



**Neinvazívny genetický monitoring rysa  
ostrovida a vlka obecného v česko-slovenskom  
pohraničí**



**Jarmila Krojerová, Barbora Turbaková, Miroslava Barančeková,  
Barbora Černá Bolfíková, Pavel Hulva**

**&**



Bojda Michal, Duľa Martin, Drengubiak Peter, Hrdý Ľuboslav, Kutal Miroslav,  
Labuda Jiří, Machciník Beňadik a ďalší



# Genetický monitoring rýsa a vlka od roku 2009

## Minulosť:

- zber vzoriek prebieha už od roku 2009
- vzorky boli zbierané v rámci niekoľkých projektov:
  - a) **projekty ÚBO AV ČR:** v rámci verejnej zákazky pre AOPK ČR, financované z Operačného programu Životní prostředí (2011-14)  
- také GPS telemetrie rýsa, fotomonitoring, potravná ekológia  
fondy EEA v rámci prípravy *Programu péče o velké šelmy* (2015-16)
  - b) **projekty Hnutí DUHA Olomouc** – Medzinárodný višegrádsky fond (2011-12), Program švajčiarsko-českej spolupráce (2011-13, 2013-15), fondy EEA (2015-16)

## Súčasnosť:

- 2018-2019 projekt ŠELMY SKCZ z programu Interreg V-A SK-CZ



**INTERREG V-A**  
SLOVENSKÁ REPUBLIKA  
ČESKÁ REPUBLIKA



**EURÓPSKA ÚNIA**  
**EURÓPSKY FOND**  
**REGIONÁLNEHO ROZVOJA**  
  
SPOLOČNE BEZ HRANÍC

# Materiál a metodika

- zber vzoriek celoročne, najviac v zimnom období
- monitoring pobytových znakov, chlповé pasce (2011-2014)
- neinvazívne vzorky - trus, chlpy, moč



# Trusy

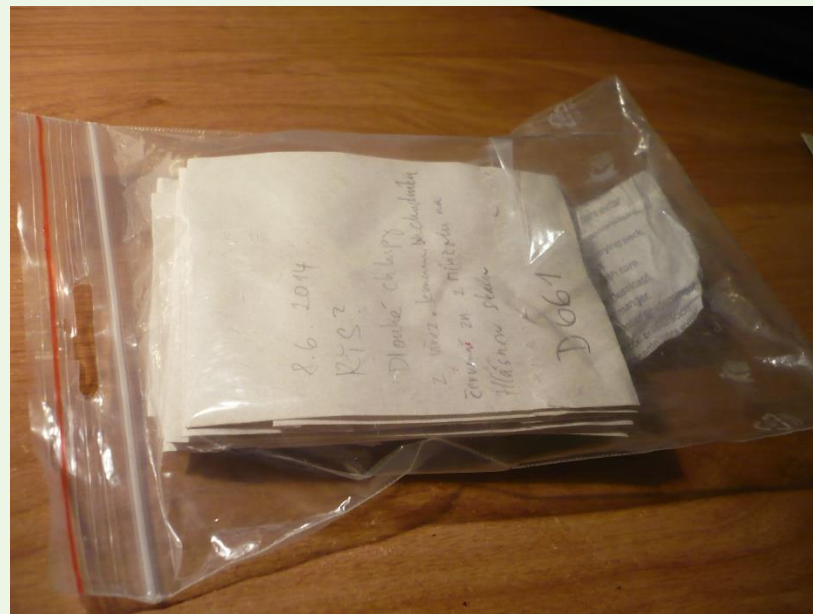
- ideálne starý maximálne 1 týždeň (tmavý, lesklý)



úspešnosť genotypizácie vzoriek trusu je 50-60 %

# Chlpy, srst'

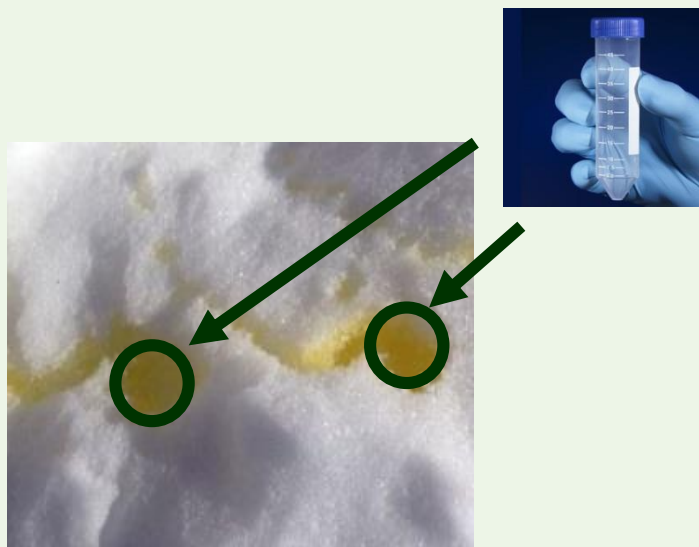
- aspoň 10 chlпов **s korigenkami** (u veľmi čerstvých stačí menej chlпов)
- vzorky staré ideálne 1 týždeň (u chlпов problematické)



úspešnosť genotypizácie vzoriek srsti je obyčajne len 30 %

# Moč, krv

- do skúmavky bez alkoholu prenieť len najkoncentrovanejšiu časť snehu s močou/krvou a zamraziť



úspešnosť moč – 11 %  
krv – 100 %

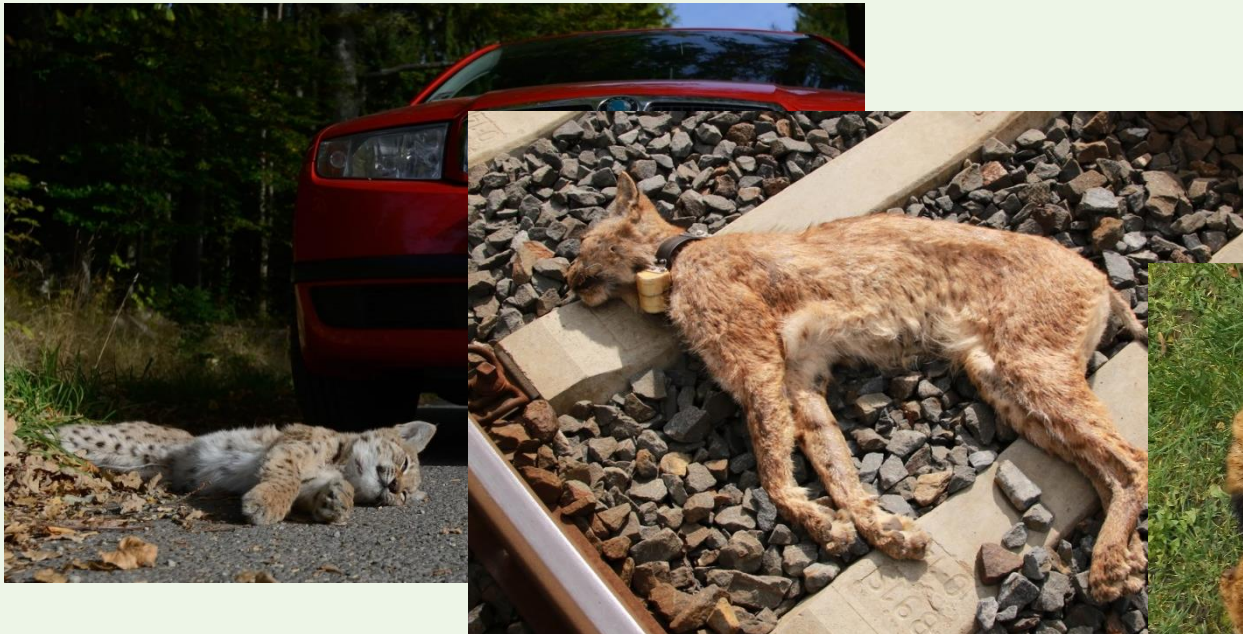
# Hemofágny hmyz

- DNA stavovcov získaná z krvcicajúceho hmyzu
- príklad - napitý kliešť nájdený v brlohu rysa



# Tkanivové vzorky - kadávery

- vzorka s vysokým obsahom kvalitnej DNA
- stačí odobrať malý kúsok svaloviny (1x1 cm) a vložiť do skúmavky s 96% alkoholom a uskladniť do mrazničky/chladničky, alebo kúsok tkaniva v igelitovom vrecku či skúmavke zamraziť



úspešnosť 100 %



# Analýza DNA

- izolácia DNA pomocou komerčne vyrábaných kitov:

**trus:** QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, DE)

**chlupy, moč, krev:** The Genomic DNA Mini kit Tissue (Geneaid Biotech Ltd., New Taipei City, Taiwan)

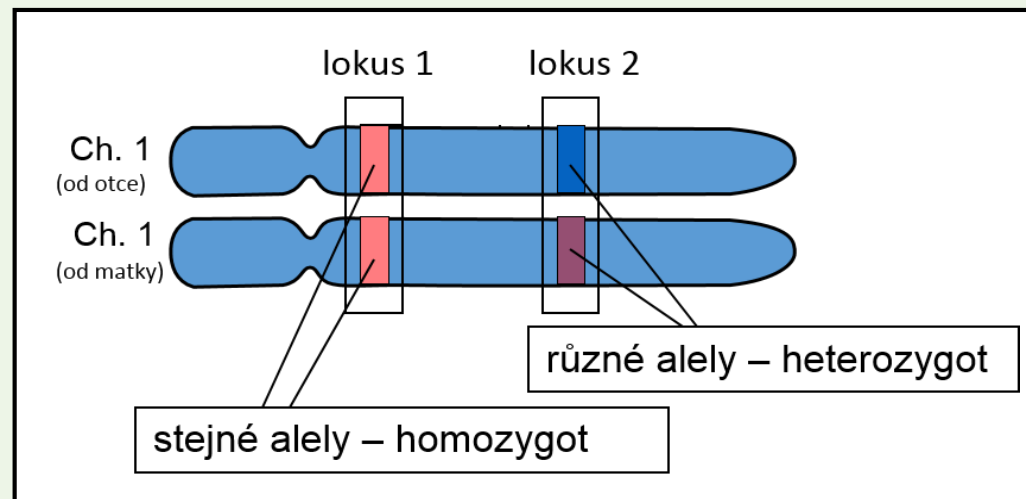


# Genetické markery - mikrosatelity

- krátke opakujúce sa repeticie 2 - 6 nukleotidových bází DNA (A, T, C, G)
- neutrálne k prírodnému výberu (mimo gény v nekódujúcich častiach DNA)
- vysoko polymorfné (relatívne rýchlo mutujú), jednotlivé formy (alely) mikrosatelitu sa líšia svojou dĺžkou (počtom opakovaní)

alela A	...GTTCTGTC	ATATATATATATATAT	.....	CGTACTT...
alela B	...GTTCTGTC	ATATATATATATATATATATATATATATATATAT		CGTACTT...
alela C	...GTTCTGTC	ATATATATATATATATATATATAT	.....	CGTACTT...

- každý jedinec má **jednu** alelu od **matky** a **druhú** alelu od **otca**



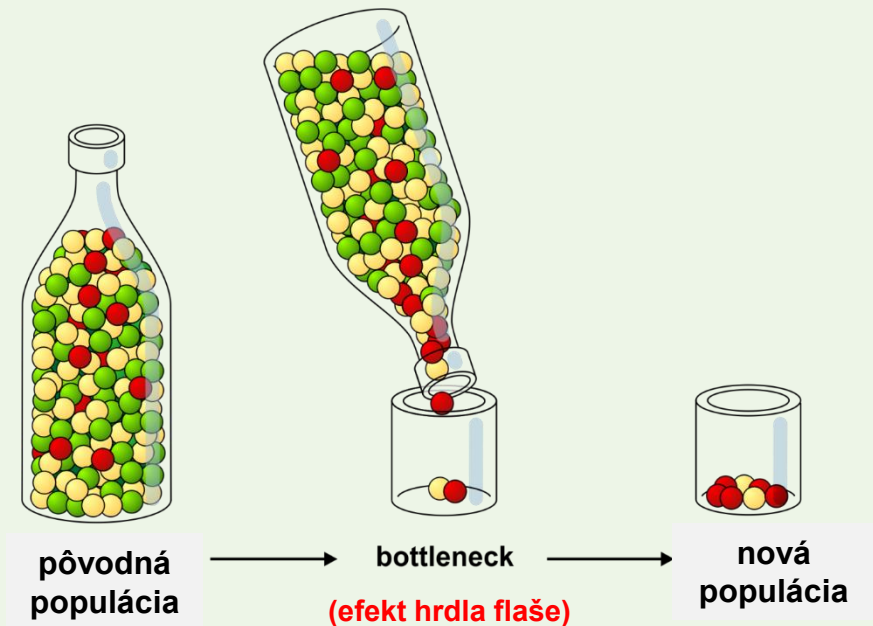
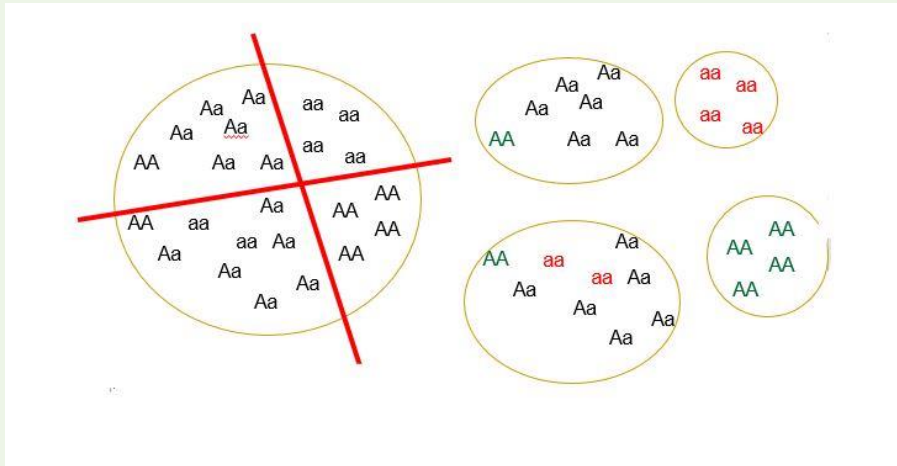
# Identifikácia jedincov, veľkosť populácie

