

# Odhad velikosti populace rysa ostrovida (*Lynx lynx*) na Slovensku analýzou DNA

Lenka Ungrová<sup>1</sup>, Jarmila Krojerová<sup>2,6</sup>, Barbora Gajdárová<sup>2</sup>, Barbora Černá Bolfíková<sup>3</sup>, Mária, Apfelová<sup>5</sup>, Jiří Labuda<sup>4</sup>, Martin Duřa<sup>4,7</sup>, Peter Drengubiak<sup>5</sup>, Beňadik Machciník<sup>5</sup>, Michal Bojda<sup>4</sup>, Miroslav Kutal<sup>4</sup>, Vladimír Antal<sup>5</sup>, Slavomír Findo<sup>5</sup>, Pavel Hulva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Katedra zoologie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká republika

<sup>2</sup>Ústav biologie obratlovců Akademie věd ČR, v. v. i, Brno, Česká republika

<sup>3</sup>Katedra chovu zvířat a potravinářství v tropech, Fakulta tropického zemědělství, Česká zemědělská univerzita, Praha, Česká republika

<sup>4</sup>Hnutí DUHA Šelmy, Olomouc, Česká republika

<sup>5</sup>Štátná ochrana prírody, Banská Bystrica, Slovensko

<sup>6</sup>Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita, Brno, Česká republika

<sup>7</sup>Ústav ekologie lesa, Lesnická a dřevařská fakulta, Mendelova Univerzita, Mendelova Univerzita, Brno, Česká republika



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

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

## Podíl autorů

Genetické vzorky pro účely této studie byly sesbírány a jejich analýza byla financována v rámci dvou různých projektů:

1. projekt **Realizácia programov starostlivosti o veľké šelmy na Slovensku** (zkráceně **Veľké šelmy 2**, OPKZP-PO1-SC131-2017-22) financovaný z Operačního Programu Kvalita Životného Prostredia (OPKŽP)
2. projekt **Koordinácia ochrany, monitoringu a manažmentu západokarpatskej populácie vlka dravého a rysa ostrovida na česko-slovenskom pomedzí** (zkráceně **Šelmy SKCZ**, 304021D016) financovaný z programu Interreg V–A SK–CZ 2014-2020

Sběr dat v terénu provedla Štátna ochrana prírody Slovenskej republiky – ŠOP SR a Hnutí DUHA Šelmy. Donoři jednotlivých vzorků jsou označeni v Příloze 1.

Laboratorní analýzy vzorků pocházejících z projektu *Veľké šelmy 2* probíhaly na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy a provedla je Lenka Ungrová. Na Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v.v.i. (ÚBO AV ČR) byly zpracovány vzorky z projektu *Šelmy SKCZ* a jejich zpracování provedly Barbora Gajdárová a Jarmila Krojerová. Tato skutečnost je u jednotlivých vzorků vyznačena v Příloze 1. Pro účely vypracování této závěrečné studie byly pro populačně-genetické analýzy využity i genotypy získané v rámci projektu *Šelmy SKCZ*. Toto spojení umožnilo lepší ovzorkování (větší množství získaných vzorků i lepší pokrytí) na západním Slovensku, kde probíhal projekt *Šelmy SKCZ*.

# Obsah

Podíl autorů .....	2
<b>Obsah .....</b>	<b>3</b>
<b>Abstrakt.....</b>	<b>5</b>
<b>Úvod .....</b>	<b>5</b>
Neinvazivní genetika a její využití v genetickém monitoringu zvířat a odhadech velikosti populace.....	6
Genetický monitoring populací za pomoci neinvazivní genetiky .....	6
Odhad velikosti populace s využitím dat z genetického monitoringu .....	6
Analýza životaschopnosti populace .....	7
Efektivní velikost populace .....	7
Fylogeografie rysa ostrovida.....	8
Historie výskytu rysa ostrovida na Slovensku .....	9
Cíle práce .....	12
<b>Metodika.....</b>	<b>13</b>
Studované území.....	13
Vzorkování .....	13
Metodika laboratorní práce .....	14
Izolace DNA.....	14
Amplifikace mikrosatelitových lokusů .....	14
Zpracování a analýza dat .....	16
Ověření druhového určení vzorků.....	17
Identifikace jedinců .....	17
Genealogická struktura a příbuzenské vztahy.....	17
Prostorová aktivita a demografie .....	17
Populační hustota .....	17
Velikost populace.....	18
Extrapolace .....	18
CMR modely bez prostorových dat .....	18
Prostorově explicitní CMR model .....	19
Simulace dat.....	19
Analýza životaschopnosti populace .....	20
Efektivní velikost populace.....	21
Prostorová distribuce, vizualizace výsledků analýz v mapě .....	21
<b>Výsledky.....</b>	<b>22</b>
Vzorkování a genotypizace vzorků .....	22
Ověření druhového určení vzorků.....	25
Populačně-genetické analýzy .....	26
Analýza identit .....	27
Genealogická struktura a příbuznost.....	30
Prostorová aktivita a demografie:.....	31
Populační hustota .....	34
Velikost populace.....	34
Metoda extrapolace.....	34
Metoda CMR.....	35

Simulace dat .....	39
Analýza životaschopnosti populace .....	42
Efektivní velikost populace .....	43
<b>Diskuze.....</b>	<b>44</b>
Genotypizace a vzorkování.....	44
Genealogická struktura a příbuznost .....	45
Prostorová aktivita a demografie .....	45
Populační hustota a velikost populace .....	46
Vybrané oblasti v rámci slovenské populace.....	48
Simulace dat .....	49
Analýza životaschopnosti populace .....	50
Efektivní velikost populace .....	50
<b>Seznam literatury .....</b>	<b>51</b>
<b>Přílohy.....</b>	<b>62</b>

# Abstrakt

i) Z celkem 187 neinvazivních genetických vzorků získaných v letech 2017–2019 bylo za pomoci 15 mikrosatelitových lokusů získáno 59 genotypů. Na základě analýzy hlavních koordinát byly z datasetu vyřazeny dva vzorky, které náležely rodu *Felis*. Za účelem zvětšení datasetu bylo k 57 genotypům získaných v rámci projektu *Velké šelmy II* přidáno 98 genotypů z projektu *Šelmy SKCZ*. Z kompletního datasetu 155 genotypů bylo na základě analýzy identit s maximální možnou neshodou ve dvou mikrosatelitových lokusech získáno 68 unikátních jedinců rýsa ostrovida.

ii) Odhad cenzi velikosti populace rýsa ostrovida na Slovensku byl za pomoci modelů vycházejících z metod zpětného odchyty (Capture Mark Recapture, CMR) a R balíčku CAPWIRE stanoven na 148 (konfidenční interval CI: 139–200) jedinců. U rýsa ostrovida mohl být přístup CMR ovlivněn malým počtem vzorků, který byl řádově menší než v případě studií zaměřených na vlka a medvěda a lze ho spíše vztáhnout jen na část území, ze které pocházely získané vzorky (západní a jižní část středního Slovenska). Dalším cílem bylo proto otestovat správnost získaných odhadů pomocí simulačních procedur. Simulace však ukázaly, že s narůstajícím počtem vzorků dochází pouze k zpřesnění výsledných odhadů velikosti populace a ne k výrazným změnám.

V důsledku toho byl využit alternativní přístup k určení cenzi velikosti populace za pomoci extrapolace populační hustoty získané z nejlépe ovzorkovaných oblastí (CHKO Kysuce) na celý areál rozšíření rýsa na Slovensku. Výsledná velikost populace byla tímto přístupem stanovena na 263 ( $\pm$  24) jedinců. Pro toto stanovení byl použit prostorově explicitní model, který bere v potaz i výskytové údaje jedinců. Takový přístup však vyžaduje modelování areálu, což je velmi komplikovaný proces s mnoha stupni volnosti.

iii) Efektivní velikost populace byla stanovena na 42 (32–59) jedinců, což reflektuje výrazný pokles početnosti, kterým populace v minulosti prošla. Predikční modely a analýzy životaschopnosti populace ukázaly, že minimální i maximální hodnoty možné mortality druhu vedou k extrémním scénářům extinkce nebo nárůstu velikosti populace. Jakožto vrcholový predátor se ale rys ostrovid nemůže přemnožit a při naplnění nosné kapacity prostředí lze předpokládat disperzi jedinců do okolních vhodných habitatů.

iv) Slovenská populace rýsa ostrovida dle získaných dat v této studii ukazuje nízkou míru disperze a možnost vzniku izolovaných rodinných skupin s vysokou mírou příbuznosti, což může mít výrazný vliv na další vývoj genetické diverzity populace.

## Úvod

### Neinvazivní genetika a její využití v genetickém monitoringu zvířat a odhadech velikosti populace

Velké šelmy jsou klíčovými druhy střeoevropských ekosystémů. Komplexní obraz o jejich ekologii, etologii a populačních trendech je nepostradatelný pro rozhodování o managementu jejich populací.

## Genetický monitoring populací za pomoci neinvazivní genetiky

Genetický monitoring je důležitým nástrojem v ochraně biodiverzity a udržitelného řízení populací druhů ohrožených vyhynutím, mezi které se řadí i rys ostrovid (*Lynx lynx*). V posledních desetiletích se významně rozvinuly techniky neinvazivní genetiky, které umožňují získávat genetické informace z materiálu, který velké šelmy zanechávají ve svém přirozeném prostředí, jakým je například trus, moč a srst. Z takových vzorků lze získat DNA daného jedince (Taberlet et al., 1996, 1999). Získaný vzorek poté může být použit k individuální identifikaci jedinců. K analýze DNA můžeme použít takzvané mitochondriální markery, tj. vybrané úseky mitochondriální DNA (mtDNA). mtDNA se dědí pouze po mateřské linii a u zkoumaných úseků rozeznáváme jednotlivé sekvence (haplotypy), z nichž některé mohou být v populaci unikátní, jiné mohou být populacemi sdílené (Ratkiewicz et al., 2012). Další možností je použití jaderných markerů. V případě předkládané studie byly využity mikrosatelity (krátké tandemové repetice v jaderném genomu, STR), kde jedinec dědí jednu kopii od matky a druhou od otce. Takové markery mohou poskytnout informace nejen o genetické diverzitě populace, ale umožňují nám také určit pohlaví a příbuzenské vztahy (Hellborg et al., 2002).

Tyto informace jsou klíčové pro pochopení populací a ekologie velkých šelem a také umožňují sledovat genetické zdraví populací. Detekce problémů, jakými jsou například nedostatek genetické rozmanitosti nebo nárůst příbuzenského křížení (inbreedingu), může vést k přijetí opatření pro záchranu ohrožených populací. Pokud jsou populace šelem geneticky rozmanité, mají lepší šanci přizpůsobit se změnám v prostředí a odolávat patogenům. Nízká genetická diverzita a vysoká hodnota inbreedingu může vést až k extinkci druhu/populace (Gilpin and Soulé, 1986).

## Odhad velikosti populace s využitím dat z genetického monitoringu

Rozvoj populační genetiky a genetického monitoringu umožnil využití vzorků DNA nejen pro účely molekulární genetiky, ale také pro účely demografického výzkumu (Miller et al., 2005; Davoli et al., 2014; Mumma et al., 2015).

Pro odhady velikosti populace a populační hustoty rysa ostrovida jsou používány převážně metody deterministického monitoringu za pomoci fotopastí a metody capture-mark-recapture (CMR), v poslední dekádě však přednostně prostorové modely vícenásobného zaznamenávání, spatial capture-recapture (SCR) (Duřa et al., 2021; Palermo et al., 2021; Fležar et al., 2023). CMR je vědecká metoda používaná k odhadu velikosti populace zvířat a sledování populační dynamiky zkoumaného druhu, která se zakládá na opakovaném zachycení a značkování jedinců v populaci. Tradičně se tato metoda provádí pomocí fyzického značkování jedinců (například kroužky na ptácích). V případě rysů ostrovidů je díky unikátnímu vzorování srsti možné pro CMR použít i data z fotopastí. Díky této neinvazivní metodě vzorkování je možná přesná identifikace jedinců bez nutnosti fyzické manipulace, čímž se minimalizuje stres a zásah do autonomie zkoumaného druhu. To je obzvláště důležité u vzácných nebo ohrožených druhů s nízkou populační hustotou a skrytým způsobem života (Taberlet et al., 1999).

Tato technika umožňuje sledovat změny v populaci šelem a poskytovat důležité údaje pro jejich ochranný management, který provádí orgány ochrany přírody. Tyto odhady jsou prováděny pomocí modelů, které zohledňují pravděpodobnost, že daný jedinec bude ovzorkován, a berou tím pádem v potaz i nezachycené jedince (Miller et al., 2005; Efford, 2022). Na základě modelů, které berou v potaz různé pravděpodobnosti záchytů a další faktory je poté proveden odhad velikosti populace.

Integrace genetických dat, která jsou díky jaderným markerům přiřazeny konkrétnímu jedinci do této metody, umožňuje získat další informace o struktuře populace, migraci jedinců a o dalších genetických parametrech (Schwartz, Luikart & Waples, 2007). Genetický monitoring může poskytnout důležité informace o příbuzenských vztazích mezi jedinci, genetické variabilitě populace a dalších faktorech ovlivňujících její dynamiku. Tímto způsobem může genetický monitoring významně přispět k přesnějšímu odhadu velikosti populace a k lepšímu pochopení biologických procesů probíhajících v daném ekosystému (Luikart et al., 2010). Populační odhady jsou klíčové pro plánování ochrany a managementu velkých šelem. V delším časovém horizontu pomáhají určit, zda je populace stabilní, roste nebo klesá. Pokud jsou odhady nízké, může to naznačovat riziko pro ohrožení druhu nebo populace. Celkově lze říci, že metoda CMR s využitím neinvazivní genetiky přináší do výzkumu populací vzácných a skrytě žijících druhů zvířat, včetně velkých šelem, mnoho výhod, a to zejména ve smyslu přesnosti, šetrnosti k populaci a získání komplexních dat o dynamice populací a ekologii těchto druhů.

## Analýza životaschopnosti populace

Analýza životaschopnosti populace a efektivní velikost populace jsou nezbytnými nástroji v ochraně velkých šelem (Chapron et al., 2014). Pro efektivní ochranu druhu je nezbytné nejen chránit jednotlivce, ale také zajistit dlouhodobou životaschopnost jejich populací.

Životaschopnost populace odkazuje na schopnost populace přežít a dlouhodobě se udržovat. Tento koncept je nezbytný pro pochopení aktuálního stavu populace a pro předvídaní budoucích trendů. Demografické faktory, jako je míra přežití, reprodukční úspěšnost a věková a pohlavní struktura, jsou důležité při analýze životaschopnosti populace velkých šelem (Caniglia et al., 2014). Studie těchto faktorů umožňují odhalit rizika ohrožující populace, jako jsou ztráta přírodního prostředí, nelegální lov a nedostatečná reprodukční úspěšnost.

## Efektivní velikost populace

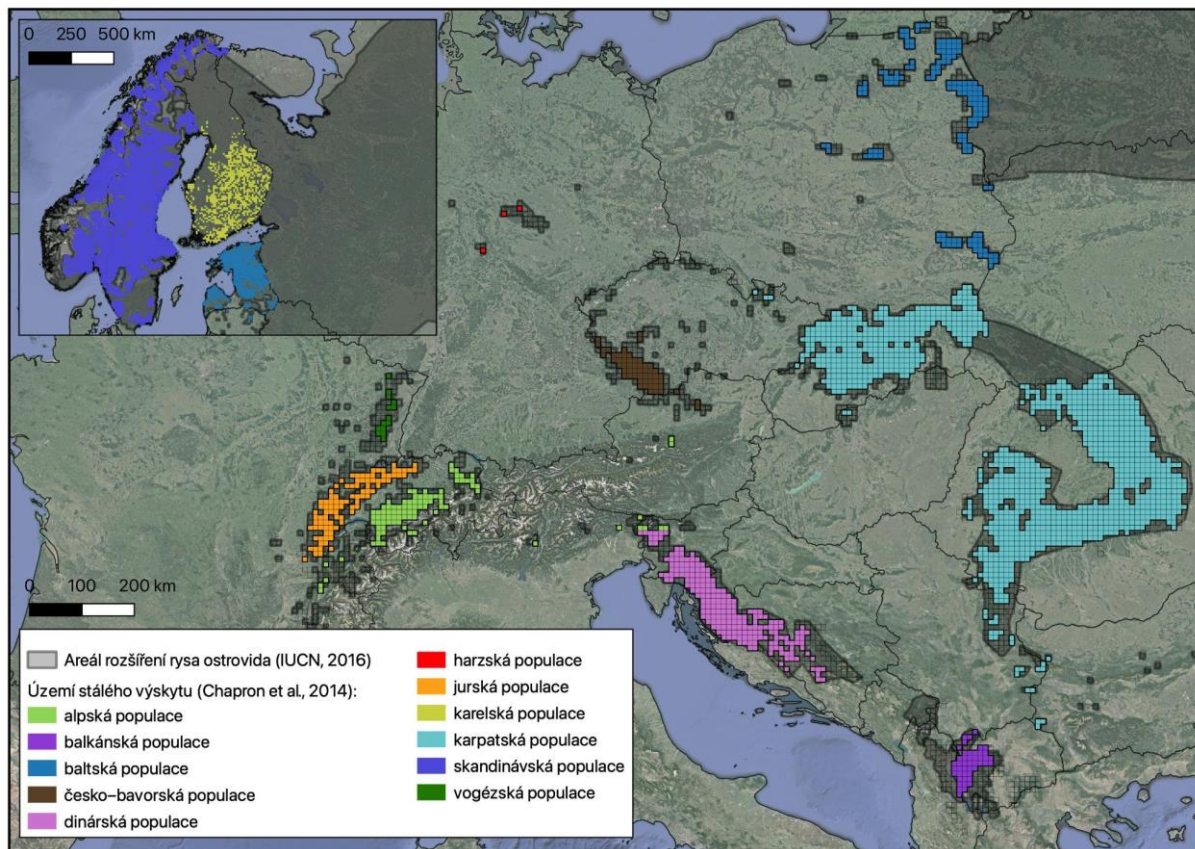
Efektivní velikost populace se zabývá genetickou diverzitou a schopností populace odolávat genetickému úpadku, který může vést k vyhynutí. Definuje velikost ideální panmiktické populace, která ztrácí genetickou diverzitu stejným tempem jako zkoumaná populace. I když je populace zdánlivě velká, její efektivní velikost může být mnohem menší kvůli nedostatečné genetické variabilitě. U velkých šelem může být nedostatek genetické diverzity způsoben izolací populace nebo genetickou depresí způsobenou malou populací (Kaczensky et al., 2013). Odhad efektivní velikosti populace je proto důležitým krokem při plánování ochrany, jelikož umožňuje identifikaci populace, která je v ohrožení genetického úpadku.

## Fylogeografie rysa ostrovida

Rys ostrovid (*Lynx lynx*) představuje vrcholového predátora s rozsáhlým geografickým rozšířením, které je hlavně v rámci Evropy výrazně fragmentované. To vytváří možnosti pro rozmanité fylogeografické analýzy. Detailní zkoumání historie a diverzity populací rysů poskytuje důležité informace o jejich genetické struktuře, migračních vzorech a historických událostech, které formovaly jejich současnou distribuci.

Fylogeografické studie rysů ostrovidů naznačují existenci rozmanitých populací s různými genetickými charakteristikami. Na základě analýz genetické variability lze identifikovat

jednotlivé populace a určit jejich vzájemné vztahy. Nedávné výzkumy ukazují, že evropská populace rysa ostrovida je rozdělena na 11 populací (Obr. 1), z nichž pět je považováno za autochtonní (původní) a šest za reintrodukované (Chapron et al., 2014). Autochtonní populace zahrnují skandinávskou, karelskou, baltskou, karpatskou a balkánskou populaci, zatímco mezi reintrodukované populace patří harzská, česko-bavorsko-rakouská, vogézská, jurská, alpská a dinárská populace (Schadt et al., 2002; Breitenmoser & Breitenmoser Würsten, 2008; Sindičić et al., 2013).

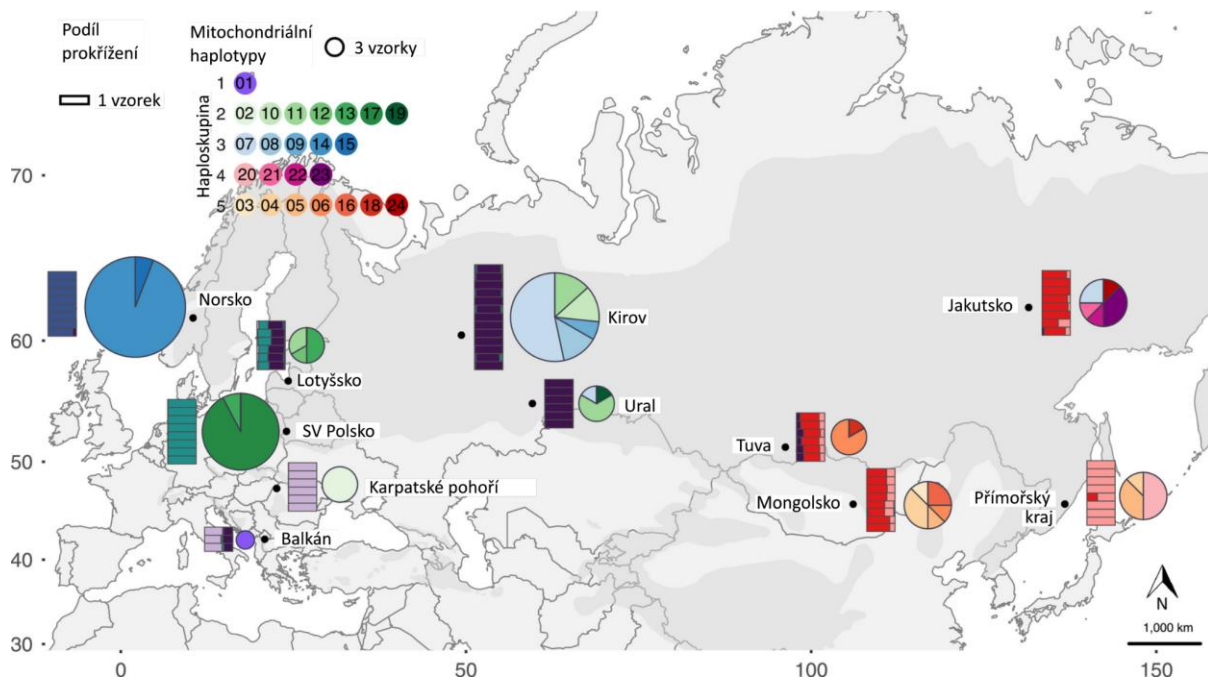


**Obr. 1:** Mapa areálu rozšíření rysa ostrovida (dle Chapron et al. 2014, IUCN, 2016, graficky modifikováno). Jednotlivé populace rysa ostrovida jsou barevně rozlišeny. Tmavě šedé oblasti vyznačují areál rozšíření na základě všech kategorií metodiky SCALP .

Environmentální faktory, například geografie, klima a dostupnost potravy, hrají klíčovou roli v formování genetické variability a rozšíření rysa ostrovida. Studium vlivu environmentálních faktorů na genetickou strukturu populace může pomoci lépe porozumět adaptaci rysů ostrovidů na různé životní podmínky a předpovědět dopady změn v prostředí na jejich populace v budoucnosti.

Analýzy genetické variability rysa ostrovida (*Lynx lynx*) v eurasijské populaci odhalují vzory diverzity a historie, které jsou důležité pro porozumění evolučního vývoje tohoto druhu (Obr. 2).





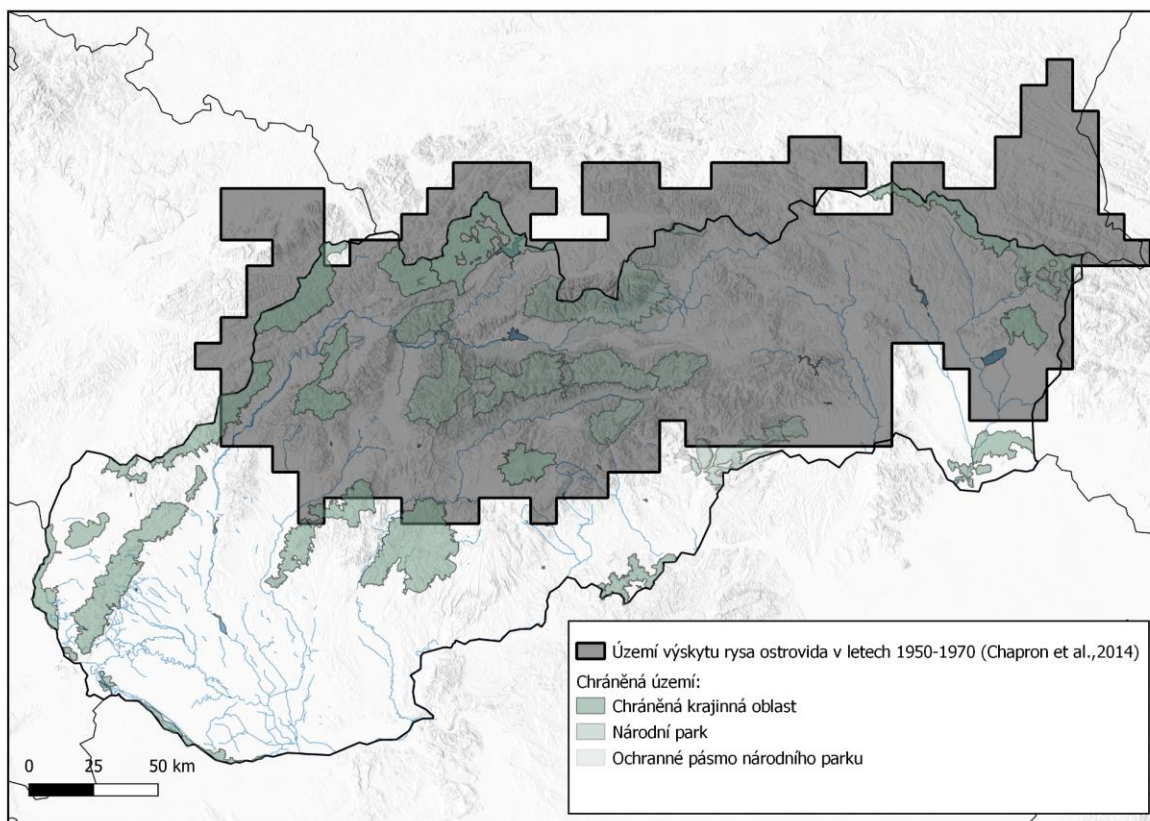
**Obr. 2:** Mitochondriální haplotypy evropských a asijských populací rysa ostrovida (Lucena-Pérez et al., 2020).

Norská (tj. skandinávská) populace spolu s karpatskou a populací v severovýchodním Polsku (tj. baltská populace) vykazují větší genetickou vzdálenost a izolovanost od zbytku populace, což může naznačovat přítomnost bottlenecku během jejich existence (Ratkiewicz et al., 2012; Lucena-Pérez et al., 2020). Studie také ukazují, že karpatská populace je od ostatních evropských populací nejvíce diferencovaná a vykazuje nejnižší diverzitu. Díky své izolovanosti od ostatních populací je karpatská populace rysa ostrovida unikátní.

Všichni jedinci z Karpat nesou exkluzivně haplotyp H4, což je haplotyp sdílený pouze s reintrodukovanými populacemi a s baltskou populací, kde se vyskytuje jistá míra haplotypové diverzity (Hellborg et al., 2002; Gugolz et al., 2008; Ratkiewicz et al., 2012; Lucena-Pérez et al., 2020). Význam Karpat v historii populace rysa ostrovida je nezpochybnitelný. Toto pohoří bylo klíčovým útočištěm pro velké šelmy a další druhy v minulosti, kdy sloužilo jako glaciální refugium mnoha živočišných druhů (Sommer a Nadachowski, 2006; Lucena-Pérez et al., 2020).

## Historie výskytu rysa ostrovida na Slovensku

Populace rysa ostrovida se na území střední Evropy vyskytovala již v pozdním Pleistocénu (Sommer & Benecke 2006; Lucena-Pérez et al. 2020). Rozšíření rysa ostrovida bylo souvisle vázáno na habitat lesů (Breitenmoser et al. 2000). Údaje o výskytu a početnosti rysa ostrovida na území Slovenska nejsou až do druhé poloviny 19. století spolehlivě popsány. Odhady početnosti byly v druhé polovině 19. století a v průběhu 20. století stanoveny pouze na základě mysliveckých statistik. V průměru bylo na přelomu 19. a 20. století uloveno 21 rysů ročně (Jamnický 1997). Předpokládá se, že nejnižší početnosti dosáhl rys ostrovid na území Slovenska v 30. letech 20. století. Jeho početnost byla odhadována na pouhých 50 jedinců, vyskytujících se pouze v oblastech středního Slovenska a východních Karpat (Jamnický 1997). V průběhu 20. století velikost populace rysa ostrovida kolísala, vzhledem ke změnám v zákonné ochraně a možnostem lovu. Areál rozšíření slovenské populace byl ale již srovnatelný se současností (Obr. 3).



