ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

KATEDRA EKOLOGIE

Ochranářská genetika obojživelníků

Conservation genetics of amphibians

Bakalářská práce

Bakalant: Lucia Krupová

Vedoucí: Ing. Jana Svobodová, Ph.D.

2024

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Autorka práce:	Lucia Krupová
Studijní program:	Krajinářství
Vedoucí práce:	Ing. Jana Svobodová, Ph.D.
Garantující pracoviště:	Katedra ekologie
Jazyk práce:	Čeština
Název práce:	**Ochranářská genetika obojživelníků**
Název anglicky:	**Conservation genetics of amphibians**
Cíle práce:	Růst a rozvoj lidské populace přímo i nepřímo přispívá k vymírání druhů, především degradací a fragmentací jejich přirozeného prostředí. Obojživelníci se stávají jednou z nejvíce ohrožených skupin obratlovců v důsledku tohoto procesu (Vojar 2007). Fragmentace krajiny vede k izolaci malých populací, což má významný efekt na jejich genetickou diverzitu a zdatnost (Frankham et al. 2002, Fusco et al. 2021, Phillips et al. 2020, Yannic et al. 2021). Proto cílem literární rešerše bude: 1. Zhodnotit využití neinvazivních metod pro extrakci DNA v ochranářsko-genetických studií obojživelníků 2. Posoudit výskytu inbreedingu a různých typů bariér, které redukují genetický tok, mezi ohroženými populacemi obojživelníků. 3. Zhodnotit úspěšnost reintrodukcí obojživelníků pomocí genetických metod.
Metodika:	Články budou vyhledávány pomocí databáze WOS.
Doporučený rozsah práce:	max. 20 stran
Klíčová slova:	populační genetika, ochranářská genetika, genetický drift, inbreeding, bottleneck, reintrodukce, genetický tok, obojživelníci

Doporučené zdroje informací:

1. Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A., McInnes K.H. (2002). Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press
2. Fusco N.A., Pehek E., Munshi-South J. 2021. Urbanization reduces gene flow but not genetic diversity of stream salamander populations in the New York City metropolitan area. Evolutionary Applications, 14: 99–116.
3. Phillips, S., Geary, M., Allmark, M., Bennett, S., Norman, K., Ball, R., Peters, C., Muir, A.P. (2020). The importance of long-term genetic monitoring of reintroduced populations: inbreeding in the natterjack toad (Epidalea calamita). The Herpetological Journal, 30(3), 159–167.
4. Vojar J. (2007). Ochrana obojživelníků: ohrožení, biologické principy, metody studia, legislativní a praktická ochrana. Doplněk k metodice č. 1 Českého svazu ochránců přírody. ZO ČSOP Hasina Louny
5. Yannic G., Helfer V., Sermier R., Schmidt B.R., Fumagalli L. 2021. Fine scale genetic structure in fire salamanders (Salamandra salamandra) along a rural-to-urban gradient. Conservation Genetics, 22: 275–292.

Předběžný termín obhajoby: 2023/24 LS - FŽP

Elektronicky schváleno: 20. 3. 2024
prof. Mgr. Bohumil Mandák, Ph.D.
Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno: 20. 3. 2024
prof. RNDr. Michael Komárek, Ph.D.
Děkan

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma: Ochranářská genetika plazů a obojživelníků vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jany Svobodové, Ph.D. a citovala jsem všechny informační zdroje, které jsem v práci použila a které jsem rovněž uvedla na konci práce v seznamu použitých informačních zdrojů.

Jsem si vědoma, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů, ve znění pozdějších předpisů, především ustanovení § 35 odst. 3 tohoto zákona, tj. o užití tohoto díla.

Jsem si vědoma, že odevzdáním bakalářské práce souhlasím s jejím zveřejněním podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů, ve znění pozdějších předpisů, a to i bez ohledu na výsledek její obhajoby.

Svým podpisem rovněž prohlašuji, že elektronická verze práce je totožná s verzi tištěnou a že s údaji uvedenými v práci bylo nakládáno v souvislosti s GDPR.

V Praze dne 2024

Lucia Krupová .....……

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Janě Svobodové, Ph.D. za její čas a pomoc, odborné rady a možnost diskuze během zpracování bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, obzvlášť mým rodičům, za podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Zjištění genetického stavu populací ohrožených druhů je velice důležité a nezbytné pro jejich budoucí ochranu a vytvoření vhodného managmentu. Ochranářská genetika obojživelníků je ovšem velice specifická, jelikož za svůj životní cyklus vystřídají několik stanovišť (suchozemských i vodních). Obojživelníci jsou tedy nejvíce ohrožovaní fragmentací a destrukcí těchto stanovišť, na které jsou vázány v průběhu jejich života. Proto byly v posledních 20 letech předmětem více translokačních programů, které měli zajistit udržení a zlepšení jejich genetické diverzity. Cílem mé bakalářské práce je shrnout poznatky empirických studií, zabývajících se oblastí ochranářské genetiky obojživelníků a zodpovědět, jestli lze u ohrožených populací obojživelníků detekovat známky inbreedingu pomocí molekulárních metod a jaké jsou nejvýznamnější bariéry pro tok genů mezi ohroženými populacemi. Prvotní problém při genetickém zkoumání obojživelníků nastává při sběru vzorků pro genetické hodnocení. Není zde možnost využít obvyklých neinvazivních metod, které se užívají u jiných druhů obratlovců. Je většinou nutný manuální odchyt spojen s odstraněním kousku těla (nejčastěji části ocasu). Jako jediná neinvazivní metoda odběru vzorku DNA obojživelníku je používána environmentální DNA, která ale neposkytuje údaje nutné pro genetické hodnocení, proto se spíše využívá nedestruktivní metoda bukálních stěrů. Při tomto procesu je nutná manipulace se zvířaty, ale nedochází k žádné újmě. Na základě rešeršní části mé práce jsem zjistila, že některé zkoumané populace opravdu trpěli inbreedingem (jednalo se o malé populace ve městském prostředí, nebo populace obklopené nevhodnými stanovišti), téměř u všech bylo také potvrzeno snížení gentské diverzity a genetický tok byl nejčastěji omezen urbanizacemi a nevhodnými stanovišti. Dále jsem zjistila, že translokační programy jsou v současné době jedny z nejslibnějších ochranářských managmentů, ale aby tyto programy byly úspěšné, je nutné dlouhodobé pozorování a genetické hodnocení přemístěných populací. Zároveň je i nutná analýza vhodnosti prostředí, kde má translokační program proběhnout. Tím se zajistí vyšší pravděpodobnost přežití a další rozšíření populace. Toto téma má dle mého názoru velký potenciál a do budoucna by translokační programy používané jako ochranářský management mohly být jedním z nejdůležitějších nástrojů pro zachování ohrožených druhů.

Klíčová slova: populační genetika, ochranářská genetika, genetický drift, inbreeding, bottleneck, reintrodukce, genetický tok, obojživelníci

Abstract

Determining the genetic status of populations of endangered species is very important and necessary for their future conservation and the development of appropriate management. However, the conservation genetics of amphibians is very specific, as they change several habitats (terrestrial and aquatic) during their life cycle. Thus, amphibians are most threatened by fragmentation and destruction of these habitats to which they are tied during their life cycle. They have therefore been the subject of multiple translocation programmes over the last 20 years to ensure the maintenance and improvement of their genetic diversity. The aim of my undergraduate thesis is to summarize the findings of empirical studies dealing with the field of amphibian conservation genetics and to answer whether signs of inbreeding can be detected in endangered amphibian populations using molecular methods and what are the most important barriers to gene flow between endangered populations. The primary problem in genetic studies of amphibians arises when collecting samples for genetic evaluation. There is no opportunity to use the usual non-invasive methods used in other vertebrate species. Manual trapping is usually necessary, involving the removal of a piece of the body (usually part of the tail). Environmental DNA is used as the only non-invasive method of DNA sampling in amphibians, but it does not provide the data necessary for genetic evaluation, so the non-destructive buccal swab method is more likely to be used. In this process, handling of animals is necessary, but no harm is done. Based on the research part of my work, I found that some of the populations studied did suffer from inbreeding (small populations in urban environments, or populations surrounded by unsuitable habitats), almost all of them were also confirmed to have reduced genetic diversity, and genetic flow was most often limited by urbanization and unsuitable habitats. I further found that translocation programs are currently one of the most promising conservation management practices, but long-term observation and genetic evaluation of translocated populations is necessary for these programs to be successful. At the same time, an analysis of the suitability of the environment where the translocation programme is to take place is also necessary. This will ensure a higher probability of survival and further expansion of the population. In my opinion, this topic has great potential and in the future translocation programmes used as conservation management could be one of the most important tools for the conservation of endangered species.

Key words: population genetics, conservation genetics, genetic drift, inbreeding, bottleneck, reintroduction, gene flow, amphibians

Obsah

Obsah 10

1. ÚVOD 1

2. CÍLE 3

3. OCHRANÁŘSKÁ GENETIKA 4

3.1. Získávání DNA neinvazivní a nedestruktivní metodou 4

3.2. Genetická diverzita 5

3.1. Landscape genetics 11

3.2. Reintrodukce 13

4. VÝSLEDKY A DISKUZE 18

6. ZÁVĚR 27

7. LITERATURA 28

8. SEZNAM PRÍLOH 33

1. ÚVOD

Růst a rozvoj lidské populace v současné době přímo i nepřímo přispívá k vymírání druhů a degradaci stanovišť, ve kterých se přirozeně vyskytují. Jedním z nejvíce ohrožených druhů jsou obojživelníci. Dle statistik IUCN z roku 2023 jsou celosvětově ohroženi vyhynutím ze 41 % druhů obojživelníků. Po celém světě bylo v posledních desetiletích zaznamenáno významné snižování jejich početních stavů včetně vymírání jednotlivých druhů (Vojar, 2007). Příčin ubývání těchto druhů živočichů je mnoho a často působí nepřímo a ve vzájemných vazbách (Vojar, 2007). Podle uvedeného autora, patří mezi ně dlouhodobé negativní vlivy týkající se změny klimatu, kontaminace toxickými látkami, infekční choroby a patogeny, ale také fyzická likvidace, vliv dopravy, invaze predátorů a kompetitorů, ale rovněž zánik biotopů, jejich degradace a celkové změny v krajině.

Přirozená heterogenita krajiny a bariéry vyplývající z lidské činnosti mohou snížit genetický tok (propojenost) mezi populacemi a tím vést k izolaci populace, snižování její velikosti v narušených stanovištích, případně až k jejímu vyhynutí (Fusco a kol., 2021; Schmidt a Garroway, 2021). Funkční konektivita je nezbytná pro dlouhodobé přetrvávání populací (Beninde a kol., 2016). Snížená propojenost totiž časem může vést k poklesu efektivní velikosti populace (Schmidt a Garroway, 2021). Malé populace se vyznačují větší citlivostí k negativním vlivům prostředí a náchylností ke ztrátě genetické variability (Primack a kol., 2011). Pokles genetické diverzity tedy omezuje schopnost volně žijících zvířat účinně se vyrovnat se změnami prostředí prostřednictvím genetické adaptace (Schmidt a Garroway, 2021). Tyto populace mohou být náchylné k problémům spojeným se sníženou početností a s izolací, jako je genetický drift a inbreeding (Noël a Lapointe, 2010).

Aby k těmto situacím nedocházelo, v minulosti proběhly studie, které využívají genetiku jako nástroj ochranářské genetiky pro zjišťování inbrední deprese, úrovně diverzity a životaschopnosti populace (Frankham a kol., 2009). Pro genetické studie obojživelníků jsou často využívány neinvazivní metody odběru vzorků DNA (Pidancier a kol., 2003). Mezi nejvýznamnější prostředky managmentu ochrany obojživelníků je zařazena jejich reintrodukce a s tím související chov v zajetí (Harding a kol., 2016).

Cílem bakalářské práce je shrnutí poznatků z publikované literatury v oblasti ochranářské genetiky obojživelníků a zodpovědět, jestli lze u ohrožených populací obojživelníků detekovat známky inbreedingu pomocí molekulárních metod a jaké jsou nejvýznamnější bariéry pro tok genů mezi ohroženými populacemi.

Ve své práci bych se nejdříve chtěla věnovat tématu ochranářské genetiky, genetické diverzitě a metodám jejího měření, následně navážu hodnocením empirických studií, které ji hodnotili. V další části se zaměřím na úvod do problematiky reitrodukčních programů a následně uvedu několik prací, které se touto tématikou zabývaly.

2. CÍLE

Jak již bylo uvedeno v předchozí kapitole, cílem mé bakalářské práce bylo shrnutí dosavadních poznatků na téma ochranářská genetika obojživelníků. Konkrétně jsem se zaměřila na následující:

- Zhodnocení využití neinvazivních metod pro extrakci DNA při ochraně obojživelníků
- Posouzení genetické diverzity a výskytu inbreedingu v ohrožených populacích obojživelníků
- Zjistit, jaké jsou nejvýznamnější bariéry pro tok genů mezi ohroženými populacemi.
- Zhodnocení úspěšnosti reintrodukcí obojživelníků pomocí molekulárních metod

3. OCHRANÁŘSKÁ GENETIKA

Ochranářská genetika je aplikace genetiky k zachování druhů jako dynamických jednotek schopných vyrovnat se se změnami prostředí (Frankham a kol., 2002) a zabránit tak jejich vymírání. Ochranářská genetika se věnuje především vzácným a ohroženým druhům, které se většinou vyskytují v malých a izolovaných populacích. Zatímco ve velkých populacích je většinou uplatňován přirozený výběr a existuje genetická rozmanitost, tj. diverzita (Frankham a kol., 2009), v malých populacích má významnější vliv náhodný genetický drift (posun), který způsobuje ztrátu genetické diverzity (Zemanová a kol., 2016) a pokles rozmanitosti alel (tj. genetických forem) genů.

Ochranářská genetika (podobně, jako všechny složky ochranářské biologie) je tedy motivována potřebou snížit současnou míru vymírání a zachovat biologickou rozmanitost (tj. biodiverzitu) druhů (Frankham a kol., 2009). Klíčovými oblastmi, kterými se zabývá, jsou např. biodiverzita, ohrožení, zranitelnost, evoluční potenciál, inbrední deprese a ztráta fitness, fragmentace populací, řešení taxonomických nejasností, genetický management ohrožených druhů a využití molekulární genetiky k ochraně přírody (Frankham a kol., 2002).

3.1. Získávání DNA neinvazivní a nedestruktivní metodou

Jelikož se ochranářská genetika věnuje zkoumání ohrožených druhů, je pro ni neinvazivní získávání DNA velice důležité. Tato metoda získání/odběru umožňuje genetický výzkum živočichů vyskytujících se ve volné přírodě bez nutnosti jejich usmrcení nebo odchytu. Tohoto přístupu se nejvíce využívá při studiích obratlovců, kde se za nečastější typ vzorku používá trus nebo srst (Taberlet a kol., 1999). Tento postup je obtížnější u druhů, u kterých se ani jedna z výše zmíněných skutečností nevyskytuje. Obojživelníci jsou velice specifickou skupinou, jelikož jejich životní cyklus není vázán pouze na jeden ty stanoviště, ale jedná se o cyklus komplexní, proto se při jejich zkoumání této metody moc nevyužívá. Pro odběr vzorků se tedy využívá nedestruktivní, nikoli neinvazivní metoda (Ringler, 2018; Joly, 2019).

Z dohledané literatury jsem dospěla k závěru, že nejvyužívanější typ nedestruktivního získávání DNA u obojživelníků je metoda bukálních stěrů, kdy je nutný odchyt a následná manipulace se zvířaty (Pidancier a kol., 2003; Müller a kol., 2013). Ovšem ani tento typ není bezchybný a může u něj dojít ke kontaminaci vzorku

(Taberlet a kol., 1999), která může být způsobena například odběrem vzorků z kloaky v období páření zkoumaných jedinců (Müller a kol., 2013).

Jako možný způsob neinvazivního odběru vzorků u obojživelníků může být využití environmentální DNA (eDNA), která je relativně novým nástrojem a s nulovým negativním vlivem na zkoumané organismy. Tento způsob se osvědčil pro určení vodních druhů živočichů za pomoci izolace DNA ze vzorku životního prostředí, jako je např. voda (Jerde a kol., 2011; Malekian a kol., 2018). Ve vodním prostředí pochází z odloučených buněčných materiálů, vylučovaných nebo oddělených z druhů obývajících nebo navštěvujících vodní systém. Může poskytnout důkaz o nedávné přítomnosti určitého druhu v tomto vodním systému, aniž by bylo nutné přímé pozorování (Jerde a kol., 2011). Tato metoda se například použila ve studii, kde cílem bylo zjištění výskytu skokana lesního (*Lithobates sylvaticus*) v Kanadě. Jejich výsledkem byl pozitivní, jelikož tímto způsobem byla detekce tohoto obojživelníka vyšší, než za použití standartních metod (v tomto případě využití vizuálního průzkumu a průzkumu pulců) (Ruso a kol., 2019). Jako jediné omezení této metody ovšem vidím v tom, že pouze identifikuje přítomnost druhů v prostředí, nikoli populační genetické parametry (jako je genetická diverzita nebo výskyt inbreedingu).

3.2. Genetická diverzita

Biodiverzita a její udržování je hlavním tématem ochranářské biologie a genetiky, je totiž podmínkou, aby se populace mohly přizpůsobit změnám životního prostředí (Zemanová a kol., 2016). Klíčovými body pro úspěšnou ochranu ohrožených druhů jsou odhalení vzorců genetické diverzity a bariér pro tok genů (Pröhl a kol., 2021). Tok genů ovlivňuje genetickou diverzitu populace a může být omezen fyzickými bariérami (Choudhuri, 2014). Diverzita populací může být, ale ovlivněna i mnoha dalšími nepříznivými vlivy. Jedním z nich je např. inbreeding, který popisuje stav, kdy v populaci dochází k příbuzenskému plemenitbě, a tím se zvyšuje pravděpodobnost, že potomek takovéhoto křížení bude homozygotní (Zemanová a kol., 2016). Pro větší podrobnost a vzájemnou návaznost jednotlivých pojmů, které budu v této práci užívat, jsem vytvořila textovou Přílohu č. 1, která je všechny popisuje.

Genetická diverzita je důležitým ukazatelem hodnoceným nejen u volně žijících ale rovněž u hospodářsky chovaných zvířat a pěstovaných rostlin. Její úroveň je zohledňována při konstrukci šlechtitelských programů udržujících a zlepšujících vlastnosti hospodářsky významných druhů (Primack a kol., 2011). Např. genetická

diverzita byla hodnocena u tuzemského plemene Přeštické černostrakaté zařazeného mezi genetické živočišné zdroje (Krupa a kol., 2021) a to použitím jak rodokmenových, tak SNP informací. Z výsledků vyplývá potřeba stabilizovat míru příbuzenské plemenitby v dlouhodobém horizontu pomocí optimálního výběru rodičů příštích generací.

Následující text je věnován empirickým studiím, které se zaměřili na měření genetické diverzity populací obojživelníků.

Studie Fusco a kol. (2021) se zaměřila na zjištění genetické konektivity populací mločíka dvoupasého (*Eurycea bislineata*) v městském, předměstském a venkovském prostředí v metropolitní oblasti New York City. Celkově bylo odebráno 351 vzorků tkání ze 350 jedinců z výše zmíněných lokalit, aby bylo možné porovnání genetické konektivity mezi stanovišti s různou mírou urbanizace. Výsledky této studie získané pomocí gentoypování SNP odhalily sníženou genetickou konektivitu populací mezi vodními toky v městské krajině, která koresponduje s potenciálními bariérami toku genů, to znamená s oblastmi s hustší urbanizací (silnice, průmyslové budovy a obytné domy). U předměstské populace byly také zaznamenány oblasti se sníženou konektivitou, které jsou spojovány s oblastmi s větším využitím půdy lidskou činností, ale i větší konektivitou v rámci rezervace, která je chráněna před zástavbou. Propojenost mezi populacemi nacházejícími se v sousedních venkovských tocích byla relativně vysoká. Nicméně, hlavní silnice odpovídala genetickým zlomům, tzn., představovala bariéru, i když stanoviště celkově obsahovalo více propojené zelené plochy.

Dle IUCN byl tento druh zařazen do skupiny nejméně dotčených druhů, i přes to že některé studie ukazovali jeho sníženou lokální početnost a hustotu v městských oblastech. Při odběru vzorků se jednalo o manuální odchyt, co zahrnovalo také otáčení krycích objektů v tocích i jejich okolí. Konkrétním zdrojem DNA byl malý odstřihnutý kousek ocasu obojživelníka. Tento typ sběru vzorků bych označila za moc invazivní, jelikož mohlo dojít k vyrušení nejen jedinců studovaného druhu, ale i ostatních živočichů zde žijících. Není ale zcela známo, jestli u tohoto druhu je i jiná možnost odběru kvalitních vzorků pro podobnou analýzu, jaká byla provedena v této studii. Jako zajímavé zjištění této práce bych uvedla, že navzdory značně vyššímu narušení krajiny způsobené lidskou činností si městské a předměstské populace mloka udržely srovnatelnou úroveň genetické diverzity jako jejich venkovské protějšky. Nicméně,

malá efektivní velikost populace zjištěná v městských biotopech by v budoucnu mohla výrazně zvyšovat pravděpodobnost ztráty heterozygotnosti v důsledku genetického driftu.

Předmětem následující studie (Wilk a kol., 2020) byl mločík popelavý (*Plethodon cinereus*). Cílem bylo zjistit, jak velikost stanovišť ovlivňuje hustotu populace a genetickou diverzitu v městském prostředí v Ohiu v USA. Dále se zaměřili na vzorce genetické diferenciace a konektivitu, s cílem zhodnotit tok genů mezi populacemi a testovat historický demografický „bottleneck“ tj. efekt hrdla láhve. Populace se nacházeli v 9 městských lesech o velikosti od cca 1 ha do přibližně 250 ha. Za pozitivum metodiky této práce bych uvedla to, že autoři vymezovali studijní lokality dle významných řek nebo silnic, a to bez ohledu na stanoviště na protější straně, na základě zjištění, že tyto krajinné prvky brání v pohybu. Byla použita invazní a destruktivní metoda získávání DNA, sběr probíhal pomocí odstranění špičky ocasu. U následujících průzkumů se vzorky nesbírali od jedinců, kterým konec ocasu chyběl nebo ho neměli celý, tím bylo dosaženo, že zde nebyly zařazené duplicitní vzorky. Zůstává ale otázkou, zda byla tato metoda opravdu úspěšná, jelikož odběry byly prováděny s měsíčním odstupem.

Autoři nezjistili žádný zjevný vliv velikosti hodnoceného stanoviště na hustotu mloka ani jeho genetickou diverzitu, ale byla zaznamenána významná genetická diferenciace u většiny ze srovnávaných populací. Pozorovaná diferenciace nebyla výsledkem fyzické vzdálenosti nebo efektivní vzdálenosti kvůli krajinným bariérám. Populace na každém ze stanovišť vykazovali historický efekt hrdla lahve. Studie současně ukazuje, že mloci červenohřbetí mohou přetrvávat v zalesněných městských parcích, ale jejich genetická rozmanitost zůstává citlivá na demografické změny.

Obr. č. 1: Hodnoty FST s 95% intervaly spolehlivosti. Signifikantní hodnoty jsou označeny *. Byly použity následující zkratky pro označení stanovišť: Blendon Woods (BW), Glen Echo (GE), Highbanks (HB), Iuka Park (IK), Inniswood Metro Garden (IW), John Beltz Retreat Center (JB), Sharon Woods (SW), Woodward Park (WP), and Whetstone (WS) (Wilk a kol., 2020).

	BW	GES	HB	IK	IW	OB	SW	WP	WS
BW	NA	0.004–0.055	0.017–0.110	0.064–0.159	0.034–0.181	0.030–0.174	0.062–0.245	0.011–0.200	0.000–0.030
GES	0.028*	NA	0.006–0.074	0.056–0.175	0.050–0.079	0.030–0.210	0.053–0.254	0.013–0.087	−0.003-0.072
HB	0.060*	0.040*	NA	0.060–0.211	0.053–0.220	0.048–0.320	0.040–0.204	0.018–0.132	0.003–0.089
IK	0.102*	0.113*	0.130*	NA	0.060–0.301	0.112–0.253	0.043–0.185	0.043–0.182	0.044–0.138
IW	0.095*	0.066*	0.142*	0.171*	NA	0.050–0.089	0.075–0.416	0.068–0.242	0.039–0.224
OB	0.093*	0.115*	0.173*	0.179*	0.068*	NA	0.108–0.367	0.042–0.359	0.046–0.196
SW	0.151*	0.150*	0.119*	0.104*	0.247*	0.241*	NA	0.057–0.224	0.051–0.161
WP	0.082*	0.043*	0.074*	0.100*	0.156*	0.183*	0.136*	NA	0.008–0.113
WS	0.016*	0.029	0.046*	0.084*	0.113*	0.111*	0.100*	0.048*	NA

Autoři další práce (Yannic a kol., 2021) vyhodnocovali genetické struktury mloka skvrnitého (*Salamandra salamandra*) podél gradientu využití půdy mezi venkovem a městem. Jejich hlavním cílem bylo vymezit genetické jednotky podél tohoto gradientu a porovnat genetickou diverzitu populací obou oblastí pro lepší management. Při použití různých analytických přístupů byl soubor dat rozdělen do mírně odlišných, ale vysoce kongruentních shluků, které zahrnovaly lokality vzdálené od sebe až 19 km. Omezení toku genů nebylo tak silně ovlivněno antropogenními (tj. dálnice, silnice nebo urbanizace) ani přírodními bariérami (tj. řeky), jak se předpokládalo. Pozitivním zjištěním této studie taky bylo to, že hodnoty F_{IS} se nelišily od nuly, co naznačuje absenci inbreedingu. Parametry genetické diverzity (hodnoty alelické bohatosti (AR) a heterozygotnosti (Hs)) byly vyšší ve venkovských oblastech.

Uvedené zjištění může být považováno za pozitivní výsledek, nicméně svou roli zde mohla sehrát i dlouhověkost zkoumaného druhu. Ze zmíněných krajinných prvků se může vytvořit měřitelný bariérový efekt až v budoucnu a genetické změny z důvodu bariér se tedy mohou projevit až po delším časovém úseku působení. Právě z tohoto důvodu je nezbytný i následovný monitoring, jak jsem uváděla už u některých výše zmíněných studií. Účinky krajinných prvků na genetickou strukturu populace obojživelníků nelze zobecnit, ale jsou závislé na sledovaném druhu (případně na regionu). Dosažené výsledky také zdůrazňují obtížnost při vymezení genetických jednotek v otevřených systémech, jako jsou volně žijící populace.

Preißler a kol. ve své práci z roku 2020 studovali mloka levantského (*Salamandra infraimmaculata*) v severní oblasti Izraele podél hory Hermon, kde by mohla být jeho populace fragmentována městskou a zemědělskou krajinou. Autoři hodnotili genetickou strukturu čtyř populací na základě mikrosatelitních lokusů a mitochondriálního genu D-loop, s cílem určit genetickou diverzitu a konektivitu mezi populacemi. Jako metodu získávání vzorků byl použit odběr z ocasní části pulců. Byl zjištěn mírný tok genů v nižších částech pohoří, což naznačuje existující, ale omezenou konektivitu mezi populacemi. Na této práci se mi líbilo, že vedle sledování genetických atributů populací byla zahrnuta i jejich poloha v rámci nadmořské výšky. A to má veliký význam, jelikož bylo zjištěno, že genetická diverzita a tok genů hodnocených populací se snižovaly podél výškového gradientu hory Hermon a dosáhli nejnižší úrovně u nejvýše položené populace v oblasti Nimrod Pool. Tyto data tedy poskytly informace o stupni genetické izolace mezi populacemi a jejích příčinách. Uvedené údaje mohly být, proto poskytnuty pro místní ochranu tohoto ohroženého druhu.

Wei a kol. (2021) zkoumali demografickou historii a genetickou strukturu skokana východního (*Pelophylax plancyi*) po celé Šanghaji v Číně. Základem studie bylo hodnocení přítomnosti vybraného mitochondriálního genu, mikrosatelitů a jednonukleotidového polymorfismu (SNP) ve vzorcích odebraných u 15 místních populací. Z výsledků vyplývá, že, všechny místní populace zažily během své historie bottleneck způsobený lidskou činností. Nicméně, populace v městských oblastech si udržely současnou efektivní velikost a genetickou rozmanitost srovnatelnou s příměstskými a venkovskými populacemi. Rychlá moderní urbanizace však již přinesla významné negativní dopady na celistvost populací. Těchto 15 místních populací bylo diferencováno do osmi genetických shluků, které se shodovaly s prostorovým rozložením urbanizace a geografií ostrova a pevniny. Ačkoli stále dochází k mírnému toku genů z venkovského periferního klastru do městských a příměstských oblastí, fragmentace populace je výraznější u městské a příměstské populace. Vyšší úroveň urbanizace v oblastech s poloměrem 2 km vykazovala významný negativní vztah k efektivní velikosti populace a genetické diverzitě místních populací. Pro ochranu populací s omezenou schopností rozšiřování by proto mělo být nejdůležitější zlepšení podmínek ve fragmentovaných zbytcích stanovišť.

Jako poslední studii, jsem si vybrala práci od Schmidta a Garrowaya z roku 2021, ti provedli komplexní znovu-vyhodnocení mikrosatelitových dat volně dostupných na online úložištích obsahujících informace o 19 druzích obojživelníků, kterých vzorky odebraných na 554 geo-referenčných místech v Severní Americe. Autoři propojením souhrnných dat o četnosti městské a venkovské populace obyvatelstva, měření hustoty lidské populace „Human Footprint Index“ a o nepropustnosti povrch a dat odběru vzorků zkoumaných obojživelníků, které obsahovali informace o jejich geografickém umístění, genetické diverzitě, alelické bohatosti, efektivní velikosti populace a populační diferenciaci. Došli k závěru, že lidská přítomnost a urbanizace neměly tendenci mít silné účinky na genetickou rozmanitost obojživelníků nebo strukturu populace pro tato zkoumané druhy, jelikož byl zjištěn minimální vztah (ať už pozitivní nebo negativní) mezi genetickými parametry sledovaných populací obojživelníků a urbanizací.

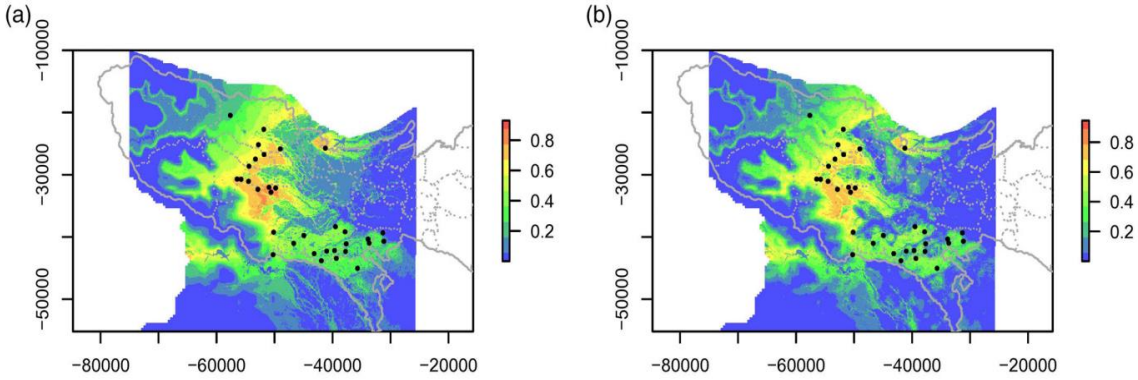
Této studii nemám téměř co vytknout, celkové zpracování mi přijde vhodné a líbila se mi komplexnost a také výběr druhů pro zkoumání. Problém ovšem vidím v tom, že pokud studie pracuje s více druhy obojživelníků, jak je tomu zde, nedokáže se podrobněji zaměřit na budoucí managment a ochranu. Tato publikace ale může být použita jako podklad pro následující studie, které se budou věnovat jednotlivým druhům samostatně.

3.1. Landscape genetics

Jedním z komplexních řešení ochranářské genetiky může být metoda krajinné genetiky, která využívá metody k propojení genetických dat s těmi prostorovými. Tato disciplína vznikla jako výsledek snahy vysvětlit pozorované prostorové genetické vzorce (jako je míra příbuznosti mezi jedinci či populacemi) pomocí krajinných proměnných. Po vzorkování se genetické a statistické nástroje používají k určení prostorového genetického vzoru a ke korelaci s krajinnými nebo environmentálními charakteristikami. Geografické informační systémy (GIS) mohou být totiž použity k vizualizaci prostorových genetických vzorců (např. hranic) a také k vytváření hypotéz o příčině genetických hranic, protože GIS umožňuje překrytí krajinných proměnných na genetická data. GIS vede k vytváření syntetických map poskytujících různé geostatistické nástroje pro interpolaci (Manel a kol., 2003, Storfer a kol. 2007).

Tato metoda byla například využit ve studii Okamiya a Kusano (2019), kde hodnotili rozdíly mezi populacemi skokana pestrobřichého (*Rana ornativentris*) v Tokiu v Japonsku. Zjišťovali, zda prostorová konfigurace oblastí zbytkových stanovišť v rámci fragmentované krajiny formovala vzorce genetické diverzity tohoto obojživelníka. Pomocí 6 mikrosatelitů hodnotili genetickou diverzitu 33 místních populací a párové genetické vzdálenosti mezi nimi. Mapy vhodnosti stanovišť byly vyvinuty na základě dvou modelů, první na základě klimatických a topografických proměnných a druhý navíc zahrnoval jako další proměnnou potenciální bariérový efekt urbanizace. Autoři zjistili, že kvalita stanoviště (v tomto případě se jednalo funkci proměnných prostředí) a stupeň fragmentace ovlivňují genetickou diverzitu a tok genů u tohoto druhu. Genetická vzdálenost mezi dvěma populacemi vykazovala nejvyšší korelaci se vzdálenostní (tj. ekologickou rezistencí) při použití komplexnějšího mapového modelu. Následující obrázek ukazuje výstupy této studie, kdy první dvě mapy okazují vhodnost stanovišť na základě dvou modelů. U mapy a, byly zahrnuty topografické a klimatické proměnné, a u mapy b, byl také zahrnut bariérový efekt způsoben urbanizací.

Obr. č. 2: Mapy zobrazující vhodnost stanovišť pro *Rana ornativentris* ve zkoumané oblasti (Tokyo, Japonsko) dle dvou modelů: HSn (a) a HSu (b). (Okamiya a Kusano, 2019).



Další studie, kterou bych so této kapitoly ráda zmínila, je práce od Pröhla a kol. (2021). Autoři se zabývali rozšířením kuňky obecné (*Bombina variegata*), její populační strukturou, genetickou diverzitou a krajinnými účinky, které na ni působily. Jejich výsledky naznačují vysokou míru fragmentace (tj. nízký gen tok) a nízkou genetickou diverzitu populací, to bylo potvrzeno zjištěnými hodnotami alelické bohatosti (AR) a heterozygotnosti (H_o). Bylo ukázáno, že genetická diverzita a genetická konektivita populací byla snížena, a to působením hustotou silnic a městskými oblastmi, které tvořily bariéry pro tok genů. Doporučení autorů pro posílení genetické diverzity a její zachování je, aby byl umožněn přirozený genetický tok mezi izolovanými populacemi, na který se ale nemá využívat translokačních programů.

3.2. Reintrodukce

Jak již bylo naznačeno v předchozí kapitole, posilování či repatriace populací, jako typ ochranářského managementu, je stále častější a může být jediným způsobem, jak zabránit vymíraní ohrožených populací. V této kapitole bych se ráda věnovala definici a významu translokačních programů, ale také následnému monitoringu.

DEFINICE POJMŮ dle IUCN (2013):

TRANSLOKACE zastřešuje jakoukoliv lidskou aktivitu, při které dochází k přesunu jakýchkoli organismů z jedné oblasti do jiné. Může se jednat o přemístění nevědomé ale i úmyslné. V druhém případě se tak může dít pro dosažení různých cílů, např. zlepšení životních podmínek, zmenšení populace nebo z důvodu ochrany přírody. Ochranářská translokace je záměrný přesun a vypuštění živého organismu, jehož hlavním cílem je ochranářský přínos. Ten obvykle zahrnuje zlepšení stavu ochrany ohniskového druhu na místní nebo celosvětové úrovni a/nebo obnovení přirozených funkcí nebo procesů v ekosystému. Ochranářské translokace mohou zahrnovat vypouštění buď v rámci původního areálu druhu, nebo mimo něj. Původní areál druhu je známé nebo předpokládané rozšíření, které vyplývá z historických (písemných nebo ústních) záznamů nebo fyzických důkazů o výskytu druhu.

Jako OBNOVA POPULACE je považuje jakékoli ochranářské přemístění do původního areálu výskytu, které zahrnuje posílení populace a proces reintrodukce.

POSÍLENÍ POPULACÍ nebo také REPATRIACE je záměrný přesun a vypuštění organismu do stávající populace stejného druhu. Tato činnost má za cíl zvýšit životaschopnost populace, například zvětšením její velikosti, zvýšením genetické rozmanitosti nebo zvýšením zastoupení určitých demografických skupin nebo stadií.

REINTRODUKCE označuje proces záměrného přesunu a vypuštění organismu uvnitř jeho původního areálu, z kterého vymizel. Jejím cílem je obnovení výskytu životaschopných populací druhů v rámci jejich původních areálů. Na rozdíl od toho INTRODUKCE označuje činnost, při které záměrné přemístění a vypuštění organismu je mimo jeho původní areál. Existují dva typy introdukce: asistovaná kolonizace a ekologická náhrada. Cílem asistované kolonizace je zabránit vyhynutí populací ohniskového druhu. Tento proces se provádí především tam, kde ochrana před současnými nebo pravděpodobnými budoucími hrozbami je na alternativních lokalitách více proveditelná než v současném areálu rozšíření. Naproti tomu,

ekologická náhrada je záměrné přemístění za účelem obnovení ekologické funkce, která byla ztracena v důsledku vyhynutí jiného druhu v areálu, a bývá často nahrazena nejbližším existujícím poddruhem nebo druhem blízko příbuzným.

Reintrodukce a s tím související chov v zajetí jsou známými, ale i kontroverzními ochranářskými zásahy (Harding a kol., 2016). V zájmu zachování rovnováhy v ekosystémech je možné navrácení vyhubených druhů na původní místa (reintrodukce) (Šlégl a kol., 2005). Tento ochranářský management je u obojživelníků náročný a nemusí vždy fungovat (IUCN, 2021), a to z několika různých důvodů. Tento proces může být ale nejlepší nebo také jedinou možností, jak některé druhy zachovat (IUCN, 2021). Analýza reintrodukce a chovu obojživelníků v zajetí proto může přinést cenné informace pro vyhodnocení jejich skutečného přínosu (Harding a kol., 2016). Např. za 7 let od zahájení Akčního plánu ochrany obojživelníků (ACAP) organizace IUCN v roce 2007 bylo zjištěno, že se počet druhů zapojených do těchto projektů v porovnání s předchozím obdobím (1966–2006) zvýšil o 57 % (Harding a kol., 2016). V rámci programů se zvýšilo zastoupení žab, salamandrů a čolků a celkově obojživelníků mezi chráněnými druhy. Přibližně polovina programů zahrnovala zoologické zahrady a akvária, přičemž podobný podíl byl zastoupen ve specializovaných zařízeních provozovaných vládními nebo nevládními agenturami. Harding a kol. (rok 2016) rovněž zjistili, že u většiny programů bylo použito jako preventivní opatření proti vyhynutí ve volné přírodě zajištění populací v zajetí a také výzkum související s ochranou přírody.

V následující části této kapitoly jsem se zaměřila na posouzení úspěšnosti jednotlivých studií zabývajících se translokačními programy, které pro své hodnocení využívaly genetické metody. Tyto publikace jsem následně zhodnotila a vytvořila k nim doporučení.

Práce Phillips a kol. (2020) byla zaměřena na monitoring a zkoumání populací obojživelníka, který byl 90. letech předmětem reitrodukčních programů. Předmětem výzkumu byla Ropucha krátkonohá (*Epidelea calamita*), která prošla ve Velké Británii na začátku 20. století rozsáhlým úbytkem populací z důvodu ztráty biotopů a sukcesích změn na místech rozmnožování. Genetické hodnocení bylo uskutečněno u dvou reintrodukovaných populací s cílem získat podklady pro další ochranářský management. Výsledky genetické rozmanitosti druhu a úroveň genetické diverzity v reintrodukovaných populacích byly porovnány s předcházejícími výsledky na

studovaných lokalitách a u zdrojových populacích. Hodnocena byla přítomnost bottlenecku a inbreedingu a zda došlo k omezení toku genů mezi studovanými oblastmi (autoři to zde nazývají pojmem pools). Zdrojem informací byly vzorky bukálních stěrů a následná mikrosatelitní analýza DNA. Autoři zjistili, že v místech reintrodukce byl zjištěn významný inbreeding (potvrzen hodnotami F_{is}), nízká heterozygotnost ve srovnání s její očekávanou hodnotou a výrazná odchylka od Hardy-Weinbergovy rovnováhy. Pozorovaná heterozygotnost byla nižší než ve zdrojové populaci v době reintrodukcí. Důkazy pro bottleneck nebyly nalezeny. V rámci lokality ale nebylo pozorováno žádné významné omezení genetického toku.

Myslím, že uvedená práce zdůrazňuje důležitost průběžného genetického monitorování ve spolupráci s ochranářskými organizacemi na podporu ochrany přírody. Tuto studii bych označila ze velice přínosnou a příkladovou pro budoucí práce, kterých cílem je určení genetických parametrů u post-reintrodukovaných druhů a jejich populací.

Další vybraná publikace (Kraaijeveld-Smit a kol., 2006) se zabývala zachováním obranných reakcí vůči predátorům u populací, které byly po různou dobu chované v zajetí a následně vypuštěny do přírody. Studie se primárně zaměřila na hodnocení indukovaných obranných reakcí u mallorské ropušky baleárské (*Alytes muletensis*) jako reakce na zavlečené predátory. Reakce byly porovnávány u 2 přirozených a 2 reintrodukovaných populacích, které měly společné předky. Populace, které prošli chovem v zajetí a byly následně vypuštěny zpátky do přírody, zde byli drženy po různě dlouhou dobu (po dobu 3–8 generací). Cílem bylo prokázat, jestli dlouhodobý chov v zajetí nepoznamenal jejich obranné reakce ve formě odtržení ocasu od zbytku těla. Taktéž byla hodnocena genetická variabilita sledovaných populací pomocí mikrosatelitových lokusů. Na následujícím obrázku je možné vidět zjištěné úrovně heterozygotnosti a alelické bohatosti v sledovaných populacích. Je zde vidět, že heterozygotnost se mezi přirozenou a reintrodukovanou populací mírně lišila, přičemž reintrodukovaná populace vykazovala nižší alelickou bohatost.

Obr. č. 2: Vyhodnocení úrovně heterozygotnosti a alelické bohatosti v populacích mallorské ropušky baleárské (*Alytes muletensis*). Populace zakladatelů, potomků a dlouhodobého chovu v zajetí měli stejného předka. (Kraaijeveld-Smit a kol., 2006).

	Wild populations		Captive populations	
	Founder	Descendent	Short-term	Long-term
Heterozygosity	$0{\cdot}61 \pm 0{\cdot}014^{ab}$	$0{\cdot}58 \pm 0{\cdot}016^{b}$	$0{\cdot}67 \pm 0{\cdot}029^{a}$	$0{\cdot}50 \pm 0{\cdot}026^{c}$
Alleles	$6{\cdot}15 \pm 1{\cdot}78^{a}$	$5{\cdot}10 \pm 1{\cdot}66^{b}$	$5{\cdot}00 \pm 1{\cdot}83^{ab}$	$3{\cdot}00 \pm 1{\cdot}05^{c}$

Tato práce se mi osobně velice líbila a nemám ji co vytknout. Výsledky bych označila za přinejmenším průlomové pro dané téma, jelikož jsem při hledání vhodných studií nenarazila ani na jednu, která by posuzovala zachování atributů u reintrodukovaných populací. Obzvlášť kladně bych ohodnotila i to, že práce porovnávala mezi sebou populace, které měli shodné předky a byli vystaveny chovu v zajetí po různě dlouhou dobu.

Navzdory tomu, že úspěšná reintrodukce je často považována za konečný milník pro ochranářské programy, může se stát, že kvůli nevratnosti mnoha současných hrozeb je nedostačující. Namísto toho může být zapotřebí výzkum populací v zajetí, aby bylo možné vyvinout nápaditá řešení pro umožnění obojživelníkům přežít vedle současných, vznikajících a budoucích hrozeb (Harding a kol., 2016). Program reintrodukce lze považovat za úspěšný, pokud díky němu dojde k vytvoření životaschopné populace (Robert a kol., 2015). Dle mého názoru tento způsob posuzování podle jednoho faktoru je nedostačující, jelikož nemusí u všech studií zahrnout i genetické hodnocení transponované populace. Např. v práci Thompson a kol. z roku 2022 byl mírou úspěšnosti pouze součet snůšek zkoumaného druhu a genetické hodnocení bylo zanedbáno. Geneticky byla hodnocena pouze přítomnost houbového onemocnění. Atribut početnosti snůšek je sice také podstatný pro určení úspěšnosti repatriačních programů, ale nemůže být brán jako jediná podmínka hodnocení úspěšnosti.

Jako poslední myšlenku této kapitoly bych uvedla, že je, podle mě, nesmírně důležité v monitoringu těchto populací pokračoval i nadále, a to v delším časovém horizontu (desítky let), protože následky nízké genetické diverzity se mohou projevit až po delší době, jak to bylo také zdůrazněno v příkladových empirických studiích. Dalším důležitým argumentem monitoringu je potřeba navržení a aplikování

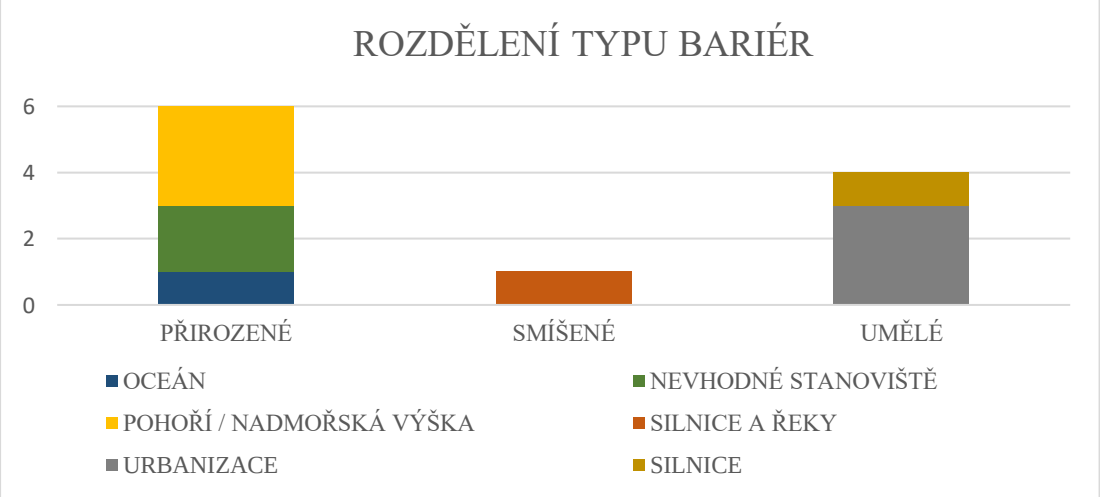
ochranářského managementu, který by pomohl ve zvýšení genetické rozmanitosti populací (Philips a kol., 2020).

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

V této kapitole se budu zabývat výsledky z dohledaných a načtených studií. Jako prostředek vyhledávání zdrojů jsem využila stránek WOS a stránky významných vědeckých časopisů (např. Conservation Genetics). Jako klíčová slova jsem použila slovní spojení conservation genetics, reintroduction, genetic diversity, gene flow a landscape genetics of amphibians.

Výstupem rešeršní části mé práce byla tabulka (Tabulka č. 1), která obsahuje výčet jednotlivých parametrů a cílů, které práce analyzovaly. Ze všech použitých zdrojů jsem pro potřeby této tabulky využila 17 empirických studií. Ty se v 9 případech zabývaly čistě genetickému hodnocení bezocasými (žáby) a v 7 případech ocasatými obojživelníky, jedna studie (Schmidt a Garroway z roku 2021) se zaměřila na společné hodnocení obou skupin, kdy 8 druhů bylo bezocasých a u zbylých 11 se jednalo o ocasaté obojživelníky. Předmětem studií byla ve všech případech analýza genetického stavu populací, tzn. vyhodnocení genetické diverzity, v 10 z nich se jednalo také o genetický tok mezi populacemi. Co se týče lokalit sběru vzorků, jednalo se v pěti případech o přirozené vodní plochy, ve třech případech o pohoří, ve pěti případech o smíšené venkovské a městské lokality, ve třech případech o čistě městské prostředí a u tří studií nebylo prostředí specifikováno. Jak je možné vidět v Tabulce č. 1, tok genů byl významně omezen ve 11 studiích, z toho bylo ve čtyřech studiích potvrzeno pouze částečné omezení tohoto procesu. S omezením toku genů je spjata i identifikace typu bariér, a proto jsem vytvořila následující graf, který zobrazuje vyhodnocení bariér v empirických studiích.

Graf č. 1: Typy bariér určených v empirických studiích z Tabulky č. 1. Bariéry byly rozděleny do tří skupin (přirozené, smíšené a umělé).



Jak je možné vidět na přiloženého sloupcovém grafu, nejčastějšími bariérami byly urbanizace, ve formě městské výstavby (3 případy), pohoří nebo nadmořská výška (3 případy) a nevhodná stanoviště (2 případy). Dalším hodnoceným parametrem byla také přítomnost inbreedingu. Ten se ale potvrdil pouze u čtyř studií.

Co se týče genetických metod, které se pro hodnocení ve studiích používali, jednalo se v 16 ze 17 případů o mikrosatelitní analýzu, která byla ve 4 případech společně užita s mitochondriální analýzou a s analýzou SNP. Analýza SNP byla samostatně využita pouze u jedné studie.

Dle dostupných a načtených zdrojů lze říct, že ochranářská genetika, a tím i proces reintrodukce jako ochranářský management, má značný potenciál a můžou být jedinou možnosti pro zachování a ochranu druhů. Jelikož asi nejvýraznějším globálním faktorem, který ovlivňuje ekosystémy je v současnosti urbanizace (Noël a Lapointe, 2010), která je uváděna jako jedna z hlavních příčin ohrožení obratlovců (Schmidt a Garroway, 2021), se touto problematikou zabývala přibližně polovina vybraných studií. U některých bylo provedeno pouze zhodnocení genetického stavu populací, u jiných bylo realizováno i následné porovnání mezi urbanizovanou a přirozenou krajinou. Tato porovnání se týkala především propojenosti krajiny a zhodnocení genetického stavu zde žijících populací. Zde bych jako překvapující zjištění uvedla, že i přes to že zkoumané městské populace prodělaly bottleneck, vykazovaly podobné hodnoty genetické diverzity jako populace venkovské. Avšak populace žijící v blízkostí urbanizací byly více náchylné k fragmentaci.

Zajímavým zjištěním také bylo, že i navzdory ztrátě stanovišť a degradaci populací některé druhy nadále přetrvávají ve změněné městské krajině (Wilk a kol., 2020) a měřitelný genetický efekt, a to ve formě zvýšených hodnot F_{is}, označující koeficient inbreedingu, nebo hodnoty H_o, která vyjadřuje heterozygotnost, není vždy u těchto populací detekován (Yannic a kol., 2021). Faktem ale je, že se většinou jedná o dlouhověké druhy, a proto se změny v antropogenních (tj. dálnice, silnice nebo urbanizace) a přírodních (tj. řeky) krajinných prvcích můžou na populacích projevit až s odstupem času. Není možné úplně vyloučit, že se z těchto krajinných prvků v budoucnu objeví bariérový efekt projevující se i na genetické úrovni (Yannic a kol., 2021). Je proto velmi důležité zaměřit se na studium účinku krajinných prvků a na prostorovou a genetickou strukturu populací.

V rešeršní části mé práce jsem se také zabývala tématem krajinné genetiky, která používá pro vytváření grafických a mapových modelů metody, které v sobě propojují populační genetiku s krajinnou ekologií (Storfer a kol., 2010). Tato metoda hodnocení mi osobně připadá zajímavá a do budoucna velice prospěšná, jelikož díky propojení lze analyzovat procesy, které ovlivňují zkoumané druhy a populace, a tak lze identifikovat nežádoucí vlivy jako jsou např. bariéry pro tok genů. Publikací na toto téma jsem mnoho nenašla, to může být důkaz toho, že tento obor je ještě mladý a neustále se rozvíjí, jelikož mnoho studií bylo publikováno jen nedávno.

Část mé rešerše byla věnována také otázce reintrodukce a translokačním programům. U tohoto tématu jsem dospěla k závěru, že tento typ ochranářského managmentu je velice významný pro zachování a ochranu druhů, přesto ale není tak často využíván u skupiny obojživelníků. To může být způsobeno obecně náročnějším procesem zkoumání těchto živočichů, jelikož většina druhů v průběhu sezóny migruje mezi různými typy prostředí (Vojar, 2007).

Jedna z hlavních otázek mé práce byla, zda v populacích docházelo k inbreedingu. Tato skutečnost se potvrdila u obou zkoumaných populací ve studii Philips a kol. z roku 2020. Tyto výsledky byly z reintrodukované populace, která prošla translokačním programem před 20 lety. Příslušné populace byly obklopeny nevhodným prostředím a stanovišti pro migraci, měli také nízký přírůstek pulců (nelišící se od nuly), a proto by do budoucna mohla být provedena studie na posouzení úrovně adaptivní genetické variability zkoumaných populacích na lokalitách, s cílem prokázat, zda se adaptivní variabilita zachovala i přes příbuzenskou plemenitbu, která zde byla v obou zkoumaných populacích potvrzena. Signifikantní inbreeding byl také potvrzen u dalších 3 studií. Konkrétně se jednalo o populace, které byly obklopeny urbanizací a městským prostředím.

Závěrem bych jen ráda uvedla, že ochrana oblastí klíčových stanovišť by mohla být účinnou metodou k udržení populací živočichů, které mají omezenou schopnost šíření (Wei a kol., 2021). Vzhledem k tomu, že ochrana obojživelníků zahrnuje i ochranu jejich ekosystémů, je tedy důležité zdokumentovat stav lokality a jejího okolí, např. stupeň ovlivnění lokality člověkem nebo způsob využívání a statut ochrany. Základním předpokladem je proto tyto populace živočichů dlouhodobě studovat, monitorovat a dle potřeb usměrňovat jejich prostředí tak, aby se

minimalizoval případný pokles četnosti, snižovala fragmentace a zachovala jejich genetická diverzita (Noël a Lapointe, 2010).

Tabulka č. 1. Studie zaměřující se na ochranářskou genetiku obojživelníků

AUTOŘI	ZKOUMANÝ/É DRUH(Y)	LOKALITA	SKUPINA	BIOTOP (STANOVIŠTĚ)	CÍLE STUDIE	GENETICKÁ METODA	SNÍŽENÍ GEN. DIVERZITY	INBREEDING	TYP BARIÉR	GENENICKÝ TOK
Addis a kol. (2015)	Bufo boreas	Národní park Glacier (USA)	ŽÁBY	nebylo přesně popsáno – vodní plochy a řeky v okolí pohoří	popis genetické struktury populace a identifikace bariér pro toku genů	analýza mikrosatelitů	nebylo potvrzeno	hodnocen, ale nepotvrzen – hodnoty F_{IS} se nelišily od nuly	pohoří	částečně omezen
Alber a kol. (2014)	Alytes obstetricans	Španělsko	ŽÁBY	oblast horského masivu a jeho okolí	posouzení, zda může populace chovaná v zajetí sloužit, jako zdroj neinfikovaných jedinců pro reintrodukci tohoto druhu ve studované oblasti	analýza lokusů mikrosatelitů	potvrzeno		identifikováno – bez upřesnění (dle umístění pokalit se domnívám, že šlo o pohoří)	omezen
Fusco a kol. (2021)	Eurycea bislineata	New York City (USA)	MLOCI	suchozemská stanoviště v blízkosti toku s vysokou vlhkostí půdy; městské prostředí	posouzení, jak urbanizace ovlivňuje zkoumaný druh	analýza SNP	hodnoceno – všechny populace si ale drželi poměrně podobnou úroveň GD	hodnoceno, potvrzeno u městských populací, kde je větší pravděpodobnost u budoucích generací kvůli fragmentaci prostředí	místa s vyšší urbanizací a využíváním půdy člověkem, např. hlavní komunikace	omezen

Haugen a kol. (2024)	Triturus cristatus	Norsko	ČOLCI	vodní plochy v okolí boreálních lesů a zemědělské krajiny	genetické hodnocení vlivu zemědělské krajiny v porovnání s lesním prostředí	analýza mikrosatelitů	potvrzen pouze v prostředí zemědělské krajiny	hodnocen, ale nebyl potvrzen	nevhodné stanoviště v lesních porostech	částečně omezen
Kraaijeveld-Smit a kol. (2006)	Alytes muletnsis	Malorka	ŽÁBY	bez specifikace	vliv chovu v zajetí na zachování obranných reakcí vůči predátorům u obojživelníků, chovaných v přirozeném prostředí a v zajetí po různou dobu	analýza mikrosatelitů	hodnoceno, potvrzeno mírné snížení u reintro-dukovaných populací	hodnocen, nepotvrzen		neomezen
Noël a Lapointe (2010)	Plethodon cinereus	Montreal a okolí (Kanada)	MLOCI	zbytkové zalesněné oblasti ve městském prostředí	hodnocení genetické struktury obojživelníka v městském prostředí a v blízkém okolí	analýza mikrosatelitů	potvrzeno – populace měli nízkou AR a heterozygotnost	hodnocen, nebyl potvrzen	identifikováno – bez upřesnění	nelze potvrdit
Okamiya a Kusano (2019)	Rana ornativentris	Tokyo (Japonsko)	ŽÁBY	sekundární lesy v blízkosti městského prostředí	posouzení, zda prostorová konfigurace oblastí zbytkových stanovišť v rámci fragmentované krajiny formovala vzorce genetické diverzity a rozdíly v místních populacích zkoumaného druhu	analýza mikrosatelitů	potvrzeno		urbanizace	omezen

Phillips a kol. (2020)	Elidelea calamita	VB	ŽÁBY	vřesoviště a tůně	posouzení stavu reintrodukovaných populací, gen. diverzity, bottleneck efekt, výskyt inbreedingu	analýza mikrosatelitů	potvrzeno – nízká heterozygotnost ve srovnání s její očekávanou hodnotou	potvrzen – vysoké hodnoty F_{IS}	nevhodné okolní stanoviště	částečně omezen
Preißler a kol. (2020)	Salamandra infraimmaculata	hora Hermon (Izrael)	MLOCI	horském prostředí v blízkosti městské a zemědělské oblasti	určení genetické diverzity a konektivity mezi populacemi studovaného druhu, které mohly být fragmentovány městskou a zemědělskou krajinou	analýza lokusů mikrosatelitů a mtDNA – Dloop	potvrzeno	hodnocen, nepotvrzen	nadmořská výška v rámci studované oblasti	částečně omezen
Pröhl a kol. (2020)	Bombina variegata	Německo	ŽÁBY	bez specifikace	zhodnocení struktury populací ohroženého obojživelníka a jejich genetické diverzity pro vhodný budoucí ochranářský management	analýza mikrosatelitů a mitochondriální analýza	potvrzeno (hodnoty AR a H_o)	hodnocen, potvrzen na 31 lokalitách ze 47	silnice a urbanizace	omezen
Roth & Jedle (2015)	Bufo bufo	Norsko	ŽÁBY	bažiny a jezírka na pevnině a blízkých ostrovech	zhodnocení genetické diverzity zkoumaného druhu	analýza mikrosatelitů	potvrzeno u ostrovních populací		oceán	omezen

Schmidt a Garroway (2021)	19 různých druhů obojživelníků	Severní Amerika	Ž (8) M (11)	554 různých venkovských a městských oblastí	souhrnné genetické vyhodnocení působení lidského působení na 19 různých druhů obojživelníků v rámci Severní Ameriky	analýza mikrosatelitů	nebylo potvrzeno			
da Silva a kol. (2017)	Capensibufo rosei	Národní park Table Mountain (Jihoafrická republika)	ŽÁBY	bez specifikace	posouzení genetického stavu populací ohroženého druhu pro jeho budoucí monitoring a ochranářský management	analýza mikrosatelitů	nebylo potvrzeno	hodnocen, nebyl potvrzen		
Sunny a kol. (2014)	Ambystoma leorae	Národní park Iztaccihuatl-Popocatepetl (Mexiko)	MLOCI	řeky v lesních stanovištích a pastvinách	analýza genetické diverzity a přítomnost inbreedingu v populacích ohroženého obojživelníka	analýza mikrosatelitů	nebylo potvrzeno	hodnocen, nebyl potvrzen		
Wei a kol. (2021)	Pelophylax plancyi	Šanghaj (Čína)	ŽÁBY	venkovské a městské prostředí	vliv urbanizace na genetickou strukturu a propojení v rámci venkovských, předměstských a městských populací	analýza mikrosatelitů, mitochondrií (SSR) a analýza SNP	nepotvrzeno – diverzita příměstských i venkovských populací byla srovnatelná		dálnice a řeky	omezen

Wilk a kol. (2020)	Plethodon cinereus	Ohio (USA)	MLOCI	lesy v městském prostředí a přilehlé oblasti	posouzení, jak velikost stanovišť ovlivňuje hustotu populace a genetickou diverzitu v městském prostředí	analýza mikrosatelitů	nebylo potvrzeno	potvrzeno pouze u jedné z 9 populací (vysoké hodnoty FIS)	neidentifikováno	neomezen
Yannic a kol. (2021)	Salamandra salamandra	Švýcarsko	MLOCI	vodní stanoviště ve venkovských a městských oblastech	analýza prostorové genetické struktury studovaného druhu a následně zhodnotit příslušné účinky této (těchto) izolace(í)	analýza mikrosatelitů	potvrzeno pro celou oblast (Ar dosahovala vyšších hodnot ve venkovském prostředí)	hodnocen, ale nepotvrzen – hodnoty FIS se nelišily od nuly	identifikováno – bez upřesnění	omezen

6. ZÁVĚR

Ve své práci jsem se zabývala využitím genetiky v ochraně obojživelníků. Z načtené odborné literatury a vybraných publikací jsem vytvořila následující závěry:

- Nezaznamenala jsem žádnou studii, která by využívala neinvazivní metodu získávání DNA u obojživelníků pro genetické hodnocení.
- Jako jediný neinvazivní typ odběru vzorku DNA obojživelníku byla používána metoda environmentální DNA.
- Pro genetická hodnocení se využívalo mikrosatelitní a mitochondriální analýz a analýzy SNP.
- Genetická diverzita byla snížena u poloviny zkoumaných populací obojživelníků.
- Inbreeding byl potvrzen u čtyř empirických studií u populací obklopených městskou zástavbou nebo nevhodnými stanovišti.
- Nejčastějšími bariérami pro tok genů u populací ohrožených obojživelníků byly pohoří a urbanizace ve formě městské zástavby.
- Do budoucna může mít metoda krajinné genetiky (lanscape genetics) veliký přínos a význam ve studiích zabývajícími se fragmentací krajiny a jejím působením na organismy.
- V průběhu posledních let byla jako ochranářský managment nejčastěji aplikována translokace populací v podobě chovu v zajetí s následnou reintrodukcí.
- Úspěšnost reintrodukcí, které byly provedeny, byla nízká na základě nepříznivých hodnot F_{IS} a H_O. Domnívám se, že hlavním důvodem tohoto neúspěchu je efekt zakladatele.

7. LITERATURA

1. ADDIS B. R., LOWE W. H., HOSSACK B. R. a ALLENDORF F. W., 2015: Population genetic structure and disease in montane boreal toads: more heterozygous individuals are more likely to be infected with amphibian chytrid. Conservation Genetics 16 (4). 833-844.
2. ALBERT E. M., FERNÁNDEZ-BEASKOETXEA S., GODOY J. A., TOBLER U., SCHMIDT B. R. a kol., 2015: Genetic management of an amphibian population after a chytridiomycosis outbreak. Conservation Genetics 16 (1). 103-111.
3. BENINDE J., FELDMEIER S., WERNER M., PEROVERDE D., SCHULTE U. a kol., 2016: Cityscape genetics: structural vs. functional connectivity of an urban lizard population. Molecular Ecology 25 (20). 4984-5000.
4. BERTORELLE G., 2009: Population genetics for animal conservation. Cambridge university press, Cambridge, 378 s.
5. BLANK L. a BLAUSTEIN L., 2012: Using ecological niche modeling to predict the distributions of two endangered amphibian species in aquatic breeding sites. Hydrobiologia 693 (1). 157-167.
6. DA SILVA J. M. a TOLLEY K. A., 2018: Conservation genetics of an endemic and threatened amphibian (Capensibufo rosei): a leap towards establishing a genetic monitoring framework. Conservation Genetics 19 (2). 349-363.
7. CHOUDHURI S., 2014: Bioinformatics for Beginners. Academic Press, London, 225 s.
8. DOWNIE J. R., LARCOMBE V. a STEAD J., 2019: Amphibian conservation in Scotland: A review of threats and opportunities. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems 29 (4). 647-654.
9. FLEGR J., 2005: Evoluční biologie. 1. vydání, Academia, Praha, 559 s.
10. FRANKEL O. H. a SOULÉ M. E., 1981: Conservation and Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, 366 s.
11. FANKHAM R., 2009: A Primer of Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge, 236 s.
12. FRANKHAM R., BRISCOE D. A. BALLOU J. D., 2002: Introduction to Conservation Genetics. 1. vydání, Cambridge University Press, Cambridge, 617 s.
13. FUSCO N. A., PEHEK E., MUNSHI-SOUTH J., 2021: Urbanization reduces gene flow but not genetic diversity of stream salamander populations in the New York City metropolitan area. Evolutionary Applications 14. 99–116.

14. HAMMOND T. T., CURTIS M. J., JACOBS L. E., GAFFNEY P. M., CLANCY M. M. a kol., 2021: Overwinter behavior, movement, and survival in a recently reintroduced, endangered amphibian, Rana muscosa. Journal for Nature Conservation 64. 1-9.
15. HARDING G., GRIFFITHS R. A. a PAVAJEAU L., 2016: Developments in amphibian captive breeding and reintroduction programs. Conservation Biology 30 (2). 340-349.
16. HAUGEN H., DERVO B. K., ØSTBYE K., HEGGENES J., DEVINEAU O. a kol., 2024: Genetic diversity, gene flow, and landscape resistance in a pond-breeding amphibian in agricultural and natural forested landscapes in Norway. Evolutionary Applications 17 (1). 1-19. wileyonlinelibrary.com/journal/ev
17. IUCN, 2023: The IUCN Red list of threatened species. Synthetic biology and nature conservation. https://www.iucnredlist.org/
18. IUCN/SSC IUCN Species Survival Commission, 2013: Guidelines for Reintroductions and Other Conservation Translocations. Version 1.0. Gland, Switzerland.
19. JERDE CH. L., MAHON A. R., CHADDERTON W. L. a LODGE D. M., 2011: "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. Conservation Letters 4 (2). 150-157.
20. JOLY P., 2019: Behavior in a Changing Landscape: Using Movement Ecology to Inform the Conservation of Pond-Breeding Amphibians. Frontiers in Ecology and Evolution 7. 1-17.
21. KRAAIJEVELD-SMIT F. J. L.; GRIFFITHS R. A.; MOORE R. D. a BEEBEE T. J. C., 2006: Captive breeding and the fitness of reintroduced species: a test of the responses to predators in a threatened amphibian. Journal of Applied Ecology 43 (2). 360-365.
22. KRUPA E., MORAVČÍKOVÁ N., KRUPOVÁ Z., ŽÁKOVÁ E., 2021: Assessment of genetic diversity of the local pig breed using the genealogical and SNP data. Genes 12. 1972.
23. LINHOFF L. J., SOORAE P. S., HARDING G., DONNELLY M. A., GERMANO J. M., HHUNTER D. A., MCFADDEN M., MENDELSON III J. R., PESSIER A. P., SREDL M. J. and ECKSTUT M. E. a kol., 2021: IUCN Guidelines for amphibian reintroductions and other conservation translocations, First edition. Gland, Switzerland: IUCN.
24. MALEKIAN M., PARISA S., GOUDARZI F., 2018: Assessment of environmental DNA for detection of an imperiled Amphibian, the luristan newt (Neurergus kaiseri, Schmidt 1952). Herpetological Conservation and Biology 13 (1). 175-182.

25. MANEL S., SCHWARTZ M. K., LUIKART G. a TABERLET P., 2003: Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. Trends in Ecology & Evolution 18 (4). 189-197.
26. MIKÁTOVÁ B. a VLAŠÍN M., 2012: Distribution and biology of Aesculapian Snake (Zamenis longissimus) in the territory of the Podyji and Thayatal National Parks and in their neighborhood. THAYENSIA (ZNOJMO) 9. 51–81.
27. MÜLLER A. S., LENHARDT P. P., THEISSINGER K., 2013: Pros and cons of external swabbing of amphibians for genetic analyses, European Journal of Wildlife Research 59. 609–612.
28. MŽP, 2023: Příroda a krajina. Mezinárodní úmluvy v ochraně přírody. Vyhláška Ministerstva životního prostředí České republiky č. 395/1992 Sb. Ministerstvo životního prostředí České republiky. https://www.mzp.cz/cz
29. NOËL S. a LAPOINTE F.-J., 2010: Urban conservation genetics: Study of a terrestrial salamander in the city. Biological Conservation 143. 2823–2831.
30. OKAMIYA H. a KUSANO T., 2019: Effects of landscape features on gene flow among urban frog populations. Ecological Research 34. 497–508.
31. PHILLIPS S., 2020: The importance of long-term genetic monitoring of reintroduced populations: inbreeding in the natterjack toad (Epidalea calamita). Herpetological Journal 30 (3). 159-167.
32. PIDANCIER N., MIQUEL CH., MIAUD C., 2003: Brucca swabs as a non-destructive tissue sampling method for DNA analysis in amphibians. Herpetological journal 13, 175-178
33. PREIßLER K., KÜPFER E., LÖFFLER F., HINCKLEY A., BLAUSTEIN L., & STEINFARTZ S., 2020: Genetic diversity and gene flow decline with elevation in the Near Eastern fire salamander (Salamandra infraimmaculata) at Mount Hermon. Golan Heights, Amphibia-Reptilia 42 (2). 241-247.
34. PREISSLER K., KÜPFER E., LÖFFLER F., HINCKLEY A., BLAUSTEIN L. a kol., 2020: Genetic diversity and gene flow decline with elevation in the Near Eastern fire salamander (Salamandra infraimmaculata) at Mount Hermon, Golan Heights. Amphibia-Reptilia 42 (2). 241-247.
35. PRIMACK R. B., KINDLMANN P., JERSÁKOVÁ J., 2011: Úvod do biologie ochrany přírody. Praha: Portál, 466 s.
36. PRÖHL H., AUFFARTH J., BERGMANN T., BUSCHMANN H. a BALKENHOL N., 2021: Conservation genetics of the yellow-bellied toad (Bombina variegata): population

structure, genetic diversity and landscape effects in an endangered amphibian. Conservation Genetics 22 (3). 513-529.

37. RINGLER Eva, 2018: Testing skin swabbing for DNA sampling in dendrobatid frogs. Online. Amphibia-Reptilia 39 (2). 245-251.
38. ROBERT A., COLAS B., GUIGON I., KERBIRIOU C., MIHOUB J-B. a kol., 2015: Defining reintroduction success using IUCN criteria for threatened species: a demographic assessment. Online. Animal Conservation 18 (5). 397-406.
39. ROTH S. a JEHLE R., 2016: High genetic diversity of common toad (Bufo bufo) populations under strong natural fragmentation on a Northern archipelago. Ecology and Evolution 6 (6). 1626-1636.
40. RUSO G. E., MORRISSEY CH. A., HOGAN N. S., SHEEDY C., GALLANT M. J. a kol., 2019: Detecting Amphibians in Agricultural Landscapes Using Environmental DNA Reveals the Importance of Wetland Condition. Environmental Toxicology and Chemistry 38 (12). 2750-2763.
41. SCHMIDT C. a GARROWAY C.J., 2021: The population genetics of urban and rural amphibians in North America. Molecular Ecology 30 (16). 3918-3929.
42. SOULÉ M., 2013: The ‘New Conservation’. Conservation Biology 27: 895–897.
43. STORFER A., MURPHY M., EVANS J. S. a kol., 2007: Putting the ‘landscape’ in landscape genetics. Heredity 98. 128–142.
44. STORFER A., MURPHY M. A., SPEAR S. F., HOLDEREGGER R. a WAITS L. P., 2010: Landscape genetics: where are we now?. Molecular Ecology 19 (17). 3496-3514.
45. SUNNY A., MONROY-VILCHIS O., FAJARDO V. a AGUILERA-REYES U., 2014: Genetic diversity and structure of an endemic and critically endangered stream river salamander (Caudata: Ambystoma leorae) in Mexico. Conservation Genetics 15 (1). 49-59.
46. ŠLÉGL J., LANÍKOVÁ J., KISLINGER F., 2002: Ekologie a ochrana životního prostředí: pro gymnázia. Praha: Fortuna, 157 s.
47. TABERLET P., WAITS L. P. a LUIKART G., 1999: Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Trends in Ecology & Evolution 14 (8). 323-327.
48. THOMPSON P. D., LUNDSKOG CH. L. a DITTMER D. E., 2022: A Successful Reintroduction of Columbia Spotted Frog (Rana luteiventris) through Repatriation of Recently Hatched Larvae. Online. Ichthyology & Herpetology. 110 (1). 131-137

49. UWYO – University of Wyoming, © 2013: Population Genetics Glossary (online) [cit.2024.03.03], dostupné z <https://www.uwyo.edu/dbmcd/popecol/maylects/popgengloss.html>
50. VLAŠÍN M. a MIKÁTOVÁ B., 2007: Metodika sledování výskytu plazů v České republice. Metodika Českého svazu ochránců přírody 35. ZO ČSOP Veronica, Brno. 39 s.
51. VOJAR J., 2007: Ochrana obojživelníků: ohrožení, biologické principy, metody studia, legislativní a praktická ochrana. Doplněk k metodice č. 1 Českého svazu ochránců přírody. ZO ČSOP Hasina, Louny, 155 s.
52. WEI X., HUANG M., YUE Q., MA S., LI B. a kol., 2021: Long-term urbanization impacts the eastern golden frog (Pelophylax plancyi) in Shanghai City: Demographic history, genetic structure, and implications for amphibian conservation in intensively urbanizing environments. Evolutionary Applications 14 (1). 117-135.
53. YANNIC G., HELFER V., SERMIER R., SCHMIDT B. R. a FUMAGALLI L., 2021: Fine scale genetic structure in fire salamanders (Salamandra salamandra) along a rural-to-urban gradient. Conservation Genetics 22 (2). 275-292.
54. ZEMANOVÁ B., HÁJKOVÁ P., BRYJA J., (2016): Genetika v ochraně. Všemocná není, ale posloužit umí. Fórum ochrany přírody 2 (2). 28-31.

8. SEZNAM PRÍLOH

Příloha č. 1: Základní termíny užívané v empirických studiích zaměřující se na ochranářskou genetiku obojživelníků