- sada mikrosatelitov (**genotyp**) je unikátna pre každého jedinca  
= **genetický otláčok prstu**
- analýza u rýsa: 15 mikrosatelitov + „amelogenin“ pre určenie pohlavia
- analýza u vlka: 21 mikrosatelitov + „amelogenin“ pre určenie pohlavia
- počet jedincov
- príbuznosť jedincov
- veľkosti populácie



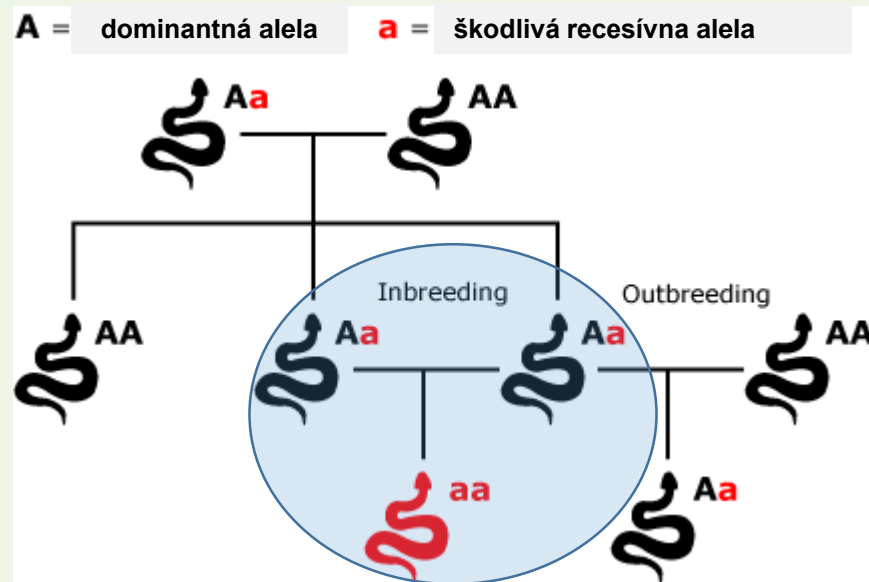
# Genetická variabilita, štruktúra populácie

- životaschopnosť populácie, identifikácia bariér v krajine
- prírodné katastrofy/**fragmentácia krajiny**/lov...
- prejaví sa znížením genetickej variability (menší počet alel)

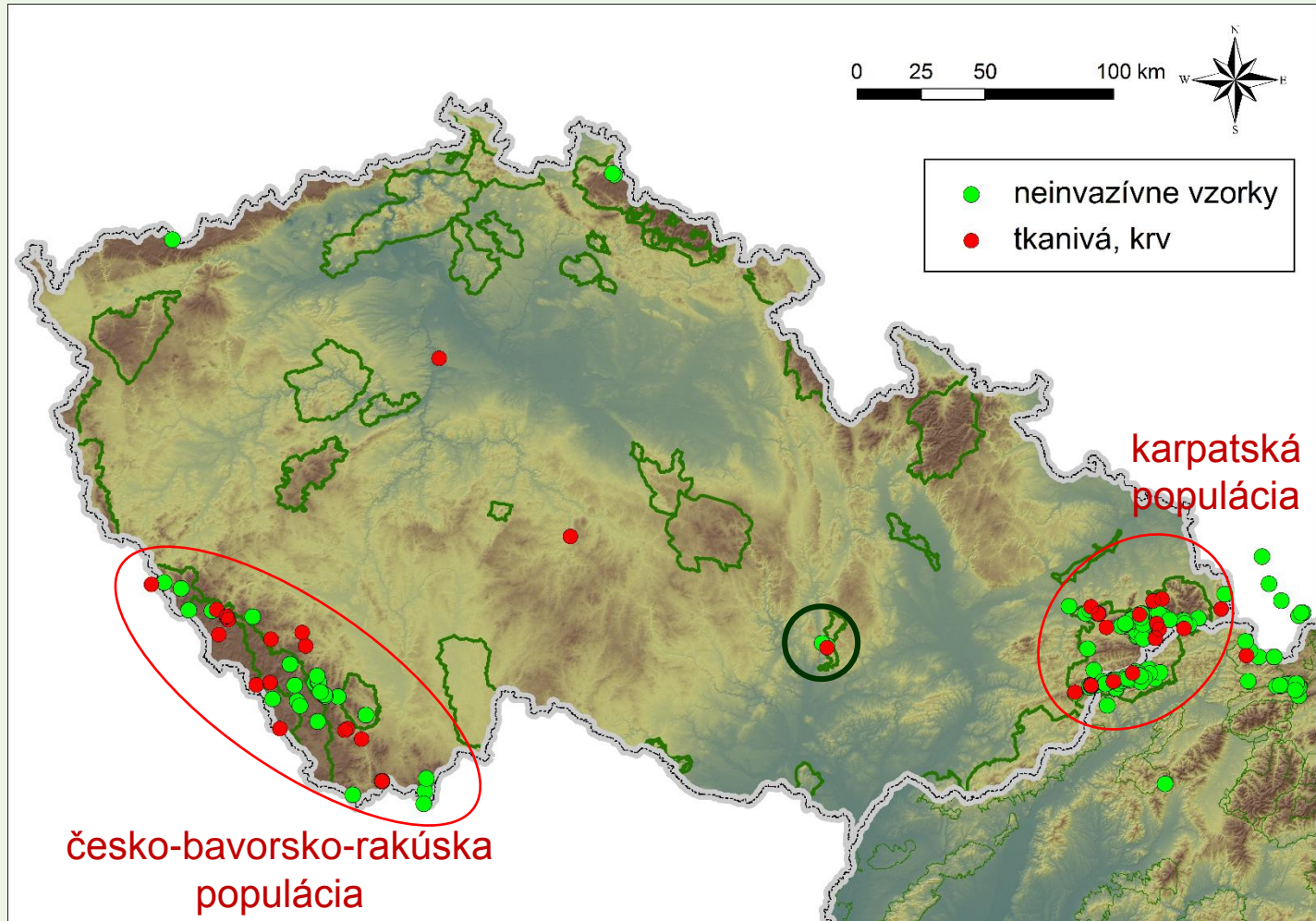


# Príbuznosť a inbreeding

- určenie príbuzenských vzťahov, identifikácia potomkov a rodičov
- príbuzenské kríženie môže viesť k prejavu škodlivých mutácií, ktoré sú kódované recesívnymi alelami (**inbredná depresia**)
- výskyt defektov, zníženie plodnosti



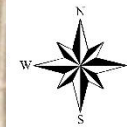
# Určenie pôvodu jedinca



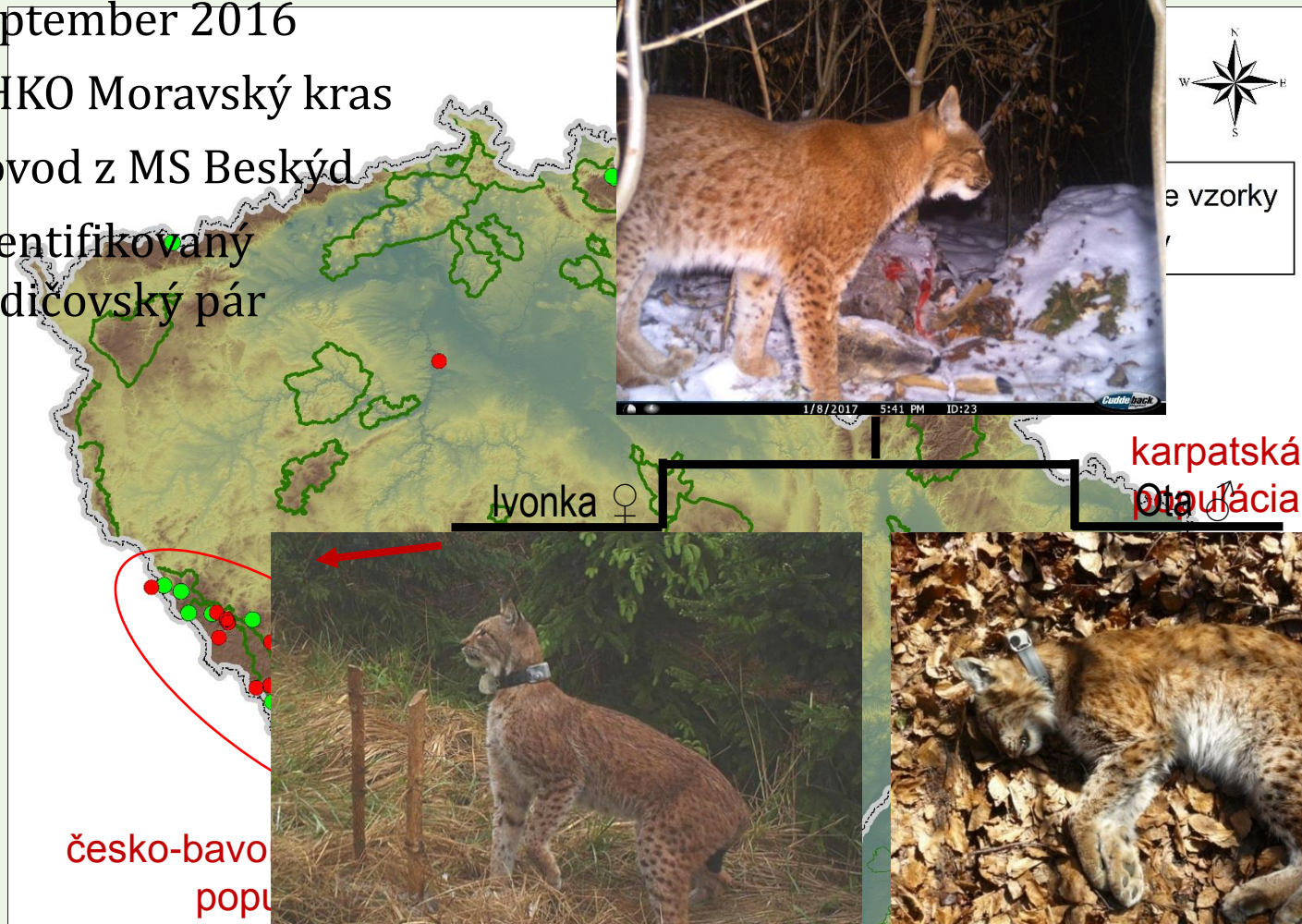
# Určenie pôvodu jedinca

- september 2016
- CHKO Moravský kras
- pôvod z MS Beskýd
- identifikovaný rodičovský pár

