

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Markéta Benešová

Ochranářská genetika vlka obecného a levharta sněžného: vliv krajiny
na mikroevoluci populační struktury

Conservation genetics of grey wolf and snow leopard: effect of landscape attributes
to the population structure

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: doc. RNDr. Pavel Hulva, Ph.D.

Konzultanti: Mgr. Barbora Černá Bolfíková, Ph.D. a Ing. Mgr. Vladimír Zýka

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 30. 04. 2018

.....

Bc. Markéta Benešová

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému školiteli Pavlu Hulvovi za jeho trpělivost, ochotu, odborné vedení a přátelský přístup. Děkuji Dušanu Romportlovi a Vladimíru Zýkovi za konzultace geografických částí, dále děkuji Barboře Černé Bolfíkové a Tereze Stříbrné za odborné rady v genetické části. Zvláštní dík patří Petře Nevečeřalové za nezištnou pomoc a připomínky a Haně Kahounové za psychickou podporu.

Diplomová práce proběhla jako součást dvou dlouhodobých projektů výzkumu velkých šelem, a) studie populační struktury levharta sněžného v Nepálu pod vedením prof. Pavla Kindlmanna a b) studie struktury střeoevropských populací vlka obecného pod vedením doc. Pavla Hulvy. Práce byla zaměřena na práci s genetickými a geografickými daty. Detaily terénní a laboratorní části jsou v případě vlka obecného uvedeny v publikaci Hulva et al. (2018), v případě levharta sněžného probíhal terénní výzkum pod vedením MSc. Bikrama Shresty, laboratorní část proběhla kvůli zákazu exportu vzorků za konzultací s Přf UK včetně autorky práce v Center of Molecular Dynamics Nepal.

Děkuji také Grantové agentuře České republiky, která financovala výzkum levhartů sněžných (grant č. GB14-36098G) a Fondům EHP a Norským fondům, které financovaly výzkum vlků (projekt č. CZ02-0024).

Obrovský dík patří také mým přátelům a rodině, kteří mě po celou dobu podporovali, obzvlášť Martinovi, Honzovi, Hance, Katce, babičce a Mirkovi. Ze všeho nejvíce děkuji svým rodičům Jitce a Hynkovi za jejich neuvěřitelnou a všestrannou podporu.

Abstrakt

Přístupy krajinné genetiky umožňují zkoumat vliv krajiny na mikroevoluci populací. Krajina může ovlivňovat genový tok i u velkých šelem s dobrými disperzními schopnosti. Pochopení vlivu krajiny na genový tok mezi populacemi je zásadní pro ochranu druhů, obzvlášť jedná-li se o druhy s nízkou populační hustotou. Cílem práce bylo popsat genetickou strukturu populací vlka obecného (*Canis lupus*) a levharta sněžného (*Panthera uncia*) ve vybraných územích a zjistit, jaký vliv mají na pozorovanou strukturu vlastnosti krajiny.

Byly analyzovány neinvazivní genetické vzorky levhartů sněžných z Nepálu a neinvazivní i invazivní vzorky vlků obecných ze střední Evropy. Populační struktura byla určena *a posteriori* pomocí Bayesiánských přístupů, které integrují genetická a geografická data, a srovnána s modely konektivity krajiny.

Populační struktura levharta sněžného je nejvíce ovlivněna přítomností lidí a frekventovaných cest, které pro ně představují disperzní bariéru. Habitat vhodný pro tento druh je výrazně omezen nadmořskou výškou, přesto jsou během disperze schopni překonat i oblasti s vyšší nadmořskou výškou, než jaká je pro ně optimální.

Byla nalezena výrazná genetická odlišnost mezi vlky ze středoevropské nížinné a z karpatské populace, přestože mezi nimi není přímá bariéra genového toku. Tuto roli hraje rozhraní dvou typů prostředí (nížina vs. horské prostředí), obě populace lze proto interpretovat jako ekotypy, přičemž proximálním mechanismem jejich separace je pravděpodobně limitace disperze habitatem narození. Nížinná populace však částečně proniká do Karpat.

klíčová slova: ochránářská genetik, krajinná genetik, konektivita, disperze, levhart sněžný, vlk obecný

Abstract

Landscape genetic approaches allow to study effects of landscape to population microevolution. Landscape can influence gene flow even in large carnivores with good dispersal ability. Understanding the influence of landscape to the gene flow between populations is crucial for species conservation, especially in the species with low population densities. Aim of the study was to describe genetic structure of the grey wolf (*Canis lupus*) and snow leopard (*Panthera uncia*) in selected areas and to determine the influence of the landscape features on observed structure.

Non-invasive genetic samples of snow leopard from Nepal were analysed, as well as invasive and non-invasive samples of grey wolf from Central Europe. Population structure was determined *a posteriori* using Bayesian clustering approaches that integrate genetic and geographical data, and compared to landscape connectivity models.

Population structure of snow leopard is mostly influenced by human presence and presence of frequented roads, which represent a substantial dispersal barrier. Habitat suitable for this species is greatly restricted by altitude, however, during dispersal they are able to overcome areas with higher elevation than what is optimal for them.

Pronounced genetic difference was found between central European and Carpathian population despite a lack of direct barrier to gene flow. The barrier role is connected with transition zone of two habitat types (lowland vs. mountain), therefore both populations could be considered as ecotypes separated by proximate mechanisms of natal habitat dispersal. However, lowland population partly spreads to the Carpathians.

keywords: conservation genetics, landscape genetics, connectivity, dispersal, snow leopard, grey wolf

Obsah

1 Úvod.....	8
1.1 Ochranařská genetika	8
1.2 Krajinná genetika.....	10
1.2.1 Konektivita krajiny	11
1.2.2 Izolace rezistencí a teorie obvodů.....	13
1.3 Bayesiánské metody	14
1.4 Specifika ochranařské genetiky velkých šelem	16
1.5 Studované druhy	17
1.5.1 Levhart sněžný	17
1.5.2 Vlk obecný	19
1.6 Cíle práce	21
2 Metody	22
2.1 Sběr vzorků.....	22
2.2 Extrakce DNA a amplifikace genetických markerů	22
2.3 Zpracování mikrosatelitových chromatogramů.....	24
2.4 Populačně genetické analýzy.....	25
2.5 Analýzy krajinné genetiky.....	26
2.6 Analýzy konektivity	28
2.7 Analýza IBD a IBR.....	31
3 Výsledky.....	33
3.1 Levhart sněžný - mikrosatelitová data.....	33
3.1.1 Identifikace vzorků	33
3.1.2 Zpracování mikrosatelitových chromatogramů	33
3.1.3 Populačně genetické analýzy	33
3.1.4 Analýzy krajinné genetiky	36
3.1.5 Analýzy konektivity.....	40
3.1.6 Analýza IBD a IBR.....	42
3.2 Vlk obecný – mikrosatelitová a mitochondriální data.....	43
3.2.1 Identifikace vzorků	43
3.2.2 Populačně genetické analýzy	44

3.2.3 Analýzy krajinné genetiky	46
3.2.4 Analýzy konektivity	53
3.2.5 Analýza IBD a IBR	58
4 Diskuze	59
4.1 Levhart sněžný	59
4.1.1 NP Sagarmatha	59
4.1.2 Manang a Mustang	60
4.1.3 Genový tok mezi oblastí Annapuren (Manang a Mustang) a Sagarmathou	60
4.2 Vlk obecný	61
4.2.1 Genetická struktura vlků v Západních Karpatech	62
4.2.2 Nížinná populace a enklávy nížinných vlků v Karpatech	64
4.2.3 Alpská populace	65
4.2.4 Rumunské Karpaty	66
4.2.5 Vlk z Vysočiny	66
5 Závěr	68
6 Dostupnost dat	69
7 Seznam literatury	70
8 Seznam příloh	85

1 Úvod

1.1 Ochranařská genetika

Podle mnohých autorů zažíváme jednu z největších extinkčních událostí v historii planety (Dirzo & Raven 2003; Ceballos et al. 2010; Barnosky et al. 2011). Pokud současná rychlost vymírání druhů nebude zpomalena, může tento trend vyústit ve vymírání srovnatelné s masovým vymíráním na konci druhohor (Ceballos et al. 2015). Ochranou biodiverzity, druhů, stanovišť a ekosystémů se zabývá ochranařská biologie (conservation biology), ať už je původcem jejich ohrožení člověk či jiné faktory (Soulé 1985).

Pokrok v oblasti molekulárních metod usnadnil získávání genetické informace a na konci 70. let umožnil vznik nové disciplíny – ochranařské genetiky (conservation genetics) (Soulé & Mills 1992; Zachos & Hackländer 2011). Zpočátku přijímali ochranařští biologové genetické metody chladně, například kvůli vyšší orientaci na statistiku a matematiku a také z důvodu zaměření na ochranu genetické variability namísto ochrany samotných druhů. K takovému přístupu je těžší si utvořit emocionální pouto, je složitější jej definovat a navíc zahrnutí nutnosti ochrany genetické variability ústí v potřebu ochrany většího počtu jedinců, než když se genetická variabilita nebere v potaz, což může vadit nejrůznějším subjektům (Soulé & Mills 1992; Laikre 1999).

Díky integraci genetiky do ochranařské biologie však máme možnost komplexnějšího pohledu na problematiku ochrany ohrožených druhů nebo stanovišť. Ochranařská genetika umožňuje například zjištění poměru pohlaví v populaci, určení populační velikosti a struktury, identifikaci migrantů a odhalení migračních koridorů, určení ohrožených populací v rámci druhu, monitorování genového toku, detekci invazních druhů, analýzu rodokmenů a určení příbuznosti jedinců, individuální identifikaci, odhalení a minimalizování hrozby inbreedingu a ztráty genetické variance, detekci hybridizace, porozumění vztahů mezi lokálními populacemi a jejich konektivitě. Umožňuje také odhalení kryptických druhů, definování stanovišť a genotypů vhodných k reintrodukci nebo použití v ochranařské forenzice či k managementu populací v zajetí (DeSalle & Amato 2004; Swenson et al. 2011).

Další pokrok přinesla možnost získat genetickou informaci z neinvazivních vzorků, tedy z trusu, srsti, peří, kůže, muzejních exponátů nebo z herbářových vzorků (Taberlet 1996; DeSalle & Amato 2004). Poprvé se genetickou informací pocházející z neinvazivních vzorků podařilo izolovat z chlupových folikulů medvěda hnědého (Taberlet & Bouvet 1992) a i další pokroky v této oblasti přinášely převážně genetické studie zaměřené na medvědy (Swenson et al. 2011).

Neinvazivní genetika umožňuje získat genetickou informaci s minimálním vyrušováním zvířat při sběru dat, bez nutnosti jejich odchytu anebo anestezie a v případě potenciálně nebezpečných druhů také s menším rizikem pro samotné výzkumníky (Taberlet & Bouvet 1992). Nevýhodou bylo v minulosti malé množství DNA získané z neinvazivních vzorků (Taberlet 1996). S vynálezem metody PCR (polymeraze chain reaction, tedy polymerázová řetězová reakce), která umožňuje amplifikaci (zmnožení) předem stanovené specifické části genomu, byl tento problém vyřešen a odpadla tak nutnost složitějšího klonování genů (DeSalle & Amato 2004; Schlötterer 2004). Problémem neinvazivních genetických vzorků však zůstává často špatná kvalita DNA, která mimo živý organismus rychle degraduje (Taberlet et al. 1999). Neinvazivní genetické metody jsou vhodné zvláště pro ohrožené a malé populace, jsou vhodné k monitorování populací, přispívají k lepšímu porozumění populační ekologii a chování druhů (Swenson et al. 2011).

K nejčastěji využívaným molekulárním metodám v ochranářské genetice živočichů patří DNA sekvenování, použití mikrosatelitů, analýza SNP a dříve fingerprintové metody jako AFLP (Schlötterer 2004).

Metoda AFLP neboli Amplified Fragment Length Polymorphism (tedy „délkový polymorfismus amplifikovaných fragmentů“) spočívá v naštěpení DNA pomocí restričních enzymů na více krátkých fragmentů, na které jsou následně navázány specifické sekvence DNA, tzv. adaptory. Poté jsou fragmenty amplifikovány pomocí PCR s použitím primerů (primery jsou krátké sekvence DNA, které se mohou navázat na jakoukoli požadovanou část genomu a tím určit místo syntézy nového řetězce (Peake 1989)), které se navazují na adaptory. Fragmenty jsou poté vizualizovány pomocí gelové elektroforézy. Analýza AFLP se využívá ke zjištění genetické variance mezi individuály i mezi populacemi, k určení příbuznosti i k individuální identifikaci či ke konstrukci genetických map (Mueller & Wolfenbarger 1999; Schlötterer 2004; DeSalle & Amato 2004).

Sekvenování DNA, tedy zjištění sekvence nukleotidů v dané oblasti genomu, poskytuje komplexní informaci o daném regionu, nicméně jsou osekvenovány i invariantní části genomu. DNA sekvenování se využívá v populační genetice a k určení selekčních a demografických schémat (Schlötterer 2004). Metod sekvenování DNA je nespočet, v základu jde však vždy o syntézu DNA v přítomnosti dideoxynukleotidů, které ukončují replikaci DNA (tzv. dideoxy metoda neboli Sangerova metoda). Syntéza DNA je ukončena opakovaně, výsledkem této metody je set řetězců DNA o různých délkách a ukončených

různými dideoxynukleotidy, podle kterých lze určit komplementární nukleotid (Alberts et al. 2002).

Mikrosatelity jsou krátké opakující se tandemové sekvence několika málo nukleotidů. Mikrosatelity jsou vysoce polymorfní a hojné v genomu. Liší se počtem opakování sekvencí, neboť kvůli chybě DNA polymerázy při replikaci (tzv. sklouznutí polymerázy) může dojít ke zvýšení nebo snížení počtu opakování (Oliveira et al. 2006). Díky své vysoké variabilitě se používají ve forenzice pro individuální identifikaci, při testech otcovství, pro tvorbu genetických map a v populační genetice (Schlötterer 2004).

Analýza jednonukleotidových polymorfismů neboli SNP (single-nucleotide polymorphism) se soustředí na změnu jediného nukleotidu v genomu. K takové analýze je vyžadována znalost o alelické variaci na dané genomické pozici ve studované populaci, protože většina pozicí nukleotidů v populaci je invariantní (Schlötterer 2004). Do jednonukleotidových polymorfismů lze zahrnout i haplotypy, tedy skupiny SNP, které se přenáší společně, dědí se jen po jednom z rodičů a tedy nerekombinují. Patří mezi ně například mitochondriální DNA (mtDNA), která se přenáší po maternální linii, a DNA chromosomu Y (Y-DNA) přenášející se pouze po paternální linii (Arora et al. 2015). Analýza SNP se využívá například k identifikaci genů zodpovědných za onemocnění (Lehne et al. 2011), k odvození populační historie (Brumfield et al. 2003) nebo k mapování vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium), což je případ, kdy se skutečná frekvence určitého haplotypu v populaci liší od předpokládané frekvence, která by nastala, kdyby se alely na každém lokusu kombinovaly náhodně (Schlötterer 2004).

V současnosti spolu s rozvojem tzv. next generation sekvenačních technologií vzniká ochránářská genomika, která využívá k monitoringu a ochraně biodiverzity metody masivního paralelního sekvenování (McMahon et al. 2014; Garner et al. 2016), což umožňuje nové vhledy do procesů probíhajících u ohrožených druhů na úrovni celých genomů (Diéz-del-Molino et al. 2018).

1.2 Krajinná genetika

Krajinná genetika (landscape genetics) představuje spojení krajinné ekologie s populační genetikou a jejím cílem je poskytnout informace o interakci mezi vlastnostmi krajiny a mikroevolučními procesy, jako jsou genový tok, genetický drift a selekce (Manel et al. 2003). Krajinná genetika si dává za cíl pochopit, jak krajinné a environmentální faktory

ovlivňují genetickou strukturu populace, prostorovou propojenost populací nebo naopak jejich fragmentaci, jaký vliv má struktura krajiny na genový tok či lokální adaptace a jaké jsou příčiny těchto procesů (Manel et al. 2003) a jak globální změny ovlivňují neutrální a adaptivní genetickou rozmanitost (Manel & Holderegger 2013).

Krajinná genetika dává do souvislosti genetické diskontinuity s krajinou a vlastnostmi prostředí jako jsou bariéry – například hory, gradient vlhkosti (Manel et al. 2003), nevhodný habitat (McRae & Beier 2007) nebo klimatický gradient (Geffen et al. 2004) – a díky tomu dokáže tyto vlastnosti krajiny odhalit jako bariéry genového toku (Scoble & Lowe 2010). Krajinná genetika dokáže odhalit nejen druhově specifické disperzní bariéry, ale také odhalit, které části krajiny genový tok usnadňují, identifikovat migrační koridory (tj. nepřetržitě „pruhy“ habitatu, které strukturálně propojují dva jinak nespojitě kusy habitatu (Tischendorf & Fahrig 2000)) a migranty, předpovědět šíření invazních druhů nebo nemocí (Storfer et al. 2010), objasnit populační strukturu (Manel et al. 2003), popsat efekty disturbance a krajinné dynamiky (Holderegger & Wagner 2006), lokalizovat oblasti s adaptivním potenciálem a adaptivní lokusy (Scoble & Lowe 2010) nebo určit vliv fragmentace krajiny a antropogenních procesů (Storfer et al. 2007). Krajinná genetika úzce souvisí s ochránářskou genetikou, protože právě fragmentace a ztráta habitatů mají velký vliv na životaschopnost populací. Malé populace, mezi kterými je omezený genový tok, jsou více ohroženy stochastickými procesy, inbrední depresí a ztrátou genetické diverzity (Laikre 1999; Lacy 2000).

V krajinné genetice živočichů se jako genetické markery nejčastěji využívají mikrosatelity a poté, výrazně méně často než mikrosatelity, mitochondriální DNA (Storfer et al. 2010). Mitochondriální DNA je díky nižší mutační rychlosti vhodná spíše ke studiu procesů, které měly na populaci vliv před dlouhou dobou (např. v době ledové), mikrosatelity jsou oproti tomu vhodnější k detekci vlivu recentní fragmentace krajiny (Balkenhol et al. 2009).

1.2.1 Konektivita krajiny

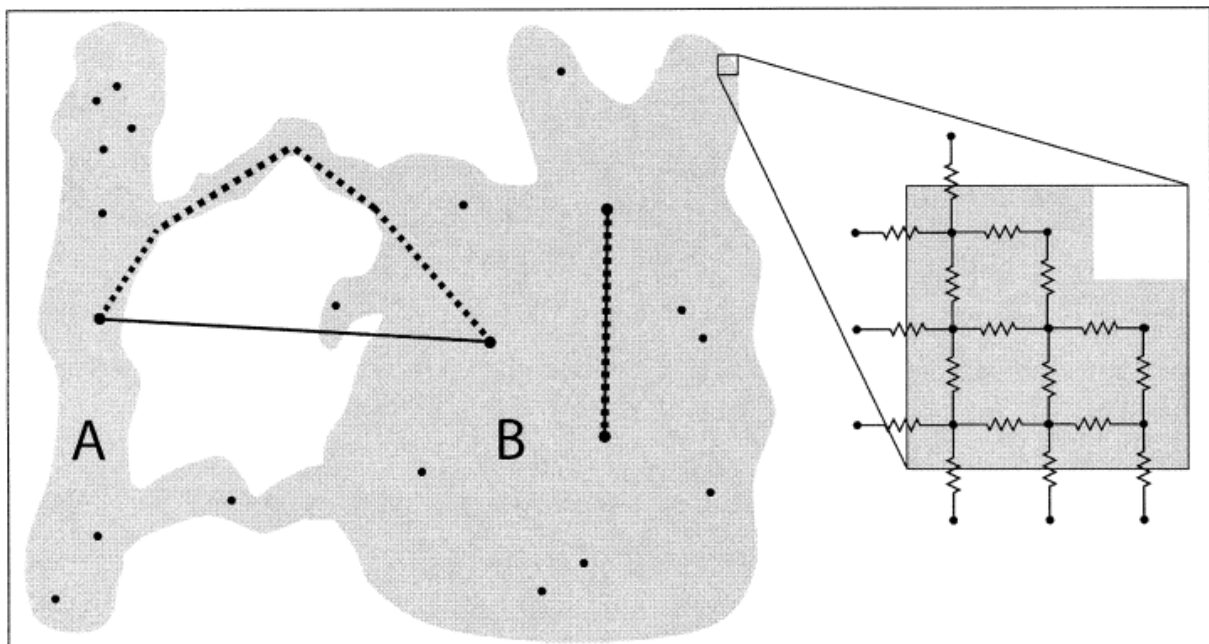
Jedním z klíčových pojmů krajinné genetiky je tzv. konektivita krajiny, což je „míra, do jaké krajina usnadňuje nebo brání pohybu mezi zdrojovými habitaty“ (Taylor et al. 1993). Existuje konektivita *strukturální*, která představuje habitatovou kontinuitu (plynulost) a měří se analyzováním struktury krajiny, a konektivita *funkční*, která je druhově specifická – zohledňuje pohybové možnosti organismu a jeho behaviorální odpovědi na prvky krajiny

(Tischendorf & Fahrig 2000). Konektivita krajiny tak zásadním způsobem ovlivňuje genový tok, který je jedním ze základních procesů, jež mají vliv na genetickou variaci v populaci. Většina krajinně genetických studií se soustředí právě na genový tok (Hall & Beissinger 2014).

Funkční konektivita se dá měřit například právě pomocí genetické konektivity, tedy kvantifikací genového toku (Manel & Holderegger 2013), případně i jinými metodami jako přímým pozorováním, např. s použitím radiolokátorů, apod. (Kool et al. 2013).

Ve svých počátcích pracovala krajinná genetik s meziprostorem mezi dvěma habitaty (tzv. matrix (Tischendorf & Fahrig 2000)), mezi kterými probíhá genový tok, jako s prostorem homogenním, definovaným pouze geografickými vzdálenostmi (Manel & Holderegger 2013). Genový tok je menší s vyšší geografickou vzdáleností a při studiu genového toku se tak pracovalo pouze s konceptem izolace vzdáleností (isolation by distance, Wright 1943), který říká, že se zvyšující se vzdáleností se zvyšuje genetická diferenciace mezi jedinci nebo populacemi (Manel et al. 2003) z důvodu omezené možnosti disperze jedinců.

V současnosti je již matrix mezi habitaty chápán jako heterogenní mozaika, v níž různé elementy mají pro určitý druh různou propustnost. Jedním z nejčastějších využití krajinné genetiky je právě posuzování propustnosti mezihabitatového matrixu (Scoble & Lowe 2010).



Obr. 1: Hypotetické vhodné habitaty A a B vyznačeny šedě, plnou čarou je znázorněna euklidovská vzdálenost, tečkovaně znázorněna least-cost path, výřez zobrazuje propojení jedinců konduktory a rezistory (McRae 2006)

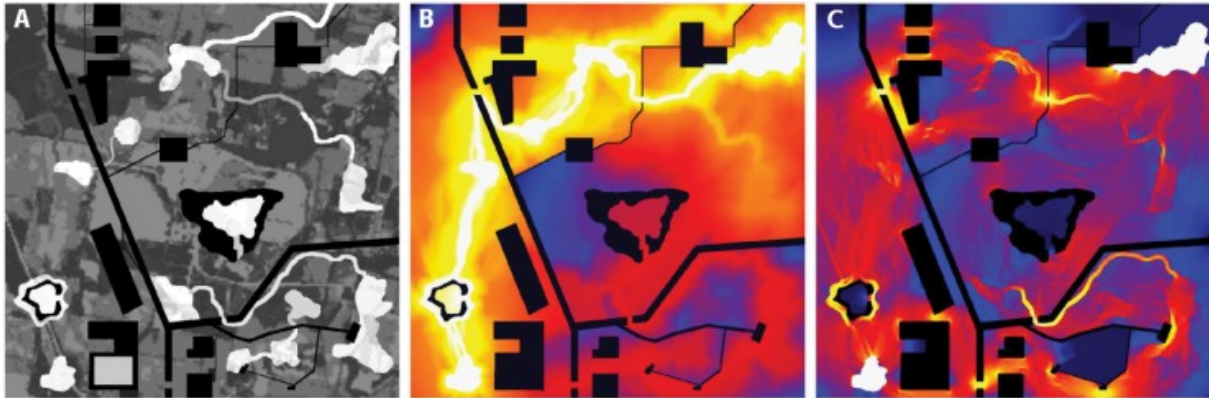
V prostoru s nízkou funkční konektivitou tedy nemůžeme předpokládat pouze izolaci vzdáleností, ale musíme se ptát, jestli a jak pro daný druh existuje možnost pohybu mezi dvěma habitaty. Model „nejlevnější cesty“ (least-cost path, Adriaensen et al. 2003) předpokládá jedinou vhodnou cestu mezi habitaty, která je založena na druhově specifické ceně za pohyb v určitém typu krajiny, není tedy založen na euklidovské (přímé) vzdálenosti, ale na tzv. efektivní vzdálenosti (effective distance, Mateo-Sánchez et al. 2015). Tento model v řadě případů odpovídal skutečnosti lépe, než model izolace vzdáleností (Scoble & Lowe 2010), přesto však vzhledem k jediné předpokládané cestě mezi habitaty není zcela přesný. Oproti tomu model izolace rezistencí (isolation by resistance, McRae 2006) operuje s více možnými trasami a je založen na rezistenční vzdálenosti, která vychází z teorie elektrických obvodů (obr. 1). Rezistence krajiny představuje převrácenou hodnotu konektivity krajiny.

1.2.2 Izolace rezistencí a teorie obvodů

Model izolace rezistencí předpokládá vztah mezi genetickou diferenciací a rezistenční vzdáleností. Základem využití rezistenčních vzdáleností pro modelování genového toku je myšlenka, že existuje paralela mezi vodivostí v elektrických obvodech a genovým tokem v heterogenní krajině (McRae 2006). V rámci této analogie můžeme elektrickou vodivost interpretovat jako propustnost krajiny, elektrický proud lze využít k předpovídání pravděpodobnosti pohybu migrujících jedinců v určitých uzlech (pravděpodobnost, že se jedinec vydá jednou cestou namísto druhou) a napětí představuje pravděpodobnost, s jakou migrant dosáhne daný cíl a ne jiný (tedy pravděpodobnost úspěšné disperze oproti například mortalitě). Konečně elektrický odpor lze interpretovat jako rezistenční vzdálenost (McRae et al. 2008), která ovšem zahrnuje možnost více disperzních cest a také umí operovat se šířkou migračního koridoru. Více elektrických vodičů nebo vodič s vyšší kapacitou umožňuje větší průtok elektrického proudu, stejně tak více migračních koridorů nebo širší migrační koridor umožňuje větší genový tok (McRae & Beier 2007).

Analýza izolace rezistencí zvaží (na základě druhově specifických informací o tom, které prvky krajiny zabraňují disperzi nebo ji ulehčují) všechny možné cesty, kterými lze propojit dva vhodné habitaty nebo dvě populace (obr. 2) (McRae 2006). Pokud krajina dobře umožňuje propojení (genový tok) mezi dvěma body, má tato krajina nízkou rezistenci, tedy vysokou konektivitu. Podle Zeller (2012) představuje rezistence „ochotu organismu přejít určité prostředí, fyziologickou cenu za pohyb skrz určité prostředí, redukci přežití při přechodu přes určité prostředí nebo integraci těchto faktorů“.

Model izolace rezistencí dokáže předpovídat genový tok v heterogenní krajině a jeho výsledky lépe odpovídají skutečnosti než modely izolace vzdáleností nebo model „nejlevnější cesty“ (McRae & Beier 2007) a to zejména v případech nepravidelných tvarů habitatu, měnící se míry migrace nebo u migrace na velké vzdálenosti (McRae 2006). Izolace rezistencí dosahuje dobrých výsledků i v případech, kdy nejsou k dispozici příliš dobrá data o velikosti populace a o migraci v populaci (McRae et al. 2008).



Obr. 2: A) Hypotetická mapa krajiny s vyznačenou druhově specifickou propustností (bílá=propustná, černá=nepropustná), B) model „nejlevnější cesty“ pro šíření z levého dolního rohu do pravého horního, C) model izolace rezistencí, na rozdíl od předchozího modelu je ve slepých odbočkách minimální tok, protože nepřispívají k nové cestě mezi habitaty. Převzato z McRae et al. (2008)

1.3 Bayesiánské metody

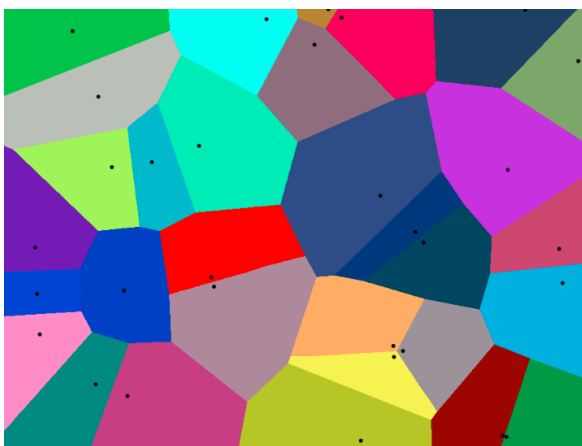
Příčinou genetické strukturovanosti populací nemusí být pouze vzdálenost, ať už euklidovská (isolation by distance), efektivní (least-cost path) nebo rezistenční (isolation by resistance). Důvodem může být například rekolonizace území z odlišných refugií (Taberlet et al. 1998), izolace způsobená prostředím (isolation by environment, Wang & Bradburd 2014), izolace způsobená lokálními adaptacemi (isolation by adaptation, Nosil et al. 2008) nebo bariéry genového toku (isolation by barriers, Ruiz-Gonzalez et al. 2015). Genetická diferenciací způsobená bariérami genového toku je studována pomocí tzv. Bayesiánských klastrovacích algoritmů (Guillot et al. 2009).

Bayesiánské metody umožňují aktualizovat pravděpodobnost určité hypotézy, když se objevují nové informace (van Ravenzwaaij et al. 2016). Je k tomu většinou využívána metoda Monte Carlo Markovovských řetězců (MCMC, Gilks et al. 1996). MCMC integruje přístup Monte Carlo, který umožňuje určit průměrnou hodnotu veličiny z velkého počtu náhodných

vzorků, s Markovovskými řetězci, které generují řetězce znaků, kdy každý následující článek řetězu závisí pouze na předchozím článku. Tímto způsobem je možné charakterizovat rozložení pravděpodobnosti určitého výsledku bez předchozí znalosti matematických vlastností tohoto rozložení pravděpodobnosti pouze z náhodných vzorků (van Ravenzwaaij et al. 2016).

Programy založené na Bayesiánských algoritmech pak umožňují odvození populační struktury a přiřazení jedinců do jednotlivých klastrů, aniž by tyto byly předem definované (klastr nebo cluster je skupina vzorků se společnými znaky, v populační genetice ve smyslu populace nebo subpopulace) (Pritchard et al. 2000; Chen et al. 2007).

Programy mohou využívat pouze genetickou informaci a pomocí této určit, do jakého klastru náleží vzorek nebo část jeho genomu (Chen et al. 2007), takovýmto programem je např. Structure (Pritchard et al. 2000), který předpokládá vazebnou rovnováhu alel studovaných lokusů a Hardy-Weinbergovu rovnováhu v rámci jediné populace. Pokud nenastane Hardy-Weinbergova rovnováha, je populace rozdělena na subpopulace/klastry a do těchto klastrů jsou přiřazeni jednotlivci tak, aby byly minimalizovány odchylky od vazebné rovnováhy a Hardy-Weinbergovy rovnováhy (Randi 2003). Jiné programy pracují kromě genetické informace i s geografickými souřadnicemi jednotlivých vzorků. Z programů, pracujících s prostorovou informací, byly v této práci využity Geneland (Guillot, Mortier, et al. 2005), Tess (Durand, Jay, et al. 2009) a Baps (Corander & Marttinen 2006). Tyto programy definují okolí jednotlivých vzorků na základě Voronojovy teselace (Guillot, Mortier, et al. 2005; Corander et al. 2008; François & Durand 2010). Teselace je vyplnění prostoru nepřekrývajícími se tvary či buňkami (polygony), Voronojova nebo také Voroného teselace (angl. Voronoi tessellation) je taková, kdy daný bod x je obklopen buňkou tvořenou body, které jsou bližší danému bodu x než jinému bodu y (obr. 3) (Corander et al. 2008).



Obr. 3: Voronojova teselace 31 náhodně vygenerovaných bodů v online programu <http://alexbeutel.com/webgl/voronoi.html>

Programy Tess a Baps definují buňky okolo jednotlivých vzorků a platí, že bližší jedinci budou spíše zařazeni do stejného klastru, než jedinci vzdálenější. Geneland oproti tomu vyhledává genetické hranice, které oddělují jednotlivé populace v Hardy-Weinbergově rovnováze, a buňky zde nejsou definovány okolo jednotlivců, ale okolo „teritorií“, což jsou skupiny vzorků, respektive populace (Guillot, Mortier, et al. 2005).

1.4 Specifika ochránářské genetiky velkých šelem

Šelmy (*Carnivora*, Bowdich 1821) jsou pátým nejpočetnějším řádem savců, čítajícím přibližně 280 druhů. V rámci tohoto velmi diverzifikovaného řádu existují terestrické i vodní šelmy, vážící od několika gramů až po několik tun (Nyakatura & Bininda-Emonds 2012). Druhy studované v rámci této práce, vlk obecný *Canis lupus* (Linné, 1758) a levhart sněžný *Panthera uncia* (Schreber, 1775), patří mezi tři desítky největších terestrických šelem (Ripple et al. 2014) a zároveň mezi vysoce mobilní druhy šelem (Pilot et al. 2006; Johansson et al. 2016).

S velikostí těla se u šelem úměrně zvětšuje velikost domovského okrsku (Gittleman & Harvey 1982) a zároveň se snižuje jejich populační hustota (Carbone & Gittleman 2002; Ripple et al. 2014). Populace s nízkou populační hustotou ohrožuje inbreeding (Laikre 1999), fragmentace populací (Randi 2003), snížení genetické variace důsledkem fragmentace habitatu a ztráty konektivity (Dixon et al. 2007), bottlenecků nebo genetického driftu (Fauvergue et al. 2012).

S rozdílnou schopností disperze zvířat se mění i procesy zodpovědné za jejich genetickou strukturu. U živočichů s nízkým disperzním potenciálem hrají primární roli bariéry genového toku (Dieckmann et al. 1999), oproti tomu u vysoce mobilních zvířat, která většinu bariér dokáží překonat, je efekt historických a geografických faktorů na genetickou strukturu potlačený (Pilot et al. 2006) a tak může být za genetickou diferenciaci zodpovědná adaptace na prostředí, vedoucí ke vzniku ekotypů, mezi kterými je omezený genový tok (tedy dochází k „izolaci prostředím“, Wang & Bradburd 2014). Tento fenomén se může udržovat díky hypotéze disperze ovlivněné habitatem narození (natal-habitat biased dispersal), tedy stavu, kdy se jedinci zdržují pouze v takovém habitatu, který je podobný habitatu, ve kterém se narodili (Sacks et al. 2004). Příkladem jsou vlci v Severní Americe, kde genetická struktura koreluje s typem habitatu a vytváří se zde dva ekotypy, „lesní“ a „tundroví“ vlci (Musiani et al. 2007; Carmichael et al. 2007). Lesní vlci se živí sedentární kořistí (losi, jeleni)

a celoročně zůstávají ve svých teritoriích, zatímco tundroví vlci loví karibu, teritoriální jsou jen část roku a na podzim migrují za svou potravou na zimoviště. V době páření se pak oblasti výskytů těchto dvou ekotypů překrývají, ale genetická diference mezi nimi se udržuje (Carmichael et al. 2007). Vlci z tundry mají navíc světlejší srst, což znamená, že se tyto vlci neliší jen naučeným chováním a diferenciací neutrálních genů, ale že zde vznikl unikátní ekotyp adaptovaný na arktické podmínky a predaci karibu (Musiani et al. 2007), pozdější výzkumy prokázaly asociaci genů i s dalšími typy adaptací jako jsou změny metabolismu, imunity nebo některých smyslů (Schweizer, VonHoldt, et al. 2016; Schweizer, Robinson, et al. 2016).

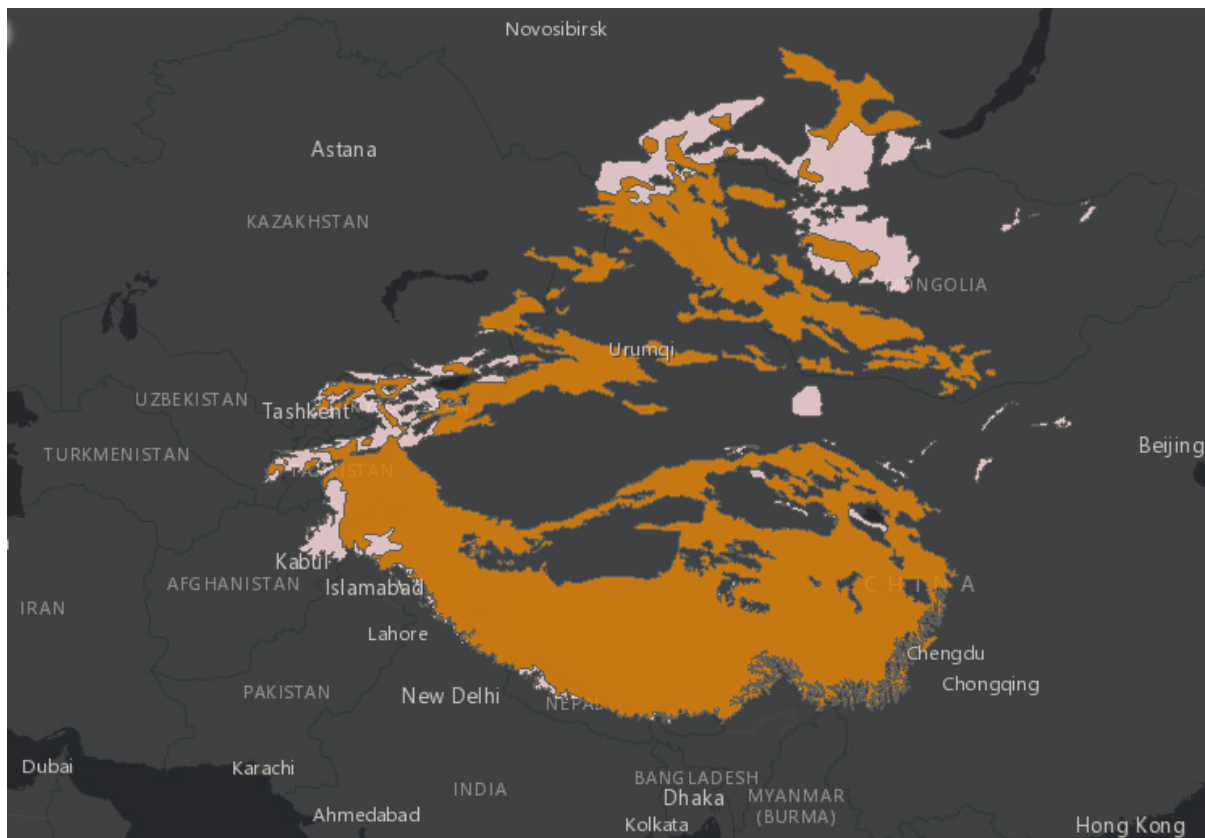
Genetická diference způsobená ekologickými faktory není jen doménou vlků, byla prokázána i u jiných šelem jako u kojotů préríjních (Sacks et al. 2004), rysů kanadských (Rueness et al. 2003), pum amerických (Waller & Wheeler 2012) nebo lišek polárních (Dalén et al. 2005).

Zvláště vhodnými metodami pro ochranářskou genetiku šelem je použití neinvazivních metod z důvodů nižšího vyrušování zvířat a menšího narušování jimi obývaného území, snadnějšího a levnějšího získávání vzorků, větší bezpečnosti pro výzkumníky nebo kvůli špatné přístupnosti habitatů některých šelem (Taberlet & Bouvet 1992). Pro vysoce mobilní druhy živočichů je vhodné použití klastrovacích metod založených na Bayesiánských algoritmech, protože tyto definují jednotlivé subpopulace a genové klastry *a posteriori* (Hulva et al. 2018).

1.5 Studované druhy

1.5.1 Levhart sněžný

Levhart sněžný neboli irbis horský (*Panthera uncia*, dříve *Uncia uncia*, Pocock 1930), je velká kočkovitá šelma (čeleď kočkovití – *Felidae*, de Waldheim 1817) vyskytující se v Himálajích, na Tibetské náhorní plošině a v horách střední Asie (obr. 4) (McCarthy et al. 2017). Levhart sněžný je soumravný (Jackson & Ahlborn 1989) a žije skrytě (Oli 1997) ve vysokohorských biotopech jako jsou horské louky, křoviny, útesy, pastviny, případně v řídkém lese (Ale et al. 2007; Aryal et al. 2014). Levharti sněžní žijí samotářsky a domovské okrsky jednotlivých zvířat stejného pohlaví se nepřekrývají, s výjimkou domovských okrsků samic a jejich dcer (Johansson et al. 2016). Mláďata odchází od matky ve věku 18 – 22 měsíců (Jackson et al. 2010).



Obr. 4: Současné rozšíření levharta sněžného podle serveru IUCN (Mezinárodní svaz ochrany přírody, www.iucn.org), oranžová = současné rozšíření, růžová = oblast reintrodukce

V této práci jsme studovali levharty sněžné z Nepálu, který je na jižním okraji současného rozšíření tohoto druhu. Levhart sněžný se vyskytuje v nadmořských výškách 500 – 5 800 m n. m. (McCarthy et al. 2017), optimální je pro ně v Himálaji a Tibetské náhorní plošině 3 000 – 5 000 m n. m. (Ale et al. 2007; Jackson et al. 2010). Oblast s takovou nadmořskou výškou je v Nepálu poměrně úzká, tvořena úpatími hor, a oblasti, kde se levharti sněžní mohou pohybovat, jsou tak značně geograficky omezené například oproti Tibetské náhorní plošině, kde je oblast vhodná pro levharty sněžné mnohem širší. V Nepálu má irbis také menší domovský okrsek z důvodu většího množství možné kořisti (Jackson et al. 2010), velikost domovského okrsku se uvádí 12 – 39 km² (Jackson & Ahlborn 1989). Jedna z oblastí, odkud pochází vzorky studované v této práci, je Národní park Sagarmatha v blízkosti Mount Everestu. Na začátku 21. století se sem levhart sněžný vrátil po zhruba čtyřiceti letech nepřítomnosti, poté, co se do oblasti vrátili někteří sudokopytníci, především tahr himálajský (*Hemitragus jemlahicus*, Smith 1826) a kabar lesní (*Moschus chrysogaster*, Hodgson 1839) (Ale et al. 2007; Lovari et al. 2009). Studovaná populace je tedy poměrně mladá. Další dvě

studované oblasti, Manang a Mustang, jsou naopak již dlouho důležitými stanovišti levharta sněžného (Jackson et al. 2010).

1.5.2 Vlk obecný

Vlk obecný (*Canis lupus*, čeleď psovití – *Canidae*, de Waldheim 1817) je ekosystémový generalista (Muñoz-Fuentes et al. 2009), vyskytují se ve všech habitatech s výjimkou bažin a deštných lesů (Geffen et al. 2004), v důsledku čehož je charakteristický obrovským areálem. Vlci jsou také schopni adaptovat se na blízkost lidí (Nowak & Mysłajek 2016). Jejich historické rozšíření je největší ze všech terestrických savců a i dnes jsou vlci jedni z nejrozšířenějších velkých savců, jejich současný areál je nicméně oproti historickému areálu přibližně o třetinu menší, byli vyhubeni ve velké části Západní Evropy, USA a Mexika i v dalších oblastech (Ripple et al. 2014). Současné rozšíření pokrývá část Severní Ameriky a většinu Eurasie (obr. 5) (Mech & Boitani 2010).



Obr. 5: Současné rozšíření vlka obecného podle serveru IUCN (Mezinárodní svaz ochrany přírody, www.iucn.org), oranžová = současné rozšíření, růžová = oblast reintrodukce (malá oblast na jihu USA), červená = vyhynulý (Japonsko)

Vlci mají také velice dobré disperzní schopnosti – někteří jedinci jsou schopni v krátkém čase urazit vzdálenost i několik stovek kilometrů (Wabakken et al. 2001). Světová vlčí populace nemá zřetelnou fylogeografickou strukturu, ale i přes svou přizpůsobivost a mobilitu existují geneticky odlišné populace (Randi 2011).

Základ vlčí smečky tvoří množící se pár a jejich mláďata, která po dosažení dospělosti (1 – 4,5 roku) smečku opouštějí a zakládají novou, a to buď v rámci lokální populace, případně se jedinci obou pohlaví mohou šířit na dlouhé vzdálenosti do nové populace (Mech & Boitani 2003). Velikosti domovského okrsku se různí v závislosti na stavu populace a zeměpisné šířce, v oblastech studovaných v této práci se nicméně liší minimálně: v Polsku se odhaduje 140 – 170 km² (Okarma et al. 1998) a ve slovenských Karpatech bylo zjištěno 146 – 191 km² (Findo & Chovancová 2004). Dochází ale i ke změnám během roku v závislosti na rozmnožovacím cyklu (Anděl et al. 2010).

Během posledního glaciálního maxima se vlci v Evropě zdržovali v refugiích na jihu Evropy, zároveň se však vyskytovali i v mamutové stepi a na refugiích pravděpodobně nebyli závislí (Sommer & Benecke 2005). Dnešní populace vlků na Pyrenejském, Apeninském a Balkánském poloostrově jsou sice vzájemně geneticky odlišné a jejich výskyt geograficky odpovídá glaciálním refugiím, oddělení těchto populací se však pravděpodobně odehrálo v pozdější době, než v posledním glaciálním maximu (Pilot et al. 2014). V pleistocénu měl vlk obecný vyšší genetickou variabilitu, než v současnosti, některé starobylé linie se ale i dnes vyskytují v Evropě. Na území střední Evropy se tak setkávají dvě haploskupiny (tj. skupiny podobných haplotypů (Arora et al. 2015)), haploskupina 1 a 2 (Pilot et al. 2010). Starobylejší haploskupina 2 převažuje v jižní Evropě (na Apeninském poloostrově je geneticky fixována) a vyskytuje se i v Karpatech a Pobaltí. V minulosti zřejmě haploskupina 2 v Evropě dominovala, ale během posledních 40 000 let ji postupně nahrazovala haploskupina 1, která v Evropě dnes převažuje a je fixována na Pyrenejském poloostrově (Pilot et al. 2010). Stejná situace nastala v Severní Americe, kde byla haploskupina 2 nahrazována haploskupinou 1 a kde se dnes již haploskupina 2 vůbec nevyskytuje. Možným vysvětlením je, že vlci s haploskupinou 2 byli adaptováni na lov megafauny (Hofreiter 2007) a v Severní Americe bylo vymizení megafauny rychlejší, takže se vlci nezvládli adaptovat a byli tak zcela vytlačeni haploskupinou 1, zatímco v Evropě se složení kořisti měnilo pozvolněji, takže vlci byli schopni se adaptovat (Pilot et al. 2010).

Genetická struktura vlčích populací tedy nemusí odpovídat geografickým bariérám genového toku, ale koreluje spíše s ekologickými faktory (Pilot et al. 2006). Například vlci v severozápadní Kanadě vykazují jasnou genetickou strukturu podél řeky Mackenzie, která je

ale více než polovinu roku zamrzlá a nemůže tak představovat bariéru genového toku (Carmichael et al. 2001), v Polsku byla prokázána korelace genetické struktury se složením potravy (Pilot et al. 2006) atd. U vlků se tedy vyskytují ekotypy, které se v jednotlivých populacích mohou vytvořit a udržovat díky fenoménu disperze ovlivněné habitatem narození. Vazba na habitat narození je u vlků upevňována behaviorálními mechanismy (Muñoz-Fuentes et al. 2009) jako jsou techniky lovu, chování eliminující riziko přenosu chorob, teritoriální chování (Carmichael et al. 2007) nebo specializace na určitou kořist (Carmichael et al. 2001). Signifikantními ekologickými faktory pro genetickou diferenciaci jsou typ vegetace (Carmichael et al. 2007), teplota, velikost kořisti, způsob disperze (Pilot et al. 2006), výběr místa pro doupě a možnost uplatnění naučeného chování v souvislosti se strukturou habitatu (Muñoz-Fuentes et al. 2009).

Střední Evropa je místem výskytu několika evropských vlčích populací (Chapron et al. 2014). Studovaná oblast zahrnuje středoevropskou nížinnou (vč. baltické), karpatskou a alpskou populaci.

1.6 Cíle práce

Hlavním cílem této diplomové práce je zjistit, jakým způsobem ovlivňuje krajina genový tok a populační strukturu u levharta sněžného a vlka obecného. Byly proto studovány populace v altitudinálně heterogenním (horském) prostředí, které může sloužit jako fyzická bariéra genového toku a generuje strmé gradienty environmentálních proměnných. Oba studované druhy mají dobré disperzní schopnosti, levhart sněžný má však úzkou ekologickou valenci a je to habitatový specialista, oproti tomu vlk obecný je oportunistický druh se širokou ekologickou valencí a vysokou mírou adaptability, tato variabilita však není spojitá a ve svém areálu vytváří úžeji specializované ekotypy. Cílem práce je zaprvé otestovat hypotézu, že i u velkých, vysoce mobilních savců se může vyvíjet populační struktura, která je ovlivněna vlastnostmi krajiny, a dále studovat detaily vzniku této populační struktury a roli jednotlivých vlastností krajiny. Budou k tomu využity populačně-genetické analýzy a přístupy krajinné genetiky, zjištěná genetická struktura pak bude srovnána s modelem konektivity krajiny vyjádřeným pomocí přístupů teorie obvodů.

2 Metody

2.1 Sběr vzorků

K analýze mikrosatelitové DNA levhartů sněžných byly použity neinvazivní vzorky (příloha 1). Vzorky byly sbírány v srpnu 2015, březnu 2016 a v listopadu 2016 v Nepálu v oblastech Manang a Mustang v chráněné oblasti Annapurna (Annapurna Conservation Area) a v Národním parku Sagarmatha v oblasti Solukhumbu ve východním Nepálu. Celkem bylo v období od srpna 2015 do listopadu 2016 nasbíráno 268 vzorků (261 vzorků trusu, 6 vzorků z chlupů a jeden vzorek z moči).

Mikrosatelitová a mitochondriální DNA vlků byla získána jak z neinvazivních vzorků (trus), tak z invazivních vzorků (tkáň, krev) odebraných z legálně zabitých zvířat nebo ze zvířat uhynulých následkem srážky s vozidlem (příloha 2). Data byla sbírána v Západních Karpatech – na Slovensku, na východě České republiky (Moravskoslezské Beskydy, Vsetínské vrchy), v jižním Polsku (Polské Beskydy) a v Rumunsku (Munții Apuseni) –, dále v rumunské části Východních Karpat, na Vysočině, na Kokořínsku a Liberecku, na Broumovsku a v Polsku. Bylo odebráno 288 vzorků, z toho 181 vzorků pocházelo z tkání, jeden vzorek z krve, 2 vzorky z chlupů a 104 vzorků z trusu. Další 38 neinvazivních vzorků pochází z Rakouska a tyto byly využity jen pro analýzy mitochondriální DNA. Celkový počet vzorků tedy činí 326. K datasetu bylo přidáno 39 vzorků ferálních psů a plemene hybridního původu mezi karpatskými vlky a německými ovčáckými psy, tzn. vzorky československých vlčáků (Smetanová et al. 2015), z důvodu potvrzení správného rozlišení mezi vzorky vlků a psů.

2.2 Extrakce DNA a amplifikace genetických markerů

DNA z trusu a z chlupů byla extrahována pomocí kitu Qiagen QIAamp DNA Mini Stool Kit (Qiagen), DNA z tkání byla extrahována pomocí kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen).

Pro druhovou identifikaci levhartů sněžných byl použit segment mitochondriálního genu pro cytochrom b (148 bp), který byl označen primery CYTB-SCT-PUN-R' a CYTB-SCT-PUN-F'. PCR reakce proběhla v objemu 7 μ l s použitím 1,4 μ l pufru 5X PCR Buffer, 0,035 μ l 5000 Units Taq Polymerázy, 0,21 μ l 10 μ M přímého a reverzního primeru, 0,14 μ l 10mM deoxynukleotid trifosfátu (dNTPs) a 3 μ l destilované vody, do které byly přidány 2 μ l DNA extraktu. Samotná reakce proběhla v následujícím cyklu: denaturace DNA při 94 $^{\circ}$ C

po dobu 2 minut následovaná 35 cykly denaturace při 95 °C po dobu 30 vteřin, annealingu (nasednutí primerů) při 60 °C po 15 vteřin, elongace (syntéza DNA) při 68 °C po 1 minutu, na závěr proběhla finální elongace při 68 °C po dobu 10 minut.

Pro vlky byl použit kontrolní region mitochondriální DNA (230 bp) označený primery Thr-L15926 a DL-H16340. PCR reakce proběhla v objemu 25 µl za použití 1U GoTaq G2 Flexi DNA polymerázy (Promega), pufru, 2,5mM MgCl₂, 0,2mM dNTPs, 0,5µM primery a 5-20 ng DNA. Průběh reakce byl následující: denaturace při 94 °C po dobu 3 minut následovaná 40 cykly denaturace při 94 °C po 1 minutu, annealingu při 50 °C po 1 minutu, elongace při 72 °C po 1 minutu, poté proběhla finální elongace při 72 °C po dobu 4 minut.

Pro analýzy levhartů sněžných bylo vybráno šest polymorfních mikrosatelitových lokusů nacházejících se na šesti různých chromozomech. Byly použity fluorescenčně označené primery ve dvou kombinacích (tabulka 1).

Jméno lokusu	Motiv	Rozsah velikosti (bp)	Chromozom	Barvivo
PUN124	(AC)22	90-100	A2	Black
PUN229	(GT)23	104-112	A1	Green
PUN1157	(AC)17	101-109	B3	Blue
PUN132	(GT)19	117-123	D3	Black
PUN894	(GT)17	110-118	C2	Green
PUN935	NA	110-120	D1	Blue

Tabulka 1: Šest mikrosatelitových lokusů použitých pro levharty sněžné (Janečka et al. 2008, 2014; Rozhnov et al. 2011)

PCR reakce proběhla při objemu 7 µl s použitím 3,5 µl pufru Qiagen 2 × Master Mix Buffer, 0.7 µl 5X Q solution a 2 µl extrahované DNA. V první kombinaci bylo použito 0,88 µl 20µM primerů, ve druhé kombinaci bylo použito 0,78 µl 20µM primerů a 0,02 µl destilované vody. Byl použit přístup multiple-tubes (Taberlet 1996), kdy je pro každý vzorek PCR reakce provedena vícekrát, v tomto případě třikrát.

Mikrosatelitová DNA vlků byla analyzována pomocí kitu Canine Genotypes Panel 1.1 (ThermoFisher), který obsahuje 18 mikrosatelitových lokusů (tabulka 2). PCR reakce začala při 98 °C po dobu 3 minut, následně proběhlo 30 cyklů při 98 °C (15 vteřin), 60 °C (75 vteřin) a 72 °C (30 vteřin), následná elongace probíhala při 72 °C po dobu pěti minut. Pro neinvazivní vzorky byl použit přístup “multiple-tubes”. Na základě genetických sekvencí získaných analýzou mitochondriální DNA byly vlkům přiřazeny haplotypy pomocí softwaru DnaSp (Rozas et al. 2003).

Jméno lokusu	Motiv	Rozsah velikosti (bp)	Chromozom	Barvivo
AHTk211	di	79-101	26	Blue
CXX279	di	109-133	22	Blue
REN169O18	di	150-170	29	Blue
INU055	di	190-216	10	Blue
REN54P11	di	222-244	18	Blue
INRA21	di	87-111	21	Green
AHT137	di	126-156	11	Green
REN169D01	di	199-221	14	Green
AHTh260	di	230-254	16	Green
AHTk253	di	277-297	23	Green
INU005	di	102-136	33	Black
INU030	di	139-157	12	Black
FH2848	di	222-244	2	Black
AHT121	di	68-118	13	Red
FH2054	tetra	135-179	12	Red
REN162C04	di	192-212	7	Red
AHTh171	di	215-239	6	Red
REN247M23	di	258-282	15	Red

Tabulka 2: 18 mikrosatelitových lokusů použitých pro analýzy vlků obecných (Thermo Scientific Canine Genotypes Panel 1.1 Technical manual)

Pohlaví vlků i levhartů sněžných bylo určeno pomocí genu pro amelogenin, který má různé varianty lokusů na X a Y chromozomech a je tak spolehlivým ukazatelem pohlaví (Pfeiffer & Brenig 2005). Pro levharty sněžné byly použity specifické primery (AMELY-F' a AMELY-R'), v případě vlků tyto primery obsahoval kit Canine Genotypes Panel 1.1, který byl u vlků použit pro analýzu mikrosatelitů.

2.3 Zpracování mikrosatelitových chromatogramů

Pomocí softwaru GeneMarker (verze 1.91, SoftGenetics, State College, Pennsylvania, USA) byl manuálně proveden allele calling pro všechna tři čtení každého vzorku levhartů sněžných. Z těchto tří čtení byl vytvořen konsenzus podle těchto pravidel:

1. Pokud tři nebo dvě čtení ukazovala stejnou hodnotu délek alel (ať už máme na mysli jeden peak, tedy homozygota, nebo dvě různé hodnoty z jednoho čtení pro dva peaky), tato hodnota byla přijata, přestože jedno čtení ukazovalo jinou hodnotu.

2. Pokud jedno čtení ukazovalo určitou hodnotu, tato hodnota byla přijata pokud byl peak jasně viditelný a zbylá dvě čtení neukazovala žádný výsledek.
3. Pokud jedno čtení neukazovalo žádné hodnoty a zbylá dvě čtení ukazovala každé jednu a zároveň každé jinou hodnotu a zároveň byla obě tato čtení kvalitní, byl vzorek označen jako heterozygotní (jedna hodnota byla přejata z jednoho kvalitního čtení a druhá z druhého).
4. Pokud každé ze tří čtení ukazovalo jiné hodnoty, byla vybrána čtení s lepší kvalitou anebo, pokud byla všechna tři čtení stejně kvalitní a přesto každé ukazovalo jiný výsledek, nebyl výsledek vůbec započítán.

Výsledné hodnoty byly upraveny v softwaru Autobin (Franck Salin, INRA, University Bordeaux, France) umožňujícím třídění a formátování dat.

2.4 Populačně genetické analýzy

V programu Cervus (verze 3.0.7, Tristan Marshall, Field Genetics Ltd, London, UK), umožňujícím analýzy rodičovství a příbuznosti, byla provedena analýza identity a analýza frekvence alel mikrosatelitových dat vlků a levhartů sněžných. Byly vyřazeny všechny vzorky vlků, které se shodovaly alespoň v patnácti lokusech z osmnácti. U levhartů sněžných vzhledem k nižšímu počtu přečtených lokusů a celkově nižší kvalitě genetické informace, pocházející výhradně z neinvazivních vzorků, byly podobné či stejné vzorky zachovány a vyřazeny byly jen u těch analýz, u kterých by mohly opakující se vzorky ovlivnit výsledek, totiž pro GenAlex a Geneland (viz dále).

Program Structure (verze 2.3.4, Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003) slouží k odhalení struktury populace na základě genetických dat, kdy předpokládá klastry, které mají vůči sobě odlišnou frekvenci alel. V programu byla provedena analýza vypočítávající nejpravděpodobnější počet klastrů a přiřazující jednotlivé vzorky s určitou pravděpodobností k těmto klastrům (Pritchard et al. 2010). Byl použit korelovaný model alelických frekvencí a admixture model, proběhlo 1 000 000 opakování a do analýzy nebylo zahrnuto prvních 100 000 opakování. Možný počet populací byl nastaven v rozmezí 1 až 10 a pro každý možný počet populací proběhlo 5 běhů.

Výsledky byly vyhodnoceny v programu Structure Harvester (Earl & vonHoldt 2012), nejvyšší pravděpodobný počet klastrů byl určen Evannovou metodou pomocí parametru delta K (Evanno et al. 2005) a výsledné hodnoty pro každý počet populací byly zprůměrovány v softwaru Clumpp (verze 1.1.2, Jakobsson & Rosenberg 2007).

Z datasetu vlků byli nejprve na základě výsledků Structure pro $K = 2$ vyřazeni psi, další analýzy v programu Structure i v dalších programech probíhaly pouze pro vlky.

Na základě výsledků z programu Structure byly populace vlka a levharta sněžného rozděleny na subpopulace, pro které byly v programu GenAlex (verze 6.5, Peakall & Smouse 2006; Peakall & Smouse 2012) zjištěny počty alel, heterozygotita a další charakteristiky, pro mitochondriální dataset vlků byly základní charakteristiky zjištěny v programu FSTAT (Goudet 1995). Opakující se vzorky levhartů sněžných byly pro tuto analýzu vyřazeny podle výsledků analýzy identity programu Cervus, kdy byly vyřazeny ty vzorky, které se shodovaly úplně anebo se lišily nejvíce v jedné alele, pokud byl počet opakování mikrosatelitové sekvence v této alele podobný počtu opakování u druhého vzorku a rozdíl tak mohl vzniknout chybou čtení. Pokud se vzorky lišily v jedné alele, ale počty opakování byly výrazně odlišné, byly tyto vzorky považovány za odlišné.

2.5 Analýzy krajinné genetiky

Geneland (verze 4.0.6, Guillot et al. 2005) je přídatný programový balíček s grafickým rozhraním pro statistický nástroj R (verze 3.3.2, Ihaka & Gentleman 1996). Pomocí softwaru Geneland lze odhadnout počet klastrů ve vzorku a lokalizovat hranice těchto klastrů (Guillot, Mortier, et al. 2005) na základě kombinace genetické informace a prostorové informace (geografické souřadnice). Jedná se o nástroj krajinné genetiky vhodný k detekci lineárních bariér genového toku (Chen et al. 2007).

Narozdíl od ostatních krajinně genetických programů použitých v této práci Geneland nevytváří klastry na základě jedinců (tzv. individual-based přístup), ale na základě populací v Hardy-Weinbergově rovnováze (Guillot, Mortier, et al. 2005). Z tohoto důvodu by opakující se vzorky mohly ovlivnit výsledek, proto byl pro analýzy levhartů sněžných použit dataset s vyřazenými opakujícími se vzorky (viz výše).

První provedená analýza sloužila ke zjištění počtu klastrů. Byl použit korelovaný model alelických frekvencí. Počet klastrů byl nastaven na 1 až 10, analýza běžela po 100 000

opakování a výsledky byly zaznamenány každých 100 opakování. Nepřesnost souřadnic byla nastavena na 0,01 stupně zeměpisné šířky a délky. Po deseti proběhnutých analýzách určil software pro každou z těchto deseti analýz počet klastrů s určitou posteriorní pravděpodobností. Na základě těchto výsledků byl určen finální počet klastrů.

V druhé analýze byl počet klastrů fixně nastaven na počet klastrů zjištěný v předchozí analýze, analýza běžela po 10 000 000 opakování a výsledky byly zaznamenány každých 1000 opakování. Nepřesnost souřadnic byla nastavena na 0,01 stupně zeměpisné šířky a délky, aby se odlišily vzorky pocházející ze stejných souřadnic. Z analýzy bylo vyřazeno prvních 5000 uložených opakování a pro grafické zobrazení výsledků bylo nastaveno 1000 pixelů na osách x a y.

Software Tess (verze 2.3.1, Durand, Jay, et al. 2009) je obzvláště vhodný na detekci recentně vzniklých kontaktních zón, nepravidelných hranic mezi populacemi a na detekci migrantů (Chen et al. 2007). V softwaru Tess byla provedena analýza s 12 000 opakováními a s vyřazením prvních 2000 opakování. Maximální počet klastrů (K_{max}) byl nastaven na hodnoty dva až deset a pro každý možný maximální počet klastrů bylo puštěno sto běhů. Z těchto sto běhů pro každé K_{max} byla poté zprůměrována hodnota DIC (deviance information criterion), které se používá jako měřítko adekvátnosti v Bayesiánských analýzách (Spiegelhalter et al. 2002)) a průměrné hodnoty DIC byly porovnány pro všechny maximální počty klastrů od dvou do deseti. Na základě těchto hodnot byl určen nejpravděpodobnější počet klastrů (hodnota DIC se od určitého počtu klastrů přestane výrazně snižovat a ustálí se v plató, což značí, že od tohoto počtu klastrů nebyl jasně detekován žádný dodatečný klastř (Durand, Chen, et al. 2009)).

Z výsledných běhů pro každý počet klastrů bylo vybráno 10 % běhů s nejnižší hodnotou DIC (Durand, Chen, et al. 2009) a těchto 10 % bylo poté zprůměrováno v softwaru Clumpp.

Software BAPS (verze 6.0, Corander & Marttinen 2006) je vhodný pro odhalování subpopulací s určitým podílem genetického přimísení. Pro analýzu prostorového klastrování jedinců byl počet klastrů nastaven na 2 až 10 a pro každé z těchto K proběhlo deset analýz. Program sám následně určí nejpravděpodobnější počet klastrů. Po zjištění počtu klastrů proběhla analýza prostorového klastrování jedinců se zafixovaným počtem klastrů odpovídající výsledku předchozí analýzy, tato analýza proběhla ve stech opakováních.

System ArcMap, fungující v rámci v rámci geografického informačního systému ArcGIS (verze 10.6, Esri®, www.esri.com), byl použit ke grafickému znázornění výsledků krajinně genetických analýz.

2.6 Analýzy konektivity

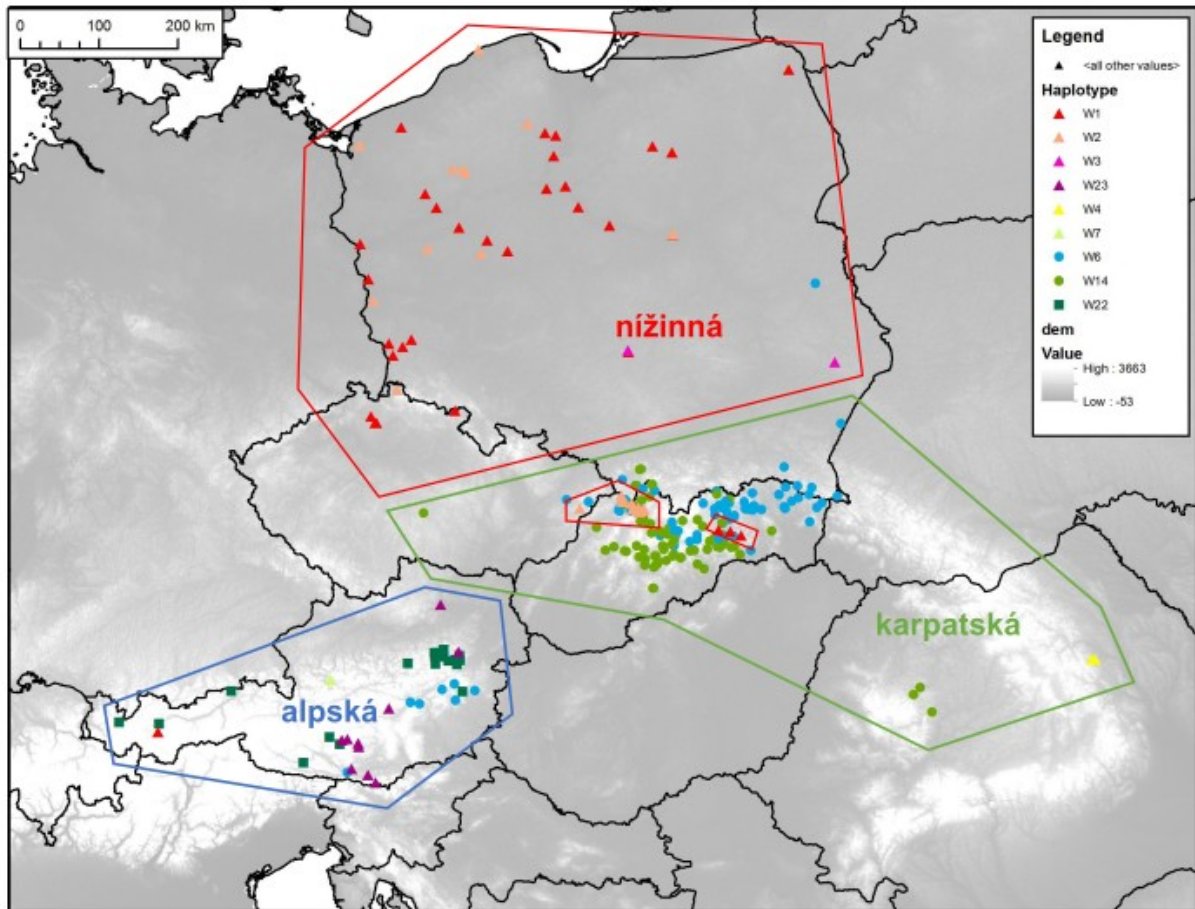
Analýza konektivity simuluje propojení jednotlivých oblastí nebo přesných míst výskytu druhu v heterogenním habitatu za využití teorie obvodů. Podkladem analýzy konektivity je rezistentní povrch, skrz který se poté pouští “proud” jako paralela šíření jednotlivců skrz více nebo méně vhodný habitat. Rezistentní povrch se připravuje na základě modelu habitatové vhodnosti, který je druhově nebo populačně specifický. Habitatový model se obvykle připravuje na základě nálezových dat, případně na základě expertního názoru, tento způsob ale není optimální (Zeller et al. 2012).

Pro habitatové modelování levhartů sněžných byla použita nálezová data společně s daty z fotopastí (Bikram Shrestha), celkem se jednalo o 406 bodů.

Habitatový model pro vlky byl připraven zvlášť pro různé subpopulace ve studované oblasti. Vlci byli na základě určených haplotypů a prostorového vymezení rozděleny na tři subpopulace (obr. 6) – střeoevropskou nížinnou (včetně baltické), alpskou a karpatskou subpopulaci (Chapron et al. 2014; Hulva et al. 2018), protože každá z těchto populací má jiné genetické parametry, je adaptována na jiný typ habitatu a využívá jiný typ krajiny (Pilot et al. 2006). Ty vzorky vlků, pro které byly zjištěny mikrosatelity, ale ne haplotypy, byly rozřazeny do subpopulací pouze na základě prostorového vymezení subpopulací. Z celkových 250 vzorků mikrosatelitů bylo 180 zařazeno do karpatské populace a 70 do nížinné, z 257 vzorků, pro které jsou určeny haplotypy, je 157 příslušníky karpatské populace, 62 nížinné a 38 spadá do alpské populace.

Pro modelování habitatové vhodnosti vlků byly použity kromě genetických dat i nálezové body (Hulva et al. 2018, Hnutí DUHA Olomouc, Nálezová Databáze Ochrany Přírody NDOP, projekt TRANSGREEN), celkem se jednalo o 3342 bodů, z toho 2528 je z oblasti Karpat, 79 z Alp a 735 z nížinné oblasti. Ty sice nenesou genetickou informaci, ale

pokud by byl habitatový model připraven pouze na základě genetických dat, nebyl by dostatečně robustní (Mateo-Sánchez et al. 2015).



Obr. 6: Rozdělení vzorků vlků do tří subpopulací. V karpatské subpopulaci jsou vyznačeny dvě enklávy nížinných vlků

Digitální model reliéfu pro model habitatové vhodnosti byl připraven na síti čtverců velkých 2×2 km pomocí programu ArcMap. Environmentální proměnné v tomto modelu (tzv. prediktory) jsou 1) model reliéfu – nadmořská výška a sklon (Shuttle Radar Topography Mission, Jarvis et al. 2008) – a 2) globální krajinný pokryv GLC (United Space In Europe, Global Land Cover 2015) pro Evropu, pro Nepál pak krajinný pokryv Land Cover of Nepal 2010 (Uddin et al. 2015). Krajinný pokryv byl rozdělen do 12 tříd: orná půda, mozaika orné půdy a přírodní vegetace, otevřený les, zapojený les, křoviny, traviny, mokřady a pravidelně zaplavovaná území, urbánní plochy, skály a holiny, vodní plochy, sníh a led, vzdálenost k zástavbě. Na základě složení krajinného pokryvu se hodnotila heterogenita krajiny – pro každý čtverec byl spočítán počet tříd krajinného pokryvu, rozloha třídy s největším zastoupením, průměrná rozloha třídy a suma délky na okrajích čtverce.

Habitatový model levhartů sněžných zahrnoval typ krajinného pokryvu, průměrnou roční teplotu, rozsah teplot, úhrn srážek za rok, solární radiaci, průměrnou nadmořskou výšku, vzdálenost od silnic, členitost reliéfu. Klimatické proměnné pochází z databáze Globální klimatická data (www.worldclim.org), vzdálenost od silnic byla určena podle silnic z mapy OpenStreetMap (www.openstreetmap.org).

Do habitatového modelu vlků byla navíc pro každý čtverec spočtena celková rozloha lesa a také rozloha a struktura lesního pokryvu v okolí 5 km od středu každého čtverce, takže pro každý čtverec přibyly parametry fragmentace lesa, sumy délky okrajů, rozlohy lesa, počtu ploch lesa a průměrného tvaru ploch lesa.

Samotný model habitatové vhodnosti byl vytvořen v softwaru Maxent (verze 3.4.1., Phillips et al. 2016) a to zvláště pro levharty sněžné, karpatské vlky, nížinné vlky a alpské vlky. Maxent dokáže podle náleзовých dat modelovat pravděpodobnost výskytu druhu v určitém typu habitatu. První analýza proběhla se všemi prediktory a sloužila k určení prediktorů, které jsou pro model habitatové vhodnosti významné. Druhá analýza proběhla pouze s těmi prediktory, které byly určeny jako významné. Obě analýzy proběhly na 500 opakování.

Výsledné hodnoty modelu habitatové vhodnosti pro každý pixel byly převráceny na obrácené hodnoty rezistentního povrchu v programu ArcMap pomocí nástroje -1. Hodnoty rezistentního povrchu slouží jako vstup pro analýzu izolace rezistencí v programu Circuitscape (verze 4.0, Shah & McRae 2008). Území je rozděleno na buňky a každá buňka má určitou hodnotu rezistence. V habitatových modelech vlků byly tyto hodnoty rezistentního povrchu poté překryty vrstvou migračních bariér – zastavěnými plochami (urbánní plochy z GLC 2015) a víceproudými silnicemi a dálnicemi (www.geofabrik.de). Na takto připraveném podkladu proběhlo několik typů analýz.

V programu Circuitscape lze provést několik různých analýz. Základní analýza spočívá v párovém propojení všech vzorků (párová analýza konektivity), jejímž výsledkem je kromě grafického znázornění konektivity mezi vzorky také matice rezistenčních vzdáleností pro každý pár vzorků.

Dalším typem analýzy je propojování tzv. habitat suitability patches, tedy jádrových oblastí habitatu vhodného pro daný druh nebo populaci, získané z habitatového modelu. Jádrové oblasti jsou definovány indexem vhodnosti habitatového modelu $> 0,5$ a zároveň velikostí alespoň 100 km^2 pro vlky a 10 km^2 pro levharty sněžné.

Třetím typem analýzy je tzv. „wall-to-wall“ analýza, kdy se „proud“, představující šíření druhu, pustí postupně ze všech světových stran a výsledky konektivity pro různé směry se poté sloučí. Zjišťuje se tak konektivita celého území, nikoli pouze konektivita mezi body nebo oblastmi.

Různé typy analýz jsou vhodné pro různá data. Pro levharty sněžné tak byla párová analýza provedena jen za účelem spočtení matice rezistenčních vzdáleností mezi vzorky, protože mezi dvěma oblastmi s genetickými vzorky je velká vzdálenost a zároveň jsou body na lokalitách velmi koncentrované. Celkem 39 bodů leželo na stejných nebo velmi blízkých souřadnicích, ty byly tedy sloučeny do jednoho bodu a rezistenční vzdálenost mezi nimi je nulová. Pro levharty sněžné byla kromě párové analýzy provedena i analýza propojující 34 jádrových oblastí habitatu.

Párová analýza konektivity a výpočet matice rezistenčních vzdáleností pro vlky proběhl zvlášť pro určené populace a zároveň zvlášť pro mikrosatelitový a mitochondriální dataset (celkem tedy pět samostatných výpočtů – pro alpskou populaci nejsou mikrosatelitová data k dispozici). Vzorky na stejných nebo velmi blízkých souřadnicích byly stejně jako u levhartů sněžných sloučeny do jednoho bodu, celkově bylo pro mikrosatelity sloučeno v Karpatech 20 bodů (propojeno 160), v nížině 8 (propojeno 62) a pro mitochondrie bylo sloučeno v Karpatech 13 bodů (propojeno 144), v nížině 4 (propojeno 58), v Alpách se žádné vzorky na stejných souřadnicích nevyskytovaly.

Propojení jádrových oblastí habitatu se počítalo dohromady pro mikrosatelitové i mitochondriální vzorky a zvlášť pro jednotlivé populace.

2.7 Analýza IBD a IBR

Ke zjištění souvislosti mezi vhodností habitatu (vyjádřenou rezistenční vzdáleností), genetickou odlišností vzorků a jejich geografickou vzdáleností bylo potřeba vytvořit matice genetických a geografických (euklidovských) vzdáleností mezi jednotlivými vzorky, které by bylo možné s maticemi rezistenčních vzdáleností statisticky porovnat. Tímto způsobem se dá zjistit, jestli se v populaci uplatňuje izolace vzdáleností (isolation by distance) nebo izolace způsobená vysokou rezistencí habitatu (isolation by resistance).

Matice genetických vzdáleností mezi mikrosatelitovými vzorky vlků a levhartů sněžných (F_{ST} , Wright 1951) byla spočítána webovou verzí programu Genepop (verze 4.2, Raymond & Rousset 1995; Rousset 2008). Pro mitochondriální vzorky vlků byla spočítána doporučená vzdálenost p-distance, vyjadřující podíl rozdílných nukleotidů v sekvenci, v programu Mega7 (verze 7.0.26, Kumar et al. 2016).

Matice euklidovských vzdáleností v metrech byla spočítána v programu Geographic Distance Matrix Generator (verze 1.2.3, Erst 2018).

Výsledné matice genetických, euklidovských a rezistenčních vzdáleností byly porovnány Mantelovým testem (Mantel 1967), který umožňuje srovnání dvou matic, v programu PASSaGE (verze 2.0.11.6, Rosenberg & Anderson 2011). Test byl proveden zvlášť pro nížinnou, karpatskou a alpskou populaci pro mitochondriální dataset vlků a zvlášť pro nížinnou a karpatskou populaci pro mikrosatelitový dataset vlků.

3 Výsledky

3.1 Levhart sněžný - mikrosatelitová data

3.1.1 Identifikace vzorků

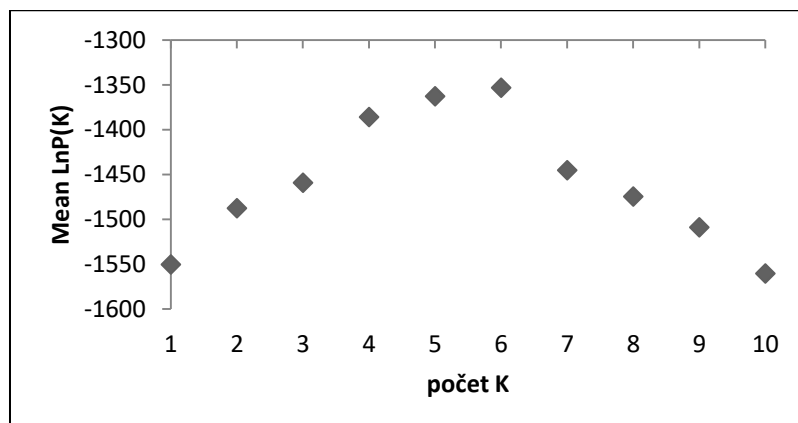
Z celkových 268 vzorků trusu, chlupů a moči získaných v Nepálu bylo 111 identifikováno jako levhart sněžný (108 vzorků pocházelo z trusu a 3 z chlupů). Z toho 40 bylo samců a 61 samic, u deseti vzorků se pohlaví nepodařilo zjistit. Poměr samců vůči samicím je 1:1,53 – na sto samců připadá 153 samic.

3.1.2 Zpracování mikrosatelitových chromatogramů

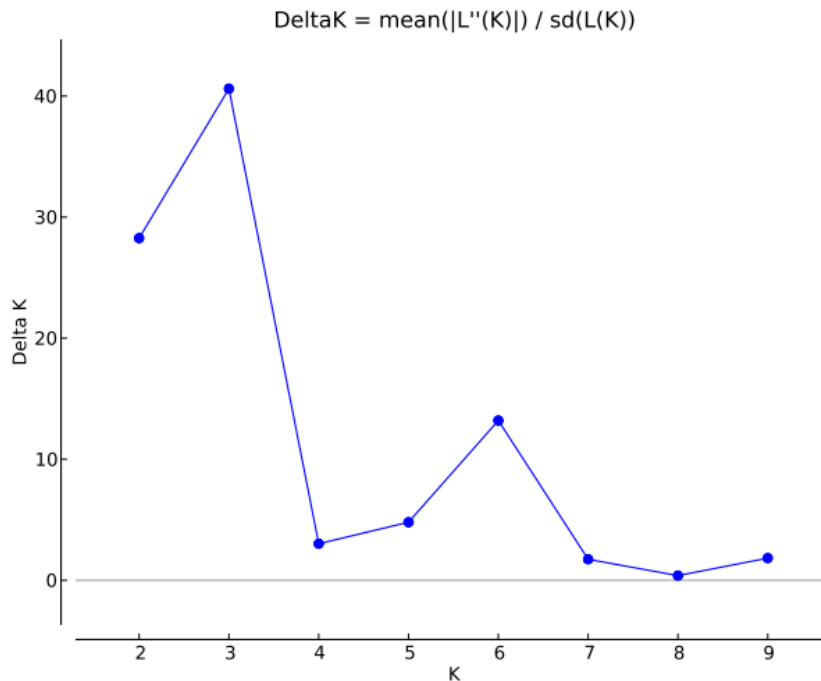
U tří vzorků levhartů sněžných se nepodařilo identifikovat žádný mikrosatelitový lokus, tyto vzorky tedy byly vyřazeny ze všech následujících analýz. Výsledný počet vzorků levhartů sněžných je tedy 108.

3.1.3 Populačně genetické analýzy

Výsledky z programu Structure ukázaly jasné oddělení některých vzorků do samostatných klastrů a naopak nejasné zařazení jiných, zvláště při vyšším počtu klastrů (K). Nejvyšší logaritmovaná pravděpodobnost dat je pro $K = 4$ až $K = 6$ (graf 1), nicméně odhadování počtu klastrů na základě této hodnoty není vždy přesné (Evanno et al. 2005), proto byl použit také parametr delta K (graf 2), který určuje nejpravděpodobnější počet klastrů na základě změny logaritmované pravděpodobnosti pro určitý počet klastrů a porovnávání hodnoty této změny pro různý počet K. Parametr delta K nejlépe určuje nejvyšší vhodný počet klastrů (Evanno et al. 2005). Podle parametru delta K je nejvyšší počet klastrů (tedy nejhlubší jasně detekovaná struktura) 6, nejlepší podporu má rozdělení na 3 klastry.



Graf 1:
Logaritmované
posteriorní
pravděpodobnosti
pro všechna
K z programu
Structure

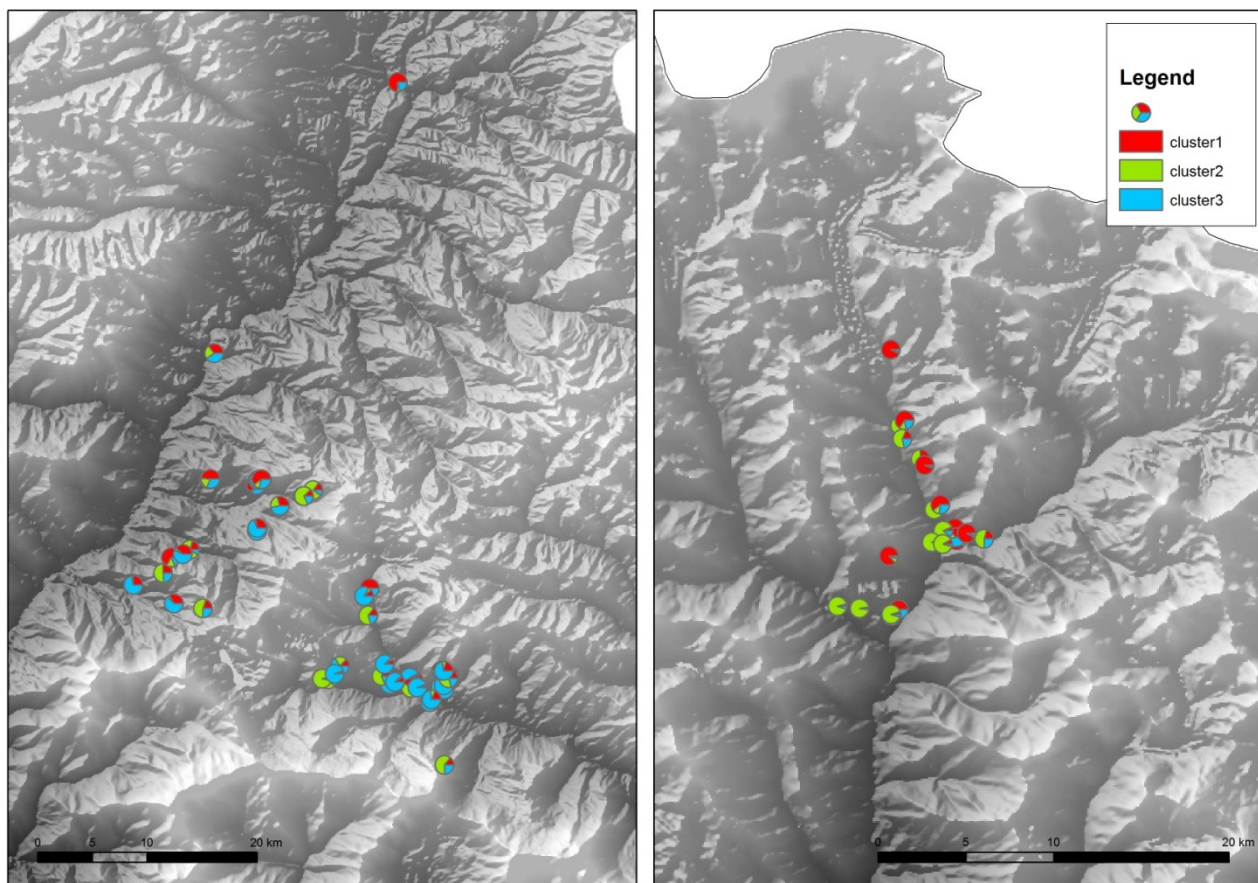


Graf 2: Parametr delta K získaný Evannovou metodou, na ose x počet klastrů

Při rozdělení vzorků levhartů sněžných na 3 klastry se ukazuje zřetelnější vzájemná genetická odlišnost mezi vzorky ve východní oblasti Nepálu v NP Sagarmatha, zatímco vzorky na západě Nepálu v oblastech Manang a Mustang (chráněná oblast Annapurna) většinou vykazují určitý podíl příslušnosti do jiných klastrů (obrázek 7) a nejsou vzájemně tak rozdílné.

Téměř všechny vzorky z oblasti Manang (jihovýchodní část západní oblasti) spadají do jednoho klastru, který se v určité míře objevuje také v jižním Mustangu, ale v NP Sagarmatha (východní oblast) se vyskytuje jen výjimečně. Vzorky v severním Mustangu klastrují se vzorky ze severu a také z východu NP Sagarmatha, zatímco jižní a západní části NP Sagarmatha tvoří samostatný klastr, který se sice také vyskytuje v Manangu i v jižním Mustangu, ale omezeně.

Při vyšších počtech klastrů se klastry v Manangu a Mustangu postupně rozpadají, zatímco v NP Sagarmatha se až do $K = 10$ udržuje určitá genetická struktura. Vzorky, které při $K = 3$ formují samostatný klastr na jihu a na západě NP Sagarmatha, zůstávají oddělené, stejně tak vzorky z východní oblasti. Pouze vzorky na severu národního parku vykazují příslušnost do více klastrů a nedají se tak s jistotou zařadit, stejně jako vzorky v Manangu a Mustangu. Při $K = 6$, které představuje dobře podpořené rozdělení, je částečně patrná genetická odlišnost mezi Manangem a Mustangem, v NP Sagarmatha jsou jasně odděleny jihozápadní a východní klastr, ostatní vzorky již nejsou jasně zařazené.



Obr. 7: Rozdělení vzorků levhartů sněžných pro $K = 3$ z programu Structure. Vlevo Manang a Mustang, vpravo NP Sagarmatha. Zobrazeno programem ArcMap na pozadí nadmořské výšky

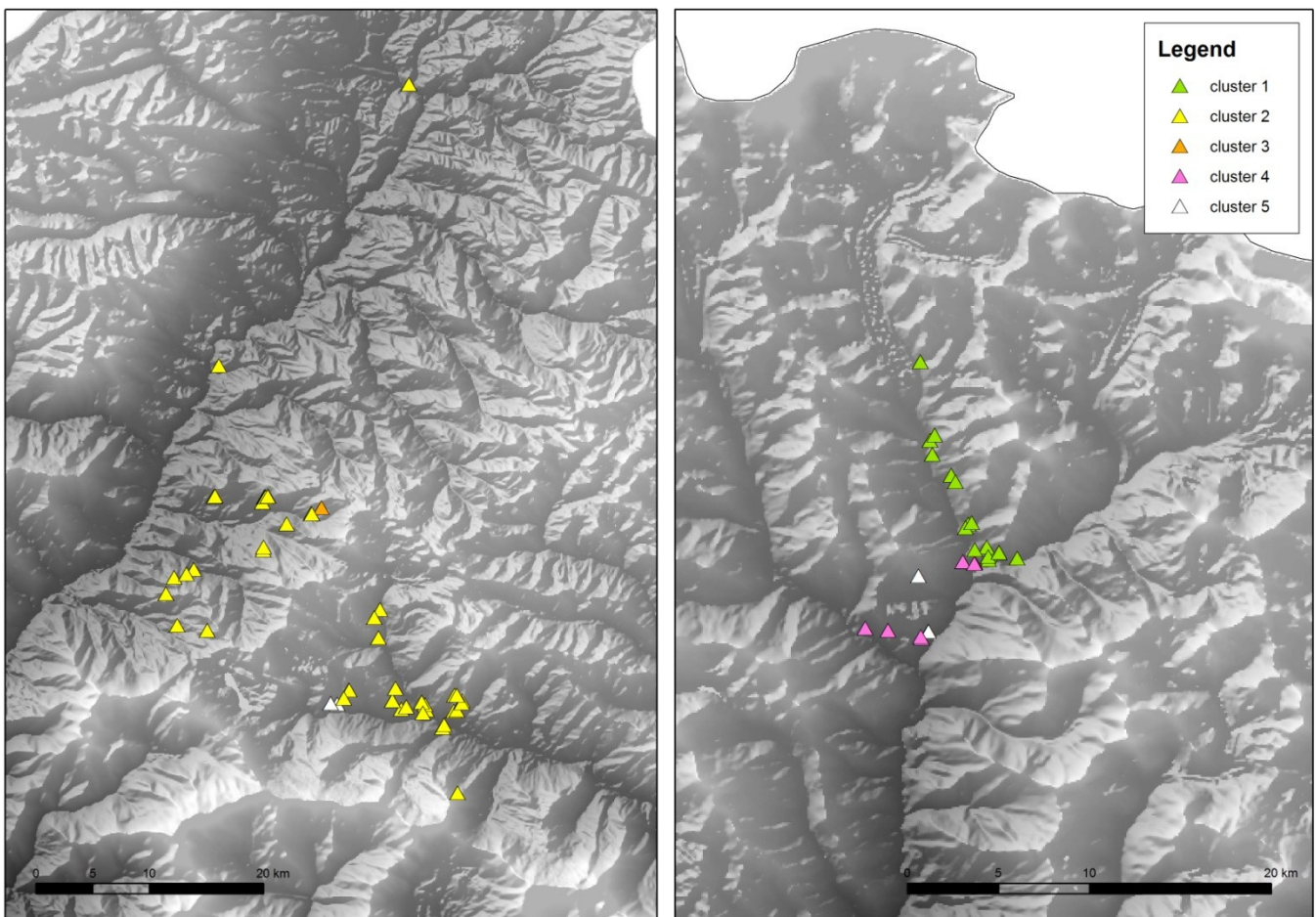
Podle výsledků Structure byly vzorky levhartů sněžných rozděleny na tři populace a byly pro ně spočítány základní charakteristiky programem GenAlex, pro tuto analýzu bylo ale použito jen 102 vzorků, opakující se vzorky byly vyřazeny, aby jimi výsledky nebyly ovlivněny (tabulka 3).

populace	N	Na	Ne	Ho	He	Fis
Manang+Mustang	70	9,000	3,000	0,542	0,632	0,141
Sagarmatha-jih	32	9,000	3,609	0,556	0,666	0,165
Sagarmatha-sever	30	5,167	2,715	0,610	0,533	-0,144

Tabulka 3: Popisné charakteristiky populací levhartů sněžných. N = počet jedinců, Na = počet alel, Ne = efektivní počet alel, Ho = očekávaná heterozygotita, He = pozorovaná heterozygotita, Fis = inbrední koeficient

3.1.4 Analýzy krajinné genetiky

Software Geneland určil podle datasetu se 102 vzorky počet klastrů levharta sněžného na pět, ve druhé analýze (obr. 8) pak rozdělil vzorky v NP Sagarmatha na východě Nepálu na tři paralelně ležící klastry a tři klastry určil také v chráněné oblasti Annapurna, kde dva vzorky (W-BS-SL1277 a W-BS-SL1282) byly zařazeny do klastru společně se vzorky z NP Sagarmatha (na obrázku 8 je tento klastr znázorněn bíle), do zvláštního klastru byl vydělen vzorek W-BS-SL1316 v severním Mustangu. Většina vzorků z Manangu a Mustangu byla přiřazena do jednoho klastru, který v NP Sagarmatha nemá zastoupení.



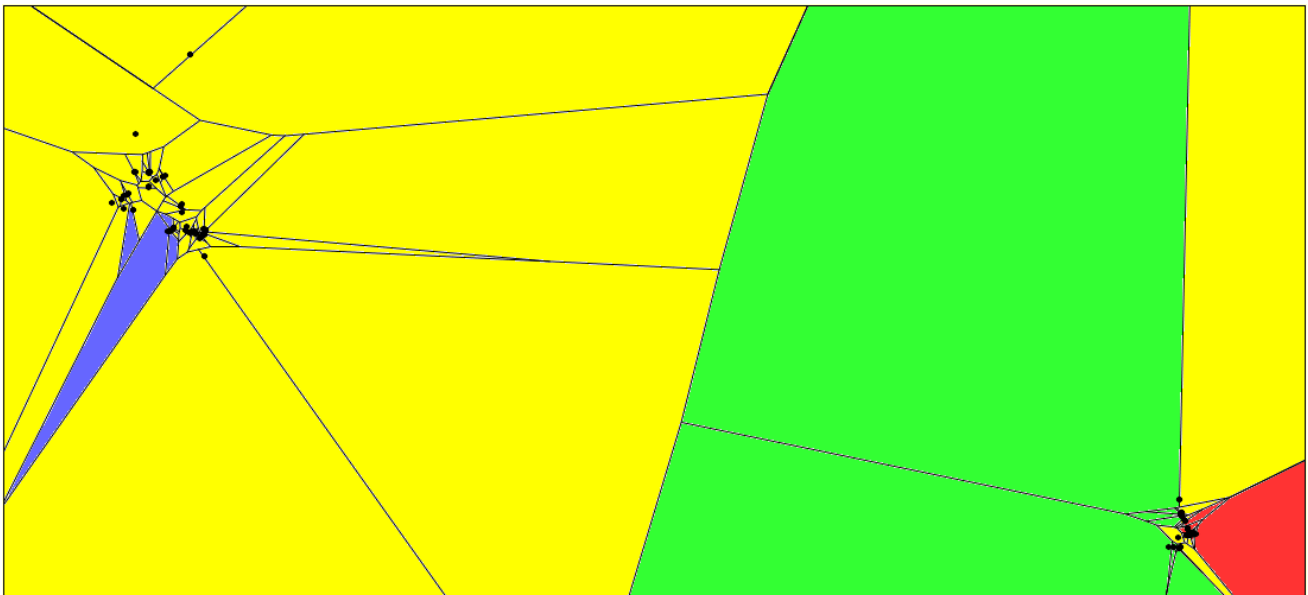
Obr. 8: Výsledky programu Geneland, ukazující příslušnost jednotlivých vzorků k určeným klastrům. Vlevo Manang a Mustang, vpravo NP Sagarmatha, zobrazeno programem ArcMap na pozadí nadmořské výšky

Program Tess určil $K = 4$ jako nejpravděpodobnější počet klastrů. Při $K = 2$ je většina vzorků z východní i západní oblasti zařazena do stejného klastru, vydělují se pouze vzorky v jihozápadní části NP Sagarmatha spolu s několika vzorky ze severozápadní části národního parku a také spolu s jedním vzorkem z Manangu (W-BS-SL1282).

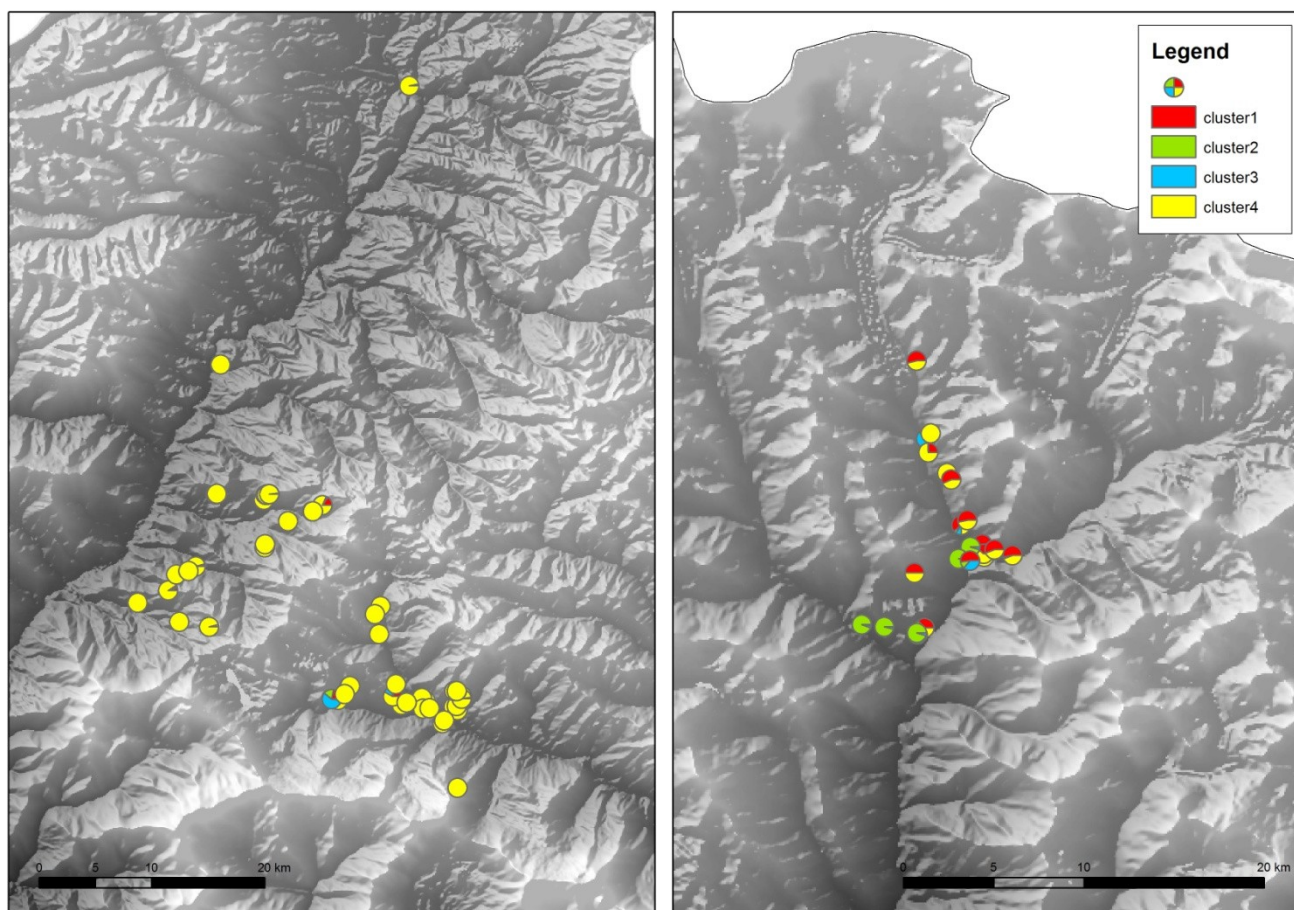
Při rozdělení datasetu na čtyři klastry jsou všechny vzorky z oblasti Manang a Mustang (s výjimkou vzorku W-BS-SL1282, který tvoří samostatný klaster) zařazeny do jednoho klastru a neobjevuje se u nich žádná nebo jen malá pravděpodobnost, že by příslušeli do jiného klastru. Do stejného klastru spadají i vzorky ze severní části NP Sagarmatha. Jihozápadní části NP Sagarmatha tvoří opět samostatný klaster a většina vzorků z centrální oblasti národního parku spadá pod čtvrtý klaster (na obr. 9 znázorněn červeně), nicméně u všech těchto vzorků je určitá pravděpodobnost, že přísluší do klastru společně se západní oblastí.

Při vyšších počtech klastrů zůstává tato struktura neměnná, pouze na severu NP Sagarmatha jsou některé vzorky nejasně zařazeny, tedy spadají do více klastrů, z nichž žádný nepřevládá.

A)



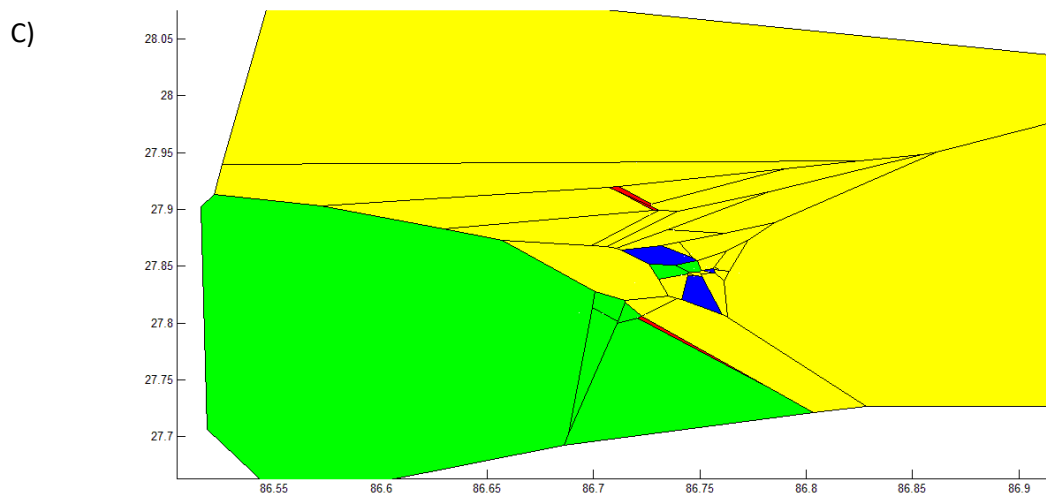
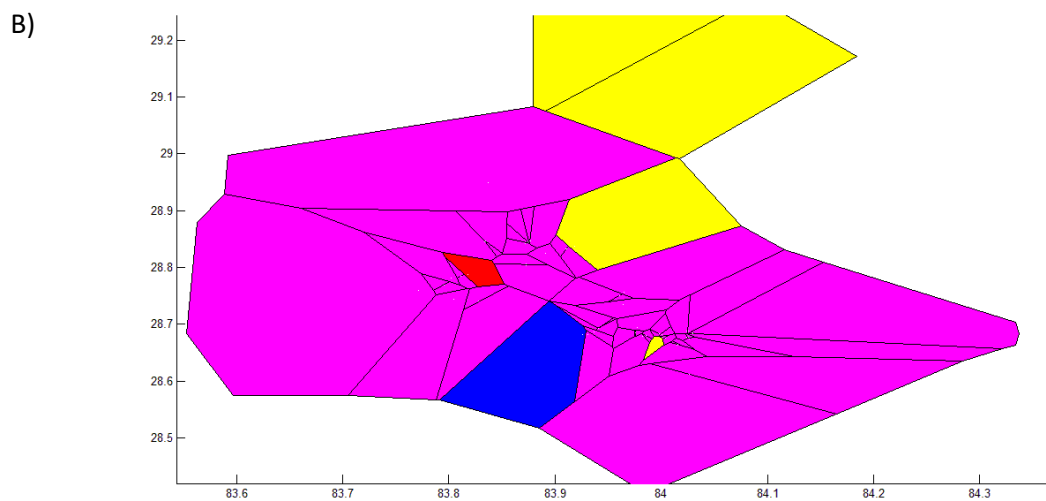
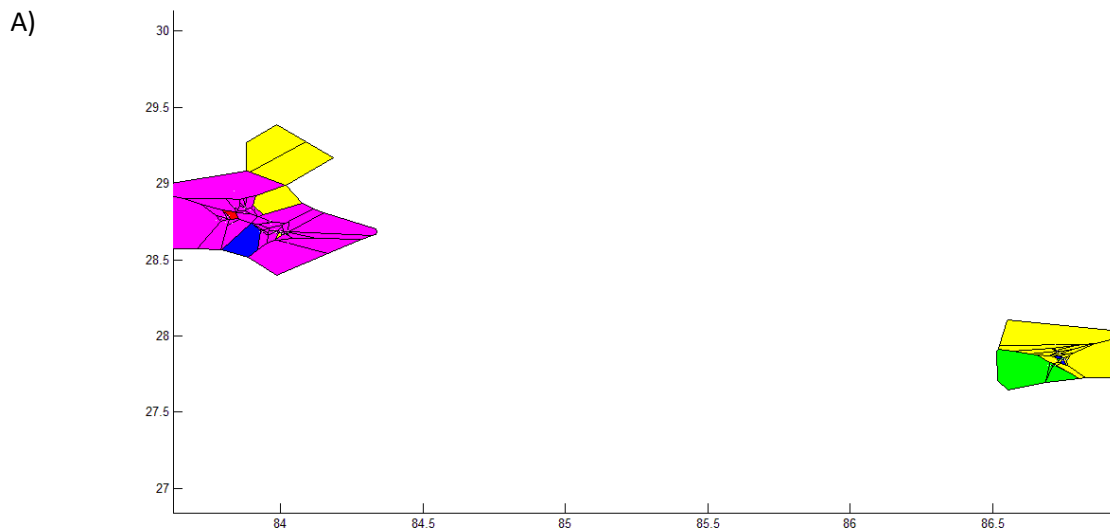
B)



Obr. 9: A) Teselace pro $K = 4$, program Tess B) Rozdělení vzorků levhartů sněžných do klastrů podle Tess, $K = 4$, zobrazeno v programu ArcMap na pozadí nadmořské výšky

Program Baps první analýzou odhalil v datasetu levhartů sněžných 5 klastrů, druhá analýza pak proběhla s počtem K zafixovaným na 5.

Stejně jako Geneland a Tess odlišil i Baps vzorek W-BS-SL1282 od ostatních vzorků v západní skupině, nicméně zařadil tento vzorek do jednoho klastru spolu s dalšími čtyřmi vzorky z východní skupiny (viz obrázek 10). Stejně tak vzorek W-BS-SL1315 je jediný ze svého klastru, který má zastoupení v západní oblasti. Ve východní oblasti je oddělena jihozápadní skupina, stejně jako podle výsledků Structure, Genelandu a Tessu. Většina vzorků ve východní oblasti však spadá do klastru, který je sdílen vzorky ze severního Mustangu (na obr. 10 je tento klaster znázorněn žlutě). Naprostá většina vzorků z Manangu a Mustangu je však řazena do jednoho klastru, který na východě Nepálu v NP Sagarmatha nemá žádné zastoupení.



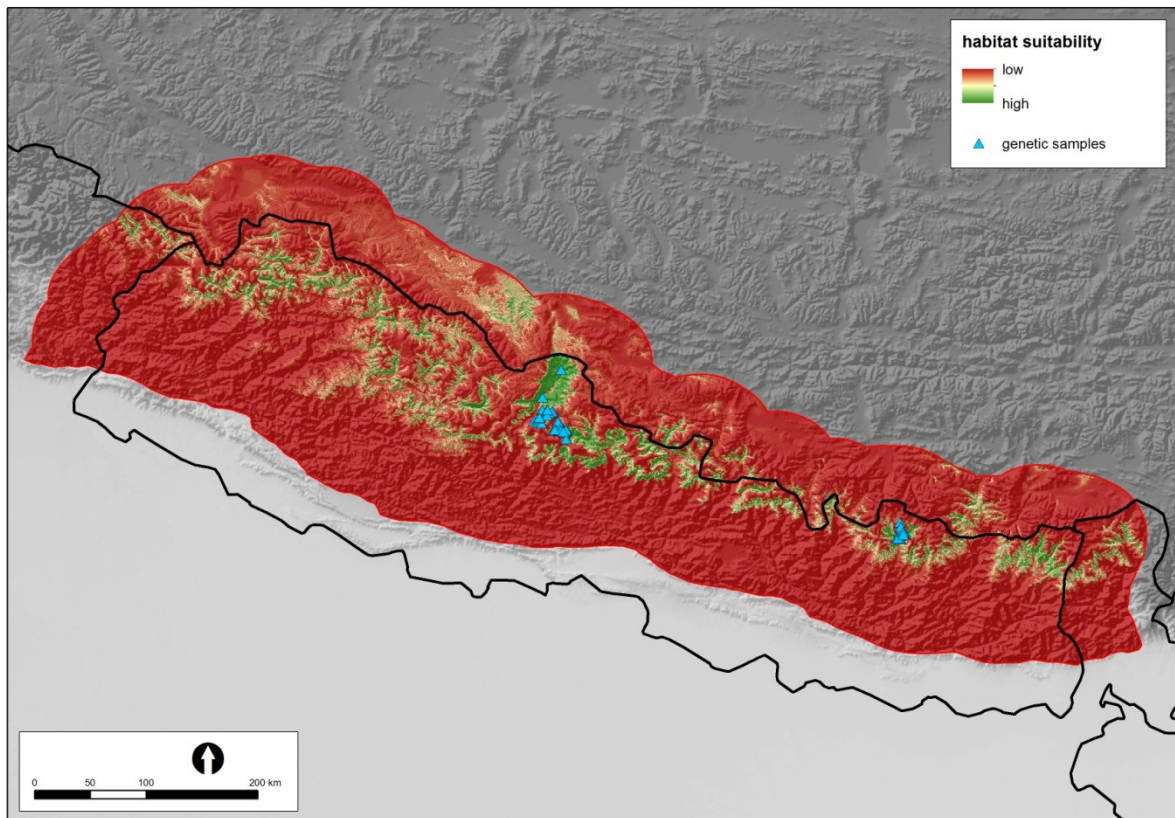
Obr. 10: Výsledky teselace z programu Baps. Modrá buňka v západní skupině představuje vzorek W-BS-SL1282, červená vzorek W-BS-SL1315. Na osách x a y jsou znázorněny zeměpisné souřadnice. A) celý dataset, B) západní skupina, C) východní skupina

3.1.5 Analýzy konektivity

První analýza v programu Maxent odhalila, že prediktory nejvýznamněji určující vhodnost habitatu levhartů sněžných jsou průměrná nadmořská výška a průměrná roční teplota, dále v menší míře roční úhrn srážek a vzdálenost od silnic, částečně vhodnost ovlivňuje také typ krajinného pokryvu, solární radiace a rozsah teplot.

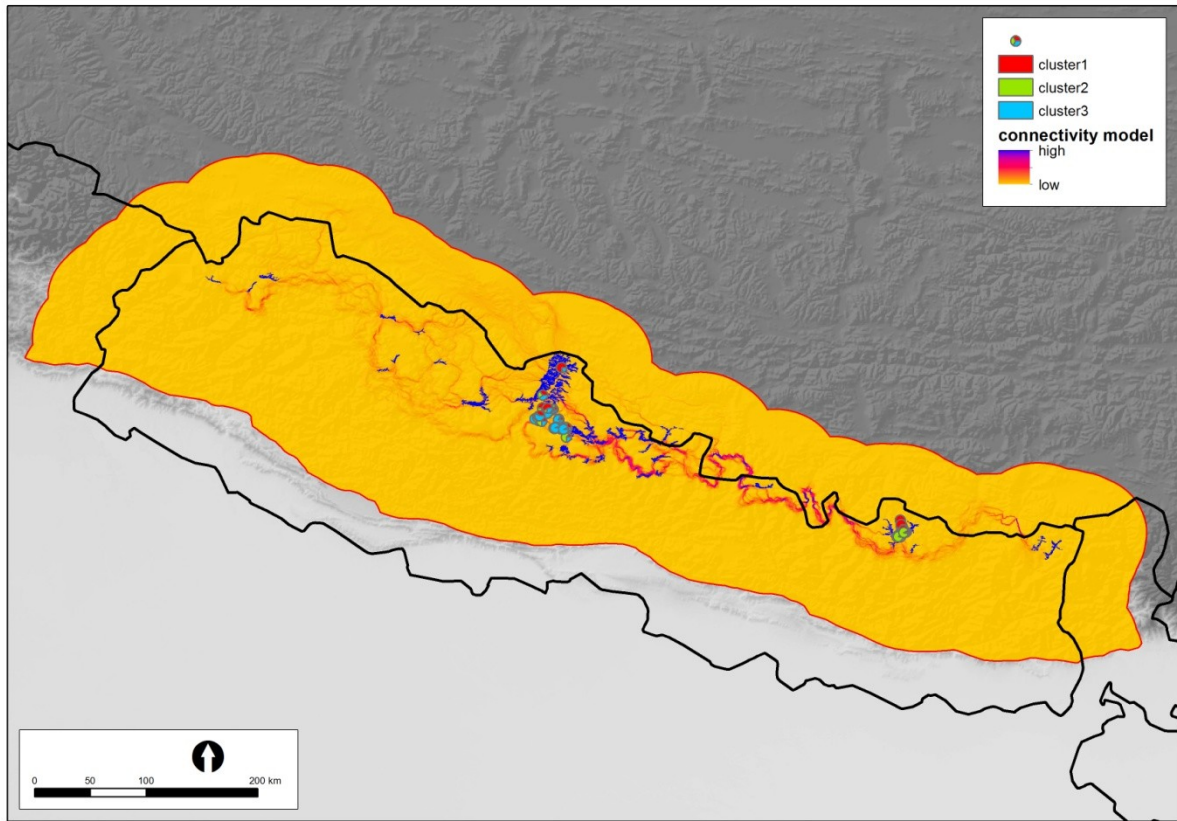
Druhou analýzou v Maxentu, pouze s významnými prediktory, byl vytvořen model habitatové vhodnosti (obrázek 11).

Programem Circuitscape byla spočtena matice rezistenčních vzdáleností mezi páry vzorků. Grafické znázornění konektivity (obr. 12) proběhlo propojením 34 jádrových oblastí (příloha 3).

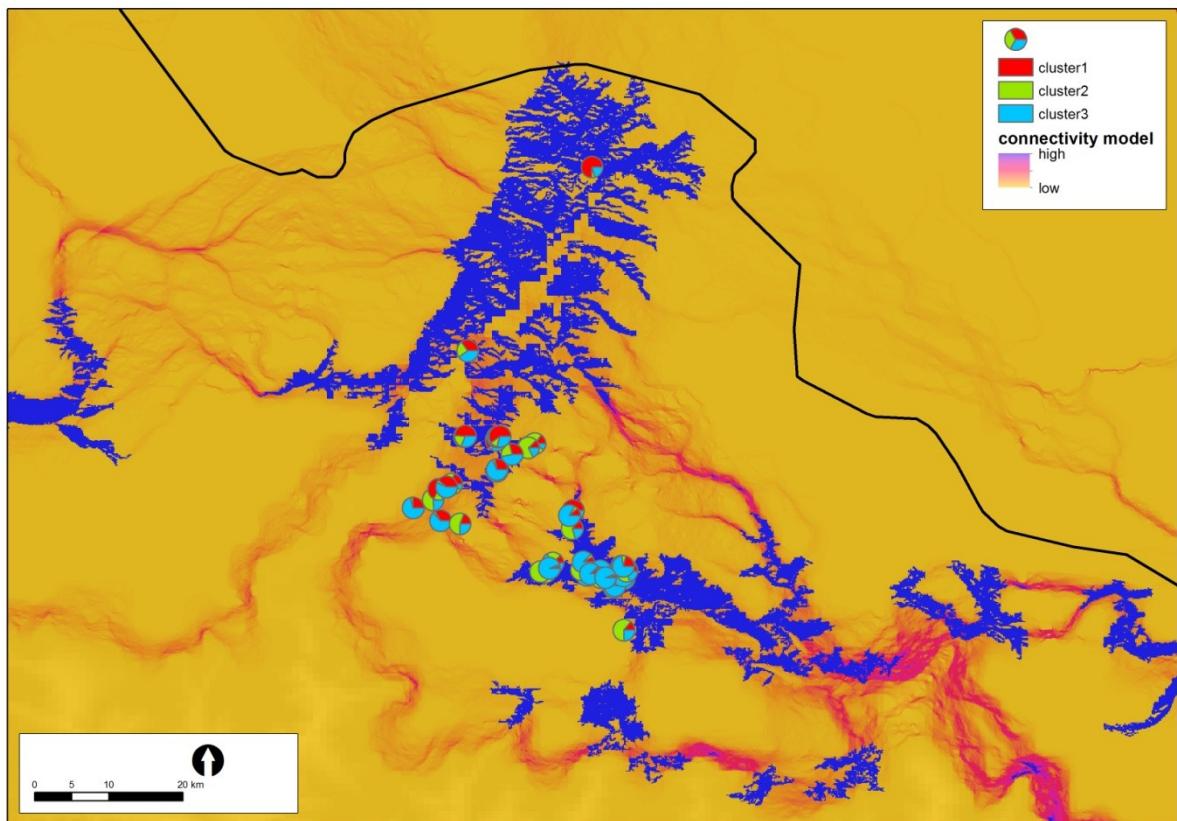


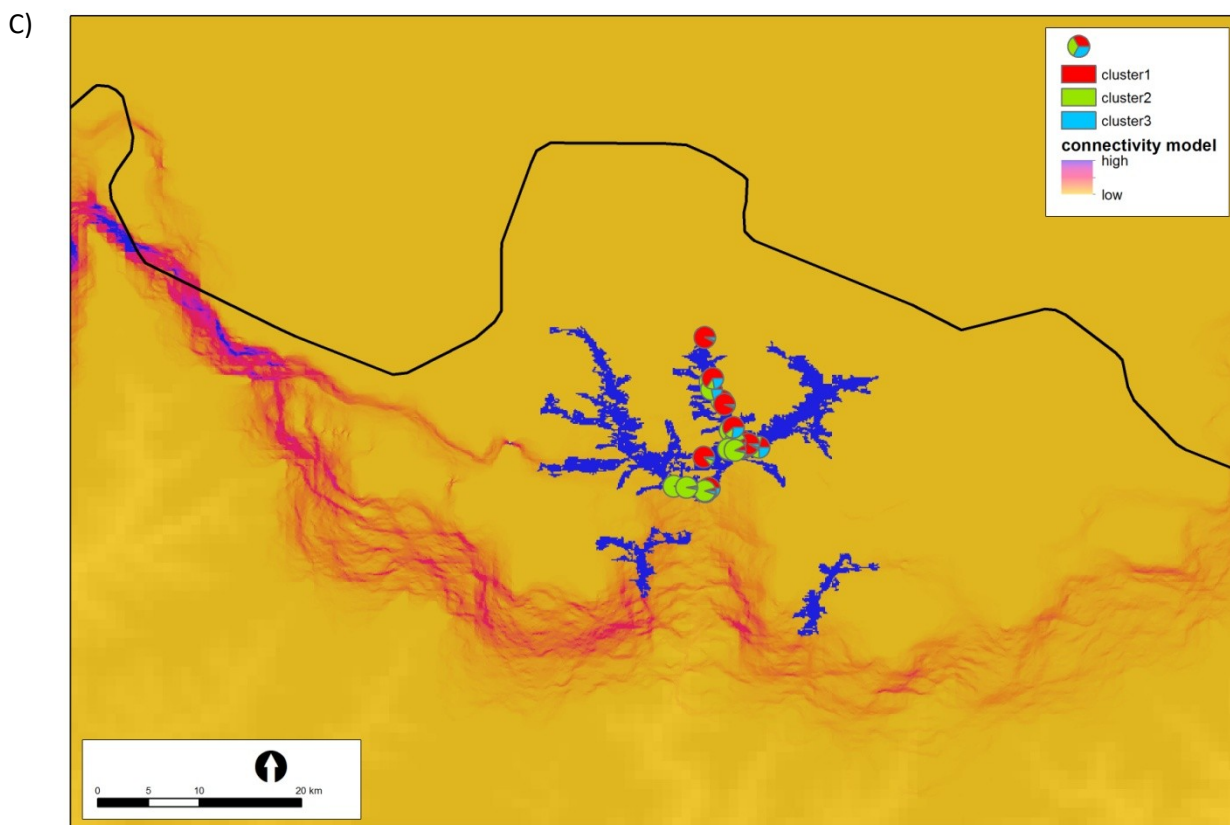
Obr. 11: Model habitatové vhodnosti pro levharty sněžné. Zelená = vysoká vhodnost, červená = nízká vhodnost. Modré trojúhelníčky představují genetické vzorky

A)



B)





Obr. 12: Znárodnění konektivity mezi 34 jádrovými oblastmi levharta sněžného v Nepálu, zobrazeny genetické vzorky s výsledky programu Structure pro $K = 3$. A) celý Nepál, B) Manang a Mustang, C) Sagarmatha

3.1.6 Analýza IBD a IBR

Srovnání genetických vzdáleností F_{ST} s geografickými vzdálenostmi ukázalo slabý vztah mezi genetickou odlišností a vzdáleností ($r = 0,14924$; $Z = 867797688,53385$; $p < 0,001$), potvrzuje se slabý vliv izolace vzdáleností (IBD). Test izolace rezistencí (IBR) vykazuje podobně slabou korelaci ($r = 0,15785$; $Z = 455729,95660$; $p < 0,001$), izolace rezistencí se tedy také slabě podílí na genetické struktuře levharta sněžného.

3.2 Vlk obecný – mikrosatelitová a mitochondriální data

3.2.1 Identifikace vzorků

Z celkových 326 vzorků bylo jako vlk obecný identifikováno 288 vzorků, na základě výsledků Structure pro $K = 2$ byli vyřazeni psi. Dataset lze rozdělit geograficky na nížinnou, karpatskou a alpskou populaci. Pro alpskou populaci jsou k dispozici pouze mitochondriální data, tito vlci nejsou zahrnuti do mikrosatelitových analýz.

250 z 288 vzorků vlků bylo použito pro mikrosatelitové analýzy. Jednalo se o 166 invazivních vzorků (165 vzorků pocházejících z tkání a jeden vzorek v krve) a 84 vzorků z trusu. Z těchto vzorků 49 pochází z nížinné populace (Polsko a osm vzorků ze severních Čech – Liberecko, Broumovsko, Kokořínsko), 201 vzorků pochází z karpatské populace (Slovensko, východ ČR, Polské Beskydy a Rumunsko).

Pro analýzy mitochondriální DNA bylo použito celkem 257 vzorků, z toho 92 neinvazivních vzorků pocházejících z trusu a dále 165 invazivních vzorků (164 tkáňových vzorků, 1 krevní vzorek). 44 vzorků geograficky přísluší k nížinné populaci, 175 ke karpatské a 38 vzorků z Rakouska formuje alpskou populaci.

Na základě mitochondriálních sekvencí byly vlkům přiřazeny haplotypy (tabulka 4) (Hulva et al. 2018), značení haplotypů je podle Pilot et al. (2010). V Polské nížině se vyskytovaly téměř pouze haplotypy z rozšířenější haploskupiny 1 (haplotypy W1 a W2), v Karpatech převládá haploskupina 2 (W6, W14, W22) (Pilot et al. 2010). V Rakousku se vyskytovaly haplotypy z haploskupiny 1 (W23) i z haploskupiny 2 (W6, W22). Na Slovensku byly kromě haplotypů z haploskupiny 2 nalezeni tři jedinci s haplotypem W1 (blízko NP Slovenský Kras) a 15 jedinců s haplotypem W2 (v blízkosti přehrady Orava). Vlci ze severu České republiky mají haplotypy W1 a W2, tedy stejné, jako vlci v Polské nížině. Naopak vlk z Vysočiny nese „karpatský“ haplotyp W14.

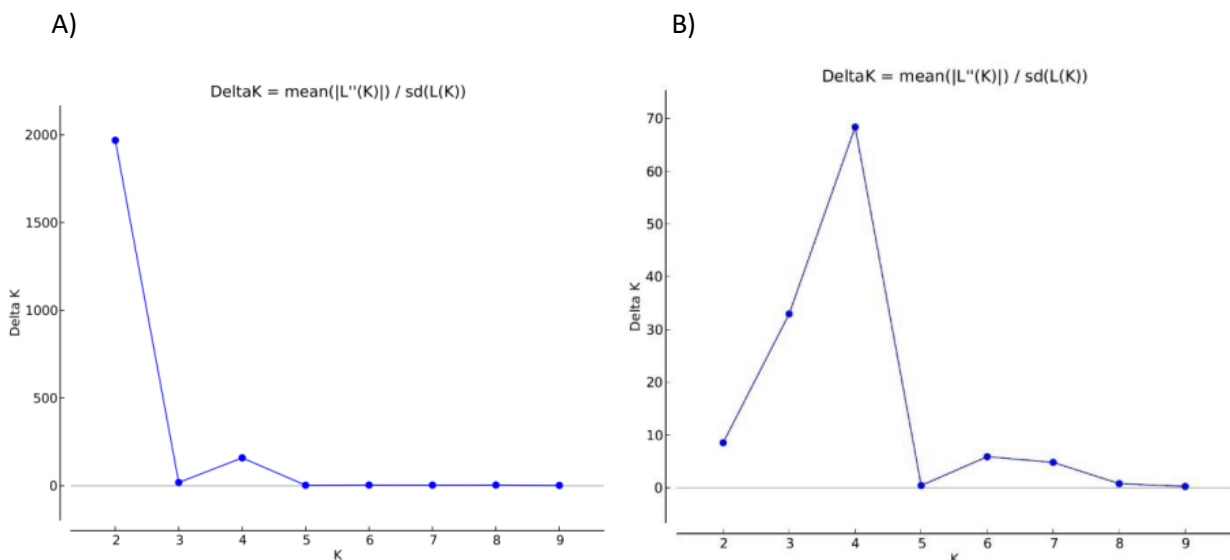
Haploskupina	Haplotyp	Výskyt
1	W1	Polská nížina, sever ČR, Slovensko - Volovské Vrchy a Slovenske Rudohorie
	W2	Polská nížina, sever ČR, Slovensko - Kysucké Beskydy, Oravská Magura
	W3	Polská nížina
	W4	Rumunsko - Východní Karpaty
	W7	Rakousko
	W23	Rakousko
2	W6	Polské Beskydy, Polská nížina, Moravskoslezské Beskydy, Slovensko, Rakousko
	W14	Polské Beskydy, Vysočina, Slovensko, Rumunsko - Munții Apuseni
	W22	Rakousko

Tabulka 4: Identifikované haplotypy a jejich zastoupení (Hulva et al. 2018)

Pohlaví bylo zjišťováno pomocí kitu, který obsahoval lokusy mikrosatelitů, je tedy určeno pro těchto 250 vzorků. Pohlaví se podařilo určit u 228 vzorků z 250. Poměr samic a samců je 1:1,26 – tedy na sto samic připadá 126 samců. Poměr pohlaví pro nížinnou populaci je 1:1,32 a poměr pohlaví pro karpatskou populaci je 1:1,24.

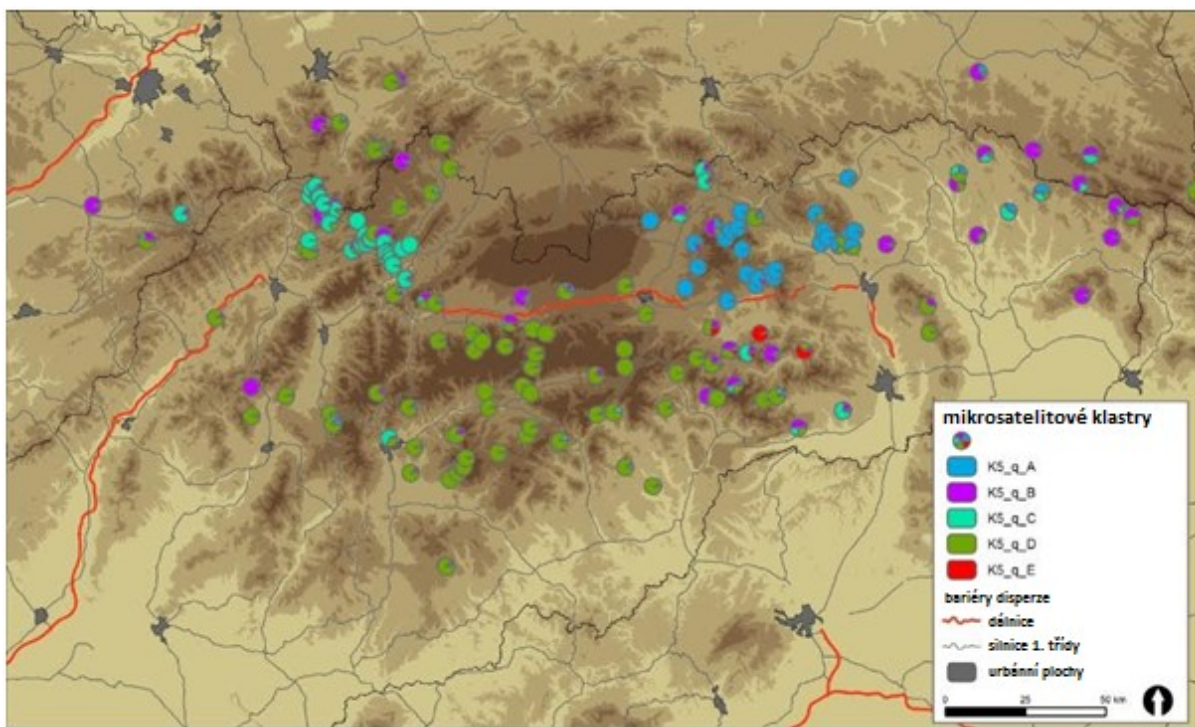
3.2.2 Populačně genetické analýzy

V programu Structure mělo nejvyšší podporu rozdělení mikrosatelitového datasetu na dva klastry, kdy se jasně oddělila nížinná populace od karpatské (graf 3A), samostatná analýza pouze karpatských vzorků ukázala v Karpatech čtyři klastry (graf 3B). Celkem jsou tedy vlci na studovaném území rozdělení do pěti klastrů – nížinná populace a čtyři klastry v Karpatech.



Graf 3: A) Delta K pro celý dataset vlků, B) Delta K pro karpatské vlky

Analýza pro $K = 5$ potvrdila oddělení nížinné a karpatské populace. V Karpatech byly určeny čtyři samostatné klastry v oblasti Oravy, Levočských vrchů, východního Slovenska a centrálního Slovenska. Dále byli v Karpatech odlišeni tři jedinci, kteří jsou geneticky bližší nížinným vlkům, všichni tři nesou zároveň haplotyp W1, typický pro vlky v polské nížině (obr. 13). Vlci z Rumunska spadají do jednoho klastru s vlky z východního Slovenska a při $K = 9$ se oddělují ve vlastním klastru (Hulva et al. 2018).



Obr. 13: Rozdělení vlků na Slovensku, v Polských Beskydech a Moravskoslezských Beskydech do mikrosatelitových klastrů podle programu Structure, výsledek pro $K = 5$. Červeně jsou odlišeni tři jedinci spadající do nížinného klastru, světle modře pak druhá enkláva nížinných vlků

Analýza alelických frekvencí a heterozygoty podle výsledků Structure pro $K = 2$ (nížinná a karpatská populace) z programu GenAlex a základní charakteristiky haplotypů pro nížinnou, karpatskou a alpskou populaci z programu FSTAT jsou zobrazeny v tabulce 5.

A)

populace	N	Na	Ne	Ho	He	Fis
nížinná	50	7,667	4,236	0,704	0,744	0,063
karpatská	200	9,444	4,224	0,694	0,733	0,057

B)

populace	N	Nh	Hd	Np	π	Tajima's D	Fu's FS
nížinná	44	4	0,511	14	0,01252	-0,08416	5,36
karpatská	175	4	0,218	11	0,0078	0,11238	5,337
alpská	38	5	0,663	9	0,01196	1,2828	3,454

Tabulka 5: Charakteristiky populací, A) mikrosatelity, N = počet jedinců, N_a = počet alel, N_e = efektivní počet alel, H_o = očekávaná heterozygotita, H_e = pozorovaná heterozygotita, F_{is} = inbrední koeficient B) mitochondrie, N = počet jedinců, N_h = počet haplotypů, H_d = haplotypová diverzita, N_p = počet polymorfních míst, π = nukleotidový polymorfismus, Tajima's D a Fu's FS označují neutralitu alel

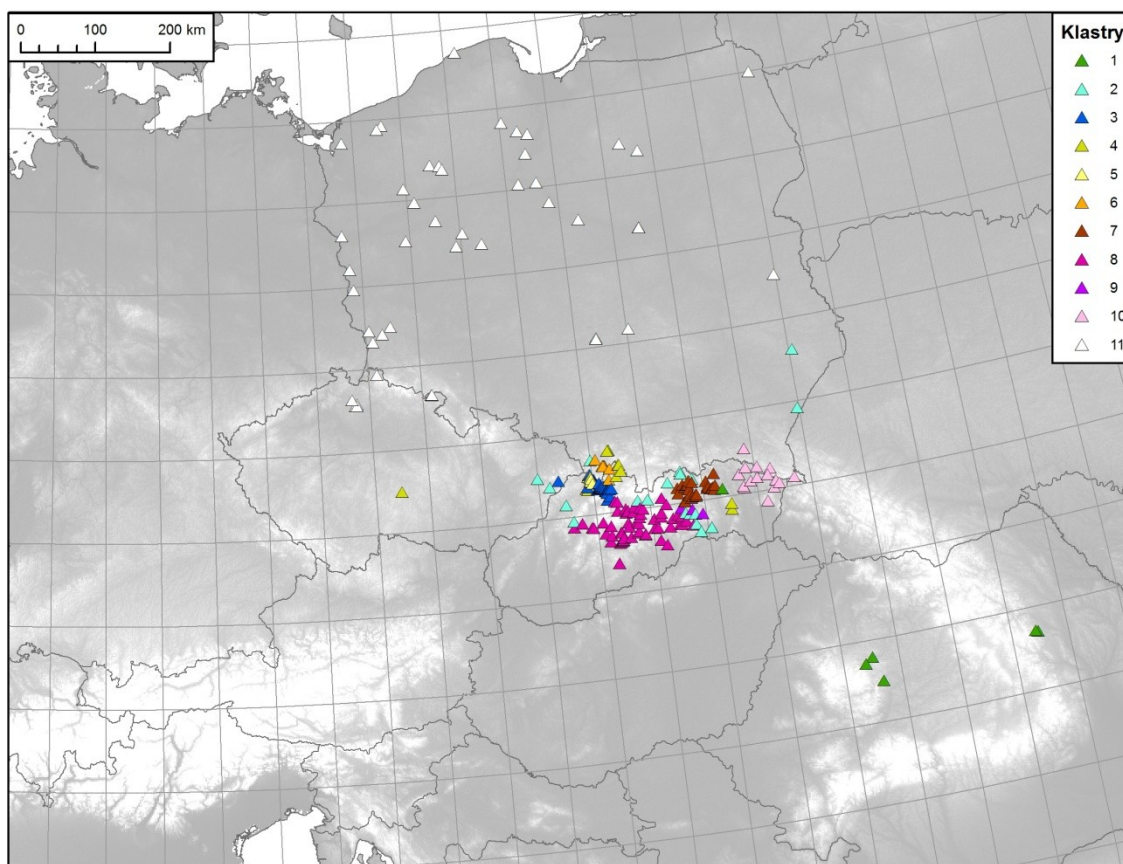
3.2.3 Analýzy krajinné genetiky

Analýza mikrosatelitového datasetu v softwaru Geneland, sloužící ke zjištění počtu klastrů, proběhla pro rozsah klastrů 1-20, protože předchozí analýza v rozsahu 1-10 určila ve všech deseti opakováních výsledný počet klastrů na 10. V analýze s maximálním počtem klastrů 20 určil Geneland počet klastrů nejednoznačně (tabulka 6), nejvyšší posteriorní pravděpodobnost vyšla pro $K = 16$, nicméně v deseti opakováních byl nejčastěji zastoupeným výsledkem $K = 11$, navíc pokud je počet buněk v teselaci příliš velký, Geneland se chová jako by klastry byly rozmístěny náhodně a nezávisle na sobě (Guillot, Estoup, et al. 2005). Proto bylo pro druhou analýzu zvoleno 11 klastrů.

Run	Number of populations	Average log posterior probability
9	16	12474.66669
5	14	7165.242203
1	13	6568.776034
7	13	4523.565030
10	11	2767.405046
2	11	1955.934622
8	11	1536.303985
3	11	1061.680459
6	10	883.9776209
4	10	207.3881453

Tabulka 6: Deset opakování analýzy v Genelandu s výslednými počty klastrů (number of populations), seřazeno dle průměrné logaritmované posteriorní pravděpodobnosti (average log posterior probability)

Většina vlků z polské nížiny byla Genelandem zařazena do jednoho klastru (výjimku tvoří vlci na východě Polska), karpatská populace (zvláště Slovenské a Polské Beskydy) je tvořena mnoha menšími klastry (obr. 14). Tento výsledek koresponduje s výsledkem ze Structure a zároveň částečně odpovídá rozmístění haplotypů. Vlky ze severu Čech Geneland zařadil do nížinného klastru, zatímco vlk z Vysočiny je zařazen ke klastrům na Oravě a na východním Slovensku.

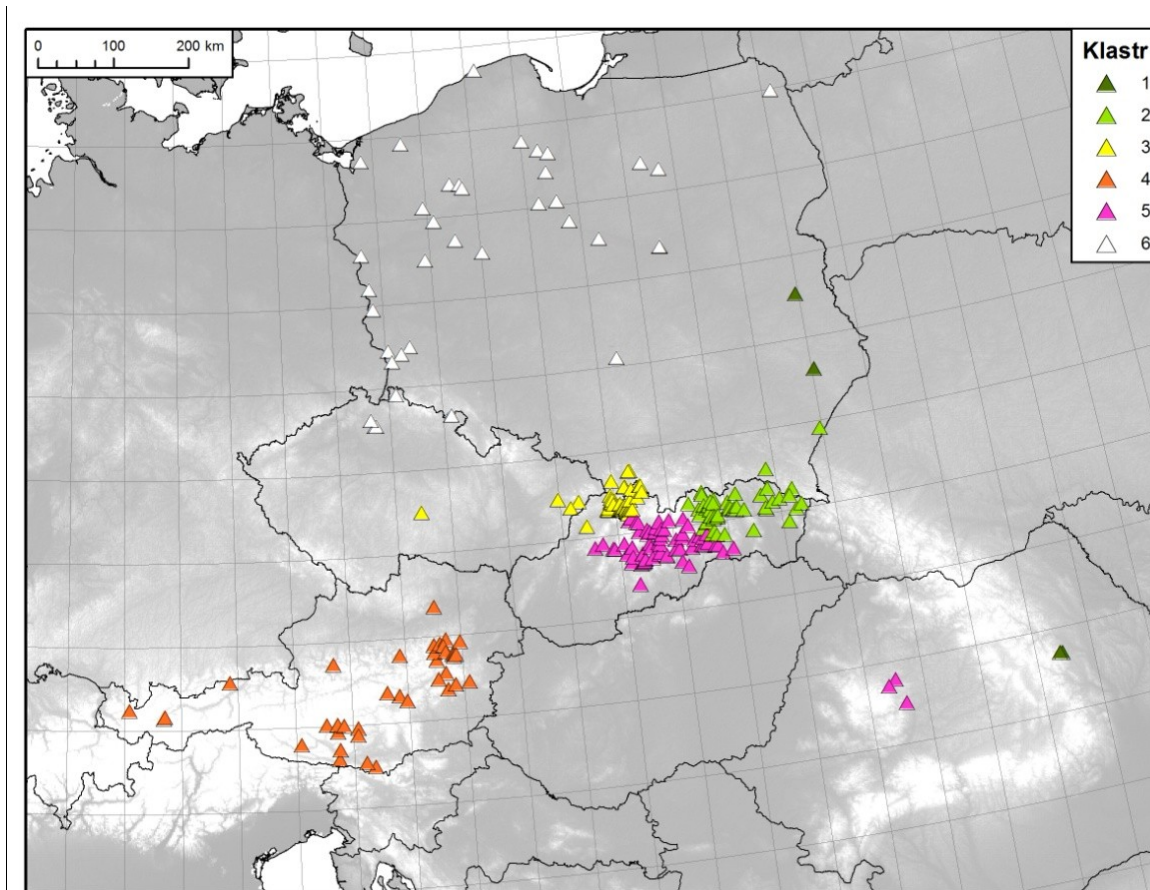


Obr. 14: Mapa příslušnosti ke klastru z programu Geneland, mikrosatelitový dataset, $K = 11$. Výsledek zobrazený v systému ArcMap na pozadí nadmořské výšky a státních hranic

V případě mitochondriálního datasetu rozdělil Geneland vzorky do šesti klastrů ve všech deseti opakováních první analýzy. Ve druhé analýze bylo tedy zafixováno $K = 6$. Na mitochondriálním datasetu tedy Geneland odhalil méně komplexní strukturu, než na mikrosatelitovém, nicméně stejně jako u mikrosatelitového datasetu je jasně oddělena populace v nížinném Polsku.

V rámci Slovenska byly odhaleny tři klastry, dva z nich odpovídají distribuci haplotypů W6 a W14, třetí, západní, klastr je v oblasti Oravy, kde se kromě dvou karpatských haplotypů vyskytují i vlci s nížinným haplotypem W2. K západnímu klastru patří i vlci z Moravskoslezských Beskyd a také vlk z Vysočiny (obr. 15).

Munții Apuseni v Rumunsku klastrují s jižním Slovenskem. Východní Karpaty, které nesou haplotypy vyskytující se ve stepních populacích východní Evropy, pak klastrují se vzorky z východu Polska, kde se vyskytují haplotypy stejného původu.

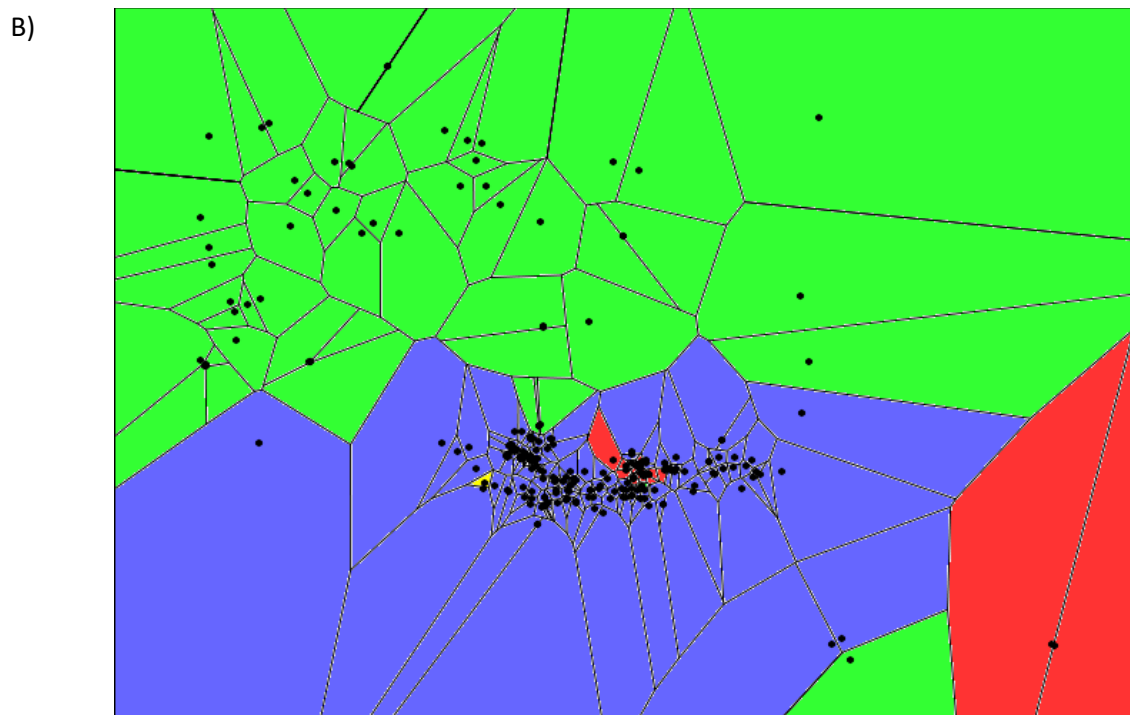
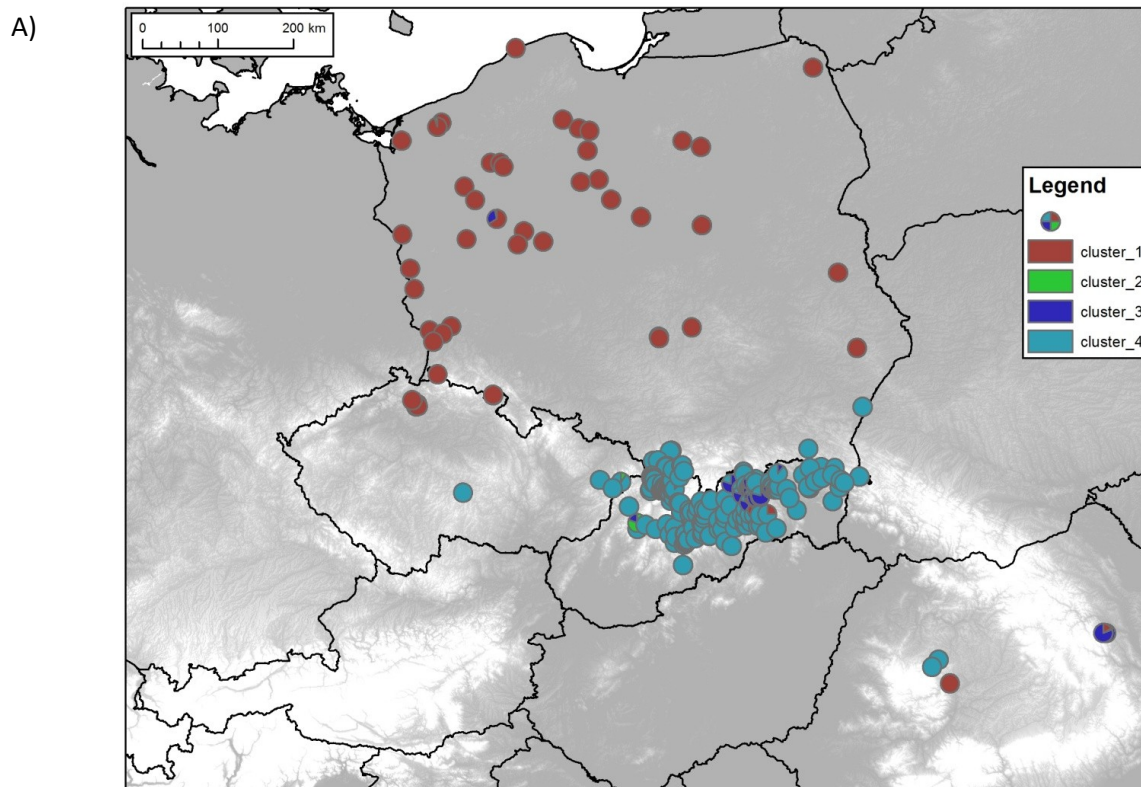


Obr. 15: Výsledek teselace mitochondriálních dat podle Genelandu, $K = 6$, zobrazeno v programu ArcMap na pozadí státních hranic a nadmořské výšky

V programu Tess se při rozdělení mikrosatelitového datasetu na dva klastry oddělila polská nížina od Karpat s výjimkou vzorků v rumunských Východních Karpatech a jednoho vzorku v rumunských Západních Karpatech (Munții Apuseni), které byly zařazeny do klastru společně s nížinnými vzorky (příloha 4). Důvodem je malý počet klastrů, při vyšším počtu klastrů tyto vzorky klastrují s později odděleným klastrem ve slovenských Karpatech.

Vlci ze severu Čech jsou řazeni k nížinné populaci, vlk z Vysočiny klastruje s karpatskou populací.

Při rozdělení datasetu na tři a více klastrů se začíná rozdělovat karpatský klastr, oddělují se vzorky z Levočských vrchů. Vzorky z Munții Apuseni klastrují se Slovenskem, vzorky z Východních Karpat s Levočskými vrchy. Největší podporu má rozdělení na $K = 4$, kdy se samostatně vyděluje vzorek D403 ze Strážovských vrchů (obr. 16). Při $K = 7$ a více se samostatně vydělují vzorky v severozápadním Slovensku (Kysucká Vrchovina, Orava).



Obr. 16 : A) Rozdělení mikrosatelitových vzorků z programu Tess s nejvyšší podporou pro $K=4$. Zeleně vyznačený vzorek na západě Slovenska se vyděluje do samostatného klastru

B) Teselace mikrosatelitových vzorků pro $K=4$ z programu Tess. Vzorek ze západního Slovenska je vyznačen žlutě

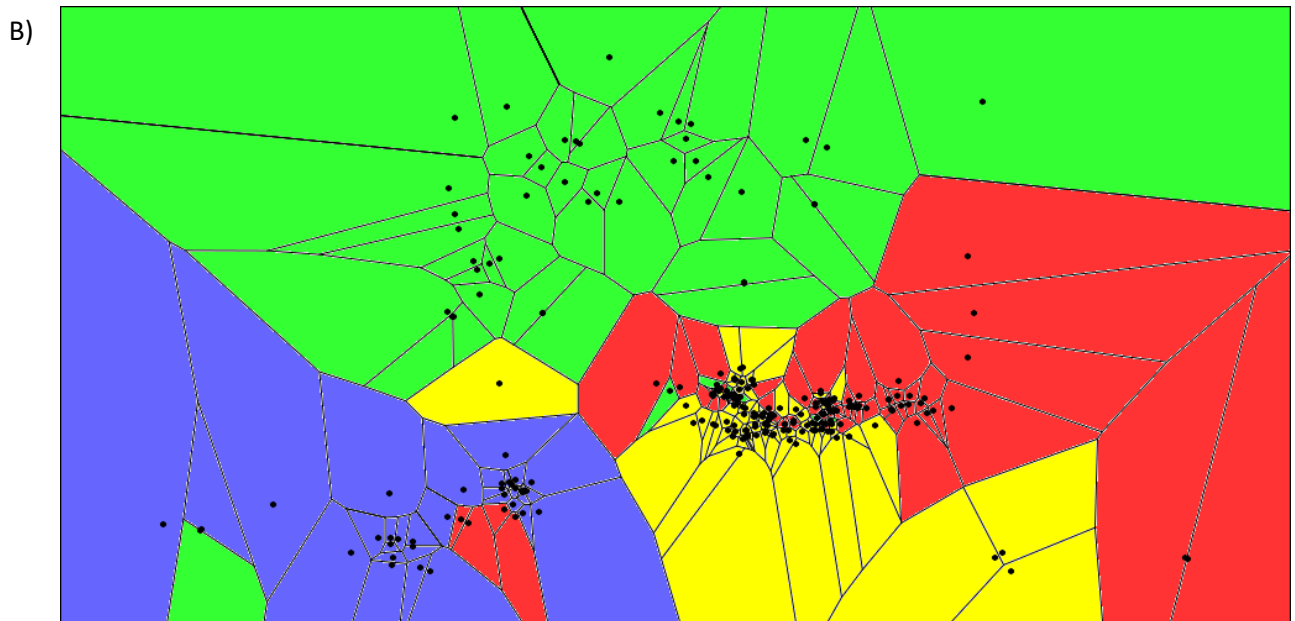
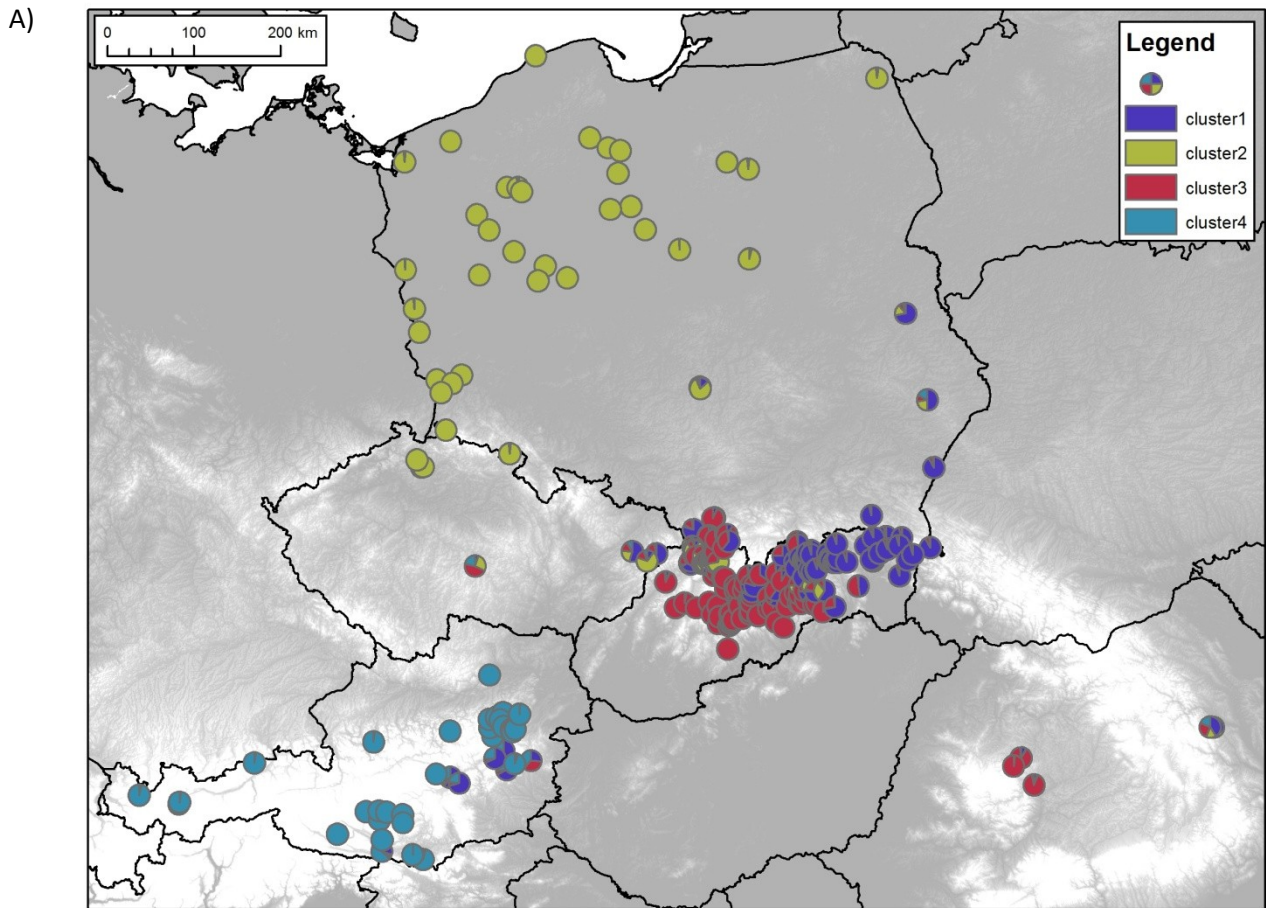
Program Tess pracuje pouze s maximálním možným počtem klastrů, proto například při $K = 5$ je u některých vzorků určitá procentuální pravděpodobnost příslušnosti do pátého klastru, tato pravděpodobnost však nepředstavuje většinu, proto při konečné teselaci jsou znázorněny jen čtyři klastry. To je případ vzorků z Kysucké Vrchoviny, které se částečně oddělují již od $K = 5$, plně však teprve při $K = 7$.

Tess pro mitochondriální dataset při $K = 2$ také ukazuje oddělení Karpat od polské nížiny. Všechny rumunské vzorky pak Tess řadí ke karpatské populaci. Rakouská populace, která se skládá z nositelů více různých haplotypů, při $K = 2$ klastruje nejasně s nížinnými vlky a při $K = 3$ tvoří samostatný klastr. U části východoslovenských vlků je při $K = 3$ určitý podíl genetické informace shodný s rakouským klastrem, nížinní vlci z Polska jsou jednoznačně odděleni.

Největší podporu má opět, stejně jako u mikrosatelitového datasetu, rozdělení mitochondriálního datasetu na čtyři klastry (obr. 17). Polská nížina a Rakousko tvoří samostatné klastry (s výjimkou několika vzorků ve východním Polsku, které patří do východoslovenského klastru), Slovensko se dělí na dva klastry – východní a západní. Do západního klastru patří i vzorky z rumunských Západních Karpat, do východoslovenského klastru vzorky z Východních Karpat.

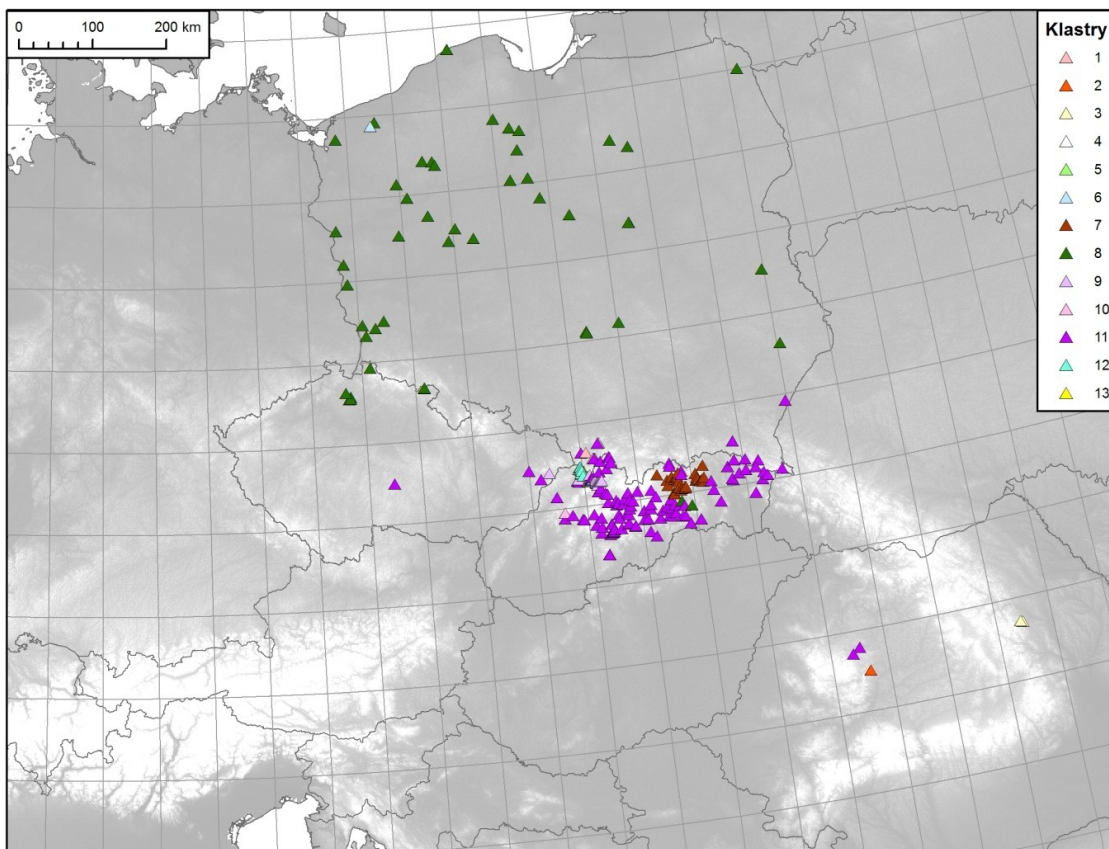
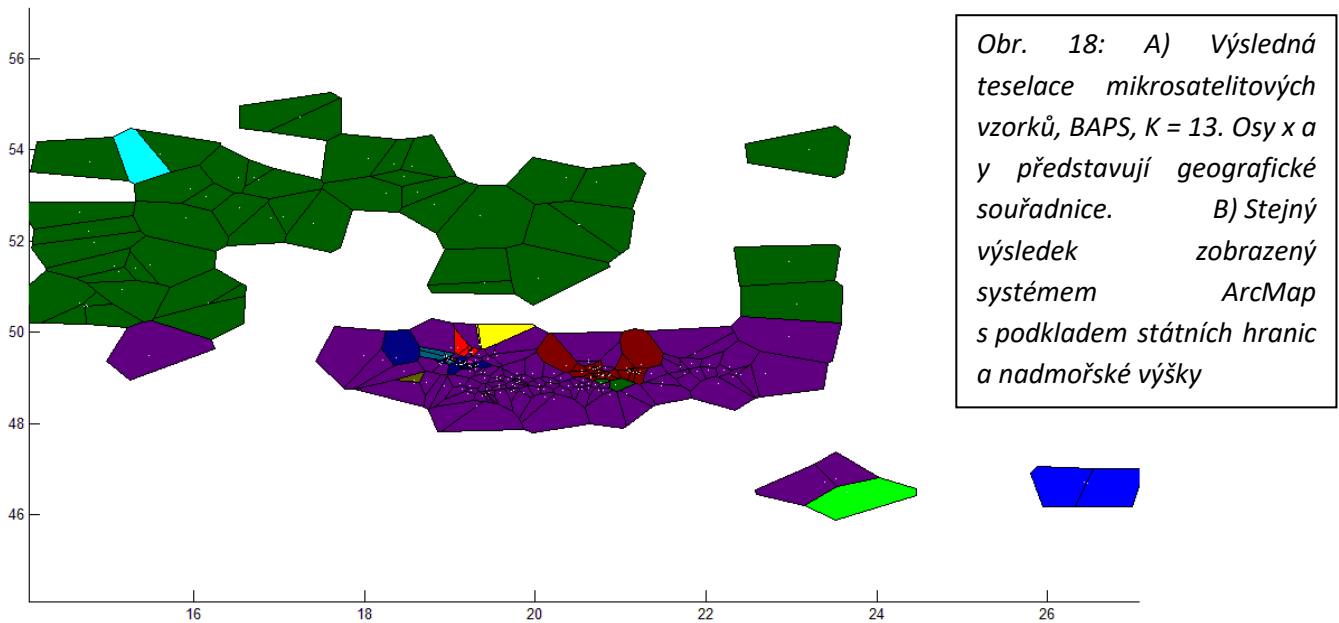
Při rozdělení na 5 a více klastrů se již žádné nové klastry nevytvářejí, pouze jednotlivé vzorky kromě převládajícího klastru menšinově přísluší i do dalších klastrů, případně je rozdělení rovnoměrné a vzorek se nedá do žádného klastru s jistotou zařadit.

Mikrosatelitová data ukazují Slovensko jako geneticky poměrně homogenní a Východní Karpaty jako geneticky zcela odlišný klastr. Oproti tomu mitochondriální data rozdělují Slovensko na dvě skupiny a vzorky z Východních Karpat řadí do jedné z nich. Oddělení Polska je shodné u obou datasetů, rakouské vzorky jsou k dispozici jen pro mitochondriální dataset.

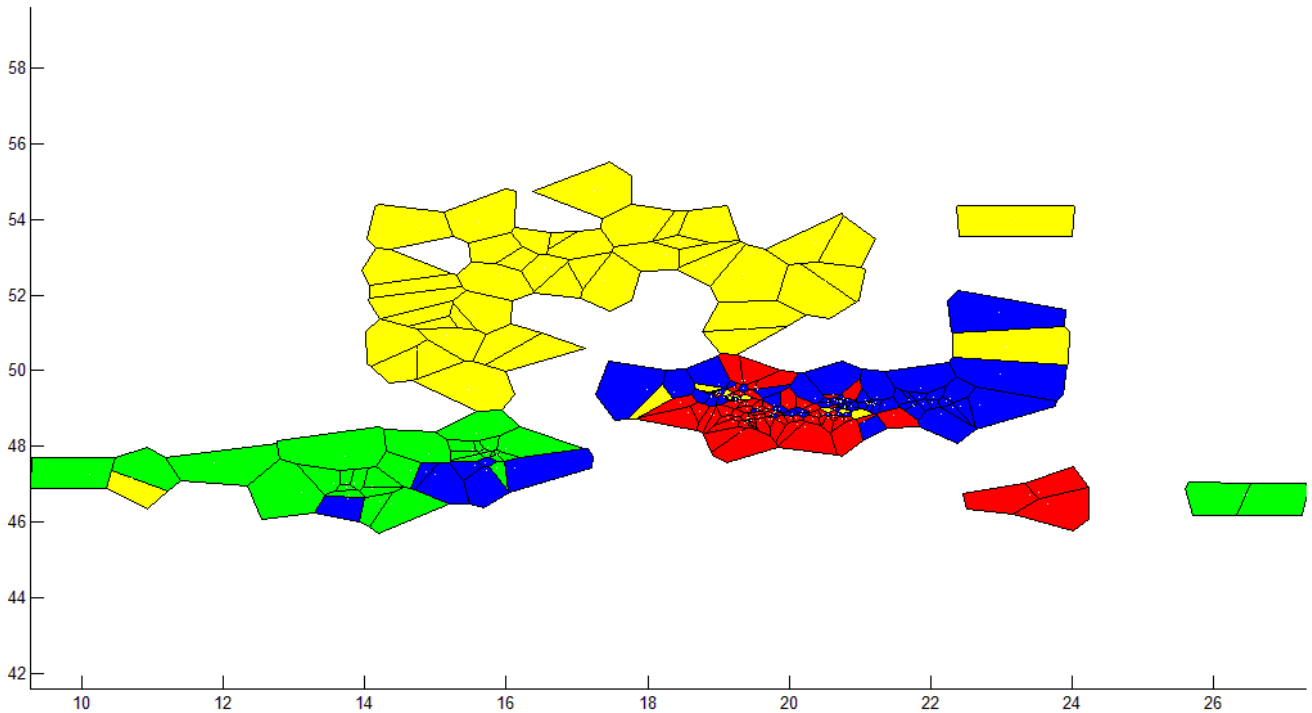


Obr. 17: A) Rozdělení mitochondriálního datasetu v Tessu, výsledek pro $K = 4$, zobrazeno programem ArcMap na pozadí nadmořské výšky a státních hranic, B) Teselace mitochondriálního datasetu pro $K = 4$ z programu Tess

V první analýze mikrosatelitů v programu Baps byl nejpravděpodobnější počet klastrů určen na deset z maximálních deseti možných, analýza byla proto opakována pro počet klastrů 8 až 15 (z důvodu omezeného počtu klastrů, které dokáže Baps spočítat v rámci jedné analýzy). Poté Baps jednoznačně určil počet klastrů na 13. Analýza se zafixovaným počtem klastrů proběhla tedy pro 13 klastrů. Polsko je opět, s výjimkou vzorku GOS28, určeno jako geneticky homogenní, na Slovensku se objevuje velké množství klastrů (obr. 18).



Mitochondriální dataset byl první analýzou v Baps rozdělen na čtyři klastry. Narozdíl od analýzy v Genelandu je podle Bapsu Rakousko rozděleno na dva klastry a rakouské vzorky překvapivě klastrují se vzorky z Východních Karpat (obr. 19).



Obr. 19: Grafické znázornění teselace mitochondriálních vzorků vlků programem BAPS, $K = 4$. Na osách x a y jsou vyneseny geografické souřadnice

Stejně jako u výsledků z Tess, tak i u výsledků z programu Baps je v případě mikrosatelitového datasetu Slovensko (až na výjimky jednotlivých vzorků) homogenní, naproti tomu na základě mitochondrií je Slovensko rozděleno na dva klastry, navíc malá část vzorků klastruje s nížinnou polskou populací. Opět, stejně jako v Tess, i zde jsou podle mikrosatelitů Východní Karpaty určeny jako samostatný klastr a nejjižnější vzorek z rumunských Západních Karpat je oddělen, zde však tvoří samostatný klastr a ne jeden klastr s nížinným Polskem.

3.2.4 Analýzy konektivity

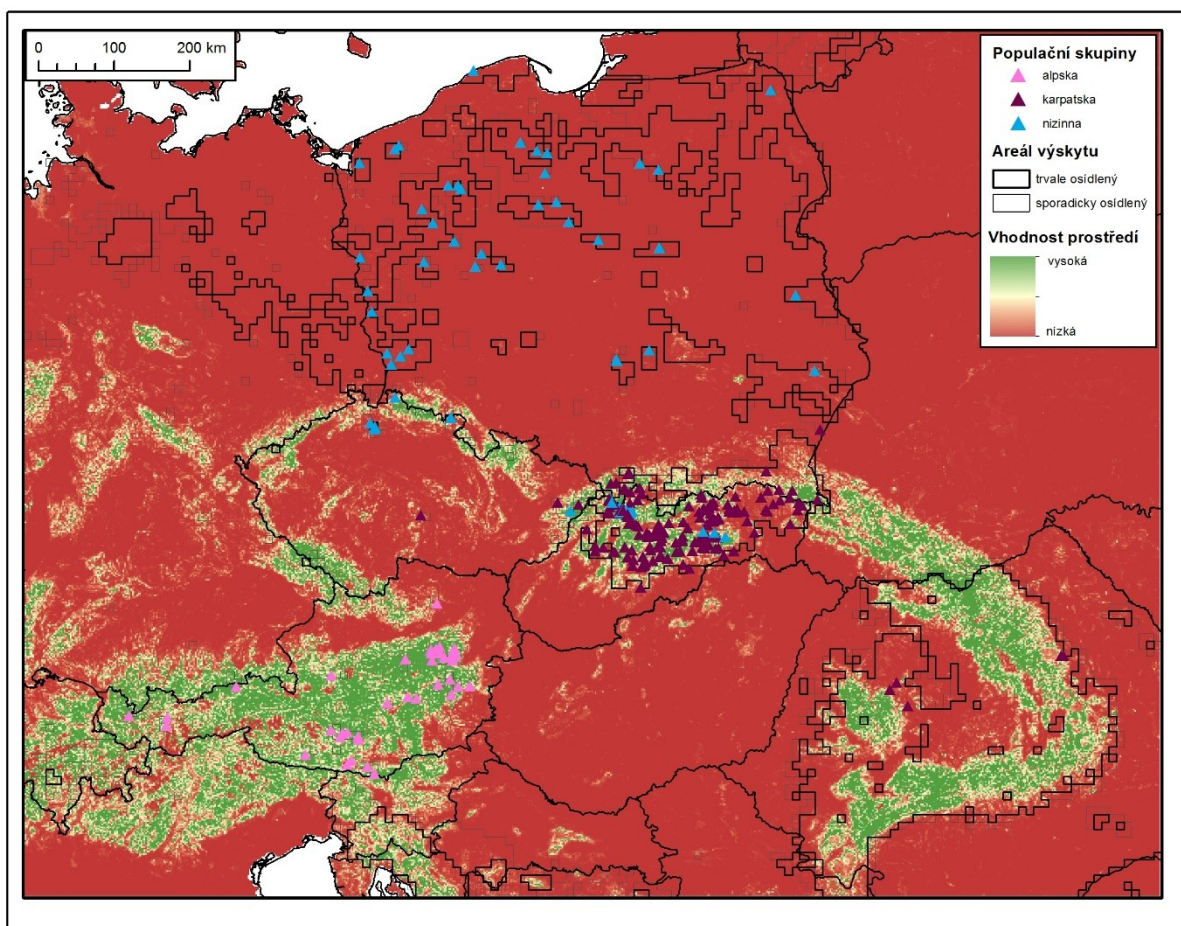
V první analýze softwaru Maxent, modelujícím vhodnost habitatu, se jako významné prediktory pro karpatskou populaci ukázaly být nadmořská výška a fragmentace a tvar lesa,

pro nížinnou populaci byla nejdůležitější rozloha a fragmentace lesa, pro alpskou populaci pak jsou nejdůležitější nadmořská výška, sklon svahů a rozloha a fragmentace lesa.

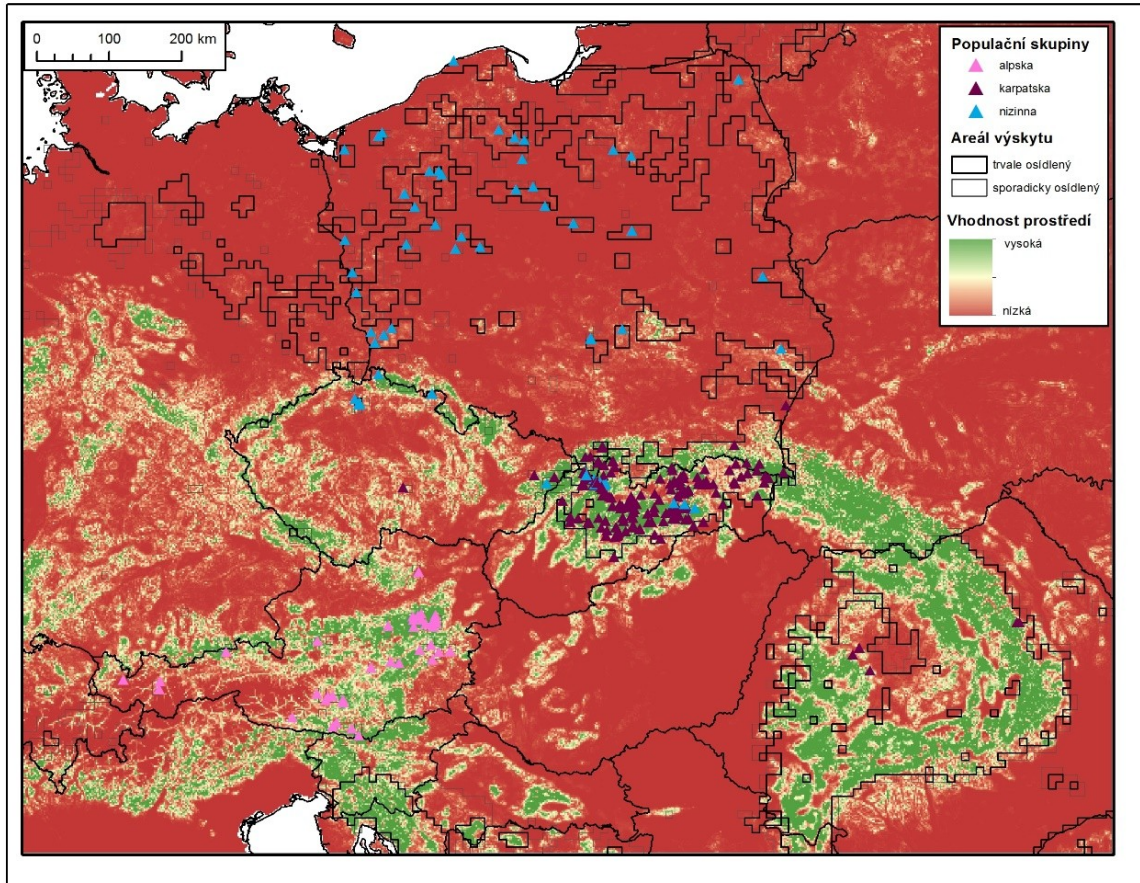
Druhá analýza vytvořila model habitatové vhodnosti zvláště pro každou populaci vlků (obr. 20).

V programu Circuitscape byly vytvořeny matice rezisenčních vzdáleností mezi jednotlivými vzorky a grafické znázornění konektivity mezi jednotlivými vzorky (příloha 5) a metodou wall-to-wall, tedy znázornění konektivity pro šíření z různých světových stran (obr. 21).

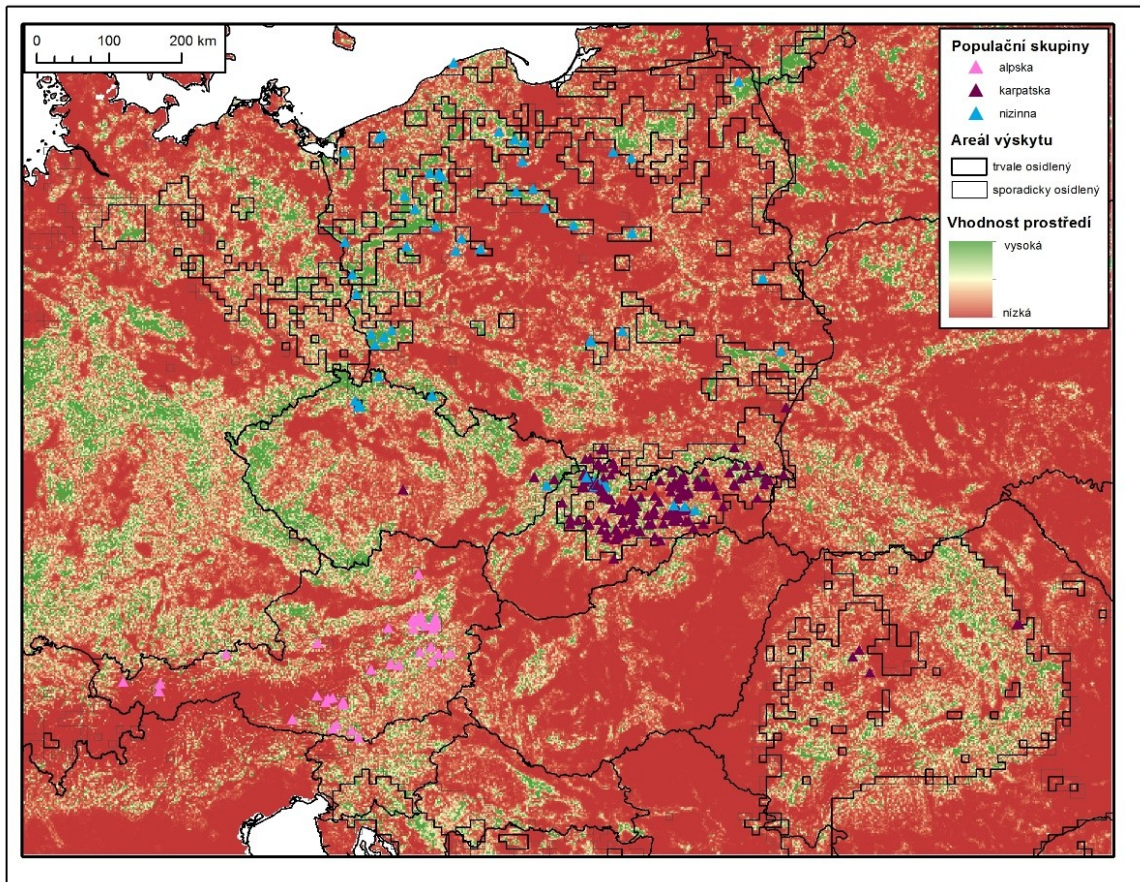
A)



B)

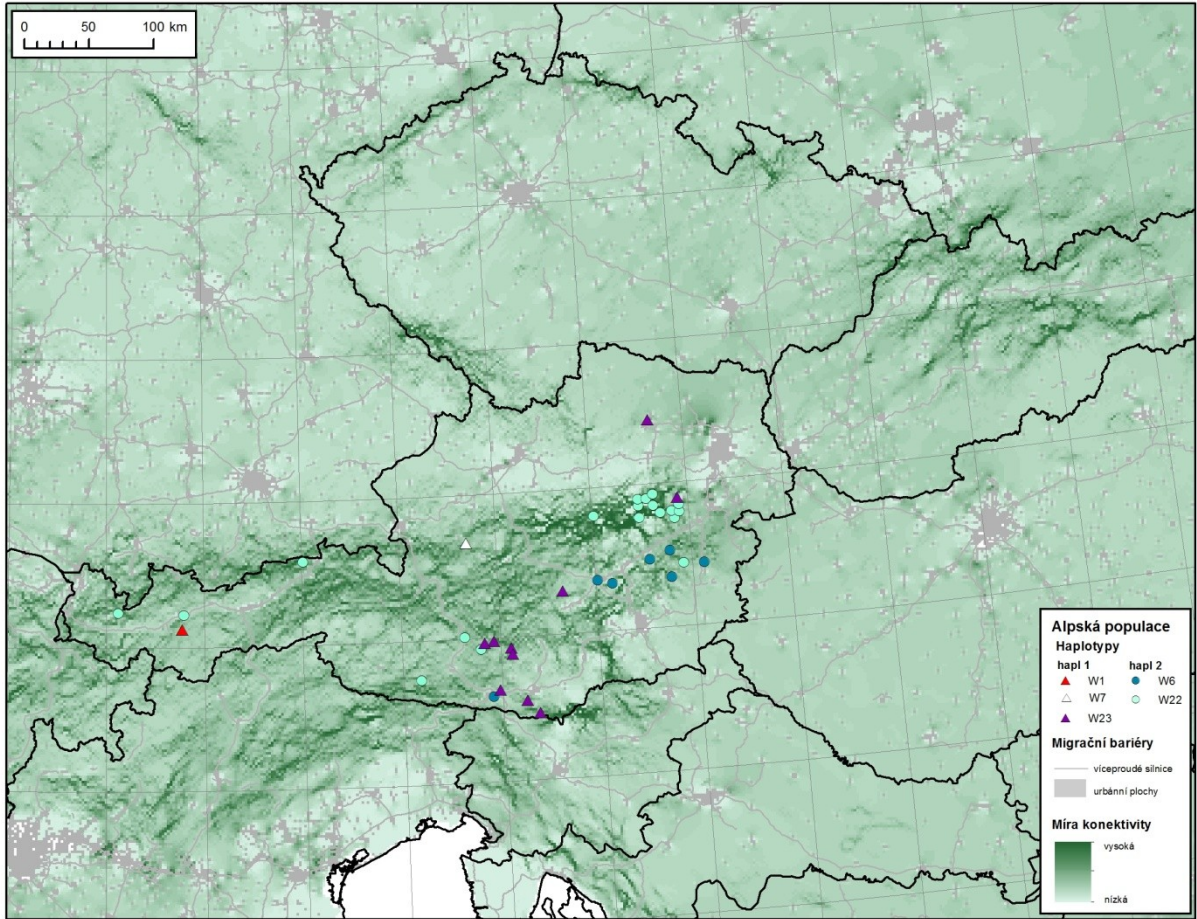


C)

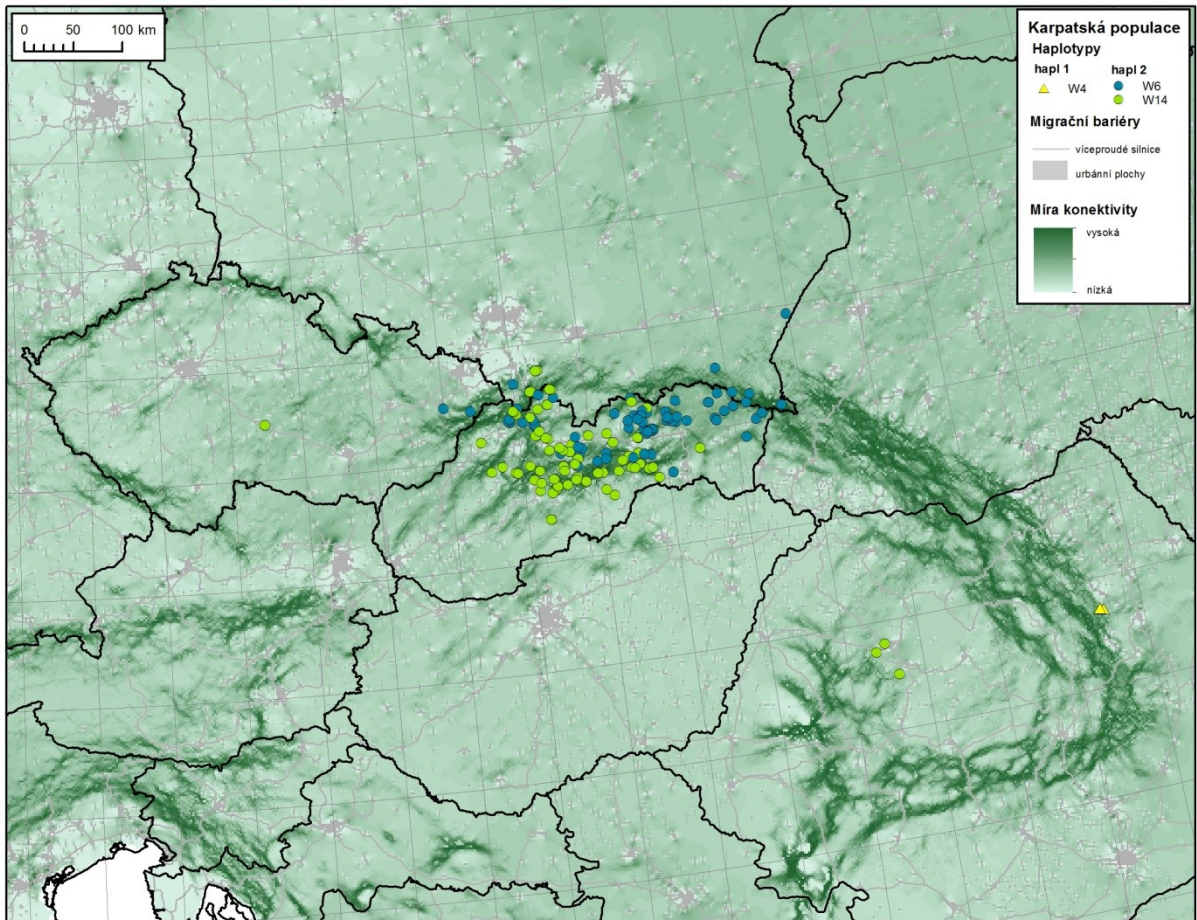


Obr. 20: Habitatový model z programu Maxent, A) alpská populace, B) karpatská populace, C) nížinná populace

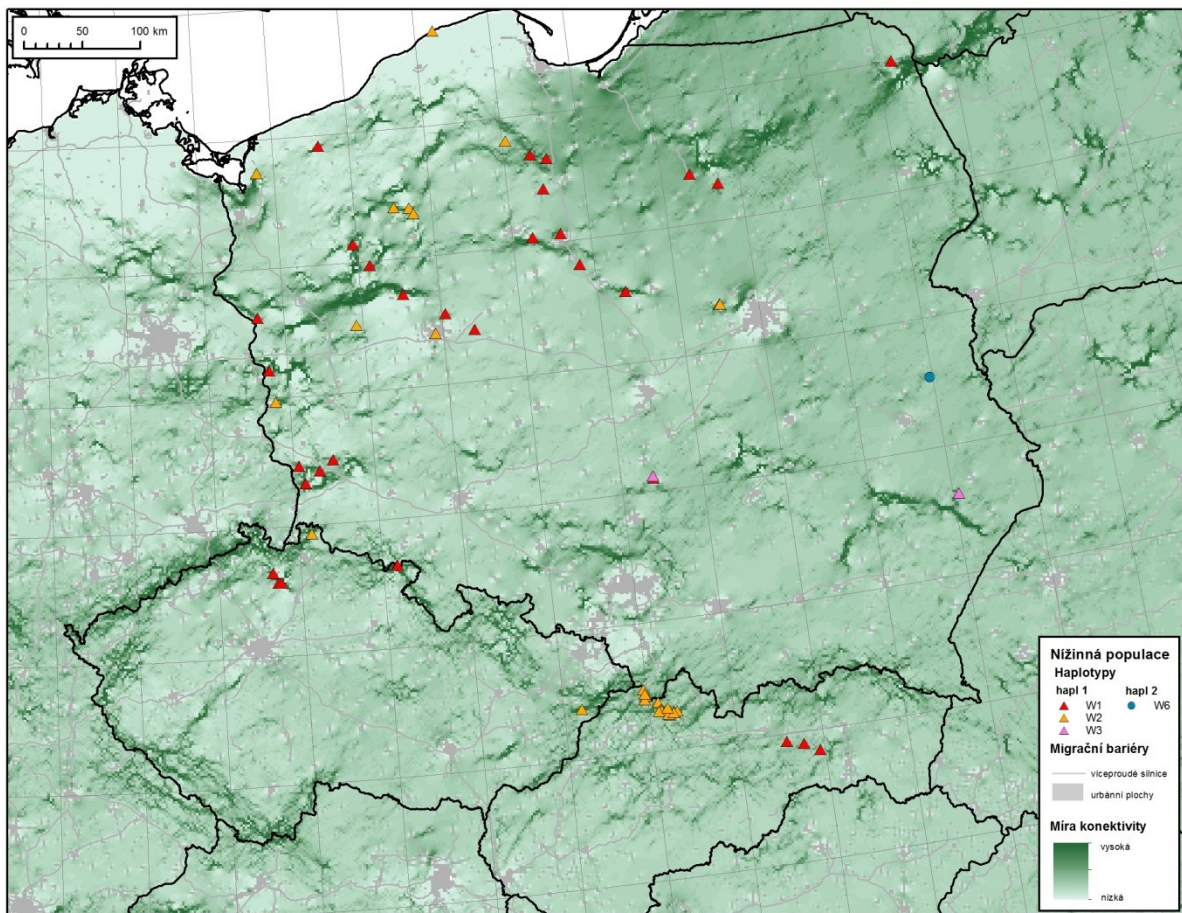
A)



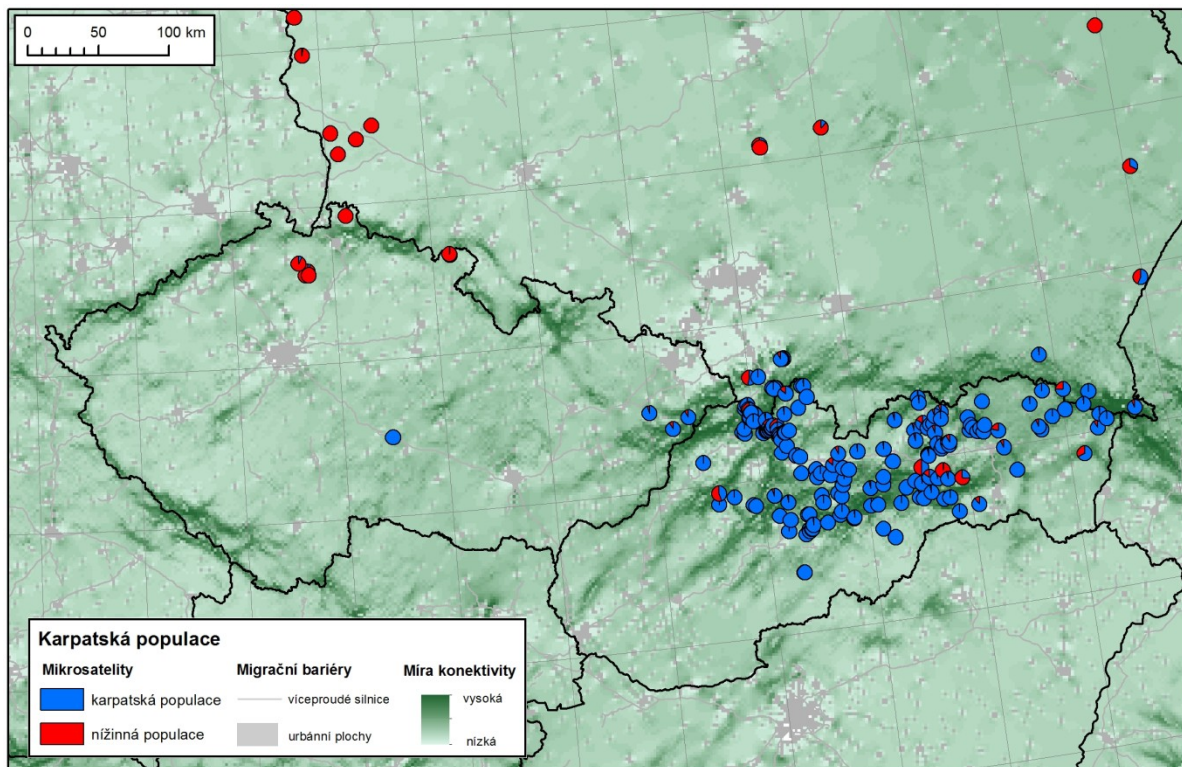
B)



C)



D)



Obr. 21: Znárodnění krajinné konektivity metodou wall to wall. A) Alpská populace s určenými haplotypy, B) Karpatská populace s určenými haplotypy, C) Nížinná populace s určenými haplotypy, D) Přiblížení pro karpatskou populaci s výsledky Structure pro $K = 2$

3.2.5 Analýza IBD a IBR

Korelace genetických vzdáleností F_{ST} s geografickými ukázala, že izolace vzdáleností (IBD) se uplatňuje více v nížinné populaci, než v karpatské (nížina: $r = 0,21094$; $Z = 823897710,07606$; $p < 0,001$; Karpaty: $r = 0,11058$; $Z = 2084471079,44523$; $p < 0,05$). Ani u jedné populace se neprokázala izolace rezistencí pomocí korelace genetické vzdálenosti s rezistenční vzdáleností, tyto výsledky však nejsou signifikantní (nížina: $r = 0,06898$; $Z = 1285,30339$; $p > 0,2$; Karpaty: $r = 0,02129$; $Z = 6098,15017$; $p > 0,9$).

Naopak u mitochondriálního datasetu v Karpatech se prokázala statisticky významná korelace mezi rozdíly v haplotypech (p-distance) a geografickou vzdáleností ($r = 0,62161$; $Z = 18053396,75146$; $p < 0,001$), v šíření haplotypů karpatskou populací se tedy silně uplatňuje izolace vzdáleností (IBD), zároveň se silně uplatňuje i izolace rezistencí IBR ($r = 0,31520$; $Z = 32,79235$; $p < 0,001$).

V polské nížině se izolace vzdáleností uplatňuje velmi slabě ($r = 0,17702$; $Z = 16561166,17544$; $p < 0,001$), větší vliv má izolace rezistencí ($r = 0,21701$; $Z = 26,48373$; $p < 0,05$), stále je však vliv IBR slabý.

V alpské populaci se potvrdila izolace rezistencí ($r = 0,22378$; $Z = 7,77663$; $p < 0,01$), slabý vliv izolace vzdáleností není průkazný ($r = 0,10584$; $Z = 2972808,78416$; $p > 0,1$).

4 Diskuze

4.1 Levhart sněžný

Výsledky této práce ukazují omezenou disperzi levhartů sněžných v Nepálu. Vzhledem k dostatku možné kořisti mají levharti sněžní v Nepálu menší domovské okrsky, než například v Mongolsku (Jackson et al. 2010), disperzi však limitují hlavně topografické bariéry, jak je patrné z výsledků habitatového modelování, protože vhodný habitat zde tvoří pouze úzké pásy na svazích okolo vrcholů hor.

Existuje řada studií na levhartech sněžných v Nepálu, jen málo z nich však pracovalo s genetickou informací a většina z nich se zabývala složením potravy levharta sněžného a jeho vlivem na hospodářská zvířata (Lovari et al. 2009; Wegge et al. 2012; Ferretti et al. 2014), případně preferovaným habitatem a velikostí domovského okrsku (Aryal et al. 2014) nebo odhadem početnosti (Karmacharya et al. 2011). Část studií je pak založena na datech z fotopastí, dotaznicích nebo pobytových znacích (v Nepálu např. Ale et al. 2007; Wolf & Ale 2009) a takové studie mohou být nepřesné, například kvůli časté záměně trusu levhartů sněžných a jiných šelem, např. lišek obecných (Janečka et al. 2008, 2011). Také studie konektivity populací levharta sněžného zmiňují Nepál jen okrajově (Riordan et al. 2016; Li et al. 2016; Janečka et al. 2017), výsledky této práce tedy nelze přímo porovnat s jinými studiemi.

4.1.1 NP Sagarmatha

Krajinně genetické analýzy levharta sněžného ukázaly genetickou diferenciaci jednotlivých populací zvláště ve východní části Nepálu v oblasti NP Sagarmatha. Všechny analýzy v této oblasti vydělují samostatně jihozápadní klastr vzorků (Structure dokonce při $K = 2$, tato diferenciacie je tedy velmi silná). Národní park Sagarmatha je jedno z turisticky nejnavštěvovanějších míst Nepálu. Turistické centrum parku leží v městečku Namche Bazaar, odkud vedou cesty do základního tábora pod Mount Everestem a k dalším vrcholům. V sezóně se na frekventovaných cestách pohybují stovky lidí, proudí zde karavany jaků, nosiči, turisté (Nepal & Nepal 2004). Takto zalidněné oblasti představují pro levharta sněžného velkou překážku (Wolf & Ale 2009). Podle výsledků genetických analýz je zřejmé, že disperze levhartů sněžných je v NP Sagarmatha limitovaná, jihozápadní klastr odpovídá údolí západně od Namche Bazaar, zatímco ostatní nálezy pocházejí z údolí východně od turistického centra, v jižní části západního a východního údolí je vzájemná diferenciacie

nejsilnější, podle výsledků všech analýz. Jižně od Namche Bazaar vede cesta, která je jedinou přístupovou cestou do národního parku, obejít město z jihu je tedy pro levharty sněžné neschůdné.

Severně se město obejít dá, ale pouze s překonáním trasy Gokyo, na které je koncentrace turistů ze všech tras nejmenší (Nepal & Nepal 2004), tento přechod navíc v jižní části ztěžuje horský hřeben ležící paralelně s turistickou trasou. Tomu odpovídá určitá, i když velmi malá, míra genového toku mezi západním údolím a západní částí východního údolí v jeho severní oblasti.

4.1.2 Manang a Mustang

Studovaná populace ze západní části Nepálu (Manang a Mustang) nevykazuje tak jasnou populační strukturu, jako populace v Sagarmathě. Tento výsledek je poměrně překvapivý vzhledem k vysoké rezistenci prostředí mezi Manangem a Mustangem, které jsou odděleny horským hřebenem táhnoucím se od vrcholu Khatung Kang směrem k jezeru Tilicho Tal. Výsledky analýzy konektivity ukázaly tři možné cesty, kudy se mohou levharti sněžní pohybovat mezi Manangem a Mustangem. Dva možné koridory do Mustangu vedou z oblasti Lamjung, která se nachází zhruba 40 km východně od Manangu a tyto dvě oblasti jsou habitatově velmi dobře propojeny. Z Lamjung vede přirozený koridor do Mustangu, ústí však severněji, než je studovaná oblast, takže by se levharti sněžní museli dostat dále na jih skrz hornatou oblast a složitě obcházet vrcholy hor. Druhou možnou cestou je jižní propojení mezi Lamjungem a Mustangem, které sice ústí ve studované oblasti, ale konektivita habitatu je zde o poznání horší. Nejpravděpodobnějším vysvětlením se tedy zdá být třetí možnost, tedy že levharti sněžní přechází přes hřeben jižně od šestitisícovky Khatung Kang či v blízkosti jezera Tilicho Tal. Dispergující jedinci však mohou být méně habitatově specifictí, než rezidenti (Mateo-Sánchez et al. 2015; Jackson et al. 2016), je tedy možné, že levharti sněžní běžně překonávají tuto překážku a při disperzi tolerují vyšší nadmořské výšky.

4.1.3 Genový tok mezi oblastí Annapuren (Manang a Mustang) a Sagarmathou

Některé ze vzorků z oblasti Mustangu byly určeny jako geneticky příbuznější levhartům sněžným z jihozápadní části NP Sagarmatha, než ostatním vzorkům z Manangu či Mustangu. Oblasti jsou od sebe vzdáleny zhruba 300 km vzdušnou čarou, průměrná denní vzdálenost uražená levharty sněžnými v Nepálu je 1-1,3 km (Jackson & Ahlborn 1989),

je tedy pravděpodobnější, že se zvířata s tímto genotypem šířila z oblasti mezi Managem a NP Sagarmatha. Pro tuto oblast bohužel nejsou k dispozici genetické vzorky.

Výsledky analýzy konektivity ukazují dvě přístupové cesty do Sagarmathy, ze západu a z jihu, do ostatních částí Sagarmathy se mohou levharti sněžní dostat pravděpodobně pouze těmito cestami, což je v souladu s výsledky genetických analýz. Na druhou stranu Structure a Baps ukazují také podobnost jedinců ze severního Mustangu s těmi ze severu NP Sagarmatha, což by naznačovalo možnost genového toku přes Tibetskou náhorní plošinu. Lovari a kol. (2009) navrhuje, že levharti sněžní mohli Sagarmathu rekolonizovat ze severu průsmykem Nangpa a možné propojení těchto dvou oblastí Nepálu přes Tibet naznačují i výsledky konektivity jiných autorů (Li et al. 2016; Riordan et al. 2016; Janečka et al. 2017), tyto studie se však soustředily na celou oblast výskytu druhu a neurčily jednotlivé koridory, spíše vhodné oblasti. Analýza konektivity v této práci však propojovala pouze jádrové oblasti vhodných habitatů v Nepálu, je proto možné, že koridory vedoucí z NP Sagarmatha směrem na sever nebyly odhaleny.

Zachování habitatové konektivity je zásadní nejen z důvodu umožnění genového toku a tím udržení životaschopné populace, ale může pomoci k zachování habitatové konektivity jiných druhů jako např. lišek, rysů, vlků nebo dhoulů (Alexander et al. 2016; Fleishman et al. 2017). Je tedy třeba ochrana přirozených koridorů propojujících oblasti výskytu levharta sněžného i zachování konektivity krajiny pro velké savce v rámci těchto oblastí.

4.2 Vlk obecný

Výsledky práce ukazují na jasné oddělení vlků do dvou populací – nížinné a karpatské. Toto rozdělení ukázaly programy Structure, Geneland, Tess i Baps a to jak pro mitochondriální, tak pro mikrosatelitová data. Tento výsledek je konzistentní s výsledky z jiných studií (Czarnomska et al. 2013) a odpovídá distribuci dvou haploskupin (Pilot et al. 2010), které se v oblasti Karpat setkávají.

V minulosti v Evropě i ve světě převládala haploskupina 2, která se v současnosti vyskytuje již jen na některých místech Evropy, v Itálii, v Karpatech a na Balkánu. Haploskupina 1, tedy haploskupina vyskytující se u nížinných vlků z Polska, starobylejší haploskupinu 2 postupně nahrazuje (Pilot et al. 2010).

Díky nárůstu početnosti vlků, který se děje v posledních letech (Chapron et al. 2014), by se vlci z nížinné a karpatské populace mohli setkávat v jižním Polsku. Silná diferenciac

těchto populací pravděpodobně není vzhledem k velkým disperzním schopnostem vlka (Wabakken et al. 2007) způsobena geografickou vzdáleností. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je tak rozdílnost habitatů – roli může hrát adaptace na jiný typ kořisti (Pilot et al. 2006; Jędrzejewski et al. 2012), disperse omezená habitatem narození (Pilot et al. 2006), behaviorální adaptace na typ krajiny ve velké míře ovlivněný člověkem (Nowak & Mysłajek 2016; Hulva et al. 2018) nebo fyziologické rozdíly související s adaptací na odlišné environmentální prostředí. V případě „přesunu“ vlka do odlišného habitatu, než na jaký je adaptován, hrozí výrazné snížení úspěšnosti lovu (Muñoz-Fuentes et al. 2009), zvýšená mortalita mláďat (Nowak & Mysłajek 2016), nebo například zvýšené riziko parazitace (Darimont et al. 2003).

Jak u nížinných, tak u karpatských vlků hraje podle výsledků habitatového modelování velkou roli zalesněnost prostředí, les se ukázal být důležitým faktorem umožňujícím konektivitu prostředí i u řady jiných velkých šelem (Yumnam et al. 2014; Warren et al. 2016; Thompson & Velilla 2017).

4.2.1 Genetická struktura vlků v Západních Karpatech

Distribuce haplotypů ukazuje v rámci slovenských Karpat dva hlavní klastry – jihozápadní a severovýchodní, toto rozdělení také potvrdily programy Geneland, Tess i Baps. Jednotlivé programy se však liší v určení dalších, menších klastrů. Programy Baps a Tess určily pro mitochondriální data čtyři klastry a oblast Oravy řadí částečně k nížinné populaci a částečně k jihozápadnímu slovenskému klastru. Program Geneland, který neurčuje klastry na základě jednotlivých vzorků, ale na základě populací, zařadil většinu vzorků z Oravy do samostatného klastru a část potom do klastru společně se vzorky z východního Rumunska. Distribuce haplotypů v Karpatech je dána především geografickou vzdáleností, uplatňuje se zde také izolace způsobená rezistencí prostředí.

Rozdělení vlků podle mikrosatelitové informace je komplexnější než rozdělení na základě mitochondrií, bylo zde určeno velké množství malých klastrů, ve skutečnosti ale většina vzorků spadá do několika největších klastrů (například Baps určil v rámci Slovenska devět genetických klastrů, více než polovina vzorků je ale součástí jednoho klastru a téměř 80 % vlků spadá do dvou největších klastrů). Tyto vzorce, které jsou v kontrastu s homogenitou střeoevropské nížinné populace, naznačují diferenciaci na subpopulace vlivem rezistence horského prostředí k disperzi a určitou frakci populace dispergující na větší vzdálenosti (cf. např. Tammelleht et al. 2010).

Geneticky odlišné oblasti odpovídají dvěma enklávám nížinných vlků v Karpatech, o kterých se zmiňují v následující kapitole. Třetí oblastí, kterou vyčlenily všechny programy jako samostatný klastř, je pohoří Čergov spolu s Levočskými Vrchy. Tato oblast je oddělená od centrálního Slovenska dálnicí E50 z Žiliny do Košic, která tvoří jižní hranici populace vlků z Levoče a Čergova. Na východ i na západ se pak tyto vlci mohou šířit jen omezeně kvůli nízké konektivitě krajiny. Možnou spojnici s ostatními slovenskými vlky jsou koridory vedoucí skrz Polské Beskydy.

Oblast CHKO Východné Karpaty a Národní Park Poloniny na východě Slovenska jsou podle analýz konektivity dobře propojeny s ukrajinskými a rumunskými Karpaty, směrem do středního Slovenska potom vede přirozený koridor, který kříží severo-j jižní dálnici z Košic do Prešova. Východoslovenskou oblast jako samostatnou určil program Structure, který má dobré výsledky v detekování postupné (klinální) změny (Chen et al. 2007), a Geneland. To naznačuje, že je tato oblast oddělená od středního Slovenska pouze částečně, kontakt mezi populacemi nezajišťuje jen malý počet migrantů, na druhou stranu populace nejsou plnohodnotně propojené. Roli zde pravděpodobně hraje částečně zmíněná dálnice, která představuje lineární bariéru genového toku, dobře detekovatelnou pro Geneland (Chen et al. 2007), částečně může mít malý vliv izolace vzdáleností, kterou v podobě postupné změny detekoval Structure, dalším faktorem je odlišný typ prostředí na východě Slovenska oproti střednímu a západnímu Slovensku, tyto oblasti se liší typem krajinného pokryvu i nadmořskou výškou – v oblasti Polonin převládají smíšené nebo listnaté lesy (Hulva et al. 2018). Východozápadní rozdělení je zřejmé také u medvěda hnědého (Straka et al. 2012).

Pokud pomineme oblasti výskytu vlků s haploskupinou 1 (tedy „nížinné“ haplotypy), pak je zřejmá rozdílná detekovaná struktura podle mitochondriální – centrální Slovensko a východní Slovensko – a mikrosatelitové DNA – centrální Slovensko, Levočské vrchy a Čergov a (podle Structure a Geneland) východní Slovensko, dále však velké množství malých klastřů, které se ne u všech programů shodují. I v oblastech výskytu nížinných vlků odhalily analýzy mikrosatelitové DNA komplexnější strukturu. Zatímco mikrosatelity jsou součástí jaderné DNA a tedy diploidní, haploidní mitochondriální DNA se dědí pouze po mateřské linii. Přestože u vlků dispergují obě pohlaví, je možné, že se ve větší míře jedná o samce (Wabakken et al. 2001; Jędrzejewski et al. 2005). Komplexnější struktura u diploidní DNA a silnější diferenciace haploidní DNA může napovídat genovému toku zprostředkovanému ve větší míře samci než samicemi (Sacks et al. 2004), kdy mikrosatelitová DNA se promísí, ale distribuce haplotypů zůstává kvůli filopatrii samic neměnná. Takovou strukturu u vlků odhalily i jiné studie (Pilot et al. 2006; Jansson et al. 2014) a odpovídá tomu

i vyšší vliv geografické i rezistenční vzdálenosti na míru odlišnosti mezi haplotypy než na genetickou vzdálenost mezi mikrosatelity. Distribuce haplotypů je pak pravděpodobně důsledkem bottlenecků ve 20. století, kdy vlci přežívali na východě Slovenska a v centrálním Slovensku. Bottlenecky mají větší vliv na mitochondriální DNA než na mikrosatelity z důvodu menší efektivní populační velikosti, mitochondriální variabilita se tak může snižovat díky jevu lineage sorting (Pilot et al. 2006; Hulva et al. 2018).

4.2.2 Nížinná populace a enklávy nížinných vlků v Karpatech

Modelování konektivity metodou wall-to-wall, tedy šíření ze všech světových stran, ukazuje dobré propojení habitatů v rámci oblouku Karpat i relativně dobrou možnost disperze ze západního Slovenska do České Republiky přes Jeseníky. Šíření karpatské populace směrem na sever, do polské nížiny, však neusnadňuje žádný přirozený koridor a zvláště v okolí Katowic je pro karpatské vlky vysoká rezistence.

Naopak nížinní vlci se mohou šířit do Karpat několika cestami. Konektivita mezi Beskydy a Oravou, kde se nachází enkláva nížinných vlků, je pro vlky nížinné populace poměrně dobrá, například přes bývalou celnici v Mostech u Jablunkova nebo skrz Makovský průsmyk, které byly již dříve označeny jako důležité koridory propojující Beskydy (Anděl et al. 2010). Druhá možná cesta pak vede přes Roháče (východně od Oravy). Větším problémem pro nížinné vlky může být spíše dostat se do jižního Polska, než projít skrz Polské Beskydy. Nízkou konektivitu mezi severním a jižním Polskem ukázala i studie Huck a kol. (2010), kteří využili model nejlevnější cesty (least-cost path). Jejich model ukazuje poměrně dobrou konektivitu u východních hranic Polska, zatímco model z této práce určil zároveň možnost propojení jižního a severního Polska západní cestou podél hranic s Německem. Modely využívající teorii obvodů by měly být přesnější, protože jsou schopny zahrnout více možných migračních cest (McRae & Beier 2007; Jackson et al. 2016).

Oravská oblast je zároveň velmi vhodná pro karpatskou populaci vlků a zároveň je do určité míry vhodná i pro vlky nížinné populace, pro které je také snadno přístupná výše popsanými koridory a to bez nutnosti překonávat pro ně nevhodnou krajinu středního Slovenska. Vyskytují se tak zde na jednom území zástupci karpatské i nížinné populace. Vlci nesoucí „nížinný“ haplotyp W2 jsou však na základě mikrosatelitových dat přiřazováni do samostatných klastrů a nikoli k nížinným, Tess pro $K = 2$ dokonce tyto vlky přiřadil ke karpatským. Tyto výsledky ukazují, že oravská enkláva nížinných vlků nevznikla recentně, ale že zde již nějakou dobu probíhá křížení s karpatskými vlky. Tomu odpovídá i poměrně

vysoký počet jedinců s haplotypem W2 v této oblasti (Hulva et al. 2018). Geneland a Baps pak v této oblasti vyčleňují velké množství dalších klastrů, často zastoupených několika málo jedinci, které haplotypem spadají buď do horské populace anebo jsou klastry namíchané z příslušníků obou populací. Geneland a Baps neurčují míru genetického přímísení u jednotlivých vzorků, pouze nejpravděpodobnější klast (Chen et al. 2007), je tedy možné, že tito jedinci nesou určitou kombinaci „horské“ a „nížinné“ genetické informace a proto byli vyděleni do samostatných klastrů.

V porovnání s oravským klastrem je druhá enkláva nížinných vlků v Karpatech mnohem menší (jedná se o tři jedince nesoucí haplotyp W1) a také je zde menší stupeň genetického přímísení, vznikla tedy pravděpodobně recentněji, než oravská enkláva (Hulva et al. 2018). Jedná se o oblast v okolí Levoče v blízkosti národních parků Slovenský Kras a Slovenský Ráj a habitatová konektivita pro nížinné vlky je v této oblasti špatná. Směrem na východ je krajina téměř nepropustná a na severu brání disperzi dálnice E50 z východu na západ. Nejpravděpodobněji vedla cesta těchto vlků přes střední Slovensko, přes hornatou Fatransko-Tatranskou oblast. Z Polska se skrz české pohraničí nížinní vlci mohou dostat do Beskyd a po překonání silnice mezi Olomoucí a Ostravou je konektivita habitatu natolik vhodná, že umožňuje přechod hranic na Slovensko několika koridory, pravděpodobně přes Vsetínské nebo Vizovické vrchy, kde se vlci z Beskyd často objevují (Anděl et al. 2010).

4.2.3 Alpská populace

Na základě mitochondriálních dat byla určena ještě alpská populace, pro kterou nebyly k dispozici mikrosatelitová data, ale pouze určené haplotypy. Tato populace nese haplotypy z obou haploskupin, až na malou skupinu s karpatským haplotypem W6 a jeden vzorek s nížinným haplotypem W1 se však jedná o haplotypy, které se nevyskytují v nížinné ani karpatské populaci. V souladu s vyšší členitostí terénu se v alpské populaci potvrdil vliv izolace rezistencí.

Podle výsledků habitatového modelování vyhovují karpatským i alpským vlkům téměř stejné podmínky. Konektivita mezi těmito dvěma oblastmi je však velice nízká. Haplotyp W6 se však vyskytuje i na Apeninském poloostrově a na Balkáně (Randi et al. 2000), haplotyp W22 je původem na Apeninském poloostrově, W23 na Balkáně (Pilot et al. 2010). Kvůli chybějící mikrosatelitové informaci nemůžeme porovnat případné křížení s karpatskými vlky. Haplotyp W1 se také vyskytuje nejen v Polsku, ale i v Bulharsku (Randi et al. 2000), nicméně

podle analýz konektivity se vlk z nížinné populace mohl do Rakouska dostat přes Krušné hory, Český Les a Šumavu.

Program Baps zařadil některé jedince z této rakouské populace ke dvěma vzorkům z Východních Karpat v Rumunsku, přestože se u těchto vzorků nejedná o stejný haplotyp. Tento výsledek by mohl být způsoben malým zastoupením haplotypu W4 v analyzovaném datasetu (jedná se pouze o tyto dva rumunské vzorky), na druhou stranu jsou tyto vzorky geograficky velmi vzdáleny a Baps, který zařadí bližší vzorky do stejného klastru spíše než vzdálenější (Corander et al. 2008), by je tedy měl zařadit do odlišných klastrů. Toto rozdělení zůstalo stejné i při opakování analýzy a bez dalších dat nejsem schopna tento výsledek interpretovat.

4.2.4 Rumunské Karpaty

Vlci z Munții Apuseni v rumunských Západních Karpatech mají haplotypy odpovídající jihozápadnímu slovenskému klastru, některé programy však vydělují jižní vzorek a řadí ho k nížinné populaci (Tess na mikrosatelitech pro $K = 2$ i pro $K = 4$, Structure pro $K = 2$) nebo společně se severnějšími vzorky ke slovenskému klastru (všechny analýzy mitochondriálního datasetu) a jiné programy ho řadí ke vzorkům z Východních Karpat (Geneland na mikrosatelitech). Jakkoliv nejednoznačné jsou tyto výsledky, ukazují, že vlci jsou schopni se šířit obloukem Karpat. Podle výsledků analýzy konektivity se do rumunských Západních Karpat mohli vlci dostat jak přes karpatský oblouk, tak omezeně skrz severozápadní Rumunsko.

Vlci z Východních Karpat jsou nositeli haplotypu W4, který je původem ze stepních populací v pontické oblasti. Stejný původ má haplotyp i W3, vyskytující se u dvou vlků v nížinném Polsku. Analýza mikrosatelitové DNA programy Tess a Geneland ukázala podobnost těchto vzorků, Baps zařadil východorumunské vzorky do samostatného klastru. Je pravděpodobné, že tito vlci pochází z pontické populace (Hulva et al. 2018).

4.2.5 Vlk z Vysočiny

Samec vlka, který byl sražen autem na dálnici D1 na Vysočině, je nositelem karpatského haplotypu W14 a představuje první doloženou disperzi na větší vzdálenost z oblouku Karpat (Hulva et al. 2018). Podle mikrosatelitové informace byl vlk zařazen do středoslovenského klastru, Geneland vlka přiřadil ke klastru z Polských Beskyd a Oravy. Vlk přišel pravděpodobně ze západního Slovenska nebo z Polských Beskyd stejným

koridorem, který je podle analýz konektivity využíván nížinnými vlky, totiž přes Jeseníky a dále přes Žďárské Vrchy. Druhou možnou trasou je z Beskyd do Vizovických či Vsetínských vrchů, Chřib a směrem na sever k Jihlavě.

Uvedená zjištění podtrhují nutnost zachovat přirozené migrační koridory a zlepšit konektivitu krajiny v kritických oblastech například vybudováním ekoduktů překlenujících dálnice. Legální lov vlků na Slovensku může způsobit zvýšenou migraci do Karpat (Kutal et al. 2016) a tedy nahrazování původní populace nížinnou. Karpatští vlci představují jednu z posledních populací nesoucích haplotypy haploskupiny 2 (Pilot et al. 2010) a byly u nich zaznamenány odlišné fenotypové vlastnosti (Okarma & Buchalczyk 1993; Milenković et al. 2010; Hulva et al. 2018), vyšší ochrana vlků na Slovensku tedy může zabránit postupnému úbytku této populace.

5 Závěr

Z výsledků této práce vyplývá, že i u velkých mobilních šelem je patrná genetická struktura, která koresponduje s druhově nebo populačně specifickou konektivitou krajiny.

U levhartů sněžných je genetická struktura ovlivněná především blízkostí lidí a cest využívaných lidmi, které pro ně představují disperzní bariéru. Značnou roli hraje také topografie terénu, která výrazně omezuje výskyt vhodného habitatu levhartů sněžných v Nepálu. Výsledky genetických studií ale naznačují, že jsou levharti sněžní schopni překonat i vyšší nadmořské výšky, než v jakých se běžně vyskytují. K lepšímu pochopení disperzních schopností levhartů sněžných je zapotřebí další výzkum, který by zmapoval i oblast mezi Národním parkem Sagarmatha a oblastí Annapuren.

Genetickou strukturu vlků ve střední Evropě ovlivňuje především habitat narození. Existují zde dva dominantní ekotypy, nížinný a horský. V nížinné populaci dominuje haploskupina 1, zatímco v karpatské populaci starobylejší haploskupina 2. Bude potřeba dalšího výzkumu k ověření proximálních mechanismů za tímto jevem (jiný původ populací vs. lineage sorting při bottlenecku). Četnost disperse mimo rodný habitat naznačují, že rezistence nížinného prostředí pro horské vlky je větší než rezistence horského prostředí pro nížinnou populaci. Dokladem je enkláva nížinných vlků na Oravě, kde nížinní vlci žijí v jedné oblasti s karpatskými a také dochází k vzájemnému křížení. Jediným známým příkladem disperse z Karpat na větší vzdálenost představuje samec sražený na dálnici D1 na Vysočině. Kromě typu prostředí je genetická struktura vlků ovlivněna do velké míry fragmentací habitatu zástavbou, velkými silnicemi a malou zalesněností, které snižují konektivitu krajiny. Další výzkum může pomoci k lepšímu porozumění aspektů prostorové ekologie vlků ve střední Evropě a k odhalení případných adaptivních změn v populacích.

6 Dostupnost dat

Seznam vzorků levhartů sněžných včetně geografických souřadnic je k dispozici v příloze 1, seznam vzorků vlků obecných včetně geografických souřadnic, určených haplotypů a přístupového čísla pro GenBank je k dispozici v příloze 2. Určené hodnoty délek alel jednotlivých mikrosatelitových lokusů levhartů sněžných jsou k dispozici v příloze 6, elektronický odkaz na výsledné hodnoty délek alel mikrosatelitových lokusů vlků obecných je k dispozici ve studii Hulva et al. (2018), která je přiložena jako příloha 7. Geografická vstupní data jsou z důvodu nekompatibility jejich formátů se SIS k dispozici na vyžádání u autorky práce (marketa.benesova@gmail.com).

7 Seznam literatury

Adriaensen, F., Chardon, J. P., De Blust, G., Swinnen, E., Villalba, S., Gulinck, H. & Matthysen, E. (2003) The application of “least-cost” modelling as a functional landscape model, *Landscape and Urban Planning*, 64(4), 233–247.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002) Isolating, Cloning and Sequencing DNA, in *Molecular Biology of the Cell*. 4th edn. New York: Garland Science.

Ale, S. B., Yonzon, P. & Thapa, K. (2007) Recovery of snow leopard *Uncia uncia* in Sagarmatha (Mount Everest) National Park, Nepal, *Oryx*, 41(1), 89–92.

Alexander, J. S., Cusack, J. J., Pengju, C., Kun, S. & Riordan, P. (2016) Conservation of snow leopards: Spill-over benefits for other carnivores?, *Oryx*, 50(2), 239–243.

Anděl, P., Andreas, M., Bláhová, A., Gorčicová, I., Hlaváč, V., Mináriková, T., Romportl, D. & Strnad, M. (2010) *Ochrana průchodnosti krajiny pro velké savce*. 1st edn. Edited by P. Anděl, T. Mináriková, and M. Andreas. Liberec: Evernia.

Arora, D., Singh, A., Sharma, V., Bhaduria, H. S. & Patel, R. B. (2015) HgsDb: Haplogroups Database to understand migration and molecular risk assessment., *Bioinformatics*, 11(6), 272–275.

Aryal, A., Brunton, D., Ji, W., Karmacharya, D., McCarthy, T., Bencini, R. & Raubenheimer, D. (2014) Multipronged strategy including genetic analysis for assessing conservation options for the snow leopard in the central Himalaya, *Journal of Mammalogy*, 95(4), 871–881.

Balkenhol, N., Gugerli, F., Cushman, S. A., Waits, L. P., Coulon, A., Arntzen, J. W., Holderegger, R., Wagner, H. H., Arens, P., Campagne, P., Dale, V. H., Niecieza, A. G., Smulders, M. J. M., Tedesco, E., Wang, H. & Wasserman, T. (2009) Identifying future research needs in landscape genetics: Where to from here?, *Landscape Ecology*, 24(4), 455–463.

- Barnosky, A. D., Matzke, N., Tomiya, S., Wogan, G. O. U., Swartz, B., Quental, T. B., Marshall, C., McGuire, J. L., Lindsey, E. L., Maguire, K. C., Mersey, B. & Ferrer, E. A. (2011)** Has the Earth's sixth mass extinction already arrived?, *Nature*. Nature Publishing Group, 471(7336), 51–57.
- Brumfield, R. T., Beerli, P., Nickerson, D. A. & Edwards, S. V. (2003)** The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history, *Trends in Ecology and Evolution*, 18(5), 249–256.
- Carbone, C. & Gittleman, J. L. (2002)** A common rule for the scaling of carnivore density, *Science*, 295(5563), 2273–2276.
- Carmichael, L. E., Krizan, J., Nagy, J. A., Fuglei, E., Dumond, M., Johnson, D., Veitch, A., Berteaux, D. & Strobeck, C. (2007)** Historical and ecological determinants of genetic structure in arctic canids, *Molecular Ecology*, 16(16), 3466–3483.
- 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(12), 2787–2798.
- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., Garcia, A., Pringle, R. M. & Palmer, T. M. (2015)** Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction, *Science Advances*, 1(5), e1400253–e1400253.
- Ceballos, G., García, A. & Ehrlich, P. R. (2010)** The Sixth Extinction Crisis Loss of Animal Populations and Species., *Journal of Cosmology*, 8(November 2009), 1821–1831.
- Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J. D. C., et al. (2014)** Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes, *Science*, 346(6216), 1517–1519.
- Chen, C., Durand, E., Forbes, F. & François, O. (2007)** Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: A new computer program and a comparison study, *Molecular Ecology Notes*, 7(5), 747–756.
- Corander, J. & Marttinen, P. (2006)** Bayesian identification of admixture events using multilocus molecular markers, *Molecular Ecology*, 15(10), 2833–2843.
- Corander, J., Sirén, J. & Arjas, E. (2008)** Bayesian spatial modeling of genetic population structure, *Computational Statistics*, 23(1), 111–129.

- Czarnomska, S. D., Jedrzejewska, B., Borowik, T., Niedziałkowska, M., Stronen, A. V., Nowak, S., Mysłajek, R. W., Okarma, H., Konopiński, M., Pilot, M., Śmietana, W., Caniglia, R., Fabbri, E., Randi, E., Pertoldi, C. & Jedrzejewski, W. (2013)** Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves, *Conservation Genetics*, 14(3), 573–588.
- Dalén, L., Fuglei, E., Hersteinsson, P., Kapel, C. M. O., Roth, J. D., Samelius, G., Tannerfeldt, M. & Angerbjörn, A. (2005)** Population history and genetic structure of a circumpolar species: the arctic fox, *Biological Journal of the Linnean Society*, 84(1), 79–89.
- Darimont, C. T., Reimchen, T. E. & Paquet, P. C. (2003)** Foraging behaviour by gray wolves on salmon streams in coastal British Columbia, *Canadian Journal of Zoology*, 81(2), 349–353.
- DeSalle, R. & Amato, G. (2004)** The expansion of conservation genetics, *Nature Reviews Genetics*, 5(9), 702–712.
- Dieckmann, U., O’Hara, B. & Weisser, W. (1999)** The evolutionary ecology of dispersal, *Trends in Ecology & Evolution*, 14(3), 88–90.
- Diéz-del-Molino, D., Sánchez-Barreiro, F., Barnes, I., Gilbert, M. T. P. & Dalén, L. (2018)** Quantifying Temporal Genomic Erosion in Endangered Species, *Trends in Ecology & Evolution*, 33(3), 176–185.
- Dirzo, R. & Raven, P. H. (2003)** Global State Of Biodiversity And Loss, *Annual Review of Environment and Resources*, 28(1), 137–167.
- Dixon, J. D., Oli, M. K., Wooten, M. C., Eason, T. H., McCown, J. W. & Cunningham, M. W. (2007)** Genetic consequences of habitat fragmentation and loss: The case of the Florida black bear (*Ursus americanus floridanus*), *Conservation Genetics*, 8(2), 455–464.
- Durand, E., Chen, C. & Francois, O. (2009)** Tess version 2.3 - Reference Manual, 1–30.
- Durand, E., Jay, F., Gaggiotti, O. E. & François, O. (2009)** Spatial inference of admixture proportions and secondary contact zones, *Molecular Biology and Evolution*, 26(9), 1963–1973.

- Earl, D. A. & vonHoldt, B. M. (2012)** STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method, *Conservation Genetics Resources*, 4(2), 359–361.
- Erst, P. J. (2018)** Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. (2005)** Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study, *Molecular Ecology*, 14(8), 2611–2620.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. (2003)** Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies, *Genetics*, 164(4), 1567–1587.
- Fauvergue, X., Vercken, E., Malausa, T. & Hufbauer, R. A. (2012)** The biology of small, introduced populations, with special reference to biological control, *Evolutionary Applications*, 5(5), 424–443.
- Ferretti, F., Lovari, S., Minder, I. & Pellizzi, B. (2014)** Recovery of the snow leopard in Sagarmatha (Mt. Everest) National Park: Effects on main prey, *European Journal of Wildlife Research*, 60(3), 559–562.
- Find’o, S. & Chovancová, B. (2004)** Home ranges of two wolf packs in the Slovak Carpathians, *Folia Zoologica*, 53(1), 17–26.
- Fleishman, E., Anderson, J. & Dickson, B. G. (2017)** Single-Species and Multiple-Species Connectivity Models for Large Mammals on the Navajo Nation, *Western North American Naturalist*, 77(2), 237–251.
- François, O. & Durand, E. (2010)** Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics, *Molecular Ecology Resources*, 10(5), 773–784.
- Garner, B. A., Hand, B. K., Amish, S. J., Bernatchez, L., Foster, J. T., Miller, K. M., Morin, P. A., Narum, S. R., O’Brien, S. J., Roffler, G., Templin, W. D., Sunnucks, P., Strait, J., Warheit, K. I., Seamons, T. R., Wenburg, J., Olsen, J. & Luikart, G. (2016)** Genomics in Conservation: Case Studies and Bridging the Gap between Data and

Application, *Trends in Ecology & Evolution*, 31(2), 81–83.

Geffen, E., Anderson, M. J. & Wayne, R. K. (2004) Climate and habitat barriers to dispersal in the highly mobile grey wolf, *Molecular Ecology*, 13(8), 2481–2490.

Gilks, W. R., Richardson, S. & Spiegelhalter, D. J. (1996) Introducing Markov Chain Monte Carlo, *Markov Chain Monte Carlo in Practice*, (October), 512.

Gittleman, J. L. & Harvey, P. H. (1982) Carnivore Home-Range Size, Metabolic Needs and Ecology, *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 10(1), 57–63.

Goudet, J. (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics, *Journal of Heredity*, 96(6), 485–486.

Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F. & Cosson, J. F. (2005) A spatial statistical model for landscape genetics, *Genetics*, 170(3), 1261–1280.

Guillot, G., Leblois, R., Coulon, A. & Frantz, A. C. (2009) Statistical methods in spatial genetics, *Molecular Ecology*, 18(23), 4734–4756.

Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. (2005) GENELAND: A computer package for landscape genetics, *Molecular Ecology Notes*, 5(3), 712–715.

Hall, L. A. & Beissinger, S. R. (2014) A practical toolbox for design and analysis of landscape genetics studies, *Landscape Ecology*, 29(9), 1487–1504.

Hofreiter, M. (2007) Pleistocene Extinctions: Haunting the Survivors, *Current Biology*, 17(15), 609–611.

Holderegger, R. & Wagner, H. H. (2006) A brief guide to Landscape Genetics, *Landscape Ecology*, 21(6), 793–796.

Huck, M., Jędrzejewski, W., Borowik, T., Miłosz-Cielma, M., Schmidt, K., Jędrzejewska, B., Nowak, S. & Mysłajek, R. W. (2010) Habitat suitability, corridors and dispersal barriers for large carnivores in Poland, *Acta Theriologica*, 55(2), 177–192.

Hulva, P., Černá Bolfíková, B., Woznicová, V., Jindřichová, M., Benešová, M., Mysłajek, R. W., Nowak, S., Szewczyk, M., Niedźwiecka, N., Figura, M., Hájková, A., Sándor, A. D., Zyka, V., Romportl, D., Kutal, M., Find'o, S. & Antal, V. (2018) Wolves at the crossroad: Fission–fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central

Europe, *Diversity and Distributions*, 24(2), 179–192.

Ihaka, R. & Gentleman, R. (1996) R: A Language for Data Analysis and Graphics., *Journal of computational and graphical statistics*, 5(3), 299–314.

Jackson, C. R., Marnewick, K., Lindsey, P. A., Røskaft, E. & Robertson, M. P. (2016) Evaluating habitat connectivity methodologies: a case study with endangered African wild dogs in South Africa, *Landscape Ecology*. Springer Netherlands, 31(7), 1433–1447.

Jackson, R. & Ahlborn, G. (1989) Snow leopards (*Panthera uncia*) in Nepal - home range and movements, *National Geographic Research*, 5(2), 161–175.

Jackson, R. M., Mishra, C., McCarthy, T. M. & Ale, S. B. (2010) Snow leopards: conflict and conservation, in *Biology and conservation of wild felids*, 417–430.

Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007) CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure, *Bioinformatics*, 23(14), 1801–1806.

Janečka, J. E., Jackson, R., Munkhtsog, B. & Murphy, W. J. (2014) Characterization of 9 microsatellites and primers in snow leopards and a species-specific PCR assay for identifying noninvasive samples, *Conservation Genetics Resources*, 6(2), 369–373.

Janečka, J. E., Jackson, R., Yuquang, Z., Diqiang, L., Munkhtsog, B., Buckley-Beason, V. & Murphy, W. J. (2008) Population monitoring of snow leopards using noninvasive collection of scat samples: A pilot study, *Animal Conservation*, 11(5), 401–411.

Janečka, J. E., Munkhtsog, B., Jackson, R. M., Naranbaatar, G., Mallon, D. P. & Murphy, W. J. (2011) Comparison of noninvasive genetic and camera-trapping techniques for surveying snow leopards, *Journal of Mammalogy*, 92(4), 771–783.

Janečka, J. E., Zhang, Y., Li, D., et al. (2017) Range-wide snow leopard phylogeography supports three subspecies, *Journal of Heredity*, 108(6), 597–607.

Jansson, E., Harmoinen, J., Ruokonen, M. & Aspi, J. (2014) Living on the edge: Reconstructing the genetic history of the Finnish wolf population, *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 1–20.

Jarvis, A., Reuter, H. I., Nelson, A. & Guevara, E. (2008) Hole-filled SRTM for the globe Version 4, available from the CGIAR-CSI SRTM 90m Database.

Jędrzejewski, W., Branicki, W., Veit, C., Medugorac, I., Pilot, M., Bunevich, A. N., Jędrzejewska, B., Schmidt, K., Theuerkauf, J., Okarma, H., Gula, R., Szymura, L. & Förster, M. (2005) Genetic diversity and relatedness within packs in an intensely hunted population of wolves *Canis lupus*, *Acta Theriologica*, 50(1), 3–22.

Jędrzejewski, W., Niedzialkowska, M., Hayward, M. W., et al. (2012) Prey choice and diet of wolves related to ungulate communities and wolf subpopulations in Poland, *Journal of Mammalogy*, 93(6), 1480–1492.

Johansson, Ö., Rauset, G. R., Samelius, G., McCarthy, T., Andrén, H., Tumursukh, L. & Mishra, C. (2016) Land sharing is essential for snow leopard conservation, *Biological Conservation*. Elsevier Ltd, 203, 1–7.

Karmacharya, D. B., Thapa, K., Shrestha, R., Dhakal, M. & Janečka, J. E. (2011) Noninvasive genetic population survey of snow leopards (*Panthera uncia*) in Kangchenjunga conservation area, Shey Phoksundo National Park and surrounding buffer zones of Nepal, *BMC Research Notes*. BioMed Central Ltd, 516(4).

Kool, J. T., Moilanen, A. & Treml, E. A. (2013) Population connectivity: Recent advances and new perspectives, *Landscape Ecology*, 28(2), 165–185.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870–1874.

Kutal, M., Váňa, M., Suchomel, J., Chapron, G. & López-Bao, J. V. (2016) Trans-Boundary edge effects in the western carpathians: The influence of hunting on large carnivore occupancy, *PLoS ONE*, 11(12), 1–15.

Lacy, R. C. (2000) Considering threats to the viability of small populations using individual-based models, *Ecological Bulletins*, 48, 39–51.

Laikre, L. (1999) Conservation genetics of Nordic carnivores: Lessons from zoos, *Hereditas*, 130(3), 203–216.

- Lehne, B., Lewis, C. M. & Schlitt, T. (2011)** From SNPs to genes: Disease association at the gene level, *PLoS ONE*, 6(6).
- Li, J., McCarthy, T. M., Wang, H., Weckworth, B. V., Schaller, G. B., Mishra, C., Lu, Z. & Beissinger, S. R. (2016)** Climate refugia of snow leopards in High Asia, *Biological Conservation*. Elsevier Ltd, 203, 188–196.
- Lovari, S., Boesi, R., Minder, I., Mucci, N., Randi, E., Dematteis, A. & Ale, S. B. (2009)** Restoring a keystone predator may endanger a prey species in a human-altered ecosystem: The return of the snow leopard to Sagarmatha National Park, *Animal Conservation*, 12(6), 559–570.
- Manel, S. & Holderegger, R. (2013)** Ten years of landscape genetics, *Trends in Ecology and Evolution*, 28(10), 614–621.
- Manel, S., Schwartz, M. K., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003)** Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics, *Trends in Ecology and Evolution*, 18(4), 189–197.
- Mantel, N. (1967)** The Detection of Disease Clustering and a Generalized Regression Approach, *Cancer Research*, 27(February), 209–220.
- Mateo-Sánchez, M. C., Balkenhol, N., Cushman, S., Pérez, T., Domínguez, A. & Saura, S. (2015)** Estimating effective landscape distances and movement corridors: Comparison of habitat and genetic data, *Ecosphere*, 6(4).
- McCarthy, T., Mallon, D., Jackson, R., Zahler, P. & McCarthy, K. (2017)** *Panthera uncia*, *The IUCN Red List of Threatened Species 2010*, 25.
- McMahon, B. J., Teeling, E. C. & Höglund, J. (2014)** How and why should we implement genomics into conservation?, *Evolutionary Applications*, 7(9), 999–1007.
- McRae, B. H. (2006)** Isolation By Resistance, *Evolution*, 60(8), 1551.
- McRae, B. H. & Beier, P. (2007)** Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19885–19890.
- McRae, B. H., Dickson, B. G., Keitt, T. H. & Shah, V. B. (2008)** Using Circuit Theory To Model Connectivity In Ecology, Evolution, And Conservation, *Ecology*, 89(10), 2712–2724.

Mech, L. D. & Boitani, L. (2003) *Wolves: Behavior, Ecology, and Conservation*. University of Chicago Press.

Mech, L. D. & Boitani, L. (2010) *Canis lupus*, *The IUCN Red List of Threatened Species 2010*, 10.

Milenković, M., Šipetić, V. J., Blagojević, J., Tatović, S. & Vujošević, M. (2010) Skull variation in Dinaric – Balkan and Carpathian gray wolf populations revealed by geometric morphometric approaches Skull variation in Dinaric – Balkan and Carpathian gray wolf populations revealed by geometric morphometric approaches, *Journal of Mammalogy*, 91(2), 376–386.

Mueller, U. G. & Wolfenbarger, L. L. R. (1999) AFLP genotyping and fingerprinting, *Trends in Ecology and Evolution*, 14(10), 389–394.

Muñoz-Fuentes, V., Darimont, C. T., Wayne, R. K., Paquet, P. C. & Leonard, J. A. (2009) Ecological factors drive differentiation in wolves from British Columbia, *Journal of Biogeography*, 36(8), 1516–1531.

Musiani, M., Leonard, J. A., Cluff, H. D., Gates, C. C., Mariani, S., Paquet, P. C., Vilà, C. & Wayne, R. K. (2007) Differentiation of tundra/taiga and boreal coniferous forest wolves: genetics, coat colour and association with migratory caribou, *Molecular Ecology*, 16(19), 4149–4170.

Nepal, S. K. & Nepal, S. A. (2004) Visitor Impacts on Trails in the Sagarmatha (Mt . Everest) National Park , Nepal, *Ambio*, 33(6), 334–340.

Nosil, P., Egan, S. P. & Funk, D. J. (2008) Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: ‘Isolation by adaptation’ and multiple roles for divergent selection, *Evolution*, 62(2), 316–336.

Nowak, S. & Mysłajek, R. W. (2016) Wolf recovery and population dynamics in Western Poland, 2001–2012, *Mammal Research*, 61(2), 83–98.

Nyakatura, K. & Bininda-Emonds, O. R. P. (2012) Updating the evolutionary history of Carnivora (Mammalia): A new species-level supertree complete with divergence time estimates, *BMC Biology*. BioMed Central Ltd, 10(1), 12.

- Okarma, H. & Buchalczyk, T. (1993)** Craniometrical Characteristics of Wolves *Canis-Lupus* From Poland, *Acta Theriologica*, 38(3), 253–262.
- Okarma, H., Jedrzejewski, W., Schmidt, K., Śnieżko, S., Bunevich, A. N. & Jedrzejewska, B. (1998)** Home Ranges of Wolves in Białowieża Primeval Forest, Poland, compared with other Eurasian populations, *Journal of Mammalogy*, 79(3), 842–852.
- Oli, M. K. (1997)** Winter home range of snow leopards in Népal, *Mammalia*, 61(3), 355–360.
- Oliveira, E. J., Pádua, J. G., Zucchi, M. I., Vencovsky, R. & Vieira, M. L. C. (2006)** Origin, evolution and genome distribution of microsatellites, *Genetics and Molecular Biology*, 29(2), 294–307.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2006)** GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research, *Molecular Ecology Notes*, 6(1), 288–295.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012)** GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update, *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539.
- Peake, I. (1989)** The polymerase chain reaction, *Journal of Clinical Pathology*, 42(7), 673–676.
- Pfeiffer, I. & Brenig, B. (2005)** X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*), *BMC Genetics*, 6, 4–7.
- Phillips, S. J., Dudík, M. & Schapire, R. E. (2016)** Maxent software for modeling species niches and distributions (Version 3.4.1).
- Pilot, M., Branicki, W., Jędrzejewski, W., Goszczyski, J., Jędrzejewska, B., Dykyy, I., Shkvyrya, M. & Tsingarska, E. (2010)** Phylogeographic history of grey wolves in Europe, *BMC Evolutionary Biology*, 10(1).
- Pilot, M., Greco, C., Vonholdt, B. M., Jędrzejewska, B., Randi, E., Jędrzejewski, W., Sidorovich, V. E., Ostrander, E. A. & Wayne, R. K. (2014)** Genome-wide signatures of population bottlenecks and diversifying selection in European wolves, *Heredity*, 112(4), 428–442.

Pilot, M., Jedrzejewski, W., Branicki, W., Sidorovich, V. E., Jedrzejewska, B., Stachura, K. & Funk, S. M. (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves, *Molecular Ecology*, 15(14), 4533–4553.

Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data, *Genetics*, 155(2), 945–959.

Pritchard, J. K., Wen, X. & Falush, D. (2010) Documentation for structure software: Version 2.3.

Randi, E. (2003) Conservation genetics of carnivores in Italy, *Comptes Rendus Biologies*, 326, 54–60.

Randi, E. (2011) Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe, *Mammal Review*, 41(2), 99–111.

Randi, E., Lucchini, V., Christensen, M. F., Mucci, N., Funk, S. M., Dolf, G. & Loeschcke, V. (2000) Mitochondrial DNA variability in Italian and east European wolves: Detecting the consequences of small population size and hybridization, *Conservation Biology*, 14(2), 464–473.

van Ravenzwaaij, D., Cassey, P. & Brown, S. D. (2016) A simple introduction to Markov Chain Monte–Carlo sampling, *Psychonomic Bulletin and Review*. *Psychonomic Bulletin & Review*, 25(1), 143–154.

Raymond, M. & Rousset, F. (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism, *Journal of Heredity*, 86(3), 248–249.

Riordan, P., Cushman, S. A., Mallon, D., Shi, K. & Hughes, J. (2016) Predicting global population connectivity and targeting conservation action for snow leopard across its range, *Ecography*, 39(5), 419–426.

Ripple, W. J., Estes, J. A., Beschta, R. L., Wilmers, C. C., Ritchie, E. G., Hebblewhite, M., Berger, J., Elmhagen, B., Letnic, M., Nelson, M. P., Schmitz, O. J., Smith, D. W., Wallach, A. D. & Wirsing, A. J. (2014) Status and ecological effects of the world’s largest carnivores, *Science*, 343(6167).

Rosenberg, M. S. & Anderson, C. D. (2011) PASSaGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics and Geographic Exegesis. Version 2, *Methods in Ecology and Evolution*, 2(3), 229–232.

- Rousset, F. (2008)** Genepop'007: a complete reimplementaion of the Genepop software for Windows and Linux, *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. & Rozas, R. (2003)** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods, *Bioinformatics*, 19(18), 2496–2497.
- Rozhnov, V. V., Zvychainaya, E. Y., Kuksin, A. N. & Poyarkov, A. D. (2011)** Noninvasive molecular genetic analysis in studying the ecology of the snow leopard: Problems and prospects, *Russian Journal of Ecology*, 42(6), 439–444.
- Rueness, E. K., Stenseth, N. C., O'Donoghue, M., Boutin, S., Ellegren, H. & Jakobsen, K. S. (2003)** Ecological and genetic spatial structuring in the Canadian lynx, *Nature*, 425(September), 69–72.
- Ruiz-Gonzalez, A., Cushman, S. A., Madeira, M. J., Randi, E. & Gómez-Moliner, B. J. (2015)** Isolation by distance, resistance and/or clusters? Lessons learned from a forest-dwelling carnivore inhabiting a heterogeneous landscape, *Molecular Ecology*, 24(20), 5110–5129.
- Sacks, B. N., Brown, S. K. & Ernest, H. B. (2004)** Population structure of California coyotes corresponds to habitat-specific breaks and illuminates species history, *Molecular Ecology*, 13(5), 1265–1275.
- Schlötterer, C. (2004)** Opinion: The evolution of molecular markers — just a matter of fashion?, *Nature Reviews Genetics*, 5(1), 63–69.
- Schweizer, R. M., Robinson, J., Harrigan, R., Silva, P., Galverni, M., Musiani, M., Green, R. E., Novembre, J. & Wayne, R. K. (2016)** Targeted capture and resequencing of 1040 genes reveal environmentally driven functional variation in grey wolves, *Molecular Ecology*, 25(1), 357–379.
- Schweizer, R. M., VonHoldt, B. M., Harrigan, R., Knowles, J. C., Musiani, M., Coltman, D., Novembre, J. & Wayne, R. K. (2016)** Genetic subdivision and candidate genes under selection in North American grey wolves, *Molecular Ecology*, 25(1), 380–402.
- Scoble, J. & Lowe, A. J. (2010)** A case for incorporating phylogeography and landscape genetics into species distribution modelling approaches to improve climate adaptation and

conservation planning, *Diversity and Distributions*, 16(3), 343–353.

Shah, V. B. & McRae, B. H. (2008) Circuitscape: A Tool for Landscape Ecology, *Proceedings of the 7th Python in Science Conference (SciPy 2008)*, (January 2008), 62–66.

Smetanová, M., Bolfíková, B. Č., Randi, E., Caniglia, R., Fabbri, E., Galaverni, M., Kotal, M. & Hulva, P. (2015) From Wolves to Dogs, and Back: Genetic Composition of the Czechoslovakian Wolfdog, *PLoS ONE*, 10(12), 1–11.

Sommer, R. S. & Benecke, N. (2005) Late-Pleistocene and early Holocene history of the canid fauna of Europe (Canidae), *Mammalian Biology - Zeitschrift für Säugetierkunde*, 70(4), 227–241.

Soulé, M. E. (1985) What is Conservation Biology. A New Synthetic Discipline Address The Dynamics and Problems of Perturbed Species, Communities, and Ecosystems, *BioScience*, 35(11), 727–734.

Soulé, M. E. & Mills, S. L. (1992) Conservation genetics and conservation biology: a troubled marriage, in Sandlund, O. T., Hindar, K., and Brown, A. H. D. (eds) *Conservation of Biodiversity for Sustainable Development*. Oslo: Scandinavian University Press, 55–69.

Spiegelhalter, D. J., Best, N. G., Carlin, B. P. & Van Der Linde, A. (2002) Bayesian measures of model complexity and fit, *Journal of the Royal Statistical Society. Series B: Statistical Methodology*, 64(4), 583–616.

Storfer, A., Murphy, M. A., Evans, J. S., Goldberg, C. S., Robinson, S., Spear, S. F., Dezzani, R., Delmelle, E., Vierling, L. & Waits, L. P. (2007) Putting the “landscape” in landscape genetics, *Heredity*, 98(3), 128–142.

Storfer, A., Murphy, M. A., Spear, S. F., Holderegger, R. & Waits, L. P. (2010) Landscape genetics: Where are we now?, *Molecular Ecology*, 19(17), 3496–3514.

Straka, M., Paule, L., Ionescu, O., Štofik, J. & Adamec, M. (2012) Microsatellite diversity and structure of Carpathian brown bears (*Ursus arctos*): Consequences of human caused fragmentation, *Conservation Genetics*, 13(1), 153–164.

Swenson, J. E., Taberlet, P. & Bellemain, E. (2011) Genetics and conservation of European brown bears *Ursus arctos*, *Mammal Review*, 41(2), 87–98.

- Taberlet, P. (1996)** Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR, *Nucleic Acids Research*, 24(16), 3189–3194.
- Taberlet, P. & Bouvet, J. (1992)** Bear conservation genetics., *Nature*, 358(6383), 197.
- Taberlet, P., Fumagali, L., Wust-Saucy, A.-G. & Cosson, J.-F. (1998)** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe, *Molecular ecology*, 453–464.
- Taberlet, P., Waits, L. P. & Luikart, G. (1999)** Noninvasive genetic sampling: look before you leap, *Tree*, 14(8), 223–227.
- Tammeleht, E., Remm, J., Korsten, M., Davison, J., Tumanov, I., Saveljev, A., Männil, P., Kojola, I. & Saarma, U. (2010)** Genetic structure in large, continuous mammal populations: The example of brown bears in northwestern Eurasia, *Molecular Ecology*, 19(24), 5359–5370.
- Taylor, P. D., Fahrig, L., Henein, K. & Merriam, G. (1993)** Connectivity Is a Vital Element of Landscape Structure, *Oikos*, 68(3), 571.
- Thompson, J. J. & Velilla, M. (2017)** Modeling the effects of deforestation on the connectivity of jaguar *Panthera onca* populations at the southern extent of the species' range, *Endangered Species Research*, 34, 109–121.
- Tischendorf, L. & Fahrig, L. (2000)** On the usage and measurement of landscape connectivity, *Oikos*, 90(1), 7–19.
- Uddin, K., Shrestha, H. L., Murthy, M. S. R., Bajracharya, B., Shrestha, B., Gilani, H., Pradhan, S. & Dangol, B. (2015)** Development of 2010 national land cover database for the Nepal, *Journal of Environmental Management*. Elsevier Ltd, 148, 82–90.
- Wabakken, P., Sand, H., Kojola, I., Zimmermann, B., Arnemo, J. M., Pedersen, H. C. & Liberg, O. (2007)** Multistage, Long-Range Natal Dispersal by a Global Positioning System–Collared Scandinavian Wolf, *Journal of Wildlife Management*, 71(5), 1631–1634.
- Wabakken, P., Sand, H., Liberg, O. & Björvall, A. (2001)** The recovery, distribution, and population dynamics of wolves on the Scandinavian peninsula, 1978–1998, *Canadian Journal of Zoology*, 79(4), 710–725.

- Waller, L. A. & Wheeler, D. C. (2012)** Spatial analysis linking landscape features and genetic population structure in cougars (*Puma concolor*) in the northern Rocky Mountains, *Statistics and Its Interface*, 5(2), 183–193.
- Wang, I. J. & Bradburd, G. S. (2014)** Isolation by environment, *Molecular Ecology*, 23(23), 5649–5662.
- Warren, M. J., Wallin, D. O., Beausoleil, R. A. & Warheit, K. I. (2016)** Forest cover mediates genetic connectivity of northwestern cougars, *Conservation Genetics*. Springer Netherlands, 17(5), 1011–1024.
- Wegge, P., Shrestha, R. & Flagstad, Ø. (2012)** Snow leopard *Panthera uncia* predation on livestock and wild prey in a mountain valley in northern Nepal: implications for conservation management, *Wildlife Biology*, 18(2), 131–141.
- Wolf, M. & Ale, S. (2009)** Signs at the Top: Habitat Features Influencing Snow Leopard *Uncia uncia* Activity in Sagarmatha National Park, Nepal, *Journal of Mammalogy*, 90(3), 604–611.
- Wright, S. (1943)** Isolation by Distance, *Genetics*, 28(2), 114–138.
- Wright, S. (1951)** Genetical Structure of Populations, *Annals of Eugenics*, 15(4), 323–354.
- Yumnam, B., Jhala, Y. V., Qureshi, Q., Maldonado, J. E., Gopal, R., Saini, S., Srinivas, Y. & Fleischer, R. C. (2014)** Prioritizing tiger conservation through landscape genetics and habitat linkages, *PLoS ONE*, 9(11).
- Zachos, F. E. & Hackländer, K. (2011)** Genetics and conservation of large mammals in Europe: A themed issue of Mammal Review, *Mammal Review*, 41(2), 85–86.
- Zeller, K. A., McGarigal, K. & Whiteley, A. R. (2012)** Estimating landscape resistance to movement: A review, *Landscape Ecology*, 27(6), 777–797.

8 Seznam příloh

Uvedené přílohy jsou umístěny samostatně na přiloženém CD-ROM.

Příloha 1 – tabulka vzorků levhartů sněžných

Příloha 2 – tabulka vzorků vlků obecných

Příloha 3 – mapa jádrových oblastí, levhart sněžný

Příloha 4 – výsledek analýzy Tess pro $K = 2$, vlk obecný

Příloha 5 – výsledek analýzy párové konektivity, vlk obecný

Příloha 6 – tabulka výsledných hodnot délek alel mikrosatelitových lokusů, levhart sněžný

Příloha 7 – studie Hulva et al. (2018)