

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA ZOOLOGIE



**Genetická struktura izolovaných populací hýla rudého
(*Carpodacus erythrinus*)**

Genetic structure of isolated populations of the Scarlet
Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*)

Diplomová práce

Lucie Šašková

Školitel: Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.
Konzultant : Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Praha 2010

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně, s použitím citované literatury a pod vedením školitele.

V Praze dne: 26.4.2010

Lucie Šašková

PODĚKOVÁNÍ

Na prvním místě bych ráda velmi poděkovala především svému školiteli Mgr. Pavlovi Munclingerovi, PhD. za vynikající a bezproblémové vedení práce, za jeho ochotu při zasvěcování do potřebných laboratorních metod, za opravdu velkou dávku trpělivosti, za pomoc při získávání výsledků a hlavně pak za jeho cenné rady a připomínky při vzniku samotné diplomové práce.

Dále chci poděkovat Mgr. Tomášovi Albrechtovi, PhD. jakožto svému konzultantovi, Mgr. Zuzaně Starostové, PhD. za velmi ochotnou pomoc při výpočtech Bayesiánské analýzy a v neposlední řadě také RNDr. Petru Kotlíkovi, PhD. (z fyziologického ústavu AV ČR v Liběchově) za cenné připomínky a rady při populačně genetických analýzách. Děkuji také všem lidem a pracovištím, jenž ochotně poskytly vzorky hýlů rudých do mých analýz.

Můj poslední, ale neméně důležitý dík patří mým rodičům, babičce a také Martinovi, kteří mě během celého mého studia a zároveň při vypracování této diplomové práce opravdu hodně podporovali všemi možnými způsoby.

Tato práce vznikla s finanční podporou výzkumného záměru MŠMT 0021620828.

OBSAH

ABSTRAKT	6
ABSTRACT	7
I. ÚVOD A CÍLE PRÁCE	8
I.1 FYLOGEOGRAFIE	8
I.2 MITOCHONDRIÁLNÍ DNA	10
I.3 VLIV GLACIÁLŮ A MIGRACE NA POPULAČNĚ GENETICKOU STRUKTURU DRUHŮ	11
I.4 CÍLE PRÁCE	14
II. LITERÁRNÍ PŘEHLED	15
II.1 LOKALIZACE DRUHU <i>CARPODACUS ERYTHRINUS</i> A CHARAKTERISTIKA JEHO SUBSPECIÍ	15
II.1.1 Rozšíření jednotlivých subspecií	16
II.1.2 Migrace a zimoviště subspecií	17
II.1.3 Vzájemné odlišení jednotlivých subspecií dle barevnosti	19
II.2 POSTUPNÉ ŠÍŘENÍ DRUHU NAPŘÍČ EVROPOU	20
II.3 ŠÍŘENÍ NA NAŠEM ÚZEMÍ	23
II.3.1 Expanze druhu na území České a Slovenské republiky	23
II.3.2 Početnost druhu	25
III. MATERIÁL A METODIKA	28
III.1 IZOLACE DNA	29
III.2 KONTROLA KVALITY DNA	29
III.3 POYLMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR), VÝBĚR VHODNÝCH PRIMERŮ	30
III.3.1 Protokol k PCR použité v této diplomové práci	30
III.3.2 Kroky PCR	31
III.4 KONTROLA SPRÁVNÉHO PRŮBĚHU PCR	32
III.5 PROČIŠTĚNÍ VZORKŮ Z PCR, PŘÍPRAVA NA SEKVENACI	33
III.6 SEKVENACE, EDITACE SEKVENCÍ	34

III.7 ANALÝZA DAT	35
IV. VÝSLEDKY	40
IV.1 ZÁKLADNÍ VZTAHY MEZI HAPLOTYPY	40
IV.2 GENETICKÉ CHARAKTERISTIKY POPULACÍ	47
IV.3 POPULAČNÍ a PROSTOROVÁ EXPANZE	48
IV.4 TESTY NEUTRALITY	54
IV.5 PÁROVÉ SROVNÁNÍ POPULACÍ (Fst), AMOVA (Φ_{st}), INTERMATCH DISTRIBUTION	55
IV.5.1 Párové Fst	55
IV.5.2 Analýza hierarchické populační struktury	56
IV.6 BAYESIÁNSKÉ SKYLINE PLOTY	62
IV.7 GENETICKÝ TOK	66
V. DISKUZE	70
V.1 VYSOKÝ TOK GENŮ MEZI POPULACEMI DRUHU	70
V.2 PŘEKVAPIVÁ IZOLACE JIHOZÁPADNÍCH POPULACÍ	71
V.3 PŮVOD IZOLOVANÝCH FRAGMENTOVANÝCH POPULACÍ NA ZÁPADĚ AREÁLU DRUHU	73
V.4 MEZIPOPULAČNÍ TOK GENŮ	74
V.5 DEMOGRAFICKÁ HISTORIE POPULACÍ	75
V.6 DALŠÍ MOŽNOSTI ROZŠÍŘENÍ VÝZKUMU	77
VI. ZÁVĚRY	78
VII. POUŽITÁ LITERATURA	80
VIII. PŘÍLOHY	93

ABSTRAKT

Diplomová práce se zabývá původem a demografickými charakteristikami geograficky izolovaných, nedávno vzniklých populací hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) na západním okraji areálu druhu. Práce je založena na nově získaných sekvencích dvou úseků mitochondriální DNA (410 páru bází dlouhá sekvence kontrolní oblasti a 1029 dlouhá sekvence genu ND2) zjištěných u 82 jedinců ze 13 lokalit a jejich srovnáním s publikovanými sekvencemi z kontinuálního areálu. Zjistila jsem, že geograficky izolované populace ze střední a severní Evropy nejsou významně geneticky izolované od populací kontinuálního areálu. Nově vzniklé populace také vykazují překvapivě vysokou diverzitu srovnatelnou s asijskými populacemi. Tato zjištění nasvědčují intenzivnímu toku genů mezi populacemi zprostředkovanému pravděpodobně převážně disperzí mladých ptáků před prvním zahnížděním. Navzdory intenzivnímu toku genů mezi kontinuálním areálem a středo- a severoevropskými izolovanými populacemi hýli z Kavkazu, Bulharska a Turecka vytvořili jasně oddělenou skupinu, která byla podpořena na základě několika typů analýz. Zdá se tedy, že jedinci z těchto oblastí mohou mít vlastní oddělené zimoviště, komunikují jen minimálně se zbytkem areálu a díky tomu jsme zde zřejmě svědky počínající speciace.

Klíčová slova: Hýl rudý (*Carpodacus erythrinus*), izolované populace, populační struktura, expanze, počínající speciace, mitochondriální DNA, kontrolní oblast, ND2

ABSTRACT

The aim of the master diploma work is to investigate origin and demography characteristics of isolated recently founded populations of the Scarlet Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*) on the western edge of its breeding range. This study is based on newly obtained sequences of two parts of mitochondrial DNA (410 bp sequence of the control region and 1029 bp sequence of the ND2 gene), which were studied in 82 individuals from 13 locations. These sequences were compared with already published sequences from a continual species breeding range. I discovered that geographically isolated populations from central and north Europe are not significantly genetically isolated from populations in the continual breeding range. In addition, recently founded populations show surprisingly high diversity, which is comparable with Asian populations. These findings suggest intensive genetic flow between populations. The gene flow is likely mediated by the dispersal of young birds before their first breeding attempts. Despite the intensive gene flow between continual breeding range and isolated populations from the Central and Nord Europe, individuals from Caucasus, Bulgaria, and Turkey form clearly isolated group, which was supported by several types of analyses. It seems that individuals from these areas winter at other places than birds from the northern continual breeding range. As the gene flow between the genetically separated areas seems negligible I suppose that incipient stages of speciation have been started here.

Key words: Scarlet Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*), isolated populations, population structure, expansion, incipient speciation, mitochondrial DNA, control region, ND2

I. ÚVOD A CÍLE PRÁCE

I.1 FYLOGEOGRAFIE

Fylogeografie je novodobou metodou zabývající se evoluční historií druhů v kontextu paleoenvironmentálních změn (Awise 2000). Zajímá se o principy a děje ovlivňující geografické rozmístění genealogických linií. Tyto linie jsou především ty, které se vyskytují buď uvnitř samotného druhu nebo mezi druhy blízce příbuznými. Umožňuje načrtnout řadu alternativních historických scénářů, které vysvětlují současné prostorové uspořádání rodokmenů. Osami fylogeografie jsou čas a prostor. Přes ně jsou mapovány jednotlivé rodokmeny, jež jsou středem zájmu fylogeografů. Všechny studie jsou založeny na popisu rozdílností organismů nebo genealogických linií napříč často širokým geografickým regionem (Awise et al. 1987, Bridle 2001, Kidd & Ritchie 2006).

Analýza a interpretace rozložení genealogických linií často vyžadují značné přispění dalších vědních disciplín jako jsou například molekulární a populační genetika, etologie, demografie, paleontologie a historická geografie. Fylogeografie je tedy považována za jakousi integrační snahu mezi mikroevolučními a makroevolučními obory (Awise 2000). Její cíl pak může být definován jako směr vedoucí k pochopení mikroevoluce a speciace v prostorovém či časovém kontextu (Kidd & Ritchie 2006).

Obnovení zájmu o geografii jako důležitou složku evoluční biogeografie proběhlo relativně nedávno. Hlavní rozmach zaznamenaly fylogeografické studie až v 80- tých letech dvacátého století spolu se stoupajícím počtem vhodných genetických markerů (Arbogast & Kenagy 2001, Kidd & Ritchie 2006). Časem samozřejmě došlo také ke zdokonalení užívaných algoritmů, neboť právě ty hrají důležitou roli při získávání historických informací z molekulárních dat (Awise et al. 1987).

Obecně se tedy fylogeografové snaží interpretovat jakým způsobem (ale i rozsahem) může proces, jenž se odehrál v minulosti, zanechat evoluční otisky v současné demografii. Ty se projevují v nejjednodušší formě v současné geografické distribuci alel (Awise 1989). Pokud si představíme, že dvě geografické populace byly oddělené před stovkami až tisíci lety, pak mohou vhodné fylogeografické analýzy odhalit toto historické rozdělení a datovat tak klíčovou událost v minulosti druhu. Nejprve je třeba ověřovat jedince napříč druhovým areálem. U každého z nich je poté určena sekvence buď části mitochondriální DNA nebo vyjíměčně i jiných genů. Výsledné haplotypy utvoří na základě analýzy předpokládaný strom, který odráží

evoluční vztahy, jak mezi samotnými jedinci, tak mezi populacemi (Avice et al. 1987, Arbogast & Kenagy 2001). Ukáže se tedy, zda jejich minulost probíhala v izolaci, v panmixii či v jejich kombinaci. Tak tomu je třeba u druhu konipas luční *Motacilla flava* (Pavlova et al. 2003), u něž lze usuzovat, že všechny tři výrazně oddělené klády (Evropa + JZ Asie, SV Evropa, JV Asie) prodělaly období nezávislé evoluce, protože haplotypy z různých lokalit areálu se jeví jako recipročně monofyletické. Co se týče dalších ptačích druhů studovaných v rámci Palearktidy, tak lze poznamenat, že některé taktéž vykazují zcela jasnou populačně genetickou strukturu (např. jespák obecný *Calidris alpina* Wenink et al. 1993, budníček zelený *Phylloscopus trochiloides* Irwin et al. 2001, strakapoud velký *Dendrocopos major* Zink et al. 2002a, konipas luční *Motacilla flava* a konipas citrónový *Motacilla citreola* Pavlova et al. 2003, slavík modráček *Luscinia svecica* Zink et al. 2003, střízlík obecný *Troglodytes troglodytes* Drovetski et al. 2004a, racek stříbřitý *Larus argentatus* Liebers et al. 2004). Naopak žádnou nebo minimální geografickou strukturovanost mtDNA napříč širokým areálem lze sledovat u druhu zvonek zelený *Carduelis chloris* (Merilä et al. 1997), sýkora laponská *Parus cinctus* (Uimaniemi et al. 2003), slavík modráček *Luscinia svecica* (Zink et al. 2003), brhlík lesní *Sitta europea* (Zink et al. 2006) a pisík obecný *Actitis hypoleucos* (Zink et al. 2008). Stromy těchto druhů se pak jeví jako mělce zakořeněné a geograficky nestrukturované. Lze z nich usuzovat, že tyto druhy prodělaly poměrně nedávnou expanzi.

V současnosti se za tímto účelem fylogeografických analýz nejvíce studují druhy s izolovanými populacemi, které vykazují odlišné genetické adaptace k lokálním podmínkám a prodělaly nezávislou evoluci (Avice 1998b, Moritz & Faith 1998). Z tohoto důvodu je zajímavým druhem i hýl rudý (*Carpodacus erythrinus*), který se v západní části svého areálu vyskytuje právě pouze v malých populacích. Ty jsou od sebe navzájem izolovány a není zcela jasné, zda nějakým způsobem komunikují s populacemi, které se vyskytují v kontinuálním areálu druhu či nikoli.

I.2 MITOCHONDRIÁLNÍ DNA

Jako vhodný marker pro účely fylogeografických analýz i pro ptačí molekulární systematiku je v současnosti nejvíce využívána mitochondriální DNA (dále jen mtDNA). Ta má jako ukazatel mnoho výhod. Jakožto kruhová molekula má relativně stálé uspořádání. Hlavní roli ale hraje její haploidní matrilineální dědičnost, rychlejší evoluce oproti jedno-kopiové jaderné DNA, vysoká míra mutace sekvencí a převážná absence rekombinace (Moore 1995, Mindell 1998, Avise 2000, Buehler & Baker 2003). Díky porovnání sekvencí mt DNA lze nyní relativně jednoduše stanovit hranice jednotlivých druhů, odvodit fylogeografické vzory, historii i strukturu jednotlivých populací (Moritz et al. 1987, Zink 1995, Moritz & Faith 1998, Ballard 2004, Zink et al. 2006, Bensch et al. 2009). Tato DNA je navíc obecně brána jako citlivější indikátor populační struktury v porovnání s jadernou DNA. Doba koalescence (splnutí linií v jediného společného předka) je pro mitochondriální geny čtyřikrát kratší než pro geny jaderné (Lynch 1998, Avise 2000, Zink & Barrowclough 2008) a mutační rychlost mtDNA je tedy přibližně čtyřikrát vyšší. Nicméně v současnosti byla publikována řada studií, které s tímto názorem částečně polemizují (Moore 1995, Zink & Barrowclough 2008, Edwards & Bensch 2009, Galtier et al. 2009).

Různé úseky mtDNA samozřejmě mutují různou rychlostí. Z tohoto důvodu byla v této diplomové práci využita k analýzám kombinace dvou odlišných úseků mtDNA. Jako první z nich byla zkoumána sekvence kontrolní oblasti (*control region*), která je obzvláště užitečným markerem ve fylogeografických analýzách (Avise 2000, Buehler & Baker 2003). Funkcí kontrolní oblasti je iniciace replikace a transkripce v organele (Moritz et al. 1987). Tato nekódující sekvence je nejrychleji se vyvíjejícím úsekem mitochondriálního genomu. Vyvíjí se třikrát až desetkrát rychleji než celá molekula mitochondrie. Vykazuje mimořádně rychlé tempo nukleotidové substituce a vysokou úroveň vnitrodruhového polymorfismu (Merilä et al. 1997, Avise 2000). Jakožto část velice variabilní je navíc velmi citlivá k demografickým změnám v populacích.

Jako druhý zkoumaný úsek byl použit gen ND2. Ten mutuje oproti kontrolní oblasti pomaleji (Pavlova 2005a) a je jedním z genů kódujících podjednotku elektrontransportního řetězce (Ballard 2001).

I.3 VLIV GLACIÁLŮ A MIGRACE NA POPULAČNĚ GENETICKOU STRUKTURU DRUHŮ

V minulých letech se mnoho vědců pokoušelo vysvětlit původ odlišných geografických variant druhů na základě klimatických změn probíhajících před 110 až 12 tisíci lety, s maximem před 18 tisíci lety (Ödeen & Björklund 2003). Fylogeografické studie se tedy zaměřily na zkoumání populací, které byly nuceny nějakým způsobem reagovat na cyklické zalednění probíhající v tomto období na severní polokouli (Kvist et al. 2003a, Pavlova et al. 2003). Mnoho druhů prodělalo velké změny areálů. Během ochlazování klimatu a šíření ledovce vyhynuly jejich severní populace. Některé druhy poté přežívaly pouze v jižních refugiiích. To mělo za následek fragmentaci jejich areálu a možnou allopatrickou speciaci. V interglaciálu pak docházelo k oteplování, což bylo doprovázeno expanzí z refugií. Tyto expanze mohly být doprovázeny sériemi *bootlenecků*. Takovéto opakované cykly expanzí a zmenšování areálů se odrážejí v současné genetické struktuře populací (Avise et al. 1987, Hewitt 2000).

Populačně genetická struktura samozřejmě nezávisí pouze na historických událostech, ale také na současných procesech (Wenink et al. 1993, Bensch et al. 2009). Svou roli zde hrají lokální adaptace i genetický drift, jenž zvyšují divergenci mezi populacemi. Divergenci naopak snižuje genetický tok mezi populacemi, který je závislý na geografické izolovanosti populací i na chování jedinců.

Pleistocénním zaledněním byly silně ovlivněny především některé severoamerické a evropské druhy. Jako příklad lze uvést motýlí druh *Melanargia lachesis* (Habet et al. 2005), saranče stěhovavé (*Chorthippus parallelus*) (Cooper et al. 1995), rejska obecného (*Sorex araneus*) (Taberlet 1994), medvěda hnědého (*Ursus arctos*) (Korsten et al. 2009), ježka západního (*Erinaceus europaeus*) a východního (*Erinaceus concolor*) (Seddon et al. 2001). Shodný vzor pro tyto a další druhy napříč taxony tedy je, že populace osidlující dříve zaledněné oblasti jsou geneticky méně variabilní než stejné populace vyskytující se v oblastech, kde byly dlouhodobě stabilní podmínky (Merilä et al. 1997, Hewitt 2000, Hewitt 2001).

Existuje bohužel jen málo studií, jenž by z tohoto hlediska zkoumaly různé ptačí druhy. Navíc pouhý zlomek vědeckých prací se zaměřil na ptáky s čistě palearktickým rozšířením. Důvodem může být poměrně obtížné získávání dostatečného množství vzorků z asijských částí areálů. Tato mezera v ovzorkování tak širokého areálu, kterým Palearktida dozajista je, může negativně ovlivnit závěry fylogeografických studií, protože glaciální historie východní

Palearktidy je zcela vyjímečná. Nelze ji ztotožňovat s historií západních oblastí a odvozovat tak závěry o minulosti celých areálů právě proto, že nejrecentnější zalednění obecně dosáhlo jižněji v oblasti Evropy než v Asii. Lze tedy očekávat, že druhy s východním areálem budou ovlivněny klimatickými změnami v tomto období méně. Z tohoto důvodu je velmi složité pokoušet se o stanovení obecného fylogeografického vzoru, který by platil pro většinu druhů palearktické avifauny v celém jejich areálu – tedy jak v oblasti Evropy, tak v oblasti Asie (Kvist et al. 2001, Kvist et al. 2003b, Pavlova et al. 2006).

V současné době lze vyvozovat závěry o minulosti palearktické avifauny z několika publikovaných vědeckých prací. Jak bylo prozatím potvrzeno, mnoho ptačích druhů prodělalo po skončení období pleistocénního zalednění expanzi. Ta probíhala především jako šíření z jižních refugií směrem na sever. Tento typ expanze byl prokázán například u druhu zvonek zelený *Carduelis chloris* (Merilä et al. 1997), sýkora koňadra *Parus major* (Kvist et al. 2003a) a konipas luční *Motacilla flava* (Ödeen & Björklund 2003, Pavlova et al. 2003). Nicméně jsou známy i případy ptačích druhů, které se naopak šířily do západní Evropy z jihovýchodních oblastí Palearktu. Pro demonstraci tohoto trendu lze uvést sýkoru lužní *Parus montanus* (Kvist et al. 2001), sýkoru laponskou *Parus cinctus* (Uimaniemi et al. 2003), strnada rákosního *Emberiza schoeniclus* a skřivana polního *Alauda arvensis* (Zink et al. 2008). Zajímavou roli zde hraje oblast Kavkazu, která se u některých ptačích druhů jeví jako geneticky zcela odlišná. Často se v ní nachází velké množství endemických haplotypů jako je tomu v případě mlynříka dlouhoocasého *Aegithalos caudatus* či strnada rákosního *Emberiza schoeniclus* (Zink et al. 2008), což dozajista souvisí s nezávislou evoluční historií této oblasti. Prokazatelně zde totiž bylo v době zalednění Evropy mírnější klima a proto se sem některé druhy stahovaly. Kavkazský region tedy může být potenciálním refugiem jako v případě strakapouda velkého *Dendrocops major* (Zink et al. 2002a), střízlíka obecného *Troglodytes troglodytes* (Drovetski et al. 2004a), konipase bílého *Motacilla alba* (Pavlova 2005b) a lejska malého *Ficedula parva* (Zink et al. 2008). Region lze proto považovat za možný *hot-spot* ptačí diverzity. Je na místě jistě poznamenat, že i v již dříve zmiňované studii od Pavlové et al. (2005a) se Kavkaz zdá být jasně geneticky oddělen od zbývajících areálů výskytu hýla rudého. V budoucnu by tento fakt mohl mít za následek odštěpení této populace a možnou speciaci.