Kryštof ♂



e vzorky



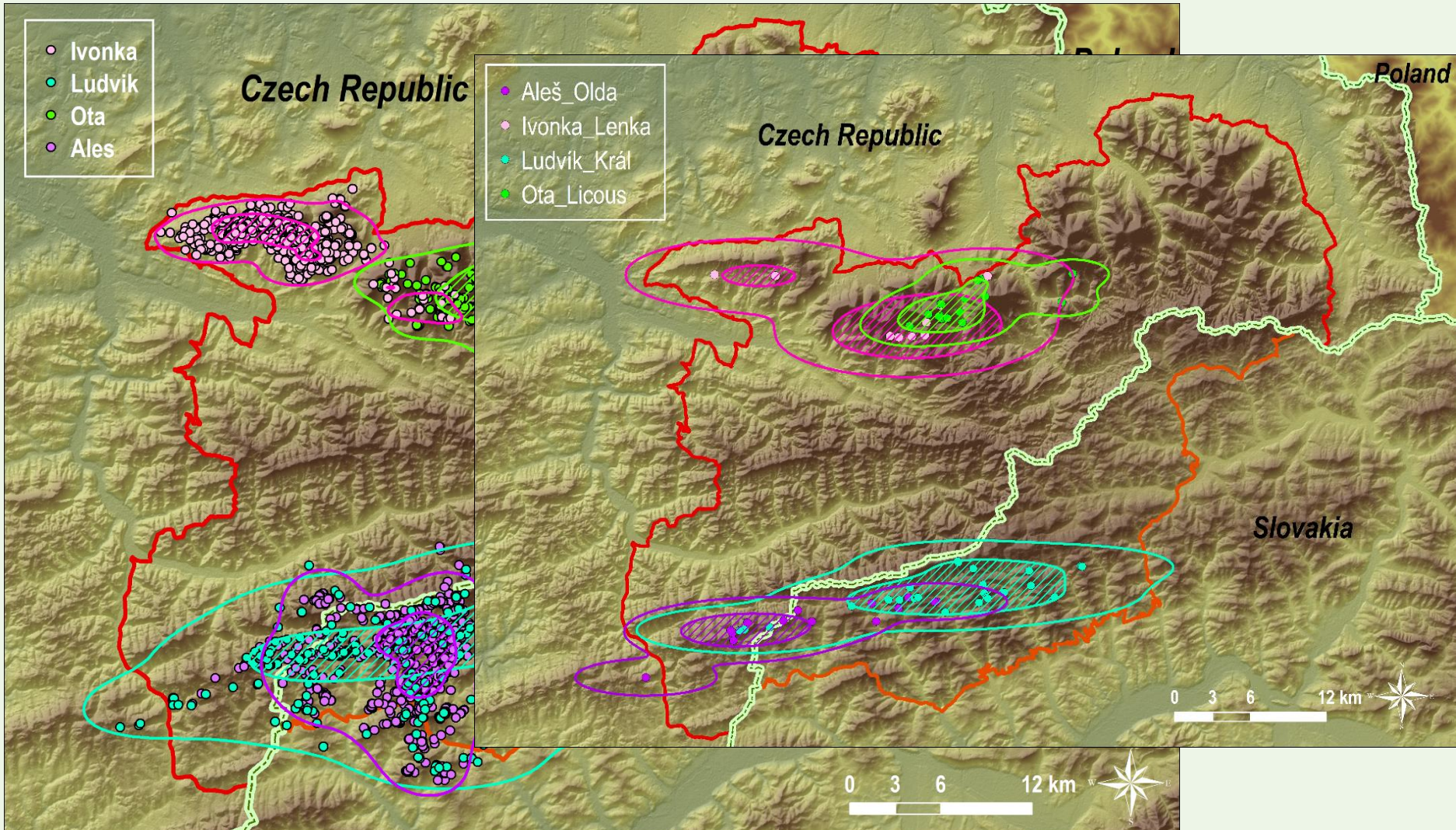
lyonka ♀

karpatská  
populácia



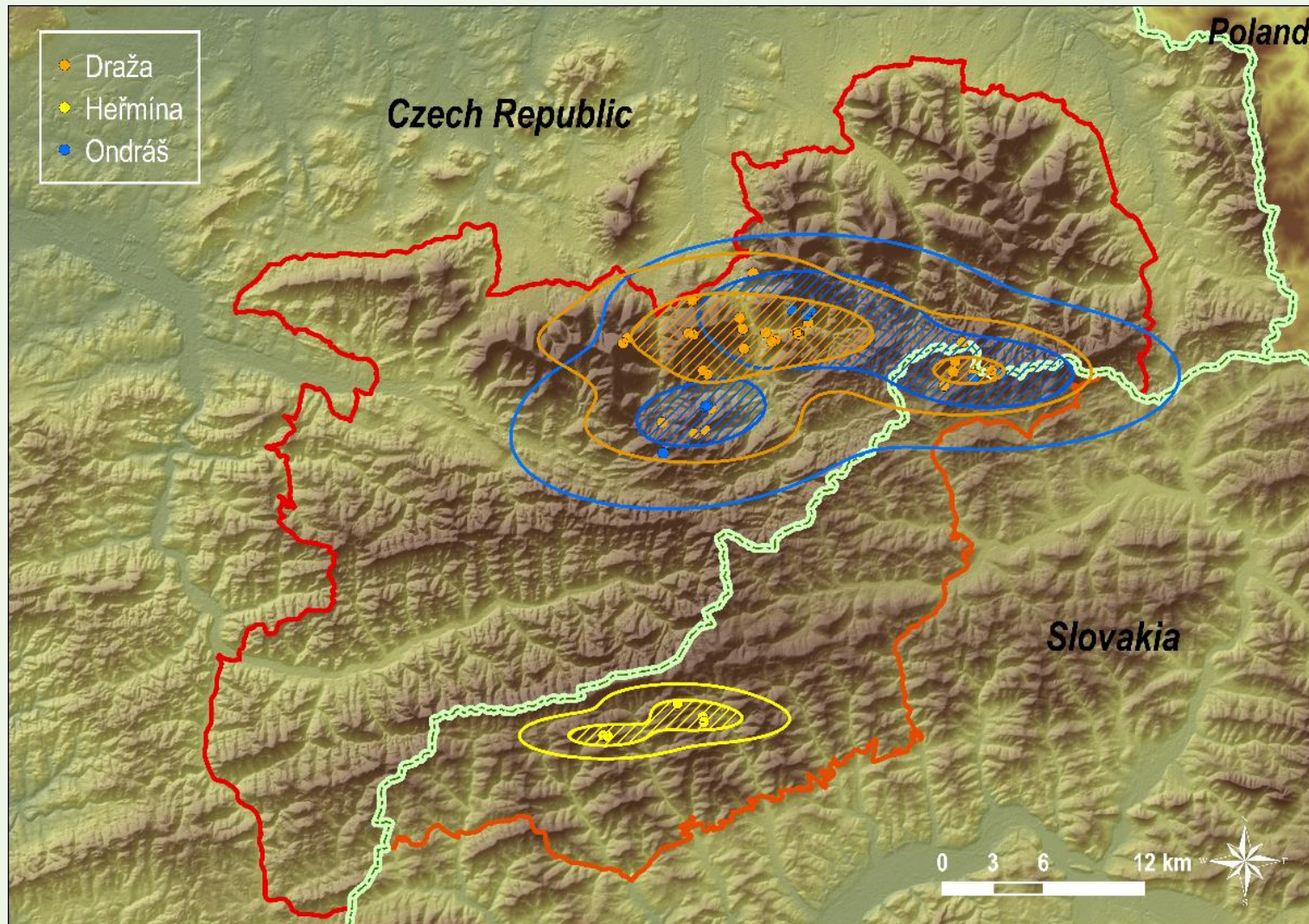
česko-bavorská  
populácia

# Priestorová aktivita jedincov

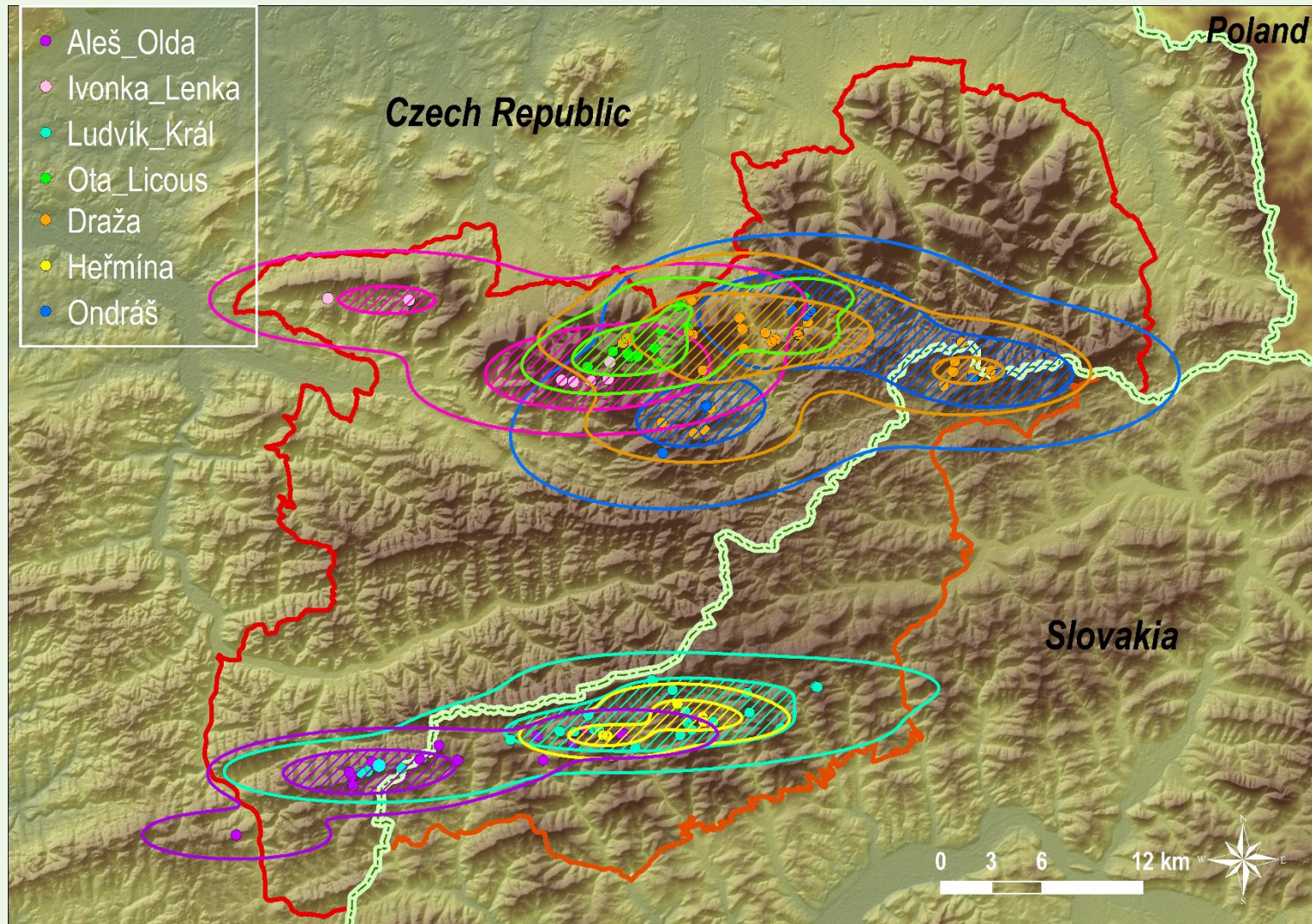




# Priestorová aktivita jedincov



# Priestorová aktivita jedincov

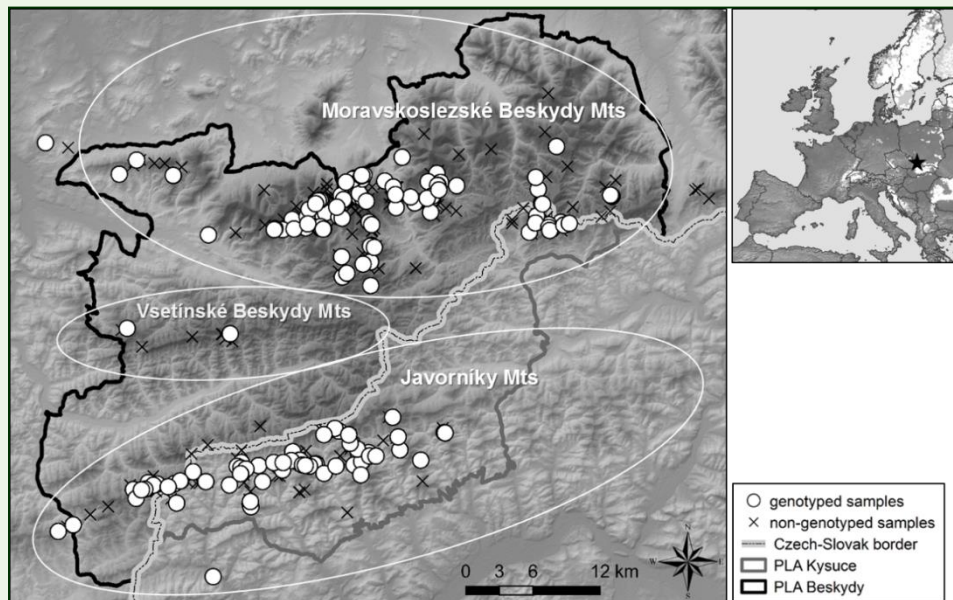


# Prvé publikované údaje o ochranárskej genetike rysa v Západných Karpatoch

## Genetic constraints of population expansion of the Carpathian lynx at the western edge of its native distribution range in Central Europe

Krojerová-Prokešová et al., 2019. *Heredity* 122:785-799

- genetická analýza hlavne neinvazívnych vzoriek z MS Beskýd a Javorníkov (celkom 454 vzoriek)
- dáta zo siedmych „rysích“ rokov (2009–2016)



*Heredity* (2019) 122:785–799  
<https://doi.org/10.1038/s41437-018-0167-x>

the  
**genetics**society

ARTICLE

Genetic constraints of population expansion of the Carpathian lynx at the western edge of its native distribution range in Central Europe

J. Krojerová-Prokešová<sup>1,2</sup> · B. Turbaková<sup>1,3</sup> · M. Jelenčík<sup>4</sup> · M. Bojda<sup>5</sup> · M. Kutal<sup>6</sup> · T. Skrbiňšek<sup>4</sup> · P. Kouček<sup>1,7</sup> · J. Bryja<sup>1,3</sup>

Received: 20 August 2018 / Revised: 05 November 2018 / Accepted: 6 November 2018 / Published online: 23 November 2018  
© The Genetics Society 2018

### Abstract

Even though populations of many large carnivores are expanding throughout Europe, the Eurasian lynx population in the Western Carpathians seems unable to spread beyond the western boundaries of its current distributional range. Many factors, both extrinsic and intrinsic, can influence the potential for range expansion: landscape fragmentation, natal philopatry, low natural fecundity and high mortality, and low and sex-biased dispersal rates. In this study we used non-invasive genetic sampling to determine population size fluctuation, sub-structuring and social organisation of the peripheral lynx population at the Czech–Slovak border. Even though the population size has been relatively stable over the period studied (2010–2016), the individual inbreeding coefficients of residents at the end of the study were much higher than those of founders at the beginning of the study. While non-resident individuals (predominantly males) occurred regularly in the study population, only resident individuals with well-established home ranges participated in breeding and produced offspring. Almost half the offspring detected in the study (predominantly females) settled in or near the natal area. Subsequent incestuous mating resulted in production of inbred individuals, reduction of effective population size of the population, and sub-structuring of the population through formation of two distinct family lineages. Our study illustrates how social constraints, such as territoriality, breeding of residents and natal philopatry of females, lead to incestuous mating in small-sized populations, especially at the periphery of their distribution. This threat should be taken into account in planning of conservation and population recovery of species with similar social structure.