**Obr. 3:** Rozšíření rysa ostrovida na území Slovenské republiky v letech 1950–1970 (Chapron et al., 2014; IUCN, 2016, graficky modifikováno).

Od druhé poloviny 20. století po začátek 21. století bylo na území Slovenska uloveno 3182 jedinců (Jamnický, 1997; Antal et al., 2017). Na konci 20. století byla jeho početnost na základě mysliveckých statistik odhadována na 871 jedinců (Národné lesnícke centrum, 2006). V roce 1999 byl rys ostrovid na území Slovenska prohlášen za celoročně chráněný druh. V roce 2006 byla jeho početnost na základě mysliveckých statistik odhadována již na 1 172 jedinců, ačkoliv odhady byly pravděpodobně nadhodnocené (Národné lesnícke centrum, 2006). Oproti tomu, početnost rysa ostrovida stanovená na základě monitoringu a biologických implikací byla v této době odhadovaná na přibližně 200–400 jedinců (Salvatori *et al.*, 2002; Gregorová, 2004; von Arx *et al.*, 2004). Nejnovější odhady současné početnosti rysa ostrovida na základě fotomonitoringu a terénního monitoringu, 193–337 jedinců (Duľa et al., 2021), se pohybují ve stejném rozmezí jako odhady z počátku 21. století. Skutečná velikost současné populace je ale pravděpodobně na spodní hranici rozmezí (Kaczensky *et al.*, 2013; Chapron *et al.*, 2014; Kubala *et al.*, 2017). Oproti tomu počet jedinců na základě údajů poskytnutých mysliveckými spolky byl v roce 2019 odhadován na 1668 jedinců (Národné lesnícke centrum, 2019). Odhady na základě sčítání mysliveckých spolků jsou ale vzhledem k velikosti domovských okrsků v řádech stovek km<sup>2</sup>, zasahujících do více honiteb, pravděpodobně výrazně nadhodnoceny (Kubala et al., 2017).

Populační hustota rysa ostrovida odhadovaná na území Slovenska počátkem 21. století byla vyšší (2,8 jedinců/100 km<sup>2</sup>) než je současná odhadovaná populační hustota (0,7 jedinců/100 km<sup>2</sup>) (Gregorová, 2004; Kubala et al., 2017). Ačkoliv jsou odhady velikosti populace za posledních 20 let přibližně stejné, areál výskytu se téměř zdvojnásobil (Gregorová, 2004; Kaczensky et al., 2013). Nejnovější studie poukazuje na fluktuaci populační hustoty napříč sezónami, kdy se pohybuje v rozmezí 0,26–1,85 jedinců na 100 km<sup>2</sup> (Duľa et al., 2021).

Předkládaná studie se vůbec jako první zaměřuje na genetický monitoring slovenské populace rýsa ostrovida jako celku, což přináší komplexní pohled na stav rýsí populace a nové poznatky pro výzkum a ochranu tohoto druhu.

## Cíle práce

i) Prvním cílem studie bylo získání genetického datasetu z neinvazivních vzorků rysa ostrovida získaných na Slovensku během dvou zimních sezón v letech 2017–2019 a na tomto základě provedení analýz identit pod statistickou kontrolou s přihlédnutím k možnému výskytu statistické chyby prvního a druhého typu.

ii) Dalším cílem byl odhad cenzi velikosti populace rysa ostrovida na Slovensku, za pomoci modelů vycházejících z metod zpětného odchyty (Capture Mark Recapture, CMR). Dalším cílem bylo testovat správnost získaných odhadů pomocí simulačních procedur. Alternativním přístupem k určení cenzi velikosti populace byla extrapolace populační hustoty získané z nejlépe ovzorkovaných oblastí na celý areál rysa na Slovensku. Pro toto stanovení byl použit prostorově explicitní model. Co se týče správnosti výsledku, odhad pomocí metodiky CMR představuje spodní hranici odhadu (odpovídající konceptu realizované niky), odhad pomocí extrapolace populační hustoty představuje horní hranici odhadu (vycházející z konceptu fundamentální niky). Stanovení změn velikosti populace nebylo možné, k takovému srovnání chybí data z minulosti získaná analogickou metodikou.

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

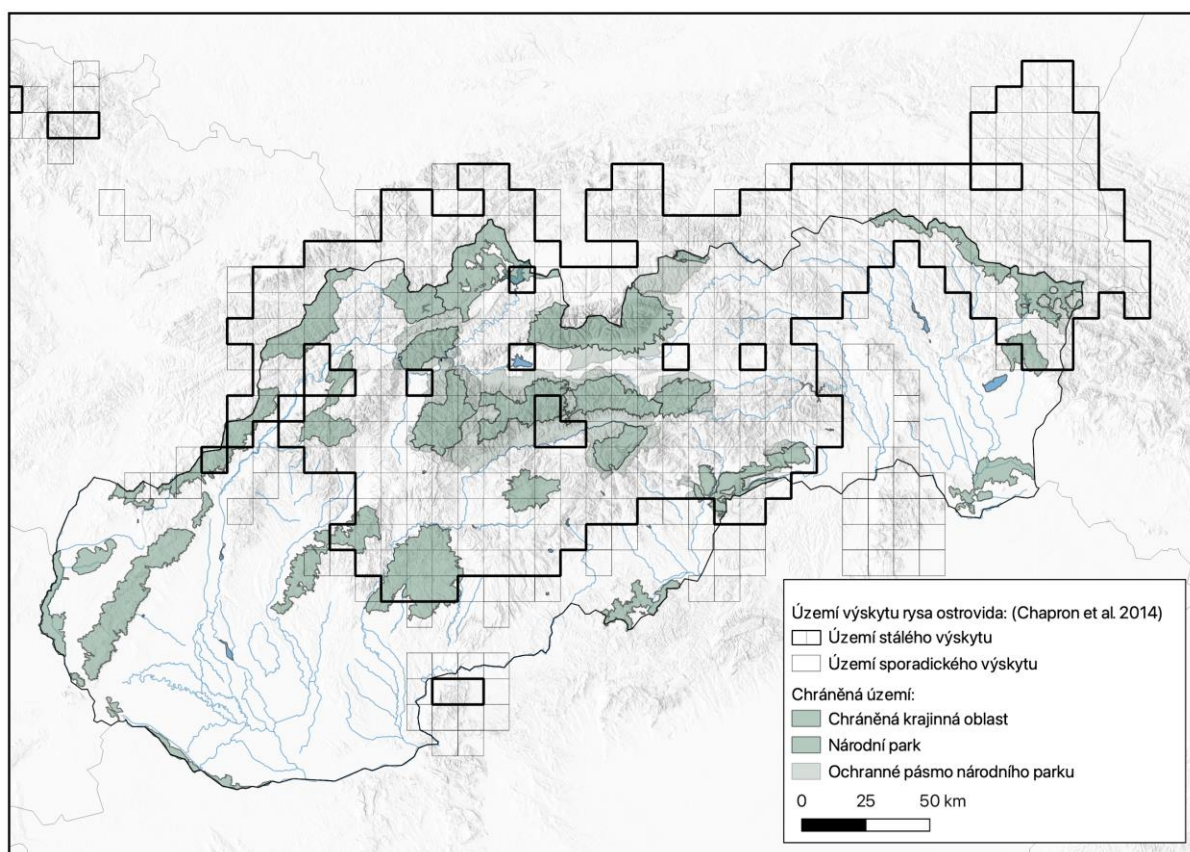
iv) Součástí studie jsou i základní popisné parametry populace, jako jsou informace o pohlavní a genealogické struktuře populace.

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

# Metodika

## Studované území

Sběr vzorků byl prováděn na území Slovenské republiky v oblastech se stálým výskytem rysa ostrovida (Obr. 4). Jednotlivé oblasti byly rozděleny do celků tvořených chráněnými krajinnými oblastmi, národními parky a jim přilehlými oblastmi. Konkrétně se jednalo o následující chráněná území a jejich přilehlé oblasti: CHKO Biele Karpaty, CHKO Horná Orava, CHKO Kysuce, CHKO Ponitrie, CHKO Strážovské vrchy, CHKO Východné Karpaty, NP Malá Fatra, NP Muránska planina, NP Nízke Tatry, NP Poloniny, NP Slovenský kras, NP Slovenský raj, NP Veľká Fatra, RSOPK Prešov, Tatranský NP.



**Obr. 4:** Mapa území spadajících pod oblast zájmu projektů *Velké šelmy 2* a *Šelmy SKCZ*. Vzorkování probíhalo ve vybraných národních parcích a chráněných krajinných oblastech Slovenska.

## Vzorkování

Pro studium populační struktury rysa ostrovida byly použity neinvazivní vzorky trusu, srsti a moči. Tyto neinvazivní vzorky byly doplněny o vzorky tkání, které byly získány z nalezených uhynulých zvířat, jeden vzorek bukálního stěru a vzorky srsti odebrané z jedinců odchycených pro účely telemetrického sledování (viz Příloha 1). Vzorky určené k izolaci DNA a dalšímu zpracování u realizátora zakázky PŘF UK v rámci projektu *Velké šelmy 2* byly sesbírány v rámci tohoto projektu. Vzorkování probíhalo dva tzv. rysí roky (sezóny), které jsou definovány jako časový úsek od 1.5. do 30.4. následujícího roku a charakterizují demografii druhu lépe než kalendářní roky. Sběr vzorků byl proveden v sezónách 2017/2018 (1.5.2017–30.4.2018) a 2018/2019 (1.5.2018–30.4.2019). Jejich laboratorní zpracování je popsáno níže.

# Metodika laboratorní práce

## Izolace DNA

DNA ze vzorků trusu byla izolována podle standardního protokolu komerčně dostupnými kity *QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen)* a *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)*. Z každého vzorku trusu byla odebrána část a ponechána několik minut na filtračním papíru z důvodu evaporace ethanolu ze vzorku. Větší nežádoucí partikule, jako například kousky listů, kosti či srst, které by mohly mít nežádoucí vliv na izolaci, byly odstraněny. Potřebná část trusu pro izolaci byla odebrána z vnější části vzorku (Eggert et al., 2005; Skrbínšek et al., 2010).

U vzorků moči předcházelo samotné izolaci vysrážení DNA a buněčných partikul z přibližně 15 ml směsi moči a sněhu přidáním 1,5 ml acetátu sodného (3M, pH 5,2) a 33 ml ethanolu (96–100%). Po inkubaci přes noc při -20°C byla DNA z roztoku peletována pomocí centrifugace (5500 ref, 60 min, 4°C) (Hausknecht et al., 2007, modifikováno). Izolace byla poté provedena kitem *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen)* podle protokolu.

DNA ze vzorků tkáně, srsti a vzorek bukálního stěru byly izolovány podle standardního protokolu komerčně dostupnými kity *DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen)* a *Genomic DNA Mini Kit Tissue (Geneaid)*. U vzorků srsti byly využity pouze vzorky obsahující chlupové folikuly.

## Amplifikace mikrosatelitových lokusů

Pro identifikaci jedinců a analýzu populační struktury byl zvolen panel 15 mikrosatelitových lokusů viz. Tab. 1 (Krojerová-Prokešová et al., 2019).

K určení pohlaví jedinců byl zvolen úsek genu pro amelogenin. Kopie genu na chromozomu Y má u kočkovitých šelem 20bp (páru bazí) delecí v porovnání s kopií genu ležícího na chromozomu X (Pilgrim et al., 2005). PCR produkt u samic byl dlouhý přibližně 214bp. V případě samečů byly PCR produkty dva. Jeden o délce 194bp a druhý o délce 214bp (Pilgrim et al., 2005). Sekvence jednotlivých primerů jsou uvedeny v Tab 1.

**Tab. 1:** Panel 15 mikrosatelitových lokusů spolu s genem pro amelogenin a sekvence primerů (Krojerová-Prokešová et al., 2019).

Lokus	Forward primer	Reverse primer	Zdroj
FCA001	TGCTTGTCTCTCCCTCG	TGACTGCGCCATAGCTTTC	Menotti-Raymond et al., 1999
FCA008	ACTGTAAATTTCTGAGCTGGCC	TGACAGACTGTTCTGGGTATGG	
FCA031	GCCAGGGACCTTTAGTTAGATT	GCCCTTGGAATATTAACCA	
FCA035	CTTGCTCTGAAAAATGTAATG	AAACGTAGGTGGGGTTAGTGG	
FCA077	GGCACCTATAACTACCAGTGTGA	ATCTCTGGGGAAATAAATTTGG	
FCA096	CACGCCAAACTCTATGCTGA	CAATGTGCCGTCCAAGAAC	
FCA149	CCTATCAAAGTTCTACCAAATCA	GTCTACCATGTGTGGGATG	
FCA208	TCAGGGTTCAAAAAAGAAAAA	CAAAGCACCAGCTTAGAAGTCA	
FCA232	ATGACCATCTCAAATTCATGG	AGCTGAGTTGCGTTTATCATG	

FCA476	GACCTTGAAGGAAAGGAGG	CCCTTTCTCCATGTTGTTACT	
FCA506	AATGACACCAAGCTGTTGTCC	AGAATGTTCTCTCCGCGTGT	
F53	GTTGGGAGTAGAGATCACCT	GAAAAAGACTCCTGCTTGCA	
F115	CTCACACAAGTAACTCTTTG	CCTCCAGATTAAGATGAGA	
LC106	TCTCCACAATAAGGTTAGC	GGGATCTTAAATGTTCTCA	Carmichael et al., 2000
LC110	CCTTTGTCACCTACCA	CGGGGATCTTCTGCTC	
amelogenin	CGAGGTAATTTTCTGTTTACT	GAAACTGAGTCAGAGAGGC	Pilgrim et al., 2005

Pro účely detekce délky alel jednotlivých mikrosatelitových lokusů pomocí kapilární elektroforézy byl jeden z každé dvojice primerů označen jednou ze čtyř fluorescenčních barev ze sady ABI DS-33. Pro cíle této práce byly vybrány lokusy, včetně amelogeninu, rozděleny do dvou multiplexů po osmi lokusech. Rozdělení do multiplexů, barevné označení a rozsah délek alel pro každý lokus jsou uvedeny v Tab. 2.

**Tab. 2:** Sestavení jednotlivých multiplexů, délky alel v ovzorkované populaci a barevné označení primerů.

MULTIPLEX A				MULTIPLEX B			
Lokus	Délka alel (bp)	Barevné označení	Zdroj	Lokus	Délka alel (bp)	Barevné označení	Zdroj
LC106	93–107	PET	(Carmichael et al., 2000)	LC110	95–107	PET	(Carmichael et al., 2000)
FCA035	130–144	NED	(Menotti-Raymond et al., 1999)	FCA232	111–115	NED	(Menotti-Raymond et al., 1999)
FCA149	123–137	VIC	(Menotti-Raymond et al., 1999)	F53	159–175	VIC	(Menotti-Raymond et al., 1999)
FCA008	125–135	6-FAM	(Menotti-Raymond et al., 1999)	FCA077	129–135	6-FAM	(Menotti-Raymond et al., 1999)
FCA506	188–202	PET	(Menotti-Raymond et al., 1999)	FCA476	195–201	PET	(Menotti-Raymond et al., 1999)
FCA031	223–231	NED	(Menotti-Raymond et al., 1999)	FCA096	207–217	NED	(Menotti-Raymond et al., 1999)
FCA001	176–186	VIC	(Menotti-Raymond et al., 1999)	FCA208	299–307	6-FAM	(Menotti-Raymond et al., 1999)
F115	217–245	6-FAM	(Menotti-Raymond et al., 1999)	amelogenin	193–213	VIC	(Pilgrim et al., 2005)

K amplifikaci lokusů pomocí PCR byl použit komerční kit *Multiplex PCR kit (Qiagen)*. Reakční směs se skládala z 5 µl *Multiplex PCR kitu*, obsahujícího HotStarTaq DNA polymerázu a PCR pufr, 3 µl ddH<sub>2</sub>O, 1 µl multiplex primer mixu (Tab. 3) a 1 µl DNA templátu nezávisle na koncentraci DNA v izolátu.

**Tab. 3:** Koncentrace jednotlivých primerů pro mikrosatelitové lokusy v primermixu.

<b>MULTIPLEX A</b>	<b>MULTIPLEX B</b>
------------------------	------------------------

<b>Lokus</b>	<b>Koncentrace</b>	<b>Lokus</b>	<b>Koncentrace</b>
<b>LC106</b>	5 $\mu$ M	<b>LC110</b>	5 $\mu$ M
<b>FCA035</b>	2,5 $\mu$ M	<b>FCA232</b>	1 $\mu$ M
<b>FCA149</b>	1 $\mu$ M	<b>F53</b>	2,5 $\mu$ M
<b>FCA008</b>	1 $\mu$ M	<b>FCA077</b>	1 $\mu$ M
<b>FCA506</b>	5 $\mu$ M	<b>FCA476</b>	5 $\mu$ M
<b>FCA031</b>	2,5 $\mu$ M	<b>FCA096</b>	2,5 $\mu$ M
<b>FCA001</b>	1 $\mu$ M	<b>FCA208</b>	5 $\mu$ M
<b>F115</b>	1 $\mu$ M	<b>amelogenin</b>	1 $\mu$ M

Pro spolehlivé stanovení genotypů z amplifikovaných lokusů byl použit “multiple-tube approach”, který je optimální pro analýzy DNA izolátů s nízkou koncentrací DNA a předpokladem nekvalitní, fragmentované DNA (Navidi et al., 1992; Taberlet, 1996). Každý vzorek byl pro panel mikrosatelitových lokusů amplifikován 3–6x v nezávislých opakováních. Zpracování všech vzorků předcházelo proces optimalizace PCR podmínek pro námi vytvořené multiplexy. Na základě optimalizace byla stanovena annealingová teplota pro Multiplex A 51,5 °C a pro Multiplex B 54,0 °C. Reakce proběhla v celkem 40 cyklech a finální extenze byla prodloužena na 30 minut oproti standardnímu protokolu.

PCR produkt byl poté zředěn formamidem a fluorescenčně značeným velikostním standardem GeneScan™ 500 LIZ™ a zaslán na fragmentační analýzu. Finální roztok se skládal z 9,3  $\mu$ l formamidu, 0,2  $\mu$ l velikostního standardu a 0,5  $\mu$ l PCR produktu

## Zpracování a analýza dat

Vizualizace výsledků fragmentační analýzy a odečet délky jednotlivých mikrosatelitových lokusů byl prováděn pomocí softwaru GENEIOUS PRIME 2020.1.1 (<https://www.geneious.com>). Binning byl proveden automaticky v softwaru GENEIOUS PRIME. Konsenzuální genotyp pro jednotlivé lokusy byl sestaven z minimálně třech nezávislých genotypování. Jednotlivé výsledky genotypování pro konkrétní vzorek a lokus byly odečteny nezávisle a poté porovnány, aby nedošlo k chybnému odečtení. Konsenzuální genotyp byl sestaven podle následujících pravidel: jedinec byl v daném lokusu označen za heterozygota, pokud se každá z alel vyskytla v elektroforetogramech alespoň dvakrát. Jako homozygot pro danou alelu byl označen jedinec, u kterého se homozygotní kombinace alel vyskytla v elektroforetogramech alespoň třikrát. Pokud toto pravidlo nebylo splněno, genotypování vzorků bylo zopakováno pro dosažení věrohodných výsledků (Navidi et al., 1992; Taberlet et al., 1996; Benschop et al., 2013). Jako úspěšný genotyp byl považován takový genotyp, kde se podařilo replikovat z panelu 15 mikrosatelitových lokusů alespoň 13 lokusů. Vzorky, které nespĺnily toto kritérium byly označeny jako neúspěšné a byly vyřazeny z dalších analýz.

Při spojování datasetů z projektů *Velké šelmy 2* a *Šelmy SKCZ* byla provedena kalibrace odečtů elektroforetogramů za pomoci vzorků, které byly nezávisle zpracovány v obou laboratořích. Výsledné odečty délek mikrosatelitových alel byly přepočteny na stejnou hodnotu tak, aby byl vytvořen společný dataset.



## Ověření druhového určení vzorků

Z důvodu možné nesprávné druhové determinace při sběru vzorků v terénu a záměny trusu rysa ostrovida za trus kočky divoké (*Felis silvestris silvestris*), případně kočky domácí (*Felis silvestris catus*), byla pomocí plug-inu GENEALEX 6.5 (Peakall & Smouse, 2006, 2012) pro Microsoft Excel provedena analýza hlavních koordinát (PCoA) na základě genetických vzdáleností. Pro přiřazení vzorků ke konkrétnímu druhu byly jako referenční vzorky použity ověřené vzorky tkáně a srsti kočky divoké a domácí, které byly získány v rámci stejného projektu. Chybně determinované vzorky byly vyřazeny z dalších analýz.

## Identifikace jedinců

Jednotlivé konsenzuální genotypy byly mezi sebou porovnány pomocí softwaru CERVUS (Kalinowski et al., 2007). Genotypy označené jako potenciálně identické měly minimálně 10 shodných lokusů a maximálně 5 neshod. Po provedení této explorační analýzy byly jednotlivé genotypy, které splnily tyto parametry porovnány a neshody zkontrolovány v konkrétních elektroforetogramech. Na základě ověření shody na úrovni primárních dat byly poté genotypy označeny za identické. Genotypy označené jako identické měly maximálně dva neshodné lokusy a v neshodách musely sdílet jednu z alel. Neshody tedy byly na úrovni rozdílu heterozygot/homozygot pro konkrétní lokus. Data o opakovaných záchytech konkrétních jedinců, tj. identické genotypy s odlišným místem a datem nálezů, byly použity pro analýzy demografie a prostorové ekologie. Dataset pro populačně–genetické analýzy byl tvořen pouze jedním konsenzuálním genotypem pro konkrétního jedince.

## Genealogická struktura a příbuzenské vztahy

Za účelem rozřešení vztahů mezi jedinci byla provedena analýza příbuznosti za pomocí softwaru ML-RELATE (Kalinowski et al., 2006). Vyhodnocení vztahu mezi dvěma jedinci je stanoveno na základě největší pravděpodobnosti jednoho ze čtyř možných vztahů: nepříbuzní jedinci, nevlastní sourozenec s jedním společným rodičem, sourozenec a vztah rodič–potomek. Signifikance každého výsledného potenciálního vztahu byla ověřena testem konkrétní hypotézy pro konkrétní dvojici. Pro každou hypotézu bylo provedeno 100 000 simulací. Pokud byla hodnota  $p < 0,05$  byl vztah považován za signifikantní.

## Prostorová aktivita a demografie

### Populační hustota

Pro odhad populační hustoty byla použita metodika dle Duľa et al., (2021) a Kubala et al., (2017). Populační hustota byla nejprve vypočtena pro hustě ovzorkovaná území Javorníků a Kysucké vrchoviny. Nejprve byla stanovena velikost prostorového bufferu kolem minimálního konvexního polygonu (MCP) ohraničujícím ovzorkované území. Byly provedeny odhady populační hustoty pro buffery o velikost od 100 m do 28 km a jako nejvhodnější byl zvolen buffer, kde výpočty populační hustoty začaly konvergovat ke stejné hodnotě. Minimální velikost bufferu byla stanovena 24 km pro ovzorkované území Javorníků a 14 km pro ovzorkované území Kysucké vrchoviny. Populační hustota byla také vypočtena pro MCP celé ovzorkované oblasti západního a středního Slovenska.

## Velikost populace

Pro odhady velikosti populace rysa na Slovensku byla použita metoda extrapolace populační hustoty a 3 metody, které pracují s principem CMR za použití různých vstupních dat a různých modelů.

### Extrapolace

První metodou byl výpočet velikosti populace na základě extrapolace populační hodnoty z modelových oblastí. Podobná metodika byla již dříve použita pro odhady velikosti populace rysa ostrovida na Slovensku za pomoci dat z fotopastí (Kubala et al., 2017; Kubala et al., 2020; Duľa et al., 2021). Velikost populace pro celé Slovensko byla vypočítána jako násobek rozlohy vhodného habitatu obývaného rysem ostrovidem (28 090 km<sup>2</sup>, Kaczensky et al., 2013) a průměru získaných odhadů populačních hustot pro Javorníky a Kysuckou vrchovinu. Velikost populace byla také vypočtena pouze pro ovzorkovanou oblast západního a středního Slovenska (13 651 km<sup>2</sup>).

### CMR modely bez prostorových dat

Jeden z nejpoužívanějších softwarů pro odhad velikosti populace u velkých šelem je CAPWIRE (v. 1.1.4, Pennell et al., 2013.). Tento softwarový balíček v programovacím prostředí R pracuje s primárními daty, které obsahují všechny záchyty každého ovzorkovaného jedince. CAPWIRE je schopný zohlednit heterogenitu v počtu opakovaných záchytů a je vhodný pro analýzy druhů s menší početností populace (Miller et al., 2005). Vzhledem k předpokladu heterogenity v získaných datech, byl dle doporučení autorů použit vhodnější model TIRM (Two Innate Rates Model) (Miller et al., 2005).

Dataset pro odhad velikosti populace se skládal ze všech úspěšně genotypovaných vzorků. Z datasetu byly odstraněny opakované záchyty ze stejného dne a místa.

Velikost populace rysa byla stanovena nejprve pro území celého Slovenska. Vzhledem k heterogenitě záchytů a zanedbatelnému množství vzorků z východního Slovenska byla početnost rysa ostrovida stanovena také pouze pro ovzorkované území západního a středního Slovenska, které bylo ohraničeno minimálním konvexním polygonem.

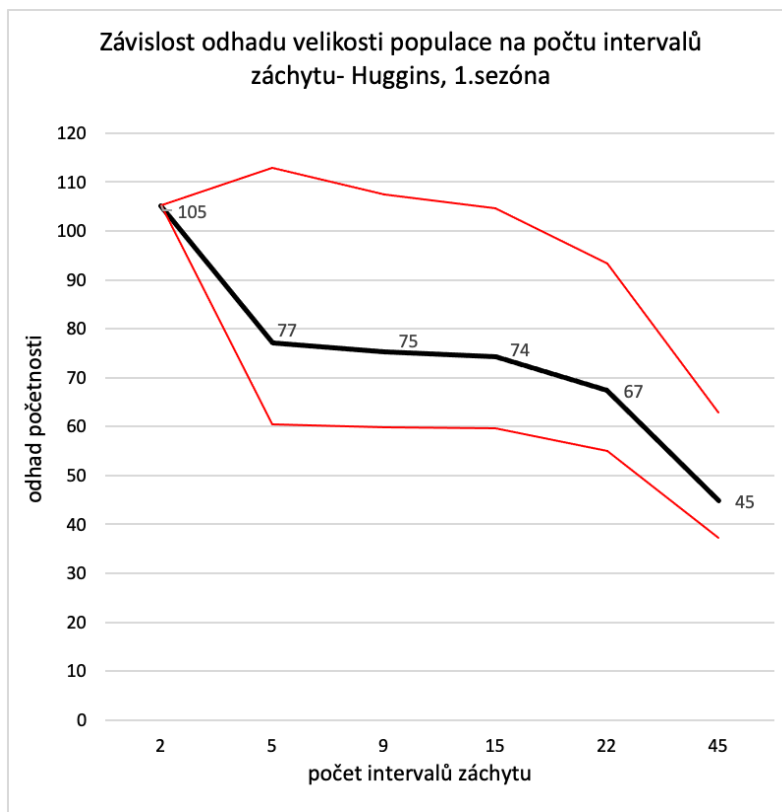
Rovněž z důvodu malého počtu jedinců a jejich opakovaných záchytů byla početnost pro jednotlivá chráněná území odhadnuta pouze pro CHKO Kysuce (která byla pro účely srovnání s dalšími publikacemi rozdělena na Javorníky a Kysuckou vrchovinu), CHKO Strážovské vrchy a NP Velká Fatra.

U všech odhadů byl pomocí 1000 bootstrapů vytvořen 95% interval spolehlivosti.

CAPWIRE je primárně stavěn pro uzavřené populace ovzorkované v krátkém časovém úseku. Proto byl pro odhady velikosti populace použit také software MARK (White and Burnham, 1999).