Otázka současných procesů, které působí na genetickou strukturu populací jednotlivých druhů, je ale často dost opomíjená. Migrace totiž může působit jako faktor proti vlivům selekce a driftu. Snižuje divergenci mezi populacemi a ovlivňuje zcela zásadně jejich genetickou strukturu. Většina soudobých fylogeografických prací se zaměřila na sedentární

ptačí druhy. Existuje však i omezený počet studií zabývajících se dálkovými migranty jako jespák obecný *Calidris alpina* (Wenink et al. 1993), rákosník velký *Acrocephalus arundinaceus* (Bensch & Hasselquist 1999, Hansson 2000, Yohannes 2008), jespák rezavý *Calidris canutus* (Buehler & Baker 2003), slavík modráček *Luscinia svecica* (Zink et al. 2003), pisík obecný *Actitis hypoleucos* (Zink et al. 2008) a budníček větší *Phylloscopus trochilus* (Bensch et al. 2009). Shodné fylogeografické vzory, které by měly obecnou platnost pro migrující druh, ale nejsou dostatečně podloženy. I z tohoto důvodu by bylo vhodné podrobit užšímu zkoumání ještě další takovéto druhy. Hýl rudý *Carpodacus erythrinus* je tedy i v tomto směru dobrým modelovým druhem. Kromě faktu, že je dálkovým migrantem, je také zajímavé, že na rozdíl od většiny takto studovaných druhů, táhne na zimoviště nejspíš do jihovýchodní Asie a nikoli do subsaharské Afriky.

Je tedy zřejmé, že by bylo zapotřebí ještě prozkoumat co nejvíce ptačích druhů s širokým palearktickým rozšířením. Teprve pak je možné se pokusit stanovit obecný fylogeografický vzor, který by platil pro celou avifaunu této oblasti. Navíc je třeba rozšířit znalosti týkající se migrujících druhů a zároveň jednotlivých faktorů, které mohou mít vliv na jejich populační strukturu.

Právě z těchto důvodů byl hýl rudý vybrán jako zajímavý modelový druh. Splňuje totiž obě předchozí kritéria. Vyskytuje se v rámci kontinuálního palearktického areálu i v malých izolovaných populacích na západním okraji. Navíc některé vědecké práce naznačují, že nebyl vytlačen ze svého areálu během klimatických změn v období čtvrtohor jako ostatní druhy, ale přežil maxima zalednění v několika refugiálních populacích. Například Pavlova et al.(2005a) na základě vysoké nukleotidové diverzity soudí, že se mohlo jednat i o severská refugia. Zdá se tedy, že je tento druh velmi adaptabilní napříč širokým spektrem nadmořských výšek i teplot (Cramp & Perrins 1994). Předpokládá se ale, že svůj areál začal rapidně rozšiřovat až v 19. století. Západní hranice areálu není stálá a druh se postupně šíří do střední a západní Evropy (Józefik 1960, Jung 1983, Šťastný et al. 2006), kde vznikají právě malé izolované populace. Není však doposud zcela rozřešené z jakých oblastí zakladatelé izolovaných populací pocházejí a zda spolu populace nějakým způsobem komunikují. Samotné šíření do západních oblastí areálu je přičítáno dlouhým a relativně teplým létům, které usnadňují pronikání jednoletých samců směrem na západ. Tento trend lze nyní také pozorovat v oblasti pohoří Pirin v Bulharsku (Nikolov et al. 2008). Stejně tak se děje i u jiných druhů pěvců jako např. zvonek zelený *Carduelis chloris* (Merilä et al. 1997) či konipas obecný *Motacilla flava* (Ödeen & Björklund 2003) .

Výzkumem lze navíc volně navázat na studii Pavlové et al. z roku 2005(a), která se zaměřuje na genetickou strukturu populací hýla rudého v rámci jeho kontinuálního areálu. Ve výsledku se bude jednat o jeden z komplexnějších typů srovnání populací palearktického druhu, které v sobě zahrne jak vzorky z asijského kontinuálního areálu, tak z izolovaných populací v rámci Evropy.

I.4 CÍLE PRÁCE

Tato diplomová práce si klade za cíl :

- 1) Získat genetické informace o izolovaných populacích hýla rudého pomocí sekvencí určitých úseků mtDNA a doplnit tím znalosti týkající se širokého eurasijského areálu druhu
- 2) Zjistit míru izolovanosti i variability izolovaných populací a jejich vztahy k ostatním populacím v kontinuálním areálu
- 3) Určit z jakých zdrojů izolované populace vznikaly a zda se populace v jihozápadní části areálu průkazně liší od ostatních

II.LITERÁRNÍ PŘEHLED



Obr.1 : Hýl rudý (*Carpodacus erythrinus*) – vlevo nahoře samice odchycená v Tadžikistánu (r.2008), vpravo nahoře juvenilní samec odchycen v Bulharsku (r.2009) ,dole uprostřed adultní samec odchycen v Bulharsku (r.2009)

II.1 VÝSKYT DRUHU *CARPODACUS ERYTHRINUS* A CHARAKTERISTIKA JEHO SUBSPECIÍ

Rod *Carpodacus* spadá do jedné z čeledí pěvců, konkrétně do čeledi *Fringilidae*. Tento rod zahrnuje celkem 21 ptačích druhů s centrem rozšíření v Asii (Hudec 1983). V Evropě se vyskytuje ve dvou druzích (*C.erythrinus*, *C.rubicila*), v severní Americe pak ve třech druzích (Cramp & Perrins 1994, Černý 2004) .

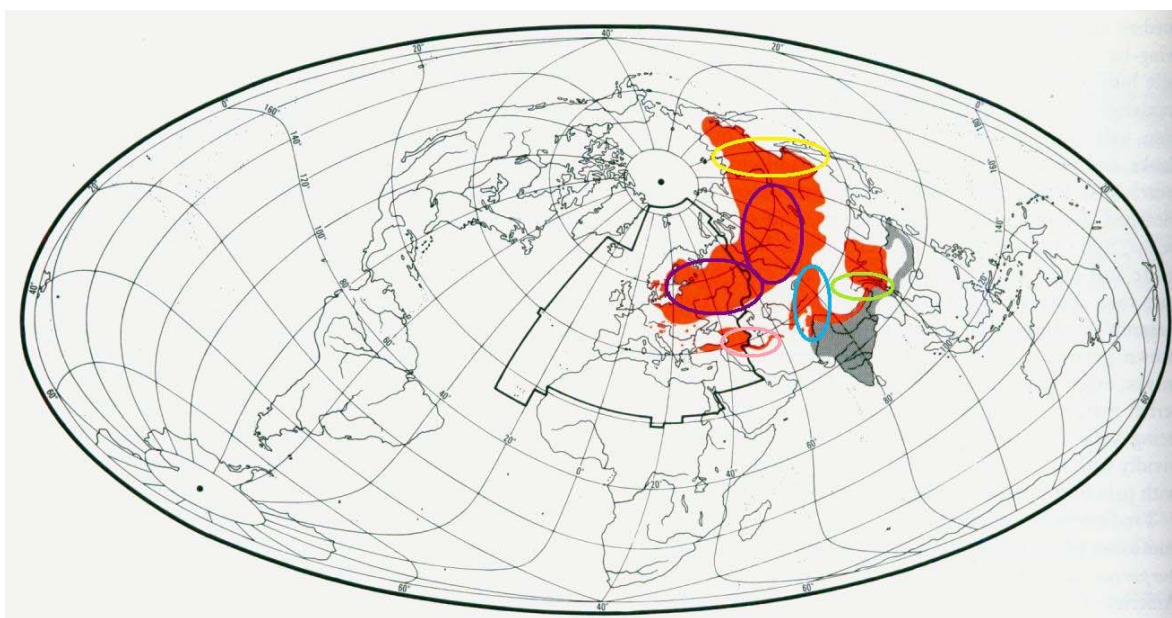
Obecně má zkoumaný druh *Carpodacus erythrinus* (viz.obr.č.1) palearktický typ rozšíření. Areál jeho výskytu lze rozdělit na dvě části. Severní část (tj. pás mezi 50°- 60° S.Š.) se rozprostírá od oblasti severní Evropy (Švédsko, Finsko) až po Kamčatku, část jižní se táhne od jihovýchodního pobřeží Černého moře a Kavkaz přes hornaté oblasti střední Asie až do severovýchodní Číny (Cramp & Perrins 1994, Pavlova 2005a). Očekávané zimoviště tohoto tažného druhu je v oblasti jižní Asie. V těchto různorodých oblastech samozřejmě obsazuje odlišné biotopy (Turček 1960, Šťastný 1991, Pavlova 2005a). Mezi severní a jižní částí areálu výskytu nejsou zjevné geografické bariéry. I přes tento fakt je kontaktní zóna zřejmě pouze v oblasti východního Kazachstánu. V současnosti není zcela jasné, zda spolu severní a jižní

oblast komunikují prostřednictvím genetického toku či nikoli (Pavlova et al. 2005a). Nejvýše položené hnízdiště tohoto druhu v Evropě bylo prokázáno v oblasti Tyrolských Alp ve výšce cca 1800 m n.m. (Dvorak 1993). U ostatních subspecií (tj.vyjma *Carpodacus erythrinus erythrinus*), které se vyskytují v oblasti střední Asie, nejsou výjimkou ani lokality položené nad 2500 m n.m. (Bozhko 1980).

V severní Americe tento druh ekologicky zastupují *Carpodacus purpureus* (Gmelin 1789) a *Carpodacus mexicanus* (Müller 1776) (Hudec 1983, Dickinson 2003) .

II.1.1 Rozšíření jednotlivých subspecií

Náš hnízdící druh *Carpodacus erythrinus* je polytypický. Dle rozdílnosti ve fenotypu rozpoznáváme 4 (Dementev 1954), popřípadě 5 (Cramp & Perrins 1994) subspecií. Jednotlivé populace subspecií obývají jak nížiny, tak vysokohorské polohy. Popis areálů subspecií je však značně obtížný a často se liší dle autora. Například Dementev (1954) uznává jako oblast výskytu subspecie *Carpodacus erythrinus grebnitski* severovýchodní část areálu druhu, Cramp & Perrins (1994) pak pobřeží Ochotského moře a Kamčatku, zatímco Stepanyan (2003) pouze Kamčatku .



Obr.č.2 : Schéma rozšíření subspecií - **fialově** *Carpodacus erythrinus erythrinus*, **růžově** *C.e.kubanensis*, **modře** *C.e.ferghanensis*, **zeleně** *C.e.roseatus* a **žlutě** *C.e.grebnitski*.

Carpodacus erythrinus erythrinus (1770 Pallas) vykazuje napříč hnízdním areálem rozšíření ostrůvkovitého charakteru. Obývá severní a střední Evropu, západní a střední Sibiř a zasahuje svým pravděpodobným zimovištěm až do Indie (Dickinson 2003). Na Altaji a severozápadě Mongolska se střetává se subspecií *Carpodacus erythrinus ferghanensis* (1939 Kozlova), na severovýchodě Mongolska s *Carpodacus erythrinus grebnitski* (1885 Stejneger). *Carpodacus erythrinus kubanensis* (1915 Laubmann) je dalším možným evropským poddruhem. Prokazatelně obývá severovýchodní Irán a část pohoří Kavkaz. Zůstává však otázkou, zda se tento poddruh nemůže rozšiřovat dále na západ tj. do oblasti Turecka a Balkánu.

Následující tři subspecie se vyskytují pouze v asijské části areálu druhu. *Carpodacus erythrinus grebnitski* se nalézá v severovýchodní Číně, v severní Koreji, na pobřeží Ochotského moře, na Kamčatce a jeho areál pokračuje až na severovýchodní Sibiř. *Carpodacus erythrinus ferghanensis* žije v oblasti severozápadního Himaláje, Pakistánu a Afganistánu. Postupně přechází v *Carpodacus erythrinus roseatus* (1842 Blyth), který je rozšířen od východního Himaláje, přes východní Tibet až po západní Čínu (Cramp & Perrins 1994, Dickinson 2003). V současné době však neexistují studie, jenž by jasně a striktně stanovily geografický rozsah jednotlivých subspecií ani jejich přesná zimoviště (viz.obr.č.2) například s pomocí vhodného genetického markeru.

II.1.2 Migrace a zimoviště subspecií

Jako jeden z mála druhů z čeledi pěnkavovitých je hýl rudý přísně tažný. Usuzuje se, že je jedním z celkem sedmi druhů záposibiřských pěvců, kteří mají tzv.migrační rozhraní (*migration divide*). Migrační rozhraní vzniká v případě, kdy se směry migrací jednotlivých příbuzných populací rozcházejí (Berthold 2003). Znamená to tedy, že například dvě subspecie hnízdící v přilehlých východních a západních oblastech Sibiře vykazují odlišné tahové směry při cestě na zimoviště. Část populací migruje západní cestou do Indie a další z nich východní cestou do jihovýchodní Asie (Berthold 2001). Tento migrační pattern se nachází právě u hýla rudého a to u subspecií *Carpodacus erythrinus erythrinus*, která obývá západní část Sibiře a *Carpodacus erythrinus grebnitski*, která se vyskytuje ve východní Sibiři. Migrační rozhraní mezi odlišnými subspeciemi bude tedy v tomto případě ležet v sibiřské oblasti. Podobně je tomu i v případě dalších druhů jako budníček zelený (*Phylloscopus trochiloides*) a bramborníček černohlavý (*Saxicola rubicola*) (Irwin 2005).

Přesné zimoviště jednotlivých populací subspecií není prozatím známo, protože chybí zpětné nálezy ptáků ze zimovišť. Soudí se pouze, že *Carpodacus erythrinus erythrinus* táhne na zimoviště jihovýchodním směrem přes východní Evropu a střední Asii do oblasti Indie, Pakistánu a Nepálu. Ptáci se zde zřejmě zdržují od října až listopadu do března až dubna (Stjernberg 1979). Dle několika starších studií dochází u populací ze střední Evropy prvotně k odletu severovýchodním směrem (tedy do oblasti Moskvy) a teprve poté k jihovýchodnímu tahu (Józefik 1960, Bozhko 1980, Hudec 1983, Svensson 2004, Albrecht 2008). Přesná lokalizace zimovišť je ale velmi obtížná. Problémem je také přesně určit zpáteční migrační směry tahů. Z tohoto pohledu je zcela zřejmá absence studií, které se týkají chování druhu na zimovišti a především tahů zpět na hnízdiště. V 90. letech bylo dále pozorováno, že někteří jedinci mohou táhnout i do oblasti jižní Evropy. Nicméně tyto hypotézy o jižních zimovištích nejsou prozatím dostatečně podloženy (Šťastný & Bejček 1987, Hudec 1983).

O příletu na hnízdiště a průtahu je jen velmi málo přesných dat. Je známo pouze, že přílet na evropská hnízdiště je velmi pozdní a odlet zpět na zimoviště zase naopak velmi brzký. Hnízdní sezóna tohoto druhu je tedy velice krátká na rozdíl od většiny ostatních příslušníků podčeledi *Carduelinae* (Hudec 1983). Svou roli zde hraje zřejmě vzdálenost zimovišť (Cramp & Perrins 1994). Na hnízdištích v jižní a východní části evropského areálu se první jedinci objevují dříve než na západě a severozápadě. U Petrohradu se objevují první samci již v první dekádě května (Bozhko 1974), do středního Švédska přilétají kolem 28. května (Björklund 1989b) a do severních oblastí Švédska dokonce až v první dekádě června (Risberg 1970). Ze studie Stjernberga (1979) vyplývá, že první migranti do oblasti Finska přilétají již během druhého až třetího týdne května. Většina z populace však přilétá až během posledního květnového týdne. Pro střední Evropu jsou příletová data posunuta o cca tři až čtyři dny ve srovnání s jižní Skandinávií (tj. Polsko 13. – 14.5., Šumava 15. – 16.5.). Přílet samic je opožděn oproti samcům o tři až čtyři dny. Mladí samci přilétají až po samicích a proto se méně zapojují do reprodukce (Björklund 1989b, 1990).

Z výzkumu podzimní migrace vyplývá, že adultní samci odlétají z Finska během posledních deseti červencových dní a juvenilové až na přelomu července a srpna. Dospělé samice migrují jen o několik dní později než dospělí samci, ale stále dříve než juvenilové. Stejně načasování bylo pozorováno i u populací ve Velké Británii. Pelichání do dospělého šatu je úplné a probíhá v období od listopadu až do ledna (Hudec 1983). Na rozdíl od dalších

evropských zástupců čeledi *Fringlidae* adulti nepelichají dříve než dosáhnou zimovišť (Stjernberg 1979).

Dospělci vykazují vysokou míru *fidelity* tj. vracejí se k „domovské“ populaci na hnízdiště (až 80% samců a 66% samic), což vyplývá i ze studie Pavlove et al. (2005a) a Albrechta (1998). Tato věrnost hnízdišti byla prokázána i na základě forem zpěvu adultních jedinců (Martens & Kessler 2000). Výše zmíněné závěry se však týkají jen adultních jedinců, u juvenilů není *fidelita* prokázána.

II.1.3 Vzájemné odlišení jednotlivých subspecií dle barevnosti

Použití barevnosti jakožto možného indikátoru jednotlivých subspecií je značně sporné a nespolehlivé. V nedávné studii Albrechta et al. (2009) bylo totiž jasně naznačeno, že zbarvení u tohoto druhu je značně proměnlivé. Vysokou variabilitu ve zbarvení samců lze totiž vysledovat již v rámci jediné lokality.

Dle dřívějších úvah by měl tedy být *Carpodacus erythrinus kubanensis* spíše světlý. Oblast břicha a boků se zdá být spíše narůžovělá a podklad je v šedohnědých odstínech. Samci jsou karmínově červení, ale méně fialoví než v případě *Carpodacus erythrinus roseatus*. *Carpodacus erythrinus ferghanensis* má červenavou hlavu a tmavší hnědý podklad než *Carpodacus erythrinus kubanensis*. *Carpodacus erythrinus roseatus* je na zádech tmavě červený. Lopatky vykazují černé pruhování a hlava je tmavě hnědá až nachová. *Carpodacus erythrinus grebnitski* leží svou tmavostí červené i hnědé a počtem proužků na letkách samic na rozhraní mezi subspeciemi *Carpodacus e. roseatus* a *Carpodacus. e. ferghanensis* (Cramp & Perrins 1994). Nicméně jak již bylo naznačeno výše, tak není toto barevné dělení subspecií zcela optimální ani dostačující.

II.2 POSTUPNÉ ŠÍŘENÍ DRUHU NAPŘÍČ EVROPOU

Jisté je, že o rozšiřování areálu druhu existovaly jen neúplné údaje. Do padesátých let dvacátého století jej bylo vcelku velmi obtížné přesně pozorovat (Turček 1960). V posledních padesáti letech je šíření druhu napříč Evropou (viz.obr.č.3, tab.č.1) již dobře dokumentováno (Šťastný & Bejček 1987, Cramp & Perrins 1994, Albrecht 1996).

Během minulého století rozšířilo mnoho odlišných ptačích druhů své výskytště napříč Evropou. Patří mezi ně i zmiňovaný *Carpodacus erythrinus* (Stjernberg 1985). Západní hranice areálu druhu prodělala v minulých dvou stoletích značné změny a není tudíž stabilní (Józefik 1960, Jung 1983, Šťastný et al. 2006). Evropská populace se během této doby výrazně zvětšila a přes jednotlivce začala obsazovat další nové lokality (Hagemeijer 1997, Albrecht 2008). Ku příkladu šíření do oblasti střední a severní Evropy nepostupovalo napříč širokým územím, ale bylo omezeno na vhodné velmi specifické lokality (Stjernberg 1985), jež jsou od dalších podobných odděleny až stovkami kilometrů (Martens & Kessler 2000). Tento fakt má za následek vznik drobných relativně izolovaných populací na jihozápadě areálu, které se poté postupně rozrůstají (Miles 1969, Hill 1986, Šťastný 1991).

V 15. a 16.století hýl rudý osidloval v Evropě zřejmě jen údolí řeky Rýn. Jak ale přesně vypadala hranice jeho areálu není bohužel známo. V následujícím století se ve střední Evropě vůbec nevyskytoval (Kinzelbach 1995). Další zmínky o výskytu ve střední Evropě pocházejí až z 18. století. Od této doby postupně expandoval směrem k západu a jihozápadu Evropy. Tato expanze probíhala posledních dvě stě let pravděpodobně ve dvou hlavních vlnách. V první z nich na počátku 19. století se hranice posunula k jihozápadu do oblasti střední Evropy (Šťastný 1991, Albrecht 1996). Dle Józefika (1960) probíhala expanze k jihozápadu (tj. střední + jihozápadní Polsko a Karpaty) ze severu, nikoli z východu, podél řek ústících do Baltského moře. Druh dosáhl až do Dolního Saska a do západních Karpat. Izolované střeoevropské populace mají tedy nejspíše původ v oblastech na severu areálu druhu. Šíření severozápadním směrem postupovalo do jižního Finska, Švédska, Norska a Dánska. Na konci století následovala regrese zpět na východ. Poté nastala druhá vlna šíření dále na jiho- i severozápad probíhající počátkem 30. let 20. století, která pokračuje ve své podstatě dodnes. Je možné ji vnímat jako jakési znovuosidlování dříve opuštěných lokalit. Bylo opět osídleno celé Finsko (Bozhko 1980), pobřeží Baltského moře na území Švédska a postupně se druh šířil i dál do vnitrozemí přes údolí řek (Turček 1960, Hudec 1983, Šťastný 1991, Cramp & Perrins 1994, Albrecht 1996).

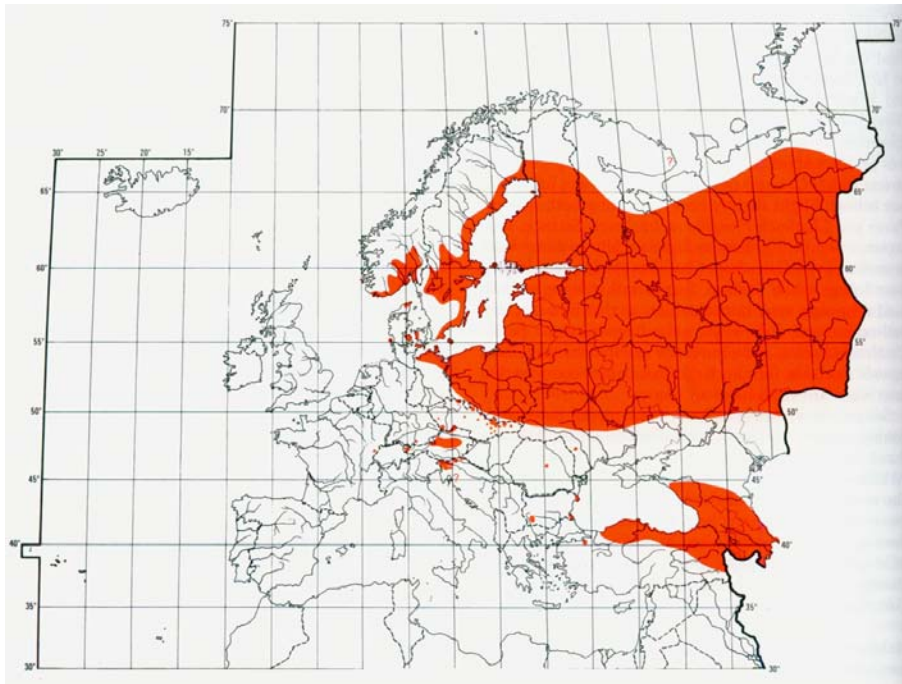


Rok	Země	Rok	Země	Rok	Země
1933	Polsko	1970	Dánsko	1983	Maďarsko
1940	Finsko	1973	Rakousko	1983	Švýcarsko
1959	Slovensko	1977	Francie	1986	Řecko
1959	Švédsko	1977	Belgie	1987	Nizozemí
1968	pobřeží Baltského moře, Německo	1982	Skotsko	1992	Anglie
1970	Norsko	1982	Holštýnsko(Německo)	2006	oblast Pirinu, Bulharsko

Obr.č.3, tabulka č.1 : Šíření hýla rudého Evropou ; zdroje Turček 1960, Risberg 1970, Bozhko 1980, Hudec 1983, Šťastný & Bejček 1987, Cramp & Perrins 1994, Šťastný 1991, Šťastný et al. 2006, Nikolov et al. 2008)

Současné šíření (viz.obr.č.4) do již zmiňovaných západních oblastí areálu je přičítáno dlouhým a relativně teplým létům. Právě ty usnadní pronikání jednoletých jedinců směrem na západ. Tito ptáci pak hrají roli jakýchsi „průkopníků“. Například v oblasti Finska se takto velmi zvýšila hnízdní úspěšnost v antropogenních biotopech (Cramp & Perrins 1994). Podobný trend lze dozajista vysledovat i z nedávné práce Nikolova et al. (2008) z pohoří Pirin v Bulharsku.

Šťastný (1991) soudí, že expanze souvisí také s vyššími teplotami na jaře. Toto oteplení totiž podpoří růst vegetace, v níž hýl rudý hnízdí a tím se zákonitě zvýší i hnízdní úspěšnost druhu. Další faktory šíření jsou samozřejmě také historie druhu (např. znovuoobsazování historického areálu), migrace, činnost člověka a samotná populační genetika druhu (Turček 1960) .



Obr.č.4 : Současné rozšíření hýla rudého v Evropě (oranžově) zdroj: Cramp et al. (1994)

Ve většině oblastí byl pozorován nárůst v počtu hnízdních párů. Například ve Finsku hnízdilo v roce 1946 celkem deset tisíc párů a koncem osmdesátých let tento počet vystoupal až na 200 – 500 tisíc párů (Stjernberg 1985, Cramp & Perrins 1994). V oblasti Švédska je patrný podobný trend tj. v roce 1959 bylo napočítáno pouze třicet hnízdních párů, ale v roce 1974 již 1400 párů (Risberg 1970).

V evropské části hnízdního areálu v období 2001 – 2003 bylo celkem zjištěno okolo tři miliónů párů hýla rudého. Do té doby (tj.v období přibližně kolem 1970 – 1990) byly stavy vesměs stabilní nebo mírně rostoucí (Šťastný et al. 2006).

Dle nejnovějších záznamů bylo pozorováno hnízdění tohoto druhu také v Bulharsku v oblasti pohoří Pirin. Jedná se o hnízdní populaci odhadnutou na 10 – 50 párů (Kostadinova 2007). První pozorování ve zmiňované lokalitě bylo zaznamenáno již před 26 lety, ale od této doby zde nebyl druh spatřen. Stalo se tak až v červnu 2006 a červenci 2007, kdy byl druh lokalizován v antropogenní krajině stejného typu jako v mnoha dalších oblastech areálu výskytu (Nikolov et al. 2008). To by naznačovalo stále trvající expanzi hýla rudého v Evropě.

II.3 ŠÍŘENÍ NA NAŠEM ÚZEMÍ

Hýl rudý byl dříve v oblasti střední Evropy považován za velmi vzácný druh. V posledních bez mála padesáti letech však na našem území pravidelně hnízdí. Střední Evropa tvoří západní okraj jeho areálu. Početnost v této oblasti postupně stoupala (Hudec 1983, Šťastný & Bejček 1987). V oblasti České republiky obsazuje široké spektrum biotopů – od lesů na východě až po otevřenou krajinu. Vyhledává však spíše vlhké lokality (např. Vltavský luh – viz diplomová práce Albrechta z roku 1998). Dá se ale spatřit i v blízkosti lidských sídel či ve vyšších polohách nad hranicí lesa (Hudec 1983, Cramp & Perrins 1994, Hagemeyer 1997). Výsledkem tohoto hnízdního trendu je fakt, že hýl rudý neobsazuje území rovnoměrně a jeho výskyt má spíše ostrůvkovitý charakter. Populace jsou rozděleny do malých skrytých skupin. Ty jsou od sebe navzájem izolovány. Na mnoha místech jsou tyto skupiny pouze ve zvukovém kontaktu (Martens & Kessler 2000). Ke hnízdění jednotlivých malých populací dochází především ve vyšších nadmořských výškách jako je tomu v oblasti Krkonoš, Šumavy a Jeseníků (Cramp & Perrins 1994, Martens & Kessler 2000). Není však doposud zcela jasné z jaké oblasti zakladatelé těchto populací pocházejí a zda spolu jednotlivé populace nějakým způsobem komunikují na úrovni genů.

II.3.1 Expanze druhu na území České a Slovenské republiky

První výskyt hýla rudého patřícího k východosibiřským faunistickým prvkům se datuje do roku 1845. Stalo se tak v Novej Lesnej ve Vysokých Tatrách (Turček 1960). První prokázané hnízdění zmiňovaného druhu na území bývalé ČSSR bylo zaznamenáno v roce 1946. Jednalo se o pár ptáků hnízdící v Tisovci na Slovensku (Hudec 1983). Poté druh postupoval dále směrem na jih (Mühlstein 1979). V roce 1959 následovalo další prokázané hnízdění a to na několika lokalitách u Liptovského Hrádku v oblasti Liptovské kotliny, opět ve Vysokých Tatrách. V této oblasti se druh vyskytoval v povodí Váhu v porostech vrby či lísky s bohatým zastoupením bylinného patra. Osídlený biotop se velmi podobá lužním oblastem v jižních Čechách, kde se druh nyní také vyskytuje. Naproti tomu na dalším místě - v oblasti Oravské kotliny - se vyskytoval v submontánní výškové zóně s odlesněným okolím. Zde byla vlhkomilná vegetace vytvořena až druhotně z bylinného patra, nezapojené složky dřevin a solitérních smrků, které samci využívají ke zpěvu z vyvýšeného místa (Turček 1963). Od této doby se hýl rudý Slovenskem postupně šířil (Feriancová 1959, Turček 1960, Štollmann 1967, Darola 1977).

V České republice jsou místy pravidelného hnízdění Šumava, Krkonoše a Hrubý Jeseník (Šťastný 1987). V polovině dvacátého století se druh šířil naším územím od severovýchodu (Lemberk 1995). Vůbec první zahrnutí proběhlo v Tovačově na Moravě roku 1962 (Kozák 1963). Bylo následováno v roce 1968 hnízděním u Bohumína (Kondělka 1970), r.1969 v Hrubém Jeseníku (Beneš 1971), r.1969 u Vrbna (Beneš 1971), r.1970 u Malé Morávky a v různých částech Českomoravské vrchoviny (Souček 1992) .

První případ hnízdního výskytu druhu nad hranicí lesa byl pozorován roku 1968 v Krkonoších (1305 m n.m.), kde se od té doby v klečovém porostu vyskytuje pravidelně (Miles 1987).

V roce 1975 následovalo zahrnutí u Želnavy (Lipno) na Šumavě (Šťastný 1991), 1977 v Železné Rudě (Mühlstein 1979), Dačicích a Slavonicích (Prokop 1986). Odtud probíhalo další šíření do přilehlých oblastí na jihu (Třeboň, Písek) a na západě (Strakonice). Během těchto let tedy vznikala plošně i početně významnější hnízdiště, z nichž se poté druh šířil po celé České republice (Šťastný et al. 2006) .

V roce 1973 osidluje taktéž západní okraj Lužických hor (Šluknovský výběžek), který je výchozím bodem pro šíření do oblasti Orlických hor a Českomoravské vrchoviny (Šťastný 1991). Následuje roku 1974 osídlení Vrchlabí a Svitav, oblasti podhůří Orlických hor, Poličky a v roce 1978 Deštné v Orlických horách (Bělka 1979). V osmdesátých letech dochází ke spojení orlické a jesenícké populace přes Kralický Sněžník. Jeseníky jsou centrem šíření dál do severovýchodních Čech (Vidnava, Bruntál, Rýmařov) .

Druh se následně šíří opět na Ostravsko, kde zahrnutí roku 1979 na Frýdecko – Místecku (Šťastný & Bejček 1987), 1981 u Ostravice a roku 1984 v povodí Odry. Následují Moravskoslezské Beskydy v roce 1979 a Českomoravská vrchovina, kam se druh šíří z již zmiňovaného Svitavska. Roku 1986 obsazuje Přibyslav, Žďár nad Sázavou a Jihlavu a odsud se šíří dál do Železných hor (Šťastný 1991).

V osmdesátých letech je taktéž obsazeno Podkrušnohoří (1986). První hnízdění bylo zaznamenáno v západní části (Ostrov nad Ohří) roku 1984 a ve východní části v oblasti Černic roku 1985 (Šťastný & Bejček 1987). Dále následují již pouze Doupovské hory (1987) (Bušek 1990) a roku 1989 podhůří Jizerských hor. V devadesátých letech je druh doložen i u Nemanic v Českém lese. Tato oblast byla možná již dříve lokalitou výskytu, ale vstup do pohraničí byl v minulosti značně omezen (Šťastný 1991).

Většina evropských hnízdišť leží v nížinách do 200 m n.m.. Hýl rudý expanduje jen zřídka až do výšek okolo 1850 m n.m. (Risberg 1970, Stjernberg 1985). V případě České republiky

hnízdí nejvýše v Krkonoších a to od 400 m n.m. do 1430 m n.m., dále v Jeseníkách do 1350 m n.m., na Šumavě do 1020 m n.m., v Orlických horách do 1000 m n.m., v Krušných a Jizerských horách do 970 m n.m. (Šťastný et al. 2006).

II.3.2 Početnost druhu

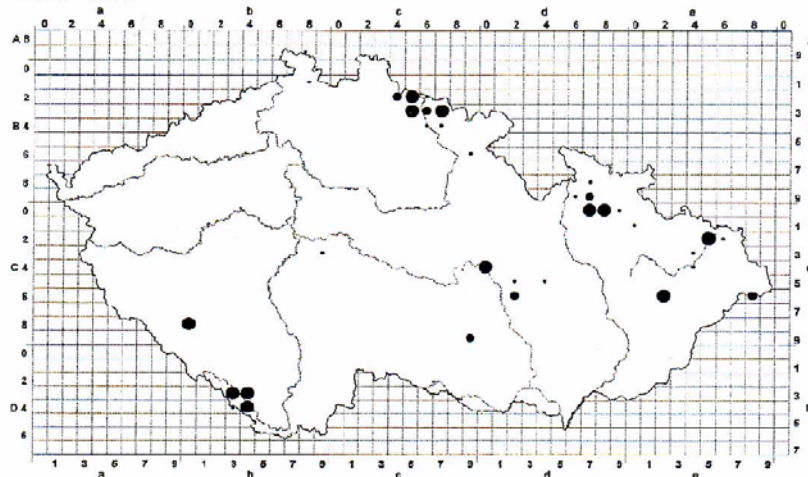
Nárůst početnosti druhu v České republice je za posledních čtyřicet let značný. Velikost populací se mnohonásobně zvětšila. Dle odhadů se na území České republiky nacházelo v letech 1973 – 1977 asi jen 30 – 50 párů (viz.obr.č.5) (Šťastný & Bejček 1987).

V období 1985 – 1989 se druh vyskytoval pravidelně v několika centrech v počtu 350 – 450 párů. Tato centra se stále zvětšovala a hnízdní hustota v nich stoupala (Šťastný 1991, Šťastný & Bejček 1997). Jedná se o Krkonoše a Jizerské hory (40 - 60 párů), Šumavu (80 - 100 párů), Českomoravskou vrchovinu (20 - 30 párů), Orlické hory (10 - 20 párů), Jeseníky (60-80 párů), Ostravsko (50 - 70 párů) a Podkrušnohoří (5 - 15 párů).

Mezi roky 1993 a 1995 stavy dosahovaly ve východních Čechách 450 - 500 párů (Lemberk 1995), v jižních Čechách 250 - 350 párů a v Krkonoších 260 - 460 párů. Většina populace na Šumavě se vyskytovala ve výšce 600 - 900 m n.m. (viz.obr.č.6). Svou roli ve zvětšování populace hrály s největší pravděpodobností krajinné změny v devadesátých letech minulého století. Přibylo neobhospodařovaných pozemků, které zarostly křovinami. Ty pak vytvořily vhodné lokality pro zahnízdění druhu stejně jako tomu bylo dle Stjernberga (1985) ve Finsku v první polovině dvacátého století. Docházelo i k expanzi mladých jedinců podél vodních toků ze Šumavy směrem do vnitrozemí (Albrecht 1996).

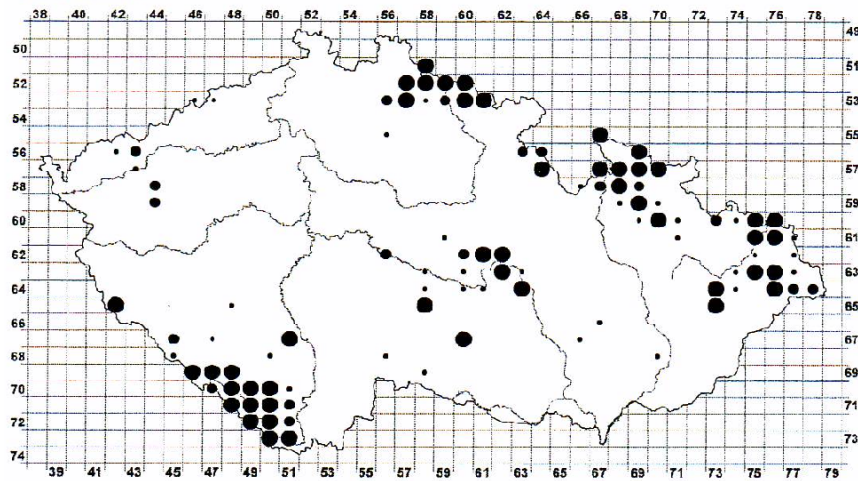
Dle posledního sčítání 2001 - 2003 dosahují stavy hýla rudého v České republice již 1300 až 2000 párů (viz.obr.č.7) (Šťastný et al. 2006). Druh se nadále vyskytuje především v již dříve zmiňovaných hlavních centrech (Šumava, Krkonoše, Jizerské hory, Orlické hory, Podkrušnohoří, Českomoravská vrchovina, Jeseníky a Ostravsko).

1973–1977

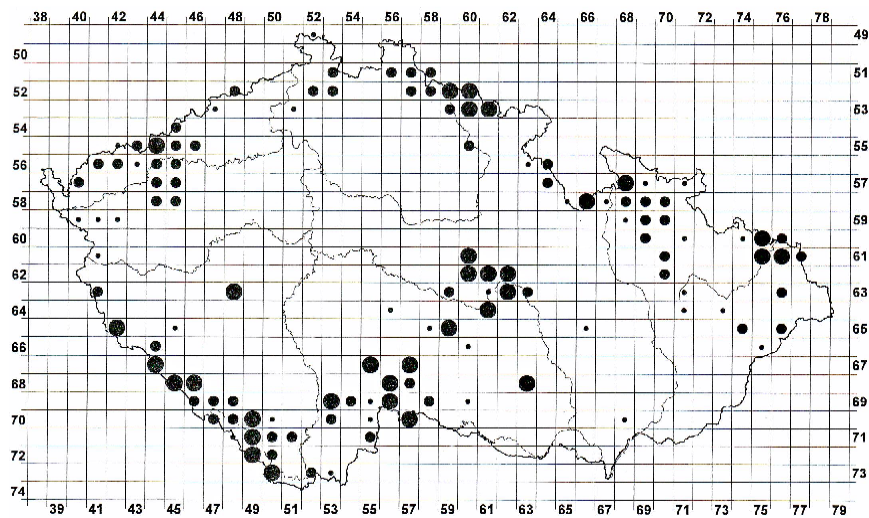


Obr.č.5 : Výskyt druhu *Carpodacus erythrinus* v České republice v letech 1973 – 1977 (zdroj : Šťastný et al. 2006)

1985–1989



Obr.č.6 : Výskyt druhu *Carpodacus erythrinus* v České republice v letech 1985 – 1989 (zdroj : Šťastný et al. 2006)



Obr.č.7 : Výskyt druhu *Carpodacus erythrinus* v České republice v letech 2001 – 2003 (zdroj : Šťastný et al. 2006)

Na základě mezinárodního síťového mapování (Šťastný & Bejček 1987, Šťastný 1991, Šťastný et al. 2006) je patrné, že k nejprůkaznějším změnám v obsazení kvadrátů (tj. v počtu čtverců mapové sítě na území České republiky, v nichž byl druh zaznamenán) došlo mezi prvním (r.1973) a druhým (r.1985 - 1989) sčítáním. Šlo o vzestup ze 4% (tj.34 obsazených kvadrátů) na 16% (tj.102 kvadrátů). V letech 2001-2003 početnost druhu dále stoupala především díky propojení šumavských lokalit přes Českobudějovicko, Třeboňsko, Jindřichohradecko s Českomoravskou vrchovinou. Obsazenost kvadrátů v této době dosáhla 20% (tj.124 kvadrátů). Na západě je patrná stoupající tendence v obsazování kvadrátů (Krušné hory a Doupovské hory, Český les). Tento trend naopak nevykazuje Českomoravská vrchovina, kde se obývaná plocha zmenšila z 28% (r.1989) na 16% (r.2003). V této oblasti však zároveň klesala také početnost druhu.

III. MATERIÁL A METODIKA

Během své diplomové práce jsem analyzovala krevní a tkáňové vzorky hýla rudého *Carpodacus erythrinus* ze sbírek Laboratoře pro výzkum biodiverzity (katedra zoologie PřF UK v Praze), které byly získány v letech 2000 – 2009 v rámci několika projektů a díky mezinárodní spolupráci. Vzorky z kaliningradské oblasti poskytla Asta Krizanauskiene (Institut ekologie, Univerzita Vilnius, Litva) a vzorek z Pakistánu byl získán z muzejních sbírek Burkeho muzea (Washingtonská Univerzita, Seattle, USA). Všechny vzorky byly nashromážděny během hnízdní doby hýla rudého. Metodika odchyty a odběru krevních vzorků je více popsána v diplomových pracích zabývajících se různými aspekty biologie hýla rudého na jednotlivých studovaných lokalitách (Schnitzer 2003, Vinkler 2007). Po odběru byla krev uchována v 96% etanolu.

V mé diplomové práci bylo tedy nově analyzováno celkem 82 vzorků ze 13 izolovaných lokalit (viz. tab.č.2).

STÁT	OBLAST	ROK ODCHYTU	ZEMĚP.ŠÍŘKA	ZEMĚP.DÉLKA	POČET VZORKŮ
Česká republika	Želnavá, Šumava	2000/2007	48°48' N	13°57' E	30
	Rychtářky, Žďárské vrchy	2005/2007	49°40' N	16°05' E	18
	Orlické záhoří, Orlické hory	2005	50°16' N	16°28' E	2
Švédsko	Götaälv	2007	57°53' N	12°01' E	4
Tádžikistán	Lyangar	2008	37°47' N	72°41' E	1
	Dzhaushangoz		37°21' N	72°28' E	1
Litva	Rybachiy	2003/2004	55°09' N	20°50' E	12
Bulharsko	Stara Planina	2009	42°43' N	24°58' E	3
	Razlog		41°52' N	23°26' E	3
Turecko	Pisenkaya	2009	40°57' N	41°16' E	4
	Aksu		41°14' N	36°18' E	2
	Cambasi		40°39' N	37°56' E	2
Pakistán	Yakh Tangai Sar	1990	34°0' N	72°40' E	1

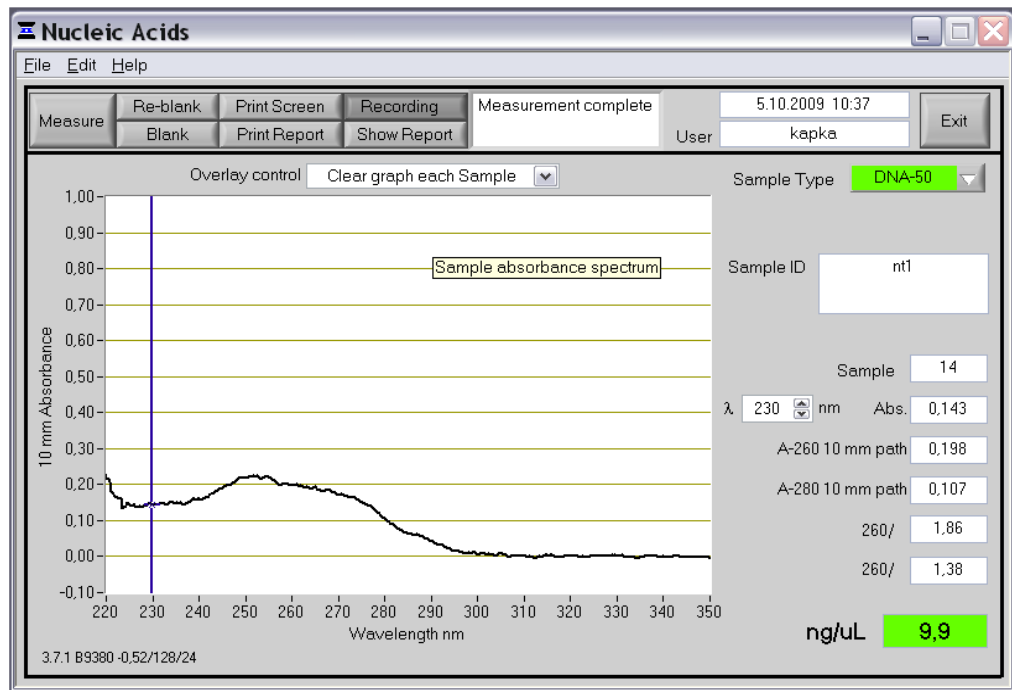
Tab.č 2 : Studované lokality se svými zeměpisnými souřadnicemi, rokem odchyty a celkovým počtem analyzovaných vzorků

III.1 IZOLACE DNA

Izolace DNA byla prováděna ze dvou zdrojů. Buď z krevních vzorků konzervovaných v 96% ethanolu skladovaných při 20°C nebo ze vzorků peří. V případě prvního zdroje bylo sterilními nástroji odebráno 5-10 mg sražené krve, která byla poté důkladně vysušena. Následně z ní byla izolována a purifikována DNA pomocí DNeasy® Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo). U vzorků z lokality „Orlické Záhoří“ bylo jako zdroj DNA použito peří odchycených jedinců. Z jednotlivých per bylo sterilními nůžkami odstřiženo přibližně 5mm z hrotu. Z této části byla izolována DNA kitem QIAmp® DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle protokolu výrobce. Získaná DNA byla uchovávána při teplotě – 20°C.

III.2 KONTROLA KVALITY DNA

Koncentrace a čistota vyizolované DNA byla změřena pomocí spektrofotometru NanoDrop®ND-1000 (Isogen Life Science, Utrecht, Nizozemí) (viz. obr.č.8). Naměřená koncentrace se u většiny vzorků pohybovala mezi 5-10 ng/μl. Jen občas se výrazně odchýlila a to jak k vyšším, tak i k nižším hodnotám. Vzorky s koncentrací 5-10 ng/μl byly použity přímo pro PCR reakci. Vzorky s koncentrací vyšší než 5-10 ng/μl byly naředěny vodou přibližně na ideální koncentraci (nejčastěji v poměru 4μl DNA ku 6 μl H₂O). U nižších koncentrací se občas vyskytovalo znečištění v oblasti vlnové délky 230 nm způsobené zřejmě fenoly či jejich sloučeninami a dále znečištění v oblasti vlnové délky 280nm způsobené peptidy s vysokým podílem aminokyselin. Vzorky s koncentrací výrazně nižší než 5-10 ng/μl byly (bylo-li to možné vzhledem k množství dalších dostupných vzorků z lokality) vyloučeny z dalšího zkoumání. U většiny vzorků se však objevil jasně rozpoznatelný *peak* v oblasti 260nm vlnové délky, což odpovídá nukleovým kyselinám.

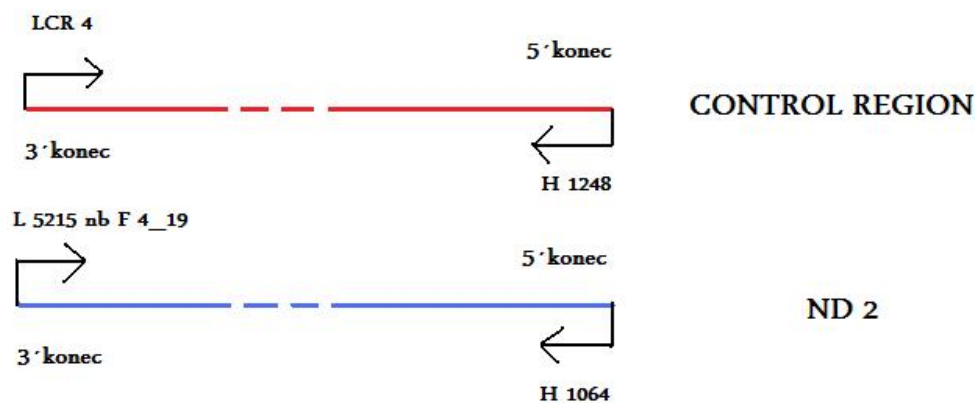


Obr. č.8 : Výstup ze spektrofotometru ukazující naměřenou koncentraci DNA

III.3 POYLMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR), VÝBĚR VHODNÝCH PRIMERŮ

III.3.1 Protokol k PCR použité v této diplomové práci

V mé diplomové práci byly užity v první fázi k PCR celkem čtyři primery (viz. obr.č.9). Primery L5251 (5'-TATCGGGCCCATACCCCGAATAT-3') (Hackett 1996) a H1064 (5'-CTTTGAAGGCCTTCGGTTTA-3') (Drovetski et al. 2004b) amplifikující gen podjednotky II NADH dehydrogenázy (dále jen ND2) a primery LCR4 (5'-CTCACGAGAACCGAGCTACT-3') (Tarr 1995) a H1248 (5'-CATCTTCAGTGTTCATGCT-3') (Tarr 1995) amplifikující kontrolní oblast (dále jen CR) mitochondriální DNA hýla rudého *Carpodacus erythrinus*. I když se zdá princip PCR metody jednoduchý, praxe je často bohužel jiná. Výsledek ovlivňuje mnoho spolupůsobících faktorů. Je tedy nutné konkrétní hodnoty jednotlivých parametrů empiricky vyzkoušet. Během své práce jsem tedy v případě některých vzorků došla k potřebě navrhnout s pomocí programu Primer 3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>) další primer pro ND2 a to F4_19 (5'-CGGGCCCATACCCCGAATA-3').



Obr.č.9 : Schématické znázornění použitých kombinací primerů zvlášť pro kontrolní oblast (červeně) a pro gen ND2 (modře).

Primery byly ze zásobního roztoku (koncentrace 100pmol/μl = 0,1mM) naředěny v poměru 1: 9 roztokem TE či redestilovanou vodou. PCR jsem provedla v celkovém objemu 30μl na jeden vzorek. Použila jsem tedy 10μl DNA a 20μl reakční směsi. Reakční směs jsem namíchala v následujícím poměru: 8μl redestilované vody, 3μl PCR pufru (složení 50mM KCl, 10mM Tris-HCl pH=9,1%), 3μl dNTPs (koncentrace 2mM), 1,8μl MgCl₂ (25mM), 2μl *forward* primeru, 2μl *reverse* primeru a 0,2 *Taq* polymerázy.

III.3.2 Kroky PCR

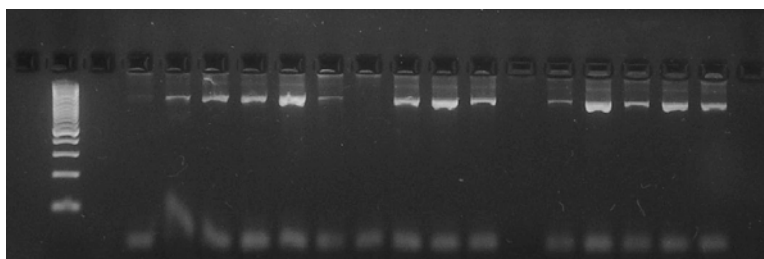
Podmínky PCR reakce se samozřejmě lišily dle zkoumaného úseku mtDNA. Reakce probíhala dle parametrů ze studie Pavlové et al. 2005a.

Cyklus pro CR se skládal z 1 minuty denaturace při 94°C, 1 minuty nasedání primerů na templát DNA (annealing) při 50°C a 1 minuty syntézy řetězce DNA (elongace) při 72°C. Celý cyklus byl opakován 34-krát. Finálním krokem byla extenze trvající 10 minut při 72°C.

V případě ND2 byly parametry pozměněny. Na počátku byla nastavena denaturace trvající 2,5 minuty při 95°C, následovalo 40 cyklů zahrnujících 30 sekund denaturace při teplotě 94°C, 30 sekund annealingu při 55°C a 1 minutu extenze při 72°C. Program byl opět ukončen extenzí trvající 10 minut při 72°C. Všechny PCR reakce byly prováděny v termocyklerech iCycler (Biorad, Herkules, USA) a Mastercycler (Eppendorf, Německo).

III.4 KONTROLA SPRÁVNÉHO PRŮBĚHU PCR

Hrubé rozdělení fragmentů DNA dle velikosti a tím i kontrola výsledku PCR je možná s pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Použila jsem tedy 2% agarózový gel. Elektroforéza připojená ke zdroji běžela na 100V po dobu 30 minut. Během této doby migrují vzorky DNA směrem ke kladné elektrodě a dělí se dle velikosti. Po dokončení elektroforézy lze pozorovat vzorky na gelu v UV světle díky navázanému fluoreskujícímu etidium bromidu jako světlé proužky na tmavém podkladě (viz.obr.č.10).



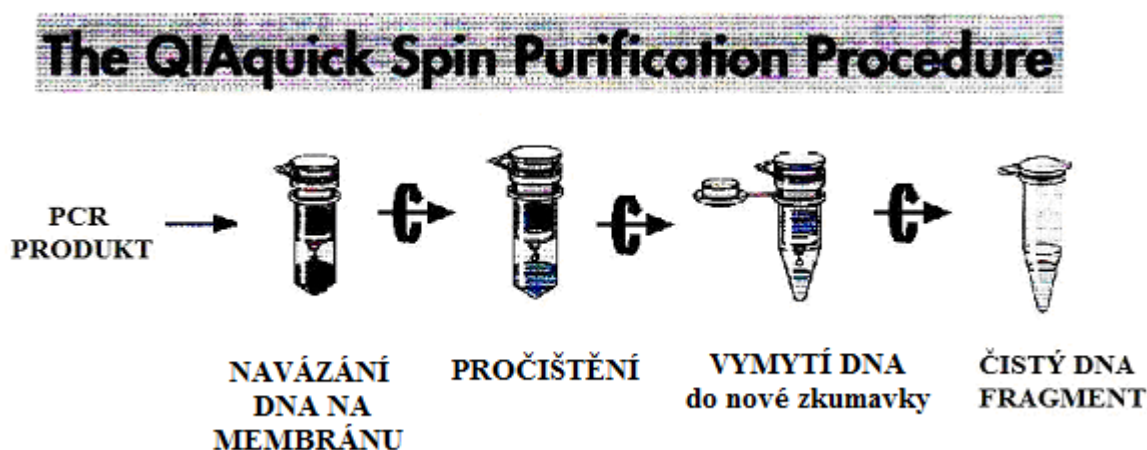
Obr.č.10 : Fotografie gelu pod UV osvětlením. Jsou patrné pozitivní a negativní (1., 7. ,11.) vzorky pro ND2 a standard (zcela na straně vlevo).

Vzorky jevící se jako pozitivní (tj. proběhla správná amplifikace) jsem poté rovnou použila v dalším kroku své práce. Vzorky negativní bylo nutné podrobit opakované PCR. U této opakované PCR bylo často potřeba změnit některé z parametrů tak, aby tentokrát reakce již proběhla hladce a s dobrým výtěžkem. Z tohoto důvodu bylo potřeba navrhnout další primer pro gen ND2 (viz. výše) a často také vyzkoušet různou koncentraci DNA u špatně fungujících vzorků.

Při molekulární diagnostice je poměrně časté, že metody zavedené v konkrétní laboratoři je náročné adaptovat i v jiné laboratoři. A to i za předpokladu, že probíhají podle identického protokolu. Proto jsem byla nucena podmínky našich reakcí oproti původnímu protokolu (Pavlova et al. 2005a) v průběhu jednotlivých fází práce mírně upravovat. Ve výše uvedené metodice je popsán již upravený protokol, podle něhož probíhala PCR právě v této diplomové práci.

III.5 PROČIŠTĚNÍ VZORKŮ Z PCR, PŘÍPRAVA NA SEKVENACI

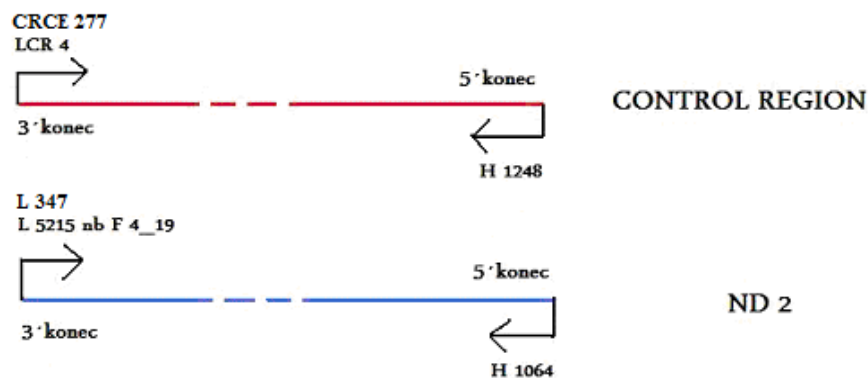
Všechny pozitivní PCR vzorky o objemu zhruba 25µl jsem pročistila pomocí QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo) dle návodu od výrobce. Tato sada umožňuje přímou purifikaci PCR produktů pomocí membránových zkumavek s využitím mikrocentrifugy a speciálních pufrů. Během jednotlivých reakcí je DNA očištěna od zbytků primerů použitých při PCR, dále také od nukleotidů, polymerázy a solí (viz.obr.č.11).



Obr.č.11 : Schéma kroků vedoucích k pročištění PCR vzorků dle QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Německo)

V dalším kroku je třeba přidat primer, přes nějž bude probíhat vlastní sekvenace (viz.obr.č.12). Jednotlivé úseky mitochondriální DNA jsem osekvenovala z obou stran řetězce. Použité primery byly pro kontrolní oblast oba amplifikující (již výše zmíněné při PCR) a navíc nový primer CRCE277 (5'- TTTTCCAAATCATTCATCATCA – 3'), který jsem oproti původnímu protokolu (Pavlova et al. 2005a) byla nucena navrhnout pro lepší sekvenaci (opět s pomocí programu Primer 3 viz.výše). V případě genu ND2 se opět jednalo o primery použité při amplifikaci a dále byl použit primer L347 (5' - CCATTCCACTTCTGATTCCC – 3') (Drovetski et al. 2004a).

Do směsi připravené na sekvenci jednoho vzorku jsem tedy přidala pročištěný PCR produkt v různém množství v závislosti na síle jeho signálu viditelného na gelu – v zásadě tedy 5µl v případě silného signálu a 10 µl u vzorku se slabším signálem. Dále jsem dodala nařazený primer a to každý ze zmíněných zvlášť v množství 1,2µl. Vše jsem poté doplnila vodou na celkový reakční objem 14µl.



Obr.č.12 : Schématické znázornění prumerů použitých pro sekvenaci

III.6 SEKVENACE, EDITACE SEKVENCÍ

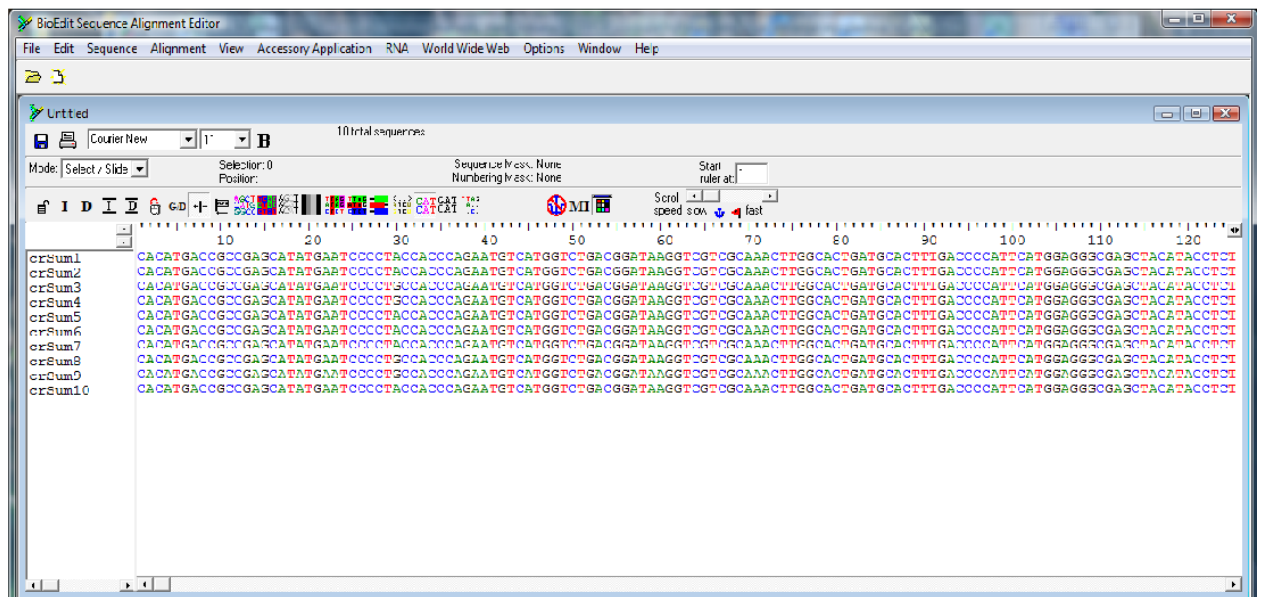
Srážecí a sekvenační reakce (kit BigDye® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, Lincoln, USA) byly provedeny v Laboratoři sekvenace PŘFUK, kde byla uskutečněna i samotná sekvenace (sekvenátor 3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems).

V případě mé práce jsem tedy nakonec ze všech tří komplementárních sekvencí detekovaných s pomocí sekvenátoru vytvořila *contigy* pro jednotlivé zkoumané úseky. Tedy na každý samostatný vzorek připadají dvě kompletní sekvence – jedna pro kontrolní oblast a druhá pro gen ND2. Sekvence jsem skládala pomocí programu DNA Baser (Heracle Software, Lilienthal, Německo) (viz.obr.č.13).



Obr.č.13 : Skládání sekvencí v programu DNA Baser

Vzniklé *contigy* jsem poté editovala a alignovala v programu BioEdit 7.0.9.0. (Hall 1999) s pomocí ClustalW (Thompson et al. 1994) (viz.obr.č.14).



Obr.č.14 : Ukázka editace a alignmentu sekvencí v programu BioEdit

III.7 ANALÝZA DAT

Celkem jsem získala 164 sekvencí. Osekvenované úseky mitochondriálního genomu jsem upravila na výslednou délku 495 bází v případě CR a 1029 bází u ND2. Pro potřebu některých z analýz jsem použila také sekvence druhu pocházející z práce Pavlové et al.(2005a), které jsou uloženy v genetické bance (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

Model evoluce sekvencí byl zjištěn v programu jModelTest 0.1 (Posada 2008) za použití Akaiikova (AIC) kritéria. Pro *control region* byl jako nejvhodnější vybrán model GTR+I+G, pro gen ND2 pak model TrN+I+G (Possada & Crandall 1998). TrN+G je submodelem *general-time reversible* modelu, v němž jsou transverze posuzovány stejnou měrou a je rovněž zahrnut gamma-model substitucí (Rodriguez et al. 1990). Výsledný strom jsme odhadli na základě sofistikované Bayesiánské analýzy pomocí programu Mr.Bayes 3.1.2 (<http://mrbayes.csit.fsu.edu>; Ronquist & Huelsenbeck 2003), kde bylo ovšem potřeba zohlednit rozdílnou rychlost evoluce obou úseků. V tomto programu jsme spustili naráz dva běhy analýz se čtyřmi řetězci. Protože byly jednotlivé běhy příliš dlouhé (šedesát miliónů generací), rozhodli jsme se zapisovat pouze každou tisícovou generaci (strom). Frekvence splitu bází byly přibližně 0,014045, tedy zaokrouhleně 0,01, jak se uvádí v manuálu. Dle manuálu bylo posléze prvních 25% navržených stromů vypuštěno z analýzy. Finální strom

tedy vznikl odpálením prvních 15 000 uložených stromů (tzn. po odpálení 15 miliónů generací). Pravděpodobnostní odhady byly vypočítány na základě zbývajících generací. Jediný konsenzuální strom byl poté vizualizován a upraven v programu Dendroscope 2.4 (Huson 2007).

Pro vizualizaci vztahů mezi haplotypy byly použity dva dostupné programy. V programu Network 4.5.1.6 (<http://www.fluxus-engineering.com>) byla metodou *Median-joining* (Bandelt et al. 1999) vytvořena haplotypová síť, která umožňuje identifikovat ancestrální i odvozené haplotypy a jejich skupiny. Pro podporu a ověření zjištěných vztahů byl použit také program TCS 1.21 (Clement et al. 2000).

Základní představu o diferenciaci lze odvodit pomocí statistik, jenž popisují genetickou variabilitu v námi zadaném datasetu. Nejjednodušším odhadem genetické proměnlivosti je počet segregujících (polymorfních) míst. Tato veličina vyjadřuje počet míst s odlišnými sekvencemi nuklotidů ve vzorku sekvencí.

Další možností, jak odhadnout polymorfismus DNA, je určit průměrný počet rozdílných nukleotidů mezi dvěma sekvencemi DNA. Jedná se tedy o stanovení nukleotidové diverzity (π). Její odhad dostaneme jako standardizaci průměrného počtu párových nukleotidových rozdílů (Π) přes celkovou délku sekvence (L). V neposlední řadě lze také určit haplotypovou diverzitu (h). Pokud v závěrečném hodnocení dosáhne námi zvolený soubor dat vysoké haplotypové (h) i nukleotidové (π) diverzity, pak to odpovídá dlouhodobě velké populaci. Oproti tomu nízké hodnoty nukleotidové diverzity naznačují spíše recentní expanzi.

K rekonstrukci demografických procesů, které v minulosti proběhly ve zkoumané populaci, mohou sloužit různé přístupy. K odhadu změn velikosti populace v minulosti byla použita metoda *mismatch distribution* (Schneider 1999), která porovnává pozorované frekvence párových distancí s očekávanými distancemi dle demografického modelu. V případě exponenciálního růstu populace je předpokládána jednovrcholová (unimodální) křivka distribuce. Naopak vícevrcholová (multimodální) distribuce je očekávána v případě, kdy se populace blíží k rovnováze mezi genetickým driftem a mutacemi. Model je založen na celkem třech parametrech. První z nich – parametr tau (τ) – slouží k určení času expanze. Je měřen v mutačních jednotkách. Lze jej vyjádřit jako $\tau = 2ut$, kde t je čas v generacích a $u = \mu k$, kde μ je mutační rychlost a k je délka sekvence (Rogers & Harpending 1992). Vyšší hodnota τ samozřejmě značí relativně delší časový úsek, který uplynul od expanze populace. Další

z parametrů popisujících distribuci jsou výchozí *théta* (značeno θ_0 , před populačním růstem či poklesem) a konečná *théta* (značeno θ_1 , po populačním růstu či poklesu). Vzorcem lze tento parametr obecně vyjádřit jako $\theta = 2N\mu$, kde N je efektivní velikost populace a μ mutační rychlost (Watterson 1975). Rozdíl mezi θ_1 a θ_0 poté umožní relativní představu o tom, zda populace expandovala či nikoli. K hodnocení dat jsme použili statistiku založenou na metodě nejmenších čtverců. Ta zhodnotí odchylky okolo křivky *mismatch distribution*. Snažíme se tedy prokázat, zda je křivka zkonstruovaná z pozorovaných dat stejná jako ta z dat simulovaných modelem. Pokud tato statistická hodnota vyjde signifikantně, pak to znamená, že je pozorovaná křivka průkazně odlišná od té simulované a data tedy nejsou v souladu s náhlou populační expanzí (Excoffier et al. 2005).

V návaznosti na odhady změn velikosti populace přes *mismatch distribution* byly stanoveny také parametry prostorové expanze. Jednalo se tedy zaprvé opět o čas expanze tau (τ). Vyjádřen je jako $\tau = 2T\mu$, kde T je čas v generacích a μ je mutační rychlost. Dále pak byla určena *théta* jako $\theta = 2N\mu$ a ukazatel M , jenž lze chápat jako součin populační velikosti a počtu migrantů vyměněných během času expanze tj. $M = 2Nm$ (Excoffier 2004).

Další možností, jak testovat minulou populační dynamiku a náznaky expanze je stanovení tzv. *intermatch distribution*. Lze jej užít v případě, kdy jednotlivé regionální populace nejsou recipročně monofyletické, ale nesou unikátní set haplotypů. Rozdělení párových nukleotidových odlišností mezi těmito regionálními populacemi bylo spočítáno v programu IWaVe (Sherry 1994a, Sherry 1994b). Pokud dvě populace prodělaly shodnou expanzi, pak si budou jejich křivky *mismatch distribution* odpovídat a trend těchto křivek bude korespondovat s trendem *intermatch distribution*. Naopak absence společného trendu naznačuje, že odlišnosti mezi populacemi byly možná formovány expanzemi z odlišných ancestrálních populací (Excoffier 2004).

Výše zmíněné sumární statistiky však nevyužívají veškerou informaci o demografické minulosti dat. K účinné detekci signálu populačního růstu se proto používají testy neutrality (Ramos-Onsins & Rozas 2002a). Tyto testy umožňují zhodnotit shodu získaných dat spolu s očekávanými neutrálními daty. Za tímto účelem se tedy využívají odhady Tajimova D a Fuova F_s . Jako ukazatele neutrality jsou však vhodnější pro datasey zahrnující větší počet vzorků. Pokud jsou hodnoty obou těchto parametrů záporné, pak to naznačuje převahu segregujících míst v alelách s nízkou frekvencí, což poukazuje na populační expanzi nebo negativní selekci. Kladné hodnoty naopak prokazují nízkou hladinu polymorfismu. Ten může být následkem buď poklesu populační velikosti nebo pozitivní selekce (např. v populacích po *bottlenecku*). Jednou z možností je také použití Rozasova R_2 , což je test vhodnější pro malé množství

vzorků (Ramos-Onsins & Rozas 2002b). Hodnota posledního parametru byla stanovena s pomocí programu DnaSp v.5 (Librado & Rozas 2009).

Následující charakteristiky byly vypočteny v programu Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005). Jedná se o počet haplotypů, haplotypovou a nukleotidovou diverzitu, Tajimovo D, Fuovo F_s a všechny parametry pro *mismatch distribution* i prostorovou expanzi. Počet polymorfních míst byl určen jak v programu Arlequin 3.1, tak v SITES (Hey 1997).

Populační diferenciaci byla odhadnuta s použitím analýzy molekulární variability (AMOVA) opět v programu Arlequin 3.1. Jedná se o odhad genetické struktury s využitím jednotlivých haplotypů a jejich frekvence ve vybrané populaci. Odráží tedy vzájemné vztahy haplotypové diverzity na rozdílných úrovních hierarchického rozdělení. Nejprve je třeba definovat podrobnou genetickou strukturu, jenž má být testována. Na tomto základě jsou určeny kovarianční komponenty (σ^2_i), které dále slouží k výpočtu fixačních indexů (F_i). Signifikantnost těchto indexů spojených s různými stupni genetické struktury (v jednotlivých populacích, mezi populacemi v rámci skupiny a mezi samotnými skupinami) je stanovena přes neparametrické permutační testy (Excoffier et al. 1992, Excoffier et al. 2005). Každá ze studovaných lokalit byla tedy považována za samostatnou populaci. Do analýzy byly zahrnuty pouze lokality čítající více jak pět jedinců z důvodu zachování dostatečné velikosti populace. Jednotlivé populace byly posléze s rozvahou propojovány různě do analyzovaných skupin.

K popisu populační dynamiky v minulosti byla použita metoda *Bayesiánských skyline plotů*. Tato nová metoda je na rozdíl od starších koalescenčních přístupů nezávislá na předem definovaném „demografickém modelu“ a odhaduje dřívější populační dynamiku až na základě odhadu genealogické struktury. *Bayesiánské skyline ploty* jsou navíc mnohem citlivější k odhadům demografických trendů než jednoduché parametrické modely. Ke stanovení *skyline plotů* byl použit program BEAST 1.5.3. (Drummond et al. 2005, Drummond & Rambaut 2007), který využívá k odhadu posteriorní distribuce efektivní velikosti populace proceduru *Markov chain Monte Carlo* (tzv. MCMC). K tomu využívá zadaný substituční model a pracuje přímo se vzorkem molekulárních sekvencí. Touto metodou je také v každém bodě stanoven konfidenční interval pro odhad efektivní populační velikosti. Analýza byla tedy provedena s MCMC o délce 100 milionů generací. Prvních 10 milionů navržených stromů bylo vždy vypuštěno z analýzy. Genealogie a jednotlivé parametry zadaného modelu byly zaznamenány vždy jednou za tisíc opakování.

Odhad migrace mezi několika subpopulacemi byl možný stanovit hned dvěma způsoby. S pomocí programu Migrate 3.0 (Beerli 2008) na základě Bayesianké analýzy (Beerli 2006). lze určit efektivní velikosti jednotlivých populací i mezipopulační míru migrace. Ve výsledku je tedy možné určit, zda tok genů mezi populacemi probíhá asymetricky či nikoli. Program lze použít však jen v případě, že byla struktura jednotlivých populací stabilní nejméně po dobu $4N_e$ generací (Kuhner 1995). Tento předpoklad splňuje pouze populace z celého kontinuálního areálu a populace z oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu. Na základě sekvencí mtDNA byly tedy stanoveny následující parametry populací : θ_i jako $\theta_i = N_e \mu$ a $M = m / \mu$, kde m je míra imigrace a μ mutační rychlost. Ukazatel M vyjadřuje, zda má větší vliv na populační strukturu (tj. na vznik nových variant v populaci) migrace či mutace sekvencí. Pokud se odhady parametru θ_i a M propojí, pak lze snadno stanovit počet imigrantů na generaci jako součin $\theta_i M_{y \rightarrow i}$. Parametry Bayesianké analýzy byly nastaveny jako jeden dlouhý řetězec MCMC s pěti opakováními na 250 miliónů generací. Výsledky byly zapisovány každých 500 tisíc generací. První 20 miliónů navržených stromů bylo vždy vypuštěno z analýzy (*burn-in*). *Heating* byl nastaven pro osm paralelních řetězců a pro počáteční relativní teploty 100000,00 7,00 3,50 2,33 1,75 1,4 1,17 1,00.

Program IM stanovuje míru migrace mezi dvěma odlišnými populacemi na základě haplotypů. Umožňuje použít různé evoluční modely dle typu vstupních dat. V případě našich sekvencí jsme zvolili jako nejvhodnější model HKY (Hasegawa – Kishino – Yano model, Hasegawa et al. 1985), který je určen pro analýzu mitochondriální DNA. Ten je pak použit v modelu „Isolation with Migration model“ (Palsbøll et al. 2004). Program je opět založen na běhu dlouhého řetězce simulací (MCMC) napříč generacemi. S jeho pomocí lze odhadnout parametry jako $q_i = 4 N_i \mu$, $q_2 = 4 N_e \mu$, $q_A = 4 N_a \mu$, $m_1 = m_1 / \mu$, $m_2 = m_2 / \mu$ a $t = t / \mu$ (N_i je efektivní velikost populace i , μ mutační rychlost, m_i míra toku genů z populace i do y v koalescenci, t je čas od oddělení populací). Finální běh byl tedy dlouhý 10 miliónů generací a obsahoval 10 krátkých řetězců. Zapisován byl každý stý krok. Z analýzy byl vypuštěn první milión generací (*burn-in*). Pro heating byl použit Geometric Increment model s parametry $h_1 = 0,8$ a $h_2 = 0,9$. Je potřeba vzít v úvahu, že při výpočtech od doby koalescence do současnosti se parametr m_i týká toku genů z populace y do i (Hey et Nielsen 2004).

IV. VÝSLEDKY

IV.1 ZÁKLADNÍ VZTAHY MEZI HAPLOTYPY

Molekulárními metodami bylo zanalyzováno celkem 82 vzorků DNA hýla rudého ze třinácti eurasijských lokalit. Kontrolní oblast byla osekvenována v délce 495 bazí a gen ND2 v délce 1029 bazí. Pro následné analýzy byla použita kombinace obou dvou oblastí mitochondriální DNA o délce 1524 bazí. Při analýzách byly dále použity sekvence z článku (Pavlova et al.2005a) a dosud nepublikovaná sekvence hýla z Pakistánu získaná od R. M. Zinka (University of California-Berkeley, USA).

Souhrnně bylo 82 nových sekvencí rozděleno v 72 haplotypů (viz.tab.č.3). Většina z haplotypů se tedy jevila jako unikátní. Společný haplotyp rozšířený ve všech populacích nebyl zaznamenán. Nejrozšířenějším haplotypem byl „206Suma“, který zahrnoval jednoho jedince ze Šumavy, dva z Rychtářských vrchů a jednoho z Pakistánu. Haplotypy „204Suma“, „212Suma“, „230Rych“, „232Rych“, „257Kali“ a „279Turk“ nebyly unikátní, nýbrž každý z nich v sobě zahrnoval dva jedince ze stejné lokality. Pouze haplotyp označený jako „227Suma“ byl přítomen jak u jednoho šumavského jedince, tak zároveň i u jednoho jedince z Kaliningradské oblasti („262Kali“). Dříve známé haplotypy, které se vyskytly i v našich izolovaných populacích pocházejí ze střední Asie, přesně z Irkutska („177Irku“, „176Irku“, 155Irku“) a z oblasti Kamčatky, přesně z Anadyru („183Anad“, „177Anad“).

Celkem bylo ve zkoumaných 82 vzorcích zaznamenáno 99 polymorfních míst (38 nekódujících a 50 synonymních mutací, 11 nesynonymních záměn, 70 transicí, 31transverzí). Zastoupení jednotlivých bazí v sekvencích bylo následující : 30,87% cytosin, 26,57% thymin, 31,73% adenin a 10,83% guanin.

Lokalita (počet jedinců)	Haplotyp	Počet vzorků s daným haplotypem	
ŠUMAVA (29)	201Suma	1	
	202Suma	1	
	203Suma	1	
	205Suma	1	
	207Suma	1	
	208Suma	1	
	209Suma	1	
	210Suma	1	
	211Suma	1	
	212Suma	2	
	214Suma	1	
	215Suma	1	
	216Suma	1	
	217Suma	1	
	218Suma	1	
	219Suma	1	
	220Suma	1	
	222Suma	1	
	223Suma	1	
	224Suma	1	
	225Suma	1	
	226Suma	1	
	228Suma	1	
	229Suma	1	
	177Irku	1	
	176Irku	1	
	155Irku	2	
	RYCHTÁŘSKÉ VRCHY (18)	230Rych	2
		234Rych	1
236Rych		1	
237Rych		1	
239Rych		1	
240Rych		1	
241Rych		1	
242Rych		1	
243Rych		1	
244Rych		1	
245Rych		1	
246Rych		1	
247Rych		1	
183Anad		2	
177Anad		2	
ŠVÉDSKO (4)		248Swed	1
		249Swed	1
		250Swed	1
	251Swed	1	

Lokalita (počet jedinců)	Haplotyp	Počet vzorků s daným haplotypem
ORLICKÉ ZÁHORÍ (2)	252Orli	1
	253Orli	1
TÁDŽIKISTÁN (2)	254Pami	1
	255Pami	1
KALININGRAD (12)	256Kali	1
	257Kali	2
	258Kali	1
	259Kali	1
	260Kali	1
	261Kali	1
	263Kali	1
	265Kali	1
	266Kali	1
	267Kali	1
	176Irku	1
	BULHARSKO (6)	268Bulg
269Bulg		1
270Bulg		1
271Bulg		1
272Bulg		1
273Bulg		1
TURECKO (8)	275Turk	1
	276Turk	1
	277Turk	1
	278Turk	1
	279Turk	2
	281Turk	1
	282Turk	1

Tab.č.3 : Jednotlivé haplotypy a jejich zastoupení v populacích

Jako sofistikovaná metoda pro určení vztahů mezi haplotypy byla poté použita Bayesiánská analýza sekvencí. Naše sekvence z izolovaných evropských populací byly propojené spolu se sekvencemi z eurasijských oblastí ze studie Pavlove et al. (2005a) v jediný dataset. Jako *outgroup* k zakořenění výsledného stromu byla použita sekvence *control regionu* a ND2 mtDNA čečetky zimní (*Carduelis flammea*). Poté proběhla vizualizace v programu Dendroscope. Původní strom má tvar hřebene, což naznačuje, že druh prodělal expanzi. Z technických důvodů je však v této práci zobrazená kruhová varianta stromu.

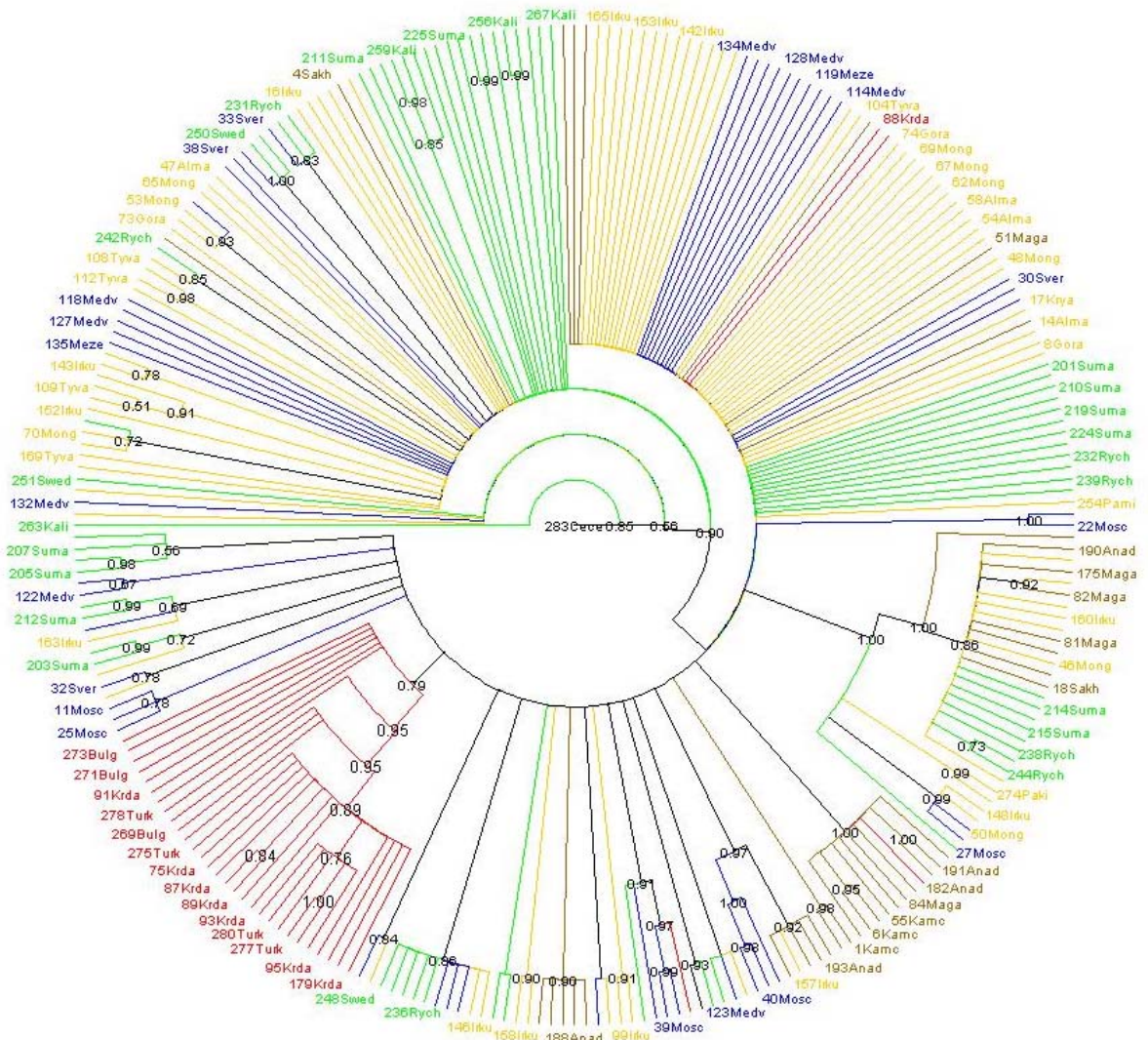
Vzorky z oblastí Bulharska, Turecka a Kavkazu tvoří zřetelně oddělenou skupinu (viz.obr.č.16). Ta má sice jako celek slabší podporu (*posterior probability* 0,79), ale podpora jejích podskupin již dosahuje poměrně vysokých hodnot (*posterior probability* 0,95).

Kromě kládu Bulharska, Turecka a Kavkazu jsou ve fylogeografickém stromě patrné i další dobře podpořené klády. Některé z nich odpovídají geografickým oblastem a jiné nikoli. Celkem v devíti případech spadaly malé dobře podpořené skupiny dvou a více haplotypů do jediné geografické oblasti. Hodnoty *posterior probability* v tomto případě přesahovaly 0,8 (například vzorky „212Suma“ a „213Suma“ s *posterior probability* 0,99 či vzorky „257Kali“ a „264Kali“ opět s *posterior probability* 0,99). Častěji se však dle stromu zdá, že vyšly lépe podpořené (tj. opět hodnota *posterior probability* > 0,8) skupiny jedinců z různých oblastí, které jsou od sebe navzájem často i velmi geograficky vzdálené. Jako extrémní ukázkou tohoto pozorování lze uvést například haplotyp „242Rych“, který klastruje s haplotypem „105Tyva“ ze středoasijské oblasti s hodnotou *posterior probability* 0,85. Stejně tak některé haplotypy ze Šumavy a Rychtářských vrchů („206Suma“, „214Suma“, „215Suma“, „235Rych“, „238Rych“, „243Rych“, „244Rych“, „247Rych“) spadají do skupiny spolu se vzorky jak ze střední Asie („177Irku“, „173Irku“, „162Irku“, „160Irku“, „145Irku“, „46Mong“, „274Paki“), tak i z oblasti Kamčatky („190Anad“, „175Maga“, „82Maga“, „81Maga“, „56Kamc“, „23Sakh“, „18Sakh“). Tato skupina má podporu *posterior probability* 0,86. Vzorky z izolovaných populací z České republiky se vyskytují na různých místech stromu.

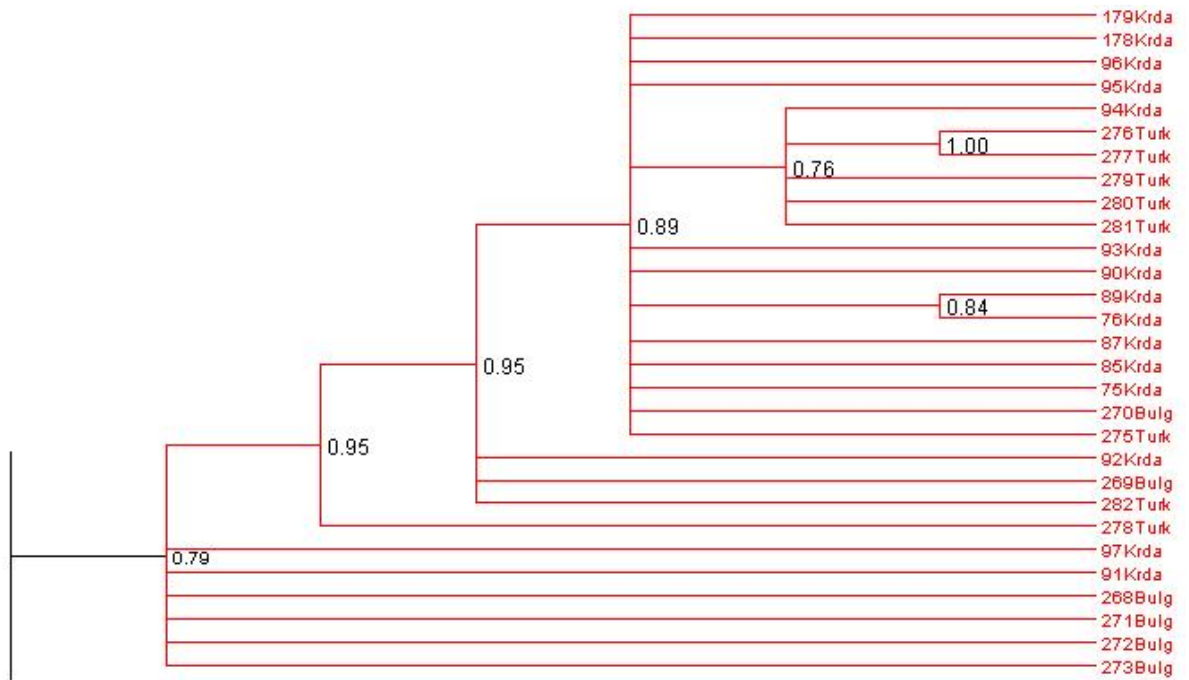
Stejně tak i čtyři vzorky („180Krda“, „88Krda“, „86Krda“ a „77Krda“) z oblasti Kavkazu nespádají do společného klastru spolu s Bulharskem a Tureckem, ale jsou naopak rozprostřeny na různých místech stromu. Spadají ke vzorkům jak ze severní, tak ze střední či východní Asie. Nicméně ani v rámci zřetelně odštěpené větve Bulharsko, Turecko, Kavkaz nejsou vzorky jasně rozdělené, nýbrž jsou také náhodně promíchané.

Výsledný haplotypový strom tedy jeví minimální geografickou strukturu (viz. obr.č.15), což může souviset s migračním chováním studovaného druhu. V zásadě stejného výsledku jsme dosáhli i bez zakořenění stromu *outgroupem*.

Z předchozí studie uskutečněné Pavlovou et al.(2005a) shodně vyplývá, že populace hýla rudého v rámci kontinuálního areálu jsou značně promíchané a fylogenetický strom vykazuje pouze minimální geografickou strukturu. Jediné vzorky, které se zřetelně oddělily od zbytku areálu, byly taktéž ty pocházející z oblasti Krasnodaru (Kavkaz). Tento klád měl však nízkou *posterior probability* (0,66). Navíc se vzorky „180Krda“, „88Krda“, „86Krda“ a „77Krda“ vyskytovaly na různých místech fylogenetického stromu stejně jako to vyšlo i v našem případě.



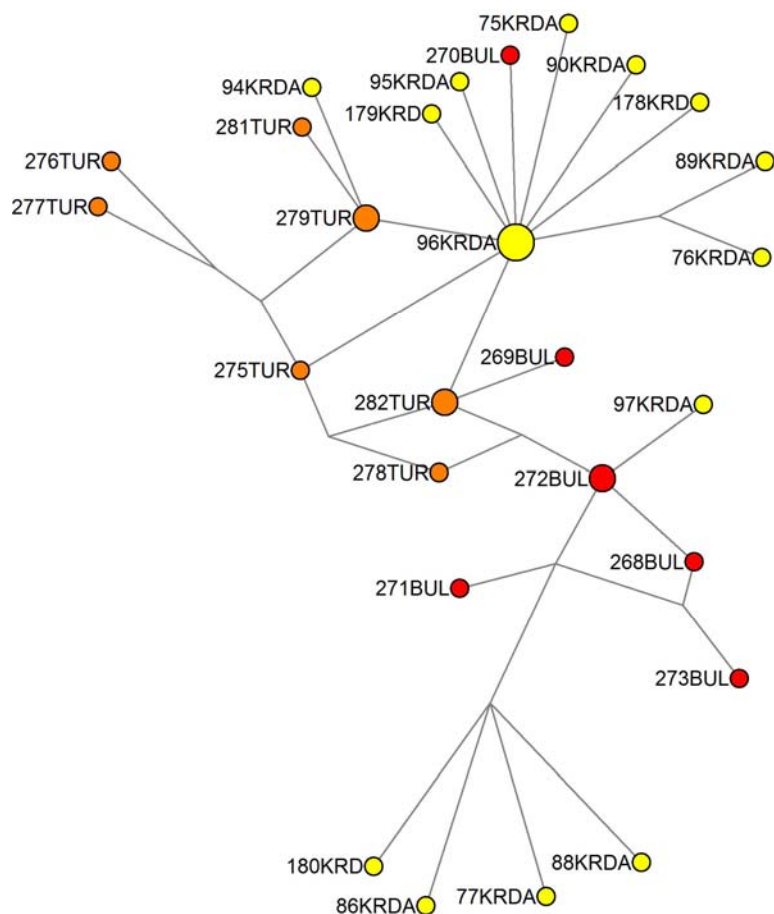
Obr.č.15 : Kruhový fylogenetický strom spočítaný Bayesiánskou analýzou na základě spojených sekvencí dvou úseků mtDNA z 82 našich vzorků a 186 ze studie Pavlové et al.2005a. Zelenou barvou jsou označeny izolované evropské populace, modrou severní eurasijské populace, oranžovou středoasijské populace, hnědou východoasijské populace a červenou populace z Bulharska, Turecka a Kavkazu. Čísla znázorňují hodnotu posteriorní pravděpodobnosti.



Obr.č.16 : Výřez fylogenetického stromu zachycující skupinu vzorků z Bulharska, Turecka, Kavkazu (Krasnodar) a hodnoty posteriorních pravděpodobností jednotlivých větví.

Pro vizualizaci vztahů mezi haplotypy byla vytvořena haplotypová síť metodou *Median-Joining* v programu Network. Ta byla podpořena i haplotypovou sítí získanou s pomocí programu TCS 1.21. Avšak plnohodnotné zobrazení TCS sítě by vyžadovalo nestandardní formát stránky. Dostatečná vizualizace této sítě tedy není možná.

Co se týče haplotypové sítě zkonstruované v programu Network, tak lze sledovat náznak *star-like pattern* především mezi vzorky z oblastí Bulharska, Turecka a Kavkazu (viz.obr.č.18). Takovýto vzor odpovídá recentní expanzi. *Star-like pattern* je patrný také na dalších místech haplotypové sítě (viz.obr.č.17). Je ovšem zajímavé, že součástí takovýchto skupinek haplotypů jsou i vzorky z velmi vzdálených geografických oblastí. Nápadně často se v rámci těchto vzorů vyskytují i haplotypy z irkutské oblasti (střední Asie) a také z nejvýchodnějších částí areálu výskytu druhu (například z oblasti Kamčatky). Tento poznatek opět nejspíše souvisí s migračním chováním hýla rudého a může také naznačovat recentní šíření.



Obr.č.18 : Haplotypová síť zkonstruovaná metodou *Median-Joining* pro vzorky z oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu. Haplotypy jsou znázorněny barevnými kruhy a jejich velikost odpovídá počtu jedinců s daným haplotypem. **Žlutou** je označena oblast Kavkazu, **červenou** oblast Bulharska a **oranžovou** oblast Turecka.

IV.2 GENETICKÉ CHARAKTERISTIKY POPULACÍ

Nejvíce polymorfních míst bylo objeveno u vzorků z oblasti Šumava. Jednalo se o 49 polymorfních míst z 29 jedinců. Naopak nejméně těchto míst bylo prokázáno u vzorků „Orlické záhoří“. Tento výsledek mohl být zapříčiněn malým množstvím zkoumaných vzorků.

Celková nukleotidová diverzita byla skoro dvojnásobně vyšší pro oblast severní a střední Evropy oproti oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu. Maximální hodnoty dosahovala v oblasti Kaliningradu a minimální naopak v oblasti Turecka. Výsledné hodnoty nukleotidové diversity jsou oproti jejich předpokladu pro stabilní populaci nižší, což by mohlo opět naznačovat recentní expanzi druhu.

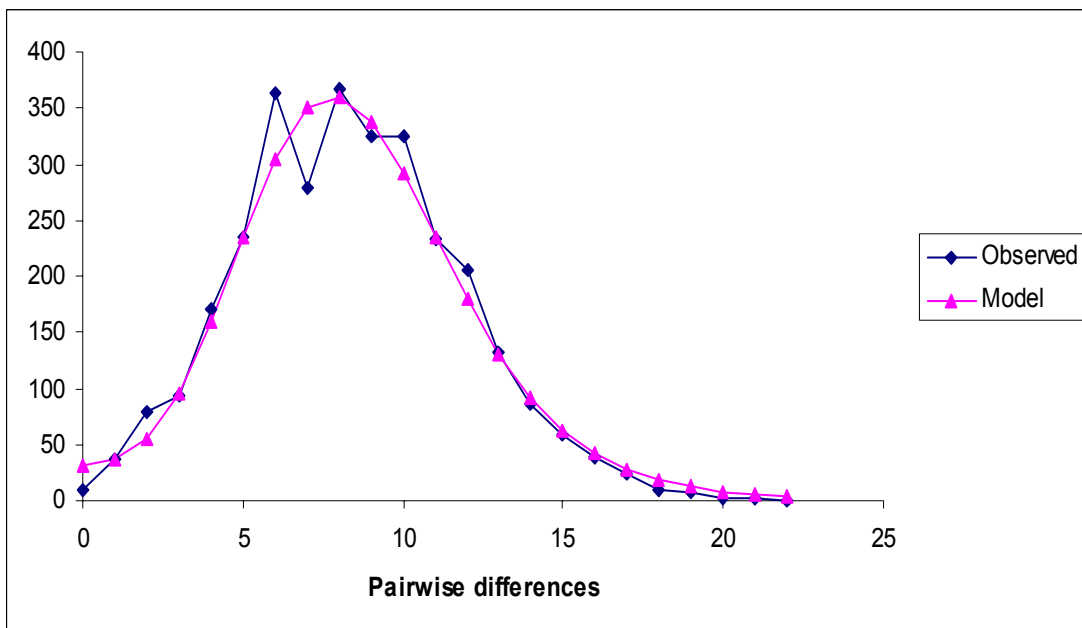
Celková haplotypová diverzita byla prokazatelně nejnižší pro oblast Turecka. Nejvyšší haplotypové diverzity dosáhly Orlické hory, Švédsko, Bulharsko a Tadžikistán. Mezi zkoumanými oblastmi (Bulharsko + Turecko + Kavkaz, severní + střední Evropa) pak haplotypová diverzita dosahovala velmi podobných hodnot (viz.tab.č.4).

LOKALITA	OZNAČENÍ VZORKŮ	N	H	P	h	π
Šumava	Suma	29	27	49	0,9951	0,004496
Rychtářské vrchy	Rych	18	15	27	0,9804	0,004452
Orlické Záhoří	Orli	2	2	5	1	0,003281
Švédsko	Swed	4	4	12	1	0,004374
Kaliningrad	Kali	12	11	34	0,9848	0,00521
Bulharsko	Bulg	6	6	10	1	0,002843
Turecko	Turk	8	7	9	0,9643	0,002226
Tadžikistán	Pami	2	2	8	1	0,0052
Bulg + Turk + Kavkaz	–	33	32	43	0,9981	0,003373
stř + sever Evropa	–	65	59	89	0,9971	0,00515

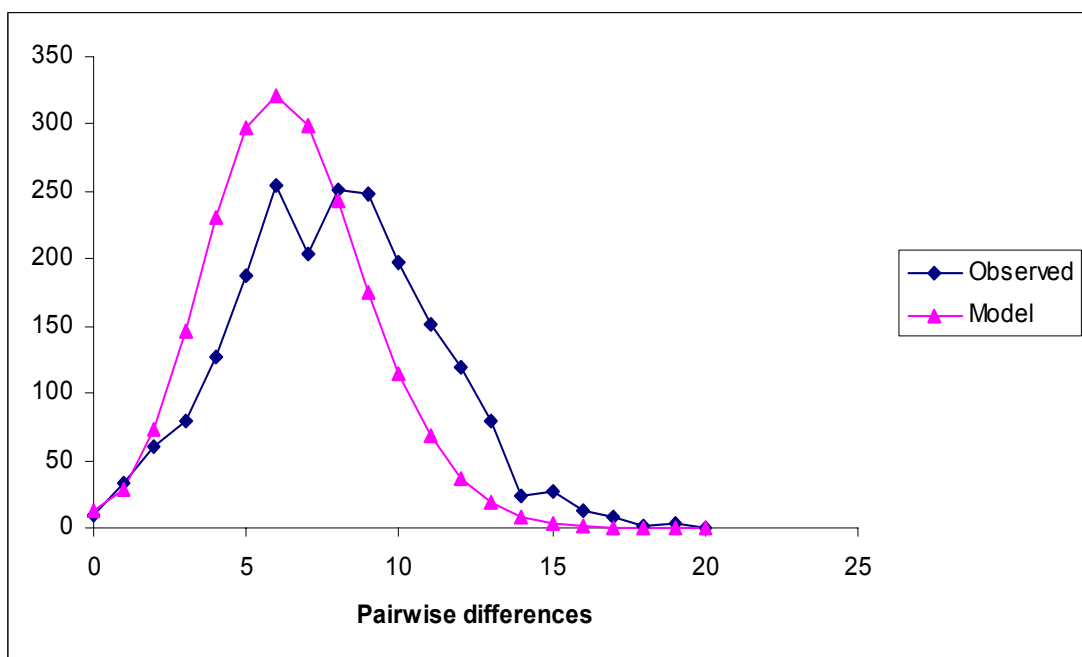
Tab.č.4 : Analýza genetické diverzity devíti zkoumaných lokalit a dvou vymezených oblastí. N = počet jedinců, H = počet haplotypů, P = počet polymorfních míst, h = haplotypová diverzita, π = nukleotidová diverzita

IV.3 POPULAČNÍ a PROSTOROVÁ EXPANZE

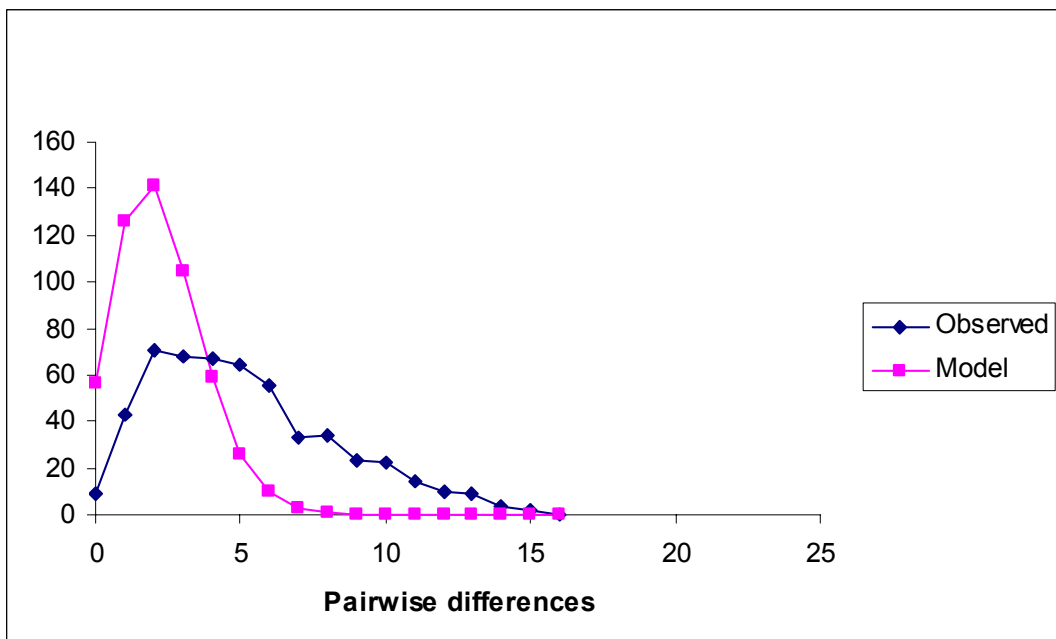
Do analýzy expanzí byly zahrnuty pouze ty z populací, které byly zastoupeny více jak čtyřmi vzorky. Většina z křivek *mismatch distribution* byla multimodální, což může být artefaktem díky malému počtu vzorků pro jednotlivé populace. Avšak tato multimodální křivka je patrná i pro populaci z Rychtářských vrchů, která však zaujímá dostatečné množství vzorků. Křivky šumavské a kaliningradské populace se zdají být výjimkou, protože jsou unimodální, což naznačuje exponenciální růst populace. Jednovrcholová křivka se taktéž objevila při kombinaci vzorků z Bulharska, Turecka a Krasnodaru (Kavkaz). To by opět poukazovalo na fakt, že v této oblasti probíhá demografická expanze druhu. Žádná z distribucí se nelišila signifikantně od modelu náhlé expanze (viz.graf.č.1 - 8).



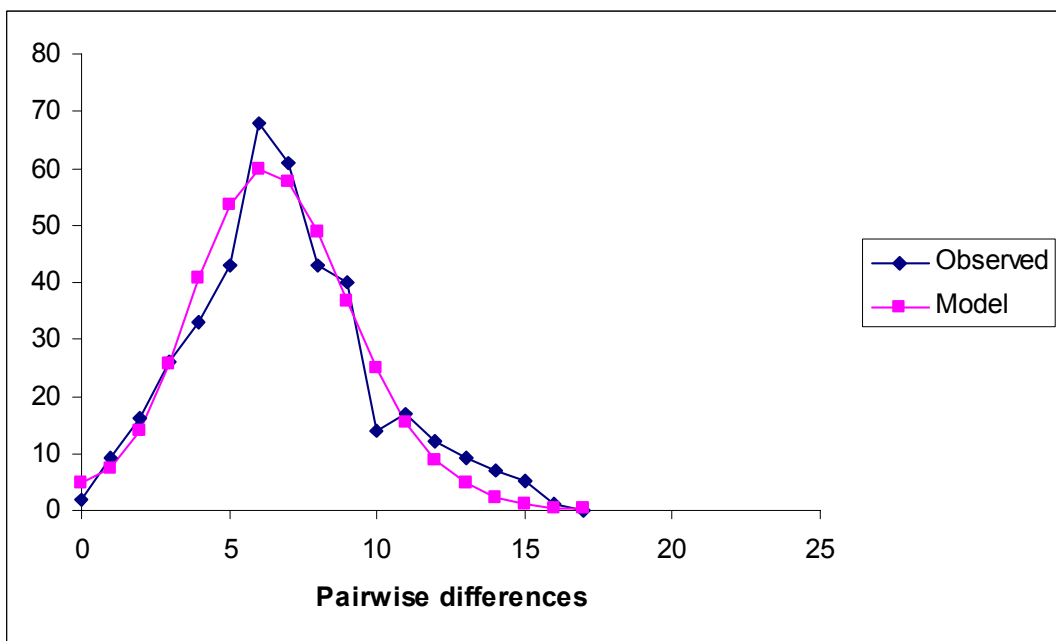
Graf.č.1 : *Mismatch distribution* pro vzorky ze Šumavy, Rychtářských vrchů, Kaliningradu, Bulharska a Turecka (n = 73).



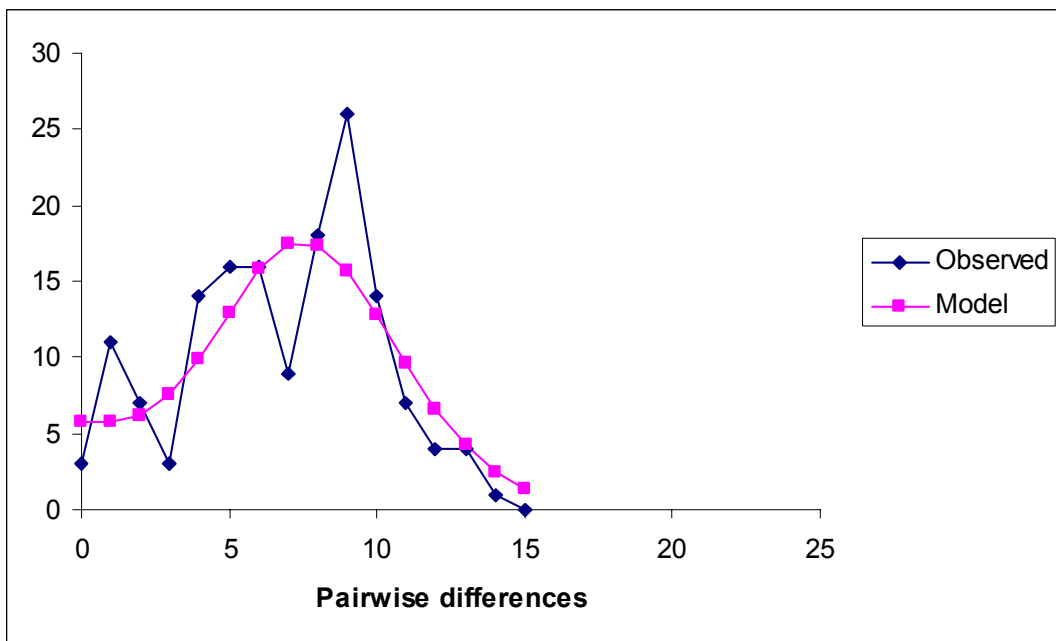
Graf.č.2 : *Mismatch distribution* pro kombinaci vzorků z České republiky, Švédska a Kaliningradu (n = 67).



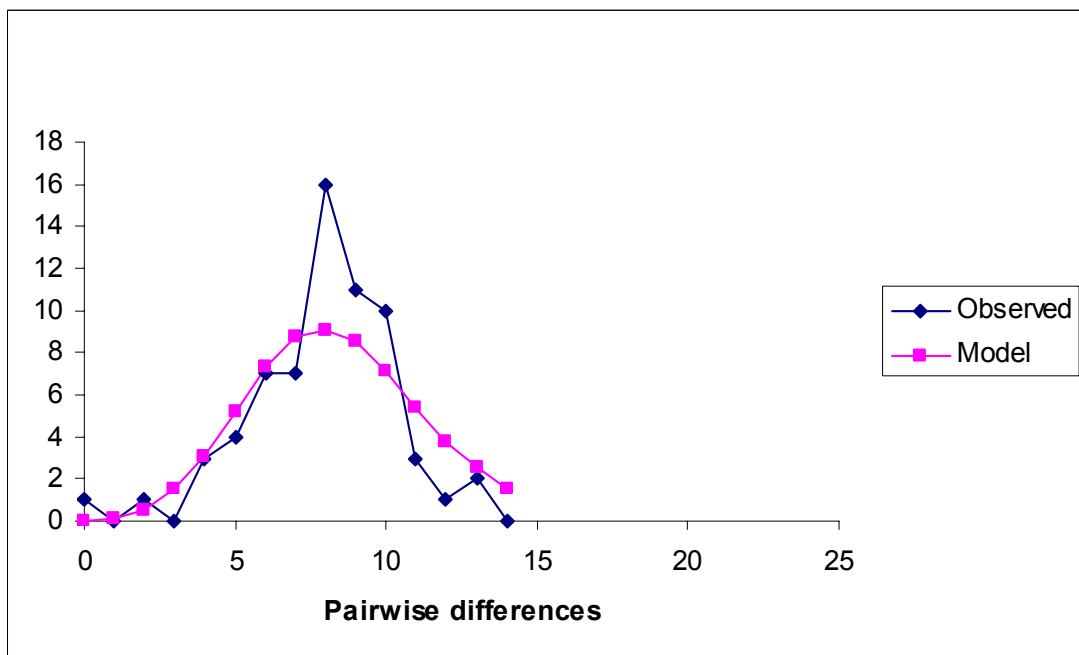
Graf č.3 : *Mismatch distribution* pro kombinaci vzorků z Bulharska, Turecka a Kavkazu (n = 33).



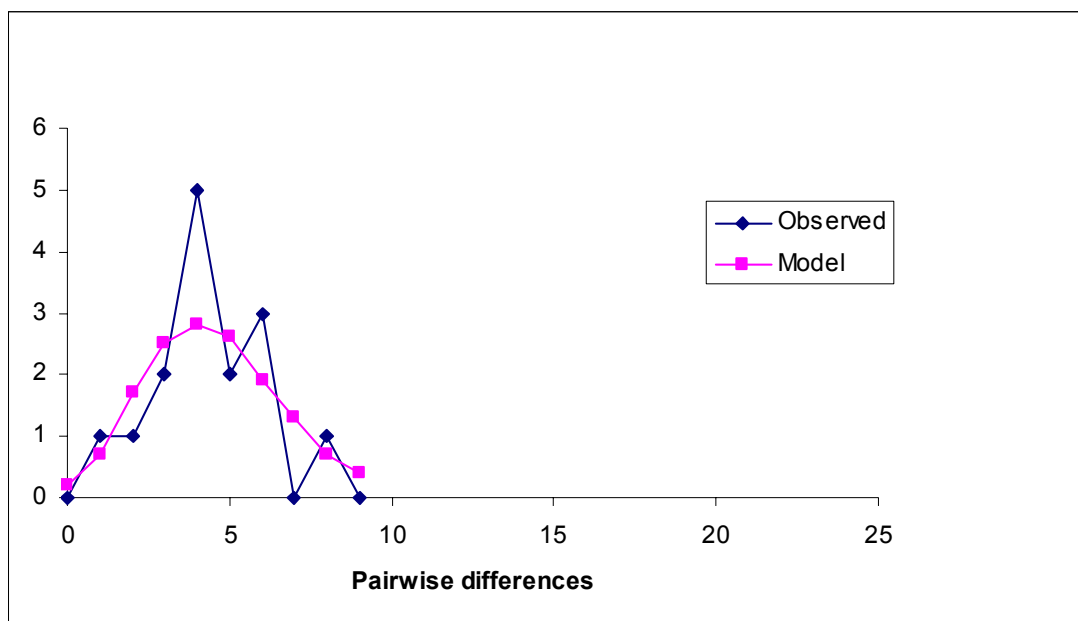
Graf č.4 : *Mismatch distribution* pro vzorky ze Šumavy (n = 29).



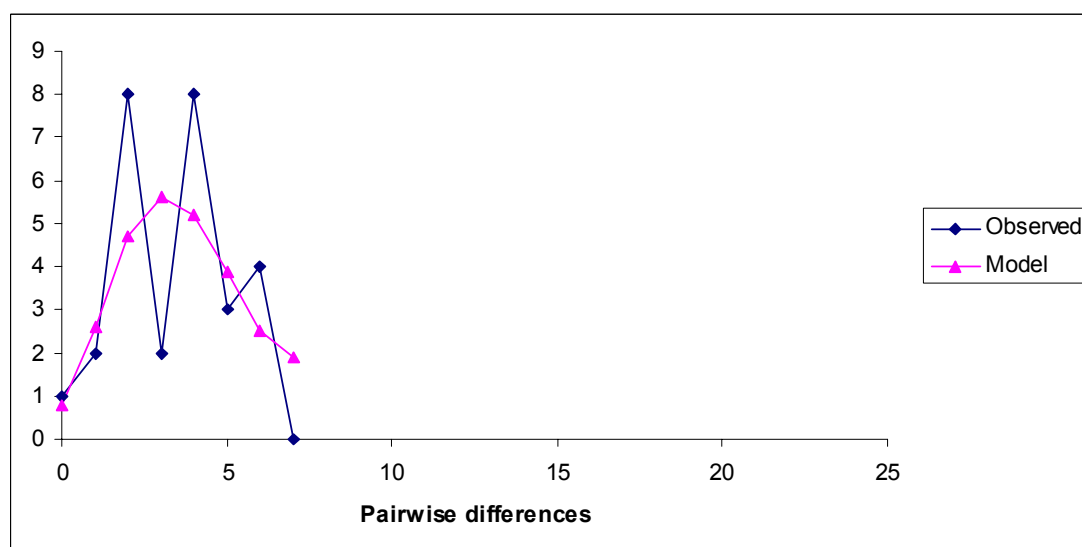
Graf č.5 : *Mismatch distribution* pro vzorky Rychtářských vrchů (n = 18).



Graf č.6 : *Mismatch distribution* pro vzorky z Kaliningradu (n = 12).



Graf č.7 : *Mismatch distribution* pro vzorky z Bulharska (n = 6).



Graf č.8 : *Mismatch distribution* pro vzorky z Turecka (n = 8).

Odhady parametru tau (τ) se pohybovaly od minima v oblasti Turecka (3,107) do maxima v kalinigradské oblasti (8,389). Střední a severní Evropa měla tento parametr skoro třikrát vyšší oproti oblasti Bulharsko + Turecko + Kavkaz. To by naznačovalo, že expanze druhé ze zmiňovaných oblastí je mladší (viz.tab.č.5).

LOKALITA	počet vzorků	tau (τ)	počáteč.théta (θ_0)	koncov.théta (θ_1)
Šumava	29	6,811	0	89,375
Rychtářské vrchy	18	8,34	0	25,352
Švédsko	4	7,627	0,002	> 10000
Kaliningrad	12	8,389	0	> 10000
Bulharsko	6	4,523	0,007	> 10000
Turecko	8	3,107	0,659	> 10000
Bulg + Turk + Kavkaz	33	2,232	0	> 10000 (ns)
stř + sever Evropa	65	6,521	0	211,562 (ns)

Tab.č.5: Parametry *mismatch distribution* pro devět zkoumaných lokalit a dvě vymezené oblasti. τ = čas expanze měřený v mutačních jednotkách, théta $\theta = 2N\mu$, N je efektivní velikost populace a μ mutační rychlost, pokud je $p > 0,05$ pak odpovídá modelu expanze, pokud je $p < 0,05$ pak je analýza nesignifikantní (ns)

Analýza prostorové expanze vyšla obdobně jako výše zmiňovaná populační expanze. Opět bylo průkazné, že hodnoty z této statistiky odpovídají modelu náhlé expanze a oblast střední a severní Evropy měla ukazatel tau (τ) opět zhruba třikrát vyšší než oblast Bulharska, Turecka a Kavkazu (viz.tab.č.6).

LOKALITA	počet vzorků	Tau	Theta	M
Šumava	29	5,791	1,142	181,013
Rychtářské vrchy	18	5,955	2,173	33,459
Švédsko	4	7,628	0,001	> 10000
Kaliningrad	12	8,39	0,001	435,861
Bulharsko	6	4,531	0,001	> 10000
Turecko	8	3,107	0,659	> 10000
Bulg+Turk+Krd	33	2,234	3,256	> 10000
stř+sever Evr	65	6,463	1,875	218,866

Tab. č. 6 : Parametry prostorové expanze pro devět zkoumaných lokalit a dvě vymezené oblasti, τ = čas expanze měřený v mutačních jednotkách, théta $\theta = 2N\mu$, N je efektivní velikost populace a μ mutační rychlost a $M = 2Nm$, kde N je populační velikost a m počet migrantů vyměněných během času expanze

IV.4 TESTY NEUTRALITY

U všech populací kromě Šumavy nebylo Tajimovo D průkazně odlišné od nuly. I přes to byl zaznamenán trend spíše k záporným hodnotám, které naznačují recentní expanzi nebo odklon od neutrální evoluce. Pouze při analýze dvou zmiňovaných oblastí (severní + střední Evropa, Bulharsko + Turecko + Kavkaz) vyšel tento test neutrality již ve zcela průkazně záporných hodnotách.

Fuovo Fs bylo prakticky v každém případě signifikantně záporné. Výjimkou byla pouze švédská populace. Záporné hodnoty tohoto parametru opět naznačují možnou populační expanzi zkoumaného druhu.

Poslední ze stanovovaných testů - Rozasovo R2 – vyšel průkazně pouze u populací ze Šumavy, Rychtářských vrchů a z oblasti Kaliningradu. Taktéž u obou analyzovaných oblastí (severní + střední Evropa, Bulharsko + Turecko + Kavkaz) byl tento parametr průkazně odlišný od nuly, což opět naznačuje populační růst. U zbývajících populací byl trend nesignifikantní a není zde tedy prokázána žádná odchylka od stabilní populace (viz.tab.č.7).

LOKALITA	počet vzorků	Tajima D	Fu's Fs	R2
Šumava	29	-1,68854	-21,99034	0,0555
Rychtářské vrchy	18	-0,54157 (ns)	-5,97946	0,1047
Švédsko	4	0,18677 (ns)	-0,15508 (ns)	0,1389 (ns)
Kaliningrad	12	-1,34012 (ns)	-3,6441	0,0711
Bulharsko	6	-0,0634 (ns)	-2,45177	0,15 (ns)
Turecko	8	-0,11038 (ns)	-2,89897	0,1441 (ns)
Bulg + Turk + Kavkaz	33	-1,85081	-25,49591	0,0493
stř + sever Evropa	65	-1,99575	-24,88272	0,0366

Tab.č.7 : Testy neutrality pro devět zkoumaných lokalit a dvě vymezené oblasti. ns = nesignifikantní hodnota tj. $p > 0,05$

IV.5 PÁROVÉ SROVNÁNÍ POPULACÍ (F_{st}), AMOVA (Φ_{st}), INTERMATCH DISTRIBUTION

IV.5.1 Párové F_{st}

Do této analýzy byly zahrnuty izolované populace spojené do skupin o více jak pěti vzorcích. Byly porovnávány s populacemi ze severu a jihovýchodu kontinuálního areálu (Pavlova et al. 2005a) tak, aby bylo možné posoudit jejich vzájemné rozrůznění. Hodnoty párových srovnání populací poukazovaly vesměs na poměrně vysokou diferenciaci. Signifikantní srovnání mezi lokalitami nabývalo hodnot od 0,03371 (ČR – Medvedovo) do 0,44765 (Kaliningrad, Švédsko – Bulharsko, Turecko). Všechny hodnoty týkající se vzorků z Krasnodaru (Kavkaz) byly vysoké a průkazné (od 0,28947 do 0,40551). Nejnižší a navíc nesignifikantní hodnotu mělo srovnání Krasnodaru s Bulharskem a Tureckem, což by naznačovalo, že jsou si tyto populace navzájem podobné a zároveň se společně odlišují od zbývajících studovaných populací. Co se týče České republiky, tak vzorky z této oblasti nejsou průkazně jiné než ty z Moskvy a Jekaterinburgu. Liší se však od zbývajících vzorků ze severní oblasti areálu výskytu (Medvedovo, Švédsko a Kaliningrad). Hodnota jejich párového srovnání je však poměrně nízká, což by naznačovalo malou úroveň diferenciaci (viz.tab.č.8).

	Bulg,Turk	Kali,Swed	Orli,Rych,Suma	Krda	Mosc	Medv	Jeka
Bulg,Turk	0						
Kali,Swed	0,44765	0					
Orli,Rych,Suma	0,3409	0,12463	0				
Krda	0,01882 (ns)	0,40551	0,28967	0			
Mosc	0,36943	0,18681	0,02582 (ns)	0,29769	0		
Medv	0,37843	0,17932	0,03371	0,30008	0,0462	0	
Jeka	0,35808	0,10768	0,01625 (ns)	0,28947	0,02489(ns)	0,01956 (ns)	0

Tab.č. 8: Párové F_{st} pro vybrané dvojice populací. Tučně jsou vyznačeny signifikantní hodnoty (tj. p < 0,05).

IV.5.2 Analýza hierarchické populační struktury

Pro další analýzy bylo zapotřebí zjistit, zda jsou populace v kontinuálním areálu a v Evropě panmiktické či nikoli. Vzali jsme tedy v úvahu celkem tři odlišné skupiny populací vyjma těch z Bulharska, Turecka a Kavkazu.

I. Šumava, Rychtářské vrchy, Orlické hory, Kaliningrad, Švédsko a severní Eurasie (Jekaterinburg, Kursk, Medvedevo, Mezen, Moskva)

II. Tadžikistán, Pakistán a střední Asie (Alma Ata, Horní Altaj, Irkutsk, Krasnoyarsk, Mongolsko, Tyva)

III. Východní Asie (Anadyr, Kamčatka, Khabarovsk, Magadan, Sachalin)

Tyto populace jsme podrobili analýze molekulární variance (viz.tab.č.9). Ta sice poukázala na průkazně největší podíl variability uvnitř v populacích, ale průkazně významné bylo i rozdělení na větší skupiny. Pro další zkoumání (*intermatch distribution, skyline plots*) jsme tedy náhodným výběrem zvolili právě tolik sekvencí, aby byly ve výsledku vhodně srovnatelné s oblastí Bulharska, Turecka a Kavkazu – tedy jedenáct sekvencí z každé ze tří skupin populací. Pro dostatečnou podporu výsledků byl náhodný výběr vzorků několikrát zopakován.

	označení	stupně volnosti	podíl variability v %	Φ - statistika (fixační index)	Průkaznost
Mezi skupinami	σ^2a	2	1,53	$\Phi_{CT}=0.01528$	0.02737
Mezi populacemi v rámci skupiny	σ^2b	19	6,89	$\Phi_{SC}=0.06995$	< 0,00001
Uvnitř v populacích	σ^2c	212	91,58	$\Phi_{ST}=0.08415$	< 0,00001

Tab.č.9 : AMOVA pro srovnání skupin I., II., III.

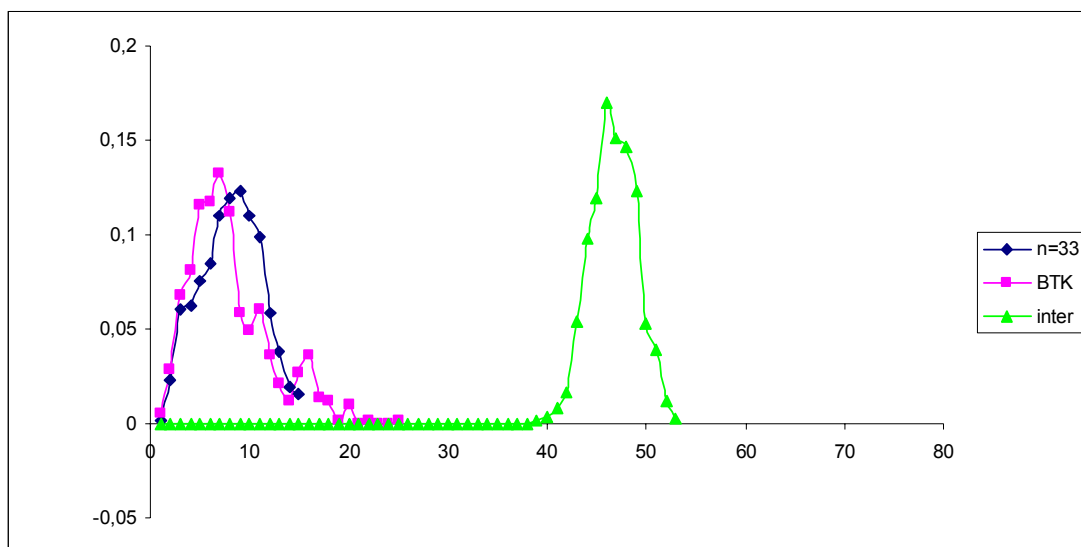
Pro následující porovnání výsledků analýz genetické struktury daných populací byly využity dva rozlišné přístupy. Při analýze molekulární variance (AMOVA) byla testována hierarchická populačně genetická struktura a při *intermatch distribution* minulá populační dynamika vždy dvou daných populací. Nejprve bylo potřeba si definovat skupiny populací a poté se věnovat jednotlivým otázkám, které se týkají populační struktury na různých úrovních.

- 1) Do prvního porovnání hierarchické populační struktury přes analýzu molekulární variance (AMOVA) byly zahrnuty dohromady populace Bulharska, Turecka a Kavkazu proti zbývajícím populacím Evropy (Česká republika – Šumava a Rychtářské vrchy, Kaliningrad, Švédsko) a severozápadu Eurasie (Moskva, Medvedevo, Mezen, Jekaterinburg, Kursk). Dle fixačního indexu „*F_{ct}*“ je zřejmé, že hierarchická populační struktura mezi skupinami vysvětlí skoro 28,4 % variability. To naznačuje, že má smysl uvažovat, že se od sebe severní a jižní oblasti areálu výskytu liší a jsou navzájem izolovány. Nejvíce variability (66,2%) je však uvnitř jednotlivých populací (viz tab.č. 10).

	označení	stupně volnosti	podíl variability v %	Φ - statistika (fixační index)	Průkaznost
Mezi skupinami	σ ² a	1	28,39	Φ _{CT} =0,28392	0,01369
Mezi populacemi v rámci skupiny	σ ² b	6	5,38	Φ _{SC} =0,07519	< 0,00001
Uvnitř v populacích	σ ² c	137	66,22	Φ _{ST} =0,33776	< 0,00001

Tab.č.10 : AMOVA pro Bulharsko, Turecko a Kavkaz vs. ostatní populace.

Vrcholy křivek *mismatch distribution* pro srovnání populací z oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu a náhodně vybraných třiceti tří vzorků ze zbývajících kontinálního areálu neodpovídají té, která charakterizuje *intermatch distribution*. To poukazuje na fakt, že analyzované skupiny vzorků mají odlišný původ (viz. graf č.9).



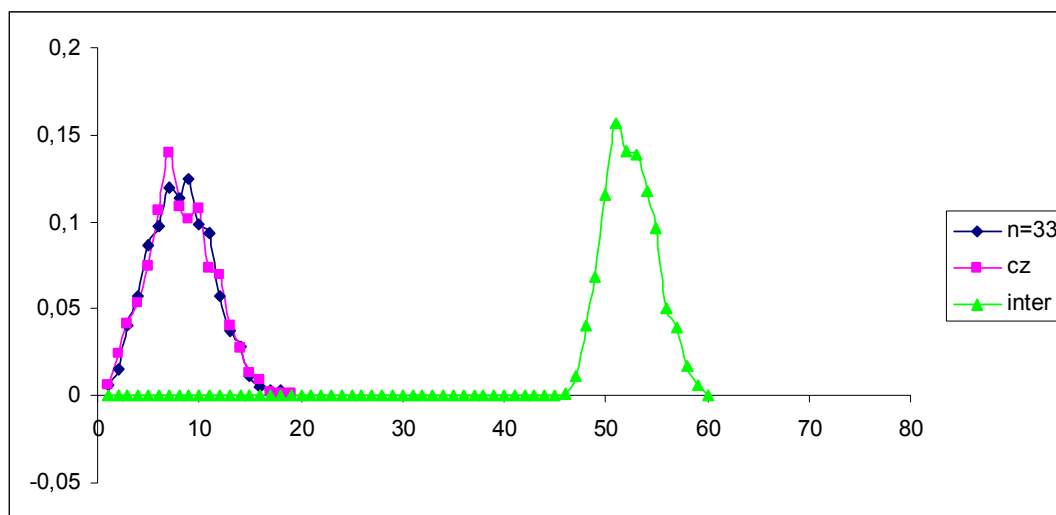
Graf č. 9 : Křivka *intermatch distribution* (zeleně) mezi náhodně vybranou populací vzorků z kontinálního areálu (n = 33, modře) a populací z Bulharska, Turecka a Kavkazu (BTK, růžově).

- 2) Ve druhém kroku byly nejprve porovnány izolované populace z České republiky oproti celému kontinuálnímu areálu. Z analýzy molekulární variance vyplývá, že se populace z České republiky neliší průkazně od populací v kontinuálním areálu. Nejvíce variability je rozprostřeno uvnitř v populacích (94,72%) (viz.tab.č.12).

	označení	stupně volnosti	podíl variability v %	Φ - statistika (fixační index)	Průkaznost
Mezi skupinami	σ^2a	1	-0,7	$\Phi_{CT} = -0,00697$	0,48094
Mezi populacemi v rámci skupiny	σ^2b	17	5,98	$\Phi_{SC} = 0,05941$	< 0,00001
Uvnitř v populacích	σ^2c	197	94,72	$\Phi_{ST} = 0,05285$	< 0,00001

Tab.č.12 : AMOVA pro populace z České republiky a kontinuálního areálu.

Do porovnání populací přes *intermatch distribution* byly použity populace z České republiky a vzorek z kontinuálního areálu, který reprezentovalo 33 náhodně vybraných jedinců. Výsledné křivky si navzájem neodpovídají, což naznačuje, že jsou analyzované skupiny vzorků možná navzájem odlišné (viz.graf č.10).



Graf.č.10 : Křivka *intermatch distribution* (inter, zeleně) mezi českou populací (cz, růžově) a náhodně vybranou populací vzorků z kontinuálního areálu (n = 33, modře).

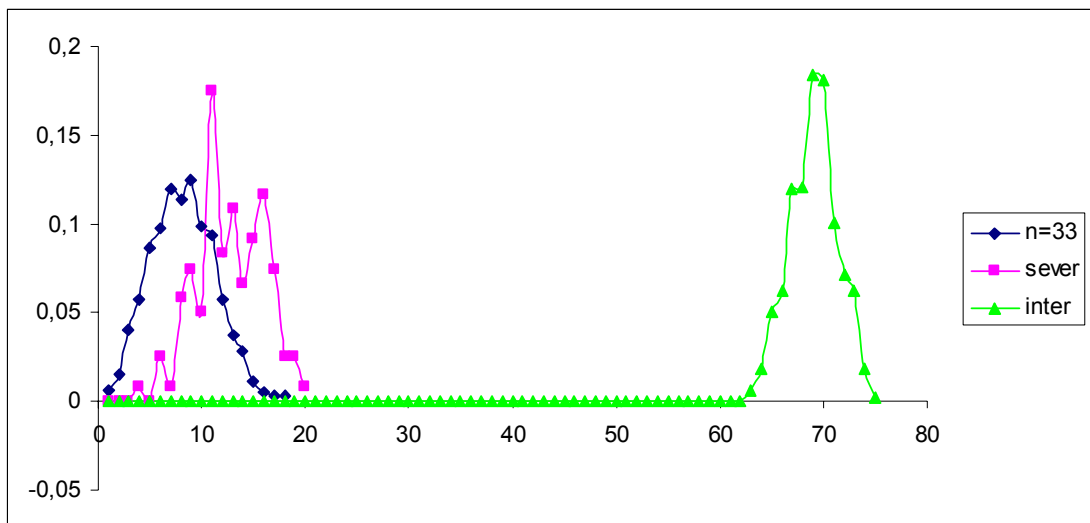
- 3) Za třetí byly analýze podrobeny populace ze severu Evropy a opět populace z kontinuálního areálu. AMOVA ukázala, že největší procento variability se nachází uvnitř v populacích (80,86%). Hierarchická populační struktura mezi skupinami vysvětlí pouze 14,32 %

variability. Možná tedy má smysl uvažovat, že se od sebe liší severní izolované populace a populace v kontinuálním areálu (viz.tab.č.13).

	označení	stupně volnosti	podíl variability v %	Φ - statistika (fixační index)	Průkaznost
Mezi skupinami	σ^2a	1	14,32	$\Phi_{CT}=0,14323$	0,02444
Mezi populacemi v rámci skupiny	σ^2b	16	4,81	$\Phi_{SC}=0,05618$	< 0,00001
Uvnitř v populacích	σ^2c	165	80,86	$\Phi_{ST}=0,19136$	< 0,00001

Tab.č.13 : AMOVA pro populace ze severní Evropy a kontinuálního areálu.

Do porovnání populací přes *intermatch distribution* byly použity populace ze severní Evropy a opět vzorek z kontinuálního areálu, který reprezentovalo 33 náhodně vybraných jedinců. Na základě výsledné křivky lze usuzovat, že se populace nejspíše liší od těch v kontinuálním areálu (viz.graf.č. 11).



Graf č.11 : křivka *intermatch distribution* (inter, zeleně) mezi severoevropskou populací (sever, růžově) a náhodně vybranou populací vzorků z kontinuálního areálu (n = 33, modře).

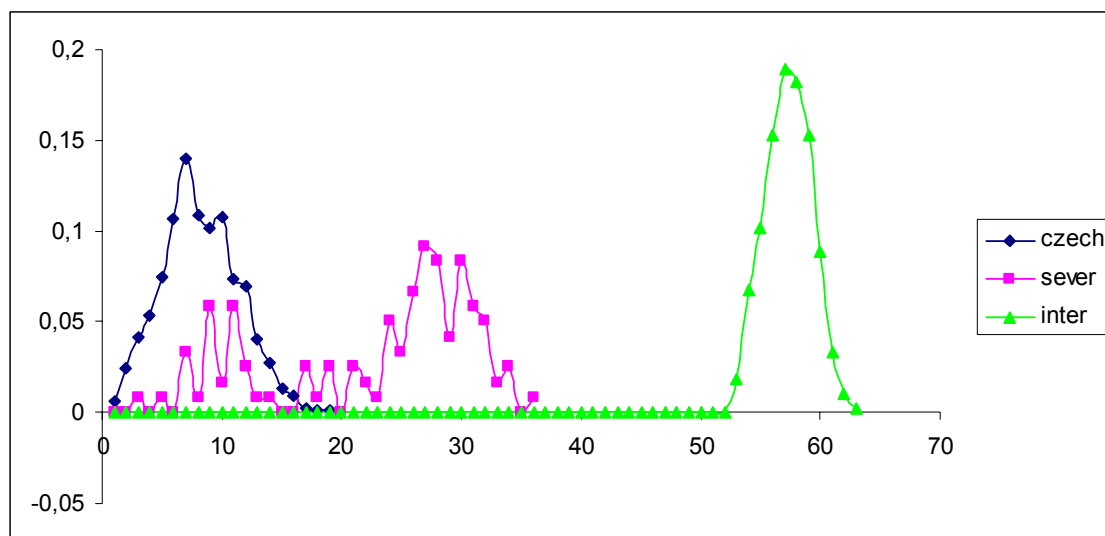
- 4) V pořadí čtvrté srovnání mělo analyzovat populace z oblasti střední a severní Evropy. Tentokrát byly však všechny populace z konkrétních lokalit spojeny dohromady a považovány za jedinou populaci. Tedy například populace z Šumavy, Rychtářských vrchů a Orlických hor byly analyzovány jako jediná populace „Česká republika“. Obdobně tomu bylo i u populací ze severní Evropy. Z této analýzy bylo zřejmé, že není potřeba rozdělovat západní izolované populace na oblast severní a střední Evropy, protože toto dělení nevysvětlí

variabilitu. Populace z České republiky se tedy signifikantně neliší od těch ze severní Evropy (viz.tab.č.14).

	označení	stupně volnosti	podíl variability v %	Φ - statistika (fixační index)	Průkaznost
Mezi skupinami	σ^2a	1	-1,21	$\Phi_{CT}=-0,01212$	0,6784
Mezi populacemi v rámci skupiny	σ^2b	1	16,67	$\Phi_{SC}=0,16467$	0,00782
Uvnitř v populacích	σ^2c	62	84,55	$\Phi_{ST}=0,15454$	< 0,00001

Tab.č.14 : AMOVA pro Českou republiku a severní Evropu.

Avšak při porovnání těchto populací přes výslednou křivku *intermatch distribution* je patrné, že jsou severské a české populace odlišné (viz. graf č.12).



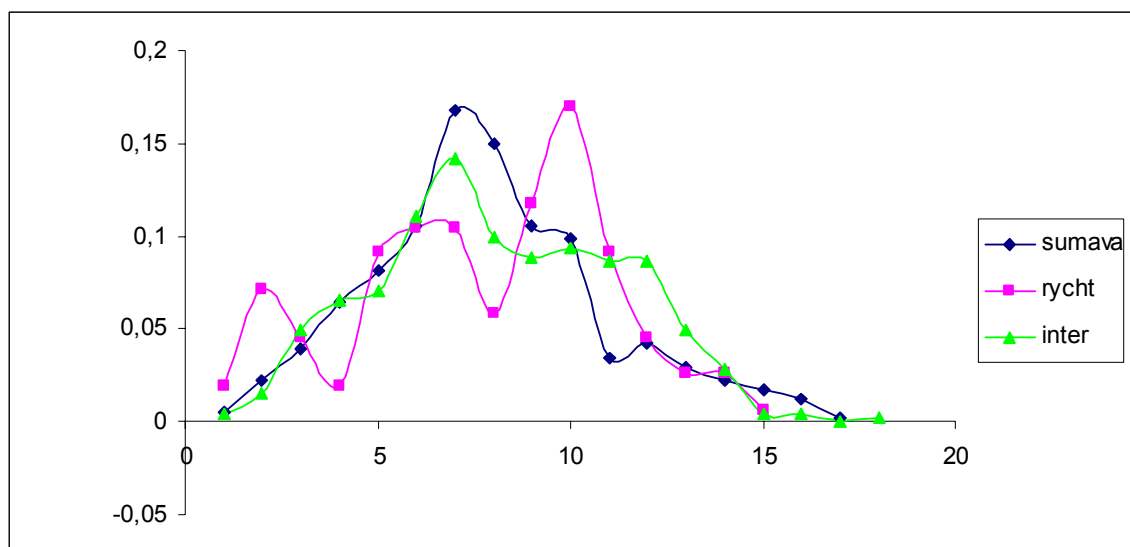
Graf č.12 : Křivka *intermatch distribution* (zeleně) mezi populacemi střední (czech, modře) a severní Evropy (sever, růžově).

- 5) V pátém kroku byly porovnány jednotlivé populace z České republiky a severní Evropy zvlášť. Na základě AMOVA lze usuzovat, že se české populace neliší průkazně od těch severských. Meziskupinové srovnání vysvětlilo pouze malé procento variability (6,64%). Nejvíce variability je opět uvnitř v populacích (82,4%) (viz.tab.č.15).

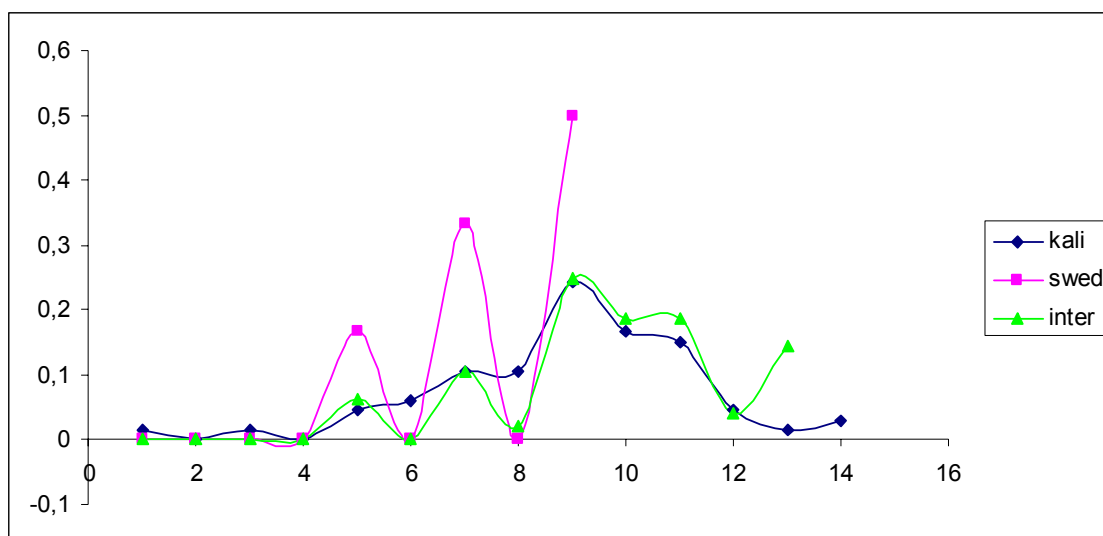
	označení	stupně volnosti	podíl variability v %	Φ - statistika (fixační index)	Průkaznost
Mezi skupinami	σ^2a	1	6,64	$\Phi_{CT}=0,06641$	0,29717
Mezi populacemi v rámci skupiny	σ^2b	3	10,95	$\Phi_{SC}=0,11727$	< 0,00001
Uvnitř v populacích	σ^2c	60	82,41	$\Phi_{ST}=0,1759$	< 0,00001

Tab.č.15 : AMOVA pro jednotlivé populace z České republiky a severní Evropy.

Dle analýzy *intermatch distribution* je zřejmé, že se mezi jednotlivými českými populacemi a ani mezi severskými populacemi neliší křivky *mismatch distribution* od výsledné *intermatch* křivky. To naznačuje, že izolované populace z České republiky mají stejný původ (viz. graf č.13). Stejně tak to platí i pro vzájemné srovnání populací z oblasti Kaliningradu a Švédska (viz.graf č.14).



Graf č.13 : Křivka *intermatch distribution* (zeleně) mezi populacemi ze Šumavy (sumava, modře) a Rychtářských vrchů (rycht, růžově).

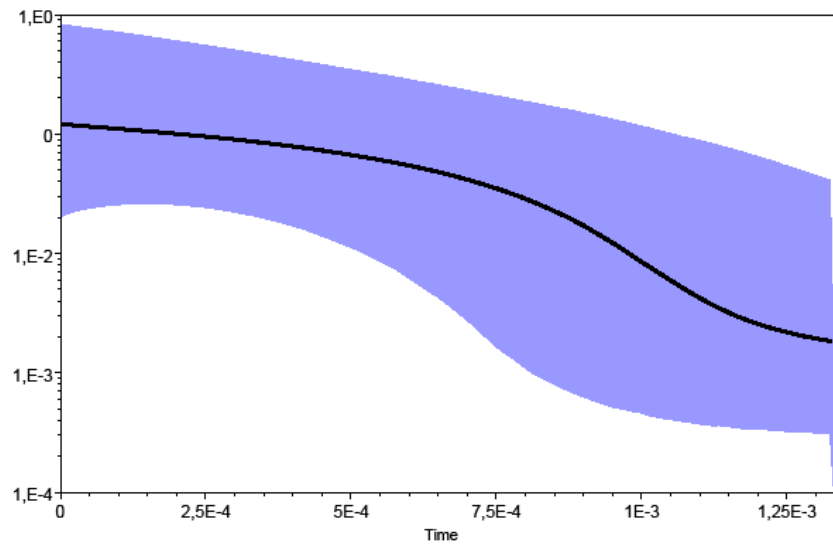


Graf č.14 : Křivka *intermatch distribution* (zeleně) mezi populacemi z Kaliningradu (kali, modře) a Švédska (swed, růžově).

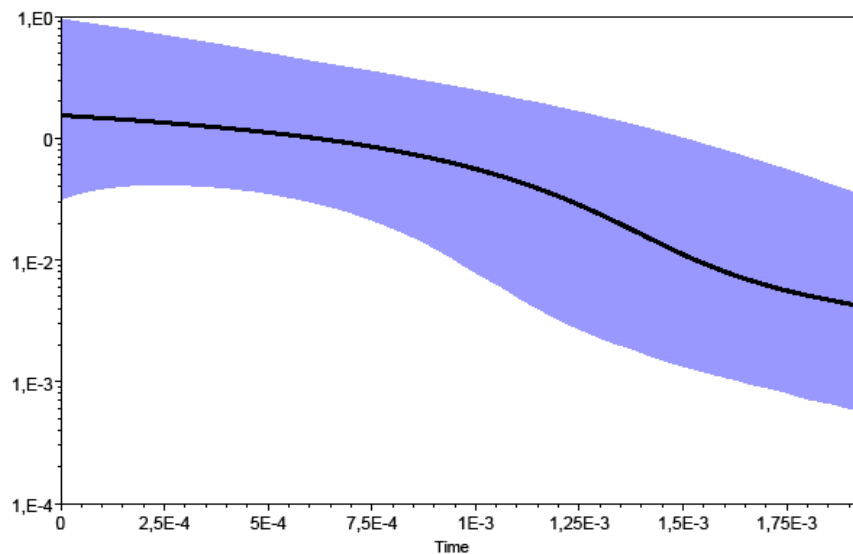
IV.6 BAYESIÁNSKÉ SKYLINE PLOTY

Při výpočtu *skyline plotů* byl díky předešlému výpočtu v programu jModelTest 0.1 jako nejvhodnější model evoluce uvažován TrN + I + G (tzv. TN93 + I + G). Vzhledem k faktu, že analyzovaná sekvence mitochondriální DNA je složená ze dvou odlišných úseků (CR jako nekódující oblast a ND2 jakožto gen), bylo nejprve zcela nezbytné určit, zda bude při analýze potřeba tyto části nějakým způsobem rozdělit či nikoli. Po srovnání tří způsobů výpočtu (nerozdělené na části, přímo zadané „*partition*“ či rozdělené dle „*codon partition*“) jsme dospěli k závěru, že po použití složitějších modelů (tj. dělení na *partition*) se bohužel nedojde ke spolehlivému odhadu jednotlivých parametrů analýzy. Model byl pro výpočet tedy zřejmě příliš složitý. Z tohoto důvodu jsme nakonec zvolili nejjednodušší variantu výpočtu bayesiánských skyline plotů tj. bez dělení sekvence na jednotlivé části.

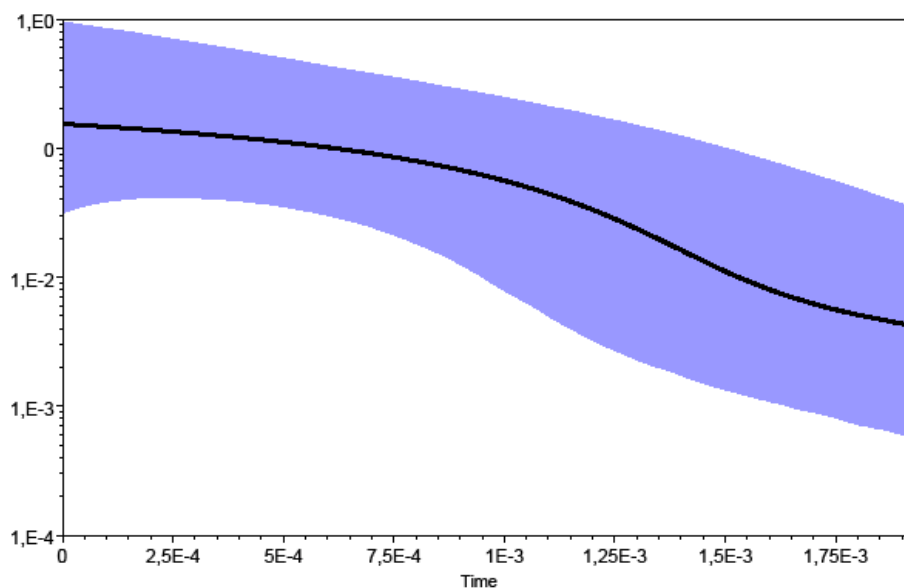
Dle výsledných *skyline plotů* se sice většinou neukázal průkazný růst populace, jelikož se hodnoty populačních velikostí před očekávanou expanzí a po ní překrývají. Konfidenční intervaly jsou tedy příliš široké. Nicméně je zde patrný totožný trend, jenž svým tvarem naznačuje nárůstu populace. Výjimkou je pouze kaliningradská populace, jejíž *skyline plot* předpokládá přibližně konstantní populační velikost v nedávné minulosti (do doby koalescence analyzovaných haplotypů) a také populace ze Šumavy + Rychtářských vrchů + Orlických hor, u níž byl jasně průkazný populační nárůst. Z grafů je dále zjevné, že populační expanze v oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu nastala ve stejném časovém úseku jako v ostatních oblastech výskytu druhu (viz.obr.č.19 – 25).



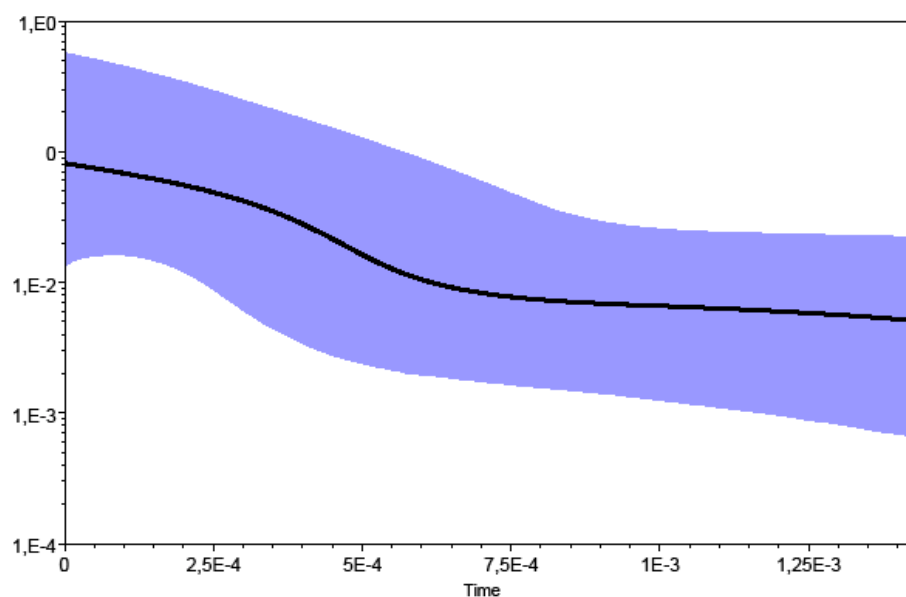
Obr.č.19 : Bayesiánský *skyline plot* spojených sekvencí mtDNA založený na vzorku ($n = 33$) z populací Bulharska, Turecka a Kavkazu. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti $N_e\mu$. Černou linií je znázorněn medián odhadu. Hranice modré plochy značí 95% konfidenční interval.