These authors contributed equally: J. Krojerová-Prokešová and B. Turbaková

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41437-018-0167-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ J. Krojerová-Prokešová  
krojerova@ivb.cz

<sup>1</sup> Institute of Vertebrate Biology of the Czech Academy of Sciences, Květná 8, 603 65 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Aquaculture, Faculty of AgriSciences, Mendel University in Brno, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Botany and Zoology, Faculty of Science, Masaryk University, Kotlářská 2, 611 37 Brno, Czech Republic

<sup>4</sup> Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of

### Introduction

The centre–periphery hypothesis predicts a decrease in genetic variation and demographic performance of a species from the centre to the periphery of its distribution range associated with the decrease in environmental suitability (Eckert et al. 2008). However, in the present human-dominated landscape the range boundaries are often not the

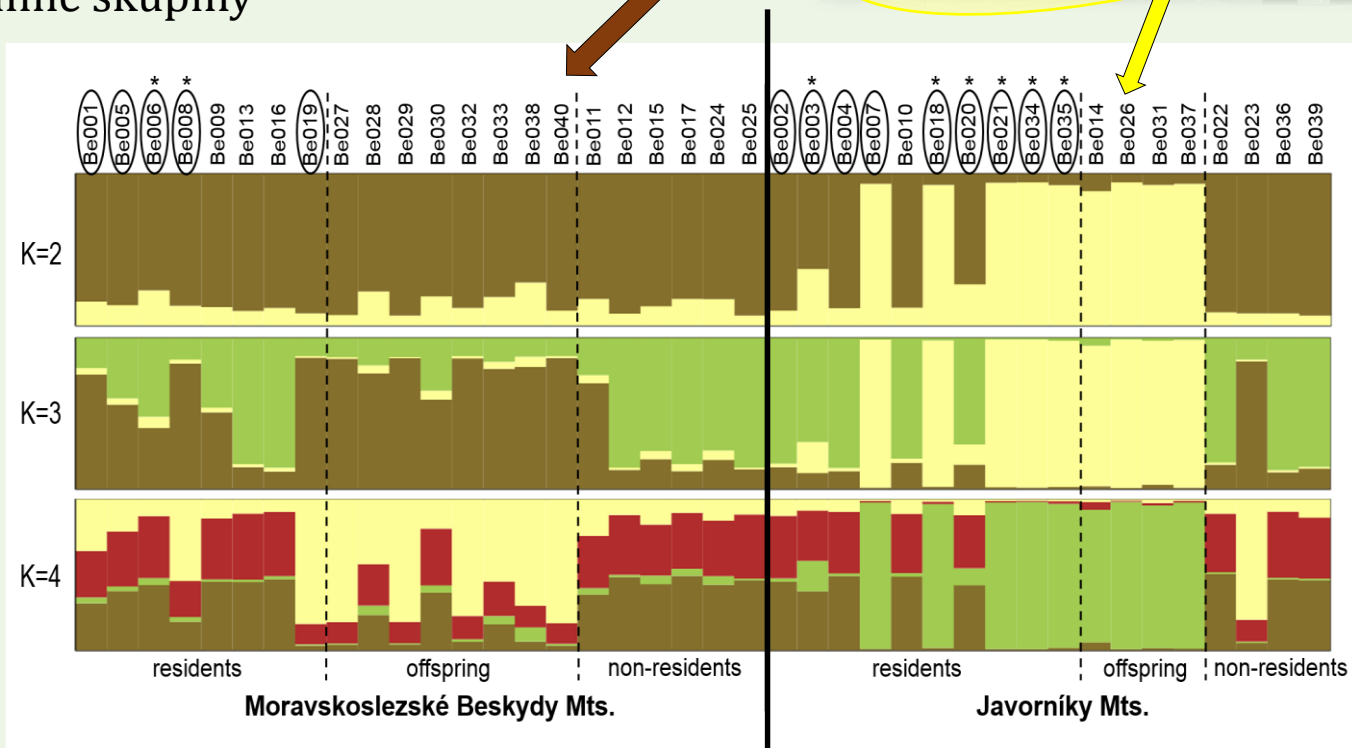
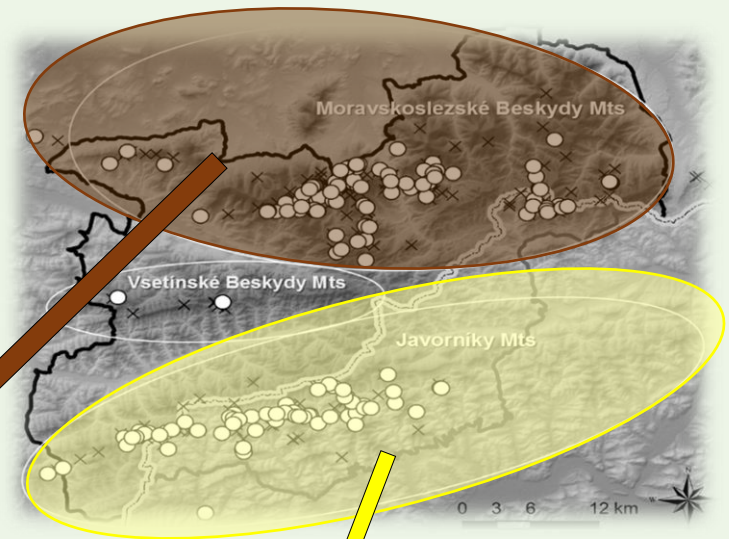
<sup>5</sup> Ljubljana, Večna pot 111, 1000 Ljubljana, Slovenia

<sup>6</sup> Friends of the Earth Czech Republic, Olomouc branch, Dolní náměstí 38, 779 00 Olomouc, Czech Republic

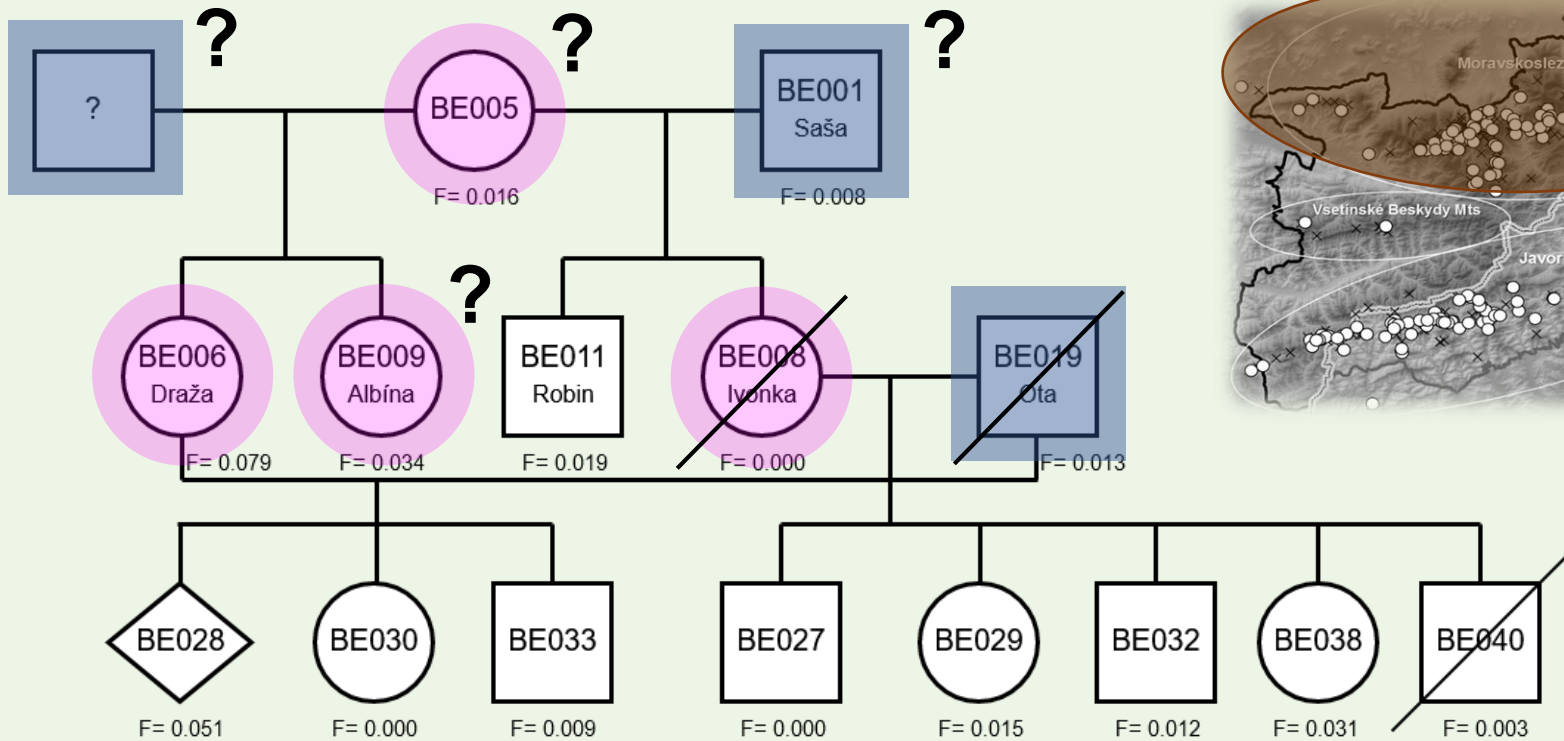
<sup>7</sup> Department of Forest Ecology, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Zemědělská 3, 613 00 Brno, Czech Republic

<sup>8</sup> Department of Forest Protection and Game Management, Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague, Kamýcká 1176, 165 21 Prague 6-Suchbát, Czech Republic

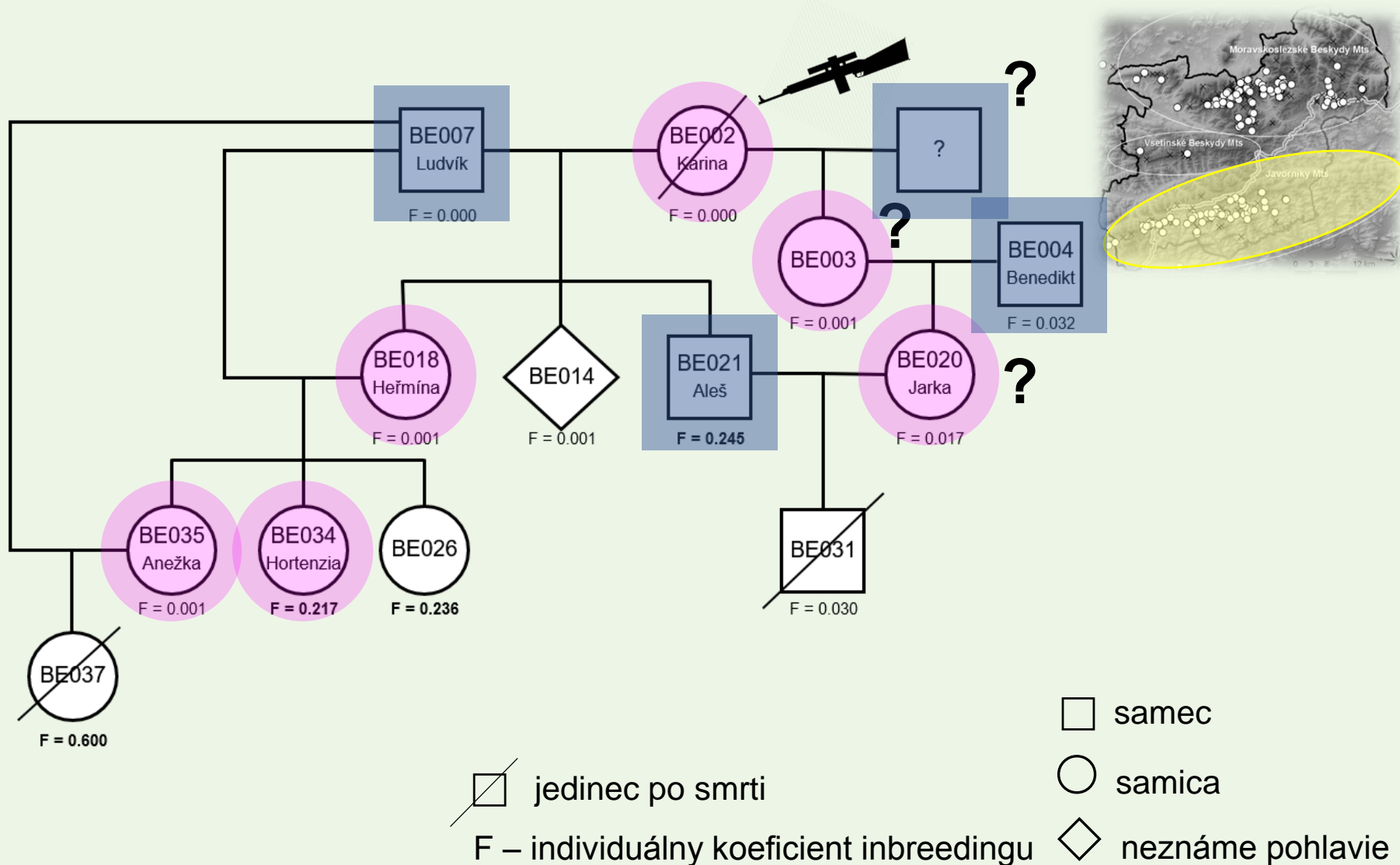
- identifikovaných 40 jedincov
- imigranti (10 ♂, 2 ♀, 1x neurčené pohlavie)
- 4 ♂ sa usadili (HR) ale len 1 (Ota) sa zapojil do rozmnožovania
- filopatria potomkov:
  - samice: 8 zo 14 (12) - (57%)
  - samci: 1 zo 7 (14%)
- dve rodinné skupiny



# Situácia v Moravskoslezských Beskydách



# Situácia v Javorníkoch



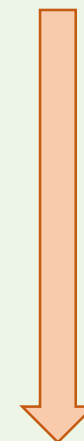
## Odhad veľkosti populácie

- metóda Capwire (v prostredí R) – štatistický odhad veľkosti populácie na základe spätných odchytov v podobe nájdených neinvazívnych genetických vzoriek

rysí rok*	počet jedincov	rezidentní dospelci	N (95 % CI) všetci jedinci	N (95 % CI) rezidentní dospelci
2009/10	2	2	-	-
2010/11	7	6	9 (7-14) <sup>E</sup>	8 (6-12) <sup>E</sup>
2011/12	9	6	10 (9-12) <sup>E</sup>	6 (6-12) <sup>E</sup>
2012/13	15	10	20 (15-30) <sup>T</sup>	10 (10-12) <sup>T</sup>
2013/14	16	9	26 (20-32) <sup>T</sup>	9 (9-11) <sup>T</sup>
2014/15	10	8	15 (12-24) <sup>T</sup>	9 (8-13) <sup>T</sup>
2015/16	9	4	12 (9-18) <sup>E</sup>	4 (4-10) <sup>E</sup>
2009/16	40	18	15 (12-22) <sup>*</sup>	8 (7-12) <sup>*</sup>

