vzorec našli.

Lokacijo najdbe vzorca. Če imate GPS napravo, zapišite koordinate. Drugače zapišite lokalno ime mesta, kjer ste vzorec našli. Ko vzorec vrnete v družino, poskusite zapisati šifro kvadranta kilometerske mreže (isto kot pri uplenitvi divjadi). Če natančne lokacije ne morete določiti, vseeno vzamite vzorec in napišite približno lokacijo.

Ocena starosti vzorca - obkrožite, koliko se vam zdi, da je vzorec star.

Velikost iztrebka - obkrožite. Velik iztrebek medveda je velik kot manjši iztrebek krave. Majhen iztrebek je približno velikosti iztrebka psa.

Opomba: - zapišite karkoli, kar se vam zdi koristno sporočiti. Tu nam lahko tudi sporočite, če vas v zvezi z vzorcem kaj posebej zanima.

12



5

Označimo iztrebek

Iztrebek po odvzemu vzorca **označimo ali odstranimo, da ga ne bo še kdo pobral**. Najbolje je, da nanj položimo večji kamen ali namečemo preko veje. Če je iztrebek na cesti, ga lahko s pomočjo palice ali kamna tudi odstranimo z vozišča.

Oznaka mora biti nedvoumna in trajna!

Že označenih iztrebkov ne vzorčimo.

13

Vzorce dostavimo

6

Po odvzemu vzorec hranimo na **hladnem in temnem mestu**. Ne puščamo ga v avtomobilu na soncu!

Vzorec dostavite tja, kjer ste dobili material. Najpogosteje bo to na lovsko družino. Če boste z dostavljanjem imeli težave, nas pokličite.

Če vam bo kaj materiala za zbiranje vzorcev ostalo, vas prosimo, da ga po končanem vzorčenju vrnete tja, kamor boste predajali vzorce.

Kontaktni podatki

Skupina za ekologijo živali

Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta

Univerza v Ljubljani

Večna pot 111, 1000 Ljubljana

E-mail: raziskovanje.medvedov@gmail.com

Spletna stran: www.medvedi.si

Telefon: (01) 423-3388 (Tomaž Skrbinšek)
(040) 833-357

14



Beležke

[illegible]

16



Opozorilo

Tekočina za shranjevanje vzorcev iztrebkov, ki se nahaja v posodica, je narejena na bazi etilnega alkohola in je **vnetljiva**.

Tekočina ni strupena, je pa **zdravju škodljiva, če jo zaužijemo**.

Hranite varno pred otroci!

Ne izpostavljajte ognju!



Tomaž Skrbinšek
Navodila za sodelovanje pri raziskavi medvedov
s pomočjo genetike
izdajatelj in založnik:
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta,
Oddelek za biologijo
ilustracije, oblikovanje in prelom:
Tomaž Skrbinšek
Ljubljana 2007, naklada 1500 izvodov
tisk: Trajanus d.o.o.

Hvala za pomoč!

Kontrolni seznam za pobiranje vzorca:

1. Iztrebek se ne zdi starejši kot 5 dni in ni videti, da bi že kdo odvzel vzorec.
2. Vzorec je bil odvzet s **površine iztrebka, z dela, ki ni bil v stiku s tlemi**.
3. Vzorca **ni več** kot za 1/5 posodice.
4. Po odvzemu je iztrebek odstranjen ali označen s kamnom ali vejicami in ni možnosti, da bi ga še kdo pobral.
5. Na posodici z vzorcem so zabeleženi vsi potrebni podatki.

Vzorčenje se začne 7. Septembra 2007!

Priloga 2: Pismo za gospodarja LD

Skupina za ekologijo živali
Oddelek za biologijo
Biotehniška fakulteta,
Univerza v Ljubljani
Večna pot 111
1000 Ljubljana



Za: gospodarja ali starešino LD

Ljubljana, 14. 8. 2007

Navodila za razdeljevanje materiala za zbiranje vzorcev za genetske raziskave slovenskih medvedov lovcem lovske družine

Spoštovani,

veseli nas, da se je vaša lovska družina odločila sodelovati pri raziskavi slovenskih medvedov s pomočjo genetike.

