

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

**FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

**KATEDRA EKOLOGIE**



**Odhad početnosti populace z neinvazivních  
genetických vzorků**

Population size estimation from noninvasive genetic  
samples

Bakalářská práce

Bakalant: Hana Pelikánová

Vedoucí: Ing. Jana Svobodová, Ph.D.

2020

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Hana Pelikánová

Environmentální vědy  
Aplikovaná ekologie

Název práce

Odhad početnosti populace z neinvazivních genetických vzorků

Název anglicky

Population size estimation from noninvasive genetic samples

---

### Cíle práce

Určení velikosti populace je nezbytné pro účinnou ochranu ohrožených druhů. Problém však může nastat u životu nebezpečných či skrytě žijících živočichů. Stanovení počtu různých genotypů z neinvazivních vzorků jako jsou chlupy, trus, peří mohou poskytnout relevantní odhady početnosti (Taberlet et al. 1997, Arrendal et al. 2007). Nicméně díky chybám při genotypizaci neinvazivních vzorků však může docházet často k nadhodnocení početnosti (Creel et al. 2003, Lukacs & Burnham 2005, Petti & Valiere 2006). Problematikou odhadů početnosti z neinvazivních vzorků se bude zabývat tato práce.

1. Práce podá stručný přehled o genetických markerech a neinvazivních metodách, které se používají v ochranářské genetice.
2. Dále práce zhodnotí, jaké metody se používají pro odhad velikosti populací.

### Metodika

Články budou vyhledány pomocí databáze WOS.

**Doporučený rozsah práce**

20 stran

**Klíčová slova**

mtDNA, mikrosatelity, neinvazivní vzorkování, SNP, velikost populace

---

**Doporučené zdroje informací**

- Arrendal J et al. 2007. Reliability of noninvasive genetic census of otters compared to field censuses. *Conservation Genetics* 8: 1097–1107
- Creel S et al. 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* 12: 2003–2009
- Lukacs PM, Burnham KP 2005. Review of capture–recapture methods applicable to noninvasive genetic sampling. *Molecular Ecology* 14: 3909–3919
- Petti E, Valiere N 2006. Estimating Population Size with Noninvasive Capture-Mark-Recapture Data. *Conservation Biology* 20: 1062–1073
- Taberlet et al. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6: 869–876

---

**Předběžný termín obhajoby**

2019/20 LS – FŽP

**Vedoucí práce**

Ing. Jana Svobodová, Ph.D.

**Garantující pracoviště**

Katedra ekologie

---

Elektronicky schváleno dne 5. 3. 2020

doc. Ing. Jirí Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

---

Elektronicky schváleno dne 9. 3. 2020

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 31. 03. 2020

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama pod vedením Ing. Jany Svobodové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny použité literární prameny, ze kterých jsem čerpala. Prohlašuji také, že tištěná verze se shoduje s verzí odevzdanou přes Univerzitní informační systém.

V Říčanech dne 27.6. 2020

.....

Pelikánová Hana

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat mé vedoucí práce Ing. Janě Svobodové, Ph.D. za čas, který mi obětovala, a za informace a taje v ochranářské ekologii. Posléze za její odbornou pomoc při vedení mé práce a množství cenných rad. Dále bych chtěla poděkovat své rodině za jejich podporu po celou dobu mého studia.

## Abstrakt

Určení velikosti populace a odhad její efektivní velikosti ( $N_e$ ) je nezbytné pro ochranu ohrožených druhů a vytvoření vhodného managementu. Neinvazivní molekulární metody pro odhad velikosti populace se využívají především pro nepolapitelné druhy, pro druhy žijící skrytým způsobem života a pro ohrožené druhy, aby nebyly vyrušovány. Cílem mé bakalářské práce je shrnout poznatky ze studií, zabývajících se odhadem velikosti populací za využití molekulárních metod. Studie odhadují nejen celkovou velikost populace, ale i efektivní, která lépe odráží reprodukční potenciál a přežívání populace. Metody pro odhad efektivní velikosti populace se rozdělují do dvou skupin, a to na single sample (odhad z jednoho vzorku) a temporal (odhad z opakovaných sběrů). Velikost populace je vypočítávána pomocí počítačových softwarů, přičemž mezi nejpřesnější a nejpoužívanější pro určení efektivní velikosti patří např. Colony, LDNe, a pro odhad celkové velikosti se používají Capwire nebo Capture. Pomocí rešerše jsem zjistila, že spolehlivost odhadů velikosti je především ovlivněna kvalitou DNA, a tedy mírou úspěšností amplifikace. Pro docílení spolehlivých odhadů se musíme řídit přesnými postupy (využití multiple tubes approach, více běhů PCR nebo aplikace primerů, které amplifikují pouze krátké DNA markery (dlouhé 200-300 párů bází)). Spolehlivost odhadu můžeme podpořit větším sběrem vzorků, delším časovým obdobím sběru a doplnit jej o observační metody. Tento obor se stále vyvíjí a do budoucna může přinést spoustu výhod pro ochrannářskou ekologii.

Klíčová slova: velikost populace, genetický drift, genetické markery, inbrídink, mikrosatelity, mtDNA, SNP, neinvazivní vzorkování, ochrannářská genetika

## **Abstract**

Estimation of population size and estimation of her effective size ( $N_e$ ) is essential for protecting endangered species and the development of appropriate management. Non-invasive molecular methods for estimating population size are mainly used for elusive species, species living in a hidden state of life and for endangered species. It is for the sake of not disturbing them. My bachelor thesis aims to summarize findings from studies dealing with the estimation of population size using molecular methods. Studies estimate not only the total population size, but also the effective size, which is often more important for conservationists. The methods for estimation of the effective population size can be divided into two groups, namely single sample and temporal. Population size is calculated using computer software; for example, Colony and LDNe are used for estimation of effective size and are the most accurate, Capwire or Capture are used to estimate the total size. Using this research, I discovered that the reliability of size estimates is highly influenced by the quality of the DNA and thus, by the low success rate of amplification. To achieve reliable estimations, we must follow precise procedures (using multiple tubes approach, multiple PCR runs, or applying primers that amplify only short DNA markers (200-300 base pairs long)). The reliability of the estimation can be maintained by a vast sample collection, a more extended collection period and then complete them with observation methods. This field is still evolving and can bring us many benefits for the conservation ecology in the future.

**Key words:** population size estimation, genetic drift, genetic markers, inbreeding, microsatellites, mtDNA, SNP, non-invasive sampling, biodiversity, conservation

## **OBSAH**

1. ÚVOD .....	1
2. OCHRANÁŘSKÁ GENETIKA .....	3
3. GENETICKÉ MARKERY .....	6
3.1. Mikrosatelity .....	6
3.2. mtDNA .....	8
3.3. SNP .....	8
4. NEINVAZIVNÍ METODY DNA .....	10
4.1. Druhy neinvazivní DNA .....	10
5. CHYBY PŘI GENOTYPOVÁNÍ .....	12
6. STATISTICKÉ METODY PRO ODHAD VELIKOSTI POPULACE .....	16
7. SOFTWARE .....	20
7.1. Software pro odhad efektivní velikosti .....	20
7.2. Software pro odhad celkové početnosti populace .....	21
8. EMPIRICKÉ STUDIE .....	22
8.1. Zhodnocení empirických studií .....	27
9. ZÁVĚR .....	30
10. LITERATURA .....	32
11. SEZNAM PŘÍLOH .....	38



# 1. Úvod

V současné době je diverzita naší planety ohrožena přímými i nepřímými následky chování lidstva (Wan et al. 2004). Příčinnou ohrožení je zemědělské využití krajiny a urbanizace, díky čemuž dochází v krajině k rychlým a výrazným změnám (Frankham 2003). Velký počet druhů již vyhynul a mnoho dalších populací bylo redukováno na úroveň, které hrozí vyhynutí. V posledních dvaceti letech byly využívány genetické studie ke zjištění podrobného stavu stávajících populací (Wan et al. 2004). Získaná data slouží nejen k odhadu početnosti populace, ale i k přehledu o prostorovém rozložení, k identifikaci jedinců a v neposlední řadě pro potvrzení přítomnosti daného druhu.

K ochraně zvířat se v poslední době častěji využívají právě neinvazivní molekulární metody pro odhad velikosti populace. Neinvazivní vzorkování je velice populární mezi terénními biology, neboť uváděná metoda umožňuje při zpracování genetických studií zabývajících se volně žijícími zvířaty studovat tato zvířata bez odchyty, bez držení nebo dokonce bez sledování (Taberlet et al. 1999).

Neinvazivní genetické metody využívají sběru biologického materiálu jako jsou chlupy, trus, peří (Taberlet et al. 1997; Arrendal et al. 2007) a mohou poskytnou relevantní informace o celkové i efektivní velikosti populace. A to především na nepolapitelné druhy, jako jsou velké šelmy, které se hůře počítají pomocí jiných metod, a pro druhy, které žijí skrytým způsobem života (Creel & Rosenblatt, 2013). Což nám může podat informace o jejich rozšíření, početnosti a tím pádem zlepšit management jejich ochrany (Creel et al. 2003).

Nicméně určování velikosti populace z neinvazivních vzorků může být náchylné k chybám. Takto získaná DNA je často degradovaná a je nízké kvality (Taberlet et al. 1999). To může způsobit nadhodnocení populace pro druhy s vysokou mírou disperze, naopak pro sedentární druhy to může způsobit podhodnocení velikosti populace. S těmito chybami se snaží vypořádat několik výzkumů a neustále se vyvíjí nové postupy a metody pro spolehlivější odhady (Creel et al. 2003; Lampa et al. 2013). I přes tyto nevýhody se tento způsob odhadu velikosti populace stává v posledních letech velmi populární, jelikož neexistuje mnoho jiných způsobů, jak odhadnout velikosti populací ohrožených druhů (Lampa et al. 2013).

Cílem mé bakalářské práce je shrnout poznatky studií, které se zabývají odhadem velikosti populace za využití molekulárních metod. Dále bych se chtěla zaměřit na způsoby neinvazivního vzorkování, jejich využití a chybovost, protože ta hraje hlavní roli pro spolehlivý odhad velikosti populace. Má práce dále podává přehled o genetických markerech, jež se využívají pro molekulární metody a na co se při nich zaměřit, aby nedocházelo ke špatným odhadům velikosti populace. Dále uvedu příklady empirických studií a představím na nich využití neinvazivní DNA a metod pro odhady velikosti populace.

## 2. Ochranařská genetika

Ochranařská genetika vychází z poznatků populační genetiky, molekulární ekologie a evoluční biologie. Využívá genetických metod, které se dnes uplatňují ve všech oborech lidského zkoumání, které se týkají živých organismů a v posledních desetiletích se prudce rozvíjejí (Soulé 2015).

Tento vysoký nárůst může být přiřazován k vývoji polymerázové řetězové reakce (PCR), kterou vyvinul Kary Mullins již v roce 1983 a byl za ní posléze oceněn Nobelovou cenou. PCR nám totiž umožňuje získat dostatek genetického materiálu i z malých či horších vzorků, není nutné tedy jedince usmrtit, či odchytávat a je možné získat dostatek genetických informací bez narušení života jedince (Kohn et al. 1998; Taberlet, Waits and Luikart 1999).

Genetické metody se v posledních letech výrazně vyvinuly. Například získání informací o kompletním genomu dnes již není otázkou let či desetiletí, ale spíše dnů či týdnů, a to vše za mnohem menší náklady než dříve. Analýza DNA u člověka se například využívá k odhalení geneticky podmíněných chorob, k usvědčení pachatele trestného činu nebo k určení otcovství. Toto lze využít i u jiných organismů, ale většinou to není žádoucí, neboť otázky, které si v zoologických výzkumech klademe, jsou především mířené na vymírání druhů, či vznik nových a za jakých podmínek. Genetické metody nám prozrazují, jakými směry se jednotlivé druhy šířily po planetě Zemi a ve kterých historických dobách (Frankham 2003). V těchto a mnoha dalších případech nám analýza DNA živočichů pomáhá zodpovědět otázky týkající se obecného fungování přírody. Uplatňuje se však také při praktických řešeních. Genetické analýzy poskytují mnoho informací, které jsou velmi cenné a jsou využívány pro plánování managementu na ochranu vzácných či ohrožených druhů živočichů a rostlin (Zemanová et al. 2016).

Hlavním tématem ochranařské genetiky je biologie druhů, společenstev a ekosystémů, které jsou přímo nebo nepřímo narušeny lidskou činností nebo jinými činiteli. Cílem je zachování biologické diverzity, tj. soubor druhů (Soulé 2015). Pokud chceme na Zemi udržet biodiverzitu druhů, je třeba jednotlivé druhy chránit. Ve skutečnosti biodiverzita zahrnuje rozmanitost života na všech úrovních, což znamená, že její součástí jsou jedinci i populace, tj. genetická diverzita. Ta samozřejmě celkovou

biodiverzitu ovlivňuje, ale jestliže chceme chránit biodiverzitu, musíme chápat a chránit i její genetickou úroveň.

Genetická rozmanitost je důležitou podmínkou pro evoluci jako například přizpůsobení se okolním změnám v prostředí. Pokud dojde k výraznému snížení genetické diverzity, může se stát, že populace nebude schopna se přizpůsobit změnám v okolí (např. klimatickým změnám), v horším případě může dojít i k jejímu zániku.

Ochranářská genetika se věnuje v první řadě vzácným a ohroženým druhům, proto je jejím tématem i bádání genetických a evolučních procesů v malých a izolovaných populacích, které jsou pro tyto druhy typické. Ve velkých populacích se dobře uplatňuje přirozený výběr, naopak u malých populací je to především náhoda, náhodný genetický posun, který nazýváme genetický drift. Ten souvisí s výběrem gamet při pohlavním rozmnožování, to může v důsledku malé početnosti způsobit vymizení některé alely z populace (Flegr, 2005).

