

## Neinvazivní genetika vlka obecného v Západních Karpatech

*Pavel Hulva, Barbora Černá Bolfiková, Milena Smetanová & Miroslav Kutal*

In: Kutal M. & Suchomel J., 2014: *Analýza výskytu velkých šelem a průchodnosti krajiny v Západních Karpatech*. Mendelova univerzita v Brně, Brno. Dostupné online:

<http://www.selmy.cz/publikace/odborne-publikace/analyza-vyskytu-velkych-selem-a-pruchodnosti-krajiny-v-zapadnich-karpatech/>

### Úvod

Velké šelmy se vyznačují nízkou populační hustotou, velkými domovskými okrsky, skrytým způsobem života a soumráchnou nebo noční aktivitou, což činí jejich monitoring náročný na lidské kapacity, techniku a finance. Oblast střední Evropy představuje křížovatku potencionálních biokoridorů, kterými mohou komunikovat relativně velké zdrojové populace vlka z východu a fragmentované populace ze západu. Tuto roli mohou hrát např. sudetská pohoří. Karpaty mohou sloužit jako most mezi populacemi z východní Evropy a Balkánu. Dále se v oblasti střední Evropy včetně ČR mohou setkávat různé ekotypy těchto druhů, například populace vlků specializovaných na horské a nížinné prostředí (Czarnomska et al. 2013). Doplnění věrohodných dat z České Republiky a jejich integrace se zjištěními ze sousedních států má zásadní význam při pochopení populační dynamiky šelem v rámci Evropy.

Genetická analýza neinvazivně získaných vzorků je mimořádně vhodný nástroj k řešení této problematiky. Kromě šetrnosti tohoto přístupu ke studovaným zvířatům umožňují genetická data zjistit řadu parametrů zkoumaných populací, např. informace o genealogické struktuře, prostorovém chování, roli antropogenních změn krajiny, úmrtnosti a potenciální hybridizaci. Poskytnutí přesných dat o struktuře a dynamice populací šelem v ČR pak může sloužit jako platforma nutná pro kvalifikovaná rozhodnutí v oblasti managementu cílových druhů. Klasické paradigma ochránářské genetiky předpokládá ztrátu a změny genetické variability u malých populací vzniklých fragmentací původních areálů a negativní dopad těchto jevů v oblasti fitness a adaptivního potenciálu (Frankel & Soulé, 1981). U hyperkarnivorních zástupců šelem, tedy poměrně velkých savců, kteří mají díky své pozici na vrcholu potravních pyramid malé populační denzity a navíc jsou ovlivněni habitatovými změnami probíhajícími v antropocénu i přímým pronásledováním, mají tyto teze evidentní platnost. Například díky efektu hrdla láhve a genetickému driftu dochází ke ztrátě části genetické variability a vlivem inbreedingu může docházet k poklesu heterozygoty a inbrední

depresi. V populacích s nízkou hustotou často hraje roli Allee efekt (způsobený např. nemožností najít partnera). K výše zmíněným jevům může docházet na okrajích areálu, tedy v případě velkých šelem často v oblastech reexpanze do míst, kde byly tyto druhy vyhubeny. U vlka obecného je v takových regionech genofond často ohrožován i nadměrnou hybridizací s ferálními populacemi domestikovaných forem.

## **Materiál a metody**

Vzorky trusu, srsti a případně tkání z jedinců uhynulých na silnici nebo ulovených v rámci legálního odstřelu na Slovensku byly sbírány v Západních Karpatech (Oravská Magura, Kysucké Beskydy, Kysucká vrchovina, Moravskoslezské Beskydy a Javorníky) v letech 2006, 2008, a 2010–2012 ve spolupráci s dobrovolníky Vlčích hlídek a Fatranského spolku. Vzorky byly uchovávány v čistém ethanolu a po převozu do laboratoře skladovány při  $-20^{\circ}\text{C}$ . Jako referenční genetický materiál vlka obecného s ověřenou druhovou identifikací jsme použili vzorky trusu ze Zoo Praha. Protože u vzorků získaných neinvazivním způsobem může docházet k záměně se psem, navíc v přírodě se může vyskytovat hybridizace mezi divokou a domestikovanou formou, pro srovnání jsme použili i vzorky německých ovčáků a československých vlčáků získané jako bukální stěry. Genomická DNA byla izolována pomocí QIAamp DNA Stool Mini Kitu (Qiagen) nebo DNA Blood and Tissue Kitu (Qiagen). Jako genetické markery pro tuto studii byly vybrány jaderné mikrosatelity, což jsou úseky DNA tvořené opakováním velmi krátkých sekvenčních motivů (nejčastěji 2-4 báze). Příslušné lokusy mají v přírodě velkou délkovou variabilitu, jsou proto vhodné pro analýzy populační struktury, genealogických vztahů a individuální identifikaci. Použili jsme Canine Genotypes™ Panel 1.1 (Finzymes), který obsahuje 18 mikrosatelitových lokusů. Navíc jsou v kitu obsaženy primery pro amplifikaci amelogeninu, jaderného genu, který má různé dlouhé varianty na X a Y chromozomu a dá se proto použít k určení pohlaví. Případné vícenásobné vzorkování stejného jedince bylo zjištěno pomocí analýzy identity v programu Cervus 3.0 (Kalinowski et al., 2007). Základní náhled na populační strukturu z výsledných genotypových dat jsme získali pomocí programu Structure 2.3.3. (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003). Dále jsme použili přístup krajinné genetiky (Manel et al. 2003), která umožňuje studovat genetickou variabilitu v kontextu geografické situace, a analyzovali získané genotypy v programu Geneland (Guillot et al., 2005).

## **Výsledky a diskuse**

Předběžná analýza odhalila ve zpracované části materiálu 23 jedinců (Obr. 1). Celkem bylo analyzováno 58 vzorků, přičemž úspěšně se podařilo získat DNA profil v 31 případech, úspěšnost genotypizace z vlčího trsu byla 54 %. Tři jedinci byli vzorkováni dvakrát, jedno zvíře čtyřikrát, ostatních 20 jedinců bylo zaznamenáno jen jedenkrát.

Zajímavým výstupem je potvrzení druhové identifikace u pobytových stop (trusu) z listopadu 2006 ze Vsetínských vrchů, 2008 ze Smrku a u mladé vlčice sražené autem 8. července 2012 na silnici u Krhové u Valašského Meziříčí (Obr. 2). I když se od druhé poloviny 90. let staly údaje o výskytu vlka v Beskydech oproti minulým dekadám mnohem častějšími (např. Anděra et al. (2004) uvádí v oblasti Beskyd v letech 2000–2003 trvalý výskyt 2–3 smeček), skutečně věrohodný důkaz o recentním výskytu (fotografie, nález uhynulého jedince nebo genetická analýza) nebyl z území dosud publikován (Anděra & Červený, 2009). Jedná se tak o první přímé důkazy výskytu vlka obecného v oblasti Beskyd od roku 1914, kdy je datován poslední doložený zástřel u Bukovce (Hošek, 1976).

Analýza celého datasetu nenaznačuje větší přítomnost psí DNA v genotypch západokarpatských vlků, a tudíž se dá předpokládat, že v současnosti nedochází ve větší míře ke křížení psů a vlků v této oblasti. Jen u dvou vzorků (z Javorníků a Horní Oravy) Bayesiánské analýzy naznačují možný hybridní původ. Určení hybridního statusu je poměrně komplikované (např. Randi et al., 2014), v současnosti proto probíhají analýzy dalších lokusů, které mohou tyto výsledky zpřesnit. Poměr pohlaví u analyzovaných exemplářů byl vyrovnaný, což neukazuje na významné pohlavní rozdíly v disperzi ve zkoumané oblasti (a je v protikladu s teoretickým předpokladem vyšší filopatrie samic typické pro savce). Analýzy populační genetiky indikují diferenciaci populace ve zkoumané oblasti, příslušníci jednotlivých subpopulací však nejsou geograficky lokalizováni. Takový výsledek ukazuje na rozrůznění populace v důsledku genealogické (smečkové) struktury spíše než kvůli geografické izolaci. Dá se tedy předpokládat, že disperze v rámci oblasti není zásadně omezena, a že fragmentace krajiny není zatím hlavním faktorem ovlivňujícím strukturování populace vlka obecného v oblasti Západních Karpat. To odpovídá předpokládané vysoké pohyblivosti vlka v různých typech terénu (Randi, 2011). Podobné výsledky byly zjištěny i v polských Karpatech (Gula et al., 2009). Zvýšená pohyblivost může být však také důsledkem rušení zvířat, problémy s nalezením vhodného prostředí, source-sink dynamiky způsobené odstřelem a dalších antropogenních faktorů. Tomu by odpovídala i poměrně značná obměna jedinců na lokalitách v následujících letech. Detekovaná populační substruktura může poukazovat i na fenomén ekotypů u zkoumaného druhu. U vlka obecného byla zjištěna relativně významná korelace genetické variability s typem prostředí, naznačující adaptivní odpověď jednotlivých populací na podmínky prostředí (Pilot et al., 2006; Musiani et al., 2007). Je možná i specializace jednotlivých genealogických linií na různý typ kořisti (Carmichael et al., 2001). Oblast Karpat je z tohoto hlediska poměrně málo prozkoumaná, navíc může sloužit jako most a disperzní koridor mezi východoevropskými a balkánskými populacemi. V této oblasti se navíc mohou setkávat vlci obou haploskupin, což skýtá další

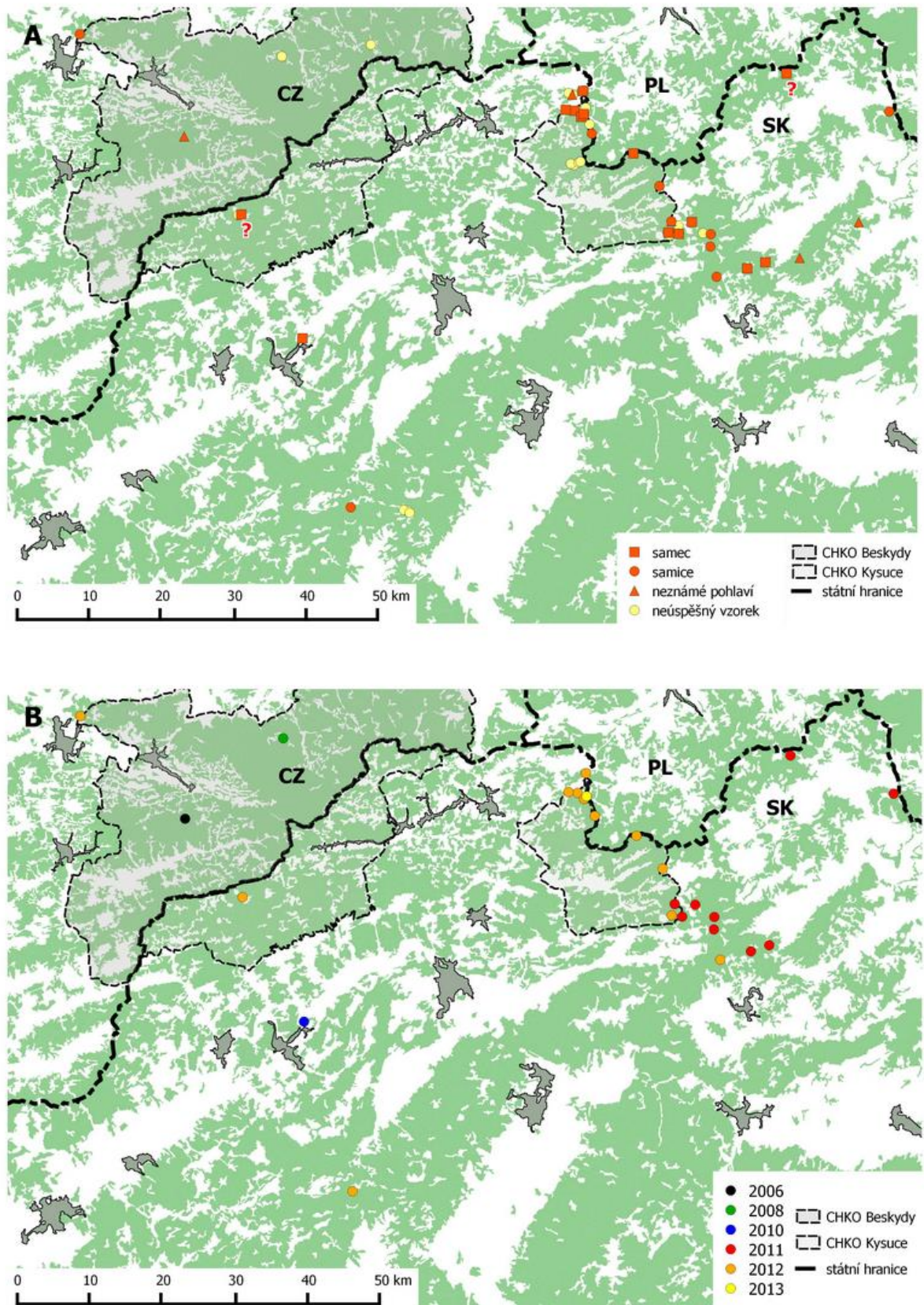
možnost zvětšení genetické variability. Analýza většího množství vzorků spolu s použitím dalších (zejména mitochondriálních) markerů může v budoucnu zpřesnit tyto hypotézy. Podobně bude srovnáním s dalšími populacemi analyzován efekt okraje areálu, fragmentace periferních populací, metapopulační dynamiky a dalších faktorů na genetickou strukturu vlka obecného.

### Poděkování

Podpořeno z International Visegrad Fund, v rámci grantu IGA FTZ CZU 20135107 a 51120/1312/3108 a IGA LDF MENDELU 1/2012. Autoři děkují všem dobrovolníkům Vlčích hlídek Hnutí DUHA, kteří se na sběru vzorků podíleli a dalším spolupracovníkům ze Slovenska – členům Fatranského spolku Obzvláště děkujeme Leoně Machalové, Vlado Trulíkovi, Ivanovi Pavlišinovi, Michalu Kalašovi, Beňadiku Machciníkovi a Radomíru Dehnerovi. Za vstřícnost děkujeme také Štátní ochraně přírody – Správě CHKO Kysuce a Správě Národního parku Malá Fatra.

### Literatura

- Anděra M. & Červený J. (2009) *Velcí savci v České republice: Rozšíření, historie a ochrana. 2. Šelmy (Carnivora)*. Praha: Národní muzeum
- Anděra M., Červený J., Bufka L., Bartošová D. & Koubek P. (2004) Současné rozšíření vlka obecného (*Canis lupus*) v České republice. *Lynx (Praha)*, n. s. **35**: 5–12
- Carmichael L. E., Nagy J. A., Larter N. C. & Strobeck C. (2001) Prey specialization may influence patterns of gene flow in wolves of the Canadian Northwest. *Molecular Ecology* **10**: 2787–2798
- Czarnomska SD, Jędrzejewska B, Borowik T, Niedziałkowska M, Stronen AV, Nowak S, Mysłajek RW, Okarma H, Konopiński M, Pilot M, Śmietana W, Caniglia R, Fabbri E, Randi E, Pertoldi C, Jędrzejewski W. 2013. Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. *Conservation Genetics* **14**: 573–588
- Falush D., Stephens M. & Pritchard J. K. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**: 1567–1587
- Frankel O. H. & Soulé M. E. (1981) *Conservation and Evolution*. Cambridge: Cambridge University Press
- Guillot G., Estoup A., Mortier F. & Cosso J. F. (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* **170**: 1261–1280
- Gula R., Hausknecht R. & Kuehn R. (2009) Evidence of wolf dispersal in anthropogenic habitats of the Polish Carpathian Mountains. *Biodiversity and Conservation* **18**: 2173–2184
- Hošek E. (1976) Ještě o vlku na Moravě a ve Slezsku. *Acta musei Silesiae, Ser. A* **25**: 1–10
- Kalinowski S. T., Taper M. L. & Marshall T. C. (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular ecology* **16**: 1099–1106
- Musiani M., Leonard J., Cluff H., Gates C., Mariani S., Paquet P., Vila C. & Wayne R. (2007) Differentiation of tundra/taiga and boreal coniferous forest wolves: genetics, coat colour and association with migratory caribou. *Molecular Ecology* **16**: 4149–4170
- Pilot M., Jędrzejewski W., Branicki W., Sidorovich V. E., Jędrzejewska B., Stachura K. & Funk S. M. (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology* **15**: 4533–4553
- Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**: 945–959
- Randi E. (2011) Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammal Review* **41**: 99–111
- Randi E., Hulva P., Fabbri E., Galaverni M., Galov A., Kusak J., Bigi D., Bolfiková B. Č., Smetanová M. & Caniglia R. (2014) Multilocus Detection of Wolf x Dog Hybridization in Italy, and Guidelines for Marker Selection. *PLoS ONE* **9**: e86409



**Obr. 1:** Mapa zájmového území. A) Lokality, kde byly odebrány vzorky trusu nebo srsti, případně tkáňové vzorky vlka obecného. Červenou barvou jsou zvýrazněny lokality, kde se podařilo získat genotyp zvířete. Otazník označuje jedince možného hybridního původu. Tvar bodů označuje pohlaví, bylo-li určeno pomocí genetických metod. B) Jednotlivými barvami jsou odlišeny lokality s výskytem vlka obecného zaznamenaným v jednotlivých letech.



**Obr. 2:** *Mladá vlčice sražená 8. července 2012 na silnici u Krhové u Valašského Meziříčí (foto: Michal Bojda)*