



reštitúcie a etológie svištv (Ballo a Ballová, Kacerová a Sedláková), syslov (Schnitzerová a kol., Lindtner a Kubovčík), pričom sa neobišli ani naše veľké šelmy – medveď, rys a vlk v oblasti Štiavnických vrchov (Petrikovič).

Podvečerné referáty sa venovali monitoringu, rozšíreniu, mikrohabitatom a priestorovej aktivite drobných zemných cicavcov (Lešová a kol., Lešo a kol., Jurčovičová a kol.). Pozornosť sa venovala aj hrabošovi severskému panónskemu (Ambros) a hrabošovi močiarnemu (Tulis). Na základe tajného hlasovania účastníkov konferencie bol v tejto časti vyhodnotený a ocenený aj najlepší poster s názvom Euroasian otter (*Lutra lutra*) in the Slovak Republic (Urban a kol.). Záver prvého konferenčného dňa patril workshopu o aktuálnych otázkach ochrany netopierov, a to najmä z pohľadu ich ohrozenia zo strany budovania veterných parkov a pri rekonštrukciách a zatepleniach ľudských stavieb. Po jeho skončení sa účastníci mohli na chvíľu rozptýliť a pokochať pútavými fotografiami vo forme slide show z aridných biotopov stredného a SV Mexika (Krištín).

Sobotňajší blok bol venovaný aplikovanému výskumu a praktickej ochrane druhov. Odzneli

príspevky o identifikácii migračných koridorov (Findo a kol.), legislatívnych zmenách v zákonoch (Hlásnik) a pozornosť sa venovala aj kompenzácii škôd spôsobených chránenými druhmi, ako je napríklad vydra riečna (Kadlečíková). Zároveň si účastníci mohli vypočuť zaujímavé referáty o medveďovi (Rakyta), rysovi (Kubala) či vlčích svorkách (Skuban).

Poslednou konferenčnou aktivitou bol workshop o výskumných a ochranných projektoch na území Slovenska, pričom účastníci hodnotili doterajšie úspechy, problémy a načrtli ďalšie smerovanie, ktoré by sa malo zamerať na zvýšenie vzájomnej informovanosti, zefektívnenie výskumu migračných trás cicavcov s cieľom znížiť fragmentáciu habitatov a celej krajiny. Pred samotným ukončením konferencie sa navrhli spoločné závery z konferencie, na základe ktorých by sa mal výskum a ochrana cicavcov na Slovensku v budúcnosti uberať.

Článok vznikol aj vďaka podpore APVV (LPP-0444-09).“

Ing. Marek Veľký, PhD.
Ústav ekológie lesa SAV

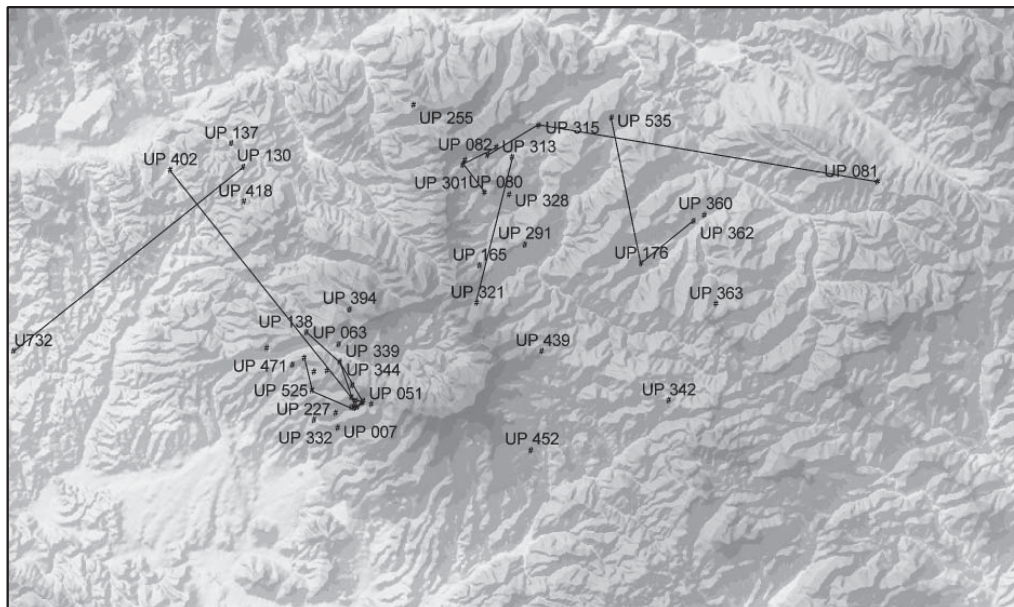
Metódy individuálnej identifikácie s využitím genetických markerov – medveď hnedý ako modelový živočích

Štúdium skryto žijúcich či chránených živočíchov býva výrazne komplikované faktom, že odchyt jedincov nie je jednoduchý a do veľkej miery zákonne obmedzený. V prípade veľkých živočíchov navyše dochádza k nebezpečeniu poranenia či už zúčastnených pracovníkov, alebo samotného živočícha. V prípade štúdií zameraných na početnosť, pomer pohlaví či genetickú štruktúru populácie je najspoľahlivejšie rozlišovať jedincov na základe informácie obsiahnutej v molekule DNA. Štruktúra DNA je jedinečná pre každého jedinca (s výnimkou jednovaječných dvojčiat) a identifikácia každého jedinca je zaručená s istotou blížiacou sa ku 100 %. Vďaka roz-

voju molekulárno-biologických metód v posledných desaťročiach možno identifikovať jedinca aj zo vzoriek, ktoré obsahujú veľmi malé množstvo DNA a ktoré sú v prírode pomerne jednoducho dostupné. Jedná sa najmä o vzorky trusu, srsti, peria či dokonca moču, súborne nazývané neinvazívne vzorky. Potreba odchytu živočícha sa v tomto prípade stáva irelevantnou.

Laboratórne metódy

Prvým krokom v laboratórnom spracovaní vzoriek je izolácia DNA. V súčasnosti sa pre tento účel využívajú komerčne dostupné sady na izoláciu. Ich výhodou je pomerne dobrá výťažnosť



Obr. 1: Identifikované vzorky trusu. Línie spájajú vzorky trusu pochádzajúce od toho istého jedinca.

DNA aj z takého druhu vzoriek, ako je napríklad trus. Izolovaná DNA je čistá bez prítomnosti inhibítorov. Pre odlišenie jedincov sa sledujú špecifické úseky DNA, ktoré sú syntetizované v polymerázovej reťazovej reakcii – PCR (MULLIS & FALLONA 1987). Jedinca sa navzájom odlišujú dĺžkou takto syntetizovaných fragmentov DNA, a preto sa táto metóda nazýva fragmentová analýza. Dĺžka jednotlivých fragmentov DNA sa zisťuje pomocou elektroforézy. Je to metóda, ktorá využíva vlastnosti mobility fragmentov DNA v elektrickom poli – čím dlhší je fragment DNA, tým pomalšie sa elektrickým poľom pohybuje. Pri sledovaní dostatočného počtu úsekov DNA (genetických markerov) sa spoľahlivosť identifikácie jedinca blíži k 100 %.

Nevýhodou neinvazívnych vzoriek je samotný fakt, že obsahujú pomerne málo DNA. U vzoriek trusu navyše dochádza ku komplikácii v podobe rýchlej degradácie vzorky pôsobením mikroorganizmov a vplyvov prostredia. Z dôvodu nízkeho obsahu DNA v neinvazívnych vzorkách môže dôjsť ku genotypovej chybe, to znamená k nesprávnej identifikácii jedinca. Najbežnejšou metódou, ako tomuto negatívnemu javu predísť, je opakovanie analýzy vzorky vo viacerých skú-

mavkách – multiple tube approach (TABERLET ET AL. 1996). Vďaka tejto metóde sa znižuje riziko genotypových chýb na minimum, avšak podstatne sa zvyšujú náklady na identifikáciu jedinca. U srsti vek nezohráva až takú dôležitú úlohu ako u vzoriek trusu, avšak je potrebné, aby vzorka obsahovala chlpy korienok, ktorý obsahuje bunky s DNA. Na získavanie vzoriek sa využívajú takzvané hair traps, čo sú vlastne jednoduché pasce (oplátky) zostrojené z ostnatého drôtu s návnadou uprostred. Iným typom hair traps sú oterové pasce napr. na stromoch, na ktorých si jedinca značia teritória, kde sa chlpy zachytávajú buď na ostnatý drôt, alebo suchý zips. Všeobecne možno povedať, že úspešnosť analýz vzoriek srsti je vyššia ako u vzoriek trusu, ich získavanie je však náročnejšie.

Výsledky genetických analýz s použitím neinvazívnych vzoriek v Európe – medveď hnedý ako modelový živočích

Medveď hnedý ako chránený živočích žijúci skrytým spôsobom života predstavuje vhodný druh pre uskutočnenie pilotnej štúdie s využitím neinvazívnych vzoriek. Navyše, vzorky trusu medveďa možno v prírode pomerne ľahko



vyhľadať. Ide o druh, ktorého spolunažívanie s človekom a s jeho hospodárskymi záujmami sa ukazuje ako dosť problematické. Pri realizácii manažmentu populácií medveďa hnedého je dôležité poznanie vekovej a pohlavnej štruktúry populácie. Z tohto dôvodu sa uskutočňujú rôzne formy mapovania, ako sú jesenné mapovanie na snehu, prípadne mapovanie na stacionároch alebo návadách. Najpresnejšou alternatívou pre odhad početnosti sa ukazuje metóda identifikácie jedincov na základe informácie obsiahnutej v DNA.

Prvé európske štúdie medveďa hnedého s využitím neinvazívnych vzoriek sa zamerali na fylogeografiu populácií medveďa na európskom kontinente. Zistilo sa, že medvede v Európe patria do dvoch odlišných fylogeografických línií – západoeurópskej a východoeurópskej. Výskyt týchto línií má geograficky striktno vymedzený charakter (TABERLET & BOUVET 1994, KOHN ET AL. 1995). Karpatská populácia z územia Slovenska bola na základe týchto štúdií priradená k východoeurópskej línií. Vzorky trusu a srsti sa úspešne využili aj pri štúdiu ohrozenej populácie medveďa v Pyrenejách (TABERLET ET AL. 1997). Na základe tejto štúdie sa stanovila minimálna početnosť populácie v Pyrenejách a zvolil

sa program na reintrodukciiu jedincov medveďa zo Slovinska s ohľadom na pomer pohlaví jedincov v Pyrenejách. Najlepšie preskúmanou populáciou medveďa hnedého v Európe je škandinávská populácia. S pomocou vzoriek trusu zozbieraných za účasti poľovníkov sa uskutočnila štúdia v centrálnej oblasti Švédska. Celkovo bolo v tejto oblasti zozbieraných takmer 2000 vzoriek trusu, pričom v roku 2001 sa podarilo identifikovať 311 a v roku 2002 239 jedincov (BELLEMAIN ET AL. 2005).

Pilotná štúdia zameraná na početnosť medveďa hnedého v oblasti Poľany a Veporských vrchov

Na základe skúseností zo zahraničia sme sa rozhodli uskutočniť štúdiu s využitím vzoriek trusu zameranú na početnosť populácie medveďa hnedého v oblasti Poľany a Veporských vrchov. Táto štúdia bola vykonaná na Lesníckej fakulte Technickej Univerzity vo Zvolene za účasti zamestnancov spoločnosti Lesy SR, š. p., Národného lesníckeho centra, Štátnej ochrany prírody SR, Technickej univerzity vo Zvolene a dobrovoľníkov.

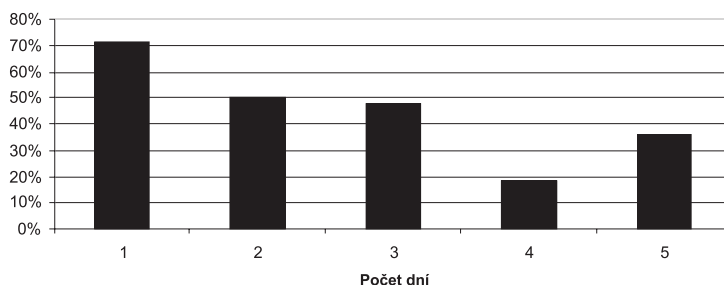
Oblasť Poľany a Veporských vrchov sa ukázala ako veľmi vhodná pre tento typ štúdie



Medveď hnedý, foto: R. Siklienka



Graf 1: Závislosť úspešnosti získania genotypu od čerstvosti vzorky



z hľadiska relatívnej geografickej izolovanosti a vhodných topografických pomerov. Zber vzoriek trusu prebiehal v mesiacoch apríl a máj v roku 2008. Zvolilo sa relatívne krátke obdobie zberu z dôvodu obmedzenia zmien v početnosti v dôsledku emigrácie, imigrácie, natality a mortality. Celkom sa na sledovanom území distribuovalo približne 500 kusov skúmaviek s cieľom rovnomerného zberu vzoriek z celého sledovaného územia. Podarilo sa získať celkom 102 vzoriek trusu. Z uvedených vzoriek bolo 49 vhodných na genetickú analýzu. Z týchto 49 vzoriek sa podarilo identifikovať 32 rôznych jedincov medveďa, čo znamená, že niektoré jedince boli zaznamenané viackrát (obr. 1).

Práve opätovné „odchyty“ jedincov sa využívajú pri štatistickom vyhodnocovaní odhadu početnosti. Na základe tejto pilotnej štúdie, v ktorej boli použité vzorky trusu, možno potvrdiť, že neinvazívne vzorky predstavujú do budúcnosti veľký prísľub pri výskume vzácných, ohrozených a skryto žijúcich živočíchov. V pomerne krátkom období a oproti iným metódam oveľa presnejšie možno sledovať také parametre populácie, ako sú napríklad početnosť či pohlavná štruktúra. Treba však splniť niektoré základné požiadavky. Pre spracovanie neinvazívnych vzoriek je nevyhnutné mať vhodné laboratórne zariadenie kvôli minimalizácii rizika kontaminácie vzoriek a obmedzenia genotypových chýb. Na základe našich doterajších skúseností má u vzoriek trusu zásadný vplyv na úspešnosť laboratórnej analýzy, a tým aj na výskyt genotypových chýb, najmä čerstvosť vzorky (graf 1).

So zvyšujúcim sa vekom vzorky úspešnosť analýzy rapídne klesá, preto odporúčame zbierať

vzorky 3 dni, maximálne 5 dní staré. Ďalej je to poznanie časovo-priestorovej aktivity sledovaného živočicha v danom území. V prípade medveďa sa predpokladá najväčší pohyb na jar a v čase párenia (apríl až jún). Útlm nastáva v plnom lete. Zvýšená aktivita (aj keď je nižšia ako jarná) je opäť v jesennom

období, kedy si medveď potrebuje doplniť tukové zásoby. Medveď veľmi rád využíva svoje chodníčky a lokality, ktoré sa sezónne môžu meniť. Toto všetko treba zohľadňovať pri vyhľadávaní a odbere vzoriek trusu. Do istej miery je diskutabilné, či sa dá ľahšie nájsť jarný trus alebo jesenný. Z hľadiska analýzy vzoriek je lepší jesenný odber, pretože nižšia teplota zabezpečuje pomalšiu degradáciu vzoriek. Najdôležitejším faktorom pri plánovaní štúdie s cieľom odhadu početnosti je práve naplánovanie a koordinácia zberu vzoriek. Vzorky by sa mali zbierať rovnomerne z celého územia a časové obdobie zberu by malo byť dostatočne krátke z dôvodu kolísania početnosti. Z dôvodu obmedzenia vplyvu natality, mortality, imigrácie a emigrácie treba plánovať obdobie zberu tak, aby došlo k minimalizácii vplyvu týchto faktorov na kolísanie početnosti. V danom období by bolo potrebné aspoň na niektoré dni zabezpečiť hromadný výjazd na jednotlivé trasy, napr. 1 deň v týždni v priebehu 2 mesiacov by bol hromadný výjazd v záujmovom území. Tým sa docielu, že aspoň v tých dňoch sú stopercentne pokryté všetky trasy v a zachytí sa čo najväčší počet jedincov. Vhodne naplánovaným štúdiom možno zásadným spôsobom prispieť k poznatkom o populáciách voľne žijúcich živočíchov, ktoré by nebolo možné získať iným spôsobom, než analýzou trusu, srsti či iného typu vzoriek. Manažment chránených živočíchov by mal preto v budúcnosti vychádzať najmä z poznatkov tohto typu. V kombinácii s mapovaním na snehu, telemetriou či inými doplnujúcimi metódami by sa mohli získať komplexnejšie poznatky o jednotlivých cieľových populáciách živočíchov.



Poďakovanie

Táto práca bola podporovaná Agentúrou na podporu výskumu a vývoja prostredníctvom finančnej podpory č. APVV-18-032105. Autori ďakujú zamestnancom štátneho podniku Lesy SR, ŠOP SR, NLC Zvolen, Lesníckej fakulty a dobrovoľníkom za dodané vzorky.

Poďakovanie patrí aj Gabriele Baloghovej a Diane Krajmerovej za pomoc pri laboratórnych prácach a vypracovávaní výsledkov.

Literatúra

BELLEMAIN E., SWENSON J. E., TALLMON D., BRUNBERG S., TABERLET P., 2005: Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected faeces: four methods for brown bears. *Conservation Biology* 19: 150–161.

KOHN M., KNAUER F., STOFFELLA A., SCHRÖDER W., PÄÄBO S., 1995: Conservation genetics of the European brown bear – a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. *Molecular Ecology* 4: 95–103.

MULLIS K. B. & FALOONA F. A., 1987: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 335–50.

TABERLET P. & BOUVET J., 1994: Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of brown bear (*Ursus arctos*) in Europe. *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, 255: 195–200.

TABERLET P., CAMARRA J. J., GRIFFIN S., UHRÈS E., HANOTTE O., WAITS L. P., DUBOIS-PAGANON C., BURKE T., BOUVET J., 1997: Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6 (9): 869–76.

TABERLET P., GRIFFIN S., GOOSENS B., QUESTIAU S., MANCEAU V., ESCARAVAGE N., WAITS L. P. & BOUVET J., 1996: Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 24 (16): 3189–3194.

Ing. Martin Straka

Lesnícka fakulta TU Zvolen

Ing. Vladimír Vician, PhD.

Fakulta ekológie a environmentalistiky TU Zvolen

prof. Ing. Ladislav Paule, DrSc

Lesnícka fakulta TU Zvolen

Záchranný transfer vstavačovca bazového (*Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó)

Článok má za cieľ podať počiatočnú informáciu o priebehu akcie na záchranu vstavačovca bazového z priestorov gaštanice na Kolibe (Bratislava) od jeho transferu (4. 6. 2008) po jún 2009 a jej stručné zhodnotenie. Treba pri tom brať na zreteľ známu skutočnosť, že o úspešnosti transferov orchideí možno hovoriť až po dlhšom časovom období.

Vstavačovca bazový – chránený, zraniteľný druh – je najskôr kvitnúci vstavačovca (kvitne v apríli až júni) s kvetmi prevažne žltej alebo menej často aj červenej farby. Jeho biotopom sú lúky, pasienky, kroviny, okraje lesov a svetlé lesy od nížin (vzácne) až do subalpínskeho

stupňa (zriedkavo) s ťažiskom výskytu v podhorí. Na Slovensku je hojnejší iba v jeho severnej časti. V Malých Karpatoch bolo známych niekoľko lokalít opísaných prevažne v minulom storočí a dávnejšie. Najviac údajov pochádza z Bratislavy a okolia, severnejšie bol zaznamenaný v 50. rokoch minulého storočia v lesoch Havranice a na západnom úpätí Drín v širšom okolí Smoleníc. V Čachtických Karpatoch (najsevernejšia časť Malých Karpát) bola opísaná v polovici 19. storočia lokalita Nedze, v súčasnosti je uvádzaný vstavačovca bazový iba od Čachtíc (KOLNÍK, 2004). O starých bratislavských lokalitách referuje podrobnejšie PTAČOVSKÝ (1956) v Poznám-