Hrozbou pro malé populace může být i příbuzenské křížení – inbreeding (Frankham 2003;). Křížení mezi příbuznými jedinci zvyšuje homozygotnost, pravděpodobnost, že jedinec z otce i od matky získá stejnou variantu genu. V takových případech se do popředí dostávají mutace, jež projevují své negativní účinky. Tyto mutace jsou v populacích běžné, ale v naprosté většině ve formě recesivních alel, které se v heterozygotním stavu vůbec neprojeví. Stav, kdy inbreeding dospěje až ke snížení přežívání nebo reprodukční schopnosti jedinců (např. snížené kvality a kvantity spermií apod.), říkáme inbrední deprese (Primack, Kindlmann, & Jersáková, 2001).

Další oblastí, kde genetika figuruje, je zkoumání struktury populací v rámci areálu druhu. Geneticky je totiž možné zjistit, které populace jsou izolované a mezi kterými naopak dochází k toku genů, tedy k migraci jedinců. Také lze odhalit, jaké faktory (např. které struktury v krajině) toku genů mezi populacemi brání. Taková zjištění mohou být pro plánování efektivních opatření na ochranu druhu velmi užitečná (Zemanová et al. 2016).

Udržování vysoké úrovně genetické rozmanitosti a udržování nízké hladiny inbreedingu jsou důležité aspekty v ochraně ohrožených populací. Ústřední roli v ochranářské biologii z tohoto důvodu hraje efektivní velikost populace ( $N_e$ ). Odhad

$N_e$  z údajů genetických markerů je hlavním opatřením na ochranu biologické rozmanitosti, protože je nezbytné vědět, jak se zvyšuje míra inbreedingu a ubývá aditivních genetických variací (Ryman et al. 2019).

Efektivní velikost populace je termín z populační genetiky a evoluční biologie, který vyjadřuje velikost ideální panmiktické populace (v ní se jedinci páří zcela náhodně), ve které by genetické procesy (např. změny ve frekvenci alel vlivem selekce či driftu) probíhaly stejnou rychlostí jako v dané reálné populaci. Efektivní velikost populace je nižší, než její reálná (nominální) velikost vyjádřená počtem jedinců (Flegr, 2005). Efektivní velikost je složena plnohodnotnými jedinci obou pohlaví, kteří další generaci přispívají potomstvem (Frankham 1995).

Efektivní velikost populace je důležitá jak teoreticky ( $N_e$  je klíčovým parametrem téměř ve všech aspektech evolučního vývoje biologie), tak pro praktické použití ( $N_e$  určuje míru genetického driftu a ztráty genetické variability a moduluje účinnost výběru, takže je zásadní při ochraně druhů) (Waples 2016).

V následujících kapitolách se budu zabývat genetickými markery a neinvasivní DNA (tj. trus, chlupy či peří) (Creel et al. 2003). Markery v ochranářské genetice využíváme proto, že vypovídají o genetické příbuznosti jedinců, populací nebo druhů, tím pádem jsou aplikovány pro stanovení historických vztahů mezi jednotlivými poměrně vzdálenými populacemi.

### 3. Genetické markery

Genetická variabilita ohrožených druhů živočichů je nejčastěji analyzována za použití genetických markerů, které jsou považovány za neutrální (tj. neprojevují se ve fenotypu jedince a nepodléhají selekci). V ochranářsko-genetických studiích se nejčastěji používají mikrosatelity, mitochondriální DNA či jednonukleotidové polymorfizmy (SNP), protože se jednoduše amplifikují. To je krucióální, pokud zdroj DNA pochází z neinvazivních vzorků.

Neinvazivní DNA bývá často degradovaná nebo jí získáme pouze malé množství a je zapotřebí využít genetických markerů. Ty mají schopnost využívat malé množství či vzorky s nekvalitní DNA, i přesto dokážou určit druh a fylogeografické zařazení. Aspektem pro vhodné markery jsou malé náklady na testy a nízké požadavky na manipulaci se vzorky (Morin et al. 2004).

V této kapitole uvádím hlavní výhody a nevýhody markerů, které jsou nejčastěji používané pro studium struktury populací ohrožených druhů živočichů. V ochranářské genetice se pro tyto účely za nejvhodnější považují především mikrosatelity, mtDNA a SNP.

#### 3.1. Mikrosatelity

Mikrosatelity jsou krátké tandemové repetice, často označovány jako SSP (Simple sequence repeats), jsou složeny z opakujících se motivů obvykle o délce 2-6 párů bází (Edwards et al. 1991). Mikrosatelity se nachází jak u prokaryotních, tak u eukaryotních organismů (Toth et al. 2003). Díky své vysoké mutační rychlosti jsou mikrosatelity velmi polymorfni. Což znamená, že v rámci jedné populace se nacházejí v různých variantách. Tato rozmanitost alel je v laboratoři snadno zjišitelná a umožňuje nám sledovat genetickou variabilitu mezi jednotlivými druhy, v rámci jednoho druhu, či v rámci jedinců uvnitř jedné populace (Tautz 1989). Mikrosatelity představují rychle se vyvíjející sekvence DNA, které jsou informativní pro odpovědi na otázky na úrovni populace.

Podle počtu nukleotidů můžeme rozlišovat mikrosatelity: mononukleotidový (např. AAAAAA), dinukleotidový (např. CACACA), trinukleotidový (např. CCACCACCA), tetranukleotidový (např. GATAGATAGATAGATA).

U savců je nejběžnější frekvence AC nebo AT a mohou být opakovány 10x - 100x (Toth et al. 2003).

Využití mikrosatelitů je velmi široké. Patří mezi kodominantní markery, díky čemuž rozlišují i heterozygotnost jedince. Jelikož to jsou krátké sekvence a snadno se amplifikují během PCR, využíváme je k určení efektivní velikosti populace ( $N_e$ ). Délkový polymorfismus využíváme především ve fylogenetických studiích, určování paternity, nebo při studii populačně genetické struktury, kam patří tok genů, efektivní velikost populace nebo odchylky od Hardy Weinbergovy rovnováhy (Buschiazzi and Gemmell 2006). Lze je získat i z velmi malého množství DNA, a proto je jejich využití při studiu ohrožených druhů živočichů výhodnější než použití jiných markerů.

Nevýhodou mikrosatelitových lokusů je, že trpí nulovými alelami. Nulové alely se během PCR neamplifikují. V rámci analýzy se pak jedinec pro daný lokus může jevit jako homozygot, ačkoliv je heterozygot. Tímto mohou nulové alely zkreslit velké množství výzkumů, nejen v oblasti ochránářské genetiky. Příčinou vzniku nulové alely je nízká koncentrace DNA nebo mutace DNA v místě, které je homologní k sekvenci primeru (obvykle v úseku blízkém 3' konci primeru), a tím znemožňuje proběhnutí PCR reakce. Přímý důkaz potvrzující nulovou alelu je nasekvenování PCR produktu vyšetřovaného lokusu (některé amplifikující se alely) a následná úprava sekvence nenedávajícího primeru, tedy jeho posunutí o několik nukleotidů vedle mutace. Reakce s takto pozměněným párem primerů proběhne a takovýto lokus je potom plně použitelný pro přesnější identifikaci paternity (Dakin and Avise 2004).

Analýza z mikrosatelitů byla použita například u studie šimpanzů (*Pan troglodytes verus*), kde se DNA odebírala z trusu, který byl sbírán těsně po defekaci a uskladněn na 2-18 měsíců. DNA byla odebírána i z chlupů, které byly uskladněny ve vzduchotěsné nádobě. DNA byla posléze extrahována z vysušených vzorků, následně byla provedena PCR, jejíž produkty byly rozděleny pomocí kapilární elektroforézy (Morin et al. 2001).

Mikrosatelity byly použity i u studie populace vyder říčních (*Lutra lutra*) v národním parku Slovenský Ráj. Bylo nasbíráno 304 vzorků trusu, které byly rozděleny do dvou skupin – „nezmrzlé“ a „zmrzlé“. Pro obě tyto skupiny měly největší podíl pozitivní PCR tzv. *jelly samples* (produkováno análními žlázami) a to s výsledkem 62% a 82%.

Bohužel tento typ vzorků je docela vzácný, jelikož je produkován pouze dospělými jedinci vyder. Na závěr této studie bylo zjištěno, že nejvýznamnějším faktorem ovlivňující úspěšnost genotypování mikrosatelitů fekálií vyder je druh vzorku a teplota při sběru. Nejlepší způsob je sběr během chladných měsíců, kdy nedochází k tak velké degradaci DNA (Hájková et al. 2006).

### 3.2. mtDNA

Mitochondriální DNA (mtDNA) je relativně malá, bohatá a snadno izolovatelná molekula, proto se stala oblíbeným cílem sekvenování. Savčí mtDNA je kruhová dvouvláknová molekula, která se v buňce nachází ve velkém množství, a to 36 nebo 37 genů. Struktura genomu je vysoce konzervativní, tudíž můžeme využívat univerzální primery. Mitochondriální DNA se vyznačuje i tím, že exony jsou těsně vedle sebe a neobsahuje introny. Další specifikací je, že má vysokou mutační rychlost (Arif et al. 2011). V ochranářské genetice se využívají především úseky mtDNA jako je cytochrom-b, který se vyznačuje mnoha kopiemi v jedné buňce), ale i HVS-1a HVS-2. mtDNA se využívá především pro určování struktury populací, stanovení mezidruhové hybridizace, určování taxonomické příslušnosti a pro vysvětlení evoluční historie na nižších úrovních jako jsou kmeny, rody a druhy (Wan et al. 2004).

Určitým omezením pro analýzy na základě mtDNA je její maternální dědičnost, která umožňuje sledovat vývoj populace jen v mateřské linii. Doporučuje se doplnit informace použitím sekvencí na jaderných genech – ať už na autozomech s biparentální dědičností nebo gonozomech s dědičností parentální (Hare 2001).

Mitochondriální DNA byla použita například u studie odhadu efektivního počtu alel ze vzorků krve kojotů (*Canis latrans*). Pomocí mtDNA byla zkoumána genotypová diverzita a genový tok préríjních kojotů Severní Ameriky (Lehman and Wayne 1991).

Dále byla použita i ve studii bonga lesního (*Tragelaphus eurycerus isaaci*), kdy odhadovali velikost populace. Použití mtDNA se ukázalo jako problematické, a to především kvůli její maternální dědičnosti. Z 201 vzorků trusu byla určena velikost populace bonga lesního na 102 jedinců (Faria et al. 2011).

### 3.3. SNP

SNP z anglického single-nucleotid polymorfism je mutace vznikající záměnou jednoho nukleotidu (A, C, T nebo G) v příslušné DNA sekvenci. SNP ještě nejsou tak



využívané markery, ale mohly by se rychle stát vyhledávaným markerem pro mnoho aplikací v populační ekologii, evoluci a zachování genetiky kvůli potenciálu pro vyšší genotypovou efektivitu, kvalitu dat, pokrytí v celém genomu a analytickou jednoduchost (např. při modelování mutační dynamiky).

SNP mohou často vytvářet ekvivalentní statistickou sílu a zároveň poskytují širší pokrytí genomem a vyšší kvalitu dat, než mohou poskytovat mikrosatelity nebo mtDNA (Morin et al. 2004). SNP jsou na rozdíl od mikrosatelitů hojně rozšířeny v mnoha druhových genomech (kódujících a nekódujících oblastech).

SNP použili například skandinávští vědci, kteří zkoumali místní populaci vlků (*Canis lupus*). Zjistili, že SNP je schopné od sebe odlišit jednotlivce a dokonce rozpoznat i populace, kdy ukázal rozdíl mezi skandinávskou a sousedskou finskou populací vlků (Seddon et al. 2005).

## 4. Neinvazivní metody DNA

DNA lze získat i neinvazivními metodami, které nijak neohrožují, neruší a nedochází u nich k fyzickému kontaktu se studovaným organismem. To je hlavní důvod, proč se využívá neinvazivních vzorků. DNA se získávají z biologického materiálu jako je trus, srst, moč nebo peří a následně se analyzují (Taberlet, P., Waits, L. P., & Luikart 1999). Další výhodou je jednoduchý sběr vzorků, nepotřebujeme k němu drahé vybavení, sběr probíhá buď opakovaně nebo se odhad analyzuje z jediného vzorku.

Analýzou DNA dokážeme stanovit počet různých genotypů, tj. velikost populace. Genetická mark-recapture metoda založená na odhadu velikosti z DNA trusu byla poprvé použita ve studii kojotů (*Canis latrans*) v Kalifornii (Kohn et al. 1999). Výsledky ukázaly, že systematický sběr trusu a následné genotypování pomocí mikrosatelitních lokusů, nám poskytuje okamžitý odhad velikosti populace a poměru pohlaví, aniž by se jakkoliv manipulovalo s jedinci. Metoda se ale spoléhala na předpoklad, že frekvence defekace byla stejná mezi pohlavími a věkovými třídami (Kohn et al. 1999). Od té doby byla neinvazivní DNA z chlupů, peří a fekálií používána pro odhad velikosti populace v řadě taxonů obratlovců (Walker et al. 2019).

Neinvazivní DNA se potýká i s řadou problémů. Patří sem především nízká úspěšnost genotypizace (způsobena nízkou kvalitou DNA), to může zapříčinit špatný odhad velikosti populace. Dále to je vysoká časová a finanční náročnost prováděných analýz (Hájková 2006). Chybám, které nastávají při genotypizaci, se budu věnovat v kapitole č.5. V další kapitole se budu zabývat druhy neinvazivní DNA, které se používají pro odhad velikosti populace.

### 4.1. Druhy neinvazivní DNA

Nejdostupnější a nejvyužívanější druhem pro analýzu je trus, jelikož obsahuje buňky sliznice střev, ze kterých může být snadno analyzována DNA daného jedince. Umožňuje identifikaci druhu, jedince, pohlaví, stanovení populačně-genetické struktury a fylogeografické analýzy (Kohn et al. 1999). Pro smysluplné účely analýzy musí být trus co nejčerstvější, maximálně 3 (v zimě 5) dní starý a ideálně ještě vlhký. Výzkum prováděný na koalím trusu uvádí, že čerstvější trus (2 dny starý) prokazoval

méně chybějících informací, než exkrementy starší (14 denní), ty měly pouze 70% kvalitní informace (Schultz et al. 2018).