Prvič imamo priložnost resnično dobro preučiti slovenske medvede in dobro oceniti, koliko jih pravzaprav je. Upamo pa, da samo število medvedov ne bo edini in končni rezultat raziskave – metode, ki jih uporabljamo, nam dejansko omogočajo zanimiv in nov vpogled v življenje medvedov na mnogo širši ravni.

Celoten uspeh raziskave pa je odvisen od enega dejavnika: števila in kvalitete zbranih vzorcev iztrebkov medvedov. Čeprav je Slovenija majhna, je območje medveda z vidika majhne raziskovalne skupine, kot je naša, zelo veliko in nikakor ne bi mogli sami zbrati dovolj vzorcev. Edini način, da raziskava uspe, je z vašo pomočjo.

Material, ki ste ga dobili, je treba razdeliti lovcem, ki bi želeli sodelovati. Nujno je, da material razdelite pravočasno, še **pred začetkom vzorčenja, torej najkasneje do 7. septembra**. Pomembno je, da po vsem območju prisotnosti medveda pričnemo z zbiranjem vzorcev istočasno, zato vas prosimo da lovce obvestite, **naj vzorcev pred 7. septembrom ne pobirajo**.

Vzorčenje in material

Vzorčenje traja od 7. septembra do 30. novembra 2007. Pri tem računamo, da bosta september in oktober najintenzivnejša, zato vas prosimo, da lovce opozorite, naj vzorce **začnejo pobirati takoj po 7. septembru.**

Iz vsakega iztrebka se vzame samo en vzorec (posodica)!

Material je zapakiran v pakete, ki jih razdelite lovcem. Če je kdo prepričan, da bo sodeloval intenzivneje, lahko vzame dva paketa. Vsak paket vsebuje:

- Tri posodice za odvzem vzorca. Podatki o vzorcu se zapišejo na etiketo na posodici.
- Brošuro z natančnimi navodili za odvzem vzorca.
- Svinčnik za zapisovanje podatkov.

V škatli je tudi paket z rezervnimi posodicami in dve rezervni brošuri. Če bo kateremu izmed lovcev zmanjkalo posodic, jih lahko dopolni iz rezervnega paketa. Ko začnete porabljati posodice iz rezervnega paketa, nam javite, da vam dostavimo nov material. Nov material boste lahko dobili tudi na nekaterih točkah (lovskih družinah) v vaši bližini, o katerih vas bomo obvestili, in neposredno sredi oktobra ob prvi oddaji vzorcev.

Če boste med vzorčenjem potrebovali dodatne posodice, nas nemudoma obvestite, da vam jih pošljemo!

Predaja materiala lovcem in zapisovanje

Prosimo vas, da material razdelite čim bolj resnim članom vaše lovske družine, ki precej časa preživijo v lovišču. Prosimo vas tudi, da **lovci, ki so prejeli material, vpišejo svoje podatke na vpisni list v škatli z materialom in prejem potrdijo s podpisom.** Na ta način jim bomo lahko, če bodo to želeli, poslali rezultate analiz za vzorce, ki jih bodo nabrali, oziroma razjasnili kakšne nejasnosti glede vzorcev (probleme pri prebiranju etiket, razumevanje lokalnih imen lokacij in podobno). **V predvideno rubriko naj označijo tudi, ali želijo dobiti rezultate za medvede, katerih iztrebke so našli.** Vsi osebni podatki bodo obravnavani kot zaupni.

Spremljanje vzorčenja

Za izvedbo raziskave je zelo pomembno, da vemo, kako zbiranje vzorcev poteka po posameznih loviščih in ali kdo potrebuje dodaten material. Zaradi tega vas bomo med vzorčenjem nekajkrat poklicali in se pozanimali, ali je vse v redu, oziroma ali kaj potrebujete.

Hranjenje vzorcev med vzorčenjem in končna oddaja vzorcev

Prosimo, da daste lovcem navodilo, naj vzorce vračajo vam v lovsko družino. Prosimo tudi, da pri dostavi vzorca v družino lovca opozorite, da na etiketo na posodici v predvideno rubriko vpiše **kvadrant kilomske mreže**, kjer je bil vzorec najden (isto kot pri evidenci uplenjene živali). Če so zabeležene GPS koordinate, potem ta korak ni potreben.