# Genetická variabilita na okraji populácie

Obdobie	Jedinci	LDN <sub>e</sub> (95% CI) <sup>Pcrit</sup>	H <sub>e</sub>
2009-2012	14	<b>20.7</b> (8.5-299.4) <sup>0.05</sup>	<b>0.531</b>
2012-2014	24	<b>12.4</b> (7.7-20.9) <sup>0.03</sup>	<b>0.538</b>
2014-2016	15	<b>2.1</b> (1.6-2.9) <sup>0.05</sup>	<b>0.492</b>
2010-2016	40	13.4 (9.7-18.6) <sup>0.02</sup>	0.531

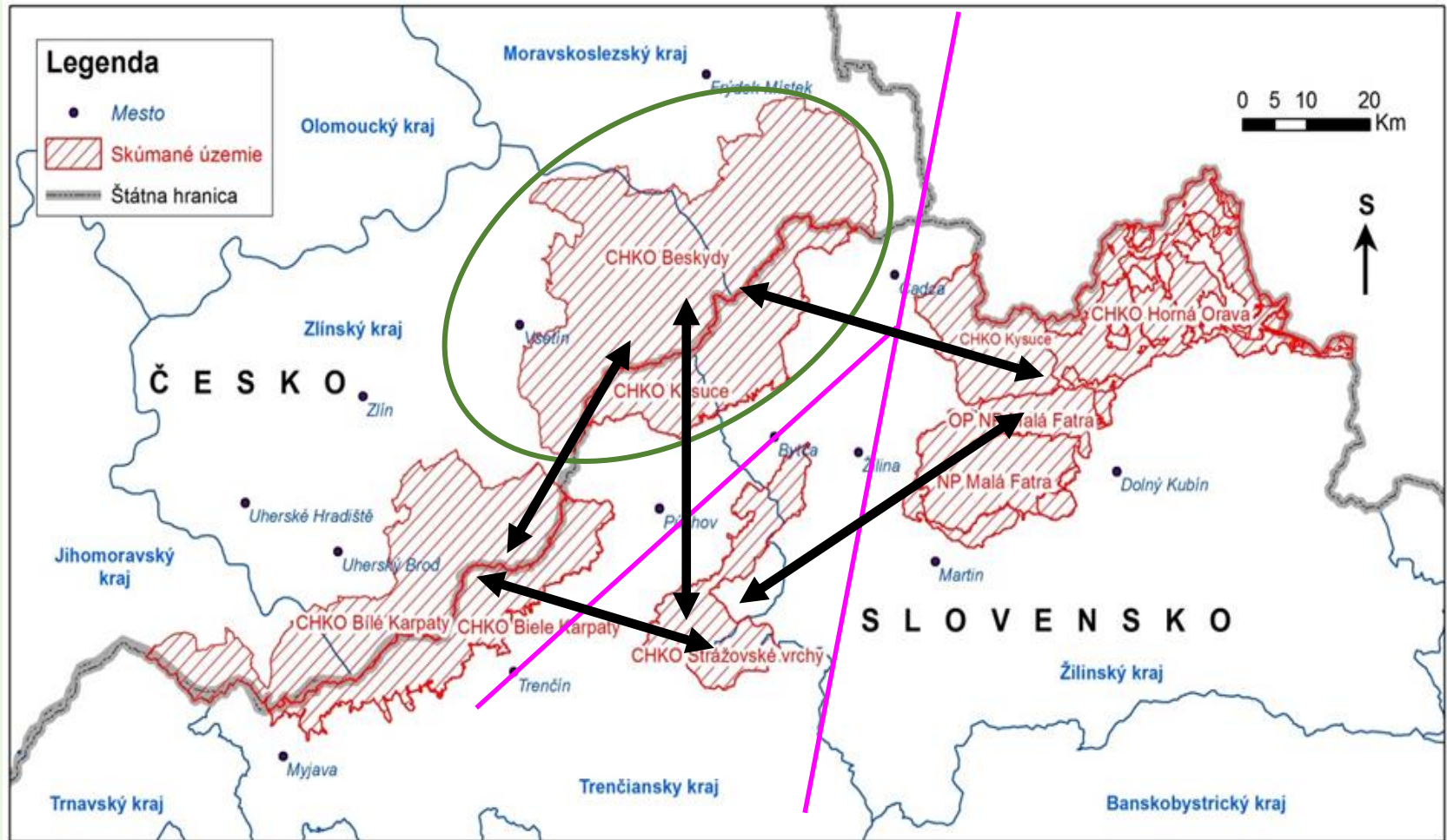




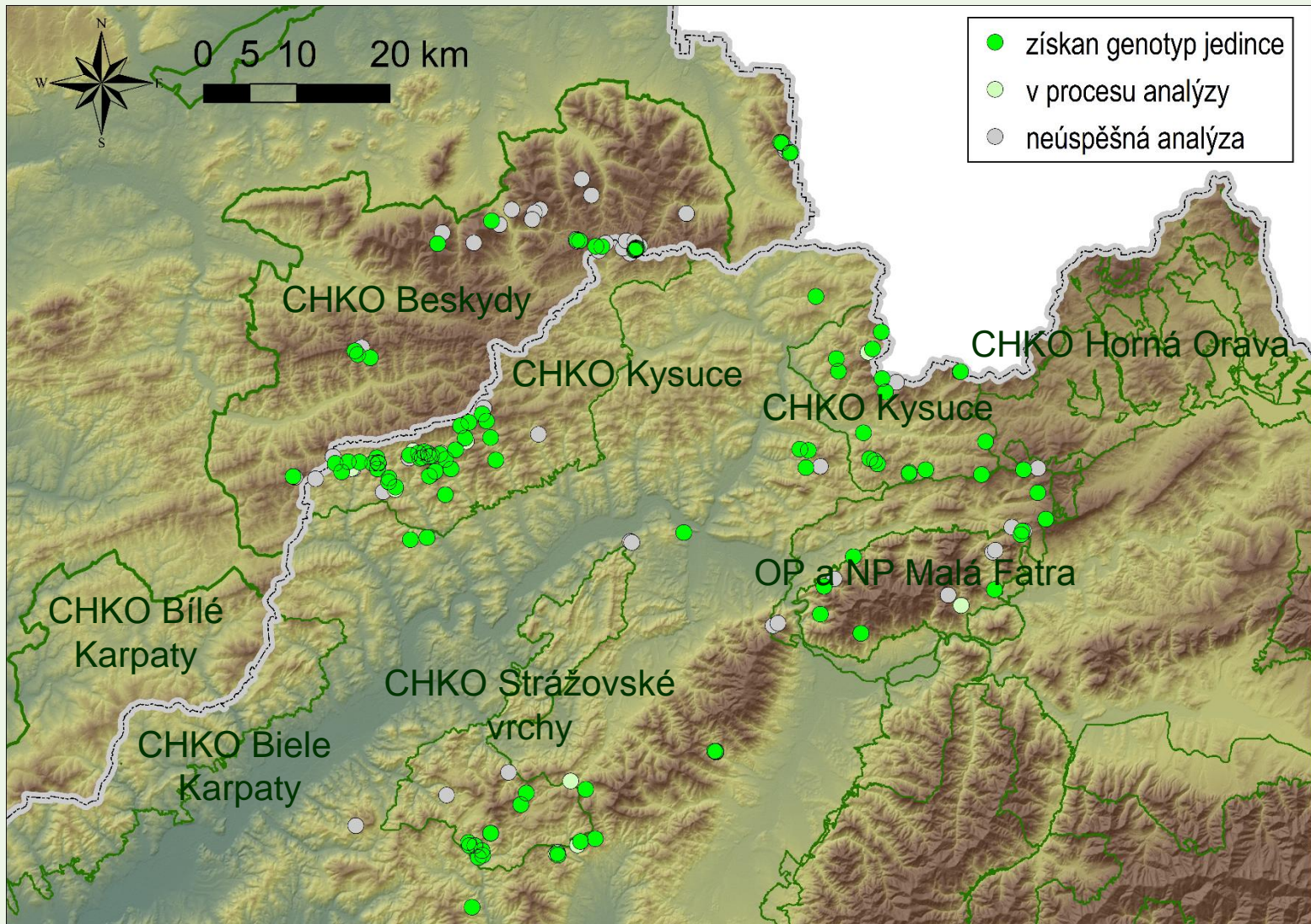
# Situácia na okraji areálu výskytu rysa v období 2009 - 2016

- početnosť je konzistentná, ale vysoká fluktuácia jedincov
- do reprodukcie sa zapojili len niektorí teritoriálni jedinci
- vysoká filopatrie potomkov, hlavne samíc, zvyšuje inbreeding a znižuje genetickú variabilitu
- populácia rysa v MS Beskydách a Javorníkoch nie je geograficky izolovaná
- Odkiaľ a kadiaľ prichádzajú noví jedinci?
- Vysoká miera filopatrie - dôsledok antropogénneho tlaku (pytliactvo, mortalita na cestách) alebo prirodzenej sociálnej štruktúry rysa?
- Aká je situácia v iných oblastiach výskytu?

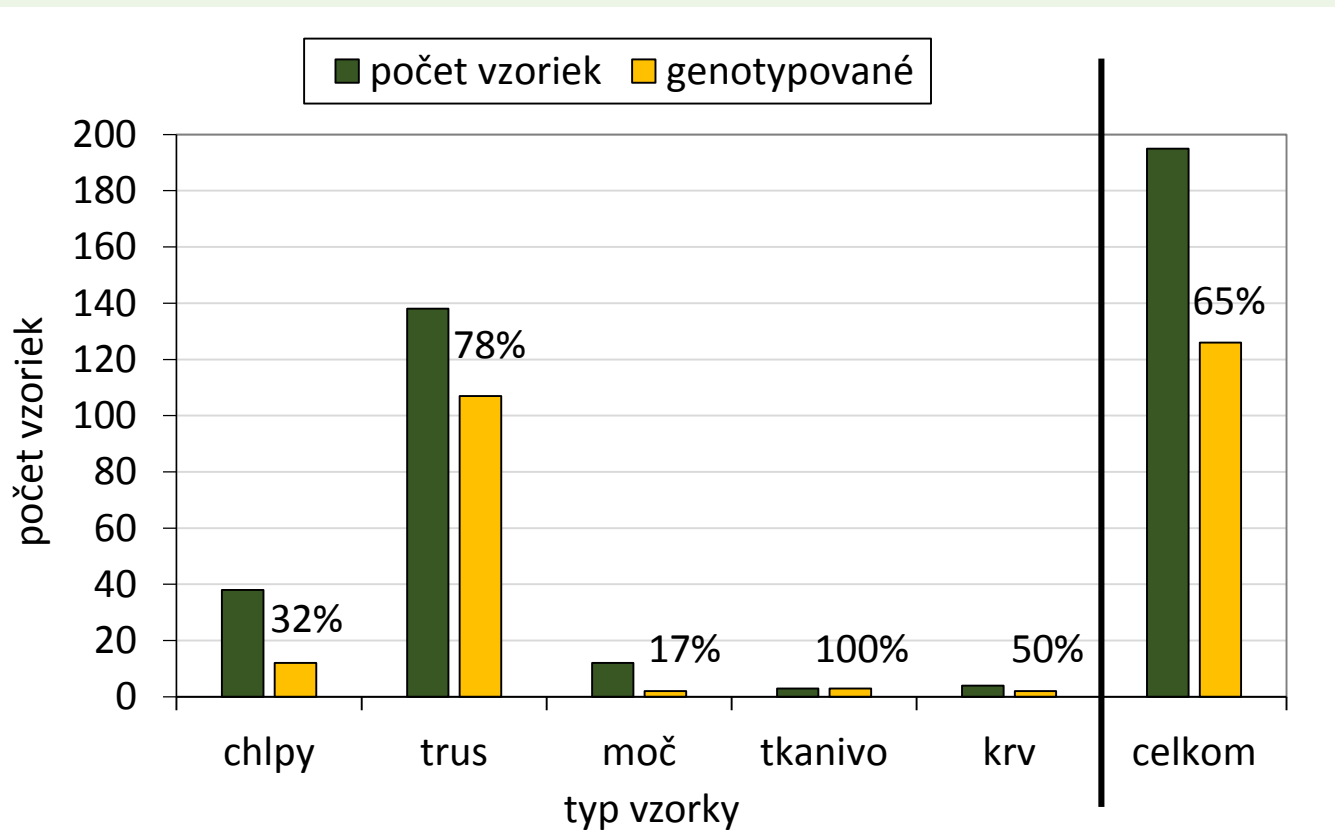
# Projekt Šelmy SKCZ



# Zber neininvazívnych vzoriek rysa



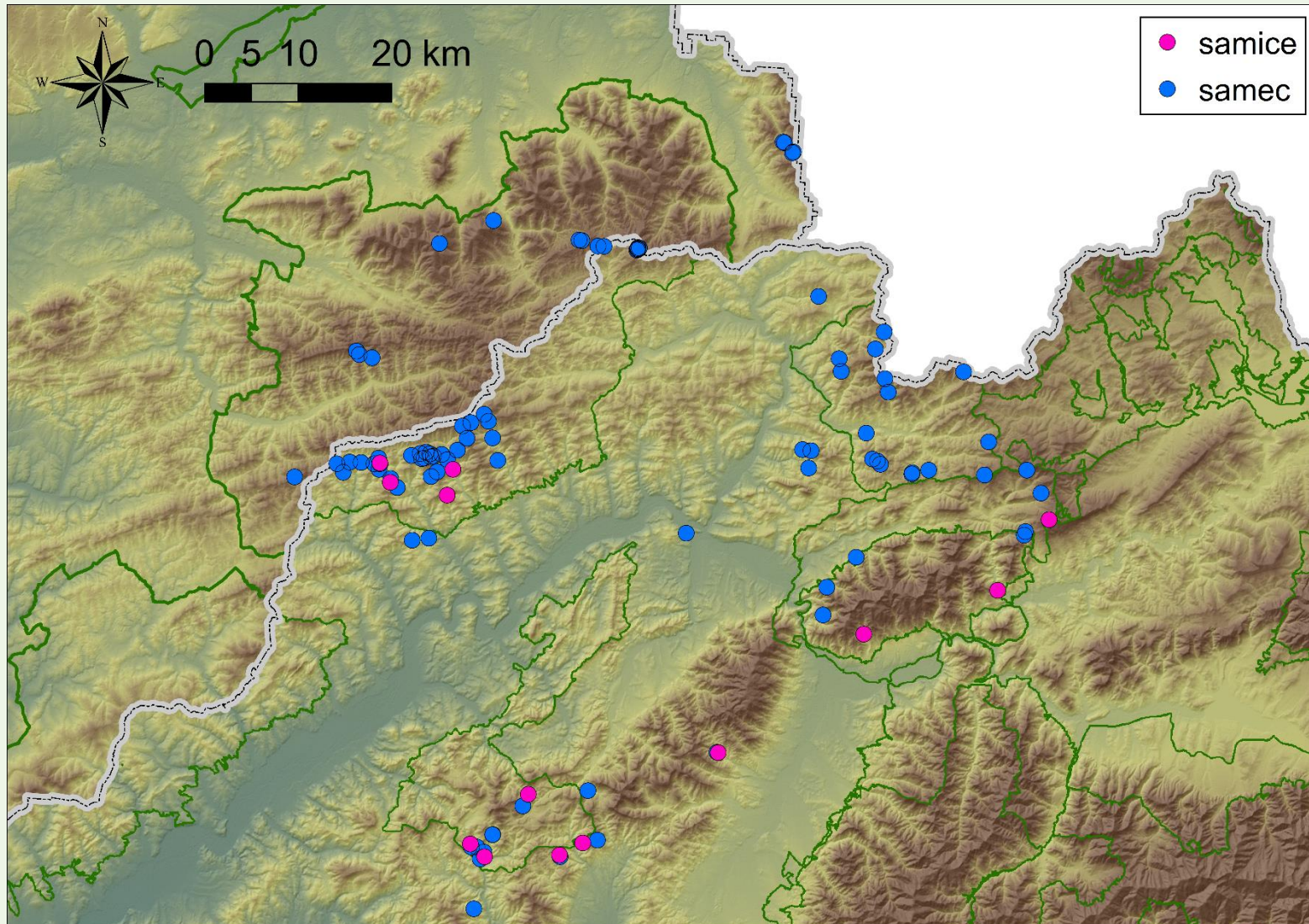
# Úspešnosť genotypizácie rysích vzoriek



# Geografická distribuce rysích vzorků

oblast'	počet vzoriek	genotyp rysa (dosud)	úspěšnost (dosud)	počet jedinců
Vsetínské vrchy	6	4	67%	2
Moravskoslezské Beskydy	40	12	30%	4
Slezské Beskydy	9	4	44%	2
Javorníky	62	50	81%	10
Kysucké Beskydy, Kysucká vrchovina	23	19	83%	8
Oravská Magura	11	7	64%	5
Malá Fatra	19	9	47%	8
Strážovské vrchy	25	19	76%	5
<b>celkom</b>	<b>195</b>	<b>124</b>	<b>65%</b>	<b>44</b>

# Pohlavná štruktúra populácie rysa



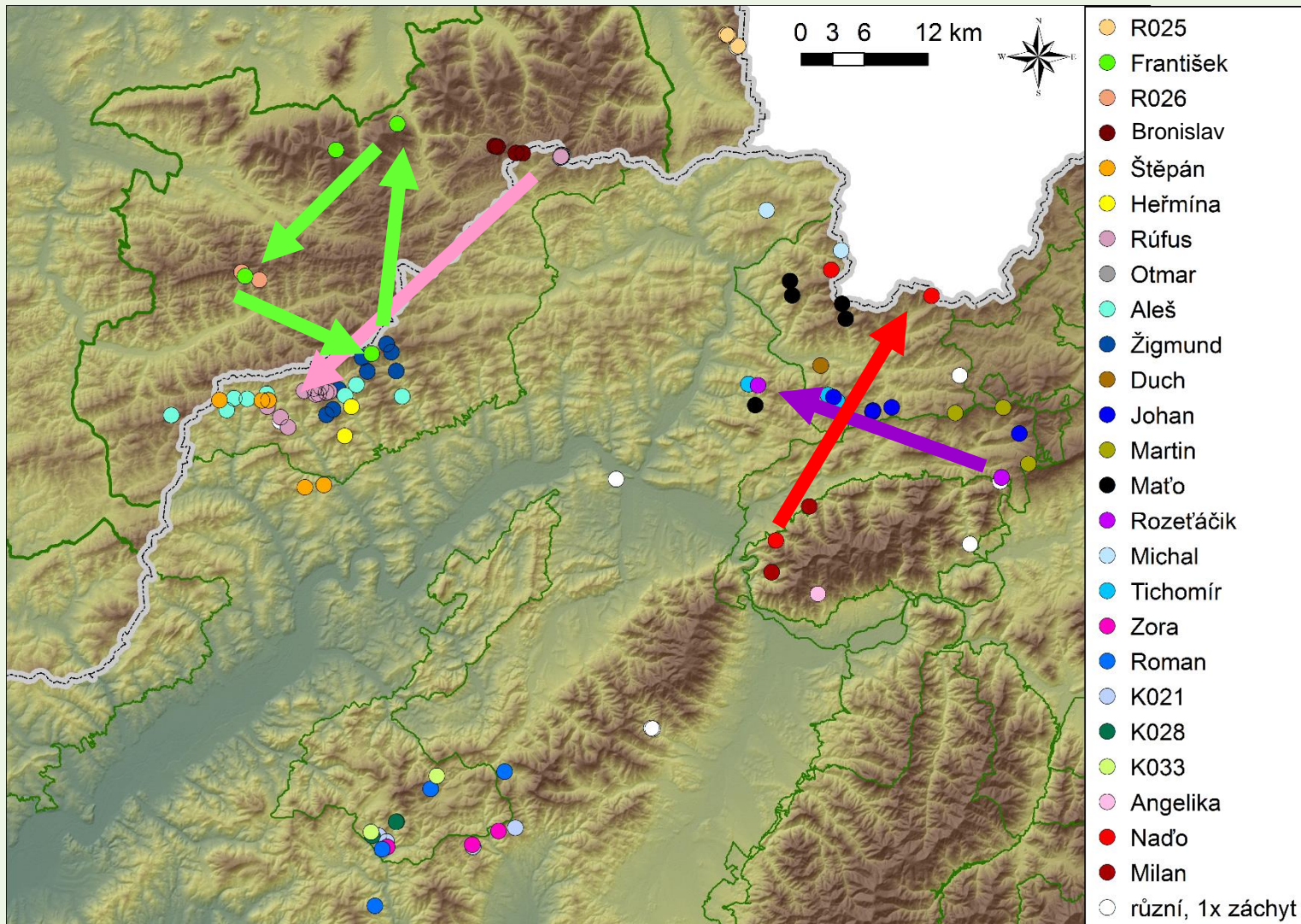
pomer  
pohlaví

35 ♂ : 9 ♀

**Samice:**

1x O. Magura  
3x Javorníky  
2x MF (1x†)  
2x Strážovky

# Genotypování jedinci a zachytené presuny



44 jedincov

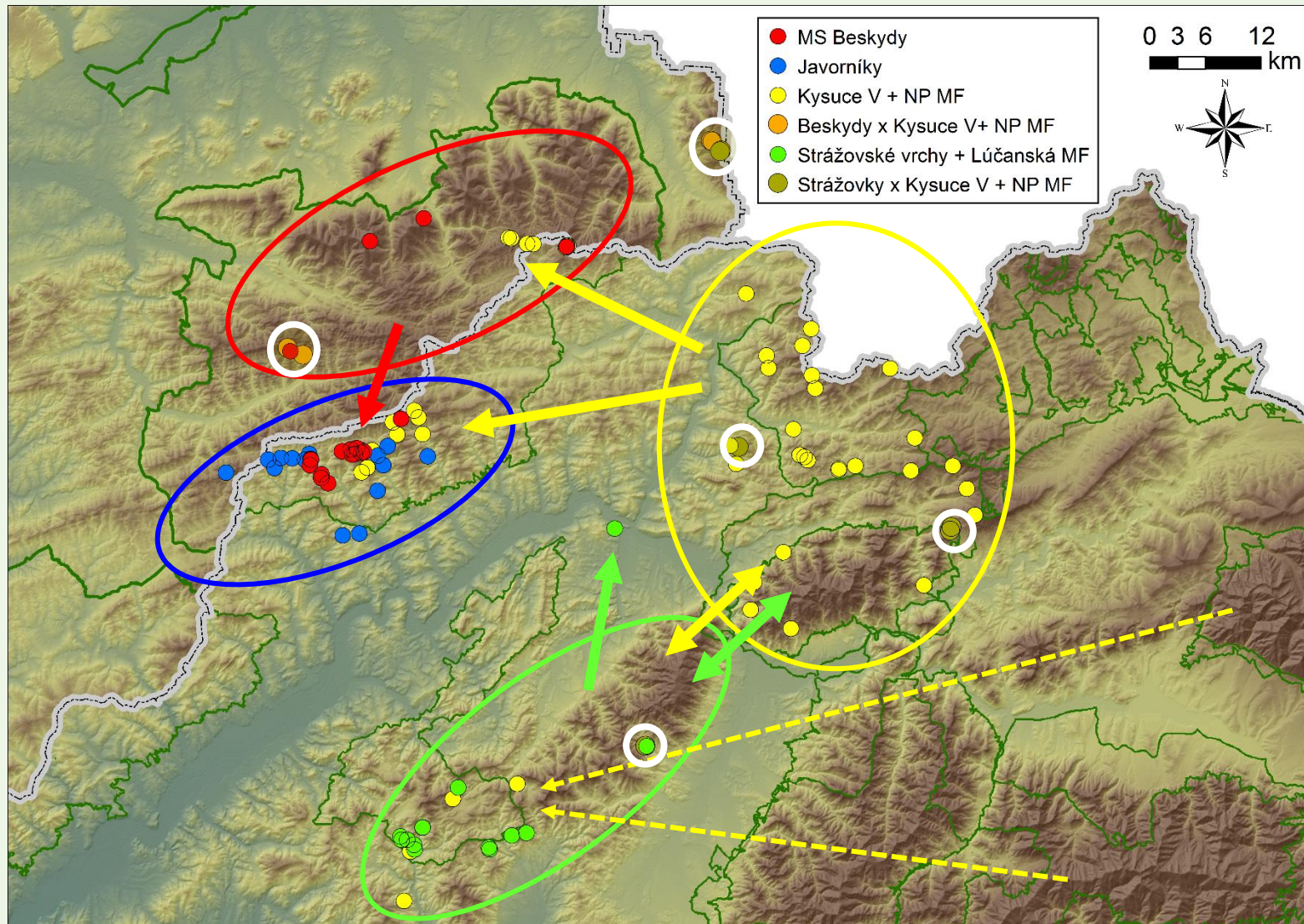
25 jedincov  
opakované  
záchyty  
2x do 14x

4 presuny  
medzi  
pohoriami

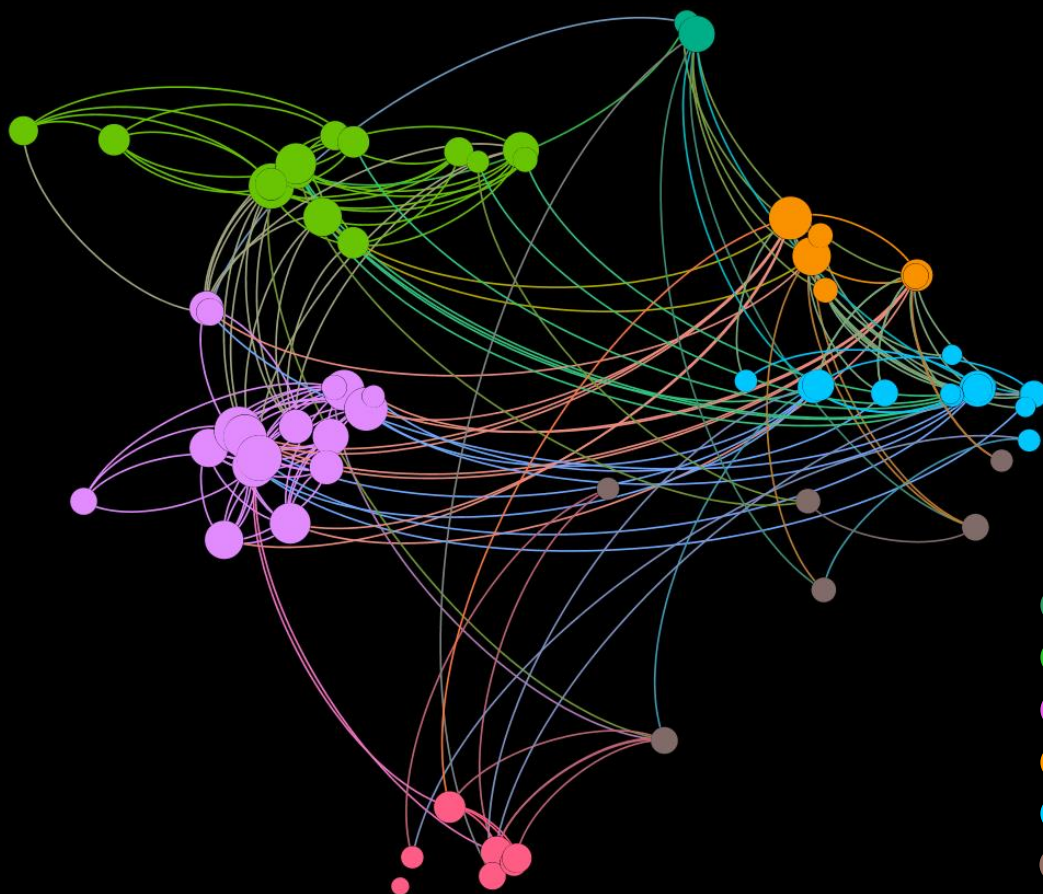




# Štruktúra u populácie rysa ostrovida



# Príbuzenské vzťahy (rys)



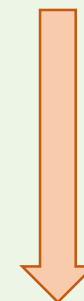
**Najviac príbuzenských vzťahov (potomok - rodič, súrodenci):**