U vzorků ze srsti se vyskytuje více tzv. *allelic dropout*, než-li u trusu, proto se ve většině studií využívají právě výkaly (Broquet et al. 2007). Genetická analýza trusu byla využita například i ve studii yellowstonské populace vlků (*Canis lupus*). Ovšem u výkalů častěji dochází k nadhodnocení populace špatným genotypováním. V této studii se snažili velikost chyb snížit pomocí mnohonásobné PCR, která ovšem vyskytující se chyby úplně neeliminovala. Výsledkem byla nadhodnocená populace o pětinašobek (Creel et al. 2003).

Velmi častá je kombinace sběru trusu a chlupů, což bylo například aplikováno při zkoumání populací medvěda hnědého (*Ursus arctos*) jak v Řecku, tak v severní části italských Alp. V obou studiích se prokázalo, že optimální strategie odběru vzorků je kombinace systematického odchytávání srsti a sběr trusu, což nám poskytne dostatečně velké množství vzorků a vhodná data pro odhad populace (De Barba et al. 2010, Tsaparis et al. 2015).

Sledování stop je vhodné pro studium živočichů žijících v severských zemích. Stopy ve sněhu bývají často jediným vodítkem k jejich životu, případně bývá monitoring podporován i fotopastmi (Martin et al. 2017). Ovšem v porovnání s genetickou analýzou dochází k podhodnocení velikosti populací (Arrendal et al. 2007; Marucco et al. 2009).

K určení populací malých savců uplatňujeme metodu sběru sovích vývržků. Pelety v sobě obsahují části skeletu, ze kterého lze izolovat DNA. Nevýhodou tohoto sběru je často degradovaná DNA. Získané výsledky však jasně ukazují, že mitochondriální a jaderná DNA může být amplifikována použitím lebek malých savců nalezených v peletách sovy jako zdroje DNA. Například ve studii Guimaraese (2016) nebylo amplifikováno 10 vzorků kostí ze sovích vývržků z 55 zkoumaných. Extrakce DNA ze sovích vývržků tak představuje vhodnou neinvazivní techniku odběru vzorků pro studium populační genetiky malých savců (Taberlet et al. 1996).

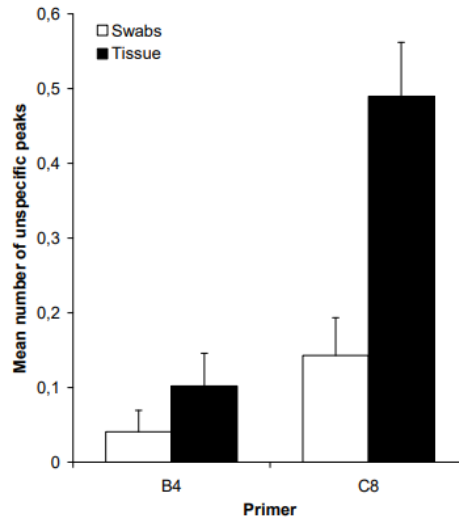
## 5. Chyby při genotypování

Malé množství DNA a její nízká kvalita (degradovaná DNA, přítomnost inhibitorů PCR) jsou běžným zdrojem chyb při PCR analýzách neinvazivně získaných vzorků. U těchto vzorků je vysoké riziko kontaminace a genotypizačních chyb. Případná kontaminace se dá odhalit důsledným prováděním kontrol při analýze každé sady vzorků (Taberlet, Waits and Luikart 1999).

Při amplifikaci vzorků s nízkou koncentrací DNA může dojít ke špatnému sekvenování, jelikož pouze jedna alela u heterozygotů je amplifikována, což může mít za následek nadhodnocení nebo podhodnocení populace. Chyb vznikajících při amplifikaci DNA se však nedá vyvarovat. Mezi tyto chyby patří tzv. *allelic dropout*. Tento jev je běžně sledovaný u mikrosatelitů, u nichž se jedna nebo obě kopie alely neamplifikují během PCR. Když jedna ze dvou kopií vypadne, způsobuje to klasifikaci heterozygotů jako homozygotů (Wang, Schroeder and Rosenberg 2012). Omezením spolehlivého odhadu mohou být i *false alleles* (nepravé alely). Ty vznikají jako produkt v počátku PCR reakce při sklouznutí DNA polymerázy (*polymerase slippage*) a my chybně určíme, např. že se jedná heterozygota (Taberlet, Pierre and Luikart. 1999)

Kvůli náchylnosti neinvazivní DNA k chybám může dojít k nadhodnocení populace, které je způsobeno špatným genotypováním (Broquet et al. 2007). Příkladem nadhodnocení populace za využití genetické analýzy trusu je studie yellowstonské populace vlků (*Canis lupus*). V této studii se sice snažili velikost chyb snížit pomocí mnohonásobné PCR, která ovšem vyskytující se chyby úplně neeliminovala, a tak došlo k nadhodnocení populace o pětinásobek (Creel et al. 2003).

Na druhou stranu, neinvazivní DNA se může někdy jevit i jako lepší zdroj DNA než invazivní DNA (např. krev). Ve studii Shulteho (2011) porovnávali neinvazivní bukální stěry a invazivní odběr tkáně u ještěrky zední (*Podarcis muralis*). Genotypovali jednotlivce na dvou mikrosatelitových lokusech. Výsledkem Schultheho studie bylo, že bukální stěry generovali genotypy stejně dobře jako vzorky tkáně. Naopak ve vzorcích tkání zjistili větší počet nespecifických peaků (Obr. č 1). Tyto výsledky ukazují, že bukální výtěry jsou jednoduchou a účinnou neinvazivní metodou odběru vzorků pro analýzu DNA u dospělých ještěrek (Schulte et al. 2011).



**Figure 2:** Mean number of unspecific peaks between loci and between swab and tissue samples (n = 49, respectively). Error bars are standard errors.

Obrázek 1: Porovnání výskytu nespecifických peaků mezi buklálními stěry a vzorky tkáně, Schulte et al. 2011

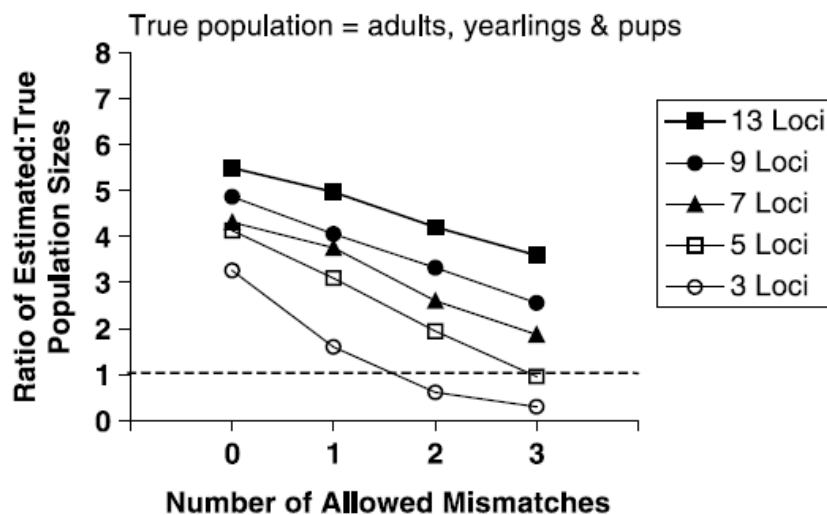
Kvůli těmto chybám byly vytvořeny modely či přesné postupy pro co nejlepší výsledky studií. Jedním z těchto postupů je odebrat dostatečný počet vzorků (*multi-samples*), dále se doporučuje zvýšit koncentraci vhodné DNA pomocí preamplifikace (selektivní amplifikace, při níž dochází k amplifikaci pouze 1/6 restrikčních fragmentů) (Piggott et al. 2004). Studie prováděná na orangutanech, ve které využívali trus jako zdroj DNA a genotypovali pomocí mikrosatelitů, doporučuje odebrání více vzorků v terénu, aby se zvýšila pravděpodobnost, že budou extrakty obsahovat DNA a poskytnou nezávislé kopie (Goossens et al. 2000).

Pro eliminaci chyb při genotypování neinvazivně získaných vzorků byla vyvinuta metoda *multiple-tubes approach* (Navidi et al. 1992). Postup zahrnuje rozdělení vzorku do několika zkumavek, následně amplifikaci a typizaci obsahu každé zkumavky samostatně. Výsledky jsou analyzovány statistickým postupem, který určuje, zda může být genotyp jednoznačně přiřazen ke vzorku DNA. Laboratorní experimenty byly prováděny na DNA extrahované ze vzorků trusu medvědů. Ve studii srovnávali, zdali experimentální výsledky trusu medvědů korelují s matematickým modelem. Bylo zjištěno, že postup s více zkumavkami je lepší než standardní postup s jednou zkumavkou, ať už je vzorek malý, nebo pokud je potenciální problém laboratorní kontaminace; a je doporučovaný v těchto situacích. Použitím tohoto postupu můžeme získat spolehlivé genotypy s úrovní spolehlivosti 99 %. Tento postup

s několika zkumavkami by se měl systematicky používat při genotypizaci jaderných lokusů starověkých nebo forenzních vzorků, muzejních exponátů anebo výkalů volně žijících zvířat. Pro správné stanovení genotypu s 99% spolehlivostí je třeba heterozygotní genotyp potvrdit alespoň dvakrát, homozygota lze potvrdit sedmi nezávislými PCR (Taberlet et al. 1996). Tento postup je nyní běžně využíván v mnoho výzkumech (Taberlet et al. 1997)

Další způsob, jak se vyhnout chybám při genotypování je použití takových primerů, které amplifikují pouze krátké DNA markery (dlouhé 200-300 párů bází) (Taberlet et al. 1999).

Přesnějších výsledků se dá docílit pomocí více běhů PCR. Tento způsob použili například u genetické analýzy sovice sněžné (*Bubo scandiacus*). DNA byla analyzována z prachového peří a vybráno bylo 12 mikrosatelitových lokusů, které amplifikují krátké fragmenty. Těchto 12 lokusů a markerů určující pohlaví bylo amplifikováno třikrát pomocí PCR. Pomocí této analýzy byla populace odhadnuta na 49 jedinců (Kleven et al. 2016). Přesnost odhadu záleží i na použitém počtu lokusů a daném počtu mismatchů (chyb). Příkladem je tomu studie, která zkoumala vliv těchto faktorů na odhad velikosti populace vlků v Yellowstonu. Tato populace byla nepřesně odhadnuta a to až o pětinašobek kvůli vysokému počtu mismatchů (Creel et al. 2003).



Obrázek 2: Porovnání skutečné velikosti populace a minimální velikosti populace odhadnuté spočtením počtu odlišných genotypů pomocí DNA extrahované z 227 vzorků trusu vlků. Průměrná velikost populace v období, ve kterém byly odebrány vzorky, byla 40 jedinců. Minimální velikost populace odhadnutá z genetických dat byla nadhodnocena 3,3krát (za použití tří lokusů) až 5,5krát (za použití 13 lokusů). Creel et al. 2003

Jak správně předejít chybám ovlivňuje mnoho faktorů. Musíme zvolit vhodný typ vzorkování pro studované zvíře (např. síť vzorkování u medvěda hnědého, Tsaparis et al. 2015), extrakční metodu, která maximalizuje množství templátové DNA a správný postup, který předejde chybám při genotypování nekvalitní DNA (Lampa et al. 2013). Nejpoužívanějším postupem proti chybám je použití více běhů PCR, větší objem vzorků (*multi-samples*) a použití vhodných markerů. Kombinací těchto postupů získáme co nejpřesnější odhad velikosti populace.

## 6. Statistické metody pro odhad velikosti populace

Způsoby odhadu velikosti populace můžeme rozdělit na dva. První, který je jednodušší a levnější, se získává pouze z jednoho neinvazivního odběru (single sampling session). Značnou výhodou single sample metod je, že nám stačí pouze jediný vzorek populace z jednoho časového úseku. Jeho nevýhoda může spočívat v nadhodnocení populace kvůli náhodnosti, to však platí spíše pro stěhovavé druhy. Naopak pro sedentární druhy to může znamenat podhodnocení velikosti populace.

Druhou možností je opakovaný sběr (multiple sampling session/ temporal) (Waples 2016). Ta je aplikována při opakovaném sběru, tzn. dva a více odběrů vzorků. Tato metoda je sice přesnější, ale nehodí se pro vzácné či ohrožené živočichy, jelikož jejich početnost je nízká a odebrat více vzorků je pro tyto druhy obtížné. Další nevýhodou může být častější rušení zvířat (Puechmaille and Petit 2007).

Odhad velikosti populace je základním principem pro ochranu živočichů. Můžeme jej ještě rozdělit na odhad celkové velikosti nebo na odhad efektivní velikosti populace. Především pro ohrožené druhy je dobré znát efektivní velikost.  $N_e$  totiž mnohem lépe odráží reprodukční potenciál a přežívání populace než samotná velikost populace (Waples 2016).