Zbrane vzorce do oddaje hranite na lovski družini, na temnem in hladnem mestu. Najbolje je, da posodice stojijo pokončno v stiropornih stojalih, ki smo jih dali zraven škatel z materialom. Hranjenje v hladilniku ni nujno potrebno, je pa zaželeno, če imate to možnost.

Vzorce bomo pobirali dvakrat: med vzorčenjem, v sredini oktobra in po 30. novembru, ko bo vzorčenje zaključeno. Glede oddaje vzorcev se bomo dogovorili - bodisi na skupnem zbirnem mestu za več družin ali pri vas na lovski družini, če to ne bo mogoče. Pri tem bomo prinesli tudi nov material, če ga bo komu primanjkovalo.

Ali vas kaj o vaših medvedih posebej zanima?

Zelo bomo veseli, če boste v raziskavi našli tudi kak vaš specifičen interes oziroma bi želeli odgovore na specifična vprašanja. Na primer, ali je medved, ki povzroča škodo ali hodi v bližino vasi, ta, ki hodi k vam na krmišče? Ali je odstreljen medved tisti, ki ga »poznate« že od prej? Kje vse se odstrelijo medvedi, ki hodijo na vaša krmišča? Prosimo, da nas o takšnem posebnem interesu obvestite (najbolje pisno, v kratkem pismu skupaj z materialom). Vzorec, ki vas posebej zanima, označite v rubriki »opombe« na etiketi posodice, ker mu bomo tako dali prednost pri analizi.

Vzporedno vzorčenje dlake

Vzporedno z vzorčenji iztrebkov bomo v nekaterih loviščih zbirali genetske vzorce medvedov preko »pasti za dlako«, posebej pripravljenih količkov z vabo intenzivnega vonja, ki privabljajo medvede. Ti se ob količke podrgnejo, pustijo dlako in v dlaki material za genetske analize. Količki bodo postavljeni na redko (približno en na 8 kvadratnih kilometrov). Pri postavljanju in kontroliranju količkov bomo pazili, da v lovišču ne bomo povzročali motenj.

Z vzorčenjem dlake bomo pričeli v posameznih loviščih konec septembra. Če bo vzorčenje dlake potekalo tudi v vašem lovišču, vas bomo o tem obvestili in povabili k sodelovanju.

Rezultati

Rezultati raziskave bodo znani do konca oktobra 2008. Vaša lovska družina bo dobila natančne rezultate za vse medvede, katerih vzorci bodo najdeni v vašem lovišču, skupaj z zemljevidi kje vse smo še dobili vzorce teh medvedov.

Vsak sodelujoč lovec, ki bo oddal vzorce in na vpisnem listu označil, da to želi, bo dobil podrobne rezultate analiz za svoje vzorce in zemljevid z lokacijami kje vse smo našli vzorce »njegovih« medvedov.

Zraven bomo poslali tudi odgovore na vaša vprašanja, če vas bo kaj o vaših medvedih posebej zanimalo (seveda, če bomo znali na njih odgovoriti).

Kontaktne podatke

Če imate kakršna koli vprašanja glede vzorčenja, če bo šlo kaj narobe ali če vam bo zmanjkalo materiala, se nam lahko kadarkoli javite:

e-mail: raziskovanje.medvedov@gmail.com

telefon: (040) 833-357 (Tomaž Skrbinšek)

naslov: Skupina za ekologijo živali, Oddelek za biologijo, Biotehniška fakulteta,
Večna pot 111, 1000 Ljubljana

spletna stran: www.medvedi.si (v izdelavi – predvidoma konec avgusta)

Zaključek

Hvala, ker ste se odločili sodelovati v raziskavi. Vaša pomoč bo ključnega pomena za končen rezultat. Ponudila se nam je velika priložnost, da lahko skupaj pomagamo pri reševanju trenutne problematike slovenskih medvedov in postavimo trdne temelje bodočemu upravljanju s to veliko zverjo. Poskusimo jo izkoristiti.