Pro analýzu celé populace byl zvolen Hugginsův model uzavřené populace, který bere v potaz heterogenitu vzorkování a chybné identifikace. Pravděpodobnost prvního záchytu byla rovna pravděpodobnosti opakovaného záchytu. Za účelem zjištění optimálního nastavení parametrů pro analýzu byla provedena explorační analýza vlivu nastavení počtu diskrétních intervalů záchytů na odhad velikosti populace (Obr. 5). Všechny výsledné odhady velikostí populací byly

stanoveny s 95% konfidenčním intervalem. Vzhledem k lepšímu ovzorkování byla pro finální odhady velikosti populace použita data opakovaných záchytů jedinců pouze z první sezóny. Dataset byl rozdělen do 15 diskretních intervalů záchytu. Z datasetu byly odstraněny opakované záchyty ze stejného dne a místa.



**Obr. 5:** Graf závislosti počtu diskretních intervalů záchytů na odhadované velikosti populace rysa ostrovida v programu MARK pro 1. sezónu. Černou barvou je zobrazen odhad velikosti populace, červenou barvou je označen 95% interval spolehlivosti.

## Prostorově explicitní CMR model

Jako další přístup ke stanovení početnosti rysa ostrovida na Slovensku byly zvoleny prostorově explicitní capture–recapture modely (spatial explicit capture–recapture, SECR) za použití R balíčku secr (Efford, 2022). Tyto modely berou v potaz i výskytová GPS data a jsou proto jedny z nejvhodnějších pro odhad velikosti populace při heterogenním vzorkování. Odhad početnosti byl stanoven pro vzorky středního a západního Slovenska. Vstupními daty byly souřadnice minimálního konvexního polygonu vytvořeného z ovzorkované oblasti a záchyty jedinců. Dle nejvyšší hodnoty AIC (Akaikovo informační kritérium) byl poté vybrán nejvhodnější model.

## Simulace dat

Za účelem ověření výsledků odhadů velikosti populace byly provedeny simulace záchytových dat na základě parametrů reálných záchytových dat. Za použití balíčků MASS (Venables & Ripley, 2002) a vcd (Meyer et al., 2023) byl dvakrát nezávisle otestován nejvhodnější typ distribuce reálných záchytových dat a byly definovány její parametry. Stejný přístup testování byl již použit v dalších capture-mark-recapture studiích (Adcock et al., 2022, Sauvé et al., 2022). Následně byly pomocí balíčku CAPWIRE vytvořeny datasety simulovaných záchytů s

pravděpodobností opakovaného záchytu a distribucí záchytů podle reálných dat. Pro ověření správnosti odhadu velikosti populace bylo vytvořeno celkem 12 datasetů s fixním počtem 155 záchytů a předpokládanou velikostí populace od 75 do 400 jedinců. Další analýza byla založena na stabilní velikosti populace a zvyšujícím se počtu genotypů od 50 do 900 vzorků. Tato analýza umožňuje predikovat vývoj odhadů velikosti populace s narůstajícím počtem vzorků, kde se frekvence a počet opakovaných záchytů vyvíjí podle trendu reálných dat.

## Analýza životaschopnosti populace

Pro predikci vývoje populace v čase byla provedena analýza životaschopnosti pomocí softwaru Vortex (Lacy & Pollak 2023).

Vzhledem k absenci komplexních dat o natalitě a mortalitě karpatské populace byly použity vstupní parametry natality a mortality (Tab. 4) dle Nilsson (2013). Velikost populace byla nastavena dle nejvyšší hodnoty odhadů získaných v této práci, tedy 263 ( $\pm$  24) jedinců (viz Výsledky). Jako velikost nosné kapacity prostředí byl rovněž nastavena získaná velikost populace a také až čtyřnásobek této hodnoty (nepublikovaná data). Celkem byly provedeny predikce tří scénářů. První scénář, simulující pozitivní stav populace, byl založen na nejnižších hodnotách parametrů mortality. Druhý scénář byl založen na průměrných hodnotách všech parametrů. Třetí scénář, simulující negativní stav populace, byl založen na nejvyšších hodnotách parametrů mortality. Pro každou predikci bylo provedeno 100 iterací. Výsledky analýzy jsou uvedeny s konfidenčním intervalem 95 %.

**Tab. 4:** Vstupní parametry natality a mortality pro analýzu životaschopnosti v softwaru Vortex (Lacy & Pollak 2023) r= rok

<b>Natalita a rozmnožování</b>			
Věk samice při prvním rozmnožování	2		
Věk samce při prvním rozmnožování	2		
Nejvyšší věk reprodukce	18		
Maximální počet mláďat ve vrhu	4		
Poměr pohlaví ve vrhu	50		
Očekávaná míra růstu populace	1,21		
	<b>min</b>	<b>průměr</b>	<b>max</b>
% množících se dospělých samic	53	63	73
Počet rozmnožujících se samic na množícího se samce		2,1	
<b>Mortalita</b>			
Mortalita samic ve věku 0–1r	13,2	48,9	84,6
Mortalita samic ve věku 1–2r	13,1	23,4	33,7
Mortalita samic ve věku 2+r	10	11	12
Mortalita samců ve věku 0–1r	51,2	71,8	92,4
Mortalita samců ve věku 1–2r	24	42,9	61,8
Mortalita samců ve věku 2+r	5,46	6	6,54

## Efektivní velikost populace

Pro výpočet efektivní velikost populace rýsa ostrovida byl použit software LDNE (Waples and Do, 2008), který vypočte efektivní velikost populace na základě vazebné nerovnováhy. Byl použit model náhodného křížení. Minimální frekvence alel ( $P_{crit}$ ) pro analýzu byla stanovena jako  $1/(2S) < P_{crit} < 1/S$ , kdy  $S$  je počet jedinců. Tímto způsobem je ošetřeno vyřazení alel s nízkou frekvencí na základě reálných dat (Waples et al., 2010; Gajdárová et al., 2023). Pro dataset 68 jedinců byla hodnota  $P_{crit}$  stanovena na 0,01.

## Prostorová distribuce, vizualizace výsledků analýz v mapě

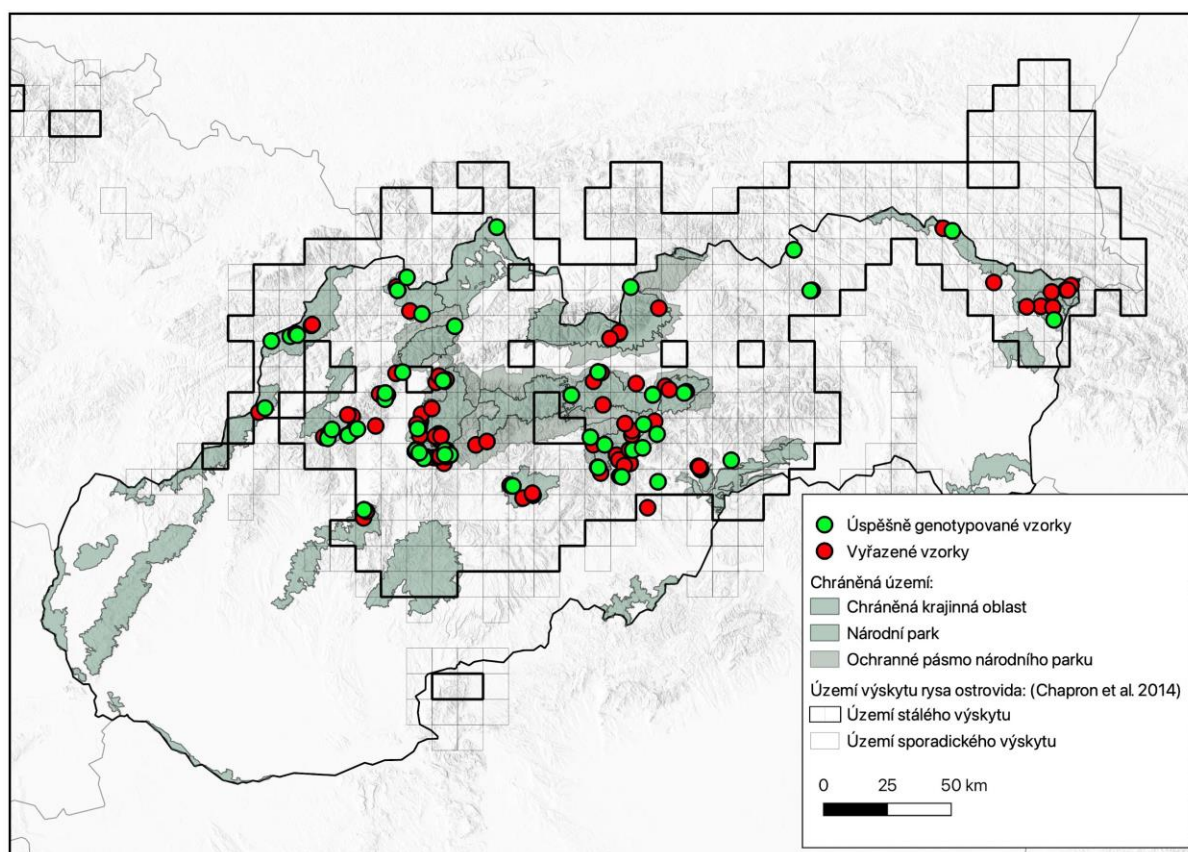
GPS souřadnice nalezených vzorků sloužily jako vstupní data pro tvorbu map v softwaru QGIS 3.18-3.26.3 (QGIS Development Team, 2021–2022). V softwaru byly také zpracovány vizualizace populačně genetických analýz, analýz identit a příbuznosti. Pro tvorbu map byly použity volně přístupné topografické vrstvy. Pro zobrazení areálu výskytu rýsa ostrovida byl použit volně přístupný shapefile z publikace Chapron et al. (2014) a Kaczensky et al. (2018).

# Výsledky

## Vzorkování a genotypizace vzorků

Za zkoumané období v letech 2017–2019 bylo v rámci projektu *Velké šelmy 2* nalezeno celkem 187 vzorků (Obr. 6). V rýsím roce 2017/2018 bylo nalezeno 98 vzorků, v rýsím roce 2018/2019 poté 77 vzorků. U 12 vzorků nebyl údaj o datu nalezení uveden. Mezi nejvíce pokryté oblasti patřil západ a střed Slovenska. U 8 vzorků chyběl údaj o GPS souřadnicích nálezů vzorku. Pro vyobrazení v mapě byly v tomto případě použity orientační souřadnice na základě popisu místa nálezů (obec, lokalita aj.)

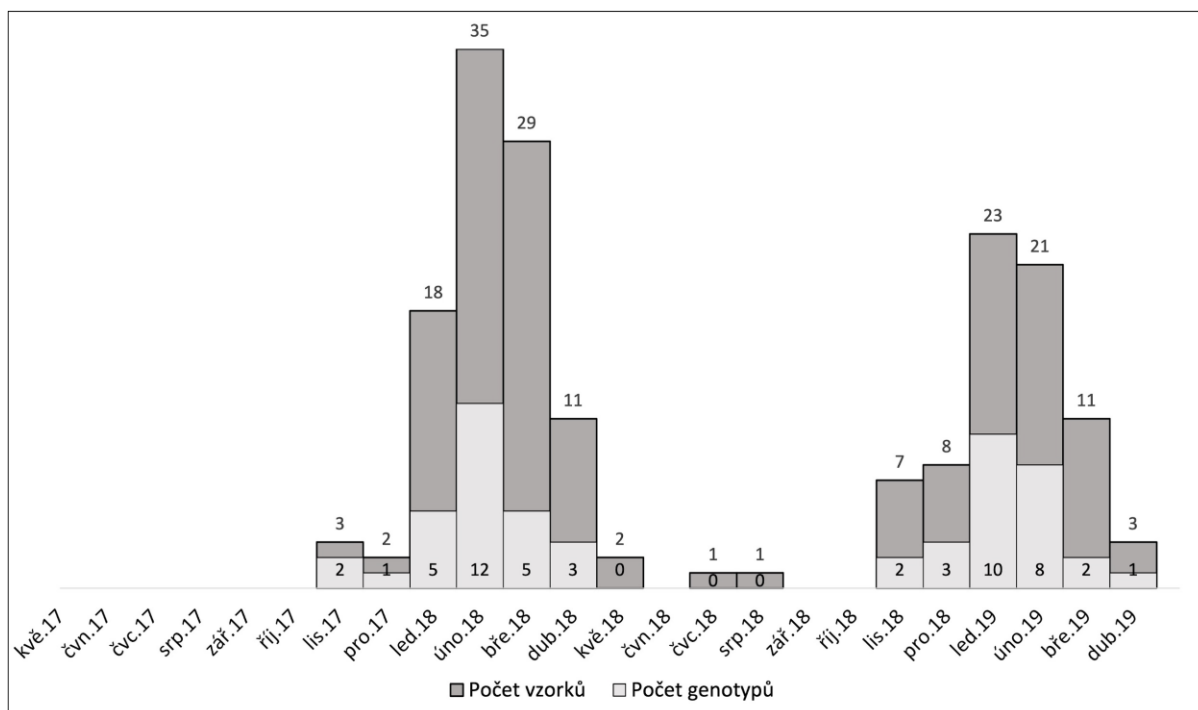
Seznam všech zpracovaných vzorků je uveden v Příloze 1.



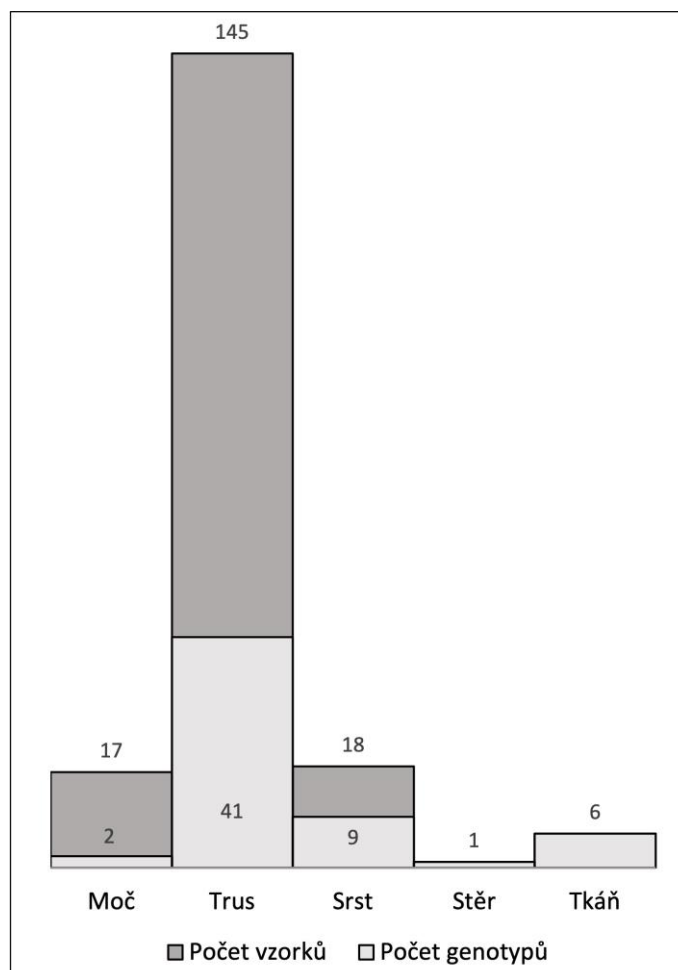
**Obr. 6.:** Mapa zájmového území s vyznačenými lokalitami nálezů jednotlivých vzorků. Zeleně jsou vyznačeny úspěšně genotypované vzorky. Červeně jsou vyznačeny vyřazené vzorky. Území ohraničené tučným okrajem polygonů znázorňuje území se stálým výskytem rysa ostrovida dle Chapron et al. (2014). Čtverce s tenkým okrajem mimo tučně ohraničenou oblast znázorňují území sporadického výskytu rysa ostrovida dle Chapron et al. (2014).

Počet nalezených vzorků a úspěšných genotypů pro jednotlivé měsíce ve dvou sezónách je popsán v Obr. 7.

Laboratorně zpracováno bylo celkem 145 vzorků trusu, 18 vzorků srsti, 17 vzorků moči, 6 tkáňových vzorků a jeden bukální stěr. Úspěšnost genotypování byla přibližně 32 % a lišila se podle typu vzorků. Úspěšně se povedlo získat genotyp u 59 vzorků (Obr. 8). Úspěšnost genotypizace pro jednotlivé typy vzorků je uvedena v Obr. 8. Nejvyšší úspěšnost, 100 %, byla u tkáňových vzorků, invazivně získaných vzorků srsti a stěru. U neinvazivně získané srsti byla úspěšnost genotypizace 36 %, u trusu přibližně 29 % a u moči pouze 12 %. Úspěšnost všech neinvazivně získaných vzorků, tj. vzorků trusu, srsti a moči byla přibližně 27 %.



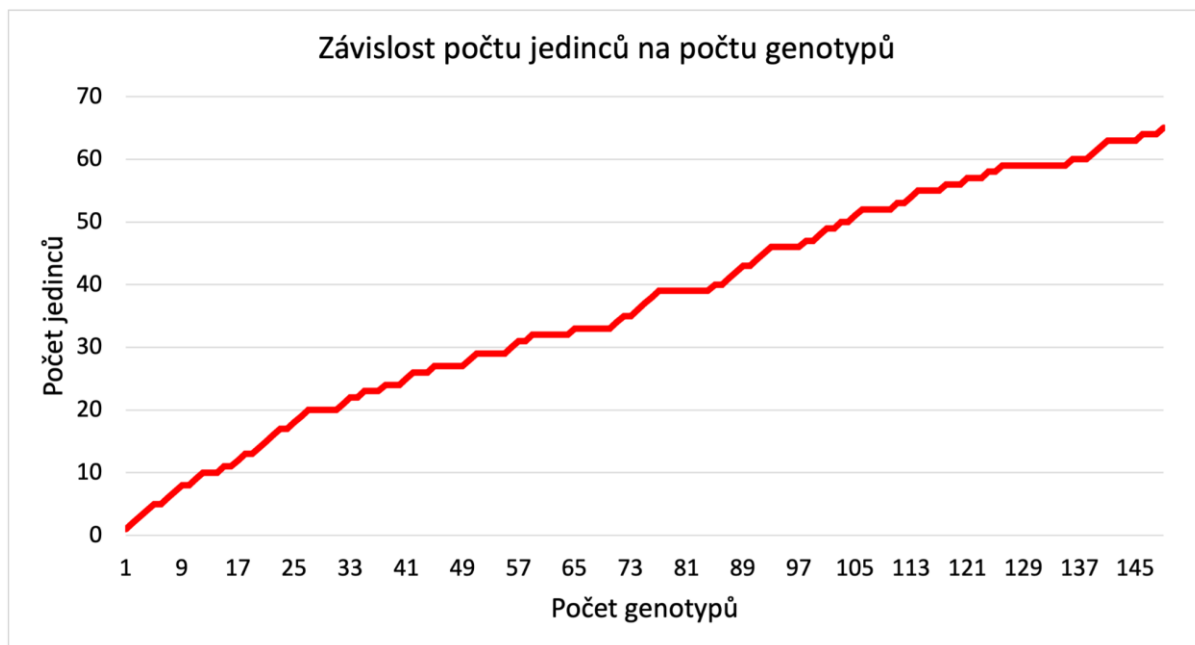
**Obr. 7:** Počet vzorků a genotypů z nich získaných v jednotlivých měsících dvou rysích roků z let 2017-2019. Každý sloupec znázorňuje celkový počet obdrženeých vzorků v daný měsíc. Světle šedá výšeř sloupců značí počet genotypů získaných z laboratorního zpracování daných vzorků.



**Obr. 8:** Počet vzorků a genotypů z nich získaných rozdělené dle typu vzorku.

Každý sloupec znázorňuje celkový počet obdržných vzorků daného typu. Světle šedá výše sloupců značí počet genotypů získaných z laboratorního zpracování daných vzorků.

Závislost počtu identifikovaných jedinců lineárně roste v závislosti na počtu získaných genotypů a nedosahuje v případě vzorků této studie plateau (Obr. 9), což naznačuje nedostatečné ovzorkování populace.



Obr. 9: Závislost počtu identifikovaných jedinců na počtu získaných genotypů

## Ověření druhového určení vzorků

Analýza hlavních koordinát na základě genetických vzdáleností rozdělila dataset do dvou oddělených skupin (Obr. 10). Jeden klastr tvořily pouze vzorky označené při sběru jako rys ostrovid. Druhá skupina byla tvořena referenčními vzorky koček divokých, koček domácích a také dvěma vzorky, které byly při sběru označeny jako rys ostrovid (konkrétně 03/0020 a 05/0091). Oba vzorky tedy byly geneticky určeny jako patřící k rodu *Felis* a vyřazeny z dalších analýz.

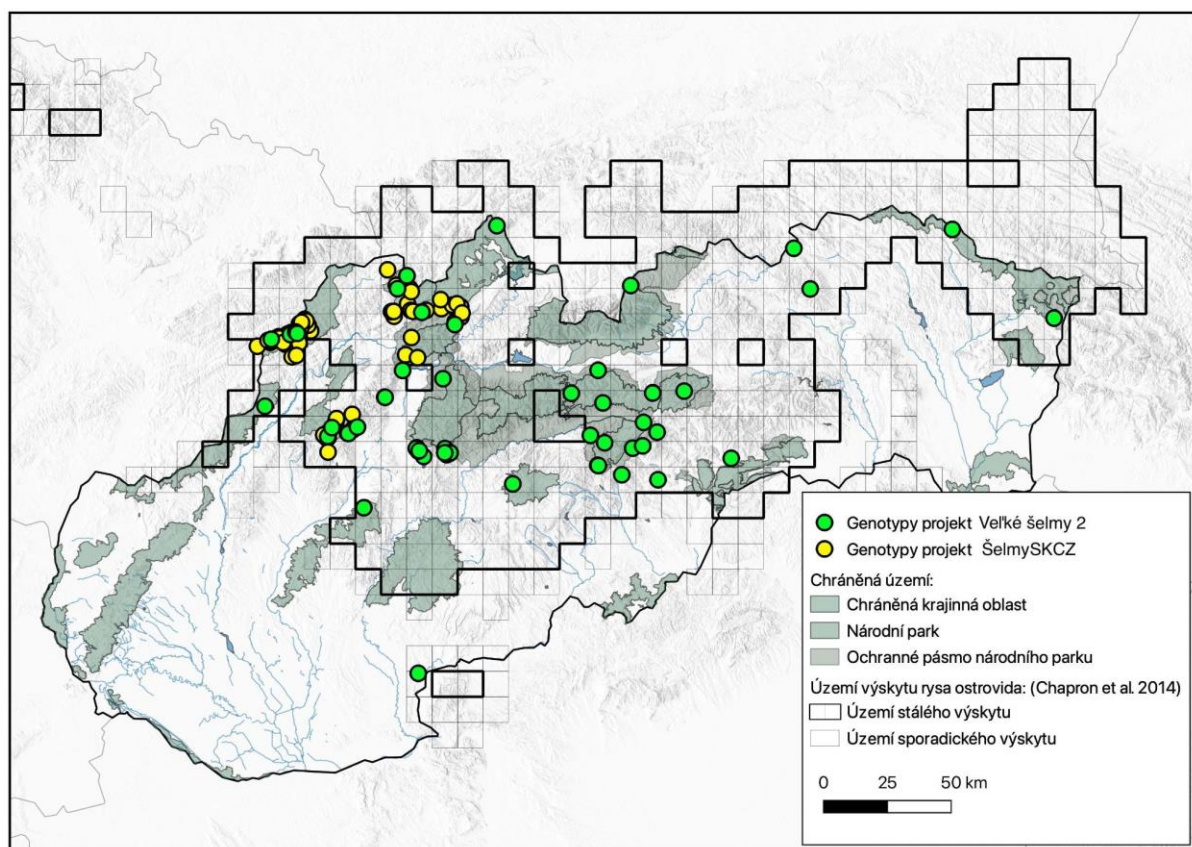




**Obr. 10:** Grafický výstup analýzy hlavních koordinát datasetu 59 genotypů získaných během dvou vzorkovacích sezón. Zelené trojúhelníky značí zpracované vzorky označené jako rys ostrovid. Modré kosočtverce značí referenční vzorky kočky divoké. Oranžové čtverce značí referenční vzorky kočky domácí.

## Populačně-genetické analýzy

Celkový dataset pro další analýzy byl tvořen 155 genotypy, z toho 98 genotypů z projektu *Šelmy SKCZ* (Krojerová et al., 2019) a 57 genotypů z projektu *Velké šelmy 2*. Prostorové umístění všech úspěšně genotypovaných vzorků z obou projektů a pokrytí zájmové oblasti vybraných chráněných území je zobrazeno na Obr. 11.



**Obr. 11:** Mapa zájmového území s vyznačenými lokalitami nálezů jednotlivých vzorků. Zeleně jsou vyznačeny genotypy získané a zpracované v rámci projektu projektu *Velké šelmy 2*. Žlutě jsou vyznačeny genotypy získané z projektu *Šelmy SKCZ*. Území ohraničené tučným okrajem polygonů znázorňuje území se stálým výskytem ryso ostrovida dle Chapron et al. 2014. Čtverce s tenkým okrajem mimo tučně ohraničenou oblast znázorňují území sporadického výskytu ryso ostrovida dle Chapron et al. 2014.

## Analýza identit

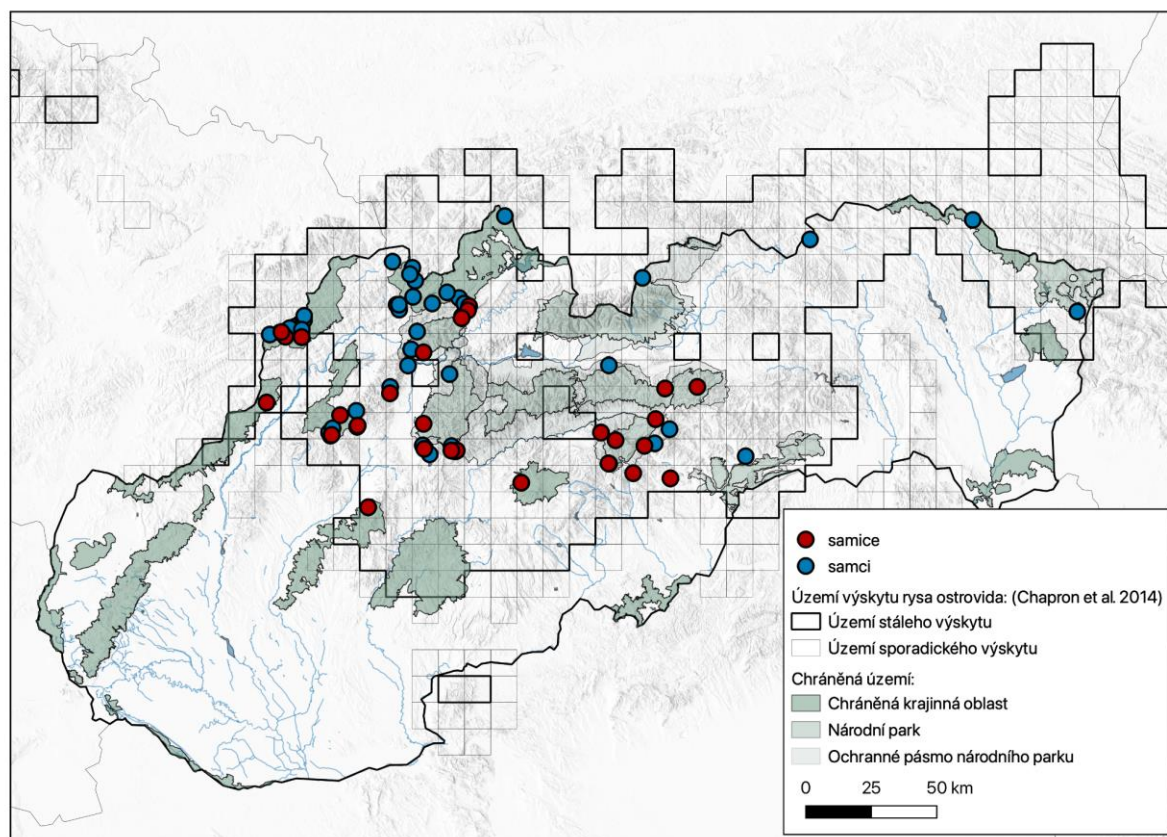
Zvolený panel lokusů se ukázal jako vhodný pro identifikaci jedinců jak pro nepřibuzné, tak příbuzné jedince ( $P_{ID} = 3,42E-10$ ,  $P_{ID-SIB} = 6,65E-05$ ). Z důvodu předpokladu příbuznosti jedinců v populaci byl jako indikátor vhodnosti panelu zvolen parametr  $P_{ID-SIB}$ . Bylo tedy potřeba 15 lokusů ke spolehlivému rozlišení jedinců v tomto datasetu. Tři vzorky (K018\_UK, LL47 a LL51) měly úspěšně genotypováno pouze 13 lokusů. Genotypy těchto vzorků ale nebyly shodné s žádným dalším vzorkem.