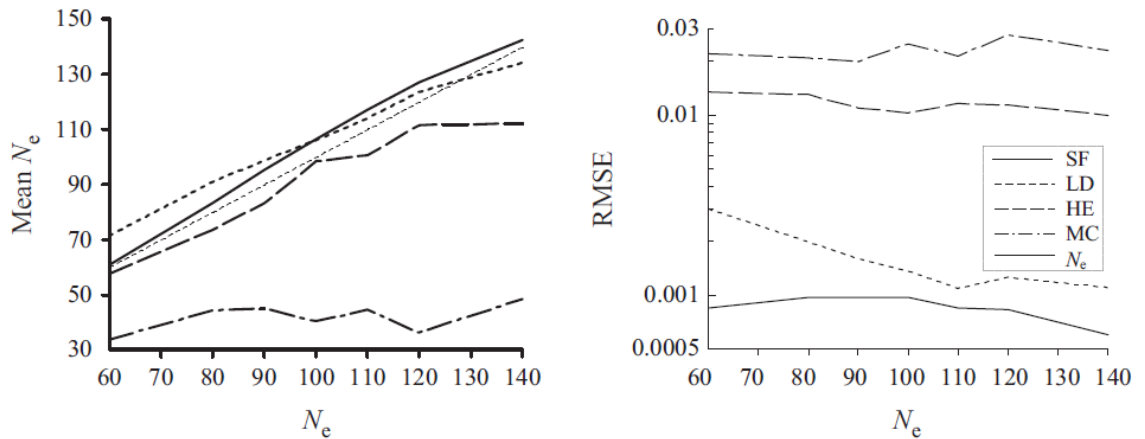
V ekologických studiích využívající molekulární metody je efektivní velikost populace poslední dobou stále více odhadována z jediného náhodného vzorkování populace a genotypovaný na řadě lokusů (např. Luikart et al. 2010; Wang and Whitlock 2003). Pro tento typ odhadu se používají 4 metody odhadu, kterými jsou *linkage disequilibrium* (LD), *heterozygote excess* (HE), *molecular coancestry* (MC) a *sibship frequency* (SF).

Nejpoužívanější metodou pro odhad  $N_e$  z jednoho odběru vzorků je analýza LD. Tato metoda je často používaná, protože je přesnější než odhady HE a MC a výpočet je jednodušší než pro odhad SF (Wang 2016).

Nicméně rozdílu v těchto čtyřech typech odhadů se věnovala Wangova simulační studie (2016). Srovnání jednotlivých typů analýz podle přesnosti odhadu  $N_e$  byla aplikována na datasetu medvěda grizzlyho (*Ursus arctos horribilis*) v Yellowstonském národním parku, jehož populace byla dobře zmapovaná (Kamath et al. 2015). Studie ukázala, že metody MC a HE jsou trvale slabší než ostatní a mají

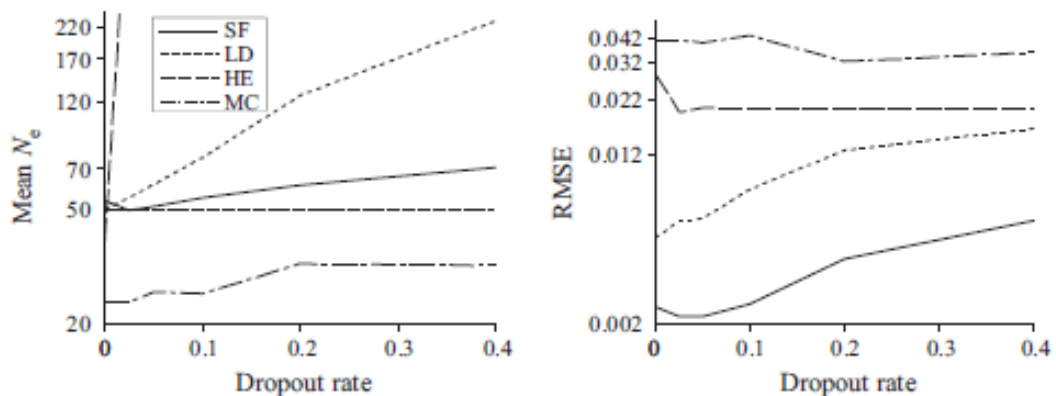


větší chybovost (viz. Obrázek č. 2). Oba tyto odhady v této simulaci podhodnocovaly efektivní velikost a byly méně přesné než LD a SF. Podle studie je SF výhodnější, jelikož je odolnější vůči *allelic dropouts* (viz Obrázek č.3). K nadhodnocení populace může dojít v důsledku nesprávného použití metody LD, když se tyto *allelic dropouts* vyskytují. Efektivní velikost populace by měla být 92 jedinců, k tomuto výsledku byl nejbliž právě estimátor SF, který předpovídal početnost na 90 jedinců. Ostatní metody se razantně nelišily, ale rozdíl mezi nimi přeci jen byl (J. Wang 2016).



Obrázek 3: Průměrné  $N_e$  a standartní chyba odhadu (RMSE) porovnávaných analýz. HE a MC mají větší chybovost, J.Wang 2016

Vysvětlivky k legendě: SF= sibship frequency, LD= linkage disequilibrium HE= heterozygote excess, MC= molecular coancestry



Obrázek 4: Odolnost SF vůči *allelic dropouts*, J.Wang 2016

Vysvětlivky k legendě: SF= sibship frequency, LD= linkage disequilibrium HE= heterozygote excess, MC= molecular coancestry

Tabulka 1: Přehled vlastností metod pro výpočet  $N_e$  pomocí single metod, J.Wang 2016

estimátor	název	vlastnosti	software
LD	Linkage disequilibrium	Vhodný pro izolované populace, nepřesný pro strukturované populace.	LDNe, NeEstimator
SF	Sibship frequency	Široký rozsah použití, vhodný i pro strukturované populace, vysoce odolný vůči allelic dropouts.	Colony
MC	Molecular coancestry	Odolný vůči allelic dropouts, ale často nadhodnocuje populace, nepřesný.	NeEstimator
HE	Heterozygosity excess	Jednoduchý výpočet, nepřesný.	NeEstimator

Odhad velikosti populace může být ovlivněn i jinými faktory, jako je například migrace jedinců, genetický drift, selekce nebo mutace. Selekce i mutace se často ve studiích ignorují. Ovšem pro mnoho populací migrace není zanedbatelná. Je prokázáno, že ve srovnání s účinkem genetického driftu vede migrace ke změnám ve frekvenci alel, což vede k podhodnocování či nadhodnocování  $N_e$ , pokud není migrace započítána (J. Wang and Whitlock 2003, Ryman 2019).

Pro odhad efektivní velikosti opakovaným sběrem (temporal methods) se využívají statistické metody. Mezi nejpoužívanější se řadí pseudo-likelihood metoda, která lze vypočítat přes program MLNE (J. Wang and Whitlock 2003). Maximum-likelihood metoda (MCMC) bývá realizována pomocí programu TMVP nebo MLNe. Jestliže chceme zařadit i migraci, můžeme využít programu  $MLN_{open}$  (Barker 2012). Je známo, že opakovaným sběrem docílíme spolehlivějšího odhadu. V datasetu je více jednotlivých opakování genotypů, které se můžou v testování opakovat, čímž máme větší pravděpodobnost dosáhnout přesnějšího odhadu (Gilbert and Whitlock 2015).

Celková velikost populace bývá nejčastěji odhadována pomocí „capture-mark-recapture“ (CMR) modelem, který řadíme mezi *multiple sampling* metody, nebo můžeme využít specializovaných softwarů, kterým se budu věnovat v kapitole č.7.2.

CMR metoda byla vyvinuta Millerem et al. (2005) pro neinvazivní genetické vzorkování založené na „capture-mark-recapture“ principu. Tato metoda se odlišuje od tradičních CMR metod v tom, že jedinci mohou být odchyceni (= genotypováni z neinvazivně sesbíraných vzorků) v sezóně několikrát. ovšem je možné i pouze jediné vzorkování (Miller et al. 2005).

Ve studii tetřeva hlušce (*Tetrao urogallus*) v roce 2009 použili pro odhad velikosti právě CMR model (Mollet et al. 2015). Pro analýzu byl sbírán trus, sběr byl systematicky vyměřen pomocí softwaru GIS. Dvanáct mikrosatelitních lokusů bylo amplifikováno pomocí čtyř multiplexních PCR. Poté použili statistický model spatial capture-recapture (SCR) pro odhad velikosti populace podle pohlaví a fragmentu. 586 vzorků trusu bylo analyzováno, z nichž 69 nemohlo být genotypováno kvůli jejich kvalitě. 51 vzorků bylo přiřazeno tetřívkoví obecnému (*Tetrao tetrix*) a zbývajících 466 bylo použito pro následnou analýzu, ze které byla zjištěna přítomnost 127 jedinců; 77 samců, 46 samic a 4 jedinci nerozpoznaného pohlaví. Použitím tradičního (neprostorového) modelu CMR byl detekován odhad celkové velikosti populace na 137,0. Po aplikování otevřeného modelu SCR, který využívá i detekčních zařízení jako jsou fotopasti a ornitologické sítě, odhadli celkovou velikost populace ve studované oblasti na 137,3 tetřevů. S modelem SCR, vyvinutým pro tuto studii, lze přesné odhady velikosti populace pro nepolapitelné druhy, jako jsou tetřevi, získat z dat pouze z jednoho odběru vzorků, za předpokladu, že alespoň někteří jedinci byli detekováni na vícekrát. Tento model pomáhá výrazně snížit náklady a zjednodušit práci v terénu ve srovnání s klasičtějšími CMR metodami, které vyžadují alespoň dva odběry vzorků (Mollet et al. 2015).

## 7. Softwary

Počítačových softwarů existuje již velké množství. Můžeme je rozdělit do dvou skupin a to podle použité metody odhadu; efektivní a celkové.

### 7.1. Softwary pro odhad efektivní velikosti

Bylo vyvinuto mnoho softwarů pro odhad  $N_e$  v přírodních systémech a výsledky ukazují, že se tyto metody velmi liší ve výkonu napříč demografickými scénáři s různou mírou migrace a velikostí populace. Některé metody vykazují trvale nízký výkon a je nejlepší se jim vyhnout. Gilbertova studie (2015) doporučuje použití několika softwarů, které vykazují nejvyšší přesnost a preciznost v různých demografických scénářích.

Přesnost odhadu mezi izolovanou populací a populací s migrací spočívá i v použití počítačového softwaru. V této studii Gilberta z roku 2015 použili několik programů pro odhad efektivní velikosti, a to Colony2, CoNe, Estim, MLNe, ONeSAMP, TMVP a NeEstimator včetně LDNe napříč simulovanými datovými soubory s populacemi, kde k migraci buďto dochází nebo k ní nedochází.

Výsledek Gilbertovi studie poukazuje na značné rozdíly ve výkonu těchto programů. Nejslabší výkon měly softwary s nejmenším počtem citací (tj. NeEstimator pro MC a HE). Softwary, které naopak měly lepší výkony byly LDNe, MLNe a TMVP. Tyto programy se ukázaly jako spolehlivější pro odhad  $N_e$  napříč demografickými scénáři a jsou nejméně zaujatými metodami; nicméně každý z těchto přístupů byl proveden v odlišném demografickém scénáři. TMVP, MLNe a NeEstimator jsou softwary, které používáme pro temporal data, zatímco LDNe používáme pro odhad z jednoho vzorku. Že jsou tyto programy spolehlivé souvisí i s jejich počtem citací na webové databázi WOS, LDNe je na první místě a hned za ním MLNe.

Například software ONeSAMP (Tallmon and Koyuk 2008), který je často využíván pro odhad efektivní velikosti, v této simulaci selhal a není pro výzkumy doporučován, jelikož způsobuje nadhodnocení  $N_e$ . Pro analýzu LD je vhodným programem NeEstimator v2.0. Doporučovaným programem je i Colony2 v 2.0, ovšem pouze pro odhad SF a LD, pro odhad HE není vhodný a způsobuje nadhodnocení. Nejdoporučovanějším programem je MLNe v1.0, který je vynikající pro scénáře

s vysokou migrací nebo členěnou populací. Nicméně znalost demografie populace do značné míry zlepšují odhady efektivní velikosti populace (Gilbert and Whitlock 2015).

## **7.2. Softwary pro odhad celkové početnosti populace**

Pro odhad celkové velikosti populace se nejčastěji používá program R a jeho balíčky, například balíček SPECIES nebo balíček CAPWIRE jsou velmi často využívány. Ten je vhodný pro data založená na capture-mark-recapture přístupu, program pracuje s daty o opakovaných záznamech jedinců a počítá i s různou pravděpodobností jejich zachycení (Rösner et al. 2014). Na základě likelihood ratio testu je možné zvolit model s rovnoměrnou pravděpodobností zachycení jedinců (ECM), nebo se dvěma různými pravděpodobnostmi (TIRM) (Pennell et al. 2013).

Software pojmenovaný MARK je vhodný pro otevřené i uzavřené populace, byl speciálně vytvořen pro odhad chyb při genotypování, vhodný i pro mark-recapture data, převzal funkci i za starší programy jako CAPTURE, RELEASE a BROWNIE (White and Burnham 2009).

Dalším dříve často využívaným softwarem je program Capture. Předpokladem pro použití tohoto programu je uzavřenost populace a individuální značení jedinců, kdy značky nemohou být ztraceny či přehlédnuty, a stejná pravděpodobnost odchyčení všech jedinců, což naznačuje, že předešlé označení jedince při odchytové akci nemá vliv na pravděpodobnost jeho dalšího odchyty (Rexstad and Burnham 1991).

## 8. Empirické studie

Z mých nasbíraných studií (viz. Tab 2) jsem si vybrala osm, které v této kapitole popíšu a představím jejich použití a výsledky. Kritériem mé volby byla různorodost, kdy jsem volila určité studie tak, aby následující tabulka byla variabilní a zahrnovala rozličné použité metody, odlišné metody sběru, různé druhy DNA a různé živočišné druhy. V této kapitole popíšu ty nejzajímavější studie.

Jedna z prvních studií pro odhad velikosti populace se věnovala medvědu hnědému (*Ursus arctos*). Tato studie i jako jedna z prvních využila *multiple tubes* přístupu pro extrakci DNA. Vzorky byly genotypovány na 24 mikrosatelitových lokusech. Ukázalo se, že pyrenejská populace je složena z pěti jedinců, a to alespoň tři dospělých samců a jedné samice. Observační a genetická data se příliš neliší, což naznačuje, že byli odhaleni všichni jedinci. Problém v této práci spočívá v nízkém procentuálním počtu vhodných vzorků. Genotypovali 352 vzorků a jen 57 poskytovalo dostatečné množství DNA pro úspěšné genotypování na všech polymorfních lokusech. Procentuální úspěšnost amplifikace lokusů se zde pohybovala mezi 15-20 % a to je velmi málo (Taberlet et al. 1997). Tato studie byla jednou z prvních studií, které se věnovaly odhadu velikosti, z tohoto důvodu ji ještě nelze považovat za úplně zdařilou, neboť obsahovala několik chyb, které se podařilo odstranit až v pozdějších studiích. I přes tuto chybovost ji je však třeba pokládat za důležitou, protože posloužila jako podklad nadcházejícím studiím.