Lep pozdrav,



Tomaž Skrbinšek



prof. dr. Ivan Kos

**Priloga 3: Vprašalnik za predstavnike LD ob
vmesnem pobiranju materiala**

**VPRAŠALNIK ZA STAREŠINO
GOSPODARJA LOVSKIH DRUŽIN**

ALI


 Univerza
v Ljubljani

 Biotehniška
fakulteta


Najprej se vam še enkrat lepo zahvaljujemo za sodelovanje v potekajočem projektu. Na vas se tokrat obračamo s prošnjo, da izpolnite spodnji vprašalnik. Ti podatki bodo pomembni pri modeliranju ulova in ponovnega ulova in izračunu številčnosti.

1. Ime in priimek: _____ telefon: _____
2. Lovska družina: _____
3. Koliko lovcev v vaši družini aktivno sodeluje pri zbiranju vzorcev? _____
4. Kateri naravni viri hrane za medveda so v vašem lovišču in v kakšni količini se pojavljajo v letošnjem letu? (obkrožite)

	skoraj nič		srednje	zelo dosti	
žir	1	2	3	4	5
želod	1	2	3	4	5
kostanj	1	2	3	4	5
sadje	1	2	3	4	5
drugo*	1	2	3	4	5

*drugo: _____

5. Koliko krmišč za medveda ali divje prašiče imate v vašem lovišču? _____
6. Ali ste krmišča v času vzorčenja zalagali? (obkrožite) da ne
7. S čim ste v času vzorčenja zalagali krmišča? (obkrožite)

- koruza
 - pesa

- sadje
 - drugo: _____
8. Komu vse ste razdelili material za vzorčenje?

- vsem zainteresiranim lovcem
 - lovcem, ki so veliko v lovišču
 - lovskim čuvajem

- drugo: _____
9. Dodatne pripombe glede izvajanja vzorčenja, težave, ideje...

**Priloga 4: Vprašalnik za predstavnike LD ob
končnem pobiranju materiala**

VPRAŠALNIK ZA STAREŠINO ALI GOSPODARJA LOVSKE DRUŽINE



Univerza
v Ljubljani

Biotehniška
fakulteta



Ob zaključku akcije zbiranja iztrebkov se na vas obračamo s prošnjo, da izpolnite spodnji vprašalnik. Ti podatki in podatki vprašalnika, ki ste ga izpolnili ob prejšnjem obisku, nam bodo v pomoč pri izračunu številčnosti medvedje populacije, pa tudi pri izboljšanju podobnih akcij v prihodnje.

Za vaše sodelovanje se vam še enkrat iskreno zahvaljujemo.

Ime in priimek: _____ telefon: _____

Lovska družina: _____

1. Prosimo vas, da na lestvici od 1 do 5 odgovorite na naslednja vprašanja:

a) Kako ocenjujete odziv lovcev v vaši družini na akcijo vzorčenja?

zelo slab 1 2 3 4 5 zelo dober

b) Kako ocenjujete komunikacijo med raziskovalci in lovci v tej akciji?

zelo slaba 1 2 3 4 5 zelo dobra

2. Kaj bi pri organizaciji vzorčenja spremenili?

3. Ali ste imeli v vaši lovski družini tekom vzorčenja skupne love? da ne

4. Število skupnih lovov med vzorčenjem: _____

5. Ocenite, na kakšni površini so se v povprečju izvajali skupni lovi: _____ ha

6. Kdaj so potekali skupni lovi? Če se spomnite, vpišite približno število sodelujočih, v nasprotnem primeru pa samo v vikend skupnega lova naredite križec:

oktober, vikendi	1 (6–7 okt)	2 (13-14 okt)	3 (20-21 okt)	4 (27-28 okt)
število lovcev	število _____	število _____	število _____	število _____
november, vikendi	1 (3-4 nov)	2 (10-11 nov)	3 (17-18 nov)	4 (24-25 nov)
število lovcev	število _____	število _____	število _____	število _____

DEC

7. Je padlo na območju vaše LD med vzorčenjem kaj snega? da ne

8. Je bilo območje vaše LD kljub snegu ves čas prevozno? da ne

9. S čim ste zalagali krmišča od našega zadnjega sestanka?

pesa koruza sadje drugo_____

10. Druge pripombe na izvajanje vzorčenja ali predlogi, kako bi ga izboljšali:
