

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Jan Náhlovský

**Vliv bottlenecku a selekce na variabilitu MHC genů v reliktních a nově vzniklých populacích
bobra evropského**

Bottleneck and selection effects on MHC genes variability in relic and newly formed Eurasian beaver
populations

Diplomová práce

Školitel: doc. Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.

Praha, 2021

Velmi děkuji Pavlu Munclingerovi za příkladné vedení a příjemnou spolupráci. Aleši Vorlovi děkuji za cenné rady a celému bobřímu týmu z ČZU za poskytnutí vzorků a možnost účastnit se terénních výzkumů. Velký dík patří všem mým blízkým, kteří mě podporovali během psaní této práce.

Prohlášení:

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

V Praze, 9.8.2021

Podpis

Abstrakt

MHC glykoproteiny jsou zásadní součástí adaptivní imunity, navíc mohou hrát roli i při volbě partnerů. MHC geny jsou pak ze všech známých genů nejvariabilnější. Z těchto důvodů jsou již několik desítek let objektem intenzivního zájmu molekulárních ekologů. Výzkum ale kromě extrémní variability komplikují také časté duplikace. Zajímavým modelem se zdá být bobr evropský. Na konci předminulého století prošel dramatickým bottleneckem, kdy po celém světě přežilo pouze zhruba 1200 jedinců v několika izolovaných reliktních populacích. Díky četným reintrodukcím se dnes bobří s rozličným původem potkávají v nově ustavených admixovaných populacích. Znalosti o MHC bobrů však byly značně omezené, byly známy sekvence pouze z jednoho lokusu a některé reliktní populace nebyly vůbec prosekvenovány. Díky doplnění o vzorky ze zbývajících reliktních populací a přidání dalšího lokusu jsem potvrdil výraznou redukcii variability bobřích MHC genů a zároveň našel známky působení selekce v minulosti. Dále jsem vyšetřil situaci ve dvou nově ustavených populacích. Potvrdil jsem zde probíhající selekci, konkrétně porušení cytonukleární rovnováhy a výhodu divergentních alel (DAA). Máme zde tedy unikátní možnost nahlédnout do různých oken historie bobřích populací: V minulosti byla diverzita MHC formována kombinací pozitivní a balancující selekce. Během nedávného bottlenecku byla variabilita MHC výrazně snížena působením genetického driftu. V současných populacích hraje opět hlavní roli přírodní výběr.

Klíčová slova: bobr, MHC, selekce, bottleneck, populační struktura

Abstract

MHC glycoproteins are an essential part of adaptive immunity and may also play a role in mate choice. In addition, MHC genes are the most variable of all known genes. For these reasons, they have been intensively studied for several last decades. However, research is complicated due to extreme variability and frequent duplications. The Eurasian beaver seems to serve as an interesting model. It underwent a dramatic bottleneck culminating in the end of 19th century, when only about 1,200 individuals survived in several isolated relic populations. Thanks to numerous reintroductions, beavers of various origin meet in newly established populations. However, knowledge of beaver MHC was very limited. Only a single MHC gene has been investigated in a detail, and some relic populations were not sampled. Utilising additional relic populations and additional MHC locus, I verified a significant reduction of the variability of beaver MHC genes and also found signs of selection in the past. Then I sequenced MHC loci in two newly formed populations. I confirmed the ongoing selection by the disruption of cytonuclear equilibrium and the advantage of divergent alleles. We therefore can have a unique insight into the several periods of the history of beaver populations: In the past, MHC diversity was shaped by a combination of positive and balancing selection. During the recent bottleneck, MHC variability was significantly reduced by genetic drift. In current populations natural selection plays a leading role again.

Keywords: beaver, MHC, selection, bottleneck, population structure

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. MHC a jeho funkce	1
1.2. Mechanismy polymorfismu MHC	1
1.3. MHC během bottlenecku.....	4
1.4. Metody detekce probíhající selekce na MHC	5
1.5. Historie a genetika bobřích populací	7
1.6. Paraziti bobrů	8
1.7. Populace bobra v Česku	9
1.8. Cíle této práce.....	10
2. Materiál a metodika.....	11
2.1. Vzorky.....	11
2.2. Design primerů	12
2.3. Sekvence.....	12
2.4. Genotypování mikrosatelitů	13
2.5. Detekce selekce v minulosti	14
2.6. Detekce probíhající selekce	15
3. Výsledky	17
3.1. Sekvence reliktních populací	17
3.2. Admixované populace	20
3.3. Rekombinace.....	20
3.4. Selekce v minulosti	21
3.5. Fylogenetické analýzy	21
3.6. Selekce v současných populacích	25
4. Diskuze	28
4.1. Selekce v minulosti	28
4.2. Vliv bottlenecku na variabilitu bobřích MHC genů.....	31
4.3. MHC geny v admixovaných populacích.....	32
4.4. Možná budoucí témata výzkumu.....	36
5. Stručné shrnutí	37
6. Seznam použité literatury	38

1. Úvod

1.1. MHC a jeho funkce

Glykoproteiny hlavního histokompatibilního komplexu (MHC, „major histocompatibility complex“) jsou zásadní pro adaptivní imunitu čelistnatých obratlovců. Název MHC upomíná na skutečnost, že tento komplex glykoproteinů je velmi důležitý při transplantacích tkání mezi jedinci. Velmi známé paradigma, že i nepříbuzní gepardi by si mohli navzájem darovat orgány, vychází právě z nízké variability jejich MHC genů (O'Brien *et al.*, 1985; Yuhki & O'Brien, 1990; Castro-Prieto *et al.*, 2011).

MHC se dělí do třech tříd, nejčastěji jsou studované jsou MHC první a druhé třídy. Důležitou a nejvariabilnější součástí molekuly je tzv. vazebný žlábek, na nějž se vážou fragmenty peptidů, jež jsou prezentovány T-buněčným receptorům (TCR). Molekuly MHC I jsou přítomny na povrchu všech buněk obsahujících jádro a prezentují peptidy pocházející z vnitřku buňky cytotoxickým T-lymfocytům. Funkcí MHC II, jež se většinou nachází pouze na povrchu tzv. antigen prezentujících buněk, je prezentovat exogenní peptidy pomocným T-lymfocytům. Mechanismus prezentace antigenů detailně popisují Neefjes *et al.* (2011).

Vysoká diverzita MHC umožňuje svým nositelům rozpoznávat širší spektrum patogenů. MHC geny jsou dokonce nejvíce polymorfní ze všech známých genů, to je jedním z důvodů jejich intenzivního výzkumu. S nástupem molekulárních metod se MHC geny dostaly také do hledáčku molekulárních ekologů, kteří sledují jejich variabilitu a populačně-genetické procesy s nimi spojené v přírodních populacích volně žijících druhů. MHC geny jsou tak již několik desítek let jednou z nejvýznamnějších oblastí studia populační genetiky. Přesto jsou naše znalosti stále neúplné a některé otázky zůstávají nezodpovězeny. Není například jasné, jak častým jevem v evoluci MHC je kompromis mezi ochranou před patogeny a dalšími složkami fitness, jako je například míra rizika vzniku autoimunitních onemocnění. S tím úzce souvisí otázka, zda selekce maximalizuje, nebo spíše optimalizuje počet a míru divergence lokusů a alel v genofondu populace, potažmo v genomu jedince. Dalšími zajímavými tématy může být možnost udržení hodně odlišných linií alel v genofondu pomocí výhody divergentních alel (DAA) nebo význam geografické struktury populací a lokálních introgresí při formování polymorfismu MHC (Radwan *et al.*, 2020).

1.2. Mechanismy polymorfismu MHC

Zajímavou vlastností MHC genů je, že jsou formovány zároveň vlivem pozitivní a balancující selekce, přestože tyto dva procesy působí mnohdy protichůdně. Pozitivní selekce se u MHC projevuje hlavně vysokým poměrem nesynonymních mutací. Tato selekce preferuje nově vzniklé alely a obecně přijímanou hypotézou je, že se jedná o produkt „závodů ve zbrojení“ mezi patogenem a hostitelem. Experiment s živorodkami (*Poecilia reticulata*) toto potvrdil, když zjistil výhodu nových alel v obraně proti parazitickému žábrohlistovi (*Gyrodactylus turnbulli*) (Phillips *et al.*, 2018). Vysoké poměry

nesynonymních mutací jsou velmi neobvyklé, kromě MHC jsou dalším známým příkladem geny hrající roli v oplození (Swanson & Vacquier, 2002).

Kromě pozitivní selekce na nesynonymních místech v genech existuje také pozitivní selekce působící na synonymní mutace. Při takovýchto mutacích se nemění sekvence aminokyselin v proteinech, selekce tak musí působit přímo na úrovni sekvence mRNA. Cílem takovéto selekce může být regulace splicingu nebo optimalizace stability molekuly mRNA, případně míry translace (Resch *et al.*, 2007; Faure *et al.*, 2017; Savisaar & Hurst, 2018).

Pozitivní selekce ve své základní podobě by měla vést k rychlé divergenci mezi druhy a krátkým časům koalescence alel. U MHC genů však typicky vidíme situaci naprosto opačnou. Alely MHC přetrvávají v genofondu delší dobu, než by odpovídalo neutrálnímu modelu. Časy koalescencí jsou tedy značně hluboké a fylogenetické stromy MHC genů pak často nesouhlasí s fylogenetickým stromem druhů. Tento jev je nazýván mezidruhovým polymorfismem (TSP, „trans-species polymorfism“) a stává se, že některé alely jsou sdíleny hned několika příbuznými druhy. Procesy, jež vedou k dlouhé perzistenci alel, se souhrnně nazývají balancující selekce.

Kromě TSP v důsledku balancující selekce je druhým mechanismem sdílení alel sesterskými druhy, jež se také u MHC nezdá uplatňovat, adaptivní introgrese jako následek mezidruhového křížení. Často udávaným příkladem adaptivní introgrese je MHC I alela HLA-B*73 v populaci moderních lidí, o níž se předpokládalo, že pochází z křížení s denisovany (Abi-Rached *et al.*, 2011). Novější výzkumy ale tuto hypotézu vyvrací (Yasukochi & Ohashi, 2017). Mimo člověka pak byla vysoká míra introgrese MHC zjištěna například mezi dvěma druhy čolků (*Lissotriton* spp.) v oblasti Karpat (Nadachowska-Brzyska *et al.*, 2012; Fijarczyk *et al.*, 2018; Dudek *et al.*, 2019) nebo u ještěrek (*Lacerta* spp.) v Řecku (Sagonas *et al.*, 2019). Obecně je obtížné rozlišit mezi adaptivní introgesí a dalšími jevy, jako je konvergence nebo ancestrální polymorfismus (Hedrick, 2013). Alely, jež se do genofondu dostaly introgesí, jsou samozřejmě v populaci nové, proto adaptivní introgrese úzce souvisí i se selekcí upřednostňující nové alely.

Hlavní role v balancující selekci na MHC se přisuzuje patogenům. Uvažované mechanismy takovéto selekce jsou selekce ve prospěch heterozygotů (HA, „heterozygote advantage“, „overdominance“), negativně frekvenčně závislá selekce (NFDS, „negative frequency-dependent selection“, „rare allele advantage“) a selekce proměnlivá v času a/nebo prostoru (FS, „fluctuating selection“). Téma bylo několikrát zpracováno do přehledových článků, velmi recentně je detailně rozebírají Radwan *et al.* (2020), dříve se mechanismům selekce na MHC detailně věnovali například Spurgin & Richardson (2010) nebo Piertney & Oliver (2006).

HA počítá s tím, že imunitní systém heterozygotů je schopen rozpoznat širší spektrum patogenů díky kodominanci MHC alel. Jednou z překážek této teorie je fakt, že počet MHC alel v jedinci může být selekcí spíše optimalizován než maximalizován. Jedinec nesoucí příliš mnoho alel MHC může být vystaven většímu riziku vzniku autoimunitních onemocnění nebo snížení počtu T-lymfocytů (Woelfing *et al.*, 2009). Je otázkou, zda HA může v genofondu udržet tak velké množství alel, jaké je často

nalézáno u MHC genů. Výsledky simulací jsou protichůdné (Borghans *et al.*, 2004; Siljestam & Rueffler, 2018). Možností, jak by HA mohla udržet MHC polymorfismus, by mohla být tzv. „divergent allele advantage“ (DAA) (Stefan *et al.*, 2019). DAA je rozšíření myšlenky HA, jež předpokládá tím vyšší fitness heterozygotů, čím odlišnější jsou jejich alely (Wakeland *et al.*, 1990).

Koncept NFDS vyzdvihuje roli koevoluce mezi patogenem a hostitelem. Parazité by se měli nejlépe přizpůsobit nejčastějším MHC alelám, čímž se tyto alely stávají nevýhodnými a roste frekvence původně vzácných alel. Simulace ukázaly, že balancující selekce probíhající skrze NFDS je ve shodě s pozitivní selekcí preferující nové alely (Ejsmond & Radwan, 2015). Probíhající frekvenčně závislou selekci je však těžší najít než HA. Navíc není jednoduché tyto dva procesy odlišit. Vzácné alely s vysokou fitness svých nositelů by mohly být pod vlivem NFDS, zároveň ale jsou vzácné alely přítomny převážně v heterozygotech, takže vyšší fitness může být způsobena HA. V rozporu s mechanismem NFDS jsou výsledky studie zkoumající vztah lepry a MHC alel v současných a středověkých lidských populacích, která nenašla známky přizpůsobení původce lepry častým alelám (Krause-Kyora *et al.*, 2018).

FS je oproti oběma předchozím mechanismům balancující selekce novější a méně studovaný koncept. Předpokládá, že v jednotlivých subpopulacích jednoho druhu se uplatňují rozdílné selekční tlaky v důsledku různého složení bioty patogenů. Nositelé stejného genotypu potom budou mít rozdílnou fitness podle toho, v které části populace se nacházejí. Jednotlivé subpopulace se pak budou lokálně adaptovat na jedinečné složení parazitů. Zastoupení patogenů v subpopulaci také může kolísat v čase. Pěkným příkladem mohou být lokální adaptace ryb, které shrnují Eizaguirre & Lenz (2010). Dalším příkladem je vrabec domácí (*Passer domesticus*), jehož MHC alely mohou svým nositelům poskytovat různou ochranu proti malárii v závislosti na tom, ve které populaci se nacházejí, účinky mohou být i naprosto antagonistické (Loiseau *et al.*, 2011)

Kromě selekce ze strany patogenů je u MHC známa také jejich role v pohlavním výběru. Toto téma je také již dlouhou dobu intenzivně studované, avšak i zde zůstávají naše znalosti neúplné. Z velké části jsou například nejasné mechanismy vnímání MHC alel. Je otázkou, jak často uplatňovaným jevem je preference pro partnery s co nejodlišnějším repertoárem MHC alel, jež by vedla ke vzniku vysoce heterozygotního potomstva, a je tedy široce studovaným konceptem. Jedinci si mohou svého partnera vybírat buď tak, aby nesl co nejvíce MHC alel, nebo tak, aby jejich alely byly navzájem co nejvíce odlišné. I zde ale, podobně jako u HA, může být cílem výběru optimalizace, nikoli maximalizace odlišnosti (Milinski, 2006). Výběr se nemusí nutně týkat pouze odlišného pohlaví. Studie mývalů (*Procyon lotor*) v Německu tak třeba ukázala, že samice si vybírají samce s odlišnými MHC alelami, ale navíc starší samci zakládají koalice nepříbuzných jedinců, v nichž naopak preferují samce s podobnými MHC alelami (Santos *et al.*, 2017).

Rozsáhlá metaanalýza napříč obratlovci zjistila, že samice si obecně vybírají samce s velkým počtem MHC alel. Naproti tomu preference pro partnery s co nejodlišnějšími MHC alelami vyšla signifikantní pouze u studií zkoumajících více lokusů, a situace je zde tedy složitější (Kamiya *et al.*,

2014). Preference samic pro partnery s co nejodlišnějším MHC byla prokázána například u hořavky (*Rhodeus ocellatus*) (Agbali *et al.*, 2010). U člověka byla nalezena preference pro partnery s velkým počtem MHC alel, naopak preference pro odlišnost na MHC nebyla nalezena (Winternitz *et al.*, 2017). Preference jak pro diverzitu, tak pro odlišnost MHC alel by měla napomáhat balancující selekci. Avšak u strnadců (*Melospiza melodia*) byla popsána preference pro partnery naopak s podobnými MHC alelami, a přesto jejich sekvence MHC vykazují jasné známky balancující selekce (Slade *et al.*, 2019).

Mechanismy vnímání genotypu MHC zůstávají nejasné. Hlavním zúčastněným smyslem je s největší pravděpodobností čich. Vnímáním látkou pak může být buď přímo molekula MHC, peptid navázaný na MHC nebo produkty mikrobiomu, jehož složení se liší podle MHC (Penn & Potts, 1998). Receptory ve vomeronasálním orgánu dokážou zachytit přímo peptidy MHC I (Leinders-Zufall *et al.*, 2004). Studie na netopýrech (*Saccopteryx bilineata*) a mývalech ukázaly, že při volbě partnera podle MHC hrají významnou roli chemosenzorické receptory TAAR („trace amine-associated receptor“) a čichové receptory (Santos *et al.*, 2016, 2018).

1.3. MHC během bottlenecku

Dlouho nebylo jasné, co se děje s diverzitou MHC při ochuzení genofondu vlivem výrazného snížení populace (efekt hrdla lahve, bottleneck). Teoreticky jsou možné tři varianty: (1) diverzita MHC bude bottleneckem zasažena méně než diverzita neutrálních lokusů díky selekci udržující polymorfismus; (2) MHC bude bottleneckem ovlivněno ve stejné míře jako neutrální markery, protože v malé populaci převládne drift a selekce nebude hrát roli; (3) selekce během bottlenecku sníží variabilitu na MHC ještě více než na neutrálních lokusech. Dříve převládal názor, že nejpravděpodobnější jsou první dvě možnosti. Avšak simulace naznačily, že správná je spíše kontraintuitivní třetí varianta (Ejsmond & Radwan, 2011). Tuto skutečnost krátce nato potvrdila také metaanalýza Suttonové (2011). Od té doby klesl počet nově publikovaných studií, jež by podporovaly původně uvažovanou možnost, tedy zachování vyšší míry polymorfismu u MHC markerů v populacích zasažených bottleneckem, ovšem i takové se najdou. Například u ostrovní populace hryzců (*Arvicola terrestris*) vykazoval MHC marker po několik sledovaných generací nadbytek heterozygotů, takže nejspíš i během snížení velikosti populace HA udržovala polymorfismus MHC (Oliver & Piertney, 2012). U hraboše (*Microtus arvalis*) v čase silně kolísají velikosti populací, přesto MHC zůstává značně polymorfní (Schuster *et al.*, 2016). U fundula (*Fundulus julisia*), ohrožené severoamerické ryby, také zůstala diverzita MHC větší než na mikrosatelitových markerech (Hurt *et al.*, 2019). Taktéž rys iberský (*Lynx pardinus*), jehož genetická variabilita je vlivem bottlenecku velmi výrazně ochuzena, si zachoval většinu své funkční variability na lokusech MHC (Marmesat *et al.*, 2017).

Je otázkou, zda redukce variability na MHC významně snižuje životaschopnost populace. Lze najít dost případů, kdy populace úspěšně přežívá následky bottlenecku. Na druhou stranu, pokud by populace v důsledku redukce variability MHC vymřela, jen těžko by to mohla nějaká studie zachytit (Radwan *et al.*, 2010). S redukováním polymorfismem MHC lokusů úspěšně přežívají například

populace geparda (*Acinonyx jubatus*) (Castro-Prieto *et al.*, 2011), sviště horského (*Marmota marmota*) (Kuduk *et al.*, 2012) či sysla perličkového (*Spermophilus suslicus*) (Biedrzycka & Radwan, 2008) i obecného (*S. citellus*) (Řičanová *et al.*, 2011). Při bottlenecku může být pro druhy výhodné mít zmnožené lokusy MHC genů. Například kriticky ohrožený skřivan kapverdský (*Alauda razae*) má značně redukovanou genetickou variabilitu, ale zachovává si v genofondu větší množství MHC alel díky několikanásobně zmnoženým lokusům (Stervander *et al.*, 2020). Redukce genetické diverzity včetně MHC je doložena také u invazních druhů, kde očividně nebrání expanzi populace. Opět se ale může jednat o vzácné případy, neúspěšnou invazi je mnohem těžší zachytit než úspěšnou. V evropských populacích ondatry pižmové nebyl na mitochondriálním markeru nalezen žádný polymorfismus a situace u MHC bude nejspíše velmi podobná (Zachos *et al.*, 2007). V invazní populaci mývala severního v Evropě je oproti původním populacím snížen počet MHC alel, ale počet MHC supertypů byl vyšší, než předpokládal neutrální model (Biedrzycka *et al.*, 2020a). O MHC mývalů v Evropě byly recentně publikovány také další studie (Santos *et al.*, 2017, 2018; Biedrzycka *et al.*, 2020b).

1.4. Metody detekce probíhající selekce na MHC

Zatímco pozitivní selekce v minulosti se dá snadno prokázat poměrem nesynonymních mutací a na balancující selekci v minulosti ukážou hluboké časy koalescence, rozpoznat z molekulárních dat probíhající selekci může být obtížnější. Metody selekce na MHC v současnosti shrnují Spurgin & Richardson (2010) nebo Bernatchez & Landry (2003).

HA a NFDS se projeví nadbytkem heterozygotů oproti neutrálnímu modelu. Odchytky v heterozygotnosti byly tradičně testovány Ewensovým-Wattersonovým testem (Watterson, 1977) nebo z něj odvozeným Slatkinovým P (Slatkin, 1994). Tímto postupem byly zkoumány například populace lososa obecného (Landry & Bernatchez, 2002), nicméně zdá se, že poslední dobou jsou tyto metody spíše na ústupu.

HA by se měla projevit v menší strukturovanosti napříč populacemi u selektovaných markerů, u NFDS je efekt nejasný (Schierup *et al.*, 2000), FS by měla zvyšovat strukturovanost populace (Charlesworth *et al.*, 1997). Tyto efekty se dají testovat porovnáním variability MHC a neutrálních markerů pomocí párových F_{ST} (analýza F_{ST} outliers) nebo „isolation by distance“ (IBD). V případě, že při různém škálování populací převládnou různé procesy, lze použít hierarchickou analýzu molekulární variance (AMOVA). Struktura populací byla hezky vyšetřena například u rosomáků (*Gulo gulo*) (Rico *et al.*, 2015), čolků (*Triturus carnifex*) (Talarico *et al.*, 2019) nebo syslů perličkových (Biedrzycka & Radwan, 2008).

Křížení geneticky vzdálených populací nebo dokonce druhů v přírodě může být také vhodnou příležitostí k výzkumu selekce na MHC. Kromě výše zmíněné adaptivní introgrese lze použít tzv. „admixture analýzu“. Díky té můžeme identifikovat míru prokříženosti a původ jednotlivých částí genomu. Můžeme pak srovnávat frekvence alel MHC a neutrálních lokusů z různých zdrojových populací (Tang *et al.*, 2006, 2007).

Selekci ze strany patogenů lze samozřejmě ověřit pomocí studia vztahu parazitů a genotypu jejich hostitelů. Asociace jednotlivých alel s konkrétními patogeny značí působení NFDS nebo FS (Spurgin & Richardson, 2010), pomocí vztahu s určitými genotypy lze také zaznamenat HA či DAA. Časté je vyšetření parazitů v trávicí soustavě nebo v krvi. V poslední době rychle roste počet publikovaných studií zabývajících se právě vztahy MHC genů a parazitů. Velká diverzita MHC alel chrání rákosníky proužkované (*Acrocephalus schoenobaenus*) před ptačí malárií (Biedrzycka *et al.*, 2018), podobný vztah byl nalezen u hlístic a norníka rudého (*Clethrionomys glareolus*) (Kloch *et al.*, 2010) nebo virů a skokana černoskvrnného (*Pelophylax nigromaculatus*) (Wang *et al.*, 2017). U hlodavců pozitivně koreluje variabilita alel MHC s diverzitou helmintů nalézáných v jednotlivých druzích (Goüy De Bellocq *et al.*, 2008). Různá vnímavost konkrétních MHC alel vůči motolicím a tasemnicím byla prokázána u mývalů v Evropě (Biedrzycka *et al.*, 2020b). Vztah genotypu MHC a imunity nemusí být ale vůbec jednoduchý. Například u vrabce domácího byla nalezena alela MHC I, jejíž nositelé jsou nadprůměrně chráněni před jednou linií malárie, zároveň je však tato alela asociována s vyšší prevalencí jiné malárie (Loiseau *et al.*, 2008).

Kromě přímé asociace s parazity lze selekční výhodu různých genotypů zkoumat také dalšími způsoby, například korelací MHC genotypů s fyzickou kondicí, imunokompetencí, přežíváním či reprodukčním úspěchem. Výsledky jsou však poněkud rozporuplné, jak lze demonstrovat na následujících příkladech. U jelenců běloocasých (*Odocoileus virginianus*) jsou největší samci se středně divergentními alelami, kdežto velikost paroží roste lineárně s divergencí alel (Ivy-Israel *et al.*, 2021). Hmotnost kozorožců horských (*Capra ibex*) roste s jejich heterozygotností na MHC (Brambilla *et al.*, 2018). Genetická variabilita na MHC zřejmě nemá velký efekt na imunokompetenci či fyzickou kondici u sovy pálené (*Tyto alba*) (Gaigher *et al.*, 2019). Nebyl nalezen vztah mezi diverzitou MHC a schopností imunitní odpovědi leukocytů (LCC) u jezevců (*Meles meles*) (Sin *et al.*, 2016). Jednotlivé alely tetřívka prériového (*Tympanuchus cupido attwateri*) se liší v délce přežívání svých nositelů (Bateson *et al.*, 2016). Je zvláštní, že sobi (*Rangifer tarandus*) s více divergentními MHC alelami se v průměru dožívají nižšího věku (Gagnon *et al.*, 2020). Samci makaků (*Macaca mulatta*) heterozygotní na MHC mají více mláďat než homozygoti (Sauermaun *et al.*, 2001).

Při výzkumu vlivu MHC na výběr partnera se testují statistiky, jako je počet alel, jimiž se vybíraný partner liší od vybírajícího, nebo počet alel vybíraného partnera (Santos *et al.*, 2016). Kromě genotypování rodičovských párů v přírodě lze provést také experimenty s preferencí potenciálního partnera podle čichu či vzhledu (Yamazaki & Beauchamp, 2007; Winternitz *et al.*, 2017).

Detekci selekční výhody různých genotypů komplikují kromě malých velikostí efektů zejména velký počet alel či mezidruhové polymorfismy. Velkým problémem mohou být často i mnohonásobné duplikace lokusů, kdy bývá problém vůbec určit počet amplifikovaných lokusů, natož pak k nim přiřadit jednotlivé alely. Tyto problémy uspokojivě nevyřešilo ani zavedení metod sekvenování nové generace (Babik, 2010; Lighten *et al.*, 2014; Rekdal *et al.*, 2018).

Jako potenciálně velmi zajímavý model při studiu MHC se mi z následujících důvodů jeví bobr evropský (*Castor fiber*):

- 1) Lokusy MHC zřejmě nejsou duplikované, dosavadní znalosti předpovídají nízký počet alel.
- 2) Druh přežil v několika geneticky vzdálených populacích, kde se fixovaly alternativní MHC alely. V nově založených populacích se pak potkávají jedinci s různým původem což do určité míry připomíná křížení inbredních kmenů při laboratorních experimentech.
- 3) Jsou dobře odladěny postupy pro genotypování neutrálních markerů. K dispozici jsou vzorky DNA ze zdrojových i nově založených populací.

1.5. Historie a genetika bobřích populací

Rod bobr obsahuje dva žijící druhy, bobr evropský žije v Eurasii, bobr kanadský (*C. canadensis*) je původní v Severní Americe, druhotně byl vysazen a žije v Patagonii (Lizarralde *et al.*, 2004), na Dálném východě (Oleinikov, 2013) a ve Finsku a přilehlých částech Ruska (Halley *et al.*, 2020). Přestože se tyto druhy oddělily již před více než sedmi miliony let (Horn *et al.*, 2011), jsou si oba velmi podobné. Navzájem se nekříží, liší se totiž v počtu chromozomů (Ward *et al.*, 1991).

Tab.1 Seznam reliktních populací a názvy z nich popsaných poddruhů bobra evropského.

reliktní populace	popsaný poddruh
Rhône (Francie)	<i>C. f. galliae</i>
Labe (Německo)	<i>C. f. albicus</i>
Telemark (Norsko)	<i>C. f. fiber</i>
Bělorusko (různá povodí)	<i>C. f. belorussicus</i>
Voroněž (Rusko)	<i>C. f. orientoeuropaeus</i>
Konda, Sosva (Rusko)	<i>C. f. pohlei</i>
Azas (Rusko)	<i>C. f. tuvunicus</i>
Bulgan gol (Mongolsko)	<i>C. f. birulai</i>

Bobr evropský dříve obýval většinu Eurasie. Poslední dobu ledovou přežil minimálně ve třech izolovaných refugiích, z nichž dvě se odrazily ve dvou klastrech mitochondriálních haplotypů v současných populacích (tzv. západní a východní linie). Třetí refugium v deltě Dunaje nemá zastoupení mitochondriální DNA u žijících bobrů (Durka *et al.*, 2005; Horn *et al.*, 2014; Marr *et al.*, 2018). Během novověku stavy bobrů poklesly natolik, že na konci devatenáctého století přežilo po celém světě pouze zhruba 1200 jedinců v osmi izolovaných populacích (tzv. reliktní populace). Všechny tyto populace byly popsány jako samostatné poddruhy (viz Tab.1). Toto rozdělení zřejmě není úplně správné, neboť rozdíly mezi jednotlivými populacemi nevznikaly lokální adaptací, nýbrž spíše driftem, nicméně používání těchto poddruhů jako názvů reliktních populací je v literatuře hluboce zakořeněno (Senn *et al.*, 2014). Díky právní ochraně a taky častým reintrodukcím začaly stavy bobrů stoupat a současná velikost populace činí minimálně jeden a půl milionu jedinců. Bobr tedy během sta let ztisícinásobil velikost své populace a obývá již značnou část svého původního areálu (Nolet & Rosell, 1998; Halley & Rosell, 2002, 2003; Halley *et al.*, 2012, 2020).

Tato dramatická fluktuace populace však měla důsledek ve výrazném snížení genetické variability, které bylo zaznamenáno na mitochondriálních, neutrálních jaderných i MHC markerech. V jednotlivých reliktních populacích se vyskytuje pouze velmi malé množství mitochondriálních

haplotypů, jež navíc nejsou sdíleny napříč těmito populacemi (Durka *et al.*, 2005; Senn *et al.*, 2014). Také na jaderných markerech (mikrosatelity a SNPs) jsou navzájem dobře odlišeny (Albrechtová, 2011; Senn *et al.*, 2014; Munclinger *et al.*, in prep.). Díky reintrodukcím se v nově vzniklých populacích mísí genomy reliktních populací a genetická variabilita je zde vyšší (Horn *et al.*, 2010; Albrechtová, 2011; Kropf *et al.*, 2013; Biedrzycka *et al.*, 2014; Frosch *et al.*, 2014; Senn *et al.*, 2014; Minnig *et al.*, 2016; Ernst *et al.*, 2017; Mai *et al.*, 2018; Iso-Touru *et al.*, 2020; Munclinger *et al.*, in prep.). Výsledky genetických studií v bobřích populacích podrobně shrnuji ve své bakalářské práci (Náhlovský, 2019).

I přes výraznou redukci genetické variability dokázali bobři provést naprosto fenomenální návrat. Proto může být velmi zajímavé vyšetřit situaci na jejich MHC genech, jež mohou být lepším prediktorem životaschopnosti populací než celková genetická variabilita, přestože výsledky studií nejsou úplně jednoznačné (Radwan *et al.*, 2010; Bateson *et al.*, 2016; Manlik *et al.*, 2019). Výsledky výzkumu MHC u bobrů jsou v dobré shodě s ostatními používanými markery v tom smyslu, že variabilita uvnitř reliktních populací je velmi nízká. Znalosti jsou ale velmi omezené, například kvůli omezené dostupnosti vzorků z některých reliktních populací.

Ellegren *et al.* (1993) provedli analýzu délky restrikčních fragmentů u MHC I a MHC II (lokusy DQA, DQB, DRB a DPB) u vzorků z populací ze Švédska, Norska a Ruska z okolí Kirova. Ruská a skandinávské populace se navzájem pouze nevýrazně lišily, uvnitř populací pak nebyla nalezena žádná variabilita.

Ve studii Babika *et al.* (2005) byl sekvenován fragment druhého exonu MHC II genu DRB ve vzorcích reprezentujících jednotlivé reliktní populace. Ukázalo se, že bobři mají v genomu jen jeden lokus studovaného genu, ale primery navíc někdy amplifikovaly také dva pseudogeny. Bylo nalezeno celkem deset alel. Pouze populace ze západní Sibíře (*C. f. pohlei*) vykazovala polymorfismus (čtyři alely), ostatní populace měly po jedné alele. Ty nebyly navzájem sdíleny napříč populacemi a vykazovaly známky působení pozitivní i balancující selekce v minulosti. Nebyly však vyšetřeny vzorky z východoevropských populací (*C. f. belorussicus* a *C. f. orientoeuropaeus*), namísto nich byly použity vzorky původem z polské populace, o níž se předpokládalo, že je založena z těchto dvou poddruhů. Přesto i tam byla nalezena pouze jedna alela.

1.6. Paraziti bobrů

Nízká diverzita MHC by tedy mohla snížit šanci bobrů ubránit se různým patogenům. Přítomnost parazitů byla zkoumána v různých populacích napříč Evropou, intenzivní výzkum byl proveden v rámci návratu bobrů do Velké Británie včetně detailní analýzy rizik (Girling *et al.*, 2019). Z ektoparazitů byl ve Velké Británii nalezen pouze bleháč bobří (*Platyssyllus castoris*), brouk žijící v bobří srsti, který nejspíš nemá velký vliv na zdraví svého hostitele (Duff *et al.*, 2013; Goodman *et al.*, 2017; Campbell-Palmer *et al.*, 2021). Dalšími druhově specifickými parazity jsou motolice *Stichorchis subtriquetrus*, hojně nalézaná v různých bobřích populacích napříč Evropou (Girling *et al.*, 2019), a hlístice *Travassosius rufus*, jež je také popsána z několika populací (Goodman *et al.*, 2012; Demiaszkiewicz *et*

al., 2014; Åhlen *et al.*, 2021; Bystrianska *et al.*, 2021). Třetí druhově specifický parazit, motolice *Psilotrema castoris* byl recentně nalezen v polské bobří populaci (Demiaszkiewicz *et al.*, 2014). Z Polska je také popsán trdník *Demodex castoris*, žijící v bobří kůži (Izdebska *et al.*, 2016). Nedávno také bylo popsáno velké množství druhů zákožkvců rodu *Schizocarpus* asociovaných s bobry (Bochkov & Dubinina, 2011; Bochkov, 2012; Bochkov & Saveljev, 2012; Bochkov *et al.*, 2012).

Bobří mohou být také rezervoárem nebezpečných zoonóz. Byl u nich potvrzen například výskyt měchožila bublinatého (*Echinococcus multilocularis*) (Janovsky *et al.*, 2002; Campbell-Palmer *et al.*, 2015; Posautz *et al.*, 2015) nebo měchožila zhoubného (*E. granulosus*) (Drózd *et al.*, 2004; Demiaszkiewicz *et al.*, 2014). Lamblie (*Giardia*) byly nalezeny u bobrů evropských v ZOO Čeng-Čou (Li *et al.*, 2015) a také ve volně žijících populacích (Sroka *et al.*, 2015; Bystrianska *et al.*, 2021). Hlavně u bobra kanadského můžou být prevalence lamblíi značně vysoké (Heitman *et al.*, 2002), a giardióza dokonce nese v angličtině název „beaver fever“. Z patogenních bakterií byla u bobrů evropských nalezena například *Escherichia coli*, *Francisella tularensis*, *Leptospira*, *Mycobacterium avium*, *Salmonella* nebo *Yersinia enterocolitica* (detailně shrnuje Girling *et al.*, 2019).

Bobří ve Velké Británii se zdají být vesměs v dobré kondici a bylo u nich nalezeno jen málo patogenů (Campbell-Palmer *et al.*, 2021). Naproti tomu Demiaszkiewicz *et al.* (2014), Åhlen *et al.* (2021) a Bystrianska *et al.* (2021) našli poměrně vysoké prevalence helmintů a Stefenová (2019) označila nemoci za jednu z nejčastějších příčin úmrtí bobrů v Německu. O situaci v českých populacích nebylo publikováno mnoho informací. Koubková *et al.* (2002) našli 34 jedinců *Stichorchis subtriquetrus* ve střevech jednoho bobra z jižní Moravy. Studie Mácy *et al.* (2015) vyšetřila přítomnost parazitů u jedenácti bobrů z jižní Moravy, ze Šumavy a z Labe. Byla zjištěna vysoká prevalence *S. subtriquetrus*, jiní parazité nebyli nalezeni. Sedlák *et al.* (2018) zkoumali přítomnost protilátek na 11 různých patogenů celkem u 72 bobrů. Byly nalezeny poměrně vysoké prevalence protilátek proti prvokům *Toxoplasma gondii* a *Neospora caninum*. Vzácně se vyskytovaly protilátky také proti patogenním bakteriím *Leptospira* spp. a *Francisella tularensis*.

1.7. Populace bobra v Česku

V moderní době se bobří v Česku poprvé objevili v sedmdesátých letech minulého století, první stabilní populace se u nás začaly formovat v devadesátých letech. České bobří populace mají pět zdrojů: Do západních Čech expandovali potomci nově ustavené populace, jež vznikla díky reintrodukčním programům v Bavorsku. Bobří z této populace se již dostali až do Prahy (Korbelová *et al.*, 2016). Po Labi se z Německa šíří původní reliktní populace *C. f. albicus*. Kontaktní zóna mezi těmito dvěma populacemi se ustanovila nedaleko Prahy (Vorel, 2020). Na soutoku Moravy a Dyje se již na počátku devadesátých let souvisle vyskytovali bobří původem z rakouské reintrodukované populace. Po řece Odře k nám migrovali jedinci z polských, taktéž reintrodukovaných populací. Na střední Moravě byli v devadesátých letech vypuštěni bobří původem z Polska a Litvy. V současnosti na Moravě existuje jedna souvislá populace (Šafář, 2002; Vorel *et al.*, 2012).

1.8. Cíle této práce

V mojí diplomové práci jsem se zaměřil na doplnění znalostí variability MHC v reliktních populacích bobra evropského a dále jsem vyšetřil situaci na MHC genech ve dvou českých nově ustavených populacích.

Cílem mé práce bylo:

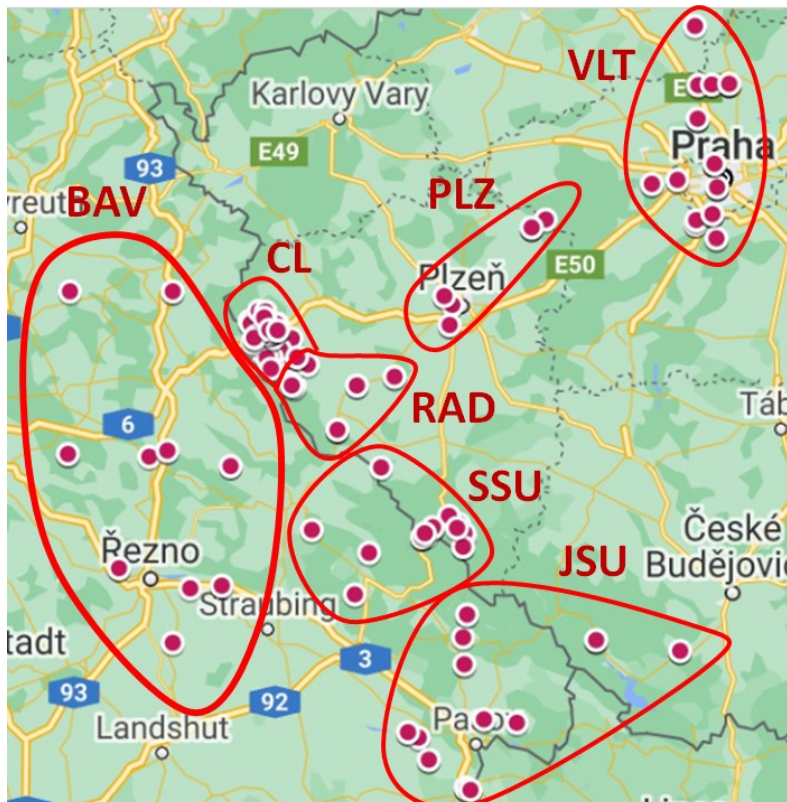
- 1) Ověřit, zda byla diverzita bobřích MHC genů v minulosti formována pozitivní a balancující selekcí. Za tímto účelem jsem provedl několik klasických testů selekce a zkonstruoval jsem haplotypové sítě a fylogenetické stromy studovaných lokusů.
- 2) Potvrdit (nebo vyvrátit) nízký počet MHC alel v genofondu bobra evropského vlivem nedávného dramatického bottlenecku. Osekvenoval jsem lokus DRB u vzorků z dříve nestudovaných reliktních populací a přidal jsem další MHC lokus (DQA).
- 3) Vyšetřit situaci na MHC lokusech v nově založených populacích a pokusit se zde detekovat selekci probíhající v současnosti. Zkoumal jsem frekvence jednotlivých genotypů MHC a porovnával situaci na MHC a neutrálních mitochondriálních i jaderných markerech.

2. Materiál a metodika

2.1. Vzorky

DNA bobrů z reliktních populací jsem měl k dispozici v laboratoři školitele díky mezinárodním spolupracím s dr. Walterem Durkou a dr. Alexandrem P. Saveljevem. Dále jsem měl k dispozici pět vzorků DNA bobra kanadského: dva vzorky pocházející ze ZOO Brno, další dva od dr. Durky a jeden od dr. Saveljeva z bobří farmy ve Voroněži.

Vzorky DNA českých bobrů pocházejí z odchytů prováděných pravidelně již řadu let týmem dr. Aleše Vorla z České zemědělské univerzity. Bobři z českých admixovaných populací byli odchyceni v letech 2004 až 2019. MHC lokusy jsem sekvenoval pouze u dospělých a subadultních jedinců, mikrosatelity jsem genotypoval i u mláďat, abych lépe popsal strukturu populací. Vzorky se dají dobře odlišit do tří populací: západní Čechy (plus Bavorsko), jižní Morava a menší populace na dolní Vltavě, která vznikla recentním kontaktem západočeské a reliktní labské populace. Jihomoravská populace je velmi kompaktní, naopak vzorky ze západočeské populace pocházejí ze širší geografické oblasti, proto jsem ji pro potřeby některých analýz rozdělil na šest menších subpopulací: BAV – povodí Naabu a okolí jeho soutoku s Dunají; CL – povodí Kateřinského potoka v Českém lese, jenž se jako Pfreimd vlévá do



Obr.1 Rozmístění vzorků v rámci západočeské a vltavské populace. Názvy subpopulací viz text. Vytvořeno přes Google Maps.

Naabu; RAD – povodí Radbuzy; PLZ – povodí Berounky od Plzně po CHKO Křivoklátsko; SSU – Úhlava, Křemelná a Regen; JSU – povodí Dunaje kolem Pasova včetně řeky Ilz a dva vzorky z horní Vltavy. Vzorky ze západočeské populace nejsou bohužel rozloženy rovnoměrně, většina vzorků spadá do subpopulace v Českém lese (CL) (Obr.1).

Část vzorků již byla dříve použita v předchozí diplomové práci (Albrechtová, 2011), která se zabývala charakterizací bobřích populací pomocí mitochondriální DNA a mikrosatelitových lokusů.

2.2. Design primerů

Primery pro fragment DRB použité v práci Babika *et al.* (2005) (JS1, JS2; Schad *et al.* (2004)) občas amplifikovaly pseudogeny, proto jsem se rozhodl navrhnout nové. V databázi Ensembl (Yates *et al.*, 2020) jsem našel sekvenci druhého exonu DRB bobra kanadského a zkopíroval ji i s 200 bp dlouhým úsekem intronu na obou koncích sekvence. Primery jsem designoval pomocí Primer Blast (Ye *et al.*, 2012) tak, aby primery nasedaly právě v intronech. Výsledný pár vypadal takto:

```
>drbLF                                >drbLR
GACGCCATCATGTGACGGTAG                CAAAATCCCGTTACCTCAGGACACT
```

délka produktu: 522 bp.

Jako druhý studovaný MHC lokus jsem vybral druhý exon genu DQA. Při navrhování primerů pro tento lokus jsem postupoval obdobně jako u DRB. Protože druhý exon DQA je poměrně krátký (249 bp), hledal jsem primery v 250 bp dlouhých úsecích intronů přiléhajících k exonu. Forward primer leží na začátku exonu, reverse primer v intronu.

```
>dqaSF                                >dqaSR
ACCATGTTGCCTCCTATGGCA                GGCTTGGGATGAAGGGATAGAC
```

délka produktu: 301 bp.

Kromě těchto dvou dvojic jsem vyzkoušel pro každý gen ještě jeden další pár primerů. Ty však kromě zkoumaných sekvencí amplifikovaly také další nespecifické fragmenty, proto jsem je rutinně k sekvenování nepoužíval.

```
>drbSF                                >drbSR
CAGCACGTTTCTTGAGGAAG                TTCCTTTACTCAGCCTGG
```

délka produktu: 313 bp

```
>dqaLF                                >dqaLR
ACTGGACAACTCCAAGACCA                AGGAGATTGGGGACTCCTGG
```

délka produktu: 567 bp.

2.3. Sekvence

PCR obou jaderných genů (DRB i DQA) jsem prováděl v objemech 10 μ l. Složení reakce bylo následovné: 5 μ l PPP Master Mix (2x), 1 μ l forward primeru (10 μ M), 1 μ l reverse primeru (10 μ M), 2 μ l vody, 1 μ l templátové DNA (koncentrace neznámá). Pokud amplifikovaný úsek nebyl detekovatelný elektroforézou, zopakoval jsem reakci s desetkrát zředěnou templátovou DNA.

U části vzorků osekvenovali fragment kontrolní oblasti (CR) mitochondriální DNA v rámci svých projektů naši kolegové z ČZU. Byly použity primery Thr-L15926 (CAATTCCCGGTCTTGTAACC) a DL-H16340 (CCTGAAGTAGGAACCAGATG) (Vilà *et al.*,

1999), jež se běžně užívají v genetických studiích na bobrech. U zbylých vzorků jsem amplifikaci prováděl v objemu 10 µl s následujícími složkami: 5 µl PPP Master Mix (2x), 0,6 µl forward primer (10µM), 0,6 µl reverse primer (10µM), 2,8 µl vody, 1 µl templátové DNA (koncentrace neznámá).

Protože některé vzorky mohly být méně kvalitní, rozhodl jsem se používat touchdown PCR pro zvýšení specificity. PCR jaderných genů a kontrolní oblasti mtDNA jsem prováděl v cycleru Eppendorf (Mastercycler ep gradient nebo Mastercycler nexus gradient). Programy na amplifikaci byly tyto:

DRB		
teplota (°C)	čas	
94	3 min	
94	30 s	10x
65	-1 °C/c. 30 s	
72	31 s	
94	30 s	25x
55	30 s	
72	31 s	
72	3 min	
12	∞	

DQA		
teplota (°C)	čas	
94	3 min	
94	30 s	10x
68	-1 °C/c. 30 s	
72	30 s	
94	30 s	20x
58	30 s	
72	30 s	
72	3 min	
12	∞	

CR		
teplota (°C)	čas	
94	4 min	
94	30 s	10x
63	-1 °C/c. 30 s	
72	31 s	
94	30 s	25x
53	30 s	
72	31 s	
72	1 min	
4	10 s	
12	∞	

Po PCR jsem vzorky zkontroloval na elektroforéze. Na gel z dvouprocentní agarózy jsem nanesl 4 µl z reakce a nechal běžet dvacet minut v TBE pufru při 140 V. Následně jsem v transiluminátoru zkontroloval přítomnost zkoumaného fragmentu. Když PCR zdárně proběhla, přečistil jsem DNA tak, že jsem k reakci přidal 0,5 µl exonukleázy I a 1 µl fosfatázy FastAP a inkuboval v cycleru (Bio-Rad) 15 minut při 37 °C a následně 15 minut při 80 °C. Sekvenaci prováděla Laboratoř sekvenace DNA PřF UK. Sekvenační reakci jsem namíchal z 5,5 µl vody, 0,5 µl reverse primeru (10µM) a 2 µl DNA z PCR reakce.

Chromatogramy ze sekvenací jsem upravil v programu CodonCode Aligner (<https://www.codoncode.com>), případně Geneious Prime (<https://www.geneious.com>). Odstranil jsem nekvalitní sekvence, ořezal primery a vyšetřil případné heterozygotní pozice. V případě nejasností jsem produkt nechal osekvenovat v druhém směru, případně jsem zopakoval PCR. Genotypy jsem rozdělil na jednotlivé sekvence pomocí kombinace programů SeqPHASE (Flot, 2010) a PHASE v2.1.1 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Scheet, 2005).

2.4. Genotypování mikrosatelitů

Mikrosatelitové lokusy jsem genotypoval pomocí sady dvanácti fluorescenčně značených párů primerů v multiplex PCR. Lokusy byly navrženy pro bobra kanadského a metoda byla v naší laboratoři odladěna

během předchozí diplomové práce (Albrechtová, 2011), podle které jsem postupoval při přípravě reakcí. U vzorků, kde se nepodařilo amplifikovat všechny lokusy, byly problémové amplifikovány v samostatných reakcích. Fragmentační analýzu prováděla opět Laboratoř sekvenace DNA PřF UK. Výsledky fragmentační analýzy jsem zpracoval v programu GeneMarker v1.90 (<https://softgenetics.com>). Jeden lokus (Cca76) vyšel monomorfní, a z analýz jsem ho proto vyřadil.

2.5. Detekce selekce v minulosti

Alely DRB bobra evropského jsem testoval na intralokusovou rekombinaci za použití těchto metod implementovaných v programu RDP v.4.101 (Martin *et al.*, 2015): SisScan, Bootscan (velikost okna 30, velikost kroku 3), RDP, GENECONV (výchozí nastavení), MaxChi, Chimaera (počet variabilních míst 10) s použitím Bonferroniho korekce.

Pro vyšetření pozitivní selekce v minulosti jsem pro sekvence druhého exonu DRB spočítal jednostranný Z-test založený na poměru synonymních a nesynonymních mutací, jenž je implementovaný v programu MEGA-X (Kumar *et al.*, 2018). Analýzu jsem provedl celkově 12x: včetně/bez sekvencí bobra kanadského, pro celé sekvence / pouze pro ABS / pouze non-ABS, pomocí Neiho-Gojoboriho (s Jukesovou-Cantorovou korekcí) / Kumarovy metody. Pro odhad rozptylu bylo použito 9999 bootstrapů.

Pozitivní selekci na jednotlivých kodonech jsem hledal pomocí metod FEL, FUBAR a MEME přes server Datamonkey (Weaver *et al.*, 2018). Analýzy jsem opakoval dvakrát, poprvé bez sekvencí bobra kanadského, podruhé s nimi.

Exon DRB jsem testoval na přítomnost selekce pomocí McDonaldova-Kreitmanova (MK) testu (McDonald & Kreitman, 1991; Egea *et al.*, 2008), jež se obvykle používá na testování vlivu pozitivní selekce, ale může odhalit také balancující selekci. Porovnal jsem synonymní a nesynonymní mutace v sekvencích sesterských druhů bobra evropského a bobra kanadského. Je ale třeba mít na paměti, že výsledek MK testu může být ovlivněn recentním bottleneckem populací bobra evropského.

V programu PopART (Leigh & Bryant, 2015) jsem vytvořil sítě alel fragmentů DRB a DQA metodou median joining. Obrázky jsem následně upravil v programu Inkscape (<https://inkscape.org>).

Vytvořil jsem tři fylogenetické stromy: konkatenát obou MHC lokusů, pouze druhý exon DRB a CR mtDNA. Konkatenovat MHC lokusy jsem si mohl dovolit díky jejich velmi těsné blízkosti, kdy jsem v žádné populaci nenašel rekombinaci, a díky tomu, že vzorky kanadských bobrů byly monomorfní pro DQA. Pro strom mitochondriální DNA jsem použil všechny známé haplotypy kontrolní oblasti, jak jsem je zrevidoval ve své bakalářské práci (Náhlovský, 2019). Pro konkatenát MHC lokusů jsem jako outgroup nastavil sekvence kanadských bobrů, stejně tak pro CR. U druhého exonu DRB jsem do analýzy jako outgroup přidal tři sekvence různých poddruhů druhů myši domácí, jež jsem stáhnul z databáze GenBank (*Mus musculus musculus*, alela MumuEb1; *M. m. domesticus*, MudoEb1; *M. m. castaneus*, MucaEb1). Nejlepší schéma modelů evoluce jsem našel přes PartitionFinder2 (Lanfear *et al.*, 2016), strom jsem spočítal v MrBayes (Ronquist *et al.*, 2012) ve dvou bžích po milionu generací.

Stromy byly upraveny v programu FigTree v1.4.4 (Rambaut, dostupné z www.softpedia.com/get/Science-CAD/FigTree-AR.shtml).

2.6. Detekce probíhající selekce

Frekvence alel MHC v jednotlivých populacích jsem spočítal v programu GenAlEx 6.503 (Peakall & Smouse, 2006, 2012), tamtéž jsem vyšetřil odchylky od Hardyho-Weinbergovy rovnováhy na jaderných markerech. V programu GenAlEx jsem také spočítal párová F_{ST} mezi jednotlivými populacemi, zvláště pro MHC a pro mikrosatelitové lokusy. Vazbu lokusů jsem vyšetřil v programu Genpop (Raymond & Rousset, 1995). Z důvodu totální vazby mezi DQA a DRB v analyzovaném datasetu jsem ve většině populačně genetických testů použil pouze lokus DRB. DQA jsem testoval pouze v analýze F_{ST} outliers a i tam jsem test zopakoval i s vynecháním DQA.

Pomocí programu BayeScan v2.1 (Foll & Gaggiotti, 2008) jsem na základě F_{ST} jednotlivých lokusů na nejmenších populacích zkoumal, zda se MHC geny napříč populacemi chovají jinak než neutrální markery. Analýzu jsem nejdříve spočítal pouze s mikrosatelitovými markery. Když žádný mikrosatelitový lokus nebyl označen jako outlier, přidal jsem MHC lokusy a analýzu zopakoval.

K testování, zda má hierarchické škálování různý vliv na podíl vysvětlené variability u MHC a u neutrálních lokusů, jsem spočítal hierarchickou AMOVA pro mikrosatelitové markery a pro druhý exon genu DRB. Analýzu jsem prováděl v programu Arlequin ver 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) s použitím 10000 permutací.

Abych vyšetřil, zda se liší struktura MHC a neutrálních jaderných markerů v závislosti na geografické vzdálenosti populací, vyšetřil jsem u obou „isolation by distance“ (IBD). Jihomoravskou populaci jsem nezahrnul, protože zde nepředpokládáme tok genů navzájem s ostatními populacemi. Středy jednotlivých populací jsem spočítal jako těžiště souřadnic příslušných vzorků. Geografické vzdálenosti mezi těmito středy jsem spočítal v R (R Core Team, 2020) za použití balíčku geosphere (funkce distGeo()). Jako genetickou vzdálenost populací jsem použil párová F_{ST} . IBD mikrosatelitů a DRB jsem testoval v R pomocí balíčku adegenet (funkce mantel.randtest(), nrepet=9999).

Asortativní párování založené na MHC by se mělo projevit porušením vazebné rovnováhy mezi mitochondriálními markery a MHC lokusy. Analyzoval jsem tedy cytonukleární nerovnováhu mezi kontrolní oblastí mitochondriální DNA a fragmentem genu DRB. Použil jsem program CNDM (Asmussen & Basten, 1994, 1996; Basten & Asmussen, 1997) uzpůsobený pro multialelické systémy a analýzu jsem provedl zvláště pro západočeskou, vltavskou a jihomoravskou populaci.

Pokud na geny působí tzv. „divergent allele advantage“ (DAA), závisí fitness heterozygotů pozitivně na rozdílnosti nesených alel. V populaci by se pak mělo vyskytovat proporčně více jedinců s velmi rozdílnými alelami, než by odpovídalo frekvencím očekávaných na základě Hardyho-Weinbergovy rovnováhy. Párové divergence alel jsem spočítal třemi způsoby: p-distance nukleotidových sekvencí (s Jukesovou-Cantorovou korekcí), PAM distance, zohledňující pravděpodobnost záměny aminokyselin dle alignmentů velkého počtu proteinů, a Granthamovy distance

reprezentující míru rozdílnosti fyzikálně-chemických vlastností aminokyselin. PAM a p-distance alel jsem spočítal v programu MEGA-X, Granthamovy distance jsem spočítal pomocí perl skriptu z práce Pieriniové & Lenze (2018). DAA jsem testoval dle skriptu z práce Talarica *et al.* (2019). Analýzy jsem provedl ve všech kombinacích hladin čtyř parametrů: 1. distance alel (p-distance, PAM, Grantham); 2. s celými alelami / pouze s „antigen binding sites“ (ABS), označených na základě krystalografie (Brown *et al.*, 1993); 3. rozdělení populací (celý dataset dohromady / velké populace (západočeská, vltavská, jihomoravská) / každá západočeská subpopulace zvlášť); 4. s užitím všech jedinců / pouze s heterozygoty (pro odfiltrování vlivu excesu nebo snížení počtu heterozygotů).

3. Výsledky

3.1. Sekvence reliktních populací

Osekvenovaný úsek fragmentu genu DRB byl dlouhý 466 bp a zahrnoval i části intronů. Délka exonu (respektive jeho přeložitelné části) byla 267 bp. Ze sedmi reliktních populací jsem získal sekvence 81 jedinců, z toho 39 pocházelo z dosud nezkoumaných východoevropských populací. Nalezl jsem deset alel. Jedenáctá alela, kterou jsem následně našel v nově založených populacích, byla dříve publikována z francouzské reliktní populace. Vzorky z této populace, jež byly dostupné v naší laboratoři, se mi bohužel nepodařilo amplifikovat. Byly nalezeny všechny alely publikované v dřívější práci Babika *et al.* (2005) kromě alely Cafi-DRB*10 ze záposibiřské reliktní populace (*C. f. pohlei*). Další dvě dosud nepublikované alely (**n1**, **n2**) jsem našel ve východoevropských reliktních populacích. Z důvodu větší přehlednosti zde nepoužívám publikované názvy alel, ale pojmenoval jsem alely dle dříve popsaných poddruhů příslušných jednotlivým reliktním populacím po vzoru mitochondriálních haplotypů. Pro přehlednost uvádím tabulku názvů zde používaných a užitých v práci Babika *et al.* (2005) (Tab.2). Čtyři populace nesly každá pouze jednu alelu. Jedna alela (**al**) se vyskytovala v německé reliktní populaci i ve východní Evropě.

Obě východoevropské reliktní populace nejsou na základě přítomnosti alel DRB rozlišitelné, na rozdíl od mitochondriální DNA a STR markerů (Albrechtová, 2011). Ve voroněžské i minské populaci se vyskytují stejné alely (**sp**, **n1**, **n2**), mění se pouze jejich frekvence – **sp** je velmi vzácná kolem Minsku

Tab.2 Názvy publikovaných alel DRB a jejich pojmenování v této práci. Zároveň je uvedena alela DQA, jež se váže k příslušné sekvenci DRB.

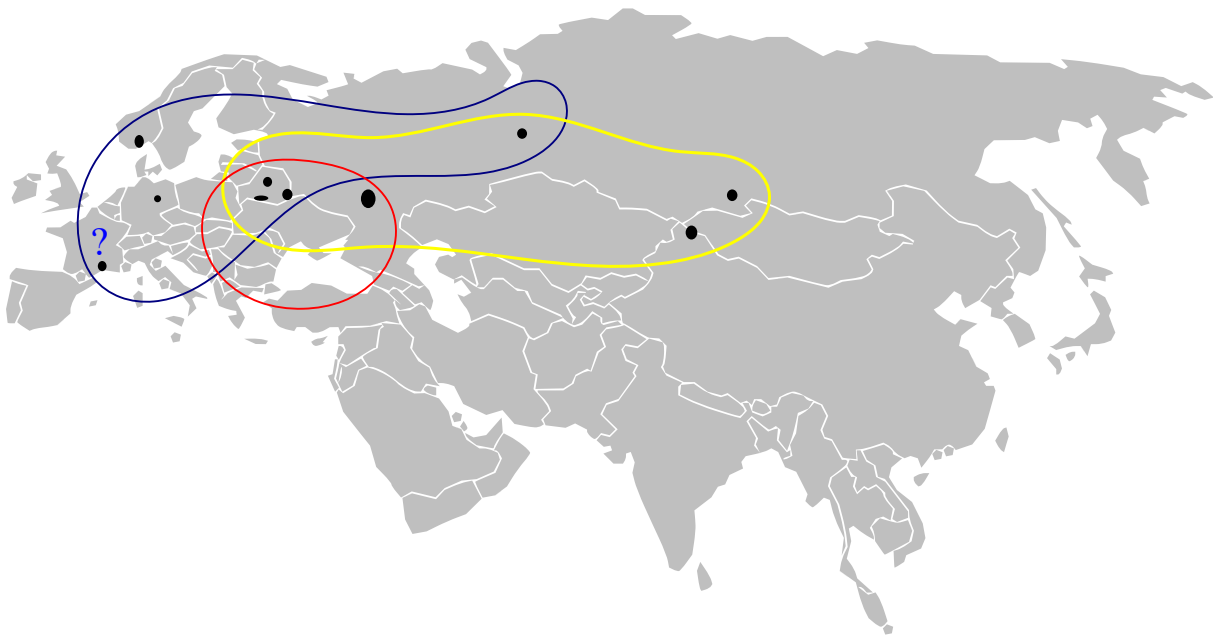
Babik <i>et al.</i> (2005)	název zde	DQA
Cafi-DRB*01	al	Z
Cafi-DRB*02	fi	Z
Cafi-DRB*03	sp	S
Cafi-DRB*04	bi	V
Cafi-DRB*05	tu	V
Cafi-DRB*06	po1	Z
Cafi-DRB*07	ga	Z
Cafi-DRB*08	po2	V
Cafi-DRB*09	po3	V
Cafi-DRB*10	(nenalezena)	
	n1	S
	n2	V

a **n2** ve Voroněži. V obou těchto populacích je nejčastější alelou **n1**. Ve vitebské populaci se bohužel podařilo rozfázovat pouze dva vzorky, obsahující alely **al** a **sp**. Dalších pět vzorků mělo jednotný genotyp velmi podobný heterozygotům **al+sp**. Očekáváme tedy, že obsahují jednu z těchto dvou alel a další alelu, jež je podobná druhé z této dvojice. Alela **al** je tak jediná, jež se vyskytuje hned ve dvou reliktních populacích, původně byla popsána z labského refugia v Německu (*C. f. albicus*). Samozřejmě výjimkou jsou východoevropské populace, jež mezi sebou sdílí své alely.

Bohužel se mi nepodařilo získat dostatečně kvalitní vzorky z francouzské reliktní populace (*C. f. galliae*). Na základě mikrosatelitových markerů jsem však zachytil silný signál z této reliktní populace v nově ustavené populaci v západních Čechách. Tomu odpovídá vysoká frekvence alely **ga**, popsané dříve z francouzského refugia, v této populaci.

Z reliktních populací jsem získal sekvenční fragmenty genu DQA z 91 bobrů. Délka osekvenované a zároveň přeložitelné části byla 222 bp a pokrývala většinu druhého exonu. Nalezl jsem jen tři alely. Ty jsem pojmenoval **Z**, **V** a **S** podle výskytu v reliktních populacích převážně v západní, východní nebo střední části areálu. Pouze reliktní populace z východní Evropy a západní Sibíře vykazovaly polymorfismus. Všechny alely byly dost podobné, navzájem se lišily o dva až pět nukleotidů, respektive o jednu až tři aminokyseliny. Není tedy pravděpodobné, že by tato diverzita měla adaptivní význam.

První alela (**Z**) je fixována v reliktních populacích západní části areálu (Německo, Norsko a s největší pravděpodobností také Francie). Druhá alela (**V**) se zafixovala ve dvou asijských reliktních populacích (Tuva, Mongolsko). Větší diverzita je, stejně jako u genu DRB, v reliktních populacích na západní Sibíři a ve východní Evropě. Západosibiřská populace nese alely **Z** a **V**. Ve východoevropských populacích je mimo tyto dvě přítomna ještě třetí alela (**S**), jež se v žádných jiných reliktních populacích nevyskytuje (Obr.2). Počty alel MHC lokusů z reliktních populací viz Tab.3, alignmenty alel MHC jsou uvedeny v Obr.3 a Obr.4.



Obr.2 Rozšíření alel DQA napříč reliktními populacemi (černě). Modře – alela **Z**, červeně – **S**, žlutě – **V**. Vzorky přímo z francouzského refugia nebyly k dispozici, přítomnost alely **Z** jsem odvodil z vazby s DRB alelou **ga**, jež byla jako jediná popsána z reliktní populace ve Francii.

Z pěti vzorků bobrů kanadských byly jen dva homozygotní na DRB (jedinec z Voroněže a z brněnské zoologické zahrady). Je zajímavé, že druhý jedinec z brněnské ZOO byl heterozygotní, stejně jako oba vzorky od W. Durky. Vzhledem k malému počtu vzorků nebylo možné heterozygotní genotypy rozfázovat. U kanadského bobra tedy můžeme předpokládat vysokou diverzitu alel, jak je obvyklé u jiných savců, byť by bylo vhodné tuto hypotézu ověřit na větším počtu vzorků. Zcela jiná je situace na lokusu DQA, kde všech pět vzorků obsahovalo pouze jedinou alelu. Ta navíc byla dosti podobná evropským alelám, od nichž se lišila o pět až osm nukleotidů, respektive o tři až pět aminokyselin.

Tab.3 Alely nalezené v jednotlivých reliktních populacích a jejich frekvence. N značí počet osekvenovaných vzorků. Běloruská reliktní populace je rozdělena na dvě subpopulace zjištěné na základě mikrosatelitových lokusů (Albrechtová, 2011, Munclinger *et al.*, in prep).

populace	N(DRB)	DRB	frekvence	N(DQA)	DQA	frekvence
Norsko	15	fi	1,00	15	Z	1,00
Labe	2	al	1,00	4	Z	1,00
BE Minsk	21	sp	0,05	21	S	0,55
		n1	0,50		V	0,45
		n2	0,45			
BE Vitebsk	2	al	0,75	7	Z	0,57
		sp	0,25		S	0,43
Voroněž (RU)	16	sp	0,28	16	S	0,94
		n1	0,66		V	0,06
		n2	0,06			
Z Sibiř (RU)	6	po1	0,50	10	Z	0,45
		po2	0,33		V	0,55
		po3	0,17			
Tuva (RU)	15	tu	1,00	15	V	1,00
Mongolsko	4	bi	1,00	8	V	1,00

3.2. Admixované populace

V nově vzniklých (převážně) českých populacích jsem osekvenoval MHC lokusy 218 (sub)adultních jedinců. Nalezl jsem 6 alel DRB a 3 alely DQA. Všechny jsem již dříve identifikoval v reliktních populacích s výjimkou alely z Francie, která však již byla známa z práce Babika *et al.* (2005).

Všichni jedinci byli genotypováni na 11 lokusech STR, navíc jsem přidal dalších 68 mláďat, jež jsem nezahrnul do analýz MHC. Mikrosatelitové lokusy nesly v českých populacích jednu až sedm alel, průměrně 3,42 alel na lokus. Monomorfní lokus Cca76 jsem vyřadil z dalších analýz.

Všechny nalezené mitochondriální haplotypy byly již dříve publikované. V západočeské populaci jsem našel 3x haplotyp **fi1**, 73x **ga1** a 38x **jf7**. V jihomoravské populaci byl zjištěn 56x haplotyp **fi1**, 7x **fi2**, 23x **jf7** a 3x **nh5**. V menší vltavské populaci jsem zjistil 1x **al1**, 1x **fi1**, 6x **ga1** a 7x **jf7**.

3.3 Rekombinace

Mezi oběma MHC lokusy jsem nenalezl rekombinaci, což odpovídá udávané velmi těsné vazbě (<0,01 cM, Mouse Genome Informatics, <http://www.informatics.jax.org>). Vazba jednotlivých alel odpovídala uspořádání, jež jsem našel v reliktních populacích. Pouze jedna metoda (Bootscan) našla jednu intralokusovou rekombinační událost ve fragmentu DRB, rekombinace tedy na formování variability tohoto lokusu zřejmě nemá velký vliv. Lokus DQA jsem netestoval z důvodu velmi nízkého počtu a extrémní podobnosti alel.

3.4. Selektce v minulosti

Z-test pozitivní selektce v minulosti vycházel vždy signifikantní, pokud jsem bral v úvahu pouze ABS (19 kodonů). Naopak na nABS test vycházel vždy nesignifikantně. Na celých alelách vycházel test signifikantní jen tehdy, když byly zahrnuty pouze sekvence bobra evropského. Neiho-Gojoboriho i Kumarova metoda poskytovaly podobné výsledky. V tabulce Tab.4 jsou shrnuty p-hodnoty jednotlivých kombinací parametrů.

Pomocí testů pozitivní selektce na kodonech jsem na fragmentu DRB v sekvencích bobra evropského alespoň jednou metodou našel celkem sedm kodonů pod vlivem pozitivní selektce. Když jsem přidal sekvence bobra kanadského, vzrostl tento počet na devět. Všechny tyto kodony jsou zároveň předpokládána ABS. Nalezené kodony pod vlivem pozitivní selektce, jak je označily jednotlivé metody, ukazuje obrázek Obr.3.

MK test selektce ukázal velké množství nesynonymních polymorfismů mezi oběma druhy. Naopak nesynonymní mutace fixované mezi druhy jsou relativně málo časté. Chí-kvadrát test ukázal p-hodnotu 0,076, jež by mohla naznačovat slibný trend. Pozitivní selektce však předpokládá snížení počtu nesynonymních polymorfismů a také hodnota α , jež reprezentuje podíl substitucí řízených pozitivní selekcí, nám vyšla záporná, konkrétně -4,6. Index neutrality (NI) vyšel 5,6, hodnoty větší než jedna značí vliv balancující nebo negativní selektce. Vzhledem k tomu, že nesynonymní mutace byly skoro pětikrát častější než synonymní, naznačil MK test vliv balancující selektce na lokus DRB. Hodnoty fixovaných a sdílených synonymních a nesynonymních mutací ukazuje tabulka Tab.5.

3.5. Fylogenetické analýzy

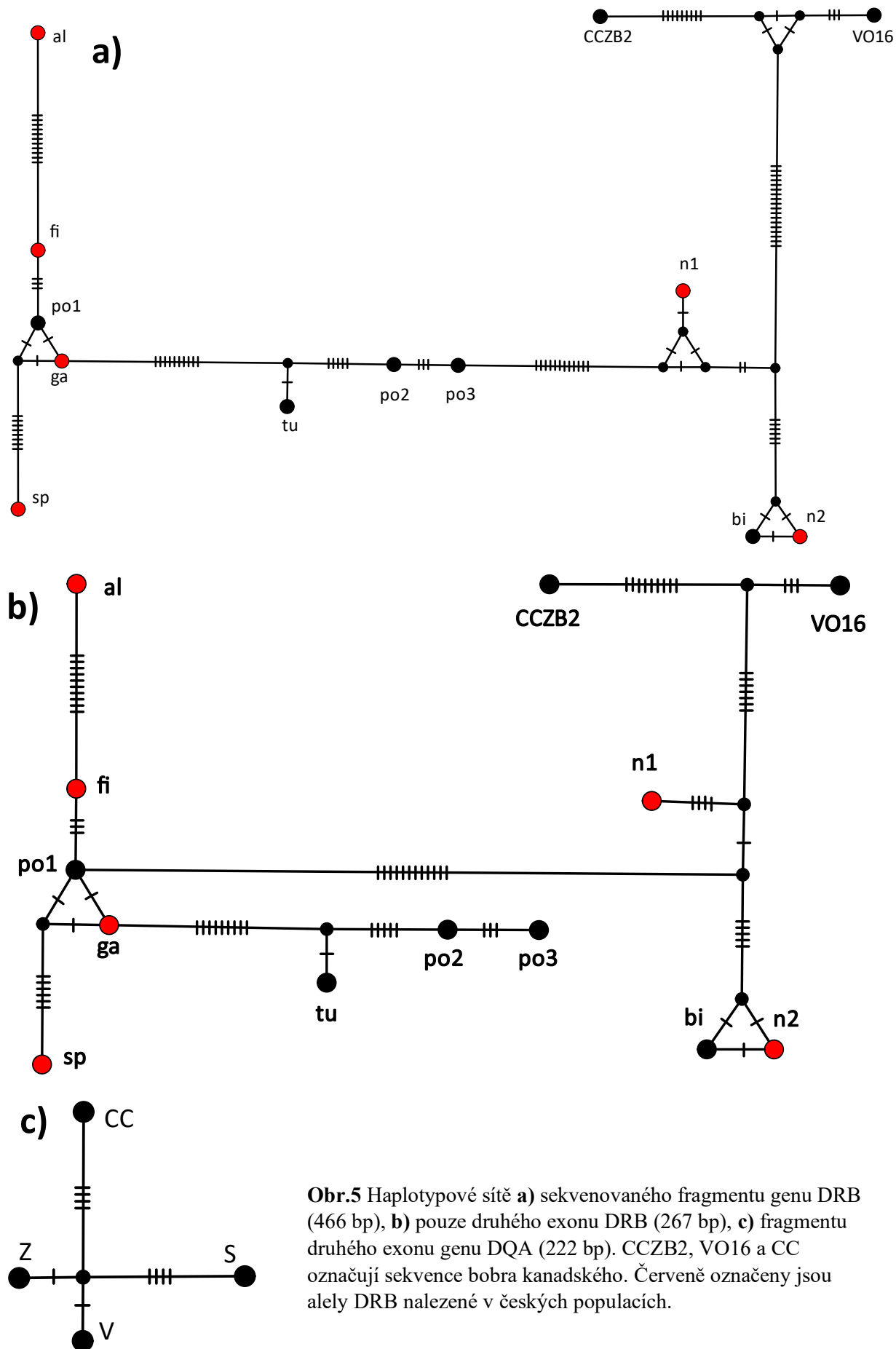
Obr.5 ukazuje neighbor-joining síť fragmentu DQA, fragmentu DRB včetně částí intronů a pouze druhého exonu DRB. Všechny alely DQA včetně sekvence z bobra kanadského jsou si velmi podobné. V síti exonu DRB lze ale odhadnout několik klastrů, jež však rozhodně nereflektují tradiční rozdělení na západní a východní linii, známé z mitochondriálního markeru. Obě alely z bobra kanadského tvoří společně jeden klast, oddělení od sekvencí bobra evropského však vynikne, až když do sítě zahrneme i introny.

Tab.4 P-hodnoty Z-testů pozitivní selektce. Testy byly provedeny za pomoci dvou metod stanovení dN/dS, se zahrnutím nebo vyloučením alel bobra kanadského a s použitím celých alel, pouze ABS a pouze nABS.

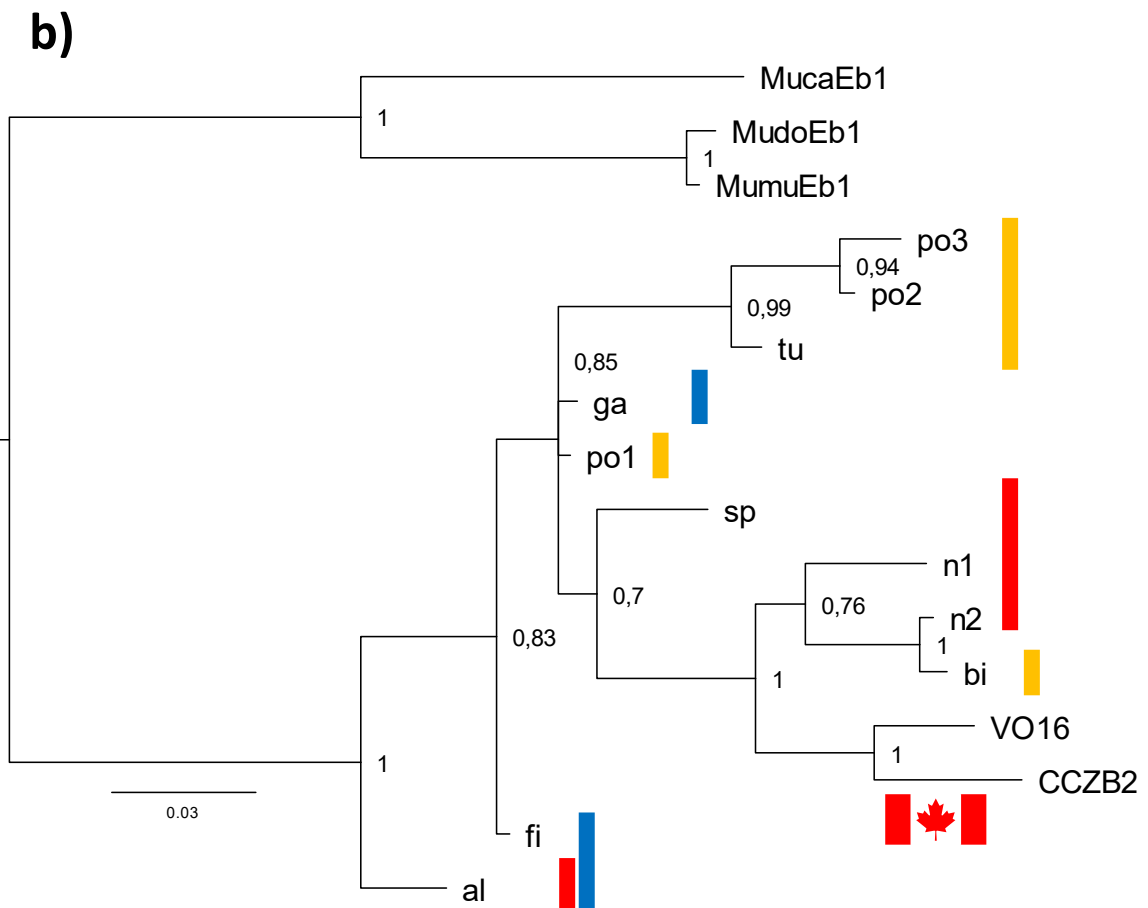
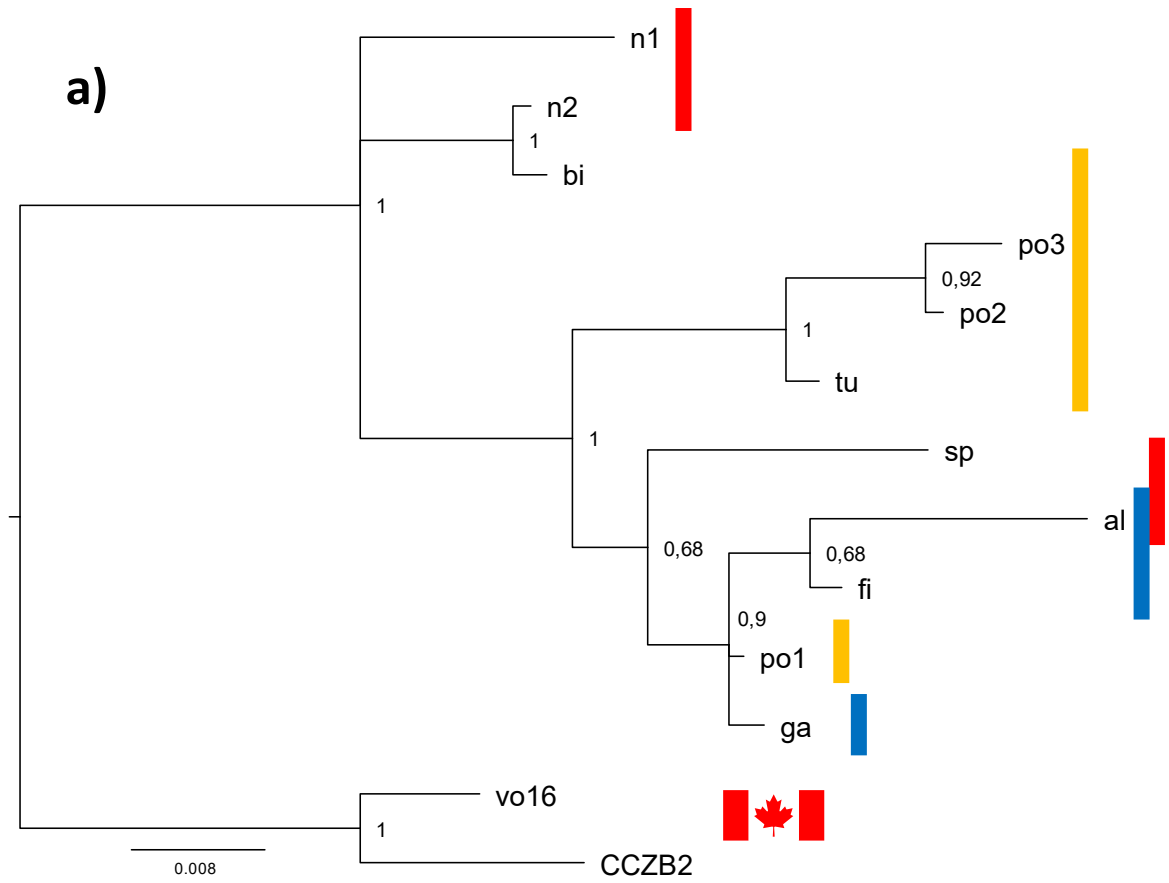
jen <i>C. fiber</i>	Nei-Gojobori	Kumar
alely	0,025	0,022
ABS	0,0002	0,002
nABS	1	1
včetně		
<i>C. canadensis</i>		
alely	0,146	0,220
ABS	0,0002	0,003
nABS	1	1

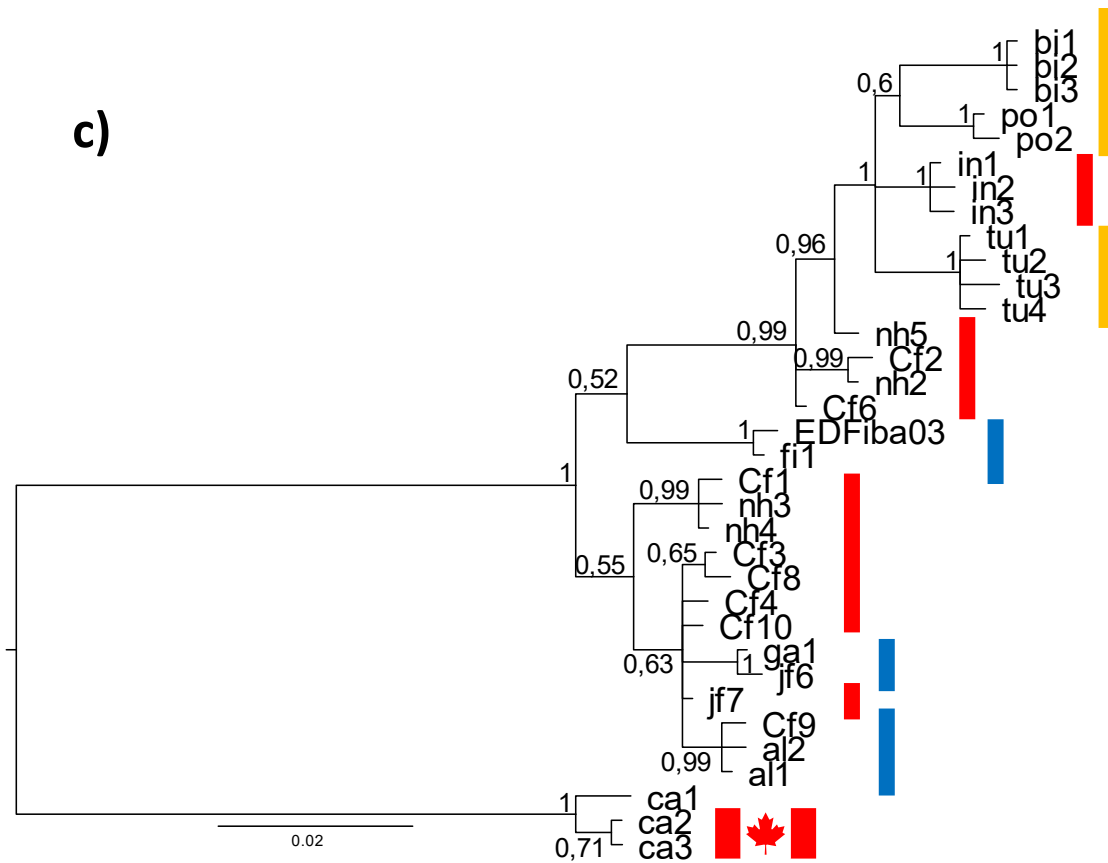
Tab.5 Počty synonymních (S) a nesynonymních (N) polymorfismů (P) a divergencí (D) mezi oběma druhy bobra.

	P	D	celkem
S	8	2	10
N	45	2	47
celkem	53	4	57



Obr.5 Haplotypové sítě **a)** sekvenovaného fragmentu genu DRB (466 bp), **b)** pouze druhého exonu DRB (267 bp), **c)** fragmentu druhého exonu genu DQA (222 bp). CCZB2, VO16 a CC označují sekveny bobra kanadského. Červeně označeny jsou alely DRB nalezené v českých populacích.





Obr.6 Fylogenetický bayesiánský strom **a)** konkatenátu obou MHC lokusů, **b)** druhého exonu DRB, **c)** kontrolní oblasti mitochondriální DNA. Hodnoty u uzlů značí posteriorní pravděpodobnost. Zobrazeny jsou pouze uzly s podporou větší než 0,5. MumuEb1, MudoEb1 a MucaEb1 jsou alely myši domácí (viz Materiál a metodika). Modře jsou označeny sekvence z reliktních populací západní linie dle mitochondriálních haplotypů, oranžově východní linie a červeně sekvence pocházející z reliktních populací ve východní Evropě, jež náleží do západní i východní linie (viz text).

Fylogenetický strom fragmentu kontrolní oblasti mitochondriální DNA má často slabé podpory uzlů. Haplotypy bobra kanadského kladou spolu a jsou dobře odlišeny od sekvencí z bobrů evropských. Mezi těmi jsou dobře rozlišitelné tři skupiny: Tzv. východní linie je tvořena haplotypy z asijských refugií a některými východoevropskými haplotypy. Nejasné postavení má klastr dvou haplotypů z norského refugia, na základě haplotypových sítí tradičně řazených do tzv. západní linie (viz Náhlovský, 2019). Třetí velkou skupinou je zbytek západní linie zahrnující haplotypy ze západoevropských refugií a zbytek východoevropských sekvencí. V rámci východní linie je dobře podpořen klastr tradičních východních haplotypů popsanych již v práci Ducroze *et al.* (2005), uvnitř kterého jsou jasně patrné menší skupiny sekvencí z jednotlivých refugií. Fylogenetické stromy jsou zobrazeny na Obr.6.

Strom konkatenátu obou MHC lokusů má opět dobře odlišený klastr sekvencí bobra kanadského. Velkou podporu má klastr zahrnující všechny sekvence bobra evropského kromě alely z mongolského refugia a obou nově popsanych alel z východní Evropy. V rámci tohoto klastru má pak velkou podporu skupina zahrnující tuvinskou a dvě západosibiřské alely.

U stromu exonu DRB tvořily všechny alely z bobrů jeden klastř, odlišený dobře od myších outgroups. Strom je logicky podobný fylogenetickému stromu z konkatenovaných lokusů. Zajímavé je, že alely bobrů kanadských tvoří vnitřní klastř sekvencí bobrů evropských. Nejbliže jsou jim příbuzné alela z Mongolska a nově popsané východoevropské alely. Opět je zde zřetelně odlišena skupina tuvinské a dvou západosibiřských alel. Ostatní uzly nemají vysokou podporu. Rozhodně však stromy z MHC lokusů na rozdíl od mitochondriálních sekvencí nemají zřetelně rozlišenou východní a západní linii.

3.6. Selekcce v současných populacích

Frekvence alel v admixovaných populacích jsou shrnuty v Tab.6. HW rovnováha DRB vyšla signifikantně porušena v západočeské i jihomoravské populaci. Testové statistice však zdaleka nejvíce přispívaly pouze jeden až dva velmi vzácné genotypy, porušení HW rovnováhy tedy nepovažují za významné. Rozhodně však v bobřích populacích není nadbytek heterozygotů, jak by se z povahy MHC dalo očekávat. Některé testy HW rovnováhy na mikrosatelitových lokusech ojedinele zaznamenaly její porušení. Výsledky však nebyly konzistentní napříč populacemi, takže je nepovažují za významné. Totéž platí také o testech vazby lokusů.

Tab.6 Frekvence alel MHC v nově ustavených populacích. N(msats) značí počet vzorků genotypovaných na jaderných STR markerech, N(MHC) je počet jedinců s osekvenovanými MHC markery. BAV, CL, RAD, PLZ, SSU a JSU jsou subpopulacemi západočeské populace (viz Materiál a metodika).

	N(msats)	N(MHC)	DRB						DQA		
			ga	fi	sp	al	n1	n2	Z	S	V
JM	109	89	-	0,30	0,32	-	0,10	0,28	0,30	0,42	0,28
VL	27	15	0,33	0,03	0,07	0,27	0,13	0,17	0,63	0,20	0,17
ZC	150	114	0,43	0,02	0,03	0,15	0,38	-	0,59	0,41	-
BAV	12	12	0,67	-	-	0,21	0,13	-	0,88	0,13	-
CL	80	58	0,36	-	-	0,11	0,53	-	0,47	0,53	-
RAD	15	9	0,44	-	-	0,28	0,28	-	0,72	0,28	-
PLZ	6	6	0,33	-	0,25	0,25	0,17	-	0,58	0,42	-
SSU	23	15	0,53	-	-	0,17	0,30	-	0,70	0,30	-
JSU	14	14	0,39	0,18	0,11	0,07	0,25	-	0,64	0,36	-
celk.	286	218	0,25	0,14	0,15	0,09	0,25	0,13	0,48	0,40	0,13

MHC lokusy v analýzách nevyšly jako F_{ST} outliers, mají tedy v populacích podobnou strukturu jako neutrální jaderné markery. Podobné výsledky přinesla také hierarchická AMOVA. Rozdělení na velké populace (západní Čechy, jižní Morava, Vltava) vysvětlilo zhruba 19 % variability neutrálních jaderných markerů. Rozdělení západočeské populace na šest menších (BAV, CL, JSU, RAD, PLZ, JSU) vysvětlilo další 4 %. V DRB vysvětlily velké populace cca 21 % a malé populace 5 %. Mantelův test IBD vyšel nesignifikantní jak u mikrosatelitových lokusů, tak u fragmentu DRB.

V jihomoravské i západočeské populaci vyšla signifikantně porušena cytonukleární rovnováha mezi mitochondriální DNA a MHC lokusem DRB (p-hodnoty 0,013 a 0). Fisherovy testy jednotlivých kombinací alel ukázaly, že tato nerovnováha je způsobena vyšším počtem jedinců s mitochondriálním haplotypem a MHC alelou pocházejícími ze stejné reliktní populace. Test vltavské populace vyšel nesignifikantní, což ale může být způsobeno také menším počtem vzorků.

Test DAA při testování datasetu nerozděleného na dílčí populace vyšel při zahrnutí pouze heterozygotů signifikantní v pěti ze šesti kombinací podmínek (kromě testu s celými alelami a Granthamovými distancemi). Naopak pokud jsem takto testoval dataset včetně homozygotů, testy byly vždy vysoce nesignifikantní. V jihomoravské populaci vychází signifikantně všechny testy s použitím Granthamových distancí, ze zbytku testů vychází pozitivně jen kombinace se zahrnutím pouze heterozygotů a celých alel. U západočeské populace vychází signifikantní DAA pouze ve dvou kombinacích z dvanácti, ale je třeba brát na zřetel, že u této populace může výsledky ovlivňovat vnitřní struktura. V subpopulaci CL, jež tvoří zhruba polovinu západočeské populace, vychází signifikantně sedm z osmi kombinací testů s PAM a p-distancemi. Naopak žádný test s Granthamovými distancemi zde nevyšel signifikantně. V ostatních subpopulacích je signifikantní jen minimum kombinací. Kvůli nízkému počtu vzorků by zde však testy zřejmě neměly dostatečnou sílu. Nicméně dáme-li dohromady testy ze západočeských subpopulací, jihomoravské populace a vltavské populace, je získaná testová statistika v 63 z 96 případů vyšší, než by odpovídalo neutrálnímu modelu. Dle jednostranného binomického testu (v R, funkce `binom.test()`) je p-hodnota rovna 0,001. Pozorovaná míra divergence alel v jedincích je tedy signifikantně častěji vyšší než předpokládaná. P-hodnoty testů jednotlivých kombinací parametrů ukazuje Tab.7.

Tab.7 P-hodnoty testů DAA. V horní polovině jsou uvedeny testy založené na divergenci celých alel, v spodní polovině testy na základě divergence pouze ABS. N je počet vzorků v populaci, N het počet heterozygotů. p-dist, PAM a Grantham označují metodu výpočtu divergence. C značí test celé populace, H pouze heterozygotů. Žlutě zvýrazněny jsou p-hodnoty menší než 0,05.

celé alely	N	N het	p-dist		PAM		Grantham	
			C	H	C	H	C	H
ZC subpop.								
BAV	12	7	0,4336	0,8804	0,6509	0,9768	0,6462	0,9584
CL	58	40	0,0168	0,0237	0,0204	0,0788	0,8275	1,0000
JSU	14	11	0,2190	0,1951	0,1834	0,1842	0,6644	0,8335
PLZ	6	4	0,7482	0,4300	0,7695	0,4488	0,6838	0,2297
RAD	9	7	0,2519	0,2627	0,3360	0,3622	0,5963	0,9463
SSU	15	5	0,9936	0,7362	0,9935	0,8516	0,9955	0,9993
velké pop.								
ZC	114	74	0,3846	0,1222	0,4247	0,2088	0,9983	1,0000
JM	89	61	0,1314	0,0002	0,4586	0,0134	0,0001	0,0001
VLT	15	11	0,4234	0,0892	0,4125	0,0813	0,5498	0,1631
dohromady								
	218	146	0,9875	0,0001	0,9925	0,0004	1,0000	0,4366
ABS								
			p-dist		PAM		Grantham	
			C	H	C	H	C	H
ZC subpop.								
BAV			0,1799	0,0200	0,1676	0,2111	0,1792	0,3754
CL			0,0263	0,0414	0,0181	0,0382	0,0746	0,7014
JSU			0,1699	0,1070	0,1519	0,0911	0,3239	0,3555
PLZ			0,5944	0,0703	0,4913	0,0889	0,7191	0,2498
RAD			0,1742	0,0431	0,0524	0,0507	0,2580	0,1468
SSU			0,9854	0,1871	0,9807	0,4898	0,9811	0,7586
velké pop.								
ZC			0,2171	0,0021	0,1889	0,004	0,4919	0,3690
JM			0,9715	0,9910	0,9986	1,0000	0,0001	0,0001
VLT			0,4716	0,1396	0,352	0,0865	0,5451	0,1944
dohromady								
			0,9983	0,0085	0,9950	0,0201	0,9991	0,0039

4. Diskuze

Variabilita MHC lokusů v populaci bobra evropského byla ovlivňována střídavými vlivy selekce a driftu. Pomocí analýzy sekvencí a frekvence alel mnou studovaných genů jsme schopni nahlédnout do této dynamiky v různých časových oknech historie bobřích populací.

V období před nedávným bottleneckem byla diverzita MHC alel formována tlakem ze strany patogenů, případně i pohlavním výběrem a lze prokázat působení kombinace pozitivní a balancující selekce, jak je obvyklé u MHC naprosté většiny obratlovců (Piertney & Oliver, 2006). Vzácnou výjimkou z tohoto pravidla může být například absence známek pozitivní selekce na MHC I u sviště horského (Kuduk *et al.*, 2012).

V nedávné doběšlo k výraznému poklesu velikosti populací bobrů a druh jen těsně unikl vyhynutí (Nolet & Rosell, 1998). Během tohoto bottlenecku byl hlavním faktorem určujícím variabilitu MHC genů genetický drift. Nutno však podotknout, že v některých případech může balancující selekce působit i během bottlenecku a udržet tak v genofondu určitou variabilitu (Marmesat *et al.*, 2017; Hurt *et al.*, 2019). Obecně ale počet MHC alel klesá ještě rychleji než u neutrálních markerů (Sutton *et al.*, 2011).

V současné době žije po světě přes jeden a půl milionu bobrů a populace dále rostou (Halley *et al.*, 2020). Lze tedy předpokládat, že na MHC bude opět mít stěžejní vliv selekce. Prostor pro selekci se může projevit i poměrně rychle po prodělaném bottlenecku. Data z populací lindušky kanárské (*Anthus berthelotii*) například ukázala, že genetická variabilita může být po bottlenecku rychle obnovena díky genové konverzi (Spurgin *et al.*, 2011). Nicméně u bobrů toto nemůžeme v takové míře očekávat, za prvé nemá duplikované MHC lokusy a za druhé od nárůstu jeho populací uběhl mnohem kratší čas. Jiný mechanismus nacházíme u orla mořského (*Haliaeetus albicilla*), jenž si také prošel snížením populace, navíc v podobné době jako bobr a jeho počty také v poslední době narostly. Populace orla si však zachovaly poměrně vysokou diverzitu na neutrálních markerech i MHC, bohužel však probíhající selekce u tohoto druhu nebyla zkoumána (Minias *et al.*, 2019). Bohužel není mnoho druhů, které by po výrazném snížení velikosti populace prožily tak fenomenálně rychlý návrat jako bobr, proto nemáme pro náš model dostatek možností porovnání. V některých ohledech můžeme nalézt podobnost s biologickými invazemi – tam také geneticky ochuzené populace rychle expandují. Na rozdíl od invazí ale bobr reexpanduje ve svém přirozeném areálu, v rámci nějž dlouhou dobu probíhala koevoluce mezi ním a zbytkem bioty. Příkladem invazního druhu může být mýval severní v Evropě. V jeho populaci v Německu byl i přes nižší genetickou diverzitu potvrzen probíhající přírodní i pohlavní výběr působící na MHC (Santos *et al.*, 2017, 2018; Biedrzycka *et al.*, 2020a, 2020b).

4.1. Selekcce v minulosti

Sekvence DRB bobra evropského nesou jasné známky působení pozitivní i balancující selekce v minulosti. Díky novým primerům jsem byl schopen amplifikovat celý druhý exon genu DRB. Oproti Babikovi *et al.* (2005) jsem tak v genofondu bobra evropského našel devět dalších polymorfních

nukleotidových pozic (plus další dvě v intronu), jež dávají vznik pěti polymorfním pozicím aminokyselin. Nově osekvenovaná část exonu také obsahovala sedm ABS, důležitých pro studium MHC genů. Při PCR s našimi primery jsem nezaznamenal amplifikaci pseudogenů publikovaných Babikem *et al.* (2005). V každém vzorku byly nalezeny maximálně dvě alely, lze tedy potvrdit již dříve předpovězenou absenci duplikací na genu DRB. Stejnou situaci naznačují i publikovaná genomická data bobra kanadského (Lok *et al.*, 2017).

Pozitivní a balancující selekce způsobují protichůdné hodnoty některých statistik používaných k testům selekce, bylo tedy třeba být obezřetný při výběru testů a jejich interpretaci. Pozitivní selekci prokázal vysoký poměr nesynonymních mutací. Podobný test dělali již Babik *et al.* (2005), avšak já jsem dataset doplnil prodloužením sekvencí a přidáním nově nalezených alel. Moje závěry se shodovaly s jejich, včetně stěžejní role ABS, míst, jež nejvíce ovlivňují afinitu MHC glykoproteinů ke konkrétním antigenům. O významu ABS svědčí také to, že všechny nalezené kodony pod vlivem pozitivní selekce beze zbytku patřily mezi ABS, přestože ty tvoří jen něco přes 20 procent celkové velikosti exonu. Stěžejní role ABS v pozitivní selekci byla potvrzena z populací mnoha různých druhů obratlovců, včetně těch, jež prošly nedávným výrazným bottleneckem (Radwan *et al.*, 2007; Biedrzycka & Radwan, 2008; Zhai *et al.*, 2017; Minias *et al.*, 2019).

Balancující selekce, způsobující dlouhé přetrvávání alel v genofondu, se může projevit například abnormálně vysokým počtem nesynonymních polymorfismů sdílených sesterskými druhy (Fijarczyk & Babik, 2015). U dvou druhů křečků rodu *Peromyscus* například nebyly nalezeny žádné fixované rozdíly na MHC lokusu DQA (MacManes & Lacey, 2012). Velký podíl nesynonymních substitucí sdílených napříč druhy byl nalezen i u jelčků (*Rhinichthys* spp.) (Girard & Angers, 2011). Moje data jsou s tímto trendem v souladu, kdy téměř 80 procent všech substitucí tvořily právě nesynonymní polymorfismy. MK test vyšel těsně nesignifikantní s největší pravděpodobností kvůli malému počtu alel a hlavně nízkému počtu mutací fixovaných mezi oběma sesterskými druhy. Právě nízká divergence mezi příbuznými druhy je dalším typickým projevem balancující selekce a může vést k nesouladu fylogenetických stromů taxonů a genů pod vlivem této selekce. Extrémním, avšak nikoli vzácným projevem je pak mezidruhový polymorfismus způsobený dlouhým přetrváváním alel (Klein *et al.*, 1998). Sdílení identických alel díky balancující selekci je známo například od kamzíků (*Rupicapra* spp.) (Cavallero *et al.*, 2012) nebo od zubra a bizona (*Bison bonasus* a *B. bison*) (Radwan *et al.*, 2007). U dalších druhů je popsáno sdílení identických alel díky introgresi, jedná se třeba o kozorožce a kozy (*Capra* spp.) (Angelone *et al.*, 2018), čolky (Dudek *et al.*, 2019) nebo o ještěrky (Sagonas *et al.*, 2019).

Podobné případy můžeme najít i v našich fylogenetických stromech a sítích. Sekvence DRB bobra kanadského, ačkoli jsou i ve velmi krátkých osekvenovaných částech intronů jasně odlišitelné od sekvencí evropských bobrů, tvoří v analýze druhého exonu vnitřní klastr v rámci ostatních alel. To odkazuje na již výše zmíněnou nízkou míru divergence mezi sekvencemi obou druhů. V rámci alel bobra evropského pak nevidíme žádný jasný vzor, jaký je známý z mitochondriálních sekvencí, kde je zřetelné rozdělení na tzv. západní a východní větev podle refugií z období posledního glaciálního maxima. Také

jednotlivé mitochondriální haplotypy ze stejné reliktní populace jsou si obvykle blíže příbuzné (Durka *et al.*, 2005; Senn *et al.*, 2014). Samozřejmě je ale třeba brát v úvahu vyšší mutační rychlost mitochondriální DNA oproti jaderné. V rámci MHC jsou si naopak blíže příbuzné i některé sekvence z velmi vzdálených reliktních populací, například alely **bi** a **n2** z Mongolska, respektive z východní Evropy nebo **ga** a **pol** z Francie a ze západní Sibíře. Velmi podobnou situaci lze najít třeba v populaci normánů, kde také mitochondriální marker hezky odráží fylogeografickou historii druhu, zatímco MHC nikoli (Malé *et al.*, 2012). Nejzářnějším příkladem dlouhého přetrvávání alel je pak „mezipopulační polymorfismus“ v podobě alely **al**, jež jsem kromě německého refugia našel také ve východoevropské reliktní populaci v okolí Vitebsku. U jiných zvířat je sdílení alel mezi izolovanými populacemi samozřejmě naprosto běžné, u bobrů však jde o jedinečnou záležitost. Pouze v omezené míře sdílí své MHC alely britské a kontinentální populace veverka obecné (*Sciurus vulgaris*) (Ballingall *et al.*, 2016). Naopak například ostrovní populace skokana černoskvřného v Číně navzájem sdílejí velkou část alel (Wang *et al.*, 2017).

Lokus DRB byl tedy v minulosti pod vlivem kombinace pozitivní a balancující selekce, což je typickým jevem u MHC lokusů v přírodních populacích (Radwan *et al.*, 2020). Tuto situaci zjistili například Biedrzycka & Radwan (2008), Morenová-Santillánová *et al.* (2016) nebo Biedrzycka *et al.* (2020a). Proto očekáváme, že diverzita v genofondu bobra evropského byla dříve mnohem větší a nízký počet alel v současnosti je způsobený recentním bottleneckem. To je v souladu se zjištěními, že diverzita na MHC se během bottlenecku obecně snižuje stejně rychle, nebo dokonce ještě výrazněji, než je tomu u neutrálních markerů (Ejsmond & Radwan, 2011; Sutton *et al.*, 2011).

Situace u dalšího studovaného MHC lokusu, druhého exonu DQA, na první pohled potvrzuje naše závěry z genu DRB. Vzhledem k tomu, že všechny vzorky bobra kanadského nesou naprosto totožnou sekvenci, je ale zřejmé, že selekční tlaky působící na oba lokusy jsou dlouhodobě výrazně rozdílné. Bobr kanadský sice v devatenáctém století také prošel obdobím snížení velikosti populace, tento bottleneck se však neprojevil ve snížení genetické diverzity neutrálních markerů (Pelz-Serrano *et al.*, nepublikováno). Rozmístění tří alel DQA v rámci areálu (Obr.2) by odpovídalo jejich alternativní fixaci v glaciálních refugiích v západní Evropě a kdesi na východě, třetí alela by pak mohla náležet refugiu v deltě Dunaje, jehož mitochondriální DNA nemá zastoupení v současných populacích (Horn *et al.*, 2014). Tuto hypotézu by však bylo potřeba otestovat sekvenací starobylé DNA.

V bobřím genofondu DQA je poměrně vysoký poměr nesynonymních mutací, vzhledem k velmi malému počtu substitucí z toho však nelze vyvozovat žádné přesvědčivé závěry. I včetně alely bobra kanadského se zdá být sekvence v DQA dost konzervovaná, což je u obvykle hypervariabilních MHC genů, kde jsou často selekčně zvýhodněny nově vzniklé alely, jev vzácný a zajímavý. Jedním z možných vysvětlení by mohla být vysoká afinita k mimořádně častému patogenu. Každopádně je zřejmé, že konzervovaná sekvence DQA přináší svým nositelům výhodu a zřejmě zde přírodní výběr působí proti nově vznikajícím alelám. U sviště horského byl nalezen podobně kontrastní vzor, jednalo se zde však o rozdílné třídy MHC: Zatímco lokusy MHC II vykazovaly jasné známky historické

pozitivní selekce, u MHC I toto nebylo zjištěno (Kuduk *et al.*, 2012). Rozdílné mechanismy formování diverzity u MHC I a II byly nalezeny také u koljušky tříostné (*Gasterosteus aculeatus*), kde se u MHC II často vyskytovala rekombinace mezi jednotlivými lokusy, zatímco u MHC I nikoli (Schaschl & Wegner, 2007). Velmi podobný vzor jako bobří MHC lokusy vykazovaly geny MHC I u rákosníka proužkovaného, u kterého byly na některých lokusech nalezeny známky pozitivní selekce, zatímco jiné byly pod vlivem negativního výběru (Biedrzycka *et al.*, 2017). Lokus DQA vykazoval u hryzce vodního známky mnohem silnější probíhající selekce než DRB (Bryja *et al.*, 2007) U volně žijících populací poddruhů myši domácí působí na oba homology genů DRB a DQA (tam nazývané H-2Eb a H-2Aa) rozdílné selekční tlaky – DQA je pod vlivem silné pozitivní selekce, zatímco alely DRB perzistují v genofondu po mnohem delší dobu (Čížková *et al.*, 2011). Je zajímavé, že situace na těchto dvou lokusech je tedy u bobra a myši přesně opačná.

V minulosti byl tedy každý MHC lokus vystaven naprosto rozdílným selekčním tlakům. V nedávné době měl však na formování genetické variability naprosto zásadní vliv genetický drift v důsledku dramatického snížení velikosti a kontaktu bobřích populací. Tento bottleneck se odrazil samozřejmě také ve snížení diverzity alel MHC.

4.2. Vliv bottlenecku na variabilitu bobřích MHC genů

Jasně jsem potvrdil nízkou variabilitu na MHC lokusu DRB. Poprvé zde byly sekvenovány MHC lokusy vzorků pocházejících ze dvou východoevropských reliktních populací (Bělorusko a Voroněž, *C. f. belorussicus* a *C. f. orientoeuropaeus*). Předchozí studie (Babik *et al.*, 2005) použila vzorky z polských populací admixovaných z těchto dvou refugií. Jedinou publikovanou východoevropskou alelu **sp** jsem našel ve všech východoevropských lokalitách, nikde však nebyla moc častá.

Vzorky z východní Evropy se na základě jaderných mikrosatelitových a mitochondriálních markerů dají rozdělit do tří skupin: voroněžská reliktní populace a populace v okolí Minsku a v okolí Vitebsku. Poslední dvě se tradičně řadí do jedné běloruské reliktní populace, tamní refugium však nejspíš bylo poměrně komplexní a sestávalo minimálně z dvou navzájem oddělených subpopulací (Albrechtová, 2011). Na MHC lokusu DRB je situace odlišná a jednotlivé východoevropské populace se liší pouze frekvencí, nikoli přítomností alel.

I přes popsání dvou nových alel platí, že diverzita na lokusu DRB je velmi nízká v porovnání s obvyklou situací na MHC genech jiných druhů. Hned v pěti reliktních populacích je fixována pouze jediná alela (Německo, Norsko, Francie, Tuva, Mongolsko). Nejvíce polymorfní ze všech reliktních populací je se čtyřmi udávanými alelami populace ze západní Sibíře (*C. f. pohlei*). To je v souladu s předpokladem, že zde během vrcholu bottlenecku v 19. století přežilo nejvíce bobrů ze všech osmi reliktních populací (Halley & Rosell, 2003). Jako druhá nejpočetnější populace během vrcholu bottlenecku je udáváno běloruské refugium, kde jsem také našel hned několik alel. Intenzita bottlenecku tedy zhruba odpovídá míře snížení variability na MHC.

Na rozsáhlém území – od Francie po Mongolsko – zde tedy máme velmi malý počet MHC alel. To je jev velmi neobvyklý, protože i na malém území se u jiných druhů běžně nachází i desítky alel. Skoro čtyřicet alel bylo nalezeno u jiného hlodavce, myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) (Musolf *et al.*, 2004). U normika rudého bylo na genu DRB v severovýchodním Polsku nalezeno hned 58 funkčních alel (Kloch *et al.*, 2010). Několik desítek MHC alel je běžně nalézáno v jednotlivých populacích dalšího velkého evropského savce, vlka obecného (*Canis lupus*) (Hindrikson *et al.*, 2017). Na vině takto výrazného snížení variability u bobrů je zajisté nedávný bottleneck, jenž běžně snižuje genetickou diverzitu (Radwan *et al.*, 2010). Často během bottlenecku klesá variabilita dokonce ještě rychleji na MHC než na neutrálních markerech (Ejmond & Radwan, 2011; Sutton *et al.*, 2011). Redukce variability MHC u bobrů je však enormní. Kupříkladu evropská populace mývalů je v důsledku efektu zakladatele také geneticky ochuzena, pořád však na DRB nese skoro tři desítky alel (Biedrzycka *et al.*, 2020a). I populace orla mořského v severním Polsku, která také prošla nedávným výrazným snížením velikosti, obsahuje více MHC alel než světová bobří populace (Minias *et al.*, 2019).

Proto je zvláštní, že bobří v posledních letech rychle expandovali a znovu osídlili mnohá území, kde vyhynuli často i před více než dvěma sty lety (Halley *et al.*, 2020). V těchto nově vzniklých populacích se pak často kříží bobří s rozličným původem. Bylo tedy zajímavé vyšetřit osud MHC alel v takovýchto populacích.

4.3. MHC geny v admixovaných populacích

Ukázalo se, že pro bobry je výhodné nést co nejvíce divergentní alely DRB. Tzv. „divergent allele advantage“ (DAA) byla nejvíce zřetelná, pokud jsem simulace prováděl pouze na základě dat z heterozygotů. Zahnutí homozygotů do simulací s sebou nese riziko falešně pozitivních výsledků v případě jejich nadbytku v populaci. Na druhou stranu existuje také zvýšené riziko falešně negativních výsledků při malém počtu heterozygotů v důsledku vnitřní struktury populací (tzv. Wahlundův efekt) (Talarico *et al.*, 2019). To byl zcela jistě i náš případ při testech všech vzorků dohromady a riziko existuje i při testování západočeské populace, jejíž vzorky pochází ze širokého území. Zdá se, že výsledky jsou přesvědčivější při použití pouze ABS, což je v dobré shodě s konceptem DAA. Tato speciální varianta selekce ve prospěch heterozygotů předpokládá, že imunitní systém nositelů rozdílnějších alel bude rozpoznávat širší spektrum patogenů (Wakeland *et al.*, 1990). (Dalším uplatňovaným mechanismem může být pohlavní výběr.) DAA je v přírodních populacích méně často studovaným jevem a výsledky nejsou jednoznačné. DAA byla recentně prokázána v lidských populacích (Pierini & Lenz, 2018), u čolků (Talarico *et al.*, 2019) a již dříve u krysa (*Leopoldamys sabanus*) a lachtanů (*Zalophus wollebaeki*) (Lenz *et al.*, 2009, 2013), naopak nebyla nalezena u sovy pálené, kde se zdá, že by selekce mohla spíše optimalizovat než maximalizovat divergenci alel (Gaigher *et al.*, 2018). Data ze soví populace také ukazují, že efekty spojené s MHC mohou být slabé a je třeba pracovat s velkými vzorky (Gaigher *et al.*, 2019). Určitě je tedy zapotřebí další výzkum v této oblasti.

Je zvláštní, že přes prokázanou DAA nebyl v populaci nalezen nadbytek heterozygotů. Jedním z možných vysvětlení může být nedostatečná prokříženost uvnitř populací, to se však na základě mikrosatelitových markerů nezdá být pravděpodobné. Další variantou by mohla být vnitřní struktura populace, jež by nebyla nalezena našimi neutrálními markery. Kvůli recentnímu bottlenecku a jistě i efektu zakladatele při reintrodukcích je variabilita na mikrosatelitových lokusech velmi nízká a tento omezený set markerů nám tak dává pouze hrubou představu. S nízkou diverzitou na neutrálních markerech může být spojeno také nenalezení „isolation by distance“ (IBD) jak u MHC lokusů, tak také na mikrosatelitových markerech.

Ukazuje se, že při studiu MHC genů v přírodních populacích hraje důležitou roli škálování. Rozdíly mezi velkými populacemi jsou obvykle na MHC menší než na neutrálních markerech. Při jemnějším rozdělení se ovšem mezi malými populacemi často objeví výraznější rozdíly v MHC. Při jemném škálování tedy vidíme lokální adaptace a působení spíše pozitivní selekce. Na hrubších škálách pak pozorujeme účinky balancující selekce, jež je zde zřejmě důsledkem změn směru selekce v čase a prostoru (např. Rico *et al.*, 2015; Talarico *et al.*, 2019). Kromě populací volně žijících živočichů byl tento jev recentně popsán i z lidských populací díky datům z projektu 1000 Genomes (The 1000 Genomes Project Consortium, 2015; Brandt *et al.*, 2018). Situace u vrbců je ale naprosto opačná a MHC ukazuje výraznější strukturu populací než mikrosatelitové markery (Loiseau *et al.*, 2009) Dle výsledků AMOVA i analýzy F_{ST} outliers se bobří MHC lokusy chovají podobně jako neutrální markery. Nenašli jsme zde tedy ani známky lokálních adaptací, ani známky selekce, jež by stírala rozdíly mezi populacemi způsobené driftem. Většinou přitom AMOVA u MHC a neutrálních markerů vychází v publikovaných studiích velmi rozdílně (Biedrzycka & Radwan, 2008; Herdegen *et al.*, 2014; Rico *et al.*, 2015; Talarico *et al.*, 2019).

To, že frekvence alel a genotypů napříč jednotlivými českými populacemi neukázaly žádnou odchylku od chování neutrálních markerů, by mimo jiné mohlo být způsobeno také nízkým tlakem ze strany patogenů. Tento důvod by byl také v souladu s tím, že bobří populace i přes velmi nízkou variabilitu dokázala expandovat tak rychle, že během sta let zhruba tisíckrát znásobila svou velikost (Halley *et al.*, 2020). Pilotní pokusy provedené týmem doc. Jana Votýpky neodhalily v našich vzorcích žádnou DNA krevních parazitů. Většina publikovaných parazitologických studií z bobřích populací se zabývá střevními parazity, případně ektoparazity. Byť jsou někdy nalezené prevalence vysoké, bylo u bobrů popsáno jen málo druhů parazitů. Výjimkou jsou pouze roztoči rodu *Schizocarpus*, jichž bylo popsáno u bobra evropského velké množství druhů (nalezené i potenciální bobří endoparazity shrnuje Girling *et al.* (2019), seznam členovců parazitujících na bobrech uvádí Izdebska *et al.* (2016)). Velmi podrobná recentní studie nově vzniklých populací ve Velké Británii našla poměrně nízké prevalence parazitů i bakterií, kteří nejspíš neměli významný vliv na fyzickou kondici svých hostitelů (Campbell-Palmer *et al.*, 2021). V Česku byly publikovány parazitologické studie pouze s velmi malým vzorkem vyšetřených bobrů a našly pouze u bobrů velmi často udávanou motolici *Stichorchis subtriquetrus*

(Koubková *et al.*, 2002; Máca *et al.*, 2015). Dále byla nalezena poměrně vysoká prevalence protilátek proti prvoku *Neospora caninum* (Sedlák *et al.*, 2018).

Kromě přírodního výběru může být diverzita MHC genů formována také výběrem pohlavním. Mechanismem pohlavního výběru pak často bývá asortativní párování (Milinski, 2006). Pozitivně asortativní párování může být vysvětlením cytonukleární nerovnováhy mezi mitochondriálním markerem CR a MHC lokusem DRB. MHC proteiny dokážou ovlivnit pach svého nositele různými mechanismy, které zahrnují třeba přímé vnímání MHC proteinů nebo rozdíly v mikrobiomu na základě MHC (Penn & Potts, 1998). Je dokázáno, že bobří reagují s rozdílnou intenzitou na pachové značky („scent marks“) jedinců ze stejné a z cizí reliktní populace (Rosell & Steifetten, 2004). Bylo dokonce zjištěno, že i cvičení psi dokážou rozeznat jednotlivé bobry podle výměšků análních žláz, které bobří používají při tvorbě pachových značek (Rosell *et al.*, 2020). Pachové značky bobří používají ke značení hranice obývaného území a jejich počet je nejvyšší na jaře, kdy si subadultní jedinci hledají nová teritoria (Rosell *et al.*, 1998). Pokusy ukázaly, že přítomnost výměšku análních žláz v bobry neosídleném potoce zvyšuje frekvenci bobřích návštěv (Vorel *et al.*, 2020). Je tedy vysoce pravděpodobné, že při párování bobrů hrají chemické signály velkou roli.

Cytonukleární nerovnováha může být také pozůstatek původu reintrodukovaných bobrů z různých reliktních populací, kde jsou fixovány rozdílné MHC alely a mitochondriální haplotypy („ancestral linkage disequilibrium“). To je však v rozporu s vysokou nalezenou mírou prokříženosti v českých admixovaných populacích. Mimo to bychom v takovém případě měli zaznamenat i vazbu mezi mikrosatelitovými markery.

Kříženci geneticky vzdálených linií mohou mít sníženou fitness v důsledku nekompatibility mitochondriálního a nukleárního genomu (Burton *et al.*, 2013). Experiment s klanonožci (Copepoda) ukázal, že vztahů mezi mitochondriálním a nukleárním genomem se účastní velké množství genů a bariéry mohou vznikat i mezi blízce příbuznými taxony (Pereira *et al.*, 2021). V hybridní zóně dvou poddruhů králíka divokého (*Oryctolagus cuniculus*) prostupuje mtDNA mezi oběma poddruhy v mnohem menší míře, než je tomu u autozomálních markerů (Carneiro *et al.*, 2013). Bizoni s introgresivní mtDNA ze skotu mají zase v průměru nižší hmotnost (Derr *et al.*, 2012). Cytonukleární nerovnováha v admixovaných bobřích populacích tedy může být třeba důsledkem nižší životaschopnosti hybridů s mitonukleárními inkompatibilitami.

V českých populacích jsem našel všechny alely DRB, jež lze očekávat na základě mikrosatelitových markerů, mitochondriálních haplotypů (Albrechtová, 2011; Munclinger *et al.*, in prep.) a také předpokládaného původu českých populací (Náhlovský, 2019). Nejsou zde přítomny pouze alely z asijských reliktních populací v Mongolsku, Tuvě a na západní Sibiři. Co se týče lokusu DQA, máme v Česku zastoupeny všechny tři alely. Je velmi nezvyklé, že reintrodukované populace vykazují vyšší genetickou variabilitu než populace zdrojové. Například invazivní populace mývalů v Evropě má mnohem nižší genetickou diverzitu než zdrojové americké populace (Biedrzycka *et al.*, 2020a), stejně tak reintrodukované populace rysa ostrovida (*Lynx lynx*) mají nižší genetickou diverzitu

než zdrojové populace (Bull *et al.*, 2016). Je to opět důkaz, že snížení variability v bobřích reliktních populacích bylo opravdu dramatické a i velmi málo jedinců z několika reliktních populací dá vzniknout nové populaci s vyšší genetickou diverzitou.

Hned pět alel DRB se vyskytuje v subpopulaci JSU, jež obsahuje hlavně vzorky z jižního Bavorska. Zde se nejspíše setkávali bobři pocházející z více reintrodukčních událostí uskutečněných v Bavorsku v druhé polovině minulého století (shrnuje Zahner, 1997), možný je také vliv reintrodukcí v Rakousku (Sieber & Bauer, 2001). Uvážíme-li postupné šíření západočeské populace z Bavorska přes Šumavu a Český les až do Prahy, pak vypadá zajímavě vysoká diverzita v subpopulaci PLZ okolo Plzně a na Berounce, kde se oproti potenciálním zdrojovým populacím RAD a SSU objevuje alela **sp**, jinak ze západočeské populace známá jen okrajově z jižního Bavorska. Vysvětlení tohoto zdánlivého paradoxu nám dává geografie, zdrojovými populacemi PLZ jsou potenciálně všechny čtyři řeky, jejichž soutokem vzniká Berounka (Mže, Radbuza, Úhlava, Úslava).

Tak trochu záhadou je přítomnost hned šesti alel DRB v dolnolavské populaci. Kromě v západočeské populaci velmi vzácné alely **fi** původem z Norska se zde vyskytuje i východoevropská alela **n2**, jinak známá pouze z jihomoravské populace. Dalo by se uvažovat o expanzi jihomoravské populace až do Prahy, tato možnost však není příliš pravděpodobná. Kolem soutoku Vltavy a Labe máme unikátní možnost sledovat čerstvě vzniklou kontaktní zónu mezi expandující labskou reliktní populací a admixovanou západočeskou populací. Z pohledu studia MHC je však velká škoda, že alela **al** se vyskytuje jak v labské, tak i v západočeské populaci, kde ovšem jistě pochází z běloruské reliktní populace.

4.4. Možná budoucí témata výzkumu

Tato diplomová práce ukázala mnoho potenciálních oblastí budoucího výzkumu. V blízké době plánujeme ověřit vztah MHC alel a fyzické kondice bobrů. Jako ukazatel fyzické kondice byla u bobrů již několikrát úspěšně použita kombinace tělesných měr reprezentujících ukládání tuku v ocasu (Parker *et al.*, 2017; Mortensen & Rosell, 2020). Dále se chceme zaměřit na analýzu disperze v bobřích populacích s přihlédnutím k možnému asortativnímu křížení. Vyšetříme rozdíly v disperzi mezi pohlavími, míru promíchání původních genomů z reliktních populací či detaily struktury nově založených populací. K tomuto účelu již nepostačí zavedený set mikrosatelitových markerů, hodláme využít celogenomové přístupy.

Rozdílnou vnímavost bobrů vůči pachům jedinců z různých reliktních populací by bylo zajímavé ověřit s přihlédnutím k alelám MHC. To by mohlo mnohé napovědět o možnosti pohlavního výběru na základě MHC. Zřejmě by nebylo obtížné modifikovat k tomuto účelu pokus Vorla *et al.* (2020) s výměškem análních žláz rozmíchaným v mýdle.

Jistě by nebyl od věci rozsáhlejší výzkum patogenů rozšířených v českých bobřích populacích. Z evropských bobřích populací jsou hlášeny i velmi nebezpeční parazité, jako je měchožil bublinatý, lamblie, svalovec (*Trichinella*) nebo bakterie způsobující tularémii, leptospirózu či yersiniózu (Girling *et al.*, 2019). V souvislosti s tím lze ověřit vztah mezi přítomností patogenů a nesenými alelami MHC. Výsledky takovéto studie by pak mohly být přínosem i při plánování reintrodukčních programů.

Bylo by přínosné prověřit variabilitu také na MHC první třídy, které jsem se zde nevěnoval. O ní máme pouze velmi kusé informace na základě studia alozymů (Ellegren *et al.*, 1993). Právě MHC I však může být důležité v obraně proti intracelulárním patogenům, jako je například původce tularémie *Francisella tularensis*. Lze také prověřit situaci u dalších genů, jejichž produkty se uplatňují v imunitě, například TLR. Jednotlivé reliktní populace bobrů byly delší dobu navzájem izolované, mohlo by tedy být zajímavé vyšetřit situaci u proteinů účastnících se molekulárních mechanismů oplození, o nichž je známo, že podléhají rychlé evoluci a společně s MHC mívají nejvyšší podíl nesynonymních mutací (Meslin *et al.*, 2012).

Jistě bude zajímavé sledovat nově vytvořenou kontaktní zónu mezi dvěma populacemi, jež se ustanovila nedaleko Prahy. Pro sledování chování MHC alel však nejsou stávající markery moc vhodné, jelikož všechny alely labské populace se nacházejí i v populaci ze západních Čech. Zde by tedy bylo nutné vyšetřit situaci u dalších MHC genů.

Naše práce tedy přinesla nová zjištění o chování MHC genů v přirozených populacích a o struktuře populací bobra evropského. Mnohé další otázky však zůstávají nezodpovězeny a bude potřeba dalšího výzkumu.

5. Stručné shrnutí

1. Lokus DRB byl u bobra evropského v minulosti pod vlivem pozitivní a balancující selekce. Pozitivní selekce se zde projevuje vysokým poměrem nesynonymních mutací, na balancující selekci ukazuje hlavně nízká divergence mezi sesterskými druhy a nesoulad fylogenetických stromů s historií druhu. Sekvence DQA jsou u obou druhů bobrů evolučně velmi konzervované a variabilita je zde extrémně nízká.
2. Nedávný bottleneck populací bobra evropského se odrazil ve výrazné redukci variability genu DRB. Je obdivuhodné, že i s takovýmto snížením genetické diverzity dokázali bobři znovu úspěšně expandovat.
3. V nově založených bobřích populacích působí na MHC geny přírodní výběr. Uplatňuje se zde DAA a našel jsem porušení cytonukleární rovnováhy, jež by mohlo ukazovat na asortativní křížení.

6. Seznam použité literatury

- Abi-Rached L, Jobin MJ, Kulkarni S, McWhinnie A, Dalva K, Gragert L, Babrzadeh F, Gharizadeh B, Luo M, Plummer FA, Kimani J, Carrington M, Middleton D, Rajalingam R, Beksac M, Marsh SGE, Maiers M, Guethlein LA, Tavoularis S, Little A-M, *et al.* (2011) The Shaping of Modern Human Immune Systems by Multiregional Admixture with Archaic Humans. *Science* **334**: 89-94
- Agbali M, Reichard M, Bryjová A, Bryja J & Smith C (2010) Mate choice for nonadditive genetic benefits correlate with MHC dissimilarity in the rose bitterling (*Rhodeus ocellatus*). *Evolution* **64**: 1683–1696
- Åhlen PA, Sjöberg G & Stéen M (2021) Parasitic fauna of Eurasian beavers (*Castor fiber*) in Sweden (1997–1998). *Acta Veterinaria Scandinavica* **63**: 23
- Albrechtová A (2011) Hybridní původ bobrů ve střední Evropě. Diplomová práce. Univerzita Karlova. Praha
- Angelone S, Jowers MJ, Molinar Min AR, Fandos P, Prieto P, Pasquetti M, Cano-Manuel FJ, Mentaberre G, Olvera JRL, Ráez-Bravo A, Espinosa J, Pérez JM, Soriguer RC, Rossi L & Granados JE (2018) Hidden MHC genetic diversity in the Iberian ibex (*Capra pyrenaica*). *BMC Genetics* **19**: 28
- Asmussen MA & Basten CJ (1994) Sampling theory for cytonuclear disequilibria. *Genetics* **128**: 1351-1363
- Asmussen MA & Basten CJ (1996) Constraints and normalized measures for cytonuclear disequilibria. *Heredity* **76**: 207–214
- Babik W (2010) Methods for MHC genotyping in non-model vertebrates. *Molecular Ecology Resources* **10**: 237–251
- Babik W, Durka W & Radwan J (2005) Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Molecular Ecology* **14**: 4249–4257
- Ballingall KT, McIntyre A, Lin Z, Timmerman N, Matthysen E, Lurz PWW, Melville L, Wallace A, Meredith AL, Romeo C, Wauters LA, Sainsbury AW & McInnes CJ (2016) Limited diversity associated with duplicated class II MHC-DRB genes in the red squirrel population in the United Kingdom compared with continental Europe. *Conservation Genetics* **17**: 1171–1182
- Basten CJ & Asmussen MA (1997) The exact test for cytonuclear disequilibria. *Genetics* **146**: 1165-1171
- Bateson ZW, Hammerly SC, Johnson JA, Morrow ME, Whittingham LA & Dunn PO (2016) Specific alleles at immune genes, rather than genome-wide heterozygosity, are related to immunity and survival in the critically endangered Attwater's prairie-chicken. *Molecular ecology* **25**: 4730-4744
- Bernatchez L & Landry C (2003) MHC studies in nonmodel vertebrates: what have we learned about natural selection in 15 years? *Journal of Evolutionary Biology* **16**: 363–377
- Biedrzycka A, Bielański W, Ćmiel A, Solarz W, Zając T, Migalska M, Sebastian A, Westerdahl H & Radwan J (2018) Blood parasites shape extreme major histocompatibility complex diversity in a migratory passerine. *Molecular Ecology* **27**: 2594–2603
- Biedrzycka A, Konior M, Babik W, Świsłocka M & Ratkiewicz M (2014) Admixture of two phylogeographic lineages of the Eurasian beaver in Poland. *Mammalian Biology* **79**: 287–296
- Biedrzycka A, Konopiński M, Hoffman E, Trujillo A & Zalewski A (2020a) Comparing raccoon major histocompatibility complex diversity in native and introduced ranges: Evidence for the importance of functional immune diversity for adaptation and survival in novel environments. *Evolutionary Applications* **13**: 752–767
- Biedrzycka A, O'Connor E, Sebastian A, Migalska M, Radwan J, Zając T, Bielański W, Solarz W, Ćmiel A & Westerdahl H (2017) Extreme MHC class I diversity in the sedge warbler (*Acrocephalus schoenobaenus*); Selection patterns and allelic divergence suggest that different

- genes have different functions. *BMC Evolutionary Biology* **17**: 159
- Biedrzycka A, Popiołek M & Zalewski A (2020b) Host-parasite interactions in non-native invasive species are dependent on the levels of standing genetic variation at the immune locus. *BMC Evolutionary Biology* **20**: 43
- Biedrzycka A & Radwan J (2008) Population fragmentation and major histocompatibility complex variation in the spotted suslik, *Spermophilus suslicus*. *Molecular Ecology* **17**: 4801–4811
- Bochkov A V (2012) *Schizocarpus saveljevi* sp. nov. (Acariformes: Chirodiscidae) parasiting the Eurasian beaver – *Castor fiber* Linnaeus, 1758 (Rodentia: Castoridae) from Leningrad province (Russia). *Proceedings of the Zoological Institute RAS* **316**: 166–171
- Bochkov A V & Dubinina H V. (2011) Mites of the genus *Schizocarpus* (Acariformes: Chirodiscidae) parasitizing the Eurasian beaver *Castor fiber* (Rodentia: Castoridae) in the Voronezh National Reserve. *Acarina* **19**: 53–66
- Bochkov A V, Labrzycka A, Skoracki M & Saveljev AP (2012) Fur mites of the genus *Schizocarpus* Trouessart (Acari: Chirodiscidae) parasitizing the Eurasian beaver *Castor fiber belorusicus* Lavrov (Rodentia: Castoridae) in NE Poland (Suwalki). *Zootaxa* **3162**: 39–59
- Bochkov A V & Saveljev AP (2012) Fur mites of the genus *Schizocarpus* Trouessart (Acari: Chirodiscidae) from the Eurasian beaver *Castor fiber tuvinicus* Lavrov (Rodentia: Castoridae) in the Azas River (Tuva Republic, Russia). *Zootaxa* **3410**: 1–18
- Borghans JAM, Beltman JB & De Boer RJ (2004) MHC polymorphism under host-pathogen coevolution. *Immunogenetics* **55**: 732–739
- Brambilla A, Keller L, Bassano B & Grossen C (2018) Heterozygosity–fitness correlation at the major histocompatibility complex despite low variation in Alpine ibex (*Capra ibex*). *Evolutionary Applications* **11**: 631–644
- Brandt DYC, César J, Goudet J & Meyer D (2018) The effect of balancing selection on population differentiation: A study with HLA genes. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **8**: 2805–2815
- Brown JH, Jardetzky TS, Gorga JC, Stern LJ, Urban RG, Strominger JL & Wiley DC (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1. *Nature* **364**: 33–39
- Bryja J, Charbonnel N, Berthier K, Galan M & Cosson JF (2007) Density-related changes in selection pattern for major histocompatibility complex genes in fluctuating populations of voles. *Molecular Ecology* **16**: 5084–5097
- Bull JK, Heurich M, Saveljev AP, Schmidt K, Fickel J & Förster DW (2016) The effect of reintroductions on the genetic variability in Eurasian lynx populations: the cases of Bohemian-Bavarian and Vosges-Palatinian populations. *Conservation Genetics* **17**: 1229–1234
- Burton RS, Pereira RJ & Barreto FS (2013) Cytonuclear genomic interactions and hybrid breakdown. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **44**: 281–302
- Bystrianska J, Papajová I, Šmiga L, Šoltys J, Majláthová V, Majláth I, Gomboš F & Kleban J (2021) First report on parasites of European beavers in the Slovak Republic. *Parasitology Research* **120**: 355–358
- Campbell-Palmer R, Del Pozo J, Gottstein B, Girling S, Cracknell J, Schwab G, Rosell F & Pizzi R (2015) *Echinococcus multilocularis* Detection in Live Eurasian Beavers (*Castor fiber*) Using a Combination of Laparoscopy and Abdominal Ultrasound under Field Conditions. *PLOS ONE* **10**: e0130842
- Campbell-Palmer R, Rosell F, Naylor A, Cole G, Mota S, Brown D, Fraser M, Pizzi R, Elliott M, Wilson K, Gaywood M & Girling S (2021) Eurasian beaver (*Castor fiber*) health surveillance in Britain: Assessing a disjunctive reintroduced population. *Veterinary Record* **188**: e84
- Carneiro M, Baird SJE, Afonso S, Ramirez E, Tarroso P, Teotônio H, Villafuerte R, Nachman MW & Ferrand N (2013) Steep clines within a highly permeable genome across a hybrid zone between

- two subspecies of the European rabbit. *Molecular Ecology* **22**: 2511–2525
- Castro-Prieto A, Wachter B & Sommer S (2011) Cheetah Paradigm Revisited: MHC Diversity in the World's Largest Free-Ranging Population. *Molecular Biology and Evolution* **28**: 1455–1468
- Cavallero S, Marco I, Lavín S, D'Amelio S & López-Olvera JR (2012) Polymorphisms at MHC class II DRB1 exon 2 locus in Pyrenean chamois (*Rupicapra pyrenaica pyrenaica*). *Infection, Genetics and Evolution* **12**: 1020–1026
- Charlesworth B, Nordborg M & Charlesworth D (1997) The effects of local selection, balanced polymorphism and background selection on equilibrium patterns of genetic diversity in subdivided populations. *Genetical Research* **70**: 155–174
- Čížková D, Gouy de Bellocq J, Baird SJE, Piálek J & Bryja J (2011) Genetic structure and contrasting selection pattern at two major histocompatibility complex genes in wild house mouse populations. *Heredity* **106**: 727–740
- Demiaszkiewicz AW, Lachowicz J, Kuligowska I, Pyziel AM, Bełżecki G, Miltko R, Kowalik B, Gogola W & Giżejowski Z (2014) Endoparasites of the European beaver (*Castor fiber* L. 1758) in north-eastern Poland. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **58**: 223–227
- Derr JN, Hedrick PW, Halbert ND, Plough L, Dobson LK, King J, Duncan C, Hunter DL, Cohen ND & Hedgecock D (2012) Phenotypic Effects of Cattle Mitochondrial DNA in American Bison. *Conservation Biology* **26**: 1130–1136
- Drózd J, Demiaszkiewicz AW & Lachowicz J (2004) Endoparasites of the beaver *Castor fiber* (L.) in northeast Poland. *Helminthologia* **41**: 99–101
- Ducroz J-F, Stubbe M, Saveljev AP, Heidecke D, Samjaa R, Ulevičius A, Stubbe A & Durka W (2005) Genetic variation and population structure of the Eurasian beaver (*Castor fiber*) in eastern Europe and Asia. *Journal of Mammalogy* **86**: 1059–1067
- Dudek K, Gaczorek TS, Zieliński P & Babik W (2019) Massive introgression of major histocompatibility complex (MHC) genes in newt hybrid zones. *Molecular Ecology* **28**: 4798–4810
- Duff AG, Campbell-Palmer R & Needham R (2013) The beaver beetle *Platypsyllus castoris* Ritsema (Leiodidae: Platypsyllinae) apparently established on reintroduced beavers in Scotland, new to Britain. *The Coleopterist* **22**: 9
- Durka W, Babik W, Ducroz JF, Heidecke D, Rosell F, Samjaa R, P. Saveljev A, Stubbe A, Ulevičius A & Stubbe M (2005) Mitochondrial phylogeography of the Eurasian beaver *Castor fiber* L. *Molecular Ecology* **14**: 3843–3856
- Egea R, Casillas S & Barbadilla A (2008) Standard and generalized McDonald-Kreitman test: a website to detect selection by comparing different classes of DNA sites. *Nucleic acids research* **36**: 157-162
- Eizaguirre C & Lenz TL (2010) Major histocompatibility complex polymorphism: Dynamics and consequences of parasite-mediated local adaptation in fishes. *Journal of Fish Biology* **77**: 2023-2047
- Ejzmond MJ & Radwan J (2011) MHC diversity in bottlenecked populations: A simulation model. *Conservation Genetics* **12**: 129–137
- Ejzmond MJ & Radwan J (2015) Red Queen Processes Drive Positive Selection on Major Histocompatibility Complex (MHC) Genes. *PLOS Computational Biology* **11**: e1004627
- Ellegren H, Hartman G, Johansson M & Andersson L (1993) Major histocompatibility complex monomorphism and low levels of DNA fingerprinting variability in a reintroduced and rapidly expanding population of beavers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **90**: 8150-8153
- Ernst M, Putnová L, Štohl R & Matoušková J (2017) Comparison of Czech and Latvian Beaver Population by Microsatellite Analysis and Genetic Differences between *Castor fiber* and *Castor canadensis*. *Transylvanian Review* **25**: 5339–5349
- Excoffier L & Lischer HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform

- population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* **10**: 564-567
- Faure G, Ogurtsov AY, Shabalina SA & Koonin E V (2017) Adaptation of mRNA structure to control protein folding. *RNA Biology* **14**: 1649–1654
- Fijarczyk A & Babik W (2015) Detecting balancing selection in genomes: limits and prospects. *Molecular Ecology* **24**: 3529–3545
- Fijarczyk A, Dudek K, Niedzicka M & Babik W (2018) Balancing selection and introgression of new immune-response genes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **285**: 20180819
- Flot JF (2010) Seqphase: A web tool for interconverting phase input/output files and fasta sequence alignments. *Molecular Ecology Resources* **10**: 162–166
- Foll M & Gaggiotti O (2008) A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: A Bayesian perspective. *Genetics* **180**: 977–993
- Frosch C, Kraus RHS, Angst C, Allgöwer R, Michaux J, Teubner J & Nowak C (2014) The genetic legacy of multiple beaver reintroductions in central Europe. *PLoS ONE* **9**: e97619
- Gagnon M, Yannic G, Boyer F & Côté SD (2020) Adult survival in migratory caribou is negatively associated with MHC functional diversity. *Heredity* **125**: 290–303
- Gaigher A, Burri R, San-Jose LM, Roulin A & Fumagalli L (2019) Lack of statistical power as a major limitation in understanding MHC-mediated immunocompetence in wild vertebrate populations. *Molecular Ecology* **28**: 5115–5132
- Gaigher A, Roulin A, Gharib WH, Taberlet P, Burri R & Fumagalli L (2018) Lack of evidence for selection favouring MHC haplotypes that combine high functional diversity. *Heredity* **120**: 396-406
- Girard P & Angers B (2011) The Functional gene diversity in natural populations over postglacial areas: The shaping mechanisms behind genetic composition of longnose dace (*Rhinichthys cataractae*) in northeastern North America. *Journal of Molecular Evolution* **73**: 45–57
- Girling SJ, Naylor A, Fraser M & Campbell-Palmer R (2019) Reintroducing beavers *Castor fiber* to Britain: a disease risk analysis. *Mammal Review* **49**: 300–323
- Goodman G, Girling S, Pizzi R, Meredith A, Rosell F & Campbell-Palmer R (2012) Establishment of a health surveillance program for reintroduction of the Eurasian beaver (*Castor fiber*) into Scotland. *Journal of Wildlife Diseases* **48**: 971–978
- Goodman G, Meredith AL, Girling SJ, Rosell F & Campbell-Palmer R (2017) Outcomes of a ‘One Health’ Monitoring Approach to a Five-Year Beaver (*Castor fiber*) Reintroduction Trial in Scotland. *EcoHealth* **14**: 139–143
- Goüy De Bellocq J, Charbonnel N & Morand S (2008) Coevolutionary relationship between helminth diversity and MHC class II polymorphism in rodents. *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 1144-1150
- Halley DJ & Rosell F (2002) The beaver’s reconquest of Eurasia: Status, population development and management of a conservation success. *Mammal Review* **32**: 153–178
- Halley DJ & Rosell F (2003) Population and distribution of European beavers (*Castor fiber*). *Lutra* **46**: 91–101
- Halley DJ, Rosell F & Saveljev AP (2012) Population and Distribution of *Castor fiber*. *Baltic Forestry* **18**: 168–175
- Halley DJ, Saveljev AP & Rosell F (2020) Population and distribution of beavers *Castor fiber* and *Castor canadensis* in Eurasia. *Mammal Review* **51**: 1–24
- Hedrick PW (2013) Adaptive introgression in animals: Examples and comparison to new mutation and standing variation as sources of adaptive variation. *Molecular Ecology* **22**: 4606–4618
- Heitman TL, Frederick LM, Viste JR, Guselle NJ, Morgan UM, Thompson RCA & Olson ME (2002) Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated

- from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology* **48**: 530–541
- Herdegen M, Babik W & Radwan J (2014) Selective pressures on MHC class II genes in the guppy (*Poecilia reticulata*) as inferred by hierarchical analysis of population structure. *Journal of Evolutionary Biology* **27**: 2347–2359
- Hindrikson M, Remm J, Pilot M, Godinho R, Stronen AV, Baltrūnaitė L, Czarnomska SD, Leonard JA, Randi E, Nowak C, Åkesson M, López-Bao JV, Álvares F, Llana L, Echegaray J, Vilà C, Ozolins J, Rungis D, Aspi J, Paule L, *et al.* (2017) Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. *Biological Reviews* **92**: 1601–1629
- Horn S, Durka W, Wolf R, Ermala A, Stubbe A, Stubbe M & Hofreiter M (2011) Mitochondrial Genomes Reveal Slow Rates of Molecular Evolution and the Timing of Speciation in Beavers (*Castor*), One of the Largest Rodent Species. *PLoS ONE* **6**: e14622
- Horn S, Prost S, Stiller M, Makowiecki D, Kuznetsova T, Benecke N, Pucher E, Hufthammer AK, Schouwenburg C, Shapiro B & Hofreiter M (2014) Ancient mitochondrial DNA and the genetic history of Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Europe. *Molecular Ecology* **23**: 1717–1729
- Horn S, Teubner J, Teubner J & Heidecke D (2010) Mitochondrial DNA of beavers (*Castor*) in Germany. *Artenschutzreport* **26**: 72–78
- Hurt C, Ellis N, Harman A & Savage C (2019) Genetic Structure at the Major Histocompatibility Complex in the Endangered Barrens Topminnow (*Fundulus julisia*). *Southeastern Naturalist* **18**: 19–36
- Iso-Touru T, Huitu O, Tapio M, Kučinskienė J, Ulevičius A, Bukelskis E, Tirronen K, Fyodorov F, Panchenko D, Saarna U, Valdmann H & Kauhala K (2020) Low genetic polymorphism in the re-introduced Eurasian beaver (*Castor fiber*) population in Finland: implications for conservation. *Mammal Research* **65**: 331–338
- Ivy-Israel NMD, Moore CE, Schwartz TS, Steury TD, Zohdy S, Newbolt CH & Ditchkoff SS (2021) Association between sexually selected traits and allelic distance in two unlinked MHC II loci in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Evolutionary Ecology* **35**: 513–535
- Izdebska J, Fryderyk S & Rolbiecki L (2016) *Demodex castoris* sp. nov. (Acari: Demodecidae) parasitizing *Castor fiber* (Rodentia), and other parasitic arthropods associated with *Castor* spp. *Diseases of Aquatic Organisms* **118**: 1–10
- Janovsky M, Bacciarini L, Sager H, Gröne A & Gottstein B (2002) *Echinococcus multilocularis* in a European beaver from Switzerland. *Journal of Wildlife Diseases* **38**: 618–620
- Kamiya T, O'Dwyer K, Westerdahl H, Senior A & Nakagawa S (2014) A quantitative review of MHC-based mating preference: the role of diversity and dissimilarity. *Molecular Ecology* **23**: 5151–5163
- Klein J, Sato A, Nagl S & O'Huigin C (1998) Molecular trans-species polymorphism. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**: 1–21
- Kloch A, Babik W, Bajer A, Siński E & Radwan J (2010) Effects of an MHC-DRB genotype and allele number on the load of gut parasites in the bank vole *Myodes glareolus*. *Molecular Ecology* **19**: 255–265
- Korbelová J, Vorel A & Uhlíková J (2016) Biology and Ecology of Beavers. In *Handbook for Coexisting with Beavers*, Vorel A & Korbelová J (eds) pp 98–115. Praha: Česká zemědělská univerzita Praha
- Koubková B, Baruš V & Koubek P (2002) *Stichorchis subtriquetrus* (Digenea: Cladorchiidae) - back to the fauna of the Czech Republic after 200 years. *Helminthologia* **39**: 155–158
- Krause-Kyora B, Nutsua M, Boehme L, Pierini F, Pedersen DD, Kornell SC, Drichel D, Bonazzi M, Möbus L, Tarp P, Susat J, Bosse E, Willburger B, Schmidt AH, Sauter J, Franke A, Wittig M, Caliebe A, Nothnagel M, Schreiber S, *et al.* (2018) Ancient DNA study reveals HLA susceptibility locus for leprosy in medieval Europeans. *Nature Communications* **9**: 1–11

- Kropf M, Holzler G & Parz-Gollner R (2013) Genetic evidence on the origin of the current beaver (*Castor fiber*) population in Lower Austria. *Sumarski List* **11–12**: 591–596
- Kuduk K, Johanet A, Allainé D, Cohas A & Radwan J (2012) Contrasting patterns of selection acting on MHC class I and class II DRB genes in the Alpine marmot (*Marmota marmota*). *Journal of Evolutionary Biology* **25**: 1686–1693
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C & Tamura K (2018) MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 1547–1549
- Landry C & Bernatchez L (2002) Comparative analysis of population structure across environments and geographical scales at major histocompatibility complex and microsatellite loci in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology* **10**: 2525–2539
- Lanfear R, Frandsen PB, Wright AM, Senfeld T & Calcott B (2016) PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses. *Molecular Biology and Evolution* **34**: 772–773
- Leigh JW & Bryant D (2015) POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* **6**: 1110–1116
- Leinders-Zufall T, Brennan P, Widmayer P, Chandramani S. P, Maul-Pavicic A, Jäger M, Li XH, Breer H, Zufall F & Boehm T (2004) MHC class I peptides as chemosensory signals in the vomeronasal organ. *Science* **306**: 1033–1037
- Lenz TL, Mueller B, Trillmich F & Wolf JBW (2013) Divergent allele advantage at MHC-DRB through direct and maternal genotypic effects and its consequences for allele pool composition and mating. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **280**: 20130714
- Lenz TL, Wells K, Pfeiffer M & Sommer S (2009) Diverse MHC IIB allele repertoire increases parasite resistance and body condition in the long-tailed giant rat (*Leopoldamys sabanus*). *BMC Evolutionary Biology* **9**: 269
- Li J, Qi M, Chang Y, Wang R, Li T, Dong H & Zhang L (2015) Molecular Characterization of *Cryptosporidium* spp., *Giardia duodenalis*, and *Enterocytozoon bieneusi* in Captive Wildlife at Zhengzhou Zoo, China. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **62**: 833–839
- Lighten J, van Oosterhout C & Bentzen P (2014) Critical review of NGS analyses for de novo genotyping multigene families. *Molecular Ecology* **23**: 3957–3972
- Lizarralde M, Escobar J & Deferrari G (2004) Invader species in Argentina: A review about the beaver (*Castor canadensis*) population situation on tierra del fuego ecosystem. *Interciencia* **29**: 352–356
- Loiseau C, Richard M, Garnier S, Chastel O, Julliard R, Zoorob R & Sorci G (2009) Diversifying selection on MHC class I in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Molecular Ecology* **18**: 1331–1340
- Loiseau C, Zoorob R, Garnier S, Birard J, Federici P, Julliard R & Sorci G (2008) Antagonistic effects of a Mhc class I allele on malaria-infected house sparrows. *Ecology Letters* **11**: 258–265
- Loiseau C, Zoorob R, Robert A, Chastel O, Julliard R & Sorci G (2011) *Plasmodium relictum* infection and MHC diversity in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **278**: 1264–1272
- Lok S, Paton TA, Wang Z, Kaur G, Walker S, Yuen RKC, Sung WWL, Whitney J, Buchanan JA, Trost B, Singh N, Apresto B, Chen N, Coole M, Dawson TJ, Ho K, Hu Z, Pullenayegum S, Samler K, Shipstone A, et al. (2017) De novo genome and transcriptome assembly of the Canadian beaver (*Castor canadensis*). *G3: Genes, Genomes, Genetics* **7**: 755–773
- Máca O, Pavlásek I & Vorel A (2015) *Stichorchis subtriquetrus* (Digenea: Paramphistomatidae) from Eurasian beaver (*Castor fiber*) in the Czech Republic. *Parasitology Research* **114**: 2933–2939
- MacManes MD & Lacey EA (2012) Is Promiscuity Associated with Enhanced Selection on MHC-DQ α in Mice (genus *Peromyscus*)? *PLoS ONE* **7**: e37562
- Mai S, Weinhardt M, Allgöwer R & Merker S (2018) Recolonizing lost habitat—how European beavers

- (*Castor fiber*) return to south-western Germany. *Mammal Research* **63**: 255–265
- Malé PJG, Martin JF, Galan M, Deffontaine V, Bryja J, Cosson JF, Michaux J & Charbonnel N (2012) Discongruence of Mhc and cytochrome b phylogeographical patterns in *Myodes glareolus* (Rodentia: Cricetidae). *Biological Journal of the Linnean Society* **105**: 881–899
- Manlik O, Krützen M, Kopps AM, Mann J, Bejder L, Allen SJ, Frère C, Connor RC & Sherwin WB (2019) Is MHC diversity a better marker for conservation than neutral genetic diversity? A case study of two contrasting dolphin populations. *Ecology and Evolution* **9**: 6986–6998
- Marmesat E, Schmidt K, Saveljev AP, Seryodkin I V. & Godoy JA (2017) Retention of functional variation despite extreme genomic erosion: MHC allelic repertoires in the Lynx genus. *BMC Evolutionary Biology* **17**: 158
- Marr MM, Brace S, Schreve DC & Barnes I (2018) Identifying source populations for the reintroduction of the Eurasian beaver, *Castor fiber* L. 1758, into Britain: evidence from ancient DNA. *Scientific Reports* **8**: 2708
- Martin DP, Murrell B, Golden M, Khoosal A & Muhire B (2015) RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution* **1**: vev003
- McDonald JH & Kreitman M (1991) Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature* **351**: 652–654
- Meslin C, Mugnier S, Callebaut I, Laurin M, Pascal G, Poupon A, Goudet G & Monget P (2012) Evolution of Genes Involved in Gamete Interaction: Evidence for Positive Selection, Duplications and Losses in Vertebrates. *PLoS ONE* **7**: e44548
- Milinski M (2006) The Major Histocompatibility Complex, Sexual Selection, and Mate Choice. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **37**: 159–186
- Minias P, Pikus E & Anderwald D (2019) Allelic diversity and selection at the MHC class I and class II in a bottlenecked bird of prey, the White-tailed Eagle. *BMC Evolutionary Biology* **19**: 2
- Minnig S, Angst C & Jacob G (2016) Genetic monitoring of Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Switzerland and implications for the management of the species. *Russian Journal of Theriology* **15**: 20–27
- Moreno-Santillán DD, Lacey EA, Gendron D & Ortega J (2016) Genetic variation at exon 2 of the MHC class II DQB locus in blue whale (*Balaenoptera musculus*) from the Gulf of California. *PLoS ONE* **11**: e0141296
- Mortensen RM & Rosell F (2020) Long-term capture and handling effects on body condition, reproduction and survival in a semi-aquatic mammal. *Scientific Reports* **10**: 17886
- Munclinger P, Syřůčková A, Náhlovský J, Durka W, Saveljev AP, Rosell F, Samjaa R, Stubbe A, Stubbe M, Ulevičius A, Yanuta G & Vorel (in prep.) A Resolving the origin of newly-formed Eurasian beaver populations (*Castor fiber*) using mitochondrial and nuclear genetic markers
- Musolf K, Meyer-Lucht Y & Sommer S (2004) Evolution of MHC-DRB class II polymorphism in the genus *Apodemus* and a comparison of DRB sequences within the family Muridae (Mammalia: Rodentia). *Immunogenetics* **56**: 420–426
- Nadachowska-Brzyska K, Zieliński P, Radwan J & Babik W (2012) Interspecific hybridization increases MHC class II diversity in two sister species of newts. *Molecular Ecology* **21**: 887–906
- Náhlovský J (2019) Genetické důsledky dramatických změn kontaktu a velikosti populací bobra evropského (*Castor fiber*). Bakalářská práce. Univerzita Karlova. Praha
- Neefjes J, Jongsma MLM, Paul P & Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology* **11**: 823–836
- Nolet BA & Rosell F (1998) Comeback of the beaver *Castor fiber*: An overview of old and new conservation problems. *Biological Conservation* **83**: 165–173
- O'Brien SJ, Roelke ME, Marker L, Newman A, Winkler CA, Meltzer D, Colly L, Evermann JF, Bush M & Wildt DE (1985) Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* **227**:

- Oleinikov AY (2013) Distribution of native and introduced semiaquatic mammals in Sikhote-Alin. *Russian Journal of Biological Invasions* **4**: 180–189
- Oliver MK & Piertney SB (2012) Selection maintains mhc diversity through a natural population bottleneck. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 1713–1720
- Parker H, Zedrosser A & Rosell F (2017) Age-specific reproduction in relation to body size and condition in female Eurasian beavers. *Journal of Zoology* **302**: 236–243
- Peakall R & Smouse PE (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* **6**: 288–295
- Peakall R & Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics* **28**: 2537–2539
- Pelz-Serrano K, van Riper C, Bergman DL & Culver M (nepublikováno) Genetic diversity after extirpation and recolonisation of populations: The case of the American beaver (*Castor canadensis*). In Pelz-Serrano K (2011) Molecular phylogeography of the American beaver (*Castor canadensis*): Implications for management and conservation. Dizertační práce. The University of Arizona. Tuscon
- Penn D & Potts W (1998) How do major histocompatibility complex genes influence odor and mating preferences? *Advances in Immunology* **69**: 411–436
- Pereira RJ, Lima TG, Pierce-Ward NT, Chao L & Burton RS (2021) Recovery from hybrid breakdown reveals a complex genetic architecture of mitonuclear incompatibilities. *Molecular Ecology*: mec.15985
- Phillips KP, Cable J, Mohammed RS, Herdegen-Radwan M, Raubic J, Przesmycka KJ, Van Oosterhout C & Radwan J (2018) Immunogenetic novelty confers a selective advantage in host–pathogen coevolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**: 1552–1557
- Pierini F & Lenz TL (2018) Divergent allele advantage at human MHC genes: Signatures of past and ongoing selection. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 2145–2158
- Piertney SB & Oliver MK (2006) The evolutionary ecology of the major histocompatibility complex. *Heredity* **96**: 7–21
- Posautz A, Parz-Gollner R, Hölzler G, Gottstein B, Schwaiger L, Beiglböck C & Kübber-Heiss A (2015) Erstnachweis von *Echinococcus multilocularis* im Biber (*Castor fiber*) in Österreich. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **102**: 74–79
- R Core Team (2020) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vídeň
- Radwan J, Babik W, Kaufman J, Lenz TL & Winternitz J (2020) Advances in the Evolutionary Understanding of MHC Polymorphism. *Trends in Genetics* **36**: 298–311
- Radwan J, Biedrzycka A & Babik W (2010) Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? *Biological Conservation* **143**: 537–544
- Radwan J, Kawałko A, Wójcik JM & Babik W (2007) MHC-DRB3 variation in a free-living population of the European bison, *Bison bonasus*. *Molecular Ecology* **16**: 531–540
- Raymond M & Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**: 248–249
- Rekdal SL, Anmarkrud JA, Johnsen A & Lifjeld JT (2018) Genotyping strategy matters when analyzing hypervariable major histocompatibility complex-Experience from a passerine bird. *Ecology and Evolution* **8**: 1680–1692
- Resch AM, Carmel L, Mariño-Ramírez L, Ogurtsov AY, Shabalina SA, Rogozin IB & Koonin EV (2007) Widespread positive selection in synonymous sites of mammalian genes. *Molecular Biology and Evolution* **24**: 1821–1831

- Říčanová Š, Bryja J, Cosson J-F, Gedeon C, Choleva L, Ambros M & Sedláček F (2011) Depleted genetic variation of the European ground squirrel in Central Europe in both microsatellites and the major histocompatibility complex gene: implications for conservation. *Conservation Genetics* **12**: 1115–1129
- Rico Y, Morris-Pocock J, Zingouris J, Nocera JJ & Kyle CJ (2015) Lack of Spatial Immunogenetic Structure among Wolverine (*Gulo gulo*) Populations Suggestive of Broad Scale Balancing Selection. *PLoS ONE* **10**: e0140170
- Ronquist F, Teslenko M, Van Der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA & Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539–542
- Rosell F, Bergan P & Parker H (1998) Scent-marking in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) as a means of territory defense. *Journal of Chemical Ecology* **24**: 207–219
- Rosell F, Kniha D & Haviar M (2020) Dogs can scent-match individual Eurasian beavers from their anal gland secretion. *Wildlife Biology* **2020**: wlb.00658
- Rosell F & Steifetten Ø (2004) Subspecies discrimination in the Scandinavian beaver (*Castor fiber*): combining behavioral and chemical evidence. *Canadian Journal of Zoology* **82**: 902–909
- Šafář J (2002) Novodobé rozšíření bobra evropského (*Castor fiber* L., 1758) v České republice. *Příroda* **13**: 161–196
- Sagonas K, Runemark A, Antoniou A, Lymberakis P, Pafilis P, Valakos ED, Poulakakis N & Hansson B (2019) Selection, drift, and introgression shape MHC polymorphism in lizards. *Heredity* **122**: 468–484
- Santos PSC, Courtiol A, Heidel AJ, Höner OP, Heckmann I, Nagy M, Mayer F, Platzer M, Voigt CC & Sommer S (2016) MHC-dependent mate choice is linked to a trace-amine-associated receptor gene in a mammal. *Scientific Reports* **6**: 38490
- Santos PSC, Mezger M, Kolar M, Michler FU & Sommer S (2018) The best smellers make the best choosers: Mate choice is affected by female chemosensory receptor gene diversity in a mammal. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **285**: 20182426
- Santos PSC, Michler FU & Sommer S (2017) Can MHC-assortative partner choice promote offspring diversity? A new combination of MHC-dependent behaviours among sexes in a highly successful invasive mammal. *Molecular Ecology* **26**: 2392–2404
- Sauermann U, Nürnberg P, Bercovitch FB, Berard JD, Trefilov A, Widdig A, Kessler M, Schmidtke J & Krawczak M (2001) Increased reproductive success of MHC class II heterozygous males among free-ranging rhesus macaques. *Human Genetics* **108**: 249–254
- Savisaar R & Hurst LD (2018) Exonic splice regulation imposes strong selection at synonymous sites. *Genome Research* **28**: 1442–1454
- Schad J, Sommer S & Ganzhorn JU (2004) MHC Variability of a Small Lemur in the Littoral Forest Fragments of Southeastern Madagascar. *Conservation Genetics* **5**: 299–309
- Schaschl H & Wegner KM (2007) Contrasting mode of evolution between the MHC class I genomic region and class II region in the three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.; Gasterosteidae: Teleostei). *Immunogenetics* **59**: 295–304
- Schierup MH, Vekemans X & Charlesworth D (2000) The effect of subdivision on variation at multi-allelic loci under balancing selection. *Genetical Research* **76**: 51–62
- Schuster AC, Herde A, Mazzoni CJ, Eccard JA & Sommer S (2016) Evidence for selection maintaining MHC diversity in a rodent species despite strong density fluctuations. *Immunogenetics* **68**: 429–437
- Sedlák K, Vodička R, Bártová E & Vorel A (2018) Infection diseases in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) in the Czech Republic with high prevalence of antibodies to *Neospora caninum*. In *Proceedings 2018 Joint EAZWV/AAZV/Leibniz-IZW Conference* p 271. Praha: European

Association of Zoo and Wildlife Veterinarians

- Senn H, Ogden R, Frosch C, Syrůčková A, Campbell-Palmer R, Munclinger P, Durka W, Kraus RHS, Saveljev AP, Nowak C, Stubbe A, Stubbe M, Michaux J, Lavrov V, Samiya R, Ulevicius A & Rosell F (2014) Nuclear and mitochondrial genetic structure in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) - implications for future reintroductions. *Evolutionary Applications* **7**: 645–662
- Sieber J & Bauer K (2001) Europäischer und Kanadischer Biber. In *Grüne Reihe des BMLFUW Bd.13*, Spitzenberger F (ed) pp 366–374. Videaň
- Siljestam M & Rueffler C (2018) Heterozygote advantage can explain the extraordinary diversity of immune genes. *bioRxiv*: 347344 (preprint)
- Sin YW, Newman C, Dugdale HL, Buesching C, Mannarelli M-E, Annavi G, Burke T & Macdonald DW (2016) No Compensatory Relationship between the Innate and Adaptive Immune System in Wild-Living European Badgers. *PLOS ONE* **11**: e0163773
- Slade JWG, Watson MJ & Macdougall-Shackleton EA (2019) ‘Balancing’ balancing selection? Assortative mating at the major histocompatibility complex despite molecular signatures of balancing selection. *Ecology and Evolution* **9**: 5146–5157
- Slatkin M (1994) An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. *Genetical Research* **64**: 71–74
- Spurgin LG, van Oosterhout C, Illera JC, Bridgett S, Gharbi K, Emerson BC & Richardson DS (2011) Gene conversion rapidly generates major histocompatibility complex diversity in recently founded bird populations. *Molecular Ecology* **20**: 5213–5225
- Spurgin LG & Richardson DS (2010) How pathogens drive genetic diversity: MHC, mechanisms and misunderstandings. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **277**: 979–988
- Sroka J, Giżejowski Z, Wójcik-Fatla A, Stojek K, Bilska-Zajac E, Dutkiewicz J, Cencek T, Karamon J, Zajac V, Kusyk P, Dąbrowska J & Kochanowski M (2015) Potential role of beavers (*Castor fiber*) in contamination of water in the Masurian Lake District (north-eastern Poland) with protozoan parasites *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis*. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy* **59**: 219–228
- Stefan T, Matthews L, Prada JM, Mair C, Reeve R & Stear MJ (2019) Divergent allele advantage provides a quantitative model for maintaining alleles with a wide range of intrinsic merits. *Genetics* **212**: 553–564
- Stefen C (2019) Causes of death of beavers (*Castor fiber*) from eastern Germany and observations on parasites, skeletal diseases and tooth anomalies—a long-term analysis. *Mammal Research* **64**: 279–288
- Stephens M & Scheet P (2005) Accounting for Decay of Linkage Disequilibrium in Haplotype Inference and Missing-Data Imputation. *American Journal of Human Genetics* **76**: 449–462
- Stephens M, Smith NJ & Donnelly P (2001) A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. *American Journal of Human Genetics* **68**: 978–989
- Stervander M, Dierickx EG, Thorley J, Brooke M de L & Westerdahl H (2020) High MHC gene copy number maintains diversity despite homozygosity in a Critically Endangered single-island endemic bird, but no evidence of MHC-based mate choice. *Molecular Ecology* **29**: 3578–3592
- Sutton JT, Nakagawa S, Robertson BC & Jamieson IG (2011) Disentangling the roles of natural selection and genetic drift in shaping variation at MHC immunity genes. *Molecular Ecology* **20**: 4408–4420
- Swanson WJ & Vacquier VD (2002) The rapid evolution of reproductive proteins. *Nature Reviews Genetics* **3**: 137–144
- Talarico L, Babik W, Marta S, Pietrocini V & Mattoccia M (2019) MHC structuring and divergent allele advantage in a urodele amphibian: a hierarchical multi-scale approach. *Heredity* **123**: 593–607
- Tang H, Choudhry S, Mei R, Morgan M, Rodriguez-Cintrón W, Burchard EG & Risch NJ (2007) Recent

- genetic selection in the ancestral admixture of Puerto Ricans. *American Journal of Human Genetics* **81**: 626–633
- Tang H, Coram M, Wang P, Zhu X & Risch NJ (2006) Reconstructing genetic ancestry blocks in admixed individuals. *American Journal of Human Genetics* **79**: 1–12
- The 1000 Genomes Project Consortium (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* **526**: 68–74
- Vilà C, Amorim IR, Leonard JA, Posada D, Castroviejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall KA, Ellegren H & Wayne RK (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology* **8**: 2089–2103
- Vorel A (2020) Stav populace bobra evropského v Praze. Dostupné z <https://www.fzp.czu.cz/cs/r-6899-projekty-a-spoluprace-s-praxi/r-6923-projekty/r-13356-archiv-projektu/r-14950-stav-populace-bobra-evropskeho-v-praze>
- Vorel A, Horníček J & Barták V (2020) Beaver soap opera – mohou bobři při šíření pozměnit obecný difusní model? In *Zoologické dny Olomouc 2020. Sborník abstraktů z konference 6.-7. února 2020.*, Bryja J Kuras T Tuf IH & Tkadlec E (eds) pp 214–215. Brno: Ústav biologie obratlovců AV ČR, v.v.i.
- Vorel A, Šafář J & Šimůnková K (2012) Recentní rozšíření bobra evropského (*Castor fiber*) v České republice v letech 2002–2012 (Rodentia: Castoridae). *Lynx* **43**: 149–179
- Wakeland EK, Boehme S, She JX, Lu CC, McIndoe RA, Cheng I, Ye Y & Potts WK (1990) Ancestral polymorphisms of MHC class II genes: Divergent allele advantage. *Immunologic Research* **9**: 115-122
- Wang S, Liu C, Wilson AB, Zhao N, Li X, Zhu W, Gao X, Liu X & Li Y (2017) Pathogen richness and abundance predict patterns of adaptive major histocompatibility complex variation in insular amphibians. *Molecular Ecology* **26**: 4671–4685
- Ward OG, Graphodatsky AS, Wurster-Hill DH, Eremina VR, Park JP & Yu Q (1991) Cytogenetics of beavers: A case of speciation by monobrachial centric fusions. *Genome* **34**: 324–328
- Watterson GA (1977) Heterosis or neutrality? *Genetics* **85**: 789–814
- Weaver S, Shank SD, Spielman SJ, Li M, Muse S V. & Kosakovsky Pond SL (2018) Datamonkey 2.0: A modern web application for characterizing selective and other evolutionary processes. *Molecular Biology and Evolution* **35**: 773–777
- Winternitz J, Abbate JL, Huchard E, Havlíček J & Garamszegi LZ (2017) Patterns of MHC-dependent mate selection in humans and nonhuman primates: a meta-analysis. *Molecular Ecology* **26**: 668-688
- Woelfing B, Traulsen A, Milinski M & Boehm T (2009) Does intra-individual major histocompatibility complex diversity keep a golden mean? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **364**: 117–128
- Yamazaki K & Beauchamp GK (2007) Genetic Basis for MHC-Dependent Mate Choice. *Advances in Genetics* **59**: 129–145
- Yasukochi Y & Ohashi J (2017) Elucidating the origin of HLA-B*73 allelic lineage: Did modern humans benefit by archaic introgression? *Immunogenetics* **69**: 63–67
- Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Marugán JC, Cummins C, Davidson C, Dodiya K, Fatima R, Gall A, Giron CG, *et al.* (2020) Ensembl 2020. *Nucleic Acids Research* **48**: D682-D688
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, Cutcutache I, Rozen S & Madden TL (2012) Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics* **13**: 134
- Yuhki N & O'Brien SJ (1990) DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**: 836–840

- Zachos FE, Cirovic D, Rottgardt I, Seiffert B, Oeking S, Eckert I & Hartl GB (2007) Geographically large-scale genetic monomorphism in a highly successful introduced species: the case of the muskrat (*Ondatra zibethicus*) in Europe. *Mammalian Biology* **72**: 123–126
- Zahner V (1997) Der Biber in Bayern. Freising. Bayerische Landesanstalt für Wald und Forstwirtschaft
- Zhai T, Yang HQ, Zhang RC, Fang LM, Zhong GH & Fang SG (2017) Effects of Population Bottleneck and Balancing Selection on the Chinese Alligator Are Revealed by Locus-Specific Characterization of MHC Genes. *Scientific Reports* **7**: 1–7