



INTERREG V-A
SLOVENSKÁ REPUBLIKA
ČESKÁ REPUBLIKA

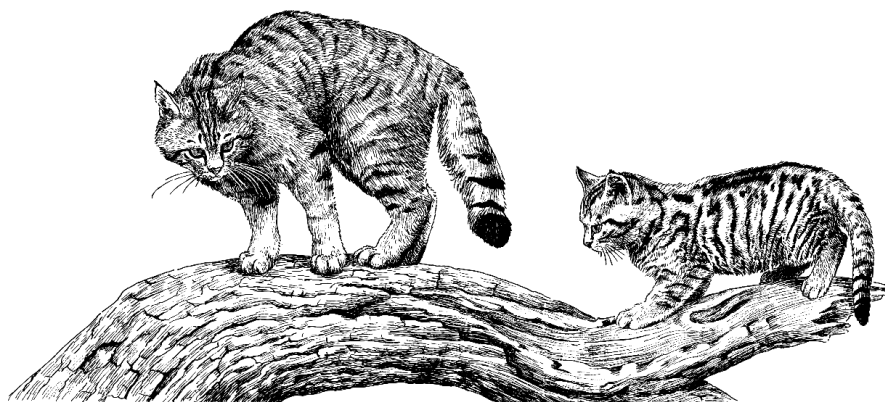


EURÓPSKA ÚNIA
EURÓPSKY FOND
REGIONÁLNEHO ROZVOJA
SPOLOČNE BEZ HRANÍC

INTERREG V-A SK-CZ
Projekt Felis SKCZ (304021R971)

Metodika monitoringu kočky divoké
(*Felis silvestris*)

Krojerová, J., Duľa M., Tám B., Bojda M., Dekoš P., Gajdárová B.,
Homolka M., Kubala J., Koubek P., Kutal M., Machcíník B.,
Tonhaiserová A., Váňa M.



Prosinec 2020

Obsah

Úvod	3
1. Monitoring pobytových znaků	4
1.1. Klasifikace nálezových dat.....	4
1.2. Sběr a vyhodnocení dat.....	6
2. Fotomonitoring	7
2.1. Extenzivní fotomonitoring.....	7
2.2. Intenzivní fotomonitoring.....	7
2.3. Zpracování a analýza získaných dat.....	8
3. Telemetrický monitoring	9
3.1. Metodika odchyty kočky divoké.....	10
3.2. Specifikace telemetrických obojků.....	11
3.3. Využití dat získaných telemetrickým sledováním.....	12
4. Chlupové pasti	12
4.1. Popis chlupové pasti.....	13
4.2. Atraktanty.....	14
4.3. Metodika monitoringu pomocí chlupových pastí.....	16
5. Genetické analýzy	17
5.1. Systematický sběr neinvazivních genetických vzorků kočky divoké.....	18
5.2. Zpracování získaných vzorků a jejich hodnocení.....	20
5.3. Analýza mitochondriální DNA.....	22
5.4. Analýza mikrosatelitů.....	23
5.5. Analýza hybridizace s kočkou domácí.....	25
Literatura	27

Úvod

Podrobná znalost areálu výskytu je klíčovým předpokladem účinné ochrany druhu. Znalosti o rozšíření a populační dynamice kočky divoké (*Felis silvestris*) jsou v současnosti nesrovnatelně horší v porovnání s jinými ohroženými druhy šelem. Důvodem je skrytý způsob života umocněný malou velikostí těla a také podobností s jedinci kočky domácí s původním divokým zbarvením. V České republice ani na Slovensku nejsou k dispozici data o početnosti a demografickém vývoji populace tohoto druhu, na jejichž základě by bylo možné vytvořit vhodný managementový plán pro její ochranu.

Populaci kočky divoké v Evropě ohrožuje ztráta a fragmentace habitatu a hybridizace s kočkou domácí. Různé studie v rámci Evropy, které studovaly problematiku hybridizace koček, se ve svých výsledcích významně liší. Například v Maďarsku nebo Skotsku jsou populace kočky divoké výrazně ovlivněny hybridizací s domácími kočkami („hybridní roje“), v jiných evropských zemích jsou naopak populace divokých koček relativně nedotčené, např. v Německu bylo identifikováno v populaci jen 3,5 % hybridů. V sousedním Polsku ve Vysokých Tatrách zas nedávný průzkum ukázal, že se na území parku kočka divoká pravděpodobně vůbec nevyskytuje a všechny kočky, které se zde pohybovaly, patřily k domácím kočkám. Právě situace v okolních zemích poukazuje na nutnost, co nejdříve zjistit, v jakém stavu je populace kočky divoké v Západních Karpatech, které představují významné refugium pro tento druh. Povinnost monitorovat kočku divokou mají jak Česká, tak Slovenská republika, a to na základě Přílohy IV Směrnice o stanovištích 92/43/EHC.

V rámci operačního programu Interreg V-A Slovenská republika – Česká republika byl proto v rámci výzvy INTERREG V-A SK-CZ/2018/07 předložen a následně finančně podpořen projekt „**Hledáme kočku, pozor, divokou!**“, akronym projektu je Felis SKCZ, registrační číslo projektu v ITMS2014+ je 304021R971. Vedoucím partnerem projektu je **Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i.**, hlavním přeshraničním partnerem je **Národní zoologická zahrada Bojnice** a partnerem projektu je **Hnutí DUHA Olomouc**. Cílem projektu je pomocí intenzivního a extenzivního fotomonitoringu a neinvazivního genetického monitoringu za pomoci chlupových pastí zjistit přítomnost kočky divoké v oblasti Strážovských vrchů, Bielych/Bílých Karpat a Javorníků. Projekt umožní získat první reálné odhady početnosti populace kočky divoké v zájmovém území, zhodnotí využívání prostředí jednotlivými jedinci (NZOO Bojnice plánuje v projektu telemetrii několika jedinců) a jejich vzájemné příbuzenské vztahy a vyhodnotí v jaké míře, nebo jestli vůbec, dochází k hybridizaci s kočkou domácí. Jedním z výstupů projektu je i vytvoření společné **Metodiky monitoringu kočky divoké**, ve které budou uvedeny vhodné, mezi oběma státy sjednocené, metodické přístupy, použité pro získání robustních dat o výskytu druhu, potřebných pro následný ochranný management kočky divoké v Západních Karpatech.

1. Monitoring pobytových znakov

Mačka divá je skryto žijúci druh a jej prítomnosť častokrát uniká pozornosti i skúseným terénnym mapovateľom. Monitoring a dokumentácia pobytových znakov mačky divej či zber neinvazívnych vzoriek (trus, moč, chlpy) je v porovnaní s veľkými šelmami omnoho náročnejší, vďaka jej veľkosti a spôsobu života. Preto budú najdôležitejším zdrojom údajov pokročilejšie a spoľahlivejšie formy potvrdenia výskytu mačky divej, ako je monitoring pomocou fotopascí a neinvazívny genetický monitoring za použitia chlpyových pascí.

1.1. Klasifikace nálezových dat

Podobne ako pre klasifikáciu nálezových údajov rysa a vlka (podrobnosti vid'. kapitola 1 str. 3 v štúdiu Krojerová et al. 2018) bude aj pre hodnotenie nálezových údajov mačky divej použitá medzinárodne uznávaná klasifikácia podľa SCALP. SCALP vymedzuje tri základné kategórie údajov: C1 – „tvrdé údaje“, C2 – „objektívne údaje“, C3 – „nedostatočné údaje“ (Molinari-Jobin et al. 2003). Do prvej kategórie patria nespochybniteľné údaje o prítomnosti mačky divej. Patria sem napríklad zastrelení jedinci, nájdené mŕtve alebo odchytené zvieratá či vzorky trusu či chlpy, u ktorých bola genetickými analýzami potvrdená druhová príslušnosť (obr. 1).



Obr. 1 Vpravo genetickou analýzou potvrdený trus mačky divej, vľavo kadáver mačky divej (Zdroj: NZOO Bojnice).

Do kategórie C2 patria fotografie jedincov (fotografie z fotopascí, fotografie verejnosti), ktoré spĺňajú kritéria identifikácie znázornené na obr. 2, ktoré sú súčasťou rôznych európskych štúdií zameraných na monitoring mačky divej (napr. Pospíšková et al. 2013, Anile et al. 2014, Kilshaw et al. 2015, Duľa et al. 2019, Maronde et al. 2020a,b). Bohužiaľ, v prípade krížencov je klasifikácia zložitá aj pre odborníkov (Eichholzer 2010), pretože fenotypovo sú viac podobní mačke divej (Krüger et al. 2009). Preto sa o kategóriu C1 môže jednať len v prípade, že je daný jedinec známy a bol získaný jeho genotyp, ktorý potvrdil druhovú príslušnosť.

Rozlišovací znaky kočky divoké a divoce zbarvené kočky domácí

		Kočka divoká	
		<ol style="list-style-type: none"> 1. podkladová barva okrově žlutá jako suchá tráva 2. tygrování rozptité, málo kontrastní 3. špičky uší stejně šedé jako zbytek uší 4. čtyři delší a jeden kratší tmavý proužek na krku 5. dva dobře patrné paralelní tmavé proužky na ramenou 6. na zádech jeden tmavý úzký úhovní pruh 7. ocas působí poněkud kratší, 2-3 oddělené kroužky na ocase, špička ocasu tupá 8. spodní strana tlapek krátce černá 9. často malý bílý flíček na hrdle 10. obojek na krku vepředu nepatrně viditelný 	
		Divoce zbarvená kočka domácí	
		<ol style="list-style-type: none"> 1. podkladová barva stříbrošedá 2. tygrování relativně kontrastní 3. špičky uší tmavé 4. na hlavě je většinou více než 5 proužků, které nejsou tak jasně odděleny 5. žádné zřetelně viditelné proužky na ramenou 6. na zádech více tmavých krátkých rozvětvených proužků 7. kroužky na ocase většinou spojené, konec ocasu většinou špičatější 8. spodní strana tlapek často celá černá 9. zřídka malý bílý flíček na hrdle 10. obojek na krku zepředu zřetelně viditelný 	

© A. Kranz, L. Lapini & P. Molinari - 2009

Obr. 2 Základné rozlišovacie znaky medzi mačkou divou a mačkou domácou

Všetky ostatné získané údaje (jednotlivé stopy, stopové dráhy, trus bez genetickej analýzy a pod.) budú z hľadiska relevantnosti získaných údajov a v porovnaní s veľkými šelmami nejednoznačnej determinácie, klasifikované do kategórie C3 (obr. 3). Ak bude viesť stopová dráha k miestu, kde bude jedinec zaznamenaný na fotopasci a následne splní identifikačné kritériá, alebo genetická analýza nájdeného trusu či chlpuv na stopnej dráhe potvrdí mačku divú, bude údaj preklasifikovaný ako C1. Nálezové údaje z terénu alebo získané dáta od verejnosti (napr. nezdokumentované priame pozorovania), ktoré môžu indikovať prezenciu druhu, ale nespĺňajú kritériá pre vyššiu klasifikáciu (C1) budú klasifikované najnižšou kategóriou vierohodnosti - C3 (obr. 4).



Obr. 3 Stopy patriace pravdepodobne mačke divej (Zdroj: Lukáš Holásek)



Obr. 4 Fotografie zaslané verejnosťou (Zdroj: M. Hepner).

1.2. Sběr a vyhodnocení dat

Zber údajov o pobytových znakoch mačky divej prebieha v priebehu celého roka, avšak prevažne v zime, sledovaním stôp a stopových dráh na snehovej pokrývke. Terénne pochôdzky prebiehajú v modelových oblastiach s cieľom rovnomerne pokryť sledované územie: v každej oblasti je potrebné pokryť čo najviac kvadrátov 5×5 km minimálne tromi návštevami (Krojerová et al. 2018). Vyškolení mapovatelia budú v priebehu pochôdzky zaznamenávať prejdené trasy do ručnej GPS alebo zákresom do máp a exportované vo formáte GPX alebo KML. V priebehu terénnej pochôdzky sú zaznamenané všetky pobytové znaky mačky divej, je urobená fotodokumentácia a prípadne odobrané biologické vzorky na genetickú analýzu (trus, srst', moč) - podrobnejšie popísané ďalej v texte. Nálezové údaje sú zbierané prostredníctvom online prostredia na webe selmy.cz (projekt kočka divoká), prípadne mobilnou aplikáciou Shelmon. Vyhodnotenie monitoringu po klasifikácii nálezových údajov na kategórie C1, C2 a C3 bude spracované v prostredí GIS a zobrazené na úrovni kvadrátov European Environmental Agency o veľkosti 10×10 km podobne ako u veľkých šeliem (Kutal et al. 2017a,b, Duřa et al. 2017).

2. Fotomonitoring

Pre intenzívny (deterministický) fotomonitoring mačky divej sa budú využívať fotopasce. Jeho cieľom je odhad veľkosti populácie a populačnej hustoty druhu v záujmovom území. Na dodatočnú identifikáciu jedincov a získanie dostatočného materiálu pre ich spoľahlivú identifikáciu, značkovaciu aktivitu, vnútro a medzidruhovú interakciu, ako aj potvrdenie reprodukcie, zistenie počtu mláďat a dynamiku populácie mačky divej bude využívaný extenzívny fotomonitoring v priebehu celého roka.

2.1. Extenzívny fotomonitoring

Na získanie dodatočného referenčného materiálu pre spoľahlivú identifikáciu jednotlivých jedincov vrátane ich pohlavia je realizovaný extenzívny fotomonitoring v priebehu celého roka (pred a po začatí príslušného intenzívneho fotomonitoringu). Tento prístup zároveň umožňuje zachytiť rozmnožovanie mačiek divých (počet vodiacich samíc a mláďat) a celkovú dynamiku populácie na sledovanom území (perzistencia jedincov, obrat jedincov v populácii). Fotopasce, ktoré sú prevažne inštalované na stálych značkovacích miestach a na vybraných lokalitách s najväčšou šancou zdokumentovať jedince mačky pohybujúce sa v danom území (lesné cesty, chodníčky, skalné hrebienky a pod.) prinášajú tiež unikátne údaje o časopriestorovej aktivite jedincov či vnútrodruhej alebo medzidruhej interakcii (napr. sympatrický výskyt s mačkami domácimi). Využívať sa budú hlavne infračervené fotopasce v kombinácii s chlповými pascami a aplikovaným atraktantom. Tento prístup umožňuje kombináciu fenotypovej a genotypovej identifikácie jedincov.

2.2. Intenzívny fotomonitoring

Intenzívny (deterministický) fotomonitoring mačky divej bude prebiehať v mesiacoch október-december v dĺžke 60 – 80 dní, rozdelených do 12 – 16 periód (5 dní = 1 perióda) podobne ako v prípade rysa ostrovida (Krojerová et al. 2018, 2019). Na základe odporúčaní a protokolov iných štúdií v Európe (Anile et al. 2014, Kilshaw et al. 2015, Maronde et al. 2020b) budú fotopasce rozmiestnené na referenčných územiach o veľkosti približne 100 km² v kvadrátovej sieti 1×1 km, v rámci projektu Felis SKCZ to budú Javorníky alebo Biele Karpaty a Strážovské vrchy. Fotostanice (dve fotopasce s bielym bleskom, napr. Cuddeback Ambush, Cuddeback C, Cuddeback X-Change Color, umiestnené oproti sebe) budú umiestnené na základe predošlého extenzívneho fotomonitoringu, nájdených pobytových znakov mačky divej (stopy, trus, značkovacie miesto) alebo na typických miestach výskytu (skalnaté hrebienky, skalnaté útvary, lesné chodníky atď.) v odporúčanej výške približne 50 cm nad zemou (Anile et al. 2014). Rozmiestnenie fotopascí je nadizajnované tak, aby každé zviera malo šancu byť zaznamenané, to znamená, že ich pokrytie zodpovedá potencionálne najmenšiemu okrsku samice, ktorý v Európe predstavuje 2 km² (Götz et al. 2018). V kombinácii s fotopascami bude na každej druhej lokalite umiestnená chlповá pasca s aplikovaným atraktantom (obr. 5). Fotopasce sú kontrolované približne v jedno- až dvojtýždňových intervaloch, kvôli ich údržbe, výmene batérií a exportu získaných údajov.



Obr. 5 Monitoring pomocou fotopasce a chlpovej pasce umožňuje pri kvalitných snímkach a úspešnej analýze DNA prepojiť vzhľad a genotyp daného jedinca (Zdroj: Hnutí DUHA Olomouc).

2.3. Zpracování a analýza získaných dat

Pomocou kvalitných fotografií (poprípade videí) a na základe unikátneho sfarbenia srsti každého jedinca (predovšetkým zadné a predné končatiny a boky), sú jednotlivé zvieratá spoľahlivo identifikovateľné (obr. 6; Eichholzer 2010, Kilshaw & Macdonald 2011, Anile et al. 2012). Každému jedincovi je pridelený unikátny identifikačný kód alebo meno a dodatočne sú uvedené ostatné kategórie ako pohlavie (samec, samica, neznáme) a veková kategória (adult, subadult, mláďa, neznáme). Získané údaje budú uložené a spracované v rozsiahlej databáze jedincov na šelmy.cz za celé monitorované územie.



Obr. 6 Jedinci mačky divej majú podobne ako rys ostrovid unikátnu kresbu srsti, preto je možné odlíšiť jednotlivé jedince. A, B – dva rôzne jedince; C, D – dva záznamy jedného jedinca (Zdroj: Beňadik Machcíník, Hnutí DUHA Olomouc).

Po identifikácii jedincov a vyradení záznamov, na ktorých nie sú podľa identifikačných kritérií jedinci mačky divej (hybridi, mačky domáce, nejednoznačná identifikácia), či záznamov so zníženou alebo nevhodnou kvalitou, ktorá by mohla viesť ku nepresnej identifikácii, budú pripravené vstupné údaje pre odhad abundancie a populačnej hustoty mačky divej na jednotlivých referenčných územiach. Pre odhad demografických parametrov budú využívané nepriestorové (CMR) a priestorové modely (SECR - spatially explicit capture-recapture) podobne ako v iných recentných štúdiách z Talianska (Anile et al. 2014), Škótska (Kilshaw et al. 2015) alebo Švajčiarska (Maronde et al. 2020b). Pri odhade populačnej hustoty mačky divej musia byť zohľadnené i jej habitatové a priestorové nároky. Pre definovanie vhodnosti habitatu sa preto používa štandardne vrstva vybraných prírode blízkych typov krajinných prvkov Corine Land Cover (CLC, European Environmental Agency 2018) alebo vhodne nadefinovaný habitatový model pre mačku divú podľa Pospíšková (2015) pro ČR a Kropil et al. (2015) pro SR. Do analýzy budú zahrnuté len adultné a subadultné jedince, avšak zachytenie mláďaťa alebo mačky divej s mláďaťom bude hodnotené ako záznam samostatnej samice podobne ako u rysov (Zimmermann et al. 2013). Pri zachytení mláďaťa je jednoznačná identifikácia a priradenie k príslušnej samici možné len na základe kvalitných identifikačných znakov z predošlých záznamov počas extenzívneho monitoringu. Na vyhodnotenie dát bude využitý program R (R Development Core Team 2013) s využitím modulov „spacecap“ (Efford 2011, Gopalaswamy et al. 2012), „secr“ (Foster & Harmsen 2012) alebo „multimarkClosedSCR“ (Anile et al. 2014, Maronde et al. 2020b)

3. Telemetrický monitoring

Telemetrický monitoring je metóda bežne využívaná na štúdium správania zveri, ich populačnej biológie a ekológie (Fuller et al. 2005). Jedince označené vysielacími môžu byť sledované dôslednejšie a častejšie než pri použití iných metód (Silvy et al. 2005). Použitie telemetrie poskytuje možnosti získavať informácie, ktoré nie je možné alebo je veľmi zložité, získať inými metódami (Fuller et al. 2005). V Európe bolo doposiaľ realizovaných viacero telemetrických štúdií tohto druhu (napr. Daniels et al. 2001; Lozano et al. 2003; Biró et al. 2005; Sarmiento et al. 2006; Klar et al. 2008; Jerosh et al. 2017), no v rámci Karpát bol doposiaľ krátku dobu sledovaný len jeden jedinec mačky divej (Kropil et al. 2015).

V rámci projektu máme naplánovaný monitoring niekoľkých jedincov mačky divej, ktorých sledovanie umožní detailnejšie zmapovať priestorovú aktivitu a využívanie konkrétnych biotopov mačkou divou. Vo vybraných modelových oblastiach (Strážovské vrchy, Biele Karpaty, Javorníky, Vtáčnik) bude realizovaný odchyt voľne žijúcich jedincov mačky divej podľa schválených legislatívnych a metodických prístupov (napr. Jerosch et al. 2017). Jedince budú po odchyte vybavené satelitným obojkom, čipom (umožňuje identifikáciu i po odopnutí obojku napr. v prípade nájdenej kadáveru) a bude im odobratá vzorka chlpov, slín a krvi na veterinárny skrining a genetickú analýzu. Následne budú vypustené späť do voľnej prírody. Telemetrický obojok umožní pravidelný príjem časopriestorových dát o pohybe a aktivite zvierat. V prípade výnimočnej situácie (migrácia) umožní zmeniť nastavení programu zaznamenávania pozície. Telemetrické zariadenie bude vybavené mechanizmom („drop-off“ alebo cotton-strip“), ktorý umožní odpadnutiu obojku z krku zvierat bez nutnosti spätného

odchyty jedinca. Odchyty jedincov mačky divej na Slovensku budú realizované v sezóne 2021/2022.

3.1. Metodika odchyty kočky divoké

Odchyťové sklopce

Odchyťové sklopce sú vyrobené z vodotesnej preglejky a oceľového rámu (obr. 7). Padacie dvere sa pohybujú v kovových koľajniciach a zabezpečujú rýchle uzavretie sklopcov, ktoré sú zvyčajne svetelne uzavreté s dostatočným vetraním vzduchu. Spodný okraj dverí je obložený penou. Plánujeme použiť aj pachové atraktanty napr. moč mačky alebo valeriánu lekársku (*Valeriana officinalis*) či kocúrnik obyčajný (*Nepeta cataria*), na ktoré mačky výborne reagujú a môžu zvýšiť pravdepodobnosť ich odchytenia. Odchyťové sklopce sa spúšťajú/aktivujú silonom, ktorý je natiahnutý v strede vnútornej časti pasce. Tento spúšťací mechanizmus je spojený so západkou KIEFERLE, ktorá drží padacie dvere a pri spustení ich uvoľní. Na oboch padacích dverách sú kvôli vizuálnej kontrole ponechané malé uzamykateľné okná. Po odchyte je mačka týmito otvormi narkotizovaná pomocou imobilizačnej fúkačky. Parametre odchyťových sklopcov sú: šírka 75 cm, výška 80 cm, dĺžka 200 cm. Na odchyť mačky divej je možné použiť aj menšie sklopce o rozmeroch 70 x 70 x 150, resp. 75 x 80 x 170 alebo 80 x 90 x 180 cm (Slovinsko; Potočnik, *pers. comm.*).

Najvhodnejším obdobím na odchyť mačky divej je zima, hlavne obdobie od februára do apríla pred a počas obdobia párenia, kedy sa mačky aktívnejšie pohybujú. Na územiach bez prezencie iných veľkých šeliem, najmä medveďa, je možné odchyťové obdobie predĺžiť už od októbra.

Odchyťové sklopce sú zvyčajne umiestnené na úzkych a priamych cestách, hrebeňoch alebo na chodníkoch pre lesnú a divú zver. Priechod je z oboch strán blokový vegetačnými alebo maskovacími sieťami (obr. 7). Inštalujú sa iba po konzultácii a po schválení príslušnými orgánmi (strážcami, správcami zveri, lesníkmi, poľovníkmi, zainteresovanými stranami alebo vlastníkmi lesov). Informačné panely, upozorňujúce na prebiehajúci odchyť, sú umiestnené na oboch stranách približne 50 metrov od boxov. Telefónne čísla a/alebo e-mailly ako aj informácie o webových stránkach projektu sú uvedené na informačných paneloch.

Odchyťové pasce sú monitorované po celý deň pomocou GSM vysieláčov. Výstražný systém sa každý deň testuje, aby sa otestovala jeho funkčnosť prostredníctvom kontrolnej SMS. Spustením systému sa odošle informačná SMS odchyťovému tímu. Okrem odchyťového tímu sa informačné SMS zasielajú aj osobe (strážca, poľovník alebo lesník), ktorá je v blízkosti miesta odchyty a pascu čo najrýchlejšie skontroluje a vypustí akékoľvek ne cieľové druhy (líšky, jazvece atď.). O odchytení mačky bude odchyťový tím informovaný čo najskôr. V závislosti od lokality a dostupnosti musí byť odchyťový tím na mieste do 2 až 4 hodín. Sklopce sú monitorované infračervenými/infračiernymi fotopascami na zaznamenanie správania mačiek a iných druhov zvierat v bezprostrednej blízkosti pasce. Kontrolujú sa pravidelne raz za 5-7 dní. Pri snežení je nutné pasce kontrolovať každý deň, aby sa zachovala ich funkčnosť.

Sklopce sú všeobecne náročné na údržbu, ale poskytujú jedinou účinnú metódu odchyty divých mačiek. Uzavreté odchyťové sklopce vyrobené z preglejky majú hladké steny a sú preto

bezpečné, doteraz neboli pri necieľových odchytoch mačiek (obr. 8) zaznamenané žiadne zranenia odchytených jedincov. V ľahkých drevených debnách sa zvieratá chovajú podstatne pokojnejšie a sú chránené pred chladom alebo inak nepriaznivým počasím.

Samotný odchyt, imobilizáciu a manipuláciu budú vykonávať len odborne spôsobilé osoby, ktoré majú obdobné skúsenosti napr. z odchytovej rysov a majú mnohoročné skúsenosti s manipuláciou so zvieratami a to vrátane veterinára, ktorý má skúsenosti s imobilizáciou voľne žijúcich zvierat. Stres zvierat bude minimalizovaný rýchlym zásahom odchytovej tímu.



Obr. 7 Odchytovej sklopce vyrobený z vode odolnej preglejky slúžiaci na odchyt rysov (Zdroj: NZOO Bojnice).



Obr. 8 Necieľový odchyt mačky divej do sklopca slúžiaceho k odchytu rysov, je vidieť pozitívnu reakciu na pachový atraktant umiestnený u vstupu (Zdroj: NZOO Bojnice).

3.2. Specifikace telemetrických obojků

Aby telemetrické obojky boli pre zvieratá bezpečné, musia byť vyrobené z kvalitných materiálov s atestom, ale hlavne ich hmotnosť nesmie prekročiť 5 % hmotnosti daného zvieratá (Animal Ethics Committees, 2020). Hmotnosť dospelých jedincov mačky divej je 3–6 kg, u samcov to môže byť až 8 kg a teda hmotnosť obojku bude spĺňať toto najdôležitejšie kritérium. V rámci nášho projektu plánujeme nákup obojkov, ktorých hmotnosť neprekročí stanovenú hranicu (obr. 9). Obojky budú mať tzv. cotton strip (samovoľný rozpad časti remeňa), ktorý umožní ich

odpadnutie bez potreby opätovného odchyty. K odpadnutiu by malo dôjsť zhruba za jeden rok tak, aby bolo možné sledovať správanie sa zvieratá v priebehu jednotlivých ročných období (ročný domovský okrskok). Obojok bude po odpadnutí následne dohľadaný pomocou VHF signálu a odstránený z prírody (obr. 9).



Obr. 9 Telemetrický obojok od firmy Lotek vhodný pre monitoring mačky divej (vľavo); zameriavanie aktuálnej pozície zvieratá s využitím VHF signálu - na rovnakom princípe bude možné dohľadať aj odpojený obojok (vpravo).

3.3. Využití dat získaných telemetrickým sledováním

Je veľmi komplikované prijímať vhodné rozhodnutia týkajúce sa ochrany druhu, ak nepoznáme jeho základné ekologické nároky na prostredie. Informácie o tom, kde sa druh vyskytuje alebo sa môže vyskytovať, sú kľúčovými aspektmi v manažmente chráneného druhu a práve telemetrický monitoring označených jedincov je jedinou vhodnou metódou na zistenie detailných biotopových nárokov tohto druhu. Získané dáta poskytnú prvé podrobné poznatky o ekologických nárokoch daného druhu v oblasti Západných Karpát. Telemetrické údaje budú využité pri exaktnom modelovaní priestorových a biotopových nárokov mačky divej a ich výstupy budú využité pre efektívnejšiu ochranu druhu a vhodných biotopov. V rámci projektu sa predpokladá odchyt a označenie siedmich jedincov mačiek divých. Telemetrickými obojkami budú označené aj mačky divé z rehabilitačnej stanice v NZOO Bojnice pri ich opätovnom vypustení do prírody. Bude tak možné posúdiť úspešnosť ich rehabilitácie a prípadne ich zapojenie do reprodukcie v rámci autochtónnej západokarpatskej populácie mačky divej.

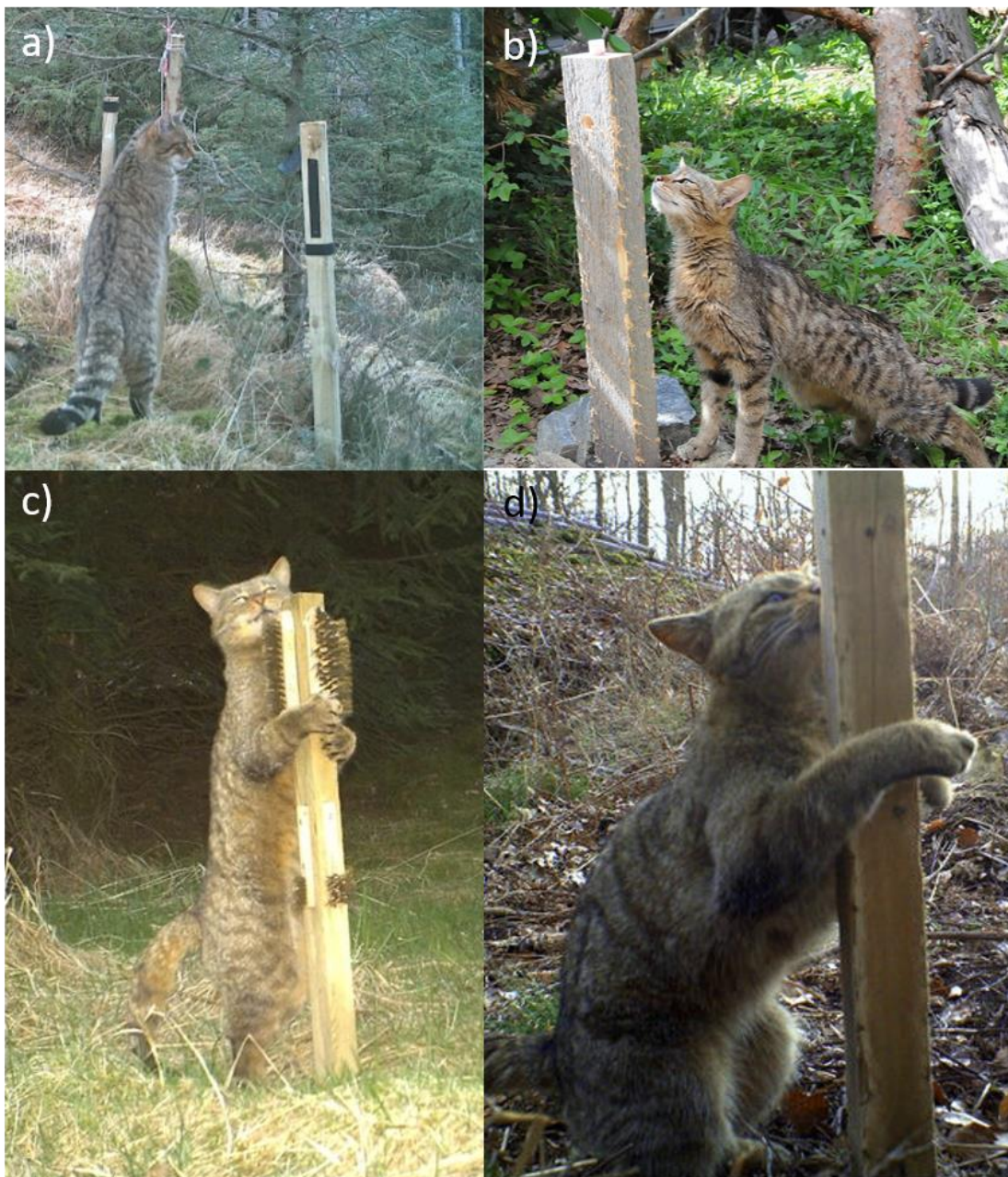
4. Chlupové pasti

Chlupové pasti jsou vhodným nástrojem, jak neinvazivně získat chlupy kočkovitých šelem, které dále slouží jako zdroj jejich DNA. Monitoring pomocí chlupových pastí (angl. *hair-trapping*) patří mezi standardně využívané neinvazivní metody monitoringu vhodné pro

studium genetické variability a prostorové aktivity kočkovitých šelem (Steyer et al. 2013, Zwijacz-Kozica et al. 2017).

4.1. Popis chlupové pasti

Nejčastěji jde o jednoduchá mechanická zařízení – dřevěné kůly se zářezy, které mohou být vybaveny kobercem, suchým zipem, hřebíky nebo jiným materiálem zvyšujícím pravděpodobnost uchycení co největšího počtu chlupů (obr. 10). Na tyto kůly se nanáší pachový atraktant, který u kočkovitých šelem vyvolává tzv. *rubbing behaviour*, tedy chování, při kterém se kočky o takto vnařené kůly, či jiné předměty otírají, a přitom zde zanechávají své chlupy. Genetický materiál je tak získáván bez přímého kontaktu s člověkem.



Obr. 10 Různé typy chlupových pastí používaných pro monitoring kočky divoké ve Skotsku (a), Rakousku (b) a Německu (c,d).

Chlupy kočkovitých (i jiných) šelem mohou být sbírány i z přirozených značkovacích míst (pařez, skála), ale objevení takového místa je obtížné a počet chlupů, které zde bývají nacházeny, je nízký. Chlupovou past je možné umístit kdekoliv, kde je objevena známka pohybu cílové šelmy, ať už pomocí fotopastí, nebo monitoringu pobytových znaků, tedy zejména stop. Jsou to např. ochozy zvěře, chodníčky kolem skalních převisů a podobně. Speciálně upravený kůl umožňuje zachycení většího počtu chlupů, což usnadňuje genetickou analýzu a navíc je možné tyto pasti vhodně rozmístit do prostředí a tím získat informace o prostorové aktivitě konkrétních jedinců identifikovaných na základě jejich genotypů. V případě využití fotopasti umístěné v blízkosti chlupové pasti, je možné propojit genotyp daného jedince s jeho vzhledem a tím získat ještě více informací o konkrétním jedinci, případně o příbuznosti monitorovaných jedinců (např. vodící samice s mláďaty).

Při dostatečném počtu terénních spolupracovníků je možné rozmístit na zkoumaném území velký počet chlupových pastí a získat tak vzorky z rozsáhlého území. Tato zařízení sama o sobě nejsou finančně náročná, mnohem víc financí vyžaduje jejich opakovaná kontrola, obzvlášť pokud jsou rozmístěna na velkém území.

4.2. Atraktanty

Některé chemické látky působí na kočkovité šelmy jako pachové atraktanty a vyvolávají u nich reakci ve formě otírání se o předmět napuštěný danou látkou ve snaze ho přeznačit nebo dotýčný pach dostat na sebe. Jako atraktanty jsou nejčastěji využívány výtažky ze dvou rostlin: ze šanty kočičí (*Nepeta cataria*; slovensky kocúrnik obyčajný) a z kozlíku lékařského (*Valeriana officinalis*; slovensky valeriána lekárska). Kýžený efekt mají i sušené části těchto rostlin, ale pro účely monitoringu je potřebné, aby pach těchto látek vydržel co nejdéle, byl intenzivní a také aby látka, která se použije, co nejlépe odolávala vlhkosti, ať už v podobě deště, sněhu, nebo rosy. Proto se nejčastěji využívá metoda destilace účinných látek, nebo jejich výluh do pomocných látek olejovitého charakteru (olej, glycerín apod.). V rámci projektu jsme testovali oba zmíněné rostlinné atraktanty. Nejdříve byla reakce testována na domácích kočkách (obr. 11).



Obr. 11 Testování pachových atraktantů na domácích kočkách (Zdroj: ÚBO AV ČR).

Následně byly v terénu na 16 místech rozmístěny dvojice kolíků (obr. 12), z nichž jeden byl vnađen kozlíkem (označen písmenem „K“) a druhý šantou (označen písmenem „S“). Kolíky byly od sebe vzdáleny dva až pět metrů, aby nedocházelo ke vzájemnému ovlivnění a následně se pomocí fotopastí sledovala reakce různých druhů zvířat. Jako více selektivní pro kočku divokou se ukázal kozlík lékařský, na šantu kočičí více reagovala i jiná zvířata, zejména lišky nebo medvědi (obr. 13), která pak chlupové pasti kontaminovala svými chlupy nebo je ničila. To je v souladu i s informacemi od kolegů z Německa (Carsten Nowak, *pers. comm.*).



Obr. 12 Instalace dvojice kolíků s různým atraktantem v Javorníkách, březen 2020 (Foto: Barbora Gajdárová).



Obr. 13 Záchyty jiných druhů savců u chlupových pastí (Zdroj: NZOO Bojnice, ÚBO AV ČR)

Některé předchozí výzkumy ukazují, že vlastnost reagovat na tyto atraktanty může být u jednotlivých zvířat nebo populací geneticky podmíněna, a ne všichni jedinci populace na atraktanty vhodným způsobem reagují. Dokonce to může být vlastnost celé studované populace (Anile et al. 2012). Naštěstí v podmínkách Západních Karpat se ukazuje, že minimálně některá zvířata pach těchto látek, zvláště kozlíku, přitahuje a chlupové pasti tak lze pro jejich neinvazivní monitoring využívat.

4.3. Metodika monitoringu pomocí chlupových pastí

DNA z neinvazivně získaných vzorků, a tedy i DNA z chlupů zachycených na chlupových pastech, má všeobecně nižší kvalitu, než je tomu u vzorků odebraných přímo z těla zvířete (krev, svalovina). DNA v průběhu času a vlivem klimatických podmínek (vyšší teplota zejména v letním období, vlhkost) postupně degraduje, proto je pro kvalitu izolované DNA důležité co nejdříve daný vzorek chlupů odebrat a vhodně zakonzervovat. Ideální je kontrolovat chlupové pasti v zimním období jednou za týden, maximálně jednou za dva týdny a v průběhu vegetační sezóny i častěji.

Úspěšnost chlupových pastí závisí na sezóně. Vzhledem ke kvalitě DNA je nejvhodnější chladná část roku, především období říje, kdy je patrná větší prostorová aktivita jedinců. Další faktor, který úspěšnost ovlivňuje, je logicky také početnost populace. V početnějších populacích je šance získání vzorku vyšší, ale také hrozí vyšší pravděpodobnost kontaminace chlupové pasti, a tedy i odebrané vzorky, více jedinci.

U vzorků z chlupových pastí existuje relativně vysoké riziko kontaminace. Nelze vyloučit, že se v odebraném vzorku nacházejí chlupy dvou nebo více jedinců, kteří se o chlupovou past v průběhu krátkého časového intervalu otírali. Ke kontaminaci může také dojít, když se o chlupovou past otře zvíře jiného druhu, nebo k ní může dojít náhodně, např. přenosem chlupů z kolemjdoucího zvířete. Ideální je proto umístění fotopasti v blízkosti chlupové pasti, čímž lze sledovat kolik jedinců se u chlupové pasti mezi kontrolami vystřídal. Dále při odběru a novém vnazení kůlu je potřebné chlupovou past důkladně očistit, aby na ní nezůstaly chlupy z předchozího období.

Na základě experimentu s pachovými atraktanty, provedeného v první fázi projektu, jsme se rozhodli využívat pro monitoring kočky divoké kozlík lékařský. V rámci extenzivního monitoringu spojeného s extenzivním fotomonitoringem jsme umístili 40 chlupových pastí na místa pokrytá fotopastmi. Dřevěné kolíky byly o rozměrech 5 x 4 x 80 cm a jejich povrch byl zdrsňen zářezy (obr. 14). Funkčnost chlupových pastí již byla odzkoušena, byly získány první chlupové vzorky divokých koček a po jejich následné genetické analýze genotypování první jedinci.



Obr. 14 Chlupové pasti využité pro monitoring kočky divoké v rámci projektu Felis SKCZ (Foto: Jarmila Krojerová).

Pro intenzivní fázi monitoringu je plánováno využití ve dvou referenčních územích v každém po 50 chlupových pastí, přičemž budou rozmístěny v každém druhém kvadrátu o velikosti 1 x 1 km, zhruba u poloviny bude umístěna fotopast. Dle zahraničních prací se jako nejvhodnější jeví sezona prosinec až květen (Steyer et al. 2013), ideálně hned po roztátí sněhové pokrývky.

Pastí budou umístěny na základě předchozích informací o výskytu kočky, tj. informací z terénního monitoringu pobytových stop a z extenzivního fotomonitoringu, a dle zkušeností o prostorových a habitatových nárocích daného druhu. Umístění se bude přizpůsobovat sezóně, informacím o nových místech výskytu a podobně. Pastí budou pravidelně kontrolovány (v zimě maximálně dvoutýdenní interval, ve vegetační sezóně maximálně 5 dní). Při kontrole bude odebrán případný genetický materiál dle instrukcí uvedených níže, kolík bude důkladně očištěn od všech chlupů (může být i opálen) a bude nanesen nový atraktant. V případě poškození nebo ztráty bude instalována náhradní chlupová past.

5. Genetické analýzy

Genetické analýzy vzorků jsou v dnešní době běžnou, v případě vzácných a ohrožených druhů, dokonce nezbytnou součástí managementových a ochranných opatření. Získaná data se dají využít nejen pro potvrzení přítomnosti sledovaného druhu, ale také pro identifikaci jedinců, sledování jejich prostorové aktivity, odhalení příbuzenských vztahů, či k odhadům početnosti populace. Dalším důležitým cílem genetických analýz je zjištění populačně-genetických parametrů, jako je genetická variabilita a struktura dané populace, pro vyhodnocení míry rizika ohrožení životaschopnosti populace z důvodu nízké genetické variability, příbuzenského křížení a hybridizace.

Pro analýzy je možné využít nejen tkáň živočicha, ale také jakýkoliv biologický materiál, který za sebou živočich zanechá při pohybu v terénu a který obsahuje buňky s DNA (Carroll et al. 2018). Mezi tyto tzv. neinvazivní genetické vzorky patří například vzorky chlupů, kde se DNA získává z chlupových kořínků, nebo vzorky trusu, či moči, kde se DNA nachází v buňkách odloupených z epitelu střeva, nebo močových cest. Takto získané vzorky mají velkou výhodu v tom, že při jejich odběru není nutný přímý kontakt zvířete s člověkem a zvíře tak není stresované. Navíc, v případě výzkumu málo početných a skrytým způsobem žijících druhů, jde často o jedinou možnost, jak získat genetický materiál. Na druhé straně, nevýhodou neinvazivně získaných vzorků DNA je nízká koncentrace a kvalita obsažené DNA, která vlivem působení povětrnostních podmínek (především vyšší teplota a vlhkost), dále v terénu degraduje. Proto je důležité těmto problémům předcházet tím, že se vzorky sbírají co nejčerstvější, a to především v zimním období, kdy je DNA více chráněná nízkou teplotou, vhodně se uskladní a při analýze v laboratoři se dále využívají speciální postupy (např. multiple-tubes approach; Taberlet et al. 1996) za dodržení přísných opatření pro práci s citlivým materiálem (speciálně vybavená laboratoř pro práci s neinvazivními nebo forenzními vzorky, speciální materiálové vybavení např. filtry špičky a podobně). Neinvazivní genetické vzorky je možné získat především při monitoringu pobytových znaků studovaného druhu, například při sledování stopní dráhy jedince na sněhové pokrývce nebo cíleně, například s použitím chlupových pastí.

Pracovníci ÚBO AV ČR se věnují analýzám neinvazivních genetických vzorků chráněných druhů šelem již od roku 2011, kdy se začali věnovat výzkumu a monitoringu velkých šelem v oblasti CHKO Beskydy. Od této doby zde zanalyzovali velké množství neinvazivně získaných vzorků v rámci celé ČR, Slovenska ale i z dalších oblastí Evropy. Vzorky kočky divoké/domácí budou získávány podobným způsobem jako vzorky velkých šelem v rámci předchozích projektů a z části tak budou využity již získané zkušenosti, které se budou moci modifikovat pro nově zkoumaný druh.

5.1. Systematický sběr neinvazivních genetických vzorků kočky divoké

Sběr neinvazivních vzorků DNA bude probíhat v rámci monitoringu pobytových znaků v projektovém území, především v zimním období a s cílem získat co největší počet vzorků. Budou se sbírat vzorky trusu nebo moči nalezené při sledování stopní dráhy zvířete a vzorky chlupů zachycených na instalovaných chlupových pastech, případně na vegetaci, či nalezené při ohledávání značkovacích míst jako jsou skalky, vývraty, pařezy atd. Dále se budou zpracovávat vzorky tkání z nalezených kadáverů (např. po srážce s dopravním prostředkem), nebo vzorky tkání získané z muzejních sbírek. Analýza sbírkového muzejního materiálu pomůže zjistit, jakými změnami populace koček divokých prochází v čase a také umožní zjistit, zda k hybridizaci s kočkou domácí dochází nejen dnes ale i v minulosti. Z takto získaných vzorků se bude DNA izolovat pomocí komerčně dostupných izolačních kitů (Qiagen Mini Stool Kit – izolace DNA z trusu, Geneaid Genomic DNA Mini Kit – izolace DNA z tkání, chlupů a moči).

Sběr a dokumentace nálezů

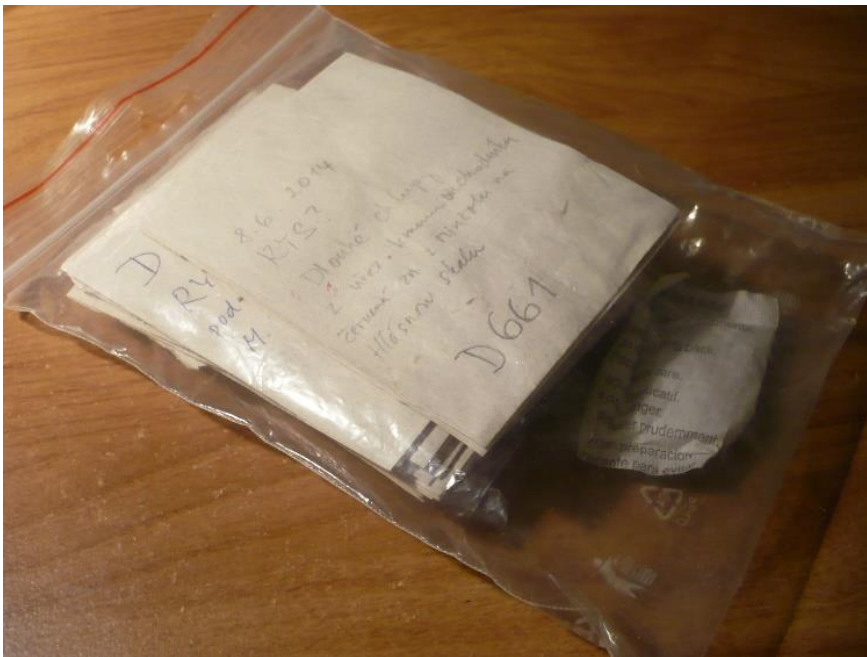
- každý nalezený vzorek bude opatřen GPS souřadnicemi místa nálezu, názvem lokality, datem a jménem nálezce
- nalezený vzorek bude zdokumentován pomocí fotografií s měřítkem a spolu s informacemi uvedenými výše vložen do databáze selmy.cz
- vzorek bude odebrán do odběrové nádoby (trus, moč), nebo papírového sáčku (chlupy) pomocí jednorázových latexových rukavic, sterilizované pinzety (omýt alkoholem/opálit), nebo větvičky, aby se zamezilo riziko kontaminace vzorku cizorodou DNA, nebo DNA z jiného vzorku.

Neinvazivní genetické vzorky

a) chlupy

- nalezené chlupy, nebo chomáče srsti budou odebrány do papírového sáčku (nedotýkat se konců chlupů holýma rukama)
- sáček bude označen jménem nálezce, lokality, datem a GPS souřadnicemi

- uzavřený papírový sáček bude vložen do igelitového pytlíku s trochou silikagelu (odvádí vlhkost ze vzorků a tím konzervuje DNA; obr. 15); do jednoho takového igelitového pytlíku se může vložit i několik dobře uzavřených papírových sáčků
- silikagelem konzervované chlupy je vhodné skladovat na suchém, tmavém místě za pokojové teploty nebo vložit do mrazničky
- v případě, že není k dispozici silikagel, je možné chlupy zamrazit, nebo dát do platové nádoby a zalít 96% alkoholem, případně ponechat v papírovém sáčku za pokojové teploty na tmavém a suchém místě (avšak ne na moc dlouhou dobu)



Obr. 15 Vzorky chlupů uložené v dobře uzavřených papírových sáčcích společně umístěné v plastovém zip sáčku se silikagelem (Foto: Barbora Gajdárová).

b) trus

- odebrat trus celý, anebo co největší jeho část (obr. 16)
- trus odebrat přímo do plastové nádoby, zakoupené v rámci projektu, případně do igelitového sáčku
- nádoba/sáček bude označen jménem nálezce, názvem lokality, datem a GPS souřadnicemi
- po návratu z terénu je vhodné vzorek co nejdříve zamrazit; pokud byl vzorek odebrán do plastových nádobek s čistým 96% etanolem (**nepoužívat denaturovaný!**), pak lze skladovat na chladném a tmavém místě (lednice, sklep)
- pro genetické analýzy odebírat vzorky (pokud lze určit), které vypadají relativně čerstvě (tmavý, vlhký trus); suchý, vyblednutý a rozpadající se trus není pro analýzy vhodný



Obr. 16 a) odebrání vzorku trusu v terénu, b) zpracování trusu v laboratoři (Foto: Barbora Gajdárová).

c) moč

- pro analýzu DNA je možné využít i moč zvířete; v případě takového nálezu je vhodné odebrat vrstvu sněhu (i mech nebo trávu apod.), kde se nachází nejkonzentrovanejší část kontaminovaná močí a umístit do plastové nádoby, která bude označena jménem nálezce, názvem lokality, datem a GPS souřadnicemi
- ideální je vzít jen ten sníh, kde je moč nejkonzentrovanejší (nejvýrazněji zbarvená), aby nedošlo k přílišnému naředění sněhem, tedy lepší je objemově menší, ale koncentrovanejší vzorek

5.2. Zpracování získaných vzorků a jejich hodnocení

V rámci projektu Felis SKCZ byla zoptimalizována (složení multiplexů a podmínky amplifikace v rámci PCR) sada 20 jaderných markerů – mikrosatelitů, vhodná pro genotypizaci vzorků kočky divoké. Byly využity primery popsané pro čeleď Felidae s přihlédnutím na to, které markery jsou pro kočku divokou používané v okolních zemích, hlavně v Německu, aby bylo možné srovnání výsledků a případná další spolupráce.

Kombinace těchto lokusů je pro každého jedince unikátní („genetický otisk prstu“). Pro určení pohlaví bude využíván úsek genu pro amelogenin, který je vázán na pohlavní chromozomy a je úspěšně využíván i u příbuzného rysa ostrovida (Krojerová-Prokešová et al. 2019).

U analýzy neinvazivních vzorků bude využíván tzv. „multiple-tubes approach“, tj. amplifikace jednotlivých lokusů bude několikrát opakovaná (2–8x) za účelem potvrzení správnosti amplifikovaných alel (Taberlet et al. 1996). Jde o standardně využívanou metodu při práci s neinvazivně získanými genetickými vzorky, u kterých je kvalita izolované DNA nízká a hrozí větší nebezpečí kontaminace mezi vzorky a případných replikačních chyb v průběhu PCR (nulové alely, falešné alely, atd.). Získaná genetická data budou analyzována pomocí moderních softwarových nástrojů vhodných pro populační, ochranářskou a krajinnou genetiku. Pomocí neinvazivního genetického vzorkování bude možné zjistit genetickou variabilitu populace, její pohlavní strukturu, možnou strukturovanost, naznačující přítomnost migračních bariér ve zkoumané oblasti. Identifikace jednotlivých jedinců a jejich zpětné záchyty umožní

studovat jejich prostorovou aktivitu a odhadnout početnost populace za pomoci moderních CMR (capture-recapture) metod uzpůsobených na analýzu genetických dat (např. package CAPWIRE; Miller et al. 2005).

V rámci této aktivity bude také vytvořena databáze jedinců, která bude sloužit k jejich identifikaci (porovnávání genotypů) v budoucnu. V rámci projektu Felis SKCZ je plánována analýza cca 500 vzorků jako statisticky signifikantního základního souboru potřebného pro analýzu dat dle výše uvedených bodů a také pro analýzu hybridizace s kočkou domácí (viz. kapitola 5.5). Při práci s mikrosatelity je rovněž důležité analýzu uskutečnit v jedné laboratoři s použitím stejné chemie a stejného analyzátoru (sekvenátoru). V případě využití několika laboratoří je potřebná vzájemná kalibrace délkového polymorfismu analyzovaných lokusů, nakolik odečtená délka alel může být posunuta až o ± 5 bází.

Prvním krokem v analýze DNA je její izolace. V laboratoři je pomocí speciálních chemikálií (tzv. izolačních kitů) ze vzorku extrahována DNA (obr. 17). Stěny buněk jsou nejdříve rozloženy pomocí enzymu proteináza K, čímž se do roztoku dostane DNA. Následně jsou z roztoku pomocí speciálních pufrů (čistidel) odstraněny jiné organické látky, hlavně tuky a bílkoviny. Extrahovaná DNA je uskladněna v speciálním pufru nebo dvakrát denaturované vodě (ddH₂O) a uchovávána v mrazničce při teplotě -20 °C, při dlouhodobém skladování při teplotě -80 °C a připravená na další analýzu.



Obr. 17 Všechno potřebné pro izolaci DNA (Foto: Peter Vallo).

Další krok představuje polymerázová řetězová reakce (anglicky „*polymerase chain reaction*“, PCR), pomocí které jsou mnohonásobně zmnoženy vybrané úseky DNA. PCR umožňuje získat velké množství kopií analyzovaného úseku DNA.



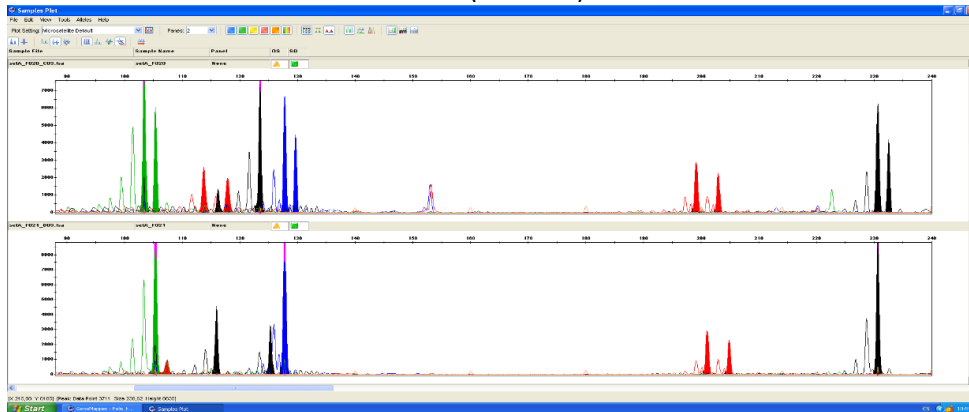
Obr. 19 Sekvence mitochondriální DNA v programu Sequencher (Zdroj: Jarmila Krojerová).

5.4. Analýza mikrosatelitů

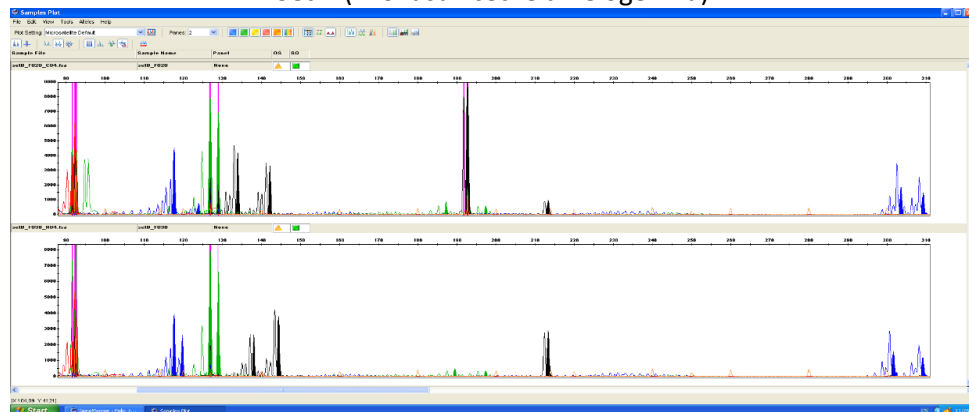
Analýza mikrosatelitů se využívá pro zjištění genetické variability a identifikaci konkrétních jedinců. Mikrosatelity jsou tandemově se opakující úseky jaderné DNA o délce 2–6 bp. Mikrosatelity mají velký význam v populačně-genetických studiích, protože se nacházejí v DNA všech obratlovců a díky vysokému polymorfizmu (variabilitě) patří k nejpoužívanějším genetickým markerům. V populačně-genetických studiích je možné s jejich pomocí určit míru hybridizace, tok genů v populaci a příbuzenské vztahy mezi jedinci. V ochrannářském výzkumu pomáhají odhalit míru izolace zkoumaných populací (u izolovaných nebo málopočetných populací může díky fixaci škodlivých mutací docházet k významnému snížení životaschopnosti dané populace). U chráněných a skrytých způsobem žijících druhů je zároveň pomocí analýzy mikrosatelitů možné identifikovat přímo konkrétní jedince žijící na daném území, a získat tak informaci o početnosti populace, o prostorové aktivitě jednotlivých zvířat a o její sociální struktuře (poměr pohlaví, míra disperze, filopatrie, reprodukční úspěšnost).

Pro rozpoznání jednotlivých jedinců je potřebné analyzovat větší počet polymorfních mikrosatelitových lokusů (obvykle minimálně 10). Primery použité pro amplifikaci jednotlivých mikrosatelitů v projektu Felis SKCZ jsou fluorescenčně značeny čtyřmi různými barvami – červená (PET), zelená (VIC), modrá (FAM) a žlutá (NED). Kombinace různých barev a různých délek analyzovaných lokusů umožňuje amplifikaci několika lokusů ve společné PCR reakci (multiplex), čímž se snižují náklady na analýzu. V rámci projektu Felis SKCZ byla optimalizována sada 24 lokusů a genu pro amelogenin, které jsou amplifikovány ve čtyřech multiplexech – set A, B, C a D (obr. 20). Lokusy byly vybrány dle práce Menotti-Raymond et al. (1999) dle toho, které lokusy jsou využívány pro genotypizaci kočky divoké v okolních zemích (Steyer et al. 2013) nebo při výzkumu rysa (Krojerová-Prokešová et al. 2019) tak, aby bylo možné data porovnat. Mikrosatelitový polymorfismus (jednotlivé alely lišící se svou délkou) je analyzován pomocí fragmentační analýzy na sekvenátoru UBO AV ČR na detašovaném pracovišti ve Studenci.

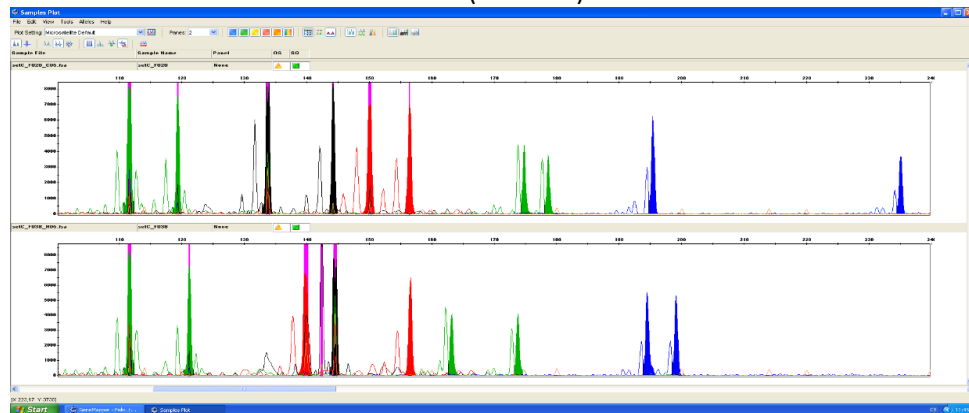
Set A (6 lokusů)



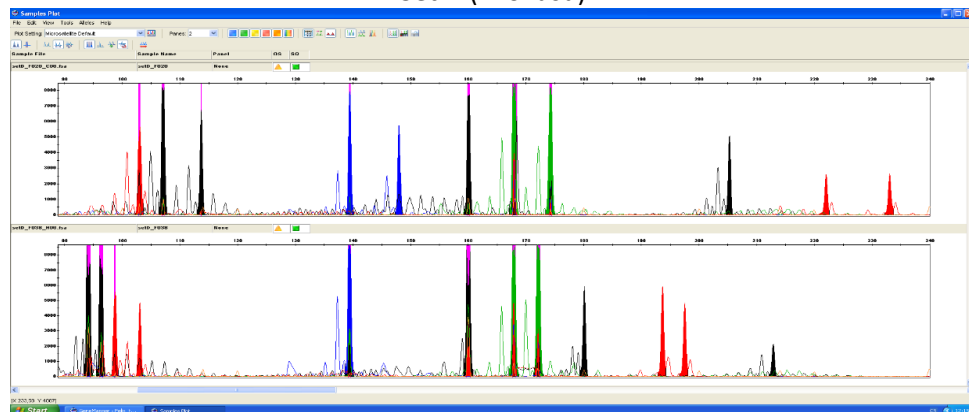
Set B (7 lokusů včetně amelogeninu)



Set C (5 lokusů)

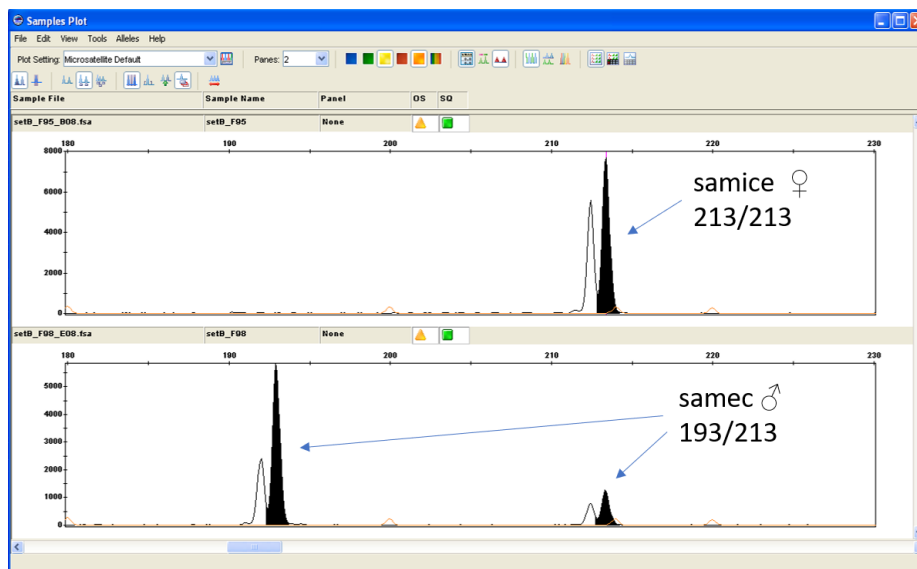


Set D (7 lokusů)



Obr. 20 Délkový polymorfismus 24 mikrosatelitů a amelogeninu amplifikovaných ve čtyřech multiplexech u dvou jedinců kočky divoké v programu Genemapper (Zdroj: Jarmila Krojerová).

Pro zjištění pohlaví jednotlivých jedinců je využíván genetický marker amplifikovaný v rámci genu pro amelogenin. Délka tohoto markeru se liší mezi X a Y chromozómem. V případě samice je u jedince přítomna jen jedna alela na chromozomu X, u samce jsou přítomny obě alely – jak alela na chromozomu X, tak alela na chromozomu Y (obr. 21).



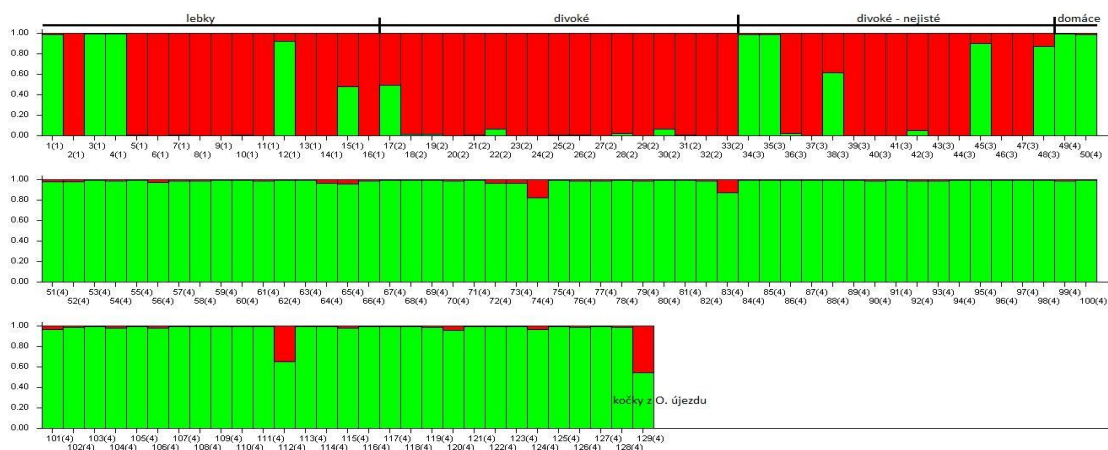
Obr. 21 Pohlaví dvou jedinců kočky divoké (nahore samice, dole samec) stanoveno pomocí Amelogeninu (Zdroj: Jarmila Krojerová).

5.5. Analýza hybridizace kočky divoké s kočkou domácí

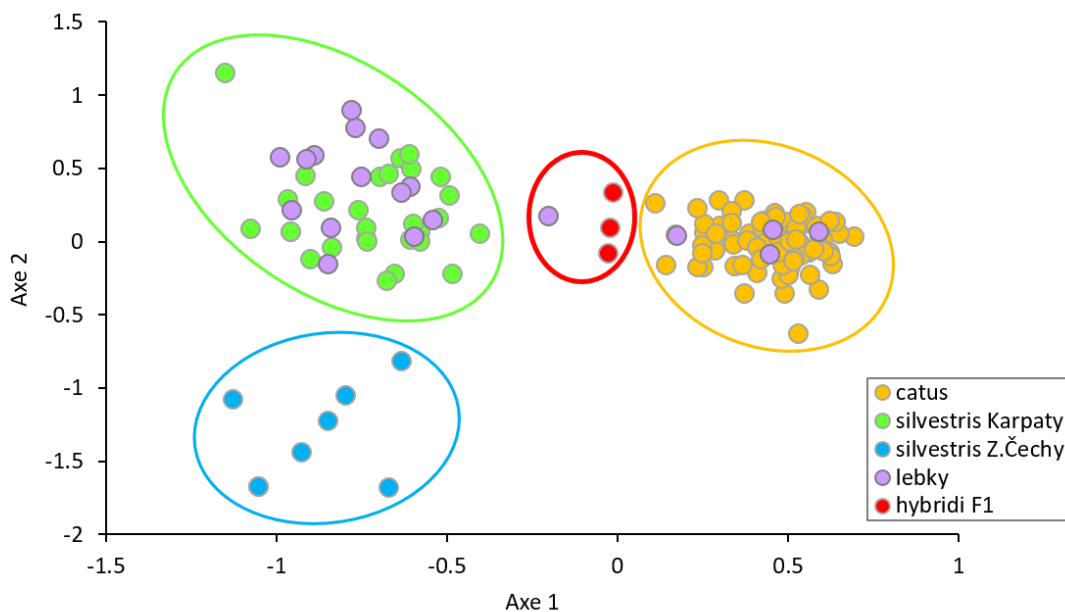
Populaci kočky divoké v Evropě ohrožuje kromě ztráty a fragmentace habitatu především hybridizace s kočkou domácí (Pierpaoli et al. 2003, Driscoll et al. 2011). Morfometrická měření lebek nebo rozlišování druhů na základě zbarvení srsti (počet a pozice pruhů v oblasti zad, na bocích a na ocasu; Kitchener et al. 2005), jsou v případě hybridních jedinců obtížně využitelné. Ani na Slovensku, ani v České Republice dosud neprobíhal systematický neinvazivní genetický monitoring tohoto druhu, přitom je to jediná možnost, jak identifikovat hybridní jedince s kočkou domácí. Přítomnost takovýchto hybridů dokládají nedávno publikované výsledky z Německa nebo Skotska (Steyer et al. 2013, 2016, 2018, Beutel et al. 2017). Dosavadní monitoring tohoto druhu byl závislý zejména na přímých pozorováních, kadáverech nalezených na silnicích, dotazníkových šetřeních, jen v menší míře se na něm podílely i fotopasti (Pospíšková et al. 2013, Mináriková et al. 2015).

Různé studie v rámci Evropy, které se zabývaly problematikou hybridizace koček, se ve svých výsledcích významně liší. Například v Maďarsku (Beaumont et al. 2001) a Skotsku (Pierpaoli et al. 2003) bylo zjištěno, že populace kočky divoké jsou výrazně ovlivněny hybridizací s domácími kočkami („hybridní roje“), v jiných evropských zemích jsou naopak populace divokých koček relativně nedotčené, např. v Německu bylo identifikováno v populaci jen 3,5 % hybridů (Steyer et al. 2016, 2018). V sousedním Polsku ve Vysokých Tatrách zase nedávný průzkum ukázal, že se na území parku kočka divoká pravděpodobně vůbec nevyskytuje (Zwijacz-Kozica et al. 2017).

Právě situace v okolních zemích, jako je Polsko a Maďarsko, poukazuje na nutnost co nejdříve zjistit, v jakém stavu je populace kočky divoké v Západních Karpatech, které představují významné refugium i pro velké druhy evropských šelem. Pro analýzu míry hybridizace využijeme soubor 20 mikrosatelitových lokusů a také soubor srovnávacích vzorků získaných z domácích koček ve spolupráci s chovateli a veterináři. Pro identifikaci hybridních jedinců F1 a F2 generace využijeme Bayesiánskou klastrovací analýzu v programu STRUCTURE a faktoriální korespondenční analýzu (FCA) v programu Genetix, které jsou schopny identifikovat kočku divokou, kočku domácí a jejich vzájemné hybridy na základě rozdílné frekvence jednotlivých alel. Tento postup byl již na prvních analyzovaných vzorcích úspěšně otestován a byly identifikováni i první hybridní jedinci (obr. 22, 23).



Obr. 22 Výstup z programu Structure pro K=2 (červený klastř – kočka divoká, zelený klastř – kočka domácí). Každý sloupec odpovídá jednomu zvířeti, barva u jednotlivých sloupců odpovídá pravděpodobnosti, se kterou daný jedinec přísluší k danému klastřu (Zdroj: Jarmila Krojerová).



Obr. 23 Faktoriální korespondenční analýza (FCA) v programu Genetix znázorňuje genetickou podobnost jedinců. Zřetelně je oddělen klastř domácích koček, hybridů i divoké kočky patřící do dvou oddělených linií - karpatské a středoevropské/německé (Zdroj: Jarmila Krojerová).

Literatura

- Anile S., Amico C., Ragni B. 2012. Population density estimation of the European wildcat (*Felis silvestris silvestris*) in Sicily using camera trapping. *Wild. Biol. Pract.* 8(1): 1–12.
- Anile S., Arrabito C., Mazzamuto M.V., Scornavacca D., Ragni B. 2012. A non-invasive monitoring on European wildcat (*Felis silvestris silvestris* Schreber, 1777) in Sicily using hair trapping and camera trapping: does it work? *Hystrix It. J. Mamm.* 23(2):45–50.
- Anile S., Ragni B., Randi E., Mattucci F., Rovero F. 2014. Wildcat population density on the Etna volcano, Italy: A comparison of density estimation methods. *J. Zool.* 293(4): 252–261.
- Animal Ethics Committees (AECs) 2020, Animal Research Review Panel Guideline 9: <https://www.animaethics.org.au/policies-and-guidelines/wildlife-research/radio-tracking>
- Beaumont M., Barratt E.M., Gottelli D., Kitchener A.C., Daniels M.J., Pritchard J.K., Bruford M.W. 2001. Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Mol. Ecol.* 10: 319–336.
- Beutel T., Reineking B., Tiesmeyer A., Nowak C., Heurich M. 2017. Unexpected detection of the European wildcat (*Felis silvestris silvestris*) in the Bavarian Forest National Park: spatial patterns of co-occurrence with the domestic cat (*Felis silvestris catus*). *Wildl. Biol.* doi: 10.2981/wlb.00284.
- Biró Z., Lanszki J., Szemethy L., Heltai M., Randi E. 2005. Feeding habits of feral domestic cats (*Felis catus*), wild cats (*Felis silvestris*) and their hybrids: trophic niche overlap among cat groups in Hungary. *J. Zool.* 266: 187–196.
- Carroll E.L., Bruford M.W., DeWoody J.A., Leroy G., Strand A., Waits L., Wang J. 2018. Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods. *Evol. Appl.* 11(7): 1094–1119.
- Daniels M.J., Beaumont M.A., Johnson P.J., Balharry D., Macdonald D.W., Barratt E. 2001. Ecology and genetics of wild-living cats in the North-East of Scotland and the implications for the conservation of the wildcat. *J. Appl. Ecol.* 38: 146–161.
- Driscoll C., Yamaguchi N., O'Brien S.J., Macdonald D.W. 2011. A Suite of Genetic Markers Useful in Assessing Wildcat (*Felis silvestris* ssp.) — Domestic Cat (*Felis silvestris catus*) Admixture. *J. Hered.* 102 (Suppl 1): S87–S90. doi: 10.1093/jhered/esr047
- Duľa M., Kalaš M., Hrdý L., Flajs T., Drengubiak P., Kutal M, 2017: Recentný výskyt a reprodukcia rysa ostrovida (*Lynx lynx*) v CHKO Kysuce a NP Malá Fatra. Pp.: 75–78. In: Kalaš M. & Kicko J. (eds.): Zborník z konferencie “Výskum a ochrana Malej Fatry”. Fatranský spolok, Varín, 100 pp.
- Duľa M., Váňa M., Dekař P., Bojda M., Kutal M. 2019. Recentní záznamy kočky divoké (*Felis silvestris*) na česko-slovenském pomezí. *Acta Carpathica Occidentalis* 10: 86–90.
- Eichholzer A. 2010. Testing the applicability of pictures taken by camera-traps for monitoring the European wildcat *Felis silvestris silvestris* in the Jura Mountains of Switzerland. Thesis, University of Zürich, Switzerland. –37 pp.
- Efford M.G. 2011 secr – spatially explicit capture-recapture in R. R package version 2.1.0. (<https://CRAN.R-project.org/package=secr>).
- Foster R.J., Harmsen B.J. 2012 A critique of density estimation from camera-trap data. *J. Wildl. Manage.* 76: 224–236.
- Fuller M.R., Millsbaugh J.J., Church K.E., Kenward R.E. 2005. Wildlife radiotelemetry. In: Braun, C. E. (ed.), *Techniques for Wildlife Investigations and Management*. 6th Edition. The Wildlife Society, Bethesda, Maryland, USA. Pp. 377–417.
- Gopaldaswamy A. M., Royle J. A., Hines J. E., Singh P., Devcharan J., Kumar N. S. & Karanth K. U. 2012: Program SPACECAP: software Example files for estimating animal density using spatially explicit capture-recapture models. *Methods Ecol. Evol.* 3: 1067–1072.
- Götz, M., Jerosch, S., Simon, O., Streif, S. 2018. Raumnutzung und Habitatansprüche der Wildkatze in Deutschland. *Die Wildkatze in Deutschland. Natur und Landschaft* 93 (4): 04.