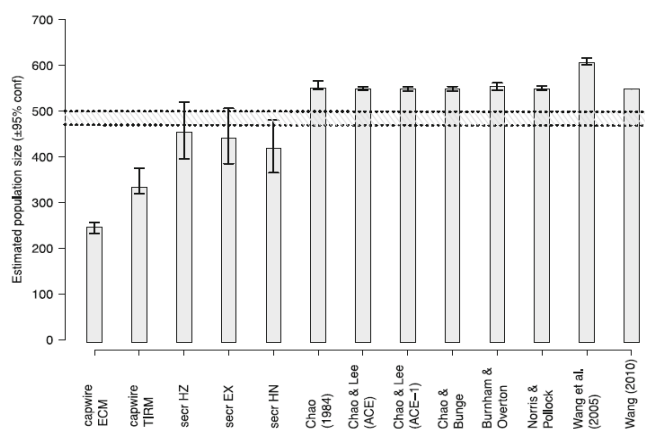
Malé populace mohou trpět různými vnitřními mechanismy, mezi které patří například efekt hrdla lahve (bottleneck effect). Tímto případem se zabírala studie medvědů v Řecku. Medvěd hnědý, největší všežravec v Evropě, v posledních desetiletích prošel několika bottlenecky, zejména kvůli lidské nenávisti a degradaci jeho stanovišť. Jedna z mála populací přežívá v severozápadním Řecku. Tsaparis et al. (2015) se rozhodli změřit jeho populaci a genetickou diverzitu. Vzorky pro genetickou analýzu byly systematicky sbírány pomocí lepivých pastí na srst, ostnatého drátu a byly doplněny o 46 vzorků trusu. Při amplifikaci bylo použito 10 mikrosatelitových lokusů určených pro tento druh. Genotypováním bylo zjištěno 82 různých jedinců, u 72 jedinců bylo zjištěno jejich pohlaví, 48 samců a 24 samic. Minimální velikost populace v regionu Kastoria byla v roce 2011 podle observačních záznamů odhadována na 75 jedinců. Celková velikost byla analyzována pomocí programu Capwire, který velikost

populace odhadl na 219 jedinců (CI95% = 145-271). V této studii odhadovali také i efektivní velikost populace, které byla odhadnuta na 49 softwarem NeESTIMATOR a na 40 jedinců pomocí softwaru ONeSAMP. Tento odhad je blízko minimální hranici 50 jedinců, která by měla být dostatečná pro to, aby se populace vyhnula inbrední depresi (Frankham et al. 2002). Velikost populace se ukázala jako dostatečně silná a mající dobrý stav ochrany (Tsaparis et al. 2015). Tato studie věnovaná medvědu hnědému je novější (18 let rozdíl) a je vidět, že se odhady během pár let posunuly dál a máme přesnější výsledky.

V některých studiích se odhaduje i efektivní velikost, která pomáhá předpovědět velikost inbreedingu a ztrátu genetické variability (Frankham 1995), což například zkoušela porovnat studie Vázquez a Pérez (2013) na kantábrijském tetřevu hlušci (*Tetrao urugallus sp. cantabricus*). V této studii porovnávali rozdíl mezi celkovým odhadem a odhadem efektivní velikosti populace. Výzkum byl prováděn ve Španělsku a využili DNA extrahované z trusu a vypelichaného peří za použití 16 mikrosatelitů. Celková velikost byla odhadnuta na 97 jedinců (z 253 pozitivních vzorků), z toho 53 samců a 37 samic. Ovšem efektivní velikost byla odhadována dvěma způsoby, pomocí odhadu z vazebné nerovnováhy (LD) a pomocí softwaru ONeSAMP (Tallmon et al. 2008). Dle LD byla efektivní velikost odhadnuta pouze na 17 jedinců, software ONeSAMP, který je specializovaný pro odhad efektivní velikost populace, odhadl velikost na 80 jedinců. Metoda LD je považována za spolehlivější a řekla bych, že i v tomto případě má pravdu, jelikož pro lekující druhy by efektivní velikost mohla být mnohonásobně nižší než odhad celkové velikosti populace. Výsledkem této studie je, že hlavní hrozbou pro tuto španělskou populaci tetřevů je její izolovanost. Vhodným managementem by byla ochrana proti predátorům a propojení habitatů (Perez 2013).

Ve výzkumu Rösnera et al. (2014) pomocí neinvazivních vzorků zjišťovali početnost a populační strukturu tetřeva hlušce (*Tetrao urogallus*). Právě tetřev je vlajkovým druhem ochrany horských lesních biotopů v Evropě, kde je několik populací ohroženo vymřením. Zkoumaná byla populace na rozmezí České republiky a Německa v oblasti Šumavského a Bavorského národního parku. Před 30 lety byla česká populace složena pouze ze sta jedinců, a proto je pro ochranu tohoto druhu zapotřebí odhadnout velikost populace a vytvořit plán péče. V průběhu 14 měsíců bylo nasbíráno 7500 vzorků trusu,

pro sběr využili systematickou síť vhodnou pro tetřevy (Teuscher 2011). Vzorky byly následně analyzovány na deseti mikrosatelitových lokusech specifické pro tetřevovité druhy ptáků. Pro odhad velikosti populace použili balíček SPECIES v programu R, ale z důvodu opakovaných sběrů a obavy ze špatné prostorové distribuce použili i program Capwire, který je vhodný pro CMR metody. Z celkového počtu vzorků (7500) bylo pro genetickou analýzu použito 550 náhodně vybraných vzorků, což je škoda, jelikož analýza mohla být komplexnější. Vzorky byly sbírány během 14 měsíců, ale pouze pár týdnů byly sbírány v pozdní zimě, kdy jsou podmínky pro sběr trusu ideální, což by se mohlo jevit jako nevýhoda. Ale i přesto byla úspěšnost amplifikace lokusů vysoká a to až 99 %, jelikož sbírány byly pouze čerstvé vzorky. Genetická analýza odhalila 219 unikátních genotypů; 113 samců a 97 samic. 218 (40 %) vzorků pocházelo z Šumavy, 144 (26 %) z Bavorska a 184 (34 %) bylo z přilehlých oblastí. Pomocí třinácti modelů (Obr. č. 5) byla celková velikost odhadnuta v průměru na 490 jedinců. Toto se mi zdá jako nadhodnocení, které by mohlo být způsobeno právě použitím jen náhodného výběru 550 vzorků. Řídila bych se odhadem programu Capwire (ECM), který je považován za nejpresnější, ten velikost populace odhadl na 246, což by dle mého názoru bylo reálnější. Vzhledem k tomu, že je tetřev lekující druh, mohli zde odhadnout i efektivní velikost. Studie došla k závěru, že populace má životaschopnou velikost a ukazuje neomezený tok genů přes státní hranice, dokonce se česká populace považuje za druhou největší pro nízká pohoří ve střední Evropě. Ovšem pro dlouhodobou životaschopnost populace je třeba přeshraničního managementu a monitoringu této izolované populace Tetřeva hlušce (Rösner et al. 2014).



Obrázek 5: Odhad velikosti populace pomocí 13 modelů pro odhad velikosti tetřeva hlušce, přerušované čáry značí průměr odhadu, Rösner et al. (2014)



Na podobné lokalitě jako v předchozí studii byl prováděn výzkum věnovaný vydře říční (*Lutra lutra*), kde odhadovali celkovou i efektivní velikost populace a její genetickou variabilitu (Martin et al. 2017). Monitoring vyder je obtížný kvůli jejich skrytému způsobu života. Vzorky byly sbírány brzy ráno a systematicky podle univerzální sítě (UTM). V této studii bylo odebráno 261 vzorků trusu a následně analyzováno za pomoci 8 mikrosatelitových lokusů. Z 261 vzorků pouze 60 (23 %) mohlo být genotypováno a analýzy odhalila 38 odlišných genotypů. Takto nízká úspěšnost amplifikace by mohla být přiřazována vyšší teplotě při sběru vzorků. Efektivní velikost populace byla zjišťována pomocí MC metody za použití programu NeEstimator v2.01 a byla odhadnuta na 27,7 (CI95%=15,7-59,5). Celková velikost populace byla odhadována pomocí softwaru Capwire a tím bylo zjištěno 118 jedinců. Díky širokému konfidenčnímu intervalu (CI95%= 64–163) však výsledek odhadu velikosti populace vyžaduje opatrnou interpretaci. Nízká spolehlivost odhadu je pravděpodobně způsobena nízkým počtu zpětných pozorování jedinců (pozorováno 1,4; doporučuje se 2–2,5 (Miller, Joycet, and Waits 2005)) a také nízkým počtem lokusů a nízkou úspěšností amplifikace (23%). Genetická variabilita je stejně nízká jako v jiných evropských populacích. Autoři se domnívají, že tato malá velikost populace je způsobena v důsledku lovení místních rybářů a nedostatkem vhodných vzorků.

Studiem vydry říční se zabývala také studie Arrendala (2007). V této práci porovnávali silné a slabé stránky odhadu početnosti pomocí pozorování stop (*snow tracking*) a neinvazivního sběru trusu. Výzkum probíhal v severní a centrální části Švédska, a právě v takovýchto zemích, kde je zem pokrytá sněhem, se častěji využívá pro odhad velikosti populace sledování stop. Sledování stop probíhalo v okolí jezer a řek, trus byl sbírán v období zimy (n=150). Vzorkování probíhalo i z 20 vzorků tkáně (sval či ledvina) odebrané z mrtvých jedinců. Úspěšnost amplifikace byla v tomto případě 49 % (viz. Tab 2). Programem Capwire byla průměrná velikost populace odhadnuta na 31 (23-40) jedinců, zatímco sledování stop odhadlo velikost na maximálně 15 jedinců. Autoři se domnívají, že sledování stop může podhodnotit populaci i přes dobré sněhové podmínky, proto je lepší věřit genetickým výsledkům (Arrendal et al. 2007). Já si myslím, že docílit spolehlivého odhadu u vyder je dost obtížné, kvůli jejich neustálé migraci, kterou musíme zahrnout do výpočtu, což v případě této studie zahrnuta nebyla.

Dalším často studovaným živočichem je vlk obecný (*Canis lupus*). Příkladem je tomu studie Marucca et al. (2009), která studovala vlky v západních Alpách v průběhu sedmi let. Získávání vzorků se skládalo z pozorování vlčích stop ve sněhu a opakovaným sběrem trusu (capture-recapture method CRM). DNA byla analyzována pomocí mikrosatelitových lokusů a mtDNA. Nasbíráno bylo 3382 vzorků trusu a prozkoumáno 3366 km vlčích stop. Genotypováno bylo 1399 vzorků trusu, jejich úspěšnost při amplifikaci činila 41,4 %, většina chyb byla způsobena tzv. *allelic dropouts*. Genotypováním a pomocí CRM modelu (open model capture-recapture) bylo identifikováno 87 jedinců, zatímco pomocí tzv. *snow tracking* byla početnost vlků odhadnuta pouze na 36 jedinců. Tento nízký odhad pomocí observačních technik by mohl být způsoben ekologií mladých vlků, jelikož u nich je větší pravděpodobnost nižší detekce stop z důvodu jejich výskytu mimo lidská obydlí. Proto se pro ně doporučuje využití neinvazivních metod (Marucco et al. 2009).

Další prací, která se věnovala právě vlkovi byla prováděna v Západních Karpatech. Kotal (2017) a jeho tým zkoumali výskyt vlka obecného pomocí neinvazivních metod a fotopastí. Pro genetickou analýzu využili 134 neinvazivních vzorků (především trusu) a 10 tkáňových vzorků. Vzorky genotypovali na 18 mikrosatelitových lokusech. Genotyp se podařilo získat u 55 neinvazivních vzorků (40 %) a u 10 tkáňových vzorků (100 %), ve kterých bylo určeno 55 odlišných jedinců, pohlaví jedinců nebylo určováno. Výsledky genetických analýz naznačují, že se jedná o dynamické území, ovšem pro přesnější početnost a vhodný management bylo by za potřebí mnohem více vzorků (Kotal et al. 2017). Například Steinglein et al. (2011) doporučuje použití 50-100 vzorků na smečku o velikosti 5-8 jedinců.

## 8.1. Zhodnocení empirických studií

V následující tabulce (Tab 2, n = 31) jsem se pokusila o srovnání, které hodnotí velikosti populace, případně efektivní velikosti populace pomocí observačních metod a pomocí odhadu na základě genetických metod. V těchto studiích se druhy opakují, poněvadž se jedná o ohrožené druhy jako je vlk obecný, medvěd hnědý a vydra říční. Studií věnujících se právě odhadu velikosti ještě moc není, většinou jsem nacházela studie, které zkoumají genetickou diverzitu či jestli populace prošla bottleneckem. Studie věnující se odhadu velikosti z neinvazivních vzorků se dostávají do popředí až v posledních patnácti letech. Vyhledávala jsem je pomocí databáze WOS, kde jsem použila klíčová slova jako population estimation size, noninvasive DNA, microsatellites či effective size population.

Nejjednoznačnejším výsledkem mé rešerše je, že nejpoužívanějším markerem pro genetické analýzy jsou mikrosatelity. V mé tabulce byly využity ve 28 studiích z 31. Je to především kvůli jejich vlastnostem, lze je získat i z velmi malého množství DNA, a proto je jejich využití při studiu ohrožených druhů živočichů výhodnější než použití jiných markerů (Buschiazzo and Gemmell 2006). Spolehlivého a přesnějšího odhadu lze docílit větším počtem a dostatečnou variabilitou (větší počet alel na lokus) použitých lokusů (Kalinowski 2002). V novějších studiích se do popředí dostává využití SNP (*single nucleotid polymorfism*) markerů. SNP reprezentuje nejširší zdroj sekvenční variace v genomu a stává se tak populárnějším genetickým markerem v ekologických a ochranných studiích (Fabbri et al. 2012).