**Tab. 5:** Výsledné pravděpodobnosti výskytu stejného genotypu pro dva jedince ( $P_{ID}$ ), pravděpodobnost výskytu stejného genotypu mezi příbuznými jedinci blízké příbuznými jedinci ( $P_{ID-SIB}$ ), kumulativní  $P_{ID}$  a  $P_{ID-SIB}$  seřazeny od nejvíce informativního lokusu (LC106).

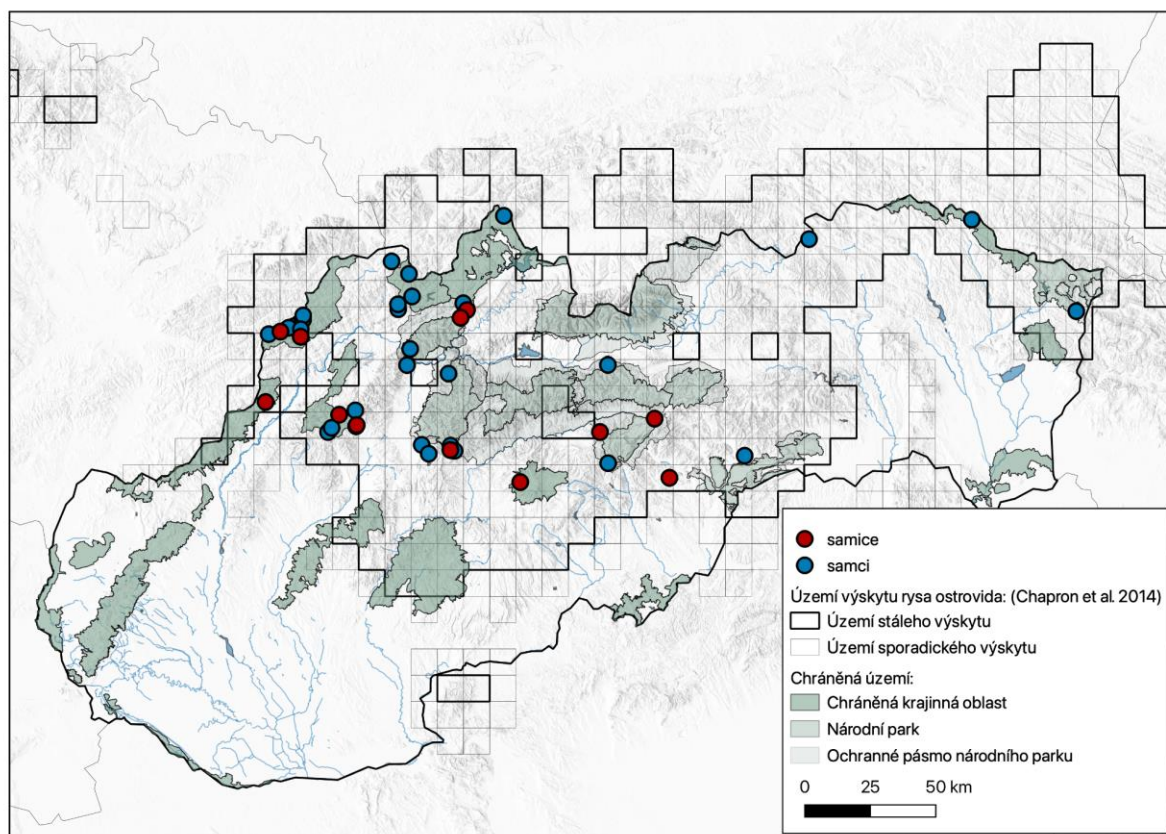
Lokus	$P_{ID}$	$P_{ID-SIB}$	kumulativní $P_{ID}$	kumulativní $P_{ID-SIB}$
<b>LC106</b>	7,81E-02	3,84E-01	7,81E-02	3,84E-01
<b>F115</b>	1,11E-01	4,16E-01	8,64E-03	1,60E-01
<b>FCA506</b>	1,52E-01	4,61E-01	1,32E-03	7,37E-02
<b>FCA476</b>	1,72E-01	4,70E-01	2,26E-04	3,46E-02
<b>FCA208</b>	1,90E-01	4,83E-01	4,30E-05	1,67E-02

<b>FCA001</b>	2,06E-01	4,95E-01	8,66E-06	8,27E-03
<b>FCA096</b>	2,01E-01	4,99E-01	1,79E-06	4,13E-03
<b>F53</b>	2,35E-01	5,11E-01	4,19E-07	2,11E-03
<b>FCA149</b>	2,69E-01	5,40E-01	1,13E-07	1,14E-03
<b>FCA035</b>	3,18E-01	5,71E-01	3,28E-08	6,49E-04
<b>FCA008</b>	3,30E-01	5,72E-01	1,04E-08	3,71E-04
<b>LC110</b>	2,91E-01	5,84E-01	3,44E-09	2,17E-04
<b>FCA077</b>	3,72E-01	5,94E-01	1,28E-09	1,29E-04
<b>FCA031</b>	3,86E-01	6,12E-01	4,93E-10	7,88E-05
<b>FCA232</b>	6,94E-01	8,44E-01	3,42E-10	6,65E-05

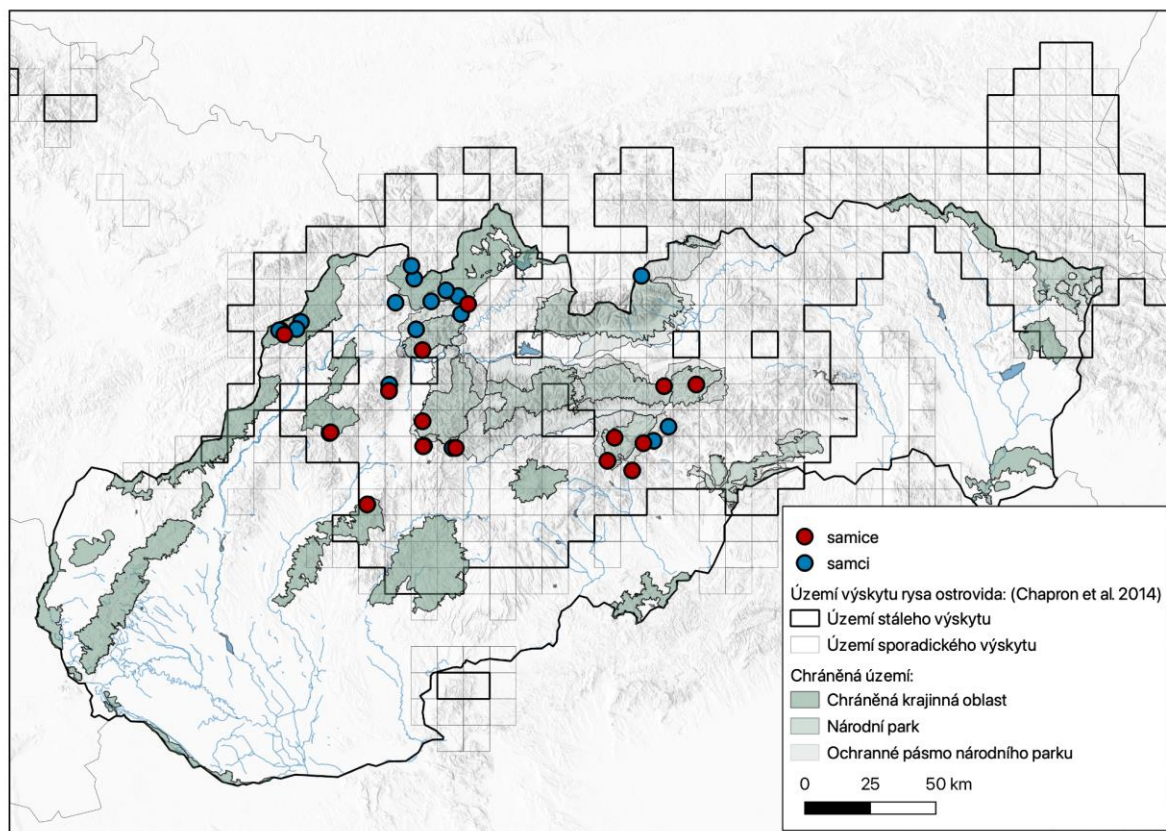
Z celkového datasetu 155 genotypů rýsa ostrovida bylo identifikováno 68 individuálních genotypů, 27 samic a 41 samců (Obr. 12). Poměr pohlaví byl tedy přibližně 2:3. Během sezóny 2017/2018 bylo zachyceno celkem 45 jedinců, 13 samic a 32 samců (Obr. 13). Během druhé sezóny bylo zachyceno celkem 35 jedinců, 15 samic a 20 samců (Obr. 14).



**Obr. 12:** Mapa znázorňující úspěšně genotypované jedince rýsa ostrovida po vyřazení opakovaných záchytů za celé sledované období 2017–2019. Pro znázornění byl ponechán vždy první záchyt daného jedince. Červené body znázorňují zachycené samice, modré body znázorňují zachycené samce.



**Obr. 13:** Mapa znázorňující úspěšně genotypované jedince rýsa ostrovida po vyřazení opakovaných záchytů za sezónu 2017/2018. Pro znázornění byl ponechán vždy první záchyt daného jedince. Červené body znázorňují zachycené samice, modré body znázorňují zachycené samce.



**Obr. 14:** Mapa znázorňující úspěšně genotypované jedince rýsa ostrovida po vyřazení opakovaných záchytů za sezónu 2018/2019. Pro znázornění byl ponechán vždy první záchyt daného jedince. Červené body znázorňují zachycené samice, modré body znázorňují zachycené samce.

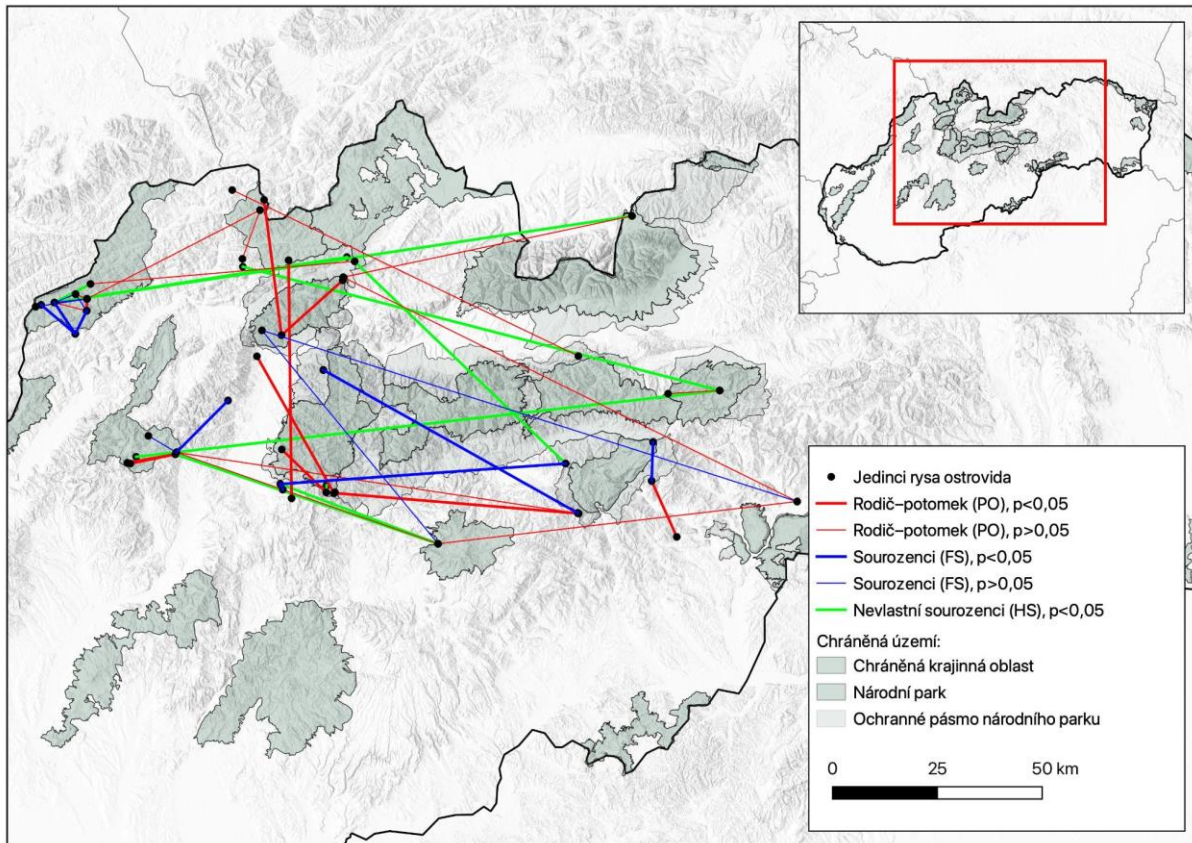
## Genealogická struktura a příbuznost

Celkem bylo nalezeno 65 potenciálních vztahů rodič–potomek (PO), 43 potenciálních párů sourozenců (FS) a 320 potenciálních párů sourozenců sdílejících jednoho z rodičů (HS). U 43 párů byla signifikantně potvrzena příbuznost prvního stupně, tj. vztah rodič–potomek nebo pár sourozenců. Z toho bylo signifikantních 11 vztahů rodič–potomek a 8 párů sourozenců (Tab. 6, Obr. 15). U zbylých 24 párů nebylo možné rozlišit, o který ze dvou vztahů prvního řádu se jedná. Vztah prvního řádu byl ale signifikantní. 9 párů bylo signifikantně identifikováno jako nevlastní sourozenci sdílející jednoho z rodičů.

**Tab. 6:** Vztahy prvního řádu na základě výsledků analýzy příbuznosti v programu ML Relate. PO= vztah rodič–potomek (*parent–offspring*), FS= sourozenci (*full siblings*), HS= nevlastní sourozenci (*half siblings*). \* označuje vztahy, jejichž  $p < 0,05$  oproti vztahu s druhým nejvyšším likelihood.

ID1	ID2	vztah	ID1	ID2	vztah
R015	R032	PO*	R033	R032	FS*
K021	K023	PO*	R033	R014	FS*
K033	K023	PO*	R029	R033	FS*
K031	K025	PO*	K035	K024	FS*
K031	LL48	PO*	LL34	LL29	FS*
LL33	K016	PO*	LL08	LL44	FS*
LL35	LL31	PO*	LL12	LL29	FS*
LL45	LL31	PO*	LL15	LL04	FS*
LL47	LL37	PO*	R014	R032	FS
LL09	LL47	PO*	R033	R031	FS
LL15	LL10	PO*	R029	R015	FS
R015	R031	PO	R029	R014	FS
R014	R031	PO	K033	K024	FS
R014	R015	PO	LL40	K022	FS
R033	R015	PO	LL42	K022	FS
R029	R031	PO	K015	R015	FS
R029	R032	PO	R029	R024	HS*
K029	K015	PO	K016	R029	HS*
K023	K024	PO	LL47	LL31	HS*
K037	R024	PO	LL40	K023	HS*
LL40	K024	PO	LL40	LL29	HS*
LL02	K034	PO	LL02	R029	HS*
LL03	K025	PO	LL06	K018	HS*

LL06	LL07	PO	LL06	K028	HS*
LL09	K024	PO	LL12	K037	HS*
LL42	K034	PO			
LL42	LL40	PO			



**Obr. 15:** Znázornění výsledků analýzy příbuzenských vztahů v softwaru ML-Relate mezi 68 jedinci rysa ostrovida. Černé body znázorňují jedince rysa ostrovida. Tučná červená spojnice bodů znázorňuje signifikantní ( $p < 0,05$ ) vztah rodič–potomek (PO) na základě nejvyššího likelihood. Tenká červená spojnice bodů znázorňuje vztah rodič–potomek na základě nejvyššího likelihood, který ale není signifikantní. Tučná modrá spojnice bodů znázorňuje signifikantní ( $p < 0,05$ ) vztah sourozenců (FS) na základě nejvyššího likelihood. Tenká modrá spojnice bodů znázorňuje vztah sourozenců na základě nejvyššího likelihood, který ale není signifikantní. Tučná zelená spojnice znázorňuje signifikantní ( $p < 0,05$ ) nevlastní sourozence, kteří mají jednoho společného rodiče.

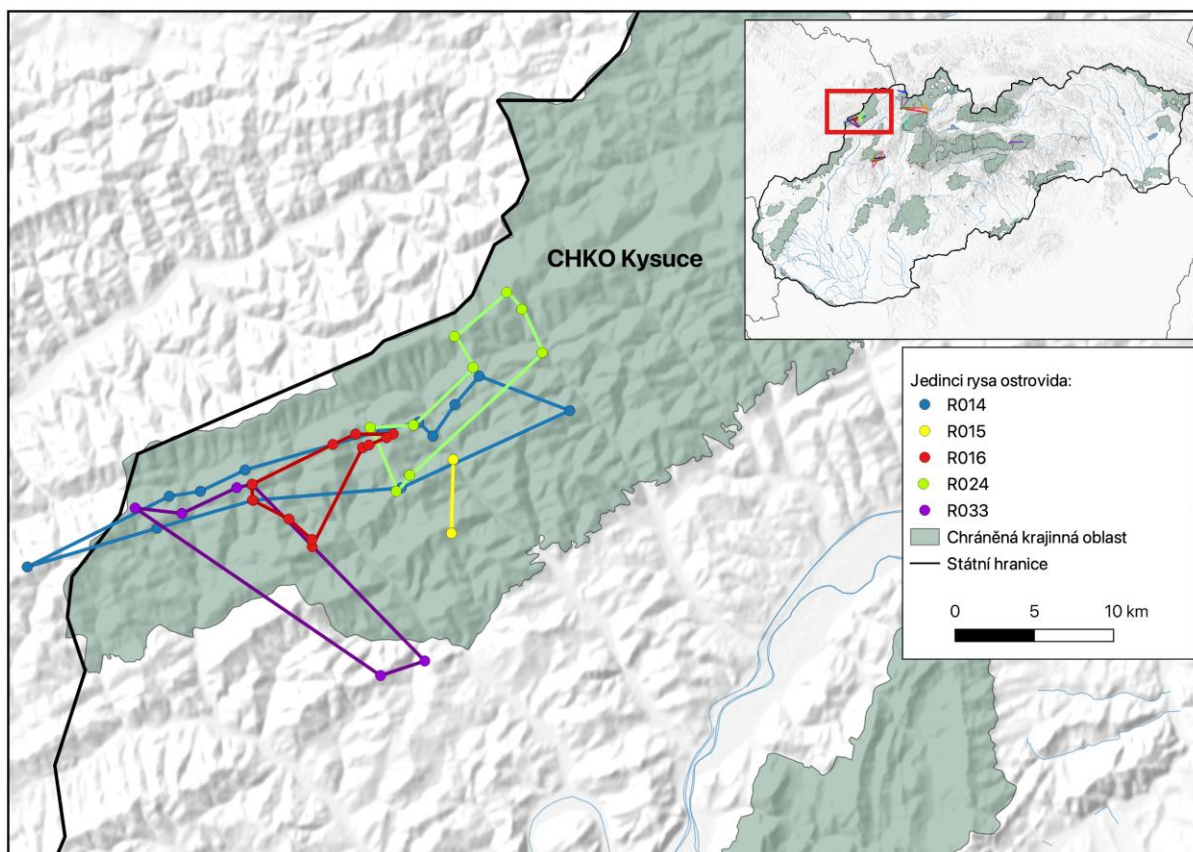
### Prostorová aktivita a demografie:

Celkem bylo opětovně zachyceno 22 jedinců a to pouze na území západního a středního Slovenska (Tab.7). Průměrný počet záchytů na jedince byl pro celé zkoumané období 1,9. Pro první sezónu bylo zaznamenáno průměrně 1,58 záchytů na jedince. Ve druhé sezóně poté 1,69 záchytů na jedince.

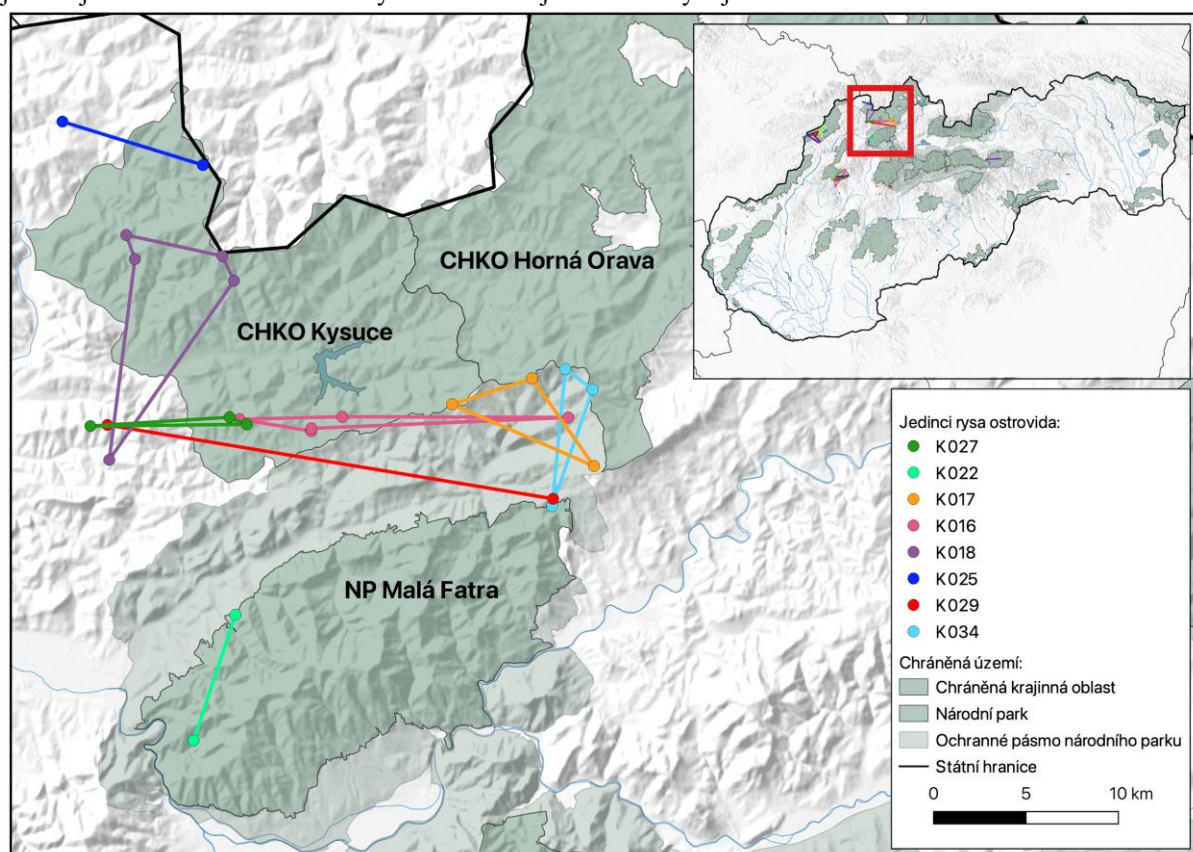
Dva jedinci (LL35, LL40) byly opakovaně zachyceny v lokalitách vzdálených jen několik desítek metrů. Opakované záchyty se vyskytly pouze v oblastech s vyšším počtem ovzorkovaných jedinců. Nejvíce opakovaných záchytů bylo na území CHKO Kysuce a CHKO Strážovské vrchy. Největší prostorovou aktivitu na základě analyzovaných záchytových dat, o ploše 43,69 km<sup>2</sup> (minimální konvexní polygon vytvořený spojením všech míst záchytů – MCP 100), měl samec označen jako R14, který měl společně se samcem R16 největší počet záchytů, a to 11. Opakované záchyty konkrétních jedinců jsou vyobrazeny na obrázcích 16–18.

**Tab. 7** Tabulka počtu genotypů, počtu jedinců a recapture rate pro jednotlivé ovzorkované oblasti.

	<b>Počet genotypů</b>	<b>Počet jedinců</b>	<b>Recapture rate</b>
<b>CHKO Kysuce</b>	72	19	3,79
<b>CHKO Strážovské vrchy</b>	19	7	2,71
<b>NP Velká Fatra</b>	16	12	1,33
<b>NP Malá Fatra</b>	10	9	1,11
<b>NP Muránska planina</b>	10	10	1,00
<b>CHKO Horná Orava</b>	8	6	1,33
<b>CHKO Poľana</b>	2	1	2,00
<b>NP Slovenský raj</b>	2	2	1,00
<b>CHKO Biele Karpaty</b>	1	1	1,00
<b>CHKO Ponitrie</b>	1	1	1,00
<b>CHKO Východné Karpaty</b>	1	1	1,00
<b>NP Nízke Tatry</b>	1	1	1,00
<b>NP Poloniny</b>	1	1	1,00
<b>NP Slovenský kras</b>	1	1	1,00
<b>RSOPK Prešov</b>	1	1	1,00
<b>TANAP</b>	1	1	1,00

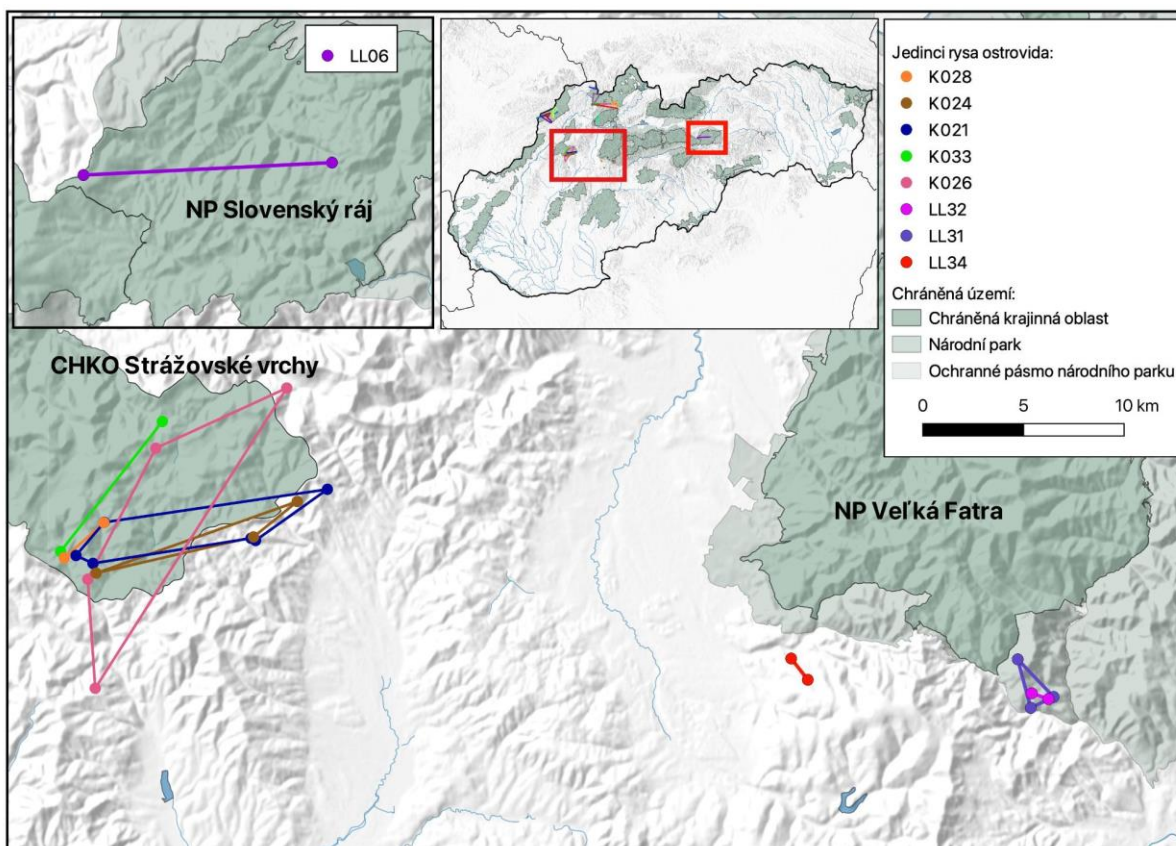


**Obr. 16:** Mapa zobrazující prostorovou aktivitu pět jedinců na území CHKO Kysuce, oblast Javorníky. Jednotliví jedinci jsou barevně odlišeni. Každý bod znázorňuje místo záchytu jedince.



**Obr. 17:** Mapa zobrazující prostorovou aktivitu pět jedinců na území CHKO Kysuce, oblast Kysucká vrchovina, CHKO Horná Orava a NP Malá Fatra. Jednotliví jedinci jsou barevně odlišeni. Každý bod znázorňuje místo záchytu jedince.

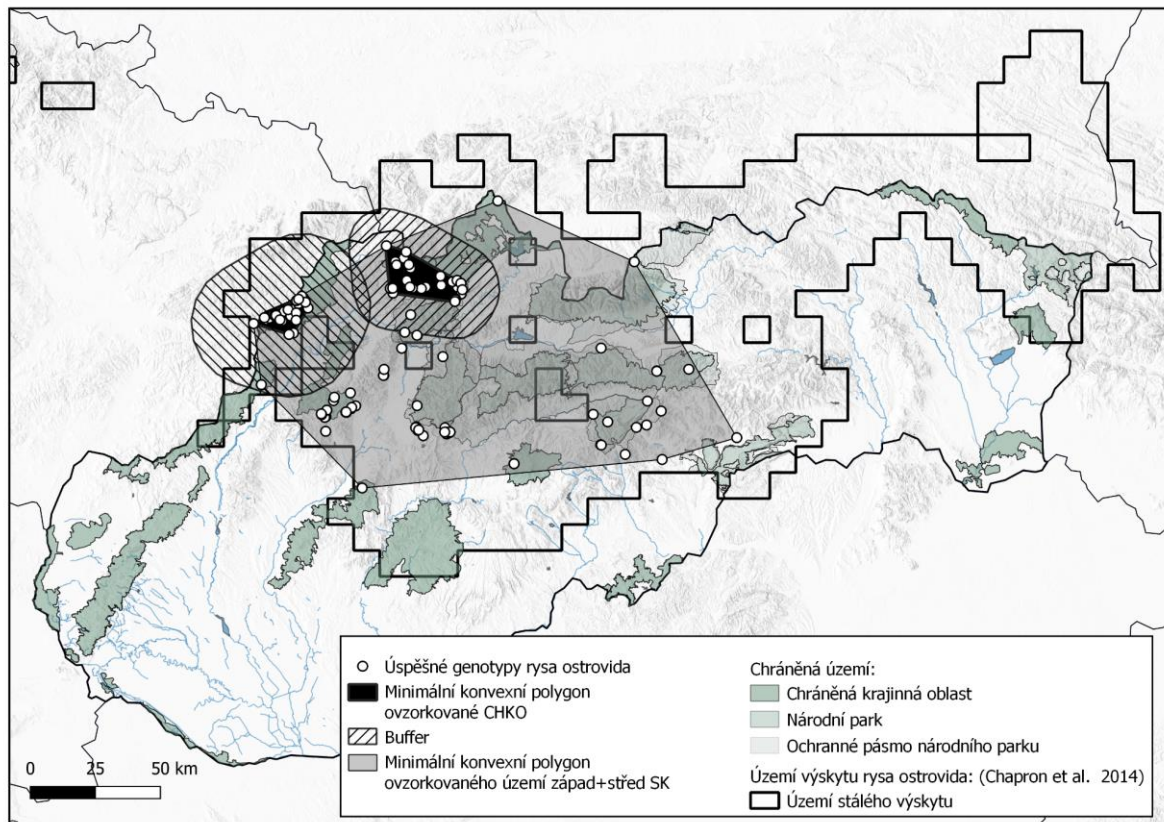




**Obr. 18:** Mapa zobrazujúca priestorovou aktivitu päť jedinců na území CHKO Strážovské vrchy a NP Veľká Fatra. Ve výřezu je znázorněna priestorová aktivita jedince na území NP Slovenský ráj. Jednotliví jedinci jsou barevně odlišeni. Každý bod znázorňuje místo záchytu jedince.

### Populační hustota

Pro území minimálního konvexního polygonu v rámci oblasti Javorníků byla populační hustota stanovena na 0,88 (0,64–1,21) jedinců na 100 km<sup>2</sup> a pro oblast Kysuc 1,0 (0,53–1,87) jedinců na 100 km<sup>2</sup>. Pro celé ovzorkované území západního a středního Slovenska byla populační hustota stanovena na 0,48 (0,37–0,62) jedinců na 100 km<sup>2</sup>.

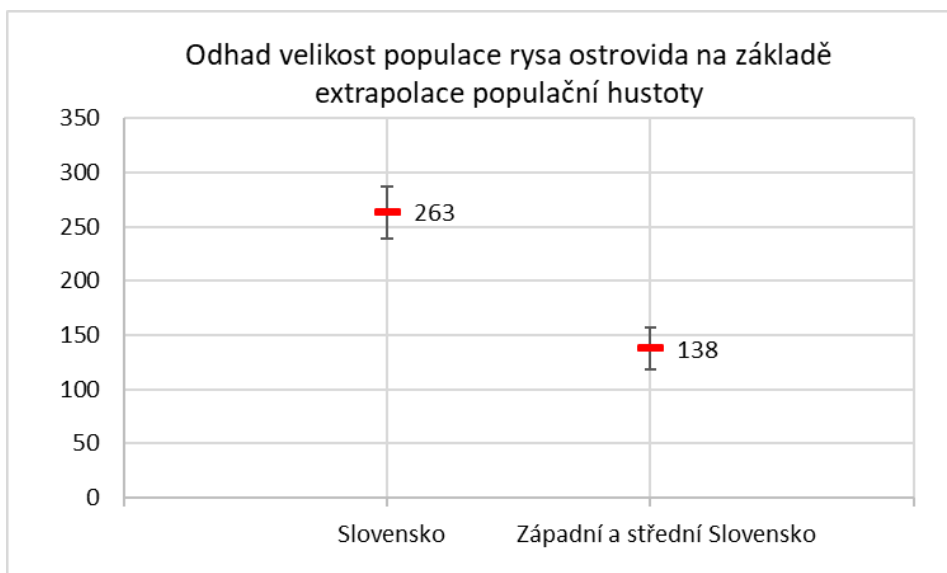


**Obr. 19:** Mapa znázorňující minimální konvexní polygony ovzorkovaných území CHKO Kysuce-Javorníky a Kysucká vrchovina, a také minimální konvexní polygon ovzorkovaného území západního a středního Slovenska. Šrafovaní značí buffer kolem MCP, pro které byla stanovena populační hustota. Biele body značí úspěšné genotypy rysa ostrovida.

## Velikost populace

### Metoda extrapolace

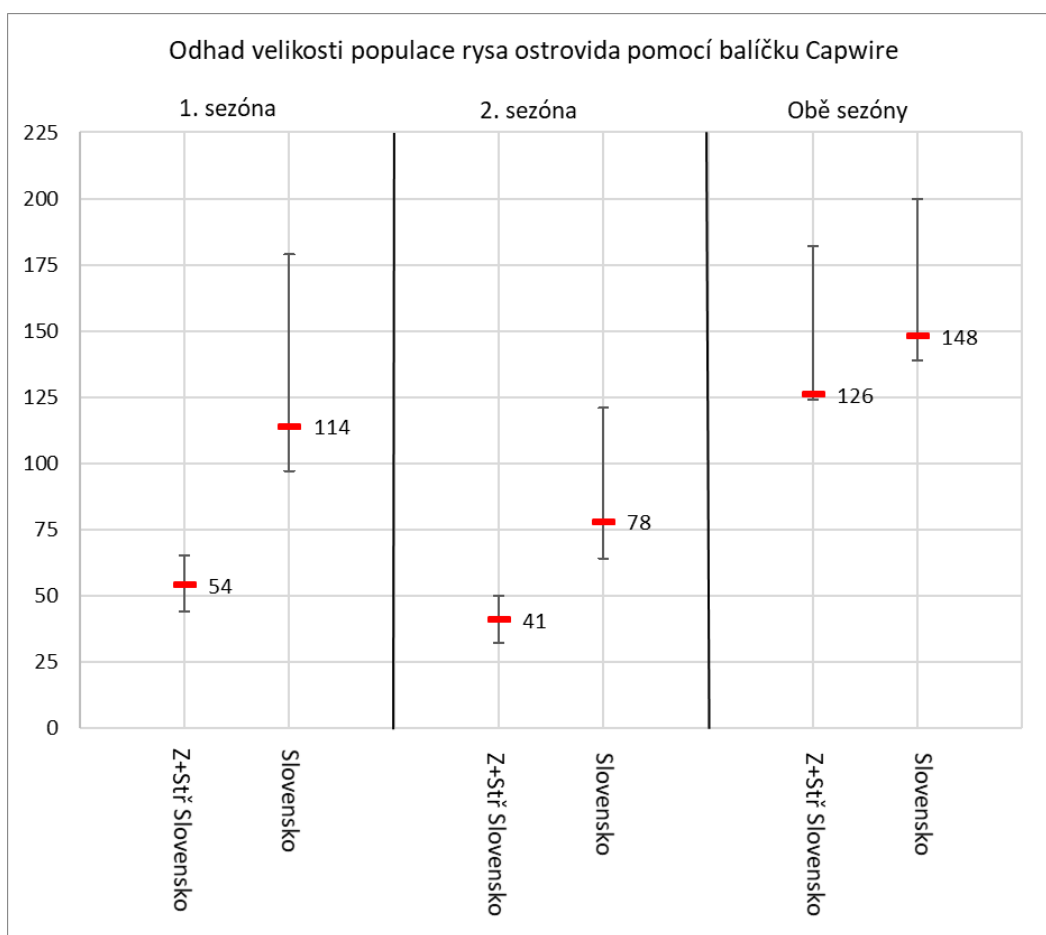
Na základě stanovené populační hustoty pro jednotlivé oblasti byla pomocí extrapolace na území stálého výskytu rysa ostrovida na Slovensku a na ovzorkované území západního a středního Slovenska vypočtena velikost populace (Obr. 20). Pro celé území stálého výskytu rysa ostrovida na Slovensku byla stanovena velikost populace na 263 ( $\pm 24$ ) jedinců. Pro ovzorkované území západního a středního Slovenska byla velikost populace stanovena na 138 ( $\pm 19$ ) jedinců.



**Obr. 20:** Odhadovaná velikost populace rýsa ostrovida na základě populační hustoty.

### Metoda CMR

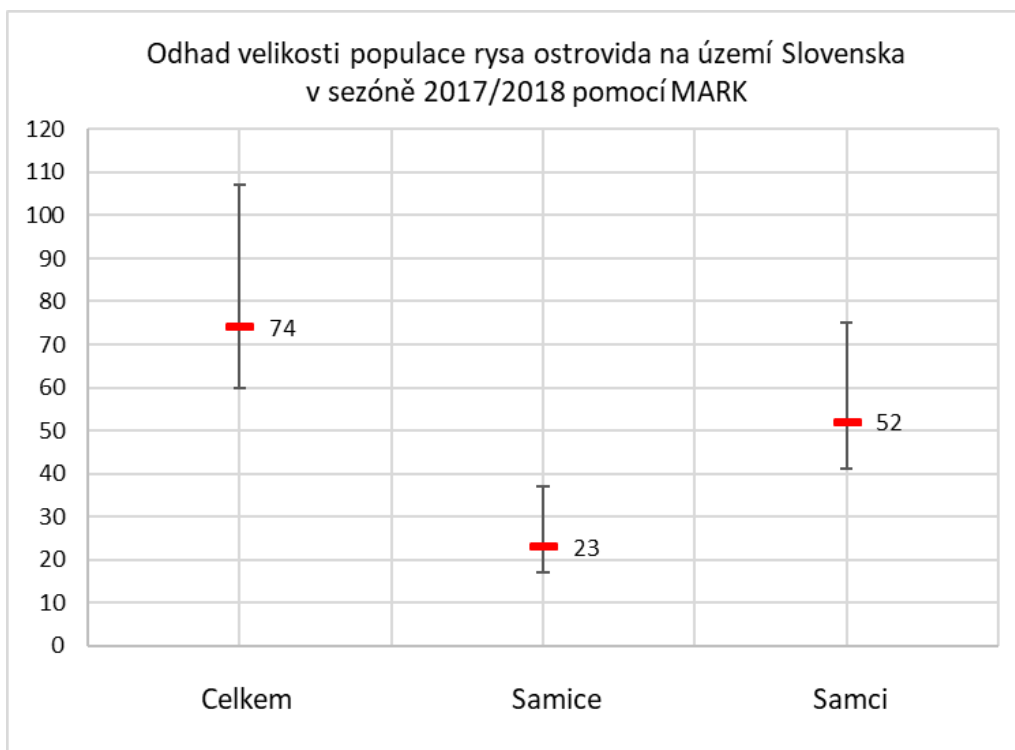
Odhadovaná velikost populace na základě analýzy R balíčkem CAPWIRE byla stanovena na základě všech obdržných vzorků a také pouze pro lépe ovzorkované území středního a západního Slovenska. Odhad početnosti byl proveden pro kompletní dataset a pro každou sezónu zvlášť. Všechny odhady byly stanoveny s 95% konfidenčním intervalem (Obr. 21, Tab. 8).



**Obr. 21, Tab. 8:** Odhadované velikosti populace rysa ostrovida stanovené metodou CMR pomocí balíčku CAPWIRE (Pennell et al., 2013) včetně rozptylu konfidenčního intervalu 95 %. SK= Slovensko, Z+Stř= západní a střední Slovensko

Období	Území	Počet zachycených jedinců	Velikost populace
2017/2018	Západ + střed SK	38	54 (44–65)
	Celé SK TIRM	45	114 (97–179)
2018/2019	Západ + střed SK	31	41 (32–50)
	Celé SK TIRM	35	78 (64–121)
2017–2019	Západ + střed SK TIRM	57	126 (124–182)
	Celé SK TIRM	68	148 (139–200)

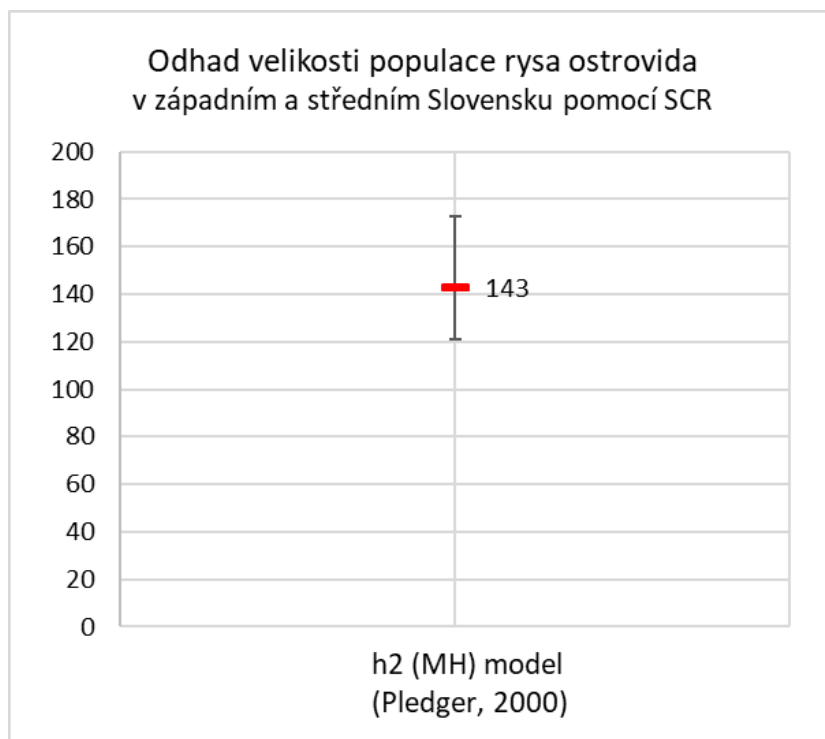
Pro analýzu v softwaru MARK byl použita pouze data ze sezóny 2017/2018. Velikost populace byla stanovena na 74 jedinců (60–105) jedinců (Obr. 22, Tab. 9). Velikost populace byla stanovena také pro jednotlivá pohlaví zvlášť. Na základě analýzy byla stanovena velikost populace samic na 23 (17–37) jedinců a velikost populace samců na 52 (41–75) jedinců (Obr. 22, Tab. 6).



**Obr. 22, Tab. 9:** Odhadované velikosti populace rýsa ostrovida stanovené metodou CMR pomocí softwaru MARK (White and Burnham, 1999) včetně rozptylu konfidenčního intervalu 95 %.

	Počet zachycených jedinců	Odhad velikosti populace
Sezóna 2017/2018	45	74 (60–105)
2017/2018 samice	13	23 (17–37)
2017/2018 samci	32	52 (41–75)

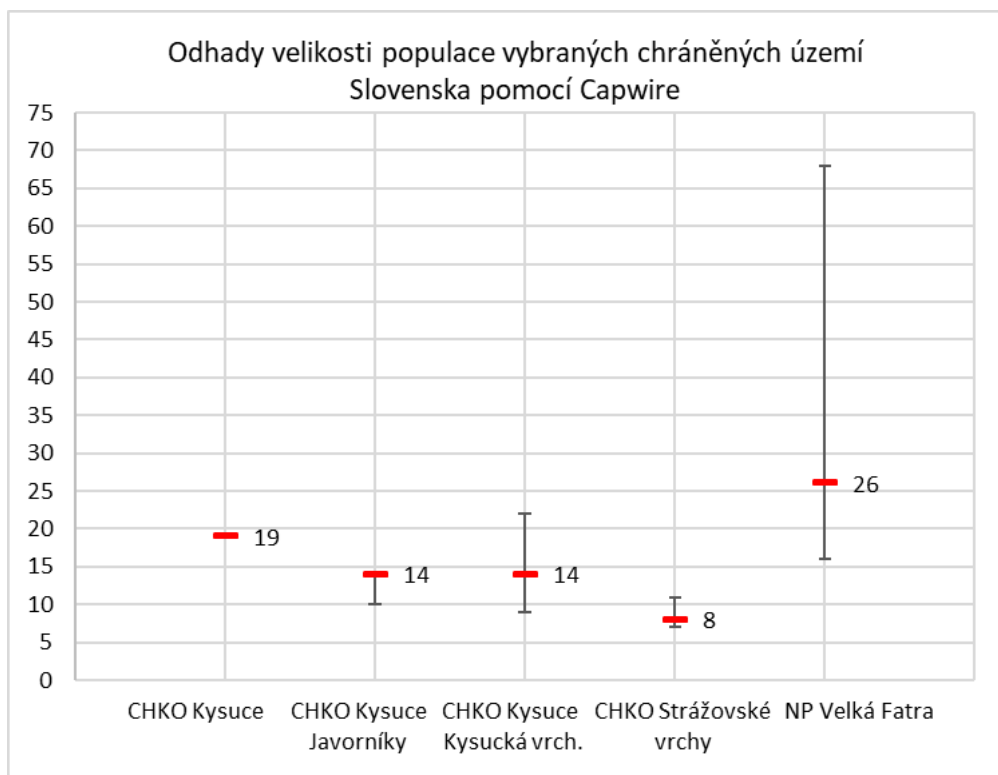
Pro odhad velikosti pomocí prostorově explicitních CMR metod bylo použito ovzorkované území západního a středního Slovenska, bez vzorků z východního Slovenska (celkem 151 genotypů). Jako nejvíce vhodný model byl určen model h2 (Pledger, 2000), který předpokládá v rámci celé populace přítomnost nezachycených skupin (tzv. latentních tříd). Velikost populace byla stanovena na 143 (121–173) jedinců. Jako druhý nejvíce vhodný model byl určen nulový model (Otis et al., 1978), který předpokládá stejnou pravděpodobnost záchytu všech jedinců (equal catchability model). Velikost populace byla stanovena na 82 (73–98) jedinců.



**Obr. 23:** Výsledky odhadu velikost populace pomocí balíčku secr (Efford, 2022).

Velikost populace byla také odhadnuta pro jednotlivá chráněná území, kde byl dostatek ovzorkovaných jedinců a opakovaných záchytů (Obr. 24, Tab. 10).

V rámci CHKO Kysuce jako celku bylo úspěšně zanalyzováno celkem 72 vzorků, ze kterých bylo identifikováno 19 jedinců z toho 16 samců a 3 samice. Velikost populace byla stanovena na 19 jedinců. Zvlášť byl ještě stanoven počet jedinců ve dvou podoblastech této CHKO a to v Javorníkách a v Kysucké vrchovině. V oblasti Javorníků bylo úspěšně zanalyzováno celkem 49 vzorků, ze kterých bylo identifikováno 10 jedinců – 7 samců a 3 samice. Odhad velikosti populace byl stanoven na 14 (10–14) jedinců. Pro oblast Kysucké vrchoviny byl odhad velikosti populace stanoven na základě 23 genotypovaných vzorků, v nichž bylo identifikováno 9 jedinců, pouze samců. Velikost populace byla stanovena na 14 (9–22) jedinců. Vyšší recapture rate byl také v oblasti CHKO Strážovské vrchy, kde byla velikost populace stanovena na 8 jedinců (7–11) na základě záchytu 7 jedinců, čtyř samců a tří samic, kteří byli identifikováni v rámci 23 genotypovaných vzorků. V oblasti NP Velká Fatra bylo úspěšně genotypováno 18 vzorků, ve kterých bylo identifikováno 11 jedinců, 7 samců a 4 samice. Velikost populace byla stanovena na 26 (16–68) jedinců.



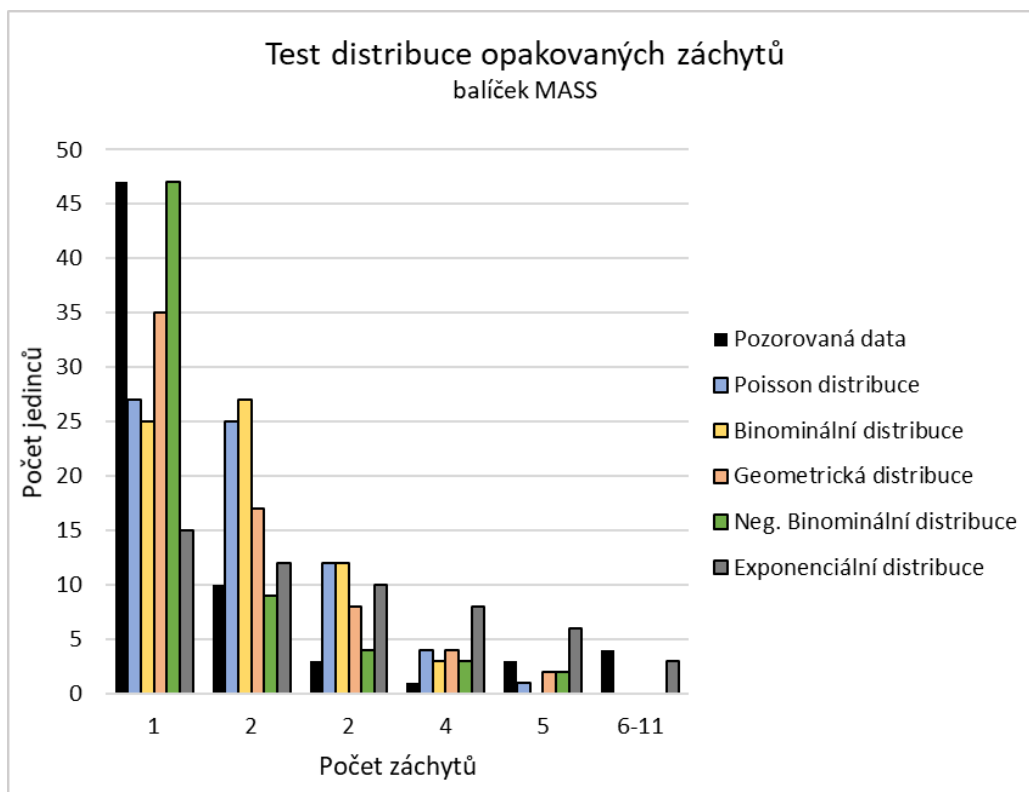
**Obr. 24:** Odhadované velikosti populací za období 2017–2019 stanovené metodou CMR za pomoci softwaru CAPWIRE (Pennell et al., 2013) ve vybraných zkoumaných oblastech včetně rozptylu konfidenčního intervalu 95 %.

**Tab. 10:** Výsledky odhadů velikosti populace metodou CMR za pomoci softwaru CAPWIRE (Pennell et al., 2013) jednotlivých oblastí.

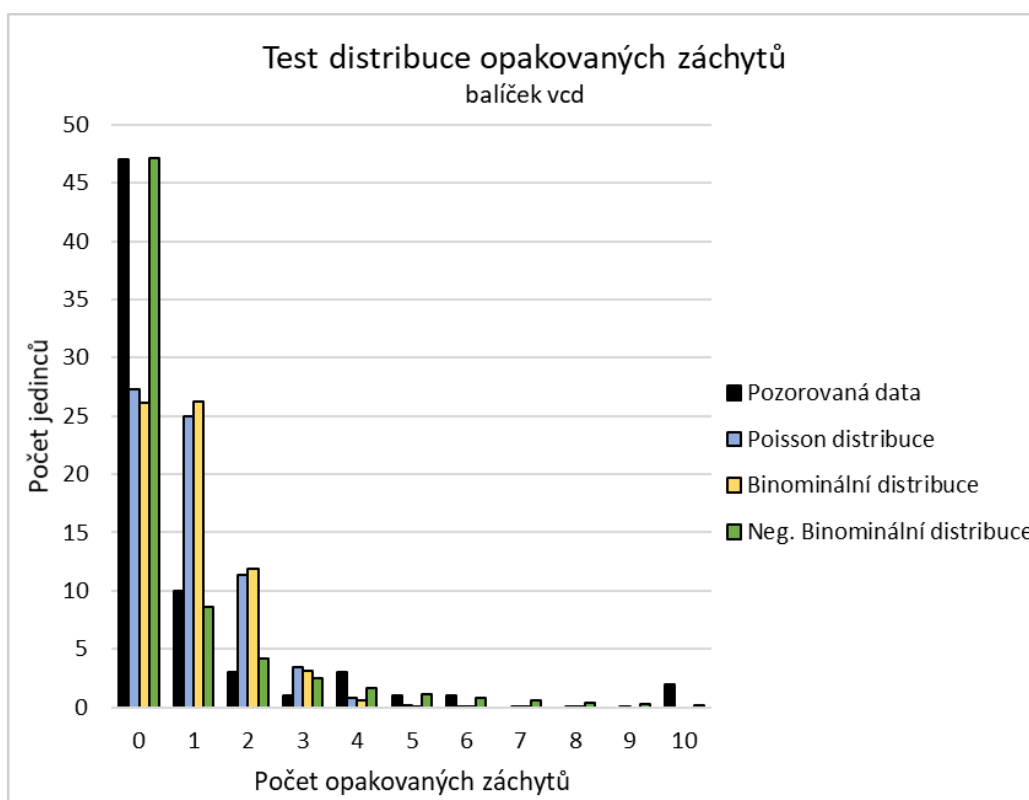
Chráněné území	Počet zachycených jedinců	Odhad velikosti populace CAPWIRE
CHKO Kysuce	19	19
CHKO Kysuce Javorníky	10	14 (10–14)
CHKO Kysuce Kysucká vrchovina	9	14 (9–22)
CHKO Strážovské vrchy	6	8 (7–11)
NP Velká Fatra	12	26 (16–68)

## Simulace dat

Na základě analýzy byla jako distribuce, nejvíce odpovídající reálným zachytovým datům, stanovena distribuce negativně binominální ( $\chi^2_{\text{MASS}} = 3,0802$ , Obr. 25, 26).



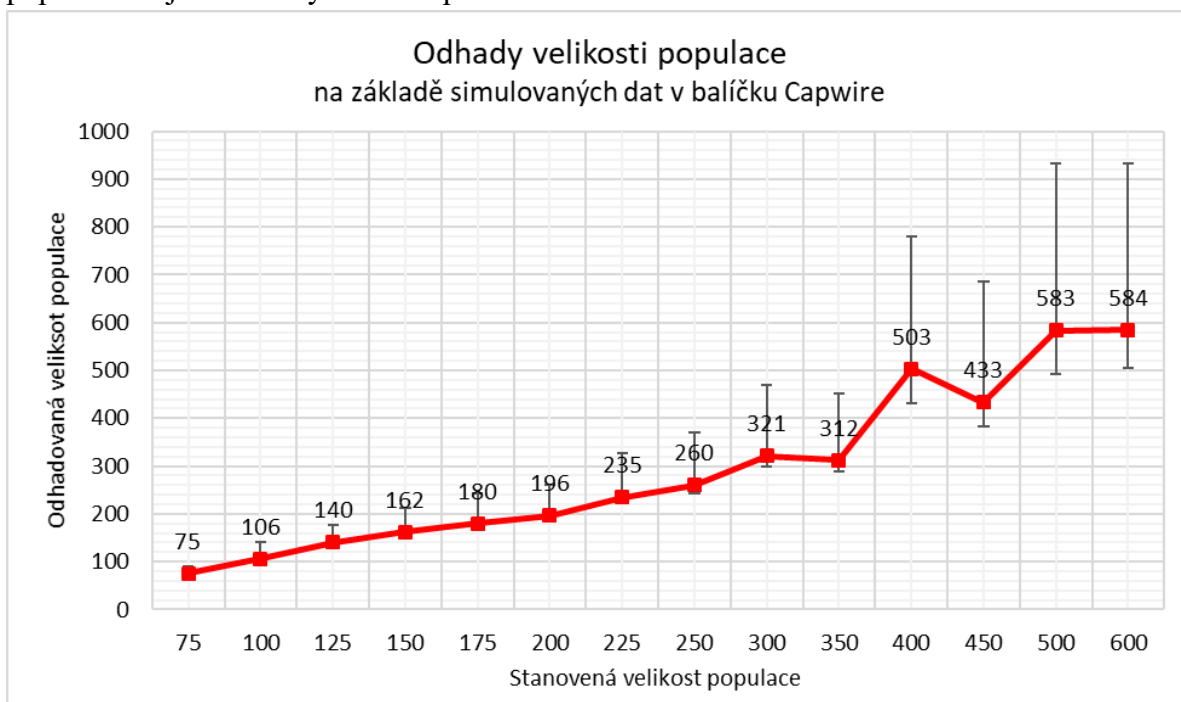
**Obr. 25:** Výsledky testu distribuce záchytových dat pomocí balíčku MASS (Venables & Ripley, 2002). Výsledky ukazují, že jako nejvíce odpovídající distribuce se jeví distribuce negativně binominální (zelené sloupce).



**Obr. 26:** Výsledky testu distribuce záchytových dat pomocí balíčku vcd (Meyer et al., 2023). Výsledky ukazují, že jako nejvíce odpovídající distribuce se jeví distribuce negativně binominální (zelené sloupce).

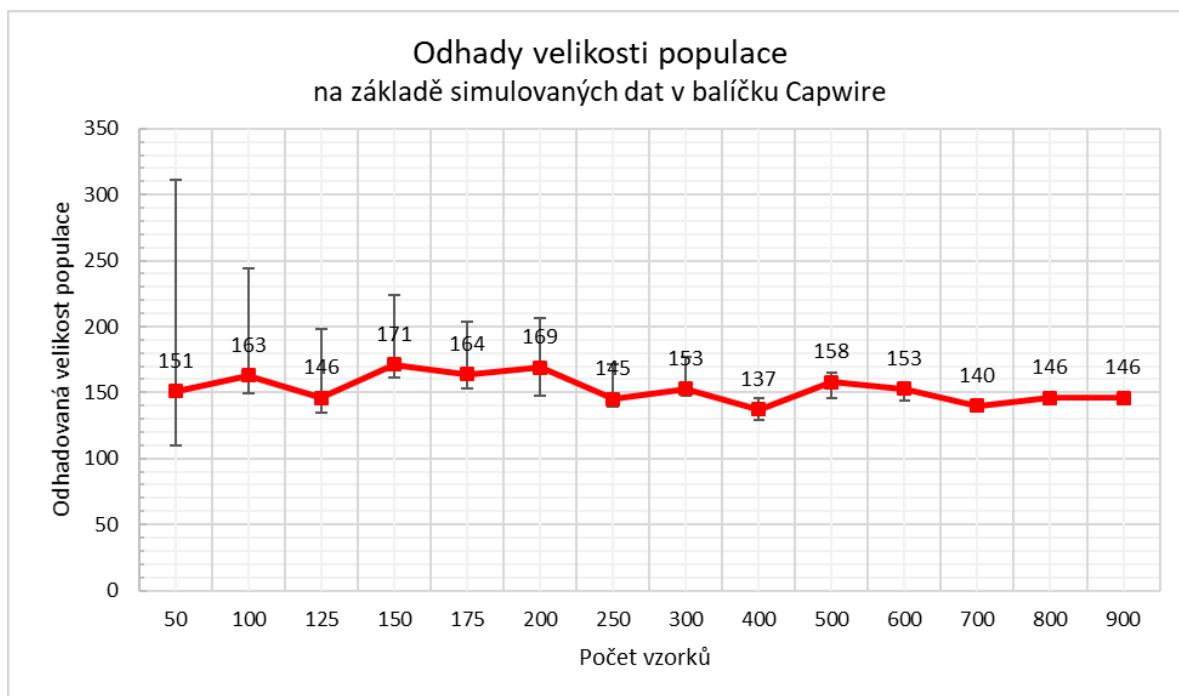


Odhady velikosti populace na základě simulovaných dat byly mírně nadhodnocené pro velikost reálné populace od 100 do 300 jedinců za použití modelu TIRM. V případě vyšší velikosti populace už jsou odhady velmi nepřesné.



**Obr. 27:** Odhadované velikosti populací stanovené pomocí balíčku CAPWIRE (Pennell et al., 2013), vypočtené ze simulovaných datasetů vytvořených na základě zjištěné negativně binomální distribuce záchytů. Simulované datasety byly vytvořeny s konstantním počtem 155 genotypů.

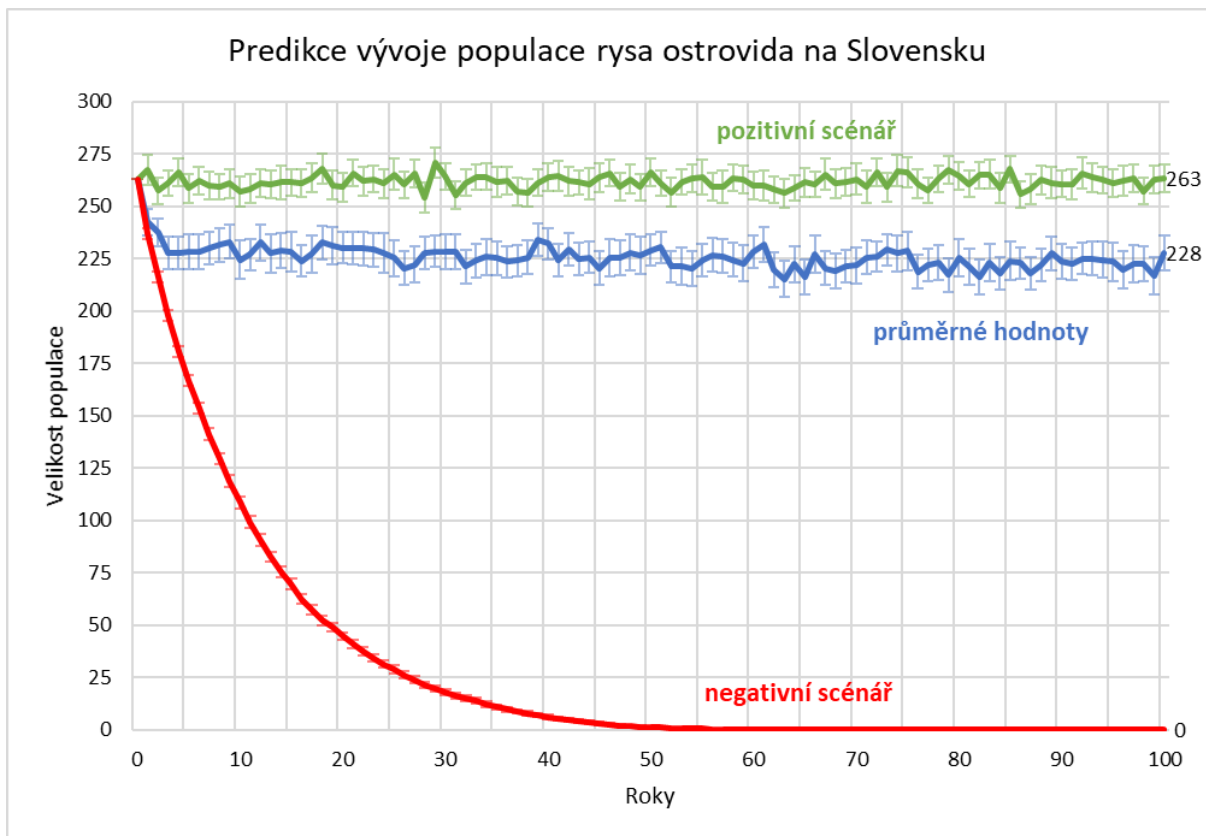
V případě simulace odhadu velikost populace při nárůstu počtu vzorků pro populaci o velikosti 148 jedinců, která byla stanovena pomocí balíčku CAPWIRE (Obr. 28) dochází při použití modelu TIRM k velmi mírnému nadhodnocení odhadu velikosti populace a to v průměru o 5 jedinců. V simulovaném datasetu pro 150 vzorků, který je nejbližší reálnému počtu vzorků v této studii dochází k nadhodnocení odhadu o přibližně 13 %. S narůstajícím počtem vzorků vstupujících do analýzy dochází ke snižování konfidenčních intervalů výsledných odhadů.



**Obr. 28:** Odhadované velikosti populací stanovené pomocí balíčku CAPWIRE (Pennell et al., 2013), vypočtené ze simulovaných datasetů vytvořených na základě zjištěné negativně binominální distribuce záchytů. Simulované datasety byly vytvořeny s konstantní reálnou velikostí populace 148 jedinců.

## Analýza životaschopnosti populace

Výsledky analýzy životaschopnosti populace ukazují, že při odhadované velikosti populace 263 jedinců, což je velikost získaná na základě extrapolace dat z modelových oblastí a předpokladu naplněné nosné kapacity prostředí, může dojít v časovém úseku 100 let k následujícím scénářům vývoje rysí populace na Slovensku (Obr. 29): v případě pozitivního scénáře s minimálními hodnotami mortality dojde k růstu populace až k limitním hodnotám nosné kapacity prostředí, a to i v případě navýšení kapacity. Za použití průměrných hodnot parametrů mortality dojde k mírnému poklesu velikosti populace na 228 ( $\pm 8$ ) jedinců. V případě negativního scénáře může v následujících 50 letech díky vysoké mortalitě dojít k úplnému vymření populace.



**Obr. 29:** Výsledky analýzy životaschopnosti populace s konfidenčním intervalem 95 %. Červená čára znázorňuje negativní predikci vývoje populace za použití maximálních hodnot parametrů mortality. Modrá čára znázorňuje predikci vývoje populace za použití průměrných hodnot parametrů mortality. Zelená čára znázorňuje pozitivní predikci vývoje populace za použití minimálních hodnot parametrů mortality.

### *Efektivní velikost populace*

Na základě analýzy vazebné nerovnováhy byla stanovena efektivní velikost populace na 42,2 (31,7–58,6) jedinců pro  $P_{crit} = 0,01$ .

# Diskuze

## Genotypizace a vzorkování

Úspěšnost genotypizace neinvazivních vzorků, tj. vzorků trusu, moči a srsti v této práci byla přibližně 27 %. Ve srovnání se studiemi, které použily stejný panel markerů je úspěšnost nižší (Krojerová-Prokešová et al., 2019, Gajdárová et al. 2023). Procentuální úspěšnost genotypizace z neinvazivních vzorků rýsa ostrovida se ale liší napříč studiemi (19,4–44,7 %) (Sindičić et al., 2013; Bull et al., 2016; Krojerová-Prokešová et al., 2019; Mengüllüoğlu et al., 2019; Mueller et al., 2020). Pravděpodobnost získání úspěšného genotypu z konkrétních neinvazivních vzorků se liší podle typu vzorku.

Úspěšnost genotypizace ze vzorků neinvazivně získané srsti (36 %) je srovnatelná s některými studiemi rýsa ostrovida (Turbaková, 2014; Krojerová-Prokešová et al., 2019), ale procentuální úspěšnost získání genotypu ze vzorků srsti se liší nejen v rámci genotypizace rýsa ostrovida (15,3 % versus 83 %) (Davoli et al., 2013; Mueller et al., 2020), ale také v rámci odlišných druhů, jako například rys červený, kočka divoká a vlk obecný, kde je rozptyl úspěšnosti srovnatelný (Ruell and Crooks, 2007; Galaverni et al., 2012; Steyer et al., 2013; Velli et al., 2015; Dufresnes et al., 2019).

Úspěšnost genotypizace vzorků trusu, která byla v této práci 29 %, ovlivňuje několik faktorů, jakými jsou například stáří vzorku a jeho skladování (Ruell and Crooks, 2007; Wultsch et al., 2015). Nelze také vyloučit špatnou determinaci druhu, ze kterého vzorek pochází, při sběru vzorku. Procentuální úspěšnost genotypizace rýsa ostrovida a dalších druhů rodu *Lynx* ze vzorků trusu se liší napříč studiemi a rozptyl je relativně velký (15,8–83 %) (Davoli et al., 2013; Bull et al., 2016; Krojerová-Prokešová et al., 2019; Mengüllüoğlu et al., 2019; Mueller et al., 2020). Ve srovnání s dalšími velkými šelmami (rys červený, vlk obecný, medvěd hnědý) je úspěšnost genotypizace vzorků trusu v této práci také nižší (Ruell and Crooks, 2007; Galaverni et al., 2012; Dufresnes et al., 2019; Skrbínšek et al., 2019).

Ačkoliv jsou vzorky moči v terénu snadno nalezitelné, nejsou kontaminovány DNA kořisti a obsahují menší množství inhibitorů než trus (Hausknecht et al., 2007), získat kvalitní genotyp ze vzorků moči se v této práci povedlo jen u 12 % vzorků. Důvodem je pravděpodobně menší množství epiteliálních buněk obsažených v moči oproti trusu, přítomnost inhibitorů PCR v moči (Schrader et al., 2012) a případná degradace vzorku vlivem vnějších podmínek před odběrem případně se může jednat o vzorek jiné šelmy. Úspěšnost získání genotypu ze vzorků moči v této práci je srovnatelná s úspěšností v dalších studiích rýsa ostrovida (úspěšnost 17,5 %, resp. 11,1 %) (Turbaková, 2014; Krojerová-Prokešová et al., 2019).

Rarefrakční křivka (Obr. 9) závislosti počtu identifikovaných jedinců na počtu genotypů ukazuje na nedostatečné ovzorkování zkoumané populace. K věrohodnému odhadu velikosti populace za použití neinvazivní genetiky a CMR přístupů je zapotřebí alespoň 2x více vzorků oproti předpokládané početnosti (Solberg et al., 2006). Při předpokládané početnosti přibližně 200–300 jedinců rýsa ostrovida na území Slovenska by tedy bylo pro spolehlivý odhad zapotřebí alespoň 400–600 neinvazivních vzorků.

## Genealogická struktura a příbuznost

V ovzorkované slovenské populaci rysa ostrovida byly nalezeny příbuzenské vztahy pouze v oblastech s vyšším pokrytím vzorků, tj. v oblastech středního a západního Slovenska. Analýzy odhalily výskyt rodinné skupiny v oblasti Javorníků spadající pod CHKO Kysuce. Vznik takové skupiny je s největší pravděpodobností následkem samičí filopatrie a větší míry disperze u samců oproti samicím a tato skupina byla již identifikována dříve (Krojerová-Prokešová et al., 2019). Vzhledem k blízké příbuznosti a inbreedingu v rámci této skupiny nebylo možné některé vztahy signifikantně potvrdit. Pokud jsou si jedinci blízce příbuzní, nelze v některých případech pouze na základě genetických dat odlišit vztah rodiče a potomka a vztah sourozenců (Kalinowski et al., 2006; Wang, 2017). Některé ze signifikantních vztahů prvního řádu byly detekovány mezi jedinci ovzorkovanými ve větších vzdálenostech. To může být způsobeno disperzí jedinců, která nebyla během vzorkování zachycena.

Pro rozřešení příbuzenských vztahů je třeba zkombinovat genetická data s daty z terénních monitoringů za pomoci fotopastí. Jedině při kombinaci těchto dvou přístupů lze spolehlivě identifikovat rodinné skupiny a rozřešit vztahy prvního řádu. Vzhledem k absenci dat z fotopastí v této práci nebylo možné kompletně rozřešit genealogickou strukturu nalezených vztahů.

## Prostorová aktivita a demografie

V rámci zkoumané populace rysa ostrovida nebyla na základě genetického monitoringu zachycena žádná disperze na dlouhé vzdálenosti. Ojedinelá nedetekovaná disperze se ale nedá na základě výsledků vyloučit. Ovzorkovaní jedinci se pohybovali pouze v rámci svého původního domovského okrsku a největší vzdálenosti mezi jednotlivými záchyty se pohybovaly v nižších desítkách kilometrů. Výsledky jsou konzistentní se studiemi prostorové aktivity rysa ostrovida. Rysové dlouhodobě obývají svůj domovský okrsek a jeho rozloha se v rámci několika sezón většinou překrývá (Breitenmoser-Würsten et al., 2007).

Ačkoliv jsou ryši ve srovnání s ostatními velkými šelmami při disperzi za účelem rozmnožování konzervativní a usazují se nejčastěji v blízkosti svého původního domovského okrsku, ve střední Evropě se dle nejnovějších studií vyskytují i případy disperze na nezvykle velké vzdálenosti (Zimmermann, 2004; Zimmermann et al., 2005; Gajdárová et al., 2021). K detekci takových disperzí je ale nutný dlouhodobý monitoring s dostatečným počtem vzorků, telemetrovaných jedinců, fotopastí apod.

Populační hustota stanovená na základě prostorově explicitního capture-recapture modelu je efektivní metodou hojně používanou při výzkumu velkých šelem, včetně rysů (Blanc et al., 2013; Duľa et al., 2021; Fležar et al., 2023). V případě, kdy jsou vstupními daty záchyty z genetického monitoringu je ale nutné brát zřetel na to, že tyto modely jsou primárně designované na data z intenzivního determinačního fotomonitoringu s jasně daným monitorovacím územím nebo na data z extenzivního terénního monitoringu v předem určeném území (Efford, 2022). V potaz je také potřeba brát vzorkovací úsilí, které je v rámci sběru vzorků pro genetické analýzy nehomogenní.

Odhady velikosti populace pomocí SCR a CMR modelů jsou závislé na počtu vzorků i počtu opakovaných záchyťů. Pro spolehlivé odhady velikosti populace je potřeba až trojnásobně větší

počet vzorků oproti předpokládané velikosti populace s alespoň v průměru dvěma záchyty na jedince (Miller et al., 2005; Luikart et al., 2010).

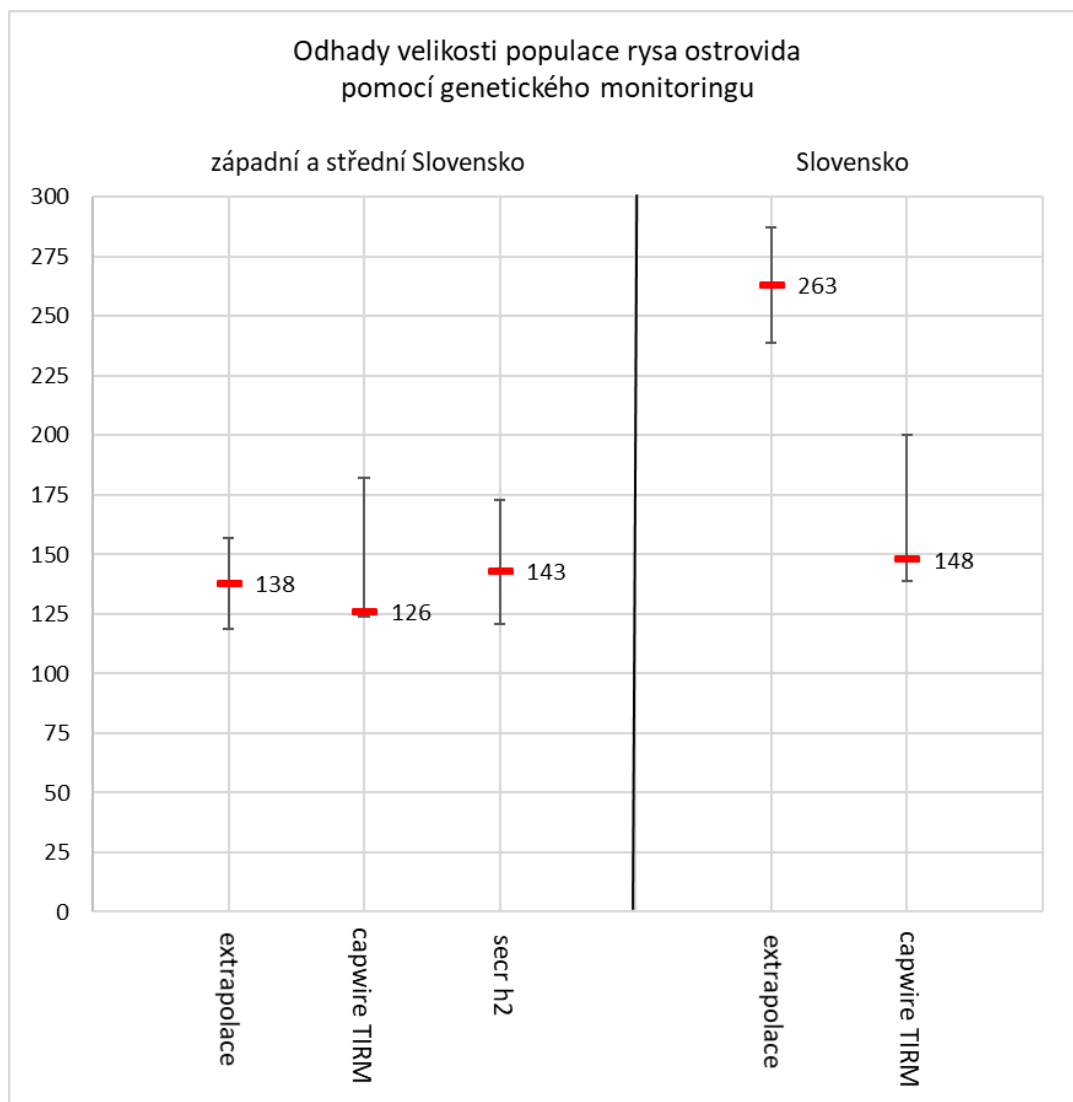
Pro stanovení co nejpřesnějšího odhadu za pomoci softwaru CAPWIRE je potřeba velké množství vzorků, opakovaných záchytů a také uzavřená populace. Software je také primárně stavěn pro odhady velikostí populací menších než 100 jedinců (Miller et al., 2005).

Tyto základní podmínky nebyly při analýze dat v této práci zcela splněny, o čemž vypovídají i široké konfidenční intervaly pro některé odhady. Při interpretaci výsledků je třeba na tento fakt brát ohled. V případě softwaru MARK je důležité homogenní vzorkování zkoumaných jedinců v čase. Vzhledem k metodice sběru vzorků v této práci nebyly intervaly záchytů jedinců rovnoměrně rozloženy v čase v rámci zkoumaného období, což může mít vliv na výsledky analýz. Nízký odhad velikosti populace na základě Hugginsonových modelů může být způsoben právě nekvalitními vstupními daty s nedostatečným počtem opakovaných záchytů.

I když je neinvazivní genetické vzorkování moderní metodou, pomocí které lze odhadnout početnost skrytě žijících druhů živočichů, její přesnost je závislá na intenzitě vzorkování a schopnosti rovnoměrně pokrýt zkoumané území v čase i prostoru. Vzhledem k malému množství opakovaných záchytů během dvou vzorkovacích sezón a nedostatečnému pokrytí předpokládaného areálu výskytu rysa ostrovida na Slovensku je třeba stanovené odhady populační hustoty a početnosti v této práci brát jako vůbec první náhled do odhadu velikosti populace rysa ostrovida za pomoci genetických dat. Výsledky jednoznačně ukazují na nutnost mnohem intenzivnějšího vzorkování pro získání přesnějších odhadů početnosti tohoto druhu.

## Populační hustota a velikost populace

Populační hustota rysa ostrovida na celém Slovensku byla dosud stanovována extrapolací na základě průměru populačních hustot získaných ve vybraných oblastech výskytu. Na základě této hodnoty poté byla vypočtena velikost populace rysa ostrovida vztažena k území stálého výskytu a vhodného habitatu (Kubala et al., 2017; Kubala et al., 2020; Duľa et al., 2021). Populační hustota vypočtena v této předkládané studii (0,94 jedinců na 100 km<sup>2</sup>) je totožná s nejnovějšími výsledky dlouhodobého monitoringu na základě fotopastí ve vybraných chráněných oblastech západního Slovenska (0,95 jedinců na 100 km<sup>2</sup>, Duľa et al., 2021 a 1,0 jedinců na 100 km<sup>2</sup>, Kubala et al., 2020). Tato skutečnost dokládá, že v relativně kvalitně ovzorkovaných oblastech je neinvazivní genetické vzorkování vhodnou alternativní metodou k fotomonitoringu.



**Obr. 30.:** Výsledky odhadů velikosti populace rýsa ostrovida na základě dat z genetického monitoringu

Odhady početnosti populace získané za pomoci několika různých metodických přístupů pro lépe ovzorkovanou část areálu výskytu (západní a jih středního Slovenska) jsou si podobné a je velice pravděpodobné, že pro tuto oblast Slovenska se blíží skutečnosti. Početnost rýsa ostrovida byla pro tuto oblast odhadnuta na 121–182 jedinců.

Na rozdíl od toho odhad pro celé Slovensko za pomoci metody Capwire je pravděpodobně podhodnocený nakolik počet vzorků získaných mimo oblast západního a jihu středního Slovenska byl velmi nízký (4 vzorky) a jejich přidání do hodnoceného datasetu už odhad početnosti téměř nezměnilo, jelikož software Capwire nebere v potaz prostorová data. Pro celé Slovensko lze proto spíše využít hodnoty získané extrapolací hodnot z lépe ovzorkovaných oblastí. Tento odhad udává početnost rýsa v rozmezí 239–287 jedinců. Využití této metody ovšem předpokládá stejnou populační hustotu rýsa ve všech oblastech v rámci areálu výskytu, což nemusí odpovídat realitě. V případě použití průměrných hodnot z několika zkoumaných oblastí mohou být ale výsledky velmi blízké reálnému stavu.

Početnost rýsa ostrovida na území Slovenska byla dosud stanovena pouze extrapolací hodnot získaných ve vybraných oblastech na základě fotomonitoringu a na základě mysliveckých statistik. Odhady velikosti populace stanovené v této práci jsou srovnatelné s odhady početnosti stanovené na základě fotomonitoringu, které odhadují početnost v rozsahu 200–400 jedinců

(Antal et al., 2017; Chapron et al., 2014; Kubala et al., 2017), nejnověji 193–337 jedinců (Duľa et al., 2021). Oficiální zpráva pro Evropskou komisi udává rovněž počet 200–400 jedinců (Černecký et al., 2020). Výsledky této genetické studie, při použití prostorových modelů, jsou tedy v souladu s těmito odhady. V porovnání s mysliveckými statistikami, které odhadují velikost populace rysa ostrovida na 1668 jedinců (Národní lesnícke centrum, 2019), je početnost stanovená v této práci až řádově nižší. To je způsobeno hlavně metodikou sčítání, kdy jeden jedinec může být započítán ve více revírech z důvodu velkého domovského okrsku jedinců rysa ostrovida.

## Vybrané oblasti v rámci slovenské populace

V rámci celé oblasti CHKO Kysuce bylo za pomoci fotopastí a terénního monitoringu v námi zkoumaném období zachyceno celkem 15 jedinců (ŠOP SR, pers. comm.). Genetický monitoring zachytil celkem 19 jedinců a CMR model odhadl velikost populace na 19 jedinců. Pro oblast Javorníků je populační hustota – 0,88 (0,64–1,21) jedinců na 100 km<sup>2</sup>, stanovená na základě dat z genetického monitoringu, srovnatelná s daty z monitoringu za použití fotopastí. Během let 2017–2019 byla na základě monitoringu za pomoci fotopastí v průměru stanovená populační hustota rysa ostrovida v oblasti Javorníků na  $0,92 \pm 0,23$  jedinců (0,7–1,15) na 100 km<sup>2</sup> a průměr počtu jedinců byl  $8,68 \pm 2,37$  (6,17–12,09) (Duľa et al., 2021). Na základě CMR modelu a dat z genetického monitoringu byly zachyceny 10 jedinců a početnost byla stanovena mírně vyšší, 10–14 jedinců.

Tato práce i nejnovější výsledky na základě dat z fotopastí ukazují, že v oblasti Javorníků došlo v průběhu posledních let pravděpodobně k nárůstu velikosti populace i populační hustoty rysů ostrovidů oproti období v letech 2009–2016 (Duľa et al., 2021; Krojerová-Prokešová et al., 2019). Důvodem odlišných výsledků na překrývajícím se zkoumaném území může být ale nejen zvětšení rysí populace, ale také meziroční fluktuace početnosti (Duľa et al., 2021).

V oblasti Kysucké vrchoviny byla ve stejném období let 2017–2019 pomocí fotomonitoringu stanovena průměrná populační hustota na  $1,57 \pm 0,4$  (1,03–2,2) jedinců na 100 km<sup>2</sup> vhodného habitatu (Duľa et al., 2021). Tento údaj je rovněž srovnatelný s odhadem na základě genetického monitoringu, který činí 1,0 (0,53–1,87) jedinců na 100 km<sup>2</sup>. Velikost populace byla za pomoci fotomonitoringu odhadnuta na  $16,55 \pm 4,68$  (10,17–22,18) jedinců (Duľa et al., 2021). Za pomoci genetických dat a CMR byla v této studii početnost odhadnuta srovnatelně na 14 (9–22) jedinců.

Pro oblast NP Velká Fatra, kde bylo za pomoci genetického monitoringu zachyceno 12 jedinců, je odhadovaná velikost populace na základě genetických dat 26 (16–68) jedinců výrazně nadhodnocena oproti odhadu na základě fotomonitoringu, který udává početnost  $15 \pm 5,27$  jedinců (Kubala et al. 2017). Příčinou je nedostatečné množství opakovaných záchytů dané populace v rámci projektu. Srovnání s daty z fotopastí ze stejného období ale naznačuje shodný počet zachycených jedinců oběma přístupy (ŠOP SR, pers. comm.).

Výsledek odhadu velikosti populace pro CHKO Strážovské vrchy je ve shodě s odhadem na základě fotomonitoringu, kde byla velikost populace rovněž odhadnuta na 8 jedinců (Kubala et al., 2020). Populační hustota za pomoci prostorově explicitních modelů zde nebyla odhadnuta z důvodu nerovnoměrného ovzorkování oblasti.



V případě NP Muránska planina nebylo možné z důvodu nedostatečného množství dat stanovit relevantní odhady velikosti populace za pomoci CMR metod. Celkem bylo zachyceno 10 jedinců. Odhadovaná velikost populace na základě fotomonitoringu byla odhadnuta na  $20,7 \pm 5,24$  jedinců (Smolko et al., 2018). Počet detekovaných jedinců pomocí fotopastí a terénního monitoringu v období 2017–2019 je srovnatelný s genetickými daty (Iľko, pers. comm.).

**Tab. 11:** Porovnání odhadů populační hustoty a početnosti rysa ostrovida na vybraných chráněných územích Slovenska na základě fotomonitoringu a terénního monitoringu a na základě genetických dat. \* údaj se vztahuje pro oblast celé CHKO Kysuce

Chráněné území	Výsledky na základě fotomonitoringu a terénního monitoringu		Výsledky na základě demografických analýz z genetických dat	
	Populační hustota (jedinců na 100 km <sup>2</sup> ) Velikost populace	Počet zachycených jedinců	Počet zachycených jedinců	Velikost populace CAPWIRE
CHKO Kysuce-Javorníky	$0,93 \pm 0,21$ $8,68 \pm 1,99$ (Duľa et al., 2021)	15* (Drengubiak, pers. comm.)	10	14 (10–14)
CHKO Kysuce-Kysucká vrch.	$1,57 \pm 0,29$ $16,55 \pm 3,14$ (Duľa et al., 2021)	15* (Drengubiak, pers. comm.)	9	14 (9–22)
CHKO Strážovské vrchy	$0,97 \pm 0,25$ 8 (Kubala et al., 2020)	X	6	8 (7–11)
NP Velká Fatra	$0,81 \pm 0,29$ $15 \pm 5,27$ (Kubala et al., 2017)	10 + mláďata (Apfelová, pers. comm.)	12	26 (16–68)
NP Muránska planina	1,5 (Iľko, pers. comm.)	8–12 (Iľko, pers. comm.)	10	X

Výsledky a srovnání početnosti a populační hustoty rysa ostrovida jak na celém území Slovenska, tak ve vybraných oblastech ukazují na nutnost kombinace genetického monitoringu s dalšími údaji získanými v terénu, ať už se jedná o determinaci jedinců za použití fotomonitoringu, tak o údaje o výskytu a pobytových znacích. Výsledky této studie ukazují, že odhady velikosti populace i populační hustoty z obou metod jsou srovnatelné. Pro získání komplexních znalostí o zkoumané populaci je nutná kombinace demografických metod a údajů z terénu s metodami ochranné genetiky. Jedním z hlavních problémů při srovnávání výsledků je různorodost dílčích zkoumaných území a nemožnost spojení výsledků studií díky nejednotné metodice či odlišným časovým úsekům, kdy je dané území monitorováno.

## Simulace dat

Pro ověření relevantnosti odhadů pomocí CMR modelů byly v této práci použity simulace datasetů na základě reálných záchytných dat. Tento přístup je vhodný pro validaci výsledků CMR odhadů a pro kontrolu kvality vzorkování a je používán i pro studie vysoce mobilních savců (Paterson et al., 2019; Wesson et al., 2023). Negativně binominální distribuce záchytů je

nejčastěji používanou distribucí pro simulaci záchyťových dat (Boyce et al., 2001; Stoklasa et al., 2022). I v našem případě se jednalo o statisticky nejvíce vhodnou distribuci.

Výsledky simulací ukazují, že odhady velikosti populace pomocí balíčku Capwire mohou být v případě této studie mírně podhodnocené. To je způsobeno hlavně nízkým počtem opakovaných záchyťů reálného datasetu a křivkou distribuce, která je negativně ovlivněna nízkým počtem opakovaných záchyťů.

Simulační studie SCR dat u rysů ve Francii naopak ukazuje, že prostorově explicitní modely mohou výsledné odhady velikosti populace lehce nadhodnocovat (Blanc et al., 2012).

## Analýza životaschopnosti populace

Životaschopnost a vývoj populace velkých šelem v čase je jedním z indikátorů stupně ohrožení velkých šelem. Na viabilitu populace lze pohlížet jak z demografického hlediska, kde hraje roli hlavně početnost populace, tak z genetického hlediska, kdy se zohledňuje genetická variabilita populace, koeficient inbreedingu a další faktory, které mají přímý vliv na zdraví populace (Linnel et al., 2008). V případě rysa ostrovida neexistují téměř žádné dostupné informace o demografické a genetické životaschopnosti populací.

Predikce vývoje populace rysa ostrovida na základě údajů o natalitě a mortalitě je klíčovým nástrojem pro plánování a management ochrany tohoto ohroženého druhu. Softwarové nástroje jako Vortex umožňují vytváření modelů populace založených na reálných biologických a ekologických datech, což umožňuje předpověď budoucího vývoje populace a identifikaci faktorů, které mohou mít vliv na její životaschopnost. Tyto informace umožňují lépe porozumět faktorům ovlivňujícím populaci a přijímat informovaná rozhodnutí pro zachování biodiverzity a ekologické stability.

Predikce v této studii ukazují, že současná populace je při průměrných hodnotách mortality stabilní a v následujících generacích nemusí dojít k výrazným změnám v početnosti. V případě maximálních a minimálních hodnotách mortality je očekávána extinkce a případně nárůst do naplnění nosné kapacity prostředí.

Je však důležité mít na paměti, že přesnost predikcí vývoje populace rysa ostrovida závisí na kvalitě a přesnosti vstupních dat. Proto je důležité neustále aktualizovat a zlepšovat monitorování populace a sběr relevantních dat pro vylepšení modelů.

## Efektivní velikost populace

Efektivní velikost populace je důležitým faktorem pro stanovení genetického zdraví populace a pro management ochrany druhu. Její monitoring v čase přispívá ke komplexnějšímu poznání stavu zkoumané populace. Pro zabránění rizika vyhynutí, inbreední deprese a vlivu genetického driftu by měla být efektivní velikost populace druhu alespoň 100 jedinců (Frankham et al., 2014), tedy dvakrát více, než bylo dlouhodobě uznáváno (Franklin, 1980). U malých populacích na rozdíl od velkých populací je ale zapotřebí brát v potaz komplexnější faktory ovlivňující fitness (García-Dorado, 2015).

Karpatská populace, stejně jako ostatní evropské i asijské populace, prošla v posledních generacích výrazným bottleneckem a její celková efektivní velikost populace v současné době nepřekračuje 80 jedinců (Bazzicalupo et al., 2022). Efektivní velikost slovenské populace rysa ostrovida stanovená v této práci je mírně nižší, než dříve stanovená efektivní velikost populace vypočtena na základě stejného mikrosatelitového panelu, která byla 53,7 (39,3–79,4) jedinců

(Gajdárová et al., 2023). Vzhledem k odhadované velikosti slovenské populace lze ale její efektivní velikost populace považovat za příznivou. Pro komplexní posouzení stavu populace je ale zapotřebí dlouhodobý genetický monitoring, který umožní porovnání vývoje efektivní velikosti populace v čase.

## Seznam literatury

Adcock, Z. C., MacLaren, A. R., Jones, R. M., Villamizar-Gomez, A., Wall, A. E., White Iv, K., & Forstner, M. R. J. (2022). Predicting surface abundance of federally threatened Jollyville Plateau Salamanders (*Eurycea tonkawae*) to inform management activities at a highly modified urban spring. *PeerJ*, 10, e13359. <https://doi.org/10.7717/peerj.13359>

Antal, V., Boroš, M., Čertíková, M., Ciberej, J., Dóczy, J., Find'o, S., Kaštier, P., Kropil, R., Kubala, J., Lukáč, J., Molnár, L., Paule, L., Rigg, R., Rybanič, R., Smolko, P., & Šramka, Š. (2017). Program starostlivosti o rysa ostrovida (*Lynx lynx*) na Slovensku.

Bazzicalupo, E., Lucena-Perez, M., Kleinman-Ruiz, D., Pavlov, A., Trajçe, A., Hoxha, B., Sanaja, B., Gurielidze, Z., Kerdikoshvili, N., Mamuchadze, J., Yarovenko, Y. A., Akkiev, M. I., Ratkiewicz, M., Saveljev, A. P., Melovski, D., Gavashelishvili, A., Schmidt, K., & Godoy, J. A. (2022). History, demography and genetic status of Balkan and Caucasian Lynx lynx (Linnaeus, 1758) populations revealed by genome-wide variation. *Diversity and Distributions*, 28, 65– 82. <https://doi.org/10.1111/ddi.13439>

Benschop, C., Haned, H., & Sijen, T. (2013). Consensus and pool profiles to assist in the analysis and interpretation of complex low template DNA mixtures. *International Journal of Legal Medicine*, 127(1), 11–23. <https://doi.org/10.1007/s00414-011-0647-5>

Blanc, L., Marboutin, E., Gatti, S. and Gimenez, O. (2013), Abundance of rare and elusive species: Empirical investigation of closed versus spatially explicit capture–recapture models with lynx as a case study. *The Journal of Wildlife Management*, 77: 372-378. <https://doi.org/10.1002/jwmg.453>

Boyce, M. S., MacKenzie, D. I., Bryan F. J. Manly, Haroldson, M. A., & Moody, D. (2001). Negative Binomial Models for Abundance Estimation of Multiple Closed Populations. *The Journal of Wildlife Management*, 65(3), 498–509. <https://doi.org/10.2307/3803103>

Breitenmoser-Würsten, C., Zimmermann, F., Stahl, P. W., Vandel, J. M., Molinari-Jobin, A., Molinari, P., Capt, S., & Breitenmoser, U. (2007). Spatial and social stability of a Eurasian lynx *Lynx lynx* population: An assessment of 10 years of observation in the Jura Mountains. *Wildlife Biology*, 13(4), 365–380. [https://doi.org/10.2981/0909-6396\(2007\)13\[365:SASSOA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2981/0909-6396(2007)13[365:SASSOA]2.0.CO;2)

Breitenmoser, U., Breitenmoser, C., Okarma, H., Kaphegyi, T., Kaphygyi, U., & Müller, U. (2000). Action Plan for the Conservation of the Eurasian Lynx in Europe (*Lynx lynx*).

Bull, J. K., Heurich, M., Saveljev, A. P., Schmidt, K., Fickel, J., & Förster, D. W. (2016). The effect of reintroductions on the genetic variability in Eurasian lynx populations: the cases of Bohemian–Bavarian and Vosges–Palatinian populations. *Conservation Genetics*, 17(5), 1229–

1234. <https://doi.org/10.1007/s10592-016-0839-0>

Carmichael, L. E., Clark, W., & Strobeck, (2000). Development and characterization of microsatellite loci from lynx (*Lynx canadensis*), and their use in other felids. *Molecular Ecology*, 9(12), 2197–2199. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2000.105323.x>

Černecký, J. et al. (2020) Správa o stave biotopov a druhov európskeho významu za obdobie rokov 2013–2018 v Slovenskej republike.

Červený, J., & Bufka, L. (1996). Lynx (*Lynx lynx*) in South-Western Bohemia. *Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemicae Brno*, 30(3), 16–33.

Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J. D. C., von Arx, M., Huber, D., Andrén, H., López-Bao, J. V., Adamec, M., Álvares, F., Anders, O., Balčiauskas, L., Balys, V., Bedő, P., Bego, F., Blanco, J. C., Breitenmoser, U., Brøseth, H., Bufka, L., Bunikyte, R., ... Boitani, L. (2014). Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. *Science*, 346(6216), 1517–1519. <https://doi.org/10.1126/science.1257553>

Davoli, F., Schmidt, K., Kowalczyk, R., & Randi, E. (2013). Hair snaring and molecular genetic identification for reconstructing the spatial structure of Eurasian lynx populations. *Mammalian Biology*, 78(2), 118–126. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2012.06.003>

Dufresnes, C., Remollino, N., Stoffel, C., Manz, R., Weber, J.-M., & Fumagalli, L. (2019). Two decades of non-invasive genetic monitoring of the grey wolves recolonizing the Alps support very limited dog introgression. *Scientific Reports*, 9(1), 148. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37331-x>

Duľa, M., Bojda, M., Chabanne, D. B. H., Drengubiak, P., Hrdý, Ľ., Krojerová-Prokešová, J., Kubala, J., Labuda, J., Marčáková, L., Oliveira, T., Smolko, P., Váňa, M., & Kutal, M. (2021). Multi-seasonal systematic camera-trapping reveals fluctuating densities and high turnover rates of Carpathian lynx on the western edge of its native range. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-88348-8>

Duľa, M., Drengubiak, P., Kutal, M., Trulík, V., & Hrdý, Ľ. (2015). Monitoring rysa ostrovida v CHKO Kysuce. January, 1–5.

Efford, M. (2022). *secr*: Spatially explicit capture-recapture models. R package version 4.5.8, <https://CRAN.R-project.org/package=secr>.

Eggert, L. S., Maldonado, J. E., & Fleischer, R. (2005). Nucleic acid isolation from ecological samples - Animal scat and other associated materials. *Methods in Enzymology*, 395, 73–82. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(05\)95006-4](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(05)95006-4)

Fležar, U., Aronsson, M., Černe, R. et al. (2023). Using heterogeneous camera-trapping sites to obtain the first density estimates for the transboundary Eurasian lynx (*Lynx lynx*) population in the Dinaric Mountains. *Biodivers Conserv*. <https://doi.org/10.1007/s10531-023-02646-3>

Find'o, S. (2013). Predpoklady a východiská odvodenia početnosti vlka na Slovensku.

Frankham, R., Bradshaw, J. A., & Brook, B. W. (2014). Genetics in conservation management: Revised recommendations for the 50/500 rules, Red List criteria and population viability

analyses. *Biological Conservation*. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.12.036>

Franklin IR.(1980). Evolutionary change in small populations. *Conservation Biology: An Evolutionary-Ecological Perspective*. Sinauer Associates: Sunderland, Massachusetts, 135–149

Fuller, M. R., & Fuller, T. K. (2012). Radio telemetry equipment and applications for carnivores. In L.

Boitani & R. A. Powell (Eds.), *Carnivore ecology and conservation: A handbook of techniques* (pp. 152–168). Oxford University Press. <http://pubs.er.usgs.gov/publication/70009640>

Gajdárová, B., Belotti, E., Bufka, L., Duľa, M., Kleven, O., Kutal, M., Ozoliņš, J., Nowak, C., Reiners, T. E., Tám, B., Volfová, J., & Krojerová-Prokešová, J. (2021). Long-distance Eurasian lynx dispersal – a prospect for connecting native and reintroduced populations in Central Europe. *Conservation Genetics*, 0123456789. <https://doi.org/10.1007/s10592-021-01363-0>

Gajdárová, B., Belotti E., Bufka L., Volfová J., Wöfl S., Mináriková T., Hollerbach L., Duľa M., Kleven O., Kutal M., Nowak C., Ozoliņš J., Tám B., Bryja J., Koubek P., Krojerová-Prokešová J. (2023). Long-term genetic monitoring of a reintroduced Eurasian lynx population does not indicate an ongoing loss of genetic diversity. *Global Ecology and Conservation*. Volume 42. 2351-9894. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2023.e02399>.

Galaverni, M., Palumbo, D., Fabbri, E., Caniglia, R., Greco, C., & Randi, E. (2012). Monitoring wolves (*Canis lupus*) by non-invasive genetics and camera trapping: A small-scale pilot study. *European Journal of Wildlife Research*, 58(1), 47–58. <https://doi.org/10.1007/s10344-011-0539-5>

García-Dorado, A. (2015) On the consequences of ignoring purging on genetic recommendations for minimum viable population rules. *Heredity* 115, 185–187 . <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.28>

Gilpin, M.E. and Soulé, M.E. (1986) Minimum viable populations: processes of species extinction. In *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity* (Soule', M.E., ed.), pp. 19–34, Sinauer Associates

Gimenez, O., Gatti, S., Duchamp, C., Germain, E., Laurent, A., Zimmermann, F., & Marboutin, E. (2019). Spatial density estimates of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in the French Jura and Vosges Mountains. *Ecology and Evolution*, 9(20), 11707–11715. <https://doi.org/10.1002/ece3.5668>

Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86(6), 485–486. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a111627>

Granjon, A.-C., Rowney, C., Vigilant, L. and Langergraber, K.E. (2017), Evaluating genetic capture-recapture using a chimpanzee population of known size. *Jour. Wild. Mgmt.*, 81: 279–288. <https://doi.org/10.1002/jwmg.21190>

Gregorová, E. (2004). Podmienky zachovania zdravej populácie Rysa ostrovida (*Lynx lynx carpathicus*) v Slovenských Karpatoch. In *Výskum a ochrana cicavcov na Slovensku*.

- Gugolz, D., Bernasconi, M. V., Breitenmoser-Würsten, C., & Wandeler, P. (2008). Historical DNA reveals the phylogenetic position of the extinct Alpine lynx. *Journal of Zoology*, 275(2), 201–208. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00428.x>
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F., & Cosson, J. F. (2005). A Spatial Statistical Model for Landscape Genetics. *Genetics*, 170(3), 1261–1280. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.033803>
- Guillot, G., Santos, F., & Estoup, A. (2011). Population genetics analysis using R and Geneland. 52.
- Gupta, M., Joshi, A., & Vidya, T. N. (2017). Effects of social organization, trap arrangement and density, sampling scale, and population density on bias in population size estimation using some common mark-recapture estimators. *PLoS ONE*, 12(3), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0173609>
- Hagen, S. B., Kopatz, A., Aspi, J., Kojola, I., & Eiken, H. G. (2015). Evidence of rapid change in genetic structure and diversity during range expansion in a recovering large terrestrial carnivore. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1807), 13–16. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0092>
- Hausknecht, R., Gula, R., Pirga, B., & Kuehn, R. (2007a). Urine - A source for noninvasive genetic monitoring in wildlife: Technical article. *Molecular Ecology Notes*, 7(2), 208–212. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01622.x>
- Hausknecht, R., Gula, R., Pirga, B., & Kuehn, R. (2007b). Urine - a source for noninvasive genetic monitoring in wildlife. *Molecular Ecology Notes*, 7(2), 208–212. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01622.x>
- Hellborg, L., Walker, W., Rueness, E. K., Stacy, J. E., Kojola, I., Valdmann, H., Vilà, C., Zimmermann, B., Jakobsen, K. S., & Ellegren, H. (2002). Differentiation and levels of genetic variation in northern European lynx (*Lynx lynx*) populations revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. *Conservation Genetics*, 3(2), 97–111. <https://doi.org/10.1023/A:1015217723287>
- Hemmingmoore, H., Aronsson, M., Åkesson, M., Persson, J., & Andrén, H. (2020). Evaluating habitat suitability and connectivity for a recolonizing large carnivore. *Biological Conservation*, 242(November 2019), 108352. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.108352>
- Herfindal, I., Linnell, J. D. C., Odden, J., Nilsen, E. B., & Andersen, R. (2005). Prey density, environmental productivity and home-range size in the Eurasian lynx (*Lynx lynx*). *Journal of Zoology*, 265(1), 63–71. <https://doi.org/10.1017/S0952836904006053>
- Hoffman, J. I., & Amos, W. (2005). Microsatellite genotyping errors: Detection approaches, common sources and consequences for paternal exclusion. *Molecular Ecology*, 14(2), 599–612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02419.x>
- Holmala, K., Herrero, A., Kopatz, A., Schregel, J., Eiken, H. G., & Hagen, S. B. (2018). Genetic evidence of female kin clusters in a continuous population of a solitary carnivore, the Eurasian lynx. *Ecology and Evolution*, 8(22), 10964–10975. <https://doi.org/10.1002/ece3.4562>

- Holmala, K., Mäntyniemi, S., & Heikkinen, J. (2019). Ilveskanta Suomessa 2019.
- Hulva, P., Černá Bolfiková, B., Woznicová, V., Jindřichová, M., Benešová, M., Mysłajek, R. W., Nowak, S., Szewczyk, M., Niedźwiecka, N., Figura, M., Hájková, A., Sándor, A. D., Zyka, V., Romportl, D., Kutal, M., Find'o, S., & Antal, V. (2018). Wolves at the crossroad: Fission–fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe. *Diversity and Distributions*, 24(2), 179–192. <https://doi.org/10.1111/ddi.12676>
- Jamnický, J. (1997). Hunting of lynx (*Lynx lynx* L.) and wild cat (*Felis silvestris* Schreb.) in Slovakia one hundred years ago. *Folia Venatoria*, 26–27, 211–219.
- Kaczensky, P., Chapron, G., von Arx, M., Huber, D., Andrén, H., & Linnell, J. (2013). Status, management and distribution of large carnivores – bear, lynx, wolf & wolverine – in Europe; Part 2 (Country summaries). IUCN/SSC Large Carnivore Initiative for Europe.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. (2007). Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16(5), 1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- Kalinowski, S. T., Wagner, A. P., & Taper, M. L. (2006). ML-RELATE: A computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes*, 6(2), 576–579. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x>
- Kelly, M. J., Morin, D., & López-González, A. (2016). *Lynx rufus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: The IUCN Red List of Threatened Species 2016, 8235. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T12521A50655874>
- Koen, E. L., Bowman, J., Lalor, J. L., & Wilson, P. J. (2014). Continental-scale assessment of the hybrid zone between bobcat and Canada lynx. *Biological Conservation*, 178, 107–115. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.07.016>
- Koivuniemi, M., Kurkilahti, M., Niemi, M., Auttila, M., & Kunnasranta, M. (2019). A mark–recapture approach for estimating population size of the endangered ringed seal (*Phoca hispida saimensis*). *PLOS ONE*, 14(3), e0214269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214269>
- Kojola, I., Määttä, E., & Hiltunen, H. (2006). Suurpetojen lukumäärä ja lisääntyminen vuonna 2005.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (2015). CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*, 15(5), 1179–1191. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Krojerová–Prokešová, J., Turbaková, B., Jelenčíč, M., Bojda, M., Kutal, M., Skrbinšek, T., Koubek, P., & Bryja, J. (2019). Genetic constraints of population expansion of the Carpathian lynx at the western edge of its native distribution range in Central Europe. *Heredity*, 122(6), 785–799. <https://doi.org/10.1038/s41437-018-0167-x>
- Krojerová J., Barančková M., Turbaková B., Homolka M., Koubek P., Kutal M., Duřa M., Bojda M., Slamka M., Bučko J., Sedliak M., Sujová K., Záhorec L., Hletko M. (2019). Štúdia

s odporúčaniami pre starostlivosť o veľké šelmy v cezhraničnom regióne SR-ČR. <http://selmyskcz.sopsr.sk/studia-s-odporucaniami/>

Kubala, J., Smolko, P., Zimmermann, F., Rigg, R., Tám, B., Il'ko, T., Foresti, D., Breitenmoser-Würsten, C., Kropil, R., & Breitenmoser, U. (2017). Robust monitoring of the Eurasian lynx *Lynx lynx* in the Slovak Carpathians reveals lower numbers than officially reported. *Oryx*, 53(3), 548–556. <https://doi.org/10.1017/S003060531700076X>

Kubala, J., Tám, B., Belák, M., Klinga, P., Il'ko, P., Kováč, P., & Guimarães, N. F. (2020). Monitoring rysa ostrovida (*Lynx lynx*) v Strážovských vrchoch a jeho význam pre národný a európsky manažment a ochranu druhu.

Kutal, M., Duľa, M., & Bojda, M. (2018). Dlouhodobý monitoring rysa ostrovida a vlka obecného v CHKO Beskydy a Kysuce.

Lacy, R.C., and J.P. Pollak. 2023. Vortex: A stochastic simulation of the extinction process. Version 10.6.0. Chicago Zoological Society, Brookfield, Illinois, USA

Linnell J., V. Salvatori & L. Boitani (2008). Guidelines for population level management plans for large carnivores in Europe. A Large Carnivore Initiative for Europe report prepared for the European Commission (contract 070501/2005/424162/MAR/B2).

Lucena-Pérez, M., Marmesat, E., Kleinman-Ruiz, D., Martínez-Cruz, B., Węcek, K., Saveljev, A. P., Seryodkin, I. V., Okhlopkov, I., Dvornikov, M. G., Ozoliņš, J., Galsandorj, N., Paunović, M., Ratkiewicz, M., Schmidt, K., & Godoy, J. A. (2020). Genomic patterns in the widespread Eurasian lynx shaped by Late Quaternary climatic fluctuations and anthropogenic impacts. *Molecular Ecology*, 29(4), 812–828. <https://doi.org/10.1111/mec.15366>

Luikart, G., Ryman, N., Tallmon, D. A., Schwartz, M. K., & Allendorf, F. W. (2010). Estimation of census and effective population sizes: the increasing usefulness of DNA-based approaches. *Conservation Genetics*, 11(2), 355–373. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0050-7>

Mengüllüoğlu, D., Fickel, J., Hofer, H., & Förster, D. W. (2019). Non-invasive faecal sampling reveals spatial organization and improves measures of genetic diversity for the conservation assessment of territorial species: Caucasian lynx as a case species. *PLoS ONE*, 14(5), 1–20. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216549>

Menotti-Raymond, M., David, V. A., Agarwala, R., Schäffer, A. A., Stephens, R., O'Brien, S. J., & Murphy, W. J. (2003). Radiation hybrid mapping of 304 novel microsatellites in the domestic cat genome. *Cytogenetic and Genome Research*, 102(1–4), 272–276. <https://doi.org/10.1159/000075762>

Menotti-Raymond, M., David, V. A., Lyons, L. A., Schäffer, A. A., Tomlin, J. F., Hutton, M. K., & O'Brien, S. J. (1999). A Genetic Linkage Map of Microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). *Genomics*, 57(1), 9–23. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5743>

Meyer D, Zeileis A, Hornik K (2023). vcd: Visualizing Categorical Data. R package version 1.4-11, <https://CRAN.R-project.org/package=vcd>.



Middelhoff, T. L. & Anders, O. (2018). Abundanz und Dichte des Luchses im östlichen Harz. Fotofallenmonitoring 2017, Projektbericht, Nationalpark Harz.

Miller, R., Joyce, P., & Waits, L. P. (2005). A new method for estimating the size of small populations from genetic mark-recapture data. *Molecular Ecology*, 14(7). <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02577.x>

Mináriková, T., Woelfl, S., Belloti, E., Engleder, T., Gahbauer, M., Volfová, J., Bufka, L., Poledník, L., Schwartz, M. K., Gerngross, P., Weingarh, K., Bednářová, H., Strnad, M., Zápotočný, S., Heurich, M., & Poláková, S. (2020). Lynx Monitoring Report for Bohemian–Bavarian–Austrian lynx population for Lynx year 2017 (2nd ed.).

Mueller, S. A., Reiners, T. E., Middelhoff, T. L., Anders, O., Kasperkiewicz, A., & Nowak, (2020). The rise of a large carnivore population in Central Europe: genetic evaluation of lynx reintroduction in the Harz Mountains. *Conservation Genetics*, 21(3), 577–587. <https://doi.org/10.1007/s10592-020-01270-w>

Mumma, M. A., Zieminski, C., Fuller, T. K., Mahoney, S. P., & Waits, L. P. (2015). Evaluating noninvasive genetic sampling techniques to estimate large carnivore abundance. *Molecular ecology resources*, 15(5), 1133–1144. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12390>

Navidi, W., Arnheim, N., & Waterman, M. S. (1992). A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. *American Journal of Human Genetics*, 50(2), 347–359. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1734715>

Národné lesnícke centrum. (2006). Poľovnícka štatistická ročenka Slovenskej republiky 2006, Zvolen

Národné lesnícke centrum. (2019). Poľovnícka štatistická ročenka Slovenskej republiky 2019, Zvolen

Nichols, J. D. (1992). Capture-Recapture Models. *BioScience*, 42(2), 94–102. <https://doi.org/10.2307/1311650>

Nilsson, T. (2013). Population Viability Analyses of the Scandinavian populations of bear (*Ursus arctos*), lynx (*Lynx lynx*) and wolverine (*Gulo gulo*). – Rapport 6549, Naturvårdsverket. <http://www.naturvardsverket.se/Documents/publikationer6400/978-91-620-6549-2.pdf?pid=7417>

Otis, D. L., Burnham, K. P., White, G. C., & Anderson, D. R. (1978). Statistical Inference from Capture Data on Closed Animal Populations. *Wildlife Monographs*, 62, 3–135. <http://www.jstor.org/stable/3830650>

Palmero, S., Belotti, E., Bufka, L. et al. Demography of a Eurasian lynx (*Lynx lynx*) population within a strictly protected area in Central Europe. *Sci Rep* 11, 19868 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99337-2>

Paterson, J. T., Proffitt, K., Jimenez, B., Rotella, J., & Garrott, R. (2019). Simulation-based validation of spatial capture-recapture models: A case study using mountain lions. *PloS one*, 14(4), e0215458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215458>

- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2006). genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288–295. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pennell, M. W., Stansbury, R., Waits, L. P., & Miller, R. (2013). CAPWIRE: A R package for estimating population census size from non-invasive genetic sampling. *Molecular Ecology Resources*, 13(1), 154–157. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12019>
- Pesenti, E., & Zimmermann, F. (2013). Density estimations of the Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in the Swiss Alps. *Journal of Mammalogy*, 94(1), 73–81. <https://doi.org/10.1644/11-MAMM-A-322.1>
- Pilgrim, K. L., Mckelvey, K. S., Riddle, A. E., & Schwartz, M. K. (2005). Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. *Molecular Ecology Notes*, 5(1), 60–61. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00831.x>
- Pledger S. (2000). Unified maximum likelihood estimates for closed capture-recapture models using mixtures. *Biometrics*, 56(2), 434–442. <https://doi.org/10.1111/j.0006-341x.2000.00434.x>
- Ratkiewicz, M., Matosiuk, M., Kowalczyk, R., Konopiński, M.K., Okarma, H., Ozolins, J., Männil, P., Ornicans, A. and Schmidt, K. (2012), Strong genetic differentiation among Eurasian lynx populations. *Anim Conserv*, 15: 603-612. <https://doi.org/10.1111/j.1469-1795.2012.00556.x>
- Rigg, R. (2007). Slovakia Wolf Census Project: Progress report.
- Rodríguez, A., & Calzada, J. (2015). *Lynx pardinus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2015, 8235, e.T12520A50655794.
- Ruben, I., Viorel, P., Liviu, U., Șerban, C., Sulică, B., Terciu, L., Bîrloiu, D., Țoanță, C., & Promberger-Fürpass, B. (2020). Report on monitoring Eurasian lynx using camera trapping Luikartin the Romanian Carpathians.
- Ruell, E. W., & Crooks, K. R. (2007). Evaluation of Noninvasive Genetic Sampling Methods for Felid and Canid Populations. *Journal of Wildlife Management*, 71(5), 1690–1694. <https://doi.org/10.2193/2006-061>
- Salvatori, V., Okarma, H., Ionescu, O., Dovhanych, Y., Find'o, S., & Boitani, L. (2002). Hunting legislation in the Carpathian Mountains: implications for the conservation and management of large carnivores. *Wildlife Biology*, 8(1), 3–10. <https://doi.org/10.2981/wlb.2002.002>
- Sauvé C., Berentsen A. R., Gilbert A. T., Conan A., Cruz-Martinez L., & Leighton P. A. (2022) Capture-Recapture Reveals Heterogeneity in Habitat-Specific Mongoose Densities and Spatiotemporal Variability in Trapping Success in St. Kitts, West Indies. *Caribbean Journal of Science*, 52(1), 63-81. <https://doi.org/10.18475/cjos.v52i1.a6>

- Schadt, S., Revilla, E., Wiegand, T., Knauer, F., Kaczensky, P., Breitenmoser, U., Bufka, L., Červený, J., Koubek, P., Huber, T., Staniša, C., & Trepl, L. (2002). Assessing the suitability of central European landscapes for the reintroduction of Eurasian lynx. *Journal of Applied Ecology*, 39(2), 189–203. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2002.00700.x>
- Schrader, C., Schielke, A., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2012). PCR inhibitors - occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5), 1014–1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Schwartz, M. K., Luikart, G., & Waples, R. S. (2007). Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in ecology & evolution*, 22(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.08.009>
- Sindičić, M., Polanc, P., Gomerčić, T., Jelenčič, M., Huber, Đ., Trontelj, P., & Skrbinšek, T. (2013). Genetic data confirm critical status of the reintroduced Dinaric population of Eurasian lynx. *Conservation Genetics*, 14(5), 1009–1018. <https://doi.org/10.1007/s10592-013-0491-x>
- Smolko, P., Kubala, J., Klinga, P., Tám, B., Il'ko, T., Tesák, J., & Guimarães, N. F. (2018). Lynx Monitoring in the Muránska Planina Np, Slovakia and Its Importance for the National and European Management and Conservation of the Species. *March*, 30.
- Solberg, Knut & Bellemain, Eva & Drageset, Ola-Mattis & Taberlet, Pierre & Swenson, Jon. (2006). An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. *Biological Conservation*. 128. 158-168. [10.1016/j.biocon.2005.09.025](https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.025).
- Sommer, R. S., & Benecke, N. (2006). Late Pleistocene and Holocene development of the felid fauna (Felidae) of Europe: A review. *Journal of Zoology*, 269(1), 7–19. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2005.00040.x>
- Stanley, T.R., and Burnham K.P. (1999). A closure test for time-specific capture-recapture data. *Environmental and Ecological Statistics* 6: 197-209.
- Stanley, T. R., & Richards, J. D. (2005). A Program for Testing Capture-Recapture Data for Closure. *Wildlife Society Bulletin* (1973-2006), 33(2), 782–785. <http://www.jstor.org/stable/3785116>
- Steyer, K., Simon, O., Kraus, R. H. S., Haase, P., & Nowak, (2013). Hair trapping with valerian-treated lure sticks as a tool for genetic wildcat monitoring in low-density habitats. *European Journal of Wildlife Research*, 59(1), 39–46. <https://doi.org/10.1007/s10344-012-0644-0>
- Stoklosa J, Blakey RV, Hui FK(2022) An Overview of Modern Applications of Negative Binomial Modelling in Ecology and Biodiversity. *Diversity*; 14(5):320. <https://doi.org/10.3390/d14050320>
- Sunde, P., Kvam, T., Moa, P. F., Negård, A., & Overskaug, K. (2000). Space use by Eurasian lynxes *Lynx lynx* in central Norway. *Acta Theriologica*, 45, 507–524. <https://doi.org/10.4098/AT.arch.00-50>
- Taberlet, P. (1996). Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research*, 24(16), 3189–3194. <https://doi.org/10.1093/nar/24.16.3189>

Taberlet, P., Luikart, G., & Waits, L. P. (1999). Noninvasive genetic sampling: Look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution*, 14(8), 323–327. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01637-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01637-7)

Turbaková, B. (2014). *Genetika rýsa ostrovida v Západních Karpatech*. Masarykova Univerzita v Brně.

Valière, N. (2002). GIMLET: A computer program for analysing genetic individual identification data. *Molecular Ecology Notes*, 2(3), 377–379. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2002.00228.x>

Venables WN, Ripley BD (2002). *Modern Applied Statistics with S*, Fourth edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0, <https://www.stats.ox.ac.uk/pub/MASS4/>.

Velli, E., Bologna, M. A., Silvia, C., Ragni, B., & Randi, E. (2015). Non-invasive monitoring of the European wildcat (*Felis silvestris silvestris* Schreber, 1777): comparative analysis of three different monitoring techniques and evaluation of their integration. *European Journal of Wildlife Research*, 61(5), 657–668. <https://doi.org/10.1007/s10344-015-0936-2>

von Arx, M., Breitenmoser-Würsten, C., Zimmermann, F., & Breitenmoser, U. (2004). Status and conservation of the Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Europe in 2001.

Wang, J. (2017). Estimating pairwise relatedness in a small sample of individuals. *Heredity*, 119(5), 302–313. <https://doi.org/10.1038/hdy.2017.52>

Waples, Robin and Do, Chi,. (2008) "LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium" . Publications, Agencies and Staff of the U.S. Department of Commerce. 471. <https://digitalcommons.unl.edu/usdeptcommercepub/471>

Waples, R. S., & Do, (2010). Linkage disequilibrium estimates of contemporary  $N_e$  using highly variable genetic markers: a largely untapped resource for applied conservation and evolution. *Evolutionary applications*, 3(3), 244–262. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2009.00104.x>

Wesson, P., Jewell, N. P., McFarland, W., & Glymour, M. M. (2023). Evaluating tools for capture-recapture model selection to estimate the size of hidden populations: it works in practice, but does it work in theory?. *Annals of epidemiology*, 77, 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2022.10.010>

White, G. C., & Burnham, K. P. (1999). Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Study*, 46(sup1), S120–S139. <https://doi.org/10.1080/00063659909477239>

Wulsch, C., Waits, L. P., Hallerman, E. M., & Kelly, M. J. (2015). Optimizing collection methods for noninvasive genetic sampling of neotropical felids. *Wildlife Society Bulletin*, 39(2), 403–412. <https://doi.org/10.1002/wsb.540>

Zimmermann, F. (2004). Conservation of the Eurasian Lynx (*Lynx lynx*) in a fragmented landscape – habitat models, dispersal and potential distribution (PhD Thesis). *Wildlife Biology*, 13(4), 406.

<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.136.9701&rep=rep1&type=pdf>

Zimmermann, F., Breitenmoser-Würsten, C., & Breitenmoser, U. (2005). Natal dispersal of Eurasian lynx (*Lynx lynx*) in Switzerland. *Journal of Zoology*, 267(4), 381–395. <https://doi.org/10.1017/S0952836905007>

# Přílohy

## Příloha 1

Tabulka zpracovaných vzorků

Kód vzorku	Typ vzorku	Donor	Projekt /laboratorní analýza	Lokalita	Datum	Úspěšnost	Pohlaví
03/2020	trus	Špyrka K.	Velké šelmy 2/Přf UK	RSOPK Prešov	21.2.2019	1	m
03/2021	trus	Špyrka K.	Velké šelmy 2/Přf UK	RSOPK Prešov	21.2.2019	0	
03/vin1	tkáň	Trojčák R.	Velké šelmy 2/Přf UK	RSOPK Prešov	07.04.18	1	m
04/2014	trus	Tajboš M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Tatranský národní park	27.3.2018	0	
04/2018	trus	Tajboš M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Tatranský národní park	15.4.2018	0	
04/2026	trus	Tajboš M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Tatranský národní park	5.4.2018	0	
04/2027	trus	Tajboš M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Tatranský národní park	15.4.2018	0	
04/0100	trus	Zimmermann P.	Velké šelmy 2/Přf UK	Tatranský národní park	15.02.19	1	m
04/VIN1	trus	Ksiažek J.	Velké šelmy 2/Přf UK	Tatranský národní park	22.11.2018	0	
05/1970	trus	Ondruš S.	Velké šelmy 2/Přf UK	Nízke Tatry	31.7.2018	0	
05/0081-1	trus	Dzuríková E.	Velké šelmy 2/Přf UK	Nízke Tatry	15.03.18	1	m
05/1987	trus	Mistrík R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Nízke Tatry	9.3.2018	0	
05/1988	tkáň	Ondruš S.	Velké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	09.04.18	1	f
05/1991	trus	Devečka V.	Velké šelmy 2/Přf UK	Nízke Tatry	22.1.2019	1	f
05/1993	trus	Bornémisa P.	Velké šelmy 2/Přf UK	Nízke Tatry	15.2.2019	0	
06/ID83803	stěr	Kalaš M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Malá Fatra		1	f
07/2012	moč	ŠOP	Velké šelmy 2/Přf UK	Slovenský raj		0	

07/2018	trus	Lehocký M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský raj	4.3.2018	0	
07/2020	trus	Lehocký M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský raj	26.3.2018	0	
07/2027	trus	Lehocký M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský raj	22.01.19	1	f
07/1940	trus	Lehocký M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský raj	16.01.19	1	f
07/1942	trus	Lehocký M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský raj	22.01.19	1	f
08/2004	trus	Balko P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	14.1.2019	0	
08/2015	trus	Bryndza P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	26.2.2019	0	
08/2018	trus	Brndiar J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	22.1.2018	0	
08/2022	trus	Brndiar J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	14.12.18	1	f
08/1934	trus	Brndiar J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	12.03.18	1	m
08/1958	tkáň	Iľko T.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	20.03.18	1	f
08/1960	trus	Bošmovičová E.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	14.2.2019	0	
08/1976	moč	Iľko T.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	23.1.2018	0	
08/1982	moč	Balko P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	17.12.2018	0	
08/1984	trus	Tesák Jerguš	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	28.12.18	1	f
08/1990	trus	Iľko T.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	10.2.2019	0	
08/1993	trus	Balko P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	22.3.2019	0	
08/0102	srst	Tesák Jerguš	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	01.03.18	1	f
08/0107	trus	Brndiar J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	20.1.2019	0	
08/0151	srst	Tesák Jerguš	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	20.12.2018	0	
08/0165	trus	Mičko Henrich	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	14.2.2019	0	
08/0170	moč	Saxa a Pastorok	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	14.2.2019	0	

08/0171	tkáň	Iľko T.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	23.01.19	1	f
08/0185	trus	Iľko T.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	25.2.2019	0	
08/0190	trus	Bariula J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	14.2.2019	0	
08/0230	trus	Stotica	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	11.04.19	1	m
08/0231	trus	Galko	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	14.2.2019	0	
08/0233	trus	Bryndza P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	22.01.19	1	m
10/2003	trus	Štofík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poloniny	4.1.2018	0	
10/2005	moč	ŠOP	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poloniny	26.1.2018	0	
10/2017	trus	Štofík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poloniny	4.1.2018	0	
10/1964	trus	Štofík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poloniny	26.2.2018	0	
10/1969	trus	Macejka V.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poloniny	08.02.18	1	m
10/1984	trus	Štofík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poloniny	7.2.2018	0	
10/0106	trus	Štofík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poloniny	23.3.2018	0	
10/0119	trus	Štofík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poloniny	29.3.2018	0	
10/0150	trus	Štofík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poloniny	5.12.2018	0	
14/0001	trus	ŠOP	Veľké šelmy 2/Přf UK	Biele Karpaty		1	f
14/OU1	trus	Rechtorik P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Biele Karpaty	27.4.2019	0	
15/0047	trus	Drengubiak P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Kysuce	13.4.2018	0	
15/0048	trus	Drengubiak P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Kysuce	13.4.2018	0	
15/0055	trus	Drengubiak P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Kysuce	28.11.18	1	m
15/0062	trus	Drengubiak P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Javorníky	05.02.19	1	m
15/0078	trus	Drengubiak P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Kysuce	02.02.19	1	m



15/0081	trus	Drengubiak P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Kysuce	10.1.2019	0	
15/0115	trus	Drengubiak P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Kysuce	16.2.2019	0	
15/0116	trus	Drengubiak P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Kysuce	23.02.19	1	m
16/0001	trus	Machciník B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	05.01.18	1	m
16/0001	trus	Machciník B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	5.1.2018	0	
16/0002	trus	ŠOP	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	24.1.2018	0	
16/0003	trus	Machciník B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	06.02.18	1	f
16/0004	trus	Kružliaková E.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	6.2.2018	0	
16/0005	trus	Machciník B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	09.02.18	1	m
16/0006	trus	Pecík P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	12.2.2018	0	
16/0007	trus	Machciník B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	20.02.18	1	m
16/0008	trus	Pecík P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	20.02.18	1	m
16/0009	trus	Machciník B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	21.2.2018	0	
16/0010	trus	Machciník B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	21.2.2018	0	
16/0011	trus	Pecík P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	21.02.18	1	m
16/0012	trus	Pecík P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	26.2.2018	0	
16/0013	trus	Pecík P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Javorníky	23.02.18	1	m
16/0014	trus	Machciník B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	20.01.18	1	m
16/0015	trus	Machciník B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Javorníky	23.02.18	1	m
16/0016	trus	Pecik P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	20.3.2018	0	
16/0017	trus	Machcinik B.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Strážovské vrchy	20.3.2018	0	
17/0034	trus	Rutt kay L.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Ponitrie	11.3.2019	0	

17/0036	trus	Ruttkay L.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Ponitrie	05.02.19	1	f
17/0037	trus	Masaryk P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Ponitrie	28.1.2019	0	
19/0004	moč	Vantara P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	9.3.2018	0	
19/0007	moč	Štofík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra		0	
19/0010	moč	ŠOP	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra		0	
19/0018	moč	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	9.2.2018	0	
19/0019	moč	Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	20.02.18	1	m
19/0020	moč	Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	20.2.2018	0	
19/0023	trus	Macek Metod	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	19.12.2017	0	
19/0024	moč	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	15.2.2018	0	
19/0025	moč	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	21.2.2018	0	
19/0026	moč	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	22.02.18	1	m
19/0032	trus	Ivon Milan	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	14.3.2018	0	
19/0033	trus	Ivan Milan	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	14.3.2018	0	
19/0034	trus	Ivon Milan	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	15.3.2018	0	
19/0049	srst	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	27.1.2018	0	
19/0050	trus	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	26.01.18	1	m
19/0060	trus	Žiak J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	15.3.2018	0	
19/0066	trus	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	20.3.2018	0	
19/0070	trus	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	27.1.2018	0	
19/0080	trus	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	20.2.2018	0	
19/0107	trus	Apfel E.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	6.2.2018	0	

19/0113	trus	Rechtorik P.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	17.3.2018	0	
19/0123	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	22.2.2018	0	
19/0124	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	22.2.2018	0	
19/0126	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	22.02.18	1	m
19/0127	srst	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	26.2.2018	0	
19/0130	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	25.2.2018	0	
19/0132	trus	Apfelová M. Apfel E.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	15.3.2018	0	
19/0134	trus	Apfelová M. Retkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	15.3.2018	0	
19/0135	trus	Apfelová M. Retkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	15.3.2018	0	
19/0140	trus	Apfelová M. Retkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	5.3.2018	0	
19/0141	srst	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	5.3.2018	0	
19/0142	srst	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	05.03.18	1	m
19/0152	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	14.2.2018	0	
19/0153	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	14.02.18	1	m
19/0155	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	29.3.2018	0	
19/0187	trus	Fančí ml.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	29.3.2018	0	
19/0191	trus	Apfelová M. Retkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	7.8.2018	0	
19/0192	trus	ŠOP	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	15.4.2018	0	
19/0201	trus	Bzinská	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	13.4.2018	0	
19/0251	trus	Apfel E.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	3.4.2018	0	
19/0267	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	18.04.18	1	m
19/0285	srst	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	13.12.2018	0	

19/0286	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	18.12.18	1	f
19/0288	trus	Olekšák M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra		0	
19/0289	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	18.01.19	1	m
19/0291	trus	Apfelová M. Reřkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	30.01.19	1	f
19/0292	trus	Apfelová M. Reřkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	30.1.2019	0	
19/0296	trus	Apfelová M. Reřkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	26.1.2019	0	
19/0297	trus	Reçtorík P. Mikuřková Katarína	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	26.1.2019	0	
19/0298	trus	Reçtorík P. Mikuřková K.	Velké šelmy 2/Přf UK	Malá Fatra	26.01.19	1	m
19/0300	trus	Reçtorík P. Mikuřková K.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	13.03.19	1	f
19/0309	trus	Reçtorík P. Mikuřková K.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	15.5.2018	0	
19/0322	trus	řOP	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra		0	
19/0323	trus	Apfelová M. Reřkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	2.11.2018	0	
19/0326	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	2.11.2018	0	
19/0333	trus	Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	22.3.2019	0	
19/0342	trus	řOP	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra		0	
19/0349	trus	Hrúz V. Apfelová M.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	24.1.2019	0	
19/0350	trus	Apfelová M. Reřkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	24.1.2019	0	
19/0351	trus	Apfelová M. Reřkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	24.01.19	1	f
19/0352	trus	Apfelová M. Reřkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	24.1.2019	0	
19/0353	trus	Apfelová M. Reřkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	05.02.19	1	f
19/0354	trus	Apfelová M. Reřkovský R.	Velké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	06.02.19	1	m

19/0355	trus	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	27.2.2019	0	
19/0358	trus	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	13.3.2019	0	
19/0359	srst	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	13.3.2019	0	
19/0360	srst	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	13.3.2019	0	
19/0361	srst	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	13.3.2019	0	
19/0362	srst	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	13.3.2019	0	
19/0364	trus	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	21.5.2019	0	
19/0367	trus	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	19.3.2019	0	
19/0382	srst	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Malá Fatra	28.11.18	1	m
19/0435	trus	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	6.2.2019	0	
19/0451	trus	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	26.11.2018	0	
19/ID83799	srst	ŠOP	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra		1	m
19/ID83800	srst	ŠOP	Veľké šelmy 2/Přf UK	Malá Fatra		1	m
19/ID83802	srst	ŠOP	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra		1	f
19/LL3	trus	Rechtorik P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	11.11.2017	0	
19/LL4	trus	Rechtorik P.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	18.11.2017	0	
19/OU24	trus	Apfelová M. Reťkovský R.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	14.1.2018	0	
19/OU25	trus	Švábik M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	10.3.2018	0	
19/OU26	trus	Švábik M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Velká Fatra	19.5.2018	0	
20/ID83801	srst	ŠOP	Veľké šelmy 2/Přf UK	Horná Orava		1	m
21/0001	trus	Švábik M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	31.1.2018	0	
21/0002	trus	Bariak Jan	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	31.1.2018	0	

21/0010	trus	Bariak Jan	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	31.01.18	1	f
21/0011	trus	Kučera M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	25.1.2018	0	
21/0012	trus	Jarný M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	3.2.2018	0	
21/0017	trus	Jarný M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	3.2.2018	0	
21/0020	trus	Jarný M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	31.01.18	1	f
21/0021	trus	Kučera M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	3.2.2018	0	
21/0027	trus	Jarný M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	5.2.2018	0	
21/0028	trus	Bariak J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Poľana	5.2.2018	0	
22/0011	trus	Bariak J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Cerová vrchovina	10.3.2018	0	
22/0016	trus	Brndiar J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Muránska planina	06.03.19	1	f
23/0002	moč	Brndiar J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský kras	10.1.2019	0	
23/0005	moč	Csík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský kras	10.1.2019	0	
23/0006	moč	Csík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský kras	18.1.2019	0	
23/0007	trus	Csík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský kras	18.12.2018	0	
23/LL5	tkáň	Apfelová M.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Slovenský kras	10.11.17	1	m
24/0010	trus	Csík J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Východné Karpaty	29.11.2018	0	
24/VIN1	tkáň	Rusinko J.	Veľké šelmy 2/Přf UK	Východné Karpaty	15.12.17	1	m
V646	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	27.02.16	1	m
15/0011	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	09.01.18	1	m
15/0076	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	17.01.19	1	m

15/0077	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	22.01.19	1	m
15/0078	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	02.02.19	1	m
15/0080	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	24.01.19	1	m
V902	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Horná Orava	28.01.18	1	m
G1675	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Horná Orava	17.11.18	1	m
G834	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	03.11.17	1	m
V889	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Horná Orava	14.10.17	1	m
15/0093	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	17.02.19	1	m
15/0097	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	09.02.19	1	m
15/0115	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	16.02.19	1	m
15/0116	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	23.02.19	1	m
V990	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	02.01.18	1	m
V595	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Horná Orava	14.10.17	1	f
16/0002	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	24.01.18	1	m
16/0005	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	09.02.18	1	m
16/0007	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	20.02.18	1	m

16/0008	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	20.02.18	1	m
16/0011	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	21.02.18	1	m
16/0017	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	20.03.18	1	m
06/0108	moč	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Malá Fatra	20.02.18	1	m
G1683	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Malá Fatra	11.02.19	1	m
16/0004	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	06.02.18	1	f
16/0003	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	06.02.18	1	f
16/0033	krev	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	08.02.19	1	f
16/0038	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	28.02.19	1	f
15/0012	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	18.01.18	1	m
15/0055	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	28.11.18	1	m
16/0006	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	12.02.18	1	m
16/0020	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	27.12.18	1	m
16/0024	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	21.01.19	1	m
Roman	krev	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	09.12.18	1	m
G1680	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	17.02.19	1	m



G1681	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	17.02.19	1	m
Zihlavny	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	10.02.19	1	m
16/0001	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	05.01.18	1	m
16/0009	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	21.02.18	1	m
15/0016	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	31.01.18	1	m
K034	moč	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Malá Fatra	07.03.18	1	m
15/0073	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Kysuce	02.02.19	1	m
ch1127	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Malá Fatra	13.03.19	1	f
53	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	15.01.18	1	f
16/0010	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Strážovské vrchy	21.02.18	1	f
11	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Malá Fatra	30.12.18	1	m
G2101	srst	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Horná Orava	17.11.19	1	m
G2103	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Horná Orava	17.11.19	1	m
19/0295	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Malá Fatra	26.01.19	1	f
19/0299	srst	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Malá Fatra	26.01.19	1	m
G2102	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Horná Orava	07.12.19	1	f

15/0062	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	05.02.19	1	m
15/0063	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	05.02.19	1	m
16/0015	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	23.02.18	1	m
G1671	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	16.02.18	1	m
G1673	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	16.02.19	1	m
G1905	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	30.09.18	1	m
G697	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	07.01.18	1	m
G775	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	22.12.17	1	m
G935	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	05.03.18	1	m
G940	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	23.02.18	1	m
K074	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	28.01.18	1	m
V499	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	12.08.17	1	m
15/0006	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	22.02.18	1	f
15/0035	srst s kůží	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	17.02.18	1	f
16/0013	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	23.02.18	1	m
16/0019	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	03.12.18	1	m

16/0028	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	07.02.19	1	m
16/0029	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	09.02.19	1	m
16/0032	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	17.02.19	1	m
16/0035	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	17.02.19	1	m
16/0036	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	17.02.19	1	m
16/0042	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	01.04.19	1	m
G1857	srst	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	22.03.19	1	m
G1903	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	26.09.18	1	m
G1923	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	05.03.18	1	m
G798	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	20.01.18	1	m
G826	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	18.02.18	1	m
16/0026	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	25.01.19	1	m
16/0030	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	09.02.19	1	m
16/0031	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	16.02.19	1	m
16/0040	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	29.03.19	1	m
bez kodu	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	25.02.17	1	m

G929	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	03.02.18	1	m
G930	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	03.02.18	1	m
G931	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	03.02.18	1	m
V893	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	14.01.18	1	m
G765	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	30.01.18	1	m
K080	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	18.02.18	1	f
15/0030	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	22.02.18	1	m
15/0034	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	17.02.18	1	m
15/0041	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	10.03.18	1	m
16/0027	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	02.02.19	1	m
G1901	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	31.10.18	1	m
G1902	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	31.10.18	1	m
G1907	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	16.12.17	1	m
G829	trus	Hnutí DUHA	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	17.02.18	1	m
16/0037	trus	ŠOP	Šelmy SKCZ/ÚBO AVČR	Javorníky	17.02.19	1	f

**Příloha 2:** PCR protokol 15 mikrosatelitových lokusů rozdělených do dvou multiplexů A a B.

<b>Multiplex A</b>		<b>Multiplex B</b>	
<b>Primer</b>	<b>Koncentrace v primer mixu</b>	<b>Primer</b>	<b>Koncentrace v primer mixu</b>
LC106	5µM	LC110	5µM
FCA035	2,5µM	FCA232	1µM
FCA149	1µM	F53	2,5µM
FCA008	1µM	FCA077	1µM
FCA506	5µM	FCA476	5µM
FCA031	2,5µM	FCA096	2,5µM
FCA001	1µM	FCA208	5µM
F115	1µM	amelogenin	1µM
<b>PCR Protokol</b>		<b>PCR Protokol</b>	
<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>	<b>Teplota</b>	<b>Čas</b>
95°C	15 min	95°C	15 min
95°C	30 s	95°C	30 s
51,5°C	90 s	54°C	90 s
72°C	60 s	72°C	60 s
72°C	30 min	72°C	30 min
4°C	∞	4°C	∞