- V rámci Javorníkov (50)
- Medzi Kysuckými Beskydami a Kysuckou vrchovinou (16)
- Medzi Javorníkmi a MS Beskydami (15)
- Medzi Kysuckými Beskydami a Javorníkmi (11)

- Slezské Beskydy
- Moravskoslezské Beskydy
- Javorníky
- Kysucké Beskydy
- Kysucká vrchovina+ Oravská Magura
- Malá Fatra
- Strážovské vrchy

# Genetická variabilita na okraji populácie

Obdobie	Jedinci	LDN <sub>e</sub> (95% CI) <sup>Pcrit</sup>	H <sub>e</sub>
2009-2012	14	20.7 (8.5-299.4) <sup>0.05</sup>	0.531
2012-2014	24	12.4 (7.7-20.9) <sup>0.03</sup>	0.538
2014-2016	15	2.1 (1.6-2.9) <sup>0.05</sup>	0.492
2016-2018	20	5.0 (2.8 - 8.5) <sup>0.05</sup>	0.467
2018-2020	9	4.8 (2.1 – 17.0) <sup>0.05</sup>	0.495

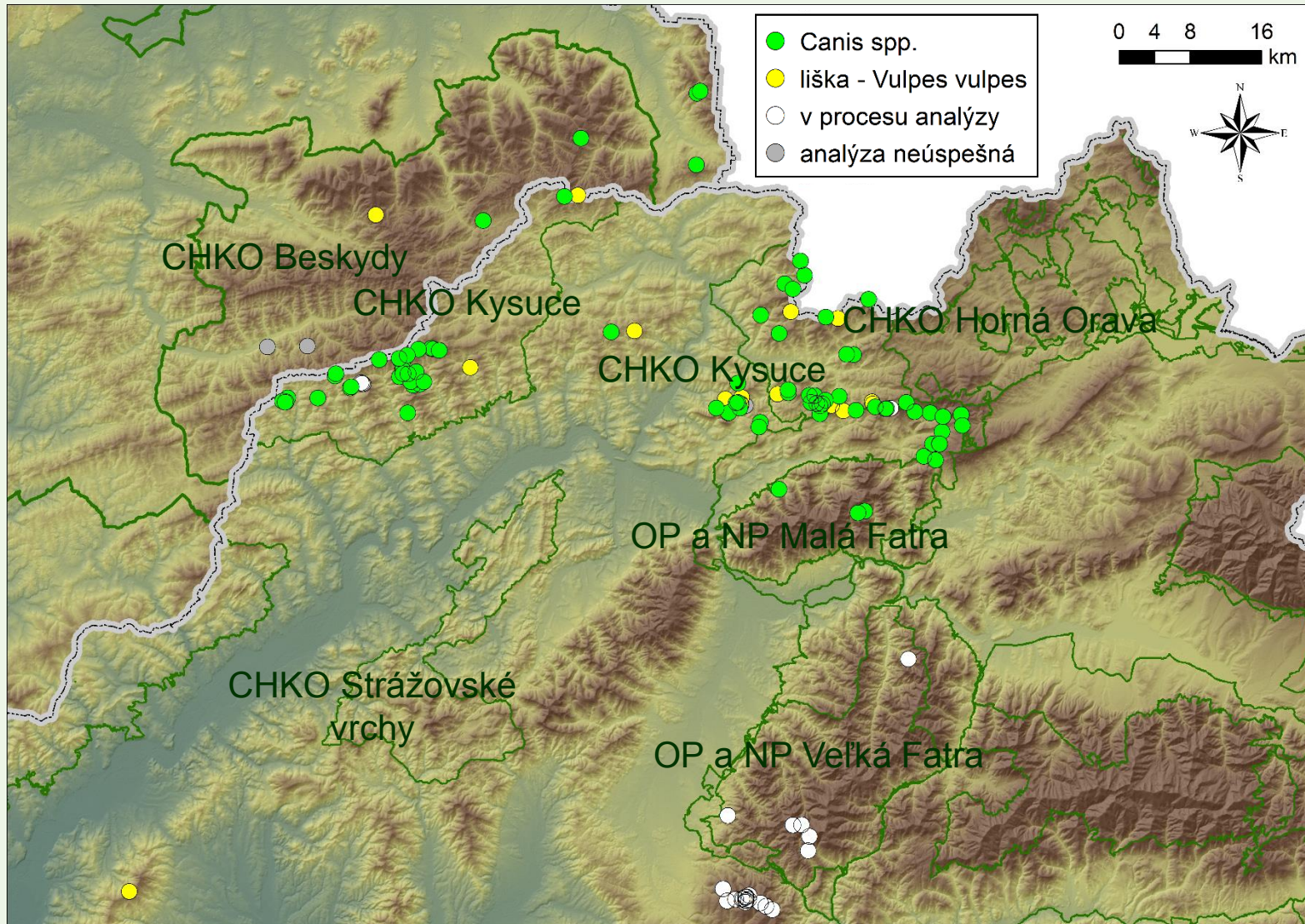


# Neinvazívny genetický monitoring vlka

- ❖ nazbieraných celkom 167 vzoriek „vlka“ (155x trus, 2x chlpy, 10x moč/krv)
- ❖ analýza mtDNA pre určenie druhu (sekvencia kontrolného regiónu - Dloop)
- ❖ kompletný genotyp u 89 vzoriek → 39 jedincov (10 z nich 2-5x)

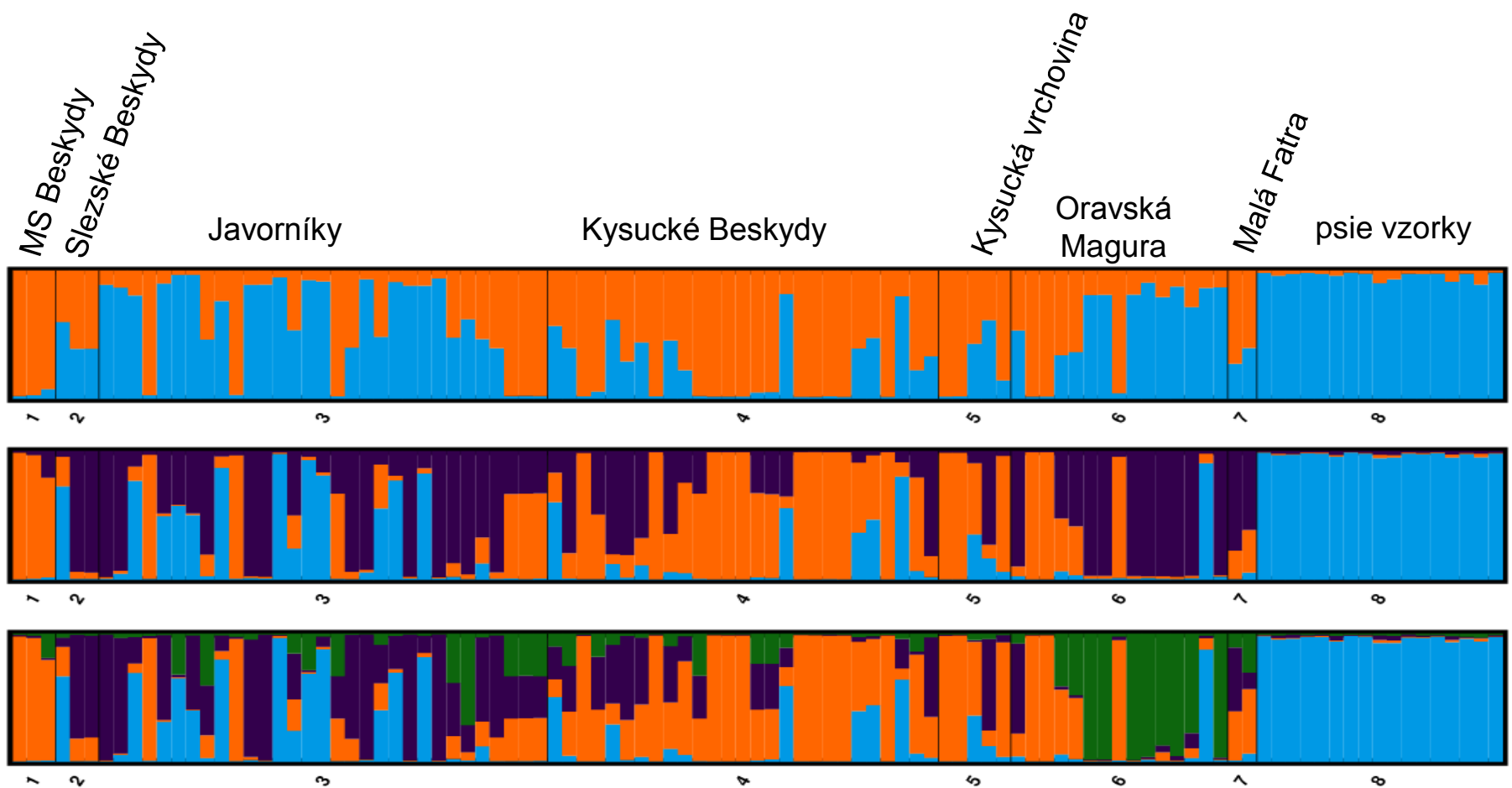
druh podľa mtDNA	počet
<i>Canis</i> spp. (vlk/pes/?)	98 (89=36/29/24)
líška hrdzavá ( <i>Vulpes vulpes</i> )	22
rys ostrovid ( <i>Lynx lynx</i> )	2
korisť + neúspešná analýza	17
celkom	139

# Zber neininvazívnych vzoriek vlka

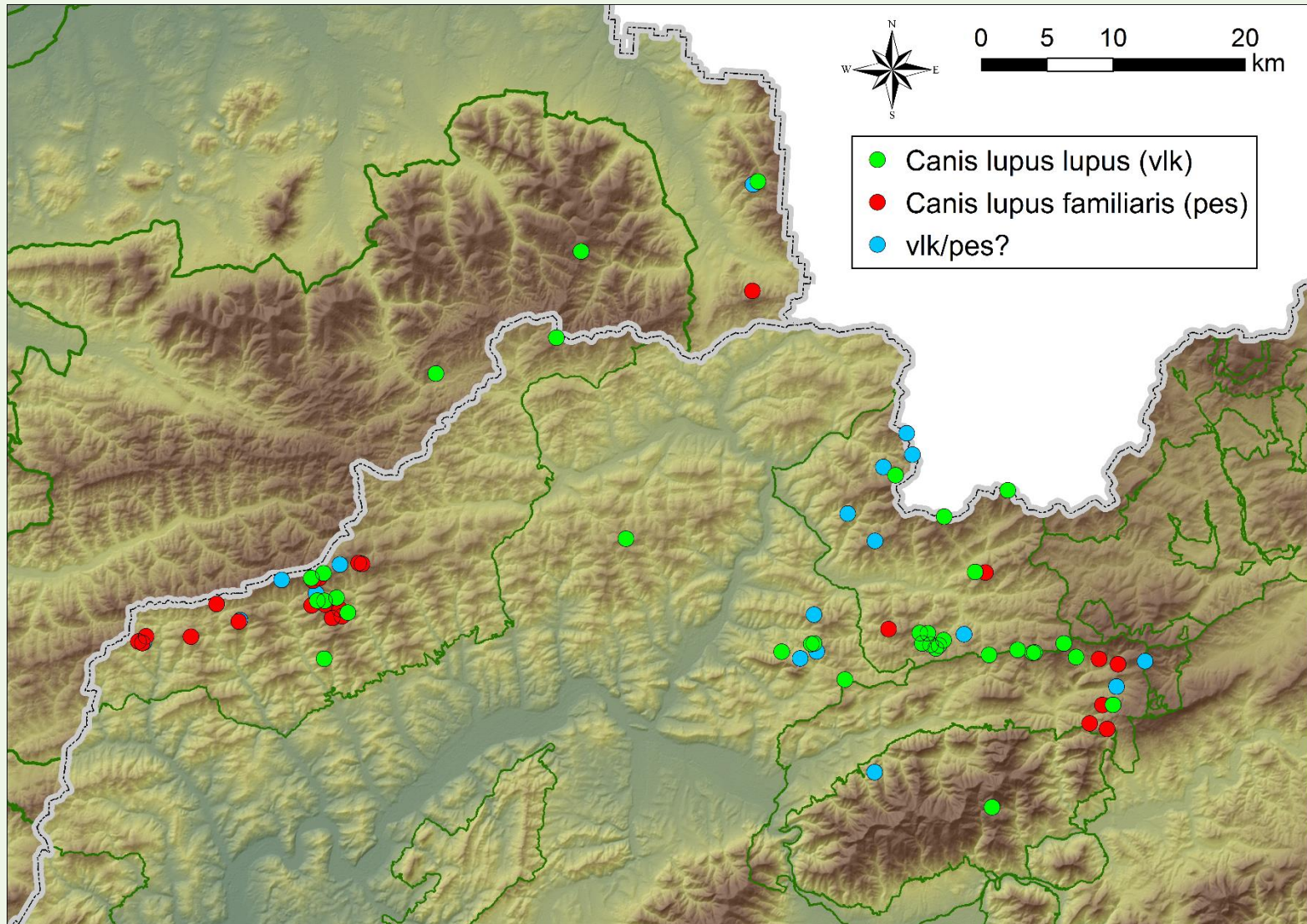


# Štruktúra populácie (vlk)

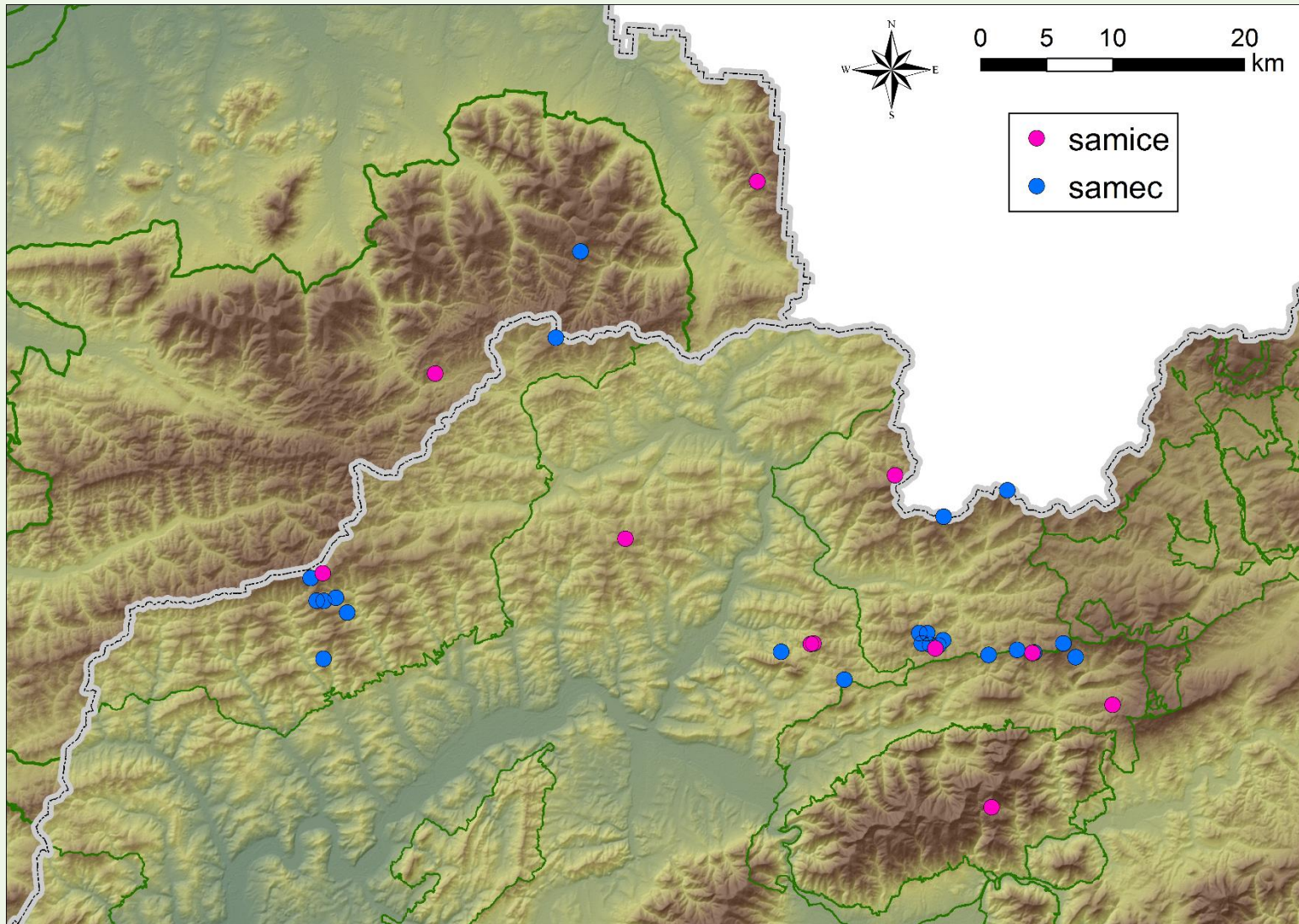
➤ Bayesiánska klastrovacia analýza v programe STRUCTURE



# Rozlíšenie vlk / pes (predbežné výsledky)



# Pohlavná štruktúra populácie (vlk)

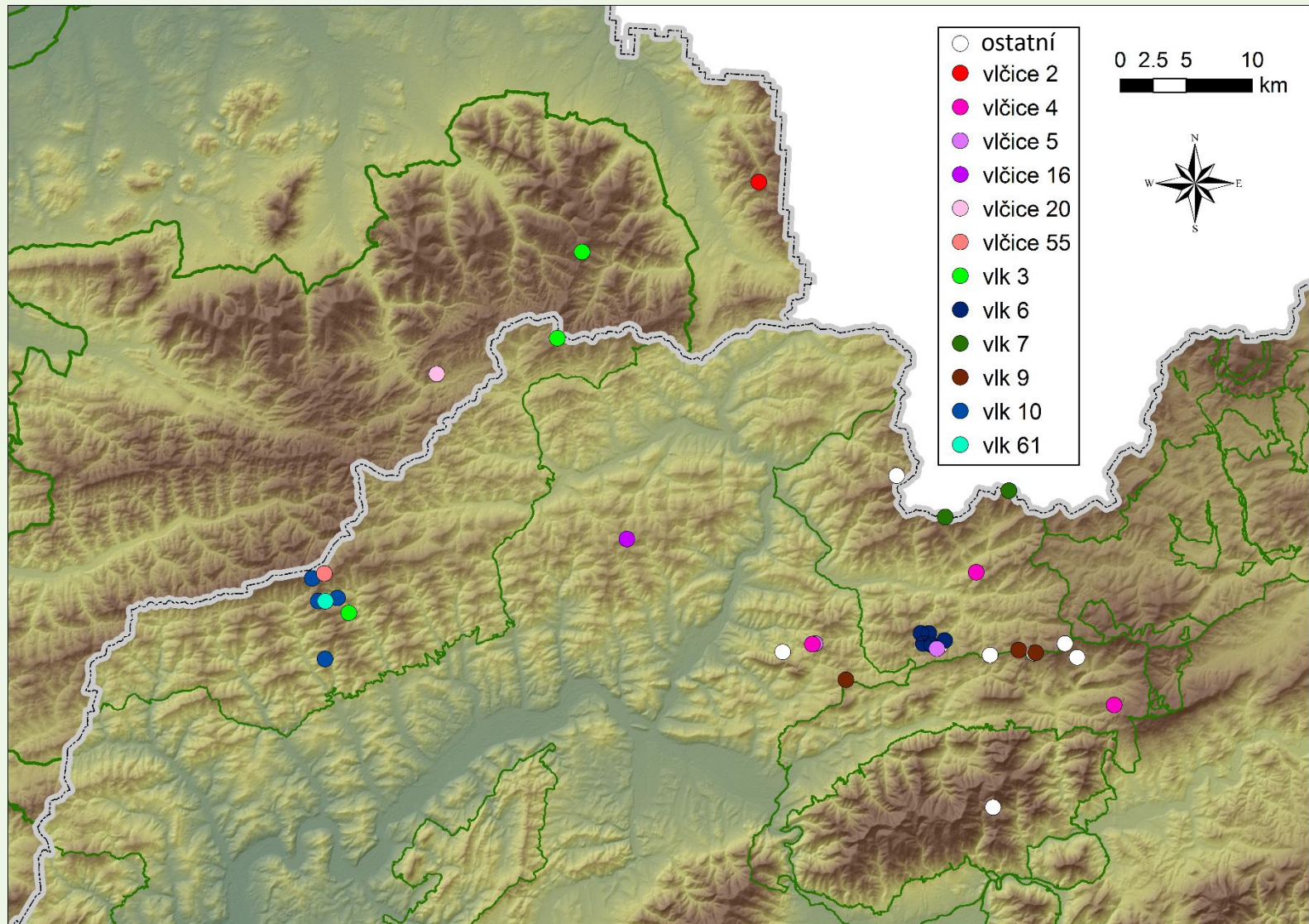


pomer  
pohlaví

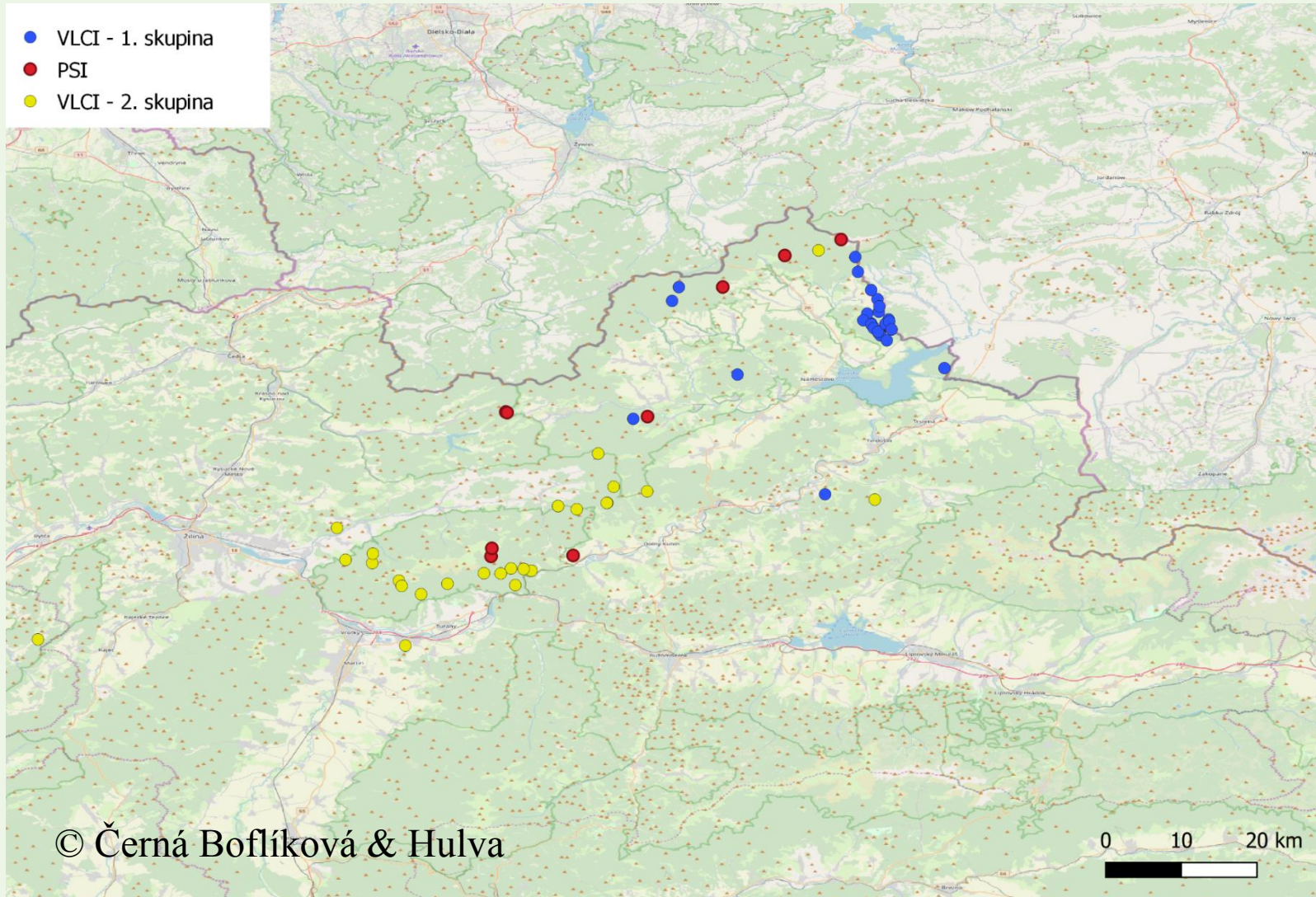
11 ♂ : 9 ♀



# Identifikovaní jedinci vlka



# Analýzy UK – ČZU Praha (OPŽP Velké šelmy 2)



Pod'akovanie:

Dana Bartošová  
František Jaskula  
Mária Apfelová  
Michal Babnič  
Michal Bojda  
Radek Červenka  
Peter Drengubiak  
Martina Dušková  
Martin Duľa  
Tomáš Flajs  
Martin Gendiar  
Lubomír Hrdý  
Lukáš Jonák  
Petr Konupka  
Ján Korňan  
Martin Kraus  
Leona Kotalová  
Miroslav Kutal  
Jiří Labuda  
Beňadik Machciník  
Richard Pekara  
Peter Pecík  
Martin Špilák  
Barbora Telnarová  
Vlado Trulík  
Martin Váňa  
Gabriela Váňová  
Josefa Volfová



Ďakujeme  
za pozornosť!

Finančne podporené:

Operační program ŽP, SFŽP, AOPK ČR  
(projekt č. 9028766)  
EEA grant (EHP-CZ02-OV-1-022-2015)  
Program švýcarsko-české spolupráce  
Internatinal Visegrad Fund

**Interreg V-A SK-CZ (304021D016)**  
**Moravskoslezský kraj**