Zjistila jsem, že nízká procentuální úspěšnost amplifikace je způsobena nízkou kvalitou i kvantitou neinvazivní DNA. To souvisí s nízkou úspěšností genotypování oproti vzorkům, které byly získány invazivně (např. krev). U těchto vzorků bývá stoprocentní úspěšnost (např. Kotal et al. 2017). Nízká úspěšnost amplifikace neinvazivních vzorků poté ovlivňuje výsledek odhadu velikosti populace (jsou tomu příkladem studie Creel et al. 2003; Hájková et al. 2006; Arrendal, J., Vila, C., & Björklund 2007; Creel and Rosenblatt 2013).

Trus je díky své dostupnosti hlavním zdrojem pro genetické analýzy. V mých studiích je v 26 případech. Tento zdroj DNA se potýká s chybami při genotypování. Ale na tyto chyby bylo vymyšleno již několik přístupů, které sice úplně neumí eliminovat chyby, ale alespoň se pokouší snížit jejich objem. Mezi tyto přístupy patří multiple tubes

approach (Taberlet and Waits 1999), opakování PCR a dostatečné množství čerstvých vzorků (Goossens et al. 2000; Stenglein et al. 2011). I vnější jevy mohou přispět k lepším výsledkům. To se týká především teploty při sběru trusu. Nižší teplota nezpůsobuje tak vysokou míru degradace DNA (Hájková et al. 2006).

Přesnějších odhadů bylo docíleno systematickým sběrem vzorků (vytvoření mapovací sítě, např. De Barba et al. 2010; Rösner et al. 2014; Rehnus and Bollmann 2016), to se týká spíše migrujících a hodně pohybujících se druhů jako je vlk či medvěd. Pro druhy, které se vyskytují na specifických místech (např. lejující tetřev hlušec v době rozmnožování), se dá využít i jednoduššího sběru v těchto specifických lokalitách. Co se týče sběru, tak komplexnější analýzu nám přinese opakovaný sběr a jeho následný CR modelling (Miller, Joycet, and Waits 2005). Pokud použijeme metodu *single sample*, pravděpodobně otestujeme jen část genotypů, které se v populaci vyskytují (Barker 2012).

Nevýhodou těchto studií využívající neinvazivního vzorkování je, že je zapotřebí mít dostatečné množství vzorků. Nedostatečné množství vzorků může zkreslit výsledek analýzy. Čím méně budeme mít nasbíraných vzorků, tím menší procento populace otestujeme. Ovšem nasbírat dostatečné množství vzorků v případě malých populací ohrožených druhů je časově náročné a může zabrat řadu let (Piggott et al. 2004).

Znalost demografie populace do značné míry zlepšuje odhady efektivní velikosti populace. Pokud studujeme migrující či pohyblivé živočichy, musíme do analýzy započítat jejich migraci, abychom se vyvarovali zkreslenému výsledku (J. Wang and Whitlock 2003, Ryman 2019). S mírou migrace počítá například software MLNe v1.0, který je doporučovaný pro scénáře s vysokou migrací nebo strukturovanou populací (Gilbert and Whitlock 2015).

Dalším mým poznatkem je, že v mnou revidovaných studiích často chybí srovnání odhadů velikosti populace pomocí molekulárních metod a počtu vyskytujících se jedinců pomocí observačních metod (9 z 31 studií použilo nějakou formu observační metody, z nichž 4 studie srovnávali spolehlivost). Pokud studie srovnává odhad velikosti populace pomocí observačních i molekulárních technik, tak ta odhadovaná velikost populace pomocí molekulárních metod bývá větší, mnohdy i dvojnásobně (např. studie věnovaná vydře říční (Arrendal et al. 2007) nebo studie

aplikovaná na vlka obecného (Marucco et al. 2009). Ve studiích se mnohdy odhaduje celková a efektivní velikost. Tyto dvě velikosti se liší, celkový odhad bývá větší než odhad efektivní velikosti, která tvoří jen 20-30 % populace (Frankham 1995).

Zjistila jsem, že vlk obecný je často studovaným zvířetem, v mé tabulce se vyskytuje pětkrát. Vlk pobývá blízko lidských obydlí, a tak je o něm známo spousta informací, jako je třeba jeho početnost. Proto studie využívají těchto informací, aby otestovali přesnost odhadu velikosti populací (Creel et al. 2003; Kutal et al. 2017). Právě toto zvíře se pro ochranu přírody považuje za poslední naději, kvůli jejich schopnosti nastavit v přírodě rovnováhu (Wohlleben, 2018).

Dle mého názoru je stále málo studií, které odhadují početnost populací pomocí molekulárních technik. Dále se domnívám, že některé odhady nejsou ještě tak přesné, abychom se dle nich řídili. Například u druhů, které se vyskytují v okolí jednoho místa a je snadné je pozorovat, např. tokající tetřev, v tomto případě je lepší se řídit observační technikou. neinvazivním genotypováním se může udělat více chyb a tím dosáhneme méně přesného odhadu. Myslím si, že Studie využívající neinvazivní techniky nám podávají přibližné informace o početnosti populací, ale zatím se jedná jen o relativní odhady a je za potřebí postupy vypilovat.

## 9. Závěr

- Neinvazivní genetické metody mohou poskytnout relevantní informace o celkové i efektivní velikosti populace, především na nepolapitelné druhy a pro druhy, které žijí skrytým způsobem života. Získání informací o jejich rozšíření a početnosti nám pomůže zlepšit péči a management jejich ochrany. Cílem mé rešerše bylo zjistit odlišnosti v problematice odhadů velikosti populací.
- V mé rešerši jsem zaznamenala, že design sběru, objem a kvalita vzorků a použití přesných postupů (např. mnohonásobná PCR, multiple tubes approach) ovlivňuje přesnost odhadu.
- Nízká procentuální úspěšnost amplifikace je způsobena nízkou kvalitou neinvazivní DNA. Pro spolehlivější odhad velikosti populace se doporučuje sběr trusu během zimních měsíců či brzy na jaře, kdy jsou vzorky ještě zmrzlé a nedegradované, naopak sběr peří a srsti je doporučován v teplých a suchých podmínkách.
- Mým poznatkem k neinvazivní DNA je i to, že studie zaměřující se na odhad velikosti populace převážně využívá jako zdroj DNA trus, a to z důvodu jeho dostupnosti.
- Ve volbě druhu genetického markeru převažují mikrosatelity. Je to z důvodu jejich hojného výskytu v genomu. Přesnost odhadu především závisí na počtu mikrosatelitových lokusů a jejich variabilitě. U novějších studií byly využity i SNP markery, které by mohly být v budoucnu používanější než mikrosatelity. SNP jsou hojněji rozšířeny v genomech mnoha druhů (kódujících a nekódujících oblastech) než mikrosatelity.
- Pro výpočet efektivní velikosti populace existuje několik metod. Nejpřesnějšími a nejpoužívanějšími metodami jsou *linkage disequilibrium* (LD) a *sibship frequency* (SF).
- Co se týče softwarů, pro výpočet efektivní velikosti jsou nejpřesnější LDNe, Colony a MLNe. Srovnání kvality programů pro odhad celkové početnosti populace zatím nikdo neudělal, ale nejčastěji se používají statistické programy jako je R, včetně jeho balíčků (SPECIES, CAPWIRE). CAPWIRE se používá

pro metody se zpětným odchylem. Dále hojně používaným softwarem je Capture, který je vhodný pro uzavřené populace.

- Spolehlivost odhadů je ve značné míře ovlivněna migrací a pokud není ve výpočtu započítána, způsobuje nadhodnocení populace.
- Přesnějších odhadů početnosti bylo docíleno opakovaným, nebo systematickým sběrem vzorků a doplněním molekulárních metod o metody observační.
- Je patrné, že účinnost a vhodnost použití jednotlivých metod pro odhad velikosti populace je závislá na mnoha faktorech. Na základě výsledků mé práce je tedy možné některé metody doporučit, nicméně je zapotřebí zohlednit individuální charakter studované populace. Závěrem ale lze konstatovat, že se jedná o zdařilou a šetrnou metodu pro odhad velikosti populace ohrožených druhů.
- Tato bakalářská práce by mohla sloužit jako podklad pro mou budoucí diplomovou práci.
- Do budoucna by bylo dobré provést více studií, které by kombinovaly současné poznatky a postupy, kam patří kombinace molekulárních a observačních metod, kombinace různých metod výpočtů a přesných postupů v laboratoři. Dále by bylo vhodné odhady provádět na dalších druzích, ať už na jejich izolovaných populacích či populacích s migrujícími. V současné době neexistuje moc studií, které by se věnovaly dlouhodobějšímu (v řádu let) vzorkování, což by bylo dobré napravit, jelikož větší množství vzorků podává efektivnější informace o dané populaci.

## 10. Literatura

- Arif, Ibrahim A., Haseeb A. Khan, Ali H. Bahkali, Ali A. Al Homaidan, Ahmad H. Al Farhan, Mohammad Al Sadoon, and Mohammad Shobrak. 2011. "DNA Marker Technology for Wildlife Conservation." *Saudi Journal of Biological Sciences* 18 (3): 219–25. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.03.002>.
- Arrendal, J., Vila, C., & Björklund, M. 2007. "Reliability of Noninvasive Genetic Census of Otters Compared to Field Censuses." *Conservation Genetics*, 8(5), 1097–1107. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9266-y>.
- Barba, Marta De, Lisette P. Waits, Piero Genovesi, Ettore Randi, Roberta Chirichella, and Ermanno Cetto. 2010. "Comparing Opportunistic and Systematic Sampling Methods for Non-Invasive Genetic Monitoring of a Small Translocated Brown Bear Population." *Journal of Applied Ecology* 47 (1): 172–81. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01752.x>.
- Barker, James Stuart F. 2012. "Effective Population Size of Natural Populations of *Drosophila Buzzatii*, with a Comparative Evaluation of Nine Methods of Estimation," no. December. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05324.x>.
- Broquet, Thomas, Nelly Ménard, and Eric Petit. 2007. "Noninvasive Population Genetics: A Review of Sample Source, Diet, Fragment Length and Microsatellite Motif Effects on Amplification Success and Genotyping Error Rates." *Conservation Genetics*. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9146-5>.
- Buschiazzo, Emmanuel, and Neil J. Gemmill. 2006. "The Rise, Fall and Renaissance of Microsatellites in Eukaryotic Genomes." *BioEssays* 28 (10): 1040–50. <https://doi.org/10.1002/bies.20470>.
- Creel, Scott, and Elias Rosenblatt. 2013. "Using Pedigree Reconstruction to Estimate Population Size: Genotypes Are More than Individually Unique Marks." *Ecology and Evolution* 3 (5): 1294–1304. <https://doi.org/10.1002/ece3.538>.
- Creel, Scott, Goran Spong, Jennifer L. Sands, Jay Rotella, Janet Zeigle, Lawrence Joe, Kerry M. Murphy, and Douglas Smith. 2003. "Population Size Estimation in Yellowstone Wolves with Error-Prone Noninvasive Microsatellite Genotypes." *Molecular Ecology* 12 (7): 2003–9. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01868.x>.
- Dakin, E. E., and J. C. Avise. 2004. "Microsatellite Null Alleles in Parentage Analysis." *Heredity*. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800545>.
- Edwards, A, A Civitello, H A Hammond, and C T Caskey. 1991. "DNA Typing and Genetic Mapping with Trimeric and Tetrameric Tandem Repeats." *American Journal of Human Genetics* 49 (4): 746–56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1897522>.
- Fabbri, E., Caniglia, R., Mucci, N., Thomsen, H. P., Krag, K., Pertoldi, C., ... & Randi, E. 2012. "Comparison of Single Nucleotide Polymorphisms and Microsatellites in Non-Invasive Genetic Monitoring of a Wolf Population." *Archives of Biological Sciences*, 64 (1): 321–35. <https://doi.org/10.2298/ABS1201321F>.



- Faria, P J, G D Kavembe, C N Kimwele, L D Estes, P R Reillo, A G Mwangi, and M W Bruford. 2011. "The Use of Non-Invasive Molecular Techniques to Confirm the Presence of Mountain Bongo *Tragelaphus Eurycerus Isaaci* Populations in Kenya and Preliminary Inference of Their Mitochondrial Genetic Variation," no. East 1999. <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0181-5>.
- Flegr, J. (2005). *Evoluční biologie [Evolutionary biology]*. Academia, Praha, 19949-19954, 560 s.
- Frankham, Richard. 1995. "Effective Population Size / Adult Population Size Ratios in Wildlife : A Review," no. 1995: 95–107.
- Frankham, Richard. 2003. "Genetics and Conservation Biology." *Comptes Rendus Biologies* 326 (August): 22–29. [https://doi.org/10.1016/S1631-0691\(03\)00023-4](https://doi.org/10.1016/S1631-0691(03)00023-4).
- Gilbert, Kimberly J, and Michael C Whitlock. 2015. "Evaluating Methods for Estimating Local Effective Population Size with and without Migration," 2154–66. <https://doi.org/10.1111/evo.12713>.
- Goossens, Benoît, Sri S Utami, Jan De Ruiter, and Michael W Bruford. 2000. "A Multi-Samples , Multi-Extracts Approach for Microsatellite Analysis of Faecal Samples in an Arboreal Ape," no. 1995: 157–62.
- Guimaraes, S, E Stoetzel, O Gorgé, E A Bennett, C Denys, and T Grange. 2016. "Owl Pellets : A Wise DNA Source for Small Mammal Genetics" 298: 64–74. <https://doi.org/10.1111/jzo.12285>.
- Hájková, P., Bryja. 2006. "Výskum a Ochrana Cicavcov Na Slovensku VII."
- Hájková, P., B. Zemanová, J. Bryja, B. Hájek, K. Roche, E. Tkadlec, and J. Zima. 2006. "Factors Affecting Success of PCR Amplification of Microsatellite Loci from Otter Faeces." *Molecular Ecology Notes* 6 (2): 559–62. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01269.x>.
- Hare, Matthew P. 2001. "Prospects for Nuclear Gene Phylogeography Matthew P." *Trends in Ecology & Evolution* 16 (12): 700–706.
- Kalinowski, S. 2002. "How Many Alleles per Locus Should Be Used to Estimate Genetic Distances ?" *Heredity*, 62–65. <https://doi.org/10.1038/sj/hdy/6800009>.
- Kamath, Pauline L, Mark A Haroldson, Gordon Luikart, and David Paetkau. 2015. "Multiple Estimates of Effective Population Size for Monitoring a Long-Lived Vertebrate: An Application to Yellowstone Grizzly Bears," 5507–21. <https://doi.org/10.1111/mec.13398>.
- Kleven, Oddmund, Tomas Aarvak, Karl Otto Jacobsen, Roar Solheim, and Ingar J. Øien. 2016. "Cross-Species Amplification of Microsatellite Loci for Non-Invasive Genetic Monitoring of the Snowy Owl (*Bubo Scandiacus*)." *European Journal of Wildlife Research* 62 (2): 247–49. <https://doi.org/10.1007/s10344-016-0986-0>.
- Kohn, Michael H, Eric C York, Denise A Kamradt, Gary Haught, Raymond M Sauvajot, and Robert K Wayne. 1999. "Estimating Population Size by Genotyping Faeces."

- Kutal, Miroslav, Barbora Černá Bolfíková, Martin Duľa, Leona Kutalová, Michal Bojda, Michal Kalaš, Tomáš Flajs, et al. 2017. "Recentní Výskyt a Dynamika Vlka Obecného (*Canis Lupus*) v Západních Karpatech." *Zborník z Konferencie „Výskum a Ochrana Malej Fatry“*, 79–83.
- Lampa, Simone, Klaus Henle, Reinhard Klenke, Marion Hoehn, and Bernd Gruber. 2013. "How to Overcome Genotyping Errors in Non-Invasive Genetic Mark-Recapture Population Size Estimation - A Review of Available Methods Illustrated by a Case Study." *Journal of Wildlife Management*. <https://doi.org/10.1002/jwmg.604>.
- Lehman, Niles, and Robert K Wayne. 1991. "Analysis of Coyote Mitochondrial."
- Luikart, Gordon, Nils Ryman, David A Tallmon, Michael K Schwartz, and Fred W Allendorf. 2010. "Estimation of Census and Effective Population Sizes : The Increasing Usefulness of DNA-Based Approaches," 355–73. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0050-7>.
- Martin, Edith Andrea, Marco Heurich, Jörg Müller, Ludek Bufka, Oleg Bublly, and Jörns Fickel. 2017. "Genetic Variability and Size Estimates of the Eurasian Otter (*Lutra Lutra*) Population in the Bohemian Forest Ecosystem." *Mammalian Biology* 86 (September): 42–47. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2016.12.001>.
- Marucco, Francesca, Daniel H. Pletscher, Luigi Boitani, Michael K. Schwartz, Kristy L. Pilgrim, and Jean Dominique Lebreton. 2009. "Wolf Survival and Population Trend Using Non-Invasive Capture-Recapture Techniques in the Western Alps." *Journal of Applied Ecology* 46 (5): 1003–10. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01696.x>.
- Miller, Craig R, Paul Joycet, and Lisette P Waits. 2005. "A New Method for Estimating the Size of Small Populations from Genetic Mark-Recapture Data," 1991–2005.
- Mollet, Pierre, Marc Kéry, Beth Gardner, Gilberto Pasinelli, and J Andrew Royle. 2015. "Estimating Population Size for Capercaillie ( *Tetrao Urogallus L.* ) with Spatial Capture- Recapture Models Based on Genotypes from One Field Sample," 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129020>.
- Morin, Phillip. A., Chambers, K. E., Boesch, C., & Vigilant, L. (2001). "Quantitative Polymerase Chain Reaction Analysis of DNA from Noninvasive Samples for Accurate Microsatellite Genotyping of Wild Chimpanzees ( *Pan Troglodytes Verus* )." 2001. *Molecular Ecology*. Vol. 10.
- Morin, Phillip A., Gordon Luikart, and Robert K. Wayne. 2004. "SNPs in Ecology, Evolution and Conservation." *Trends in Ecology and Evolution*. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.01.009>.
- Navidi, W, N Arnheim, and M S T Waterman. 1992. "A Multiple-Tubes Approach for Accurate Genotyping of Very Small DNA Samples by Using PCR : Statistical Considerations," 347–59.
- Pennell, Matthew W, Carisa R Stansbury, Lisette P Waits, and Craig R Miller. 2013. "Capwire : A R Package for Estimating Population Census Size from Non-

- Invasive Genetic Sampling,” 154–57. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12019>.
- Perez, Trinidad. 2013. “Census and Effective Population Size of the Endangered Cantabrian Capercaillie ( Tetrao Urogallus ) Estimated from Non-Invasive Samples Census and Effective Population Size of the Endangered Cantabrian Capercaillie ( Tetrao Urogallus ) Estimated from Non-Invasive Samples,” no. November.
- Piggott, Maxine P, Eva Bellemain, Pierre Taberlet, and Andrea C Taylor. 2004. “A Multiplex Pre-Amplification Method That Significantly Improves Microsatellite Amplification and Error Rates for Faecal DNA in Limiting Conditions,” no. 1995: 417–20.
- Puechmaile, Sebastien J., and Eric J. Petit. 2007. “Empirical Evaluation of Non-Invasive Capture-Mark-Recapture Estimation of Population Size Based on a Single Sampling Session.” *Journal of Applied Ecology* 44 (4): 843–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01321.x>.
- Primack, R. B., Kindlmann, P., & Jersáková, J. (2011). *Úvod do biologie ochrany přírody*. PORTÁL sro., 44
- Rehnus, Maik, and Kurt Bollmann. 2016. “Non-Invasive Genetic Population Density Estimation of Mountain Hares (Lepus Timidus) in the Alps: Systematic or Opportunistic Sampling?” *European Journal of Wildlife Research* 62 (6): 737–47. <https://doi.org/10.1007/s10344-016-1053-6>.
- Rextad, Eric; Burnham, Kenneth P. *User's guide for interactive program CAPTURE*. Color. Cooperative Fish and Wildlife Research Unit, 1991.).
- Rösner, Sascha, R. Brandl, G. Segelbacher, T. Lorenc, and J. Müller. 2014. “Noninvasive Genetic Sampling Allows Estimation of Capercaillie Numbers and Population Structure in the Bohemian Forest.” *European Journal of Wildlife Research* 60 (5): 789–801. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0848-6>.
- Ryman, Nils, Linda Laikre, and Ola Hössjer. 2019. “Do Estimates of Contemporary Effective Population Size Tell Us What We Want to Know ?,” no. April 2018: 1904–18. <https://doi.org/10.1111/mec.15027>.
- Schulte, Ulrich, Felix Gebhard, Lisa Heinz, Michael Veith, and Axel Hochkirch. 2011. “Buccal Swabs as a Reliable Non-Invasive Tissue Sampling Method for DNA Analysis in the Lacertid Lizard Podarcis Muralis” 7 (2): 325–28.
- Schultz, Anthony J, Romane H Cristescu Bethan L Littleford-colquhoun, Damian Jaccoud, and Céline H Frère. 2018. “Fresh Is Best : Accurate SNP Genotyping from Koala Scats,” no. May 2017: 3139–51. <https://doi.org/10.1002/ece3.3765>.
- Seddon, J.M. 2005. “SNPs in Ecological and Conservation Studies : A Test in the Scandinavian Wolf Population,” 503–11. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02435.x>.
- Soulé, M. 2015. “What Is Conservation?” *Oryx* 49 (4): 565–66. <https://doi.org/10.1017/S0030605315000952>.
- Stenglein, Jennifer L, Lisette P Waits, David E Ausband, Peter Zager, and Curt M

- Mack. 2011. "Estimating Gray Wolf Pack Size and Family Relationships Using Noninvasive Genetic Sampling at Rendezvous Sites Estimating Gray Wolf Pack Size and Family Relationships Using Noninvasive Genetic Sampling at Rendezvous Sites" 92 (4): 784–95. <https://doi.org/10.1644/10-MAMM-A-200.1>.
- Taberlet, P., Camarra, J. J., Griffin, S., Uhres, E., Hanotte, O., Waits, L. P., ... & Bouvet, J. 1997. "Noninvasive Genetic Tracking of the Endangered Pyrenean Brown Bear Population." *Molecular Ecology*, no. 6 (9): 869-876.
- Taberlet, P., & Fumagalli, L. (1996). Owl pellets as a source of DNA for genetic studies of small mammals. *Molecular Ecology*, 5(2), 301-305.
- Taberlet, P., Waits, L. P., & Luikart, G. 1999. "Reliability of Noninvasive Genetic Census of Otters Compared to Field Censuses." *Trends in Ecology and Evolution*, 323–27. <https://doi.org/10.1007/s10592-006-9266-y>.
- Taberlet, Pierre, Lisette P. Waits, and Gordon Luikart. n.d. 1999 Noninvasive genetic sampling: "Look before you leap" *Trends in ecology & evolution*, 14(8), 323-327."
- Taberlet, P, S Griffin, B Goossens, S Questiau, V Manceau, N Escaravage, L P Waits, and J Bouvet. 1996. "Reliable Genotyping of Samples with Very Low DNA Quantities Using PCR." *Nucleic Acids Research* 24 (16): 3189–94. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8774899>.
- Tallmon, D. A., Koyuk, A., Luikart, G., & Beaumont, M. A. 2008. "ONe SAMP : A Program to Estimate Effective Population Size Using Approximate Bayesian Computation." *Molecular Ecology Resources*, 299–301. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01997.x>.
- Tautz D. 1989. "Hypervariability of Simple Sequences of a General Source for Polymorphic DNA Markers." *Nucleic Acids Research* 17 (16): 6463–71. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC318341/pdf/nar00133-0040.pdf>.
- Teuscher, Miriam. 2011. "Modelling Habitat Suitability for the Capercaillie Tetrao Urogallus in The." *Zeitschrift Bayerischer Und Baden-Württembergischer Ornithologen*, no. January.
- Toth, G, Z Gaspari, and J Jurka. 2003. "Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes: Survey and Analysis." *Genome Research* 10: 967–81.
- Tsapis, Dimitris, Nikoleta Karaiskou, Yorgos Mertzanis, and Alexander Triantafyllidis. 2015. "Non-Invasive Genetic Study and Population Monitoring of the Brown Bear (Ursus Arctos) (Mammalia: Ursidae) in Kastoria Region – Greece." *Journal of Natural History* 49 (5–8): 393–410. <https://doi.org/10.1080/00222933.2013.877992>.
- Walker, Brett L, Sara J Oyler-mccance, Jennifer A Fike, and Barry R Noon. 2019. "Genetic Mark-Recapture Analysis of Winter Faecal Pellets Allows Estimation of Population Size in Sage Grouse Centrocercus Urophasianus." <https://doi.org/10.1111/ibi.12768>.
- Wan, Qiu Hong, Hua Wu, Tsutomu Fujihara, and Sheng Guo Fang. 2004. "Which

- Genetic Marker for Which Conservation Genetics Issue?" *Electrophoresis* 25 (14): 2165–76. <https://doi.org/10.1002/elps.200305922>.
- Wang, Chaolong, Kari B Schroeder, and Noah A Rosenberg. 2012. "A Maximum Likelihood Method to Correct for Allelic Dropout in Microsatellite Data with No Replicate Genotypes," 1–48.
- Wang, Jinliang. 2016. "A Comparison of Single-Sample Estimators of Effective Population Sizes from Genetic Marker Data," 4692–4711. <https://doi.org/10.1111/mec.13725>.
- Wang, Jinliang, and Michael C Whitlock. 2003. "Estimating Effective Population Size and Migration Rates From Genetic Samples Over Space and Time" 446 (January): 429–46.
- Waples, Robin S. 2016. "Making Sense of Genetic Estimates of Effective Population Size," 4689–91.
- White, Gary C, and Kenneth P Burnham. 2009. "Program MARK: Survival Estimation from Populations of Marked Animals" 3657. <https://doi.org/10.1080/00063659909477239>.
- Zemanová, B., P. Hájková, and Josef Bryja. 2016. "8-Genetika-v-Ochrane." *Forum Ochrany Přírody*, 28–29.
- Wohlleben, Peter. *Tajná síť přírody: jak stromy vyrábějí mraky a žížaly regulují divoká prasata*. Přeložil Jana ČEŘENOVÁ. Brno: Kazda, 2018. ISBN 978-80-906819-6-5, 14

## 11. Seznam příloh

<b>Obrázek 1:</b> Porovnání výskytu nespecifických peaků mezi bukálními stěry a vzorky tkáně, Schulte et al. 2011 .....	13
<b>Obrázek 2:</b> Porovnání skutečné velikosti populace a minimální velikosti populace odhadnuté spočtením počtu odlišných genotypů pomocí DNA extrahované z 227 vzorků trusu odebraných vlkům. Skutečná průměrná velikost populace v období, ve kterém byly odebrány vzorky, byla 40 jedinců. Minimální velikost populace odhadnutá z genetických dat byla nadhodnocena 3,3krát (za použití tří lokusů) až 5,5krát (za použití 13 lokusů). Creel et al. 2003 .....	14
<b>Obrázek 3:</b> Průměrné $N_e$ a standartní chyba odhadu (RMSE) porovnávaných analýz. HE a MC mají větší chybovost, J.Wang 2016 .....	17
<b>Obrázek 4:</b> Odolnost SF vůči allelic dropouts, J.Wang 2016.....	17
<b>Tabulka 1:</b> Přehled vlastností metod pro výpočet $N_e$ pomocí single metod, J.Wang 2016.....	18
<b>Obrázek 5:</b> Odhad velikosti populace pomocí 13 modelů pro odhad velikosti tetřeva hlušce, přerušované čáry značí průměr odhadu, Rösner et al. (2014).....	24
<b>Tabulka 2:</b> Tabulka empirických studií.....	40

## Tabulka empirických studií

druh	autor	místo	druh vzorku	počet vzorku	marker	metoda Ne	software	úspěšnost amplifikace	výsledek
Bongo lesní ( <i>Tragelaphus eurycerus isaaci</i> )	Faria et al. 2011	Mount Kenya NP, Aberdare NP, Eburu and Mau forests	trus	201 (102 pouze Bongo)	mtDNA cytochrom b	nezjišťováno	-	100%	Použití mtDNA se ukázalo jako problematické, především kvůli její mateřské dědičnosti, proto se doporučuje využít i mikrosatelity. Z 201 vzorků bylo určena velikost bonga lesního na 102 jedinců.
Gorila západní ( <i>Gorilla gorilla</i> )	Arandjelovic et al. 2010	Loango National Park, Gabon	trus	326	16 mikrosatelitů (pro gorily), 8 mikro. (pro šimpanzy)	Baysian estimator, maximum-likelihood	STRUCTURE	82% (gorily), 46% (šimpanzi)	Z 285 odpovídajících vzorků bylo analyzováno 83 unikátních genotypů goril. Na závěr této studie autoři shrnují pozitiva neinvazivních metod a doporučují studium primátů jako doplněk pro průzkum dopadu habitatu a jiných genetických průzkumů na člověka.
Jelenovití ( <i>Odocoileus</i> )	Brazeal et al. 2017	Sierra Nevada Range, USA	trus	411	8-10 mikrosatelitů	nezjišťováno	-	33% (2013), 63% (2014)	V roce 2013 byl poměr pohlaví 62 samců na 100 samic a v roce 2014 65 samců na 100 samic. Průměrná hustota je 5 jelenů na km <sup>2</sup> . SCR model odhalil, že denzita byla homogenně rozptýlená ve zkoumané oblasti.

Kočka divoká ( <i>Felis silvestris silvestris</i> )	Velli et al. 2015	Apeninský poloostrov	trus, srst	63 (30 srst, 33 trus)	10 mikrosatelitů, mtDNA (CR)	nezjišťováno	STRUCTU- RE	35,30%	Přítomnost kočky divoké v této studii byla zkoumána 3 neinvazivními způsoby. Velikost populace byla odhadnuta mezi 6 až 9 jedinci. Nejhůře na tom byl Valerian-treated, který vedl k podhodnocení populace. Populace se považuje za stabilní.
Kojot préríjní ( <i>Canis latrans</i> )	Kohn et al. 1999	Santa Monica Mt., USA	trus	238	188 (mtDNA) 115 (3 mikrosatelity)	nezjišťováno	-	79%	Analýzou bylo zjištěno, že se populace pohybuje mezi 30 a 47 jedinci.
Lama guanako ( <i>Lama guanicoe</i> )	Sarno et al. 2014	Torres del Paine NP, Chile	trus, krev	-	10 mikrosatelitů	LD, Bayesian structure, pseudo- likelihood	ONeSAMP, LDNE, MLNE	-	Ve studii odhadovali efektivní velikost populace ze vzorků z roku 1991 a 1997. Použili metody jak single sample (43,1), tak temporal (34,3). Celková efektivní velikost byla odhadnuta na 41 jedinců.
Los evropský ( <i>Alces alces</i> )	Blåhed et al. 2019	Öland, Švédsko	trus	489	86 autozomál- ních SNP	nezjišťováno	CAPWIRE	75%	Byla zjištěna přítomnost 100 jedinců. SNP je spolehlivý nástroj pro odhad velikosti, struktury a demografie populace.



Los evropský ( <i>Alces alces</i> )	Charlier 2008	Švédsko	svalová tkáň	-	6 mikrosatelitů	HE	STRUCTU- RE, BOTTLE- NECK	-	Lovci od roku 1980 sbírali svalovou tkáň, která byla následně analyzována. Analýza vyhodnotila 132 jedinců ze 4 geograficky oddělených oblastí. Výsledky také ukázaly, že populace jsou více členěné než bylo předpokládáno.
Medvěd hnědý ( <i>Ursus arctos</i> )	Tsapis 2014	Kastoria region, Řecko	trus, srst, krev	171 vzorků srsti, 46 trusu, 15 krve	10 mikrosatelitů	HE	OneSAMP CAPWIRE	76% (srst), 48% (trus), 80% (krev)	Použit přístup multiple tubes approach pro snížení chyb při genotypování. Identifikováno 82 unikátních genotypů představující 82 odlišných jedinců.
Medvěd hnědý ( <i>Ursus arctos</i> )	Taberlet et al. 1997	Pyreneje	trus, srst	352 (247 srst, 105 trus)	24 mikrosatelitů	nezjišťováno	-	16%	Použit jeho vlastní přístup multiple tubes approach, z 352 vzorků pouze 57 mělo dostatečnou kvalitu DNA. Identifikováno bylo 5 unikátních genotypů.
Medvěd hnědý ( <i>Ursus arctos</i> )	de Barba et al. 2009	Italské Alpy	trus, srst	1164	18 mikrosatelitů	nezjišťováno	CAPWIRE	92% (HT), 80% (OP), 61% (trus)	Výsledky doporučují kombinaci systematického vzorkování a náhodného sběru srsti, dále doporučují integrované vzorkování. V roce 2004 bylo zaznamenáno 15 medvědů, v obou letech (2003,2004) se vyskytovalo 9 jedinců.
Orel královský ( <i>Aquila heliaca</i> )	Rudnick et al. 2007	severní- centrální Kazachstán	prachové peří	1822 (1676)	mtDNA, ale 32 jedincům nešla zjistit -> mikrosatelity	nezjišťováno	Mark, STRUCTU- RE	68%	Analýzou mtDNA: 1176 kusů peří bylo přiřazeno 314 jedincům; 268 jedinců Orla královského, 13 jedinců Orla mořského, 1 jedinec Orla skalního

Panda červená ( <i>Ailurus fulgens</i> )	Guo et al. 2010	Himaláje, Východotibe tská pohoří	trus	33	9 mikrosatelitů, mtDNA CR	nezjišťováno	-	100% (krev a čerstvý trus), 76% (trus)	Analýza zjistila 18 odlišných genotypů (jedinců).
Puma americká ( <i>Puma concolor</i> )	Ernest et al. 1999	Yosemite Valley, USA	trus + tkáně (krev, bukální stěry, srst)	62	12 mikrosatelitů	nezjišťováno	-	75%	Tato práce využila mikrosatelitní primery vytvořené pro kočku domácí a uplatnila je na analýzu pumy americké. Genetickou analýzou bylo odhaleno 16 jedinců pumy americké (7 odchycem, 9 podle trusu).
Sovice sněžná ( <i>Bubo scandius</i> )	Kleven et al. 2016	Norsko	prachové peří	-	12 mikrosatelitů	nezjišťováno	-	-	Výsledkem byla přítomnost 49 jedinců; 32 samic a 17 samců. Tato data budou podstatná pro zachování a sledování tohoto stále zranitelnějšího druhu.
Tetřev hlušec ( <i>Tetrao urogallus</i> )	Mollet et al. 2015	Švýcarsko	trus	586	12 mikrosatelitů	nezjišťováno	Cervus	88%	Byla zjištěna přítomnost 127 jedinců; 77 samců a 46 samic.
Tetřev hlušec ( <i>Tetrao urogallus</i> )	Rösner et al. 2014	Šumava, Bavorský Národní park	trus	7500 (550)	10 mikrosatelitů	nezjišťováno	package SPECIES a CAPWIRE	99%	Druhá největší populace ve střední Evropě, 13 modelů odhadlo populaci na 490 jedinců, ovšem reálný počet je 360.

Tetřev hlušec ( <i>Tetrao urogallus</i> )	Vázquez and Perez 2007	Kantábrije, Španělsko	trus, peří	253 (199 peří, 54 trus)	16 mikrosatelitů	LD	CAPWIRE, LD, NeEstima- tor ONeSAMP	70%	Vazebná nerovnováha odhadla velikost pouze na 17 jedinců (způs. slabou strukturou populace). ONeSAMP odhadl velikost na 80 jedinců. Hlavní hrozbou pro tuto španělskou populaci tetřevů je fragmentace a izolovanost této populace
Tetřívěk pelyňkový ( <i>Centrocercus urophasianus</i> )	Shyvers et al. 2019	Severozápa dní Colorado	trus, prachové peří	2357	7 mikrosatelitů	nezjišťováno	MARK, DROPOUT	100% (čerstvé peří), 83% (trus), 46% (prachové peří)	Ve studii použili multiple-tubes approach a preamplifikaci. V obou sezónách bylo napočítáno 543 jedinců, z toho 82 jedinců vyskytujících se v obou sezónách (21 samců, 61 samic).
Tygr ( <i>Panthera tigris</i> )	Abdul Aziz et al. 2017	Bangladéš	trus, srst	440 (105)	10 mikrosatelitů	nezjišťováno	GIMLET, CENSUS	78-100%	Modelem SECR byl vypočítán odhad na 121 tygrů. Tato studie vyzdvihuje výhody neinvazivních metod a navrhuje jejich využívání oproti fotopastem, se kterými se pojí nevýhody v terénu (složitá instalace, krádeže, špatné umístění..).
Tygr ( <i>Panthera tigris</i> )	Mondol et al. 2009	Bandipur NP, Nepál	trus	73	33 mikrosatelitů	nezjišťováno	CAPTURE	70 -74%	Byla zjištěna přítomnost 63 tygrů a studie také doporučuje upřednostnit neinvazivní genetické vzorkování místo fotopastí.

Tygr ussurijský ( <i>Panthera tigris altaica</i> )	Sugimoto et al. 2012	Ruský dálný východ, SV Čína	trus, srst, sliny	286	10 mikrosatelitů	nezjišťováno	CAPTURE, CAPWIRE	83%	Analýza identifikovala 12 jedinců; 5 samců a 7 samic. Z těchto 3 typů vzorků byly nejúspěšnější ty s trusem.
Užovka proužkovaná ( <i>Thamnophis sirtalis tetrataenia</i> )	Wood et al. 2020	Poloostrov San Francisco	tkáň	1088 captures	SNP	LD, temporal	STRUCTURE, NeEstimator, R	-	V této studii použili SNP a metodu CMR. Odhady velikosti $N_e$ byly pro většinu lokalit malé ( $\leq 100$ ). Výsledky ukázaly, že nízká početnost je z důvodu izolovanosti populací. Celkově bylo odchyceno 815 jedinců.
Vlk obecný ( <i>Canis lupus</i> )	Creel et al. 2003	Yellowstone National Park, USA	trus	288	13 mikrosatelitů	nezjišťováno	Statistica	-	Chyby při genotypizaci mohou být sníženy vyřazením slabých vzorků, detekováno bylo 40 jedinců.
Vlk obecný ( <i>Canis lupus</i> )	Kutal et al. 2017	Západní Karpaty	trus	134	18 mikrosatelitů	nezjišťováno	-	44 % (trus), 100% (tkáň)	Použit přístup multiple tubes approach, unikátní genotyp získán z 55 vzorků.
Vlk obecný ( <i>Canis lupus</i> )	Aspi et al. 2006	Finsko	tkáň	116	11 mikrosatelitů	MC, maximum likelihood	BOTTLENECK, NeEstimator	-	Mezi druhy odhadu efektivní velikosti nebyl moc rozdíl, všechny odhady velikost okolo 40 jedinců. Genetická diverzita finské populace je podobná zbytku Evropy.
Vlk obecný ( <i>Canis lupus</i> )	Galaverni et al. 2009	Scale Regional Park, Itálie	trus	103	12 mikrosatelitů	nezjišťováno	COLONY	48,50%	Analýzou zjistili 11 odlišných vlčích genotypů přímo v parku a 4 mimo něj. Genetická analýza byla podpořena i monitoringem, a to ve formě fotopastí.

Vlk obecný ( <i>Canis lupus</i> )	Marucco et al. 2009	Západní Alpy Francie a Itálie	Snowtracking a trus	3382 (1399)	mtDNA, mikrosatelity	nezjišťováno	MSURGE	-	Studie prokázala pozitivní trend ve vlčí přítomnosti. Ovšem odhad podle pozorování stop ve sněhu byl menší než odhad z genetické analýzy, která početnost odhadla na 87 jedinců.
Vydra říční ( <i>Lutra lutra</i> )	Martin et al. 2016	Šumava, Bavorský Národní park	trus	261	8 mikrosatelitů	LD, MC	NeEstimator, CAPWIRE	23%	Podobná genetická variabilita Evropským populacím, bez známky bottleneck efektu, detekováno 38 jedinců.
Vydra říční ( <i>Lutra lutra</i> )	Arrendal et al. 2007	sever a střed Švédska	trus, snowtracking	150	8 mikrosatelitů	nezjišťováno	CAPWIRE	49%	Lepší výsledky dosáhneme odebráním vzorků v zimě, pomocí neinvazivního vzorkování zjistili 23 jedinců, zatímco pomocí snowtracking pouze 10-15.
Zajíc běláček ( <i>Lepus timidus</i> )	Rehnus and Bollmann 2016	Swiss National Park	trus, srst, moč	144	10 mikrosatelitů	nezjišťováno	package SECR	95,20%	Kvalita dat záleží na stáří vzorku, srst se jeví jako vyhovující vzorek, ale je těžce sehnatelná kvůli větru na horách, zatímco trus se shání lépe, obsahuje dobrou kvalitu DNA, ale rychle degraduje. V této studii odhadli hustotu zajíců běláčků na 3,2-6,6 na km <sup>2</sup> .