- Jerosch S., Götz M., Roth M. 2017. Spatial organisation of European wildcats (*Felis silvestris silvestris*) in an agriculturally dominated landscape in Central Europe. *Mamm. Biol.* 82: 8–16. doi: [10.1016/j.mambio.2016.10.003](https://doi.org/10.1016/j.mambio.2016.10.003)
- Kilshaw K., Johnson P.J., Kitchener A.C. MacDonald D.W. 2015. Detecting the elusive Scottish wildcat *Felis silvestris silvestris* using camera trapping. *Oryx* 49(2): 207–215.
- Kilshaw K., Macdonald D.W. 2011. The use of camera trapping as a method to survey for the Scottish wildcat. Scottish Natural Heritage Commissioned Report No. 479.
- Kitchener A.C., Yamaguchi N., Ward J.M., Macdonald D.W. 2005. A diagnosis for the Scottish wildcat (*Felis silvestris*): a tool for conservation action for a critically-endangered felid. *Animal Conserv.* 8: 223–237.
- Klar N., Fernández N., Kramer–Schadt S., Herrmann M., Trinzen M., Büttner I., Niemitz C. 2008. Habitat selection models for European wildcat conservation. *Biol. Conserv.* 141: 308–319.
- Krojerová J., Barančková M., Turbaková B., Homolka M., Koubek P., Kotal M., Duřa M., Slamka M., Bučko J., Sedliak M., Slamka M., Bučko J., Sedliak M., Sujová K. 2018. Spoločná cezhraničná metodika monitoringu veľkých šeliem. INTERREG V-A SK-CZ NFP304020D016 Koordinácia ochrany, monitoringu a manažmentu západokarpatskej populácie vlka dravého a rysa ostrovida na česko-slovenskom pomedzí (Šelmy SKCZ), 24pp.
- Krojerová J., Barančková M., Turbaková B., Homolka M., Koubek P., Kotal M., Duřa M., Bojda M., Slamka M., Bučko J., Sedliak M., Sujová K., Záhorec L., Hletko M. 2019. Štúdiá s odporúčaniami pre starostlivosť o veľké šelmy v cezhraničnom regióne SR-ČR. INTERREG V-A SK-CZ 304021D016 Koordinácia ochrany, monitoringu a manažmentu západokarpatskej populácie vlka dravého a rysa ostrovida na česko-slovenskom pomedzí Šelmy SKCZ, 85pp.
- Kropil R., Smolko P., Kubala J. 2015. Komplexné zisťovanie stavu populácie mačky divej (*Felis silvestris*) na Slovensku. Technická univerzita vo Zvolene, Zvolen, Slovensko, 75pp.
- Kotal M., Belotti E., Volfová J., Mináriková T., Buřka L., Poledník L., Krojerová J., Bojda M., Váňa M., Kotalová L., Beneš J., Flousek J., Tomášek V., Kafka P., Poledníková K., Pospíšková J., Dekar P., Machcinik B., Koubek P., Duřa M. 2017a: Výskyt veľkých šelem – rysa ostrovida (*Lynx lynx*), vlka obecného (*Canis lupus*) a medveďa hnědého (*Ursus arctos*) – a kočky divoké (*Felis silvestris*) v České republice a na západním Slovensku v letech 2012–2016 (Carnivora). *Lynx*, n. s. (Praha) 48: 93–107.
- Kotal M., Bolfiková Černá B., Duřa M., Kotalová L., Bojda M., Kalaš M., Flajs T., Hrdý L., Drengubiak P., Nowak S., Myslajek R., Figura M., Hulva P., 2017b: Recentní výskyt a dynamika vlka obecného (*Canis lupus*) v Západních Karpatech. Pp.: 79–83. In: Kalaš M. & Kicco J. (eds.): Zborník z Konferencie “Výskum a ochrana Malej Fatry”. Fatranský spolok, Varín, 100 pp.
- Krüger M., Hertwig S.T., Jetschke G., Fischer M.S. 2009. Evaluation of anatomical characters and the question of hybridization with domestic cats in the wildcat population of Thuringia, Germany. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 47: 268–282.
- Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, Modi W, O'Brien SJ. 1994. Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J. Mol. Evol.* 39(2): 174–190.
- Lozano J., Virgós E., Malo A.F., Huertas D.L., Casanovas J.G. 2003. Importance of scrub-pastureland mosaics on wild-living cats occurrence in a Mediterranean area: implications for the conservation of the wildcat (*Felis silvestris*). *Biodivers. Conserv.* 12: 921–935.
- Maronde L., Zimmermann F., Kunz F., Breitenmoser-Würsten C. H., Breitenmoser U. 2020a. Bestimmungshilfe zur Unterscheidung von Wild- und Hauskatzen anhand von Fotofallenbildern aus dem Schweizer Jura. KORA Bericht Nr. 92, KORA, Muri bei Bern, Schweiz, 18 pp.

- Maronde L., McClintock B.T., Breitenmoser U., Zimmermann F. 2020b Spatial capture–recapture with multiple noninvasive marks: An application to camera trapping data of the European wildcat (*Felis silvestris*) using R package multmark. *Ecol. Evol.* 10: 13968–13979.
- Menotti-Raymond M., David V.A., Lyons L.A., Schaffer A.A., Tomlin J.F., Hutton M.K., O'Brien S.J. 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57(1): 9–23. doi: [10.1006/geno.1999.5743](https://doi.org/10.1006/geno.1999.5743)
- Miller C.R., Joyce P., Waits L.P. 2005. A new method for estimating the size of small populations from genetic mark—recapture data. *Mol. Ecol.* 14: 1991–2005.
- Mináriková T., Poledníková K., Bufka L., Belotti E., Romportl D., Dietz S., Pavanello M., Munne S., Poledník L. 2015. Výskyt středně velkých a velkých lesních savců v jižních a jihozápadních Čechách (Carnivora, Artiodactyla, Lagomorpha). *Lynx*, n. s. (Praha) 46: 43–64.
- Molinari-Jobin A., Molinari P., Breitenmoser-Würsten C., Wölfl M., Stanisa C., Fasel M., Stahl P., Vandel J.-M., Rotelli L., Kaczensky P., Huber T., Adamic M., Koren I., Breitenmoser U. 2003. The pan-Alpine conservation strategy for the lynx. *Nat. Environ.* 130: 1–19.
- Pierpaoli M., Biro Z.S., Herrmann M. et al. 2003. Genetic distinction of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Europe, and hybridization with domestic cats in Hungary. *Mol. Ecol.* 12: 285–298.
- Pospíšková J., Kutal M., Bojda M., Bufková-Daniszová K., Bufka L. 2013. New records of *Felis silvestris* in the Czech Republic (Carnivora: Felidae). *Lynx*, n. s. (Praha) 44: 139–147.
- Pospíšková J. 2015: Rozšíření kočky divoké (*Felis silvestris*) v ČR / geomatické modelování a ekologický přístup. Diplomová práce, Příf UK, 88 pp.
- Sarmento P., Cruz J., Tarroso P., Fonseca C. 2006. Space and habitat selection by female European wild cat (*Felis silvestris silvestris*). *Wildl. Biol. Pract.* 2(2): 79–89.
- Silvy N.J., Lopez R.R., Peterson M.J. 2005. Wildlife marking techniques. In: *Techniques for wildlife investigations and management*. Bethesda, The Wildlife Society: 339–363.
- Steyer K., Simon O., Kraus R.H.S., Haase, P., Nowak, C. 2013. Hair trapping with valerian-treated lure sticks as a tool for genetic wildcat monitoring in low-density habitats. *Eur. J. Wildl. Res.* 59: 39–46.
- Steyer K., Kraus R., Mölich T., Anders O., Cocchiararo B., Frosch C., Geib A., Götz M., Herrmann M., Hupe K., Kohlen A., Krüger M., Müller F., Pir J., Reiners T., Roch S., Schade U., Schiefenhövel P., Siemund M., Simon O., Steeb S., Streif S., Streit B., Thein J., Tiesmeyer A., Trinzen M., Vogel B., Nowak C. 2016. Large-scale genetic census of an elusive carnivore, the European wildcat (*Felis s. silvestris*). *Conserv. Genet.* 17: 1183–1199.
- Steyer K., Tiesmeyer A., Muñoz-Fuentes V., Nowak C. 2018. Low rates of hybridization between European wildcats and domestic cats in a human-dominated landscape. *Ecol. Evol.* 8: 2290–2304.
- Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N. et al. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Res.* 26: 3189–3194.
- Zimmermann F., Breitenmoser-Würsten Ch., Molinari-Jobin A., Breitenmoser U. 2013. Optimizing the size of the area surveyed for monitoring a Eurasian lynx (*Lynx lynx* Linnaeus, 1758) population in the Swiss Alps by means of photographic capture-recapture. *Integr. Zool.* 8: 232–243.
- Zwijacz-Kozica T., Ważna A., Muñoz-Fuentes V., Tiesmeyer A., Cichocki J., Nowak C. 2017. Not European wildcats, but domestic cats inhabit Tatra National Park. *Pol. J. Ecol.* 65: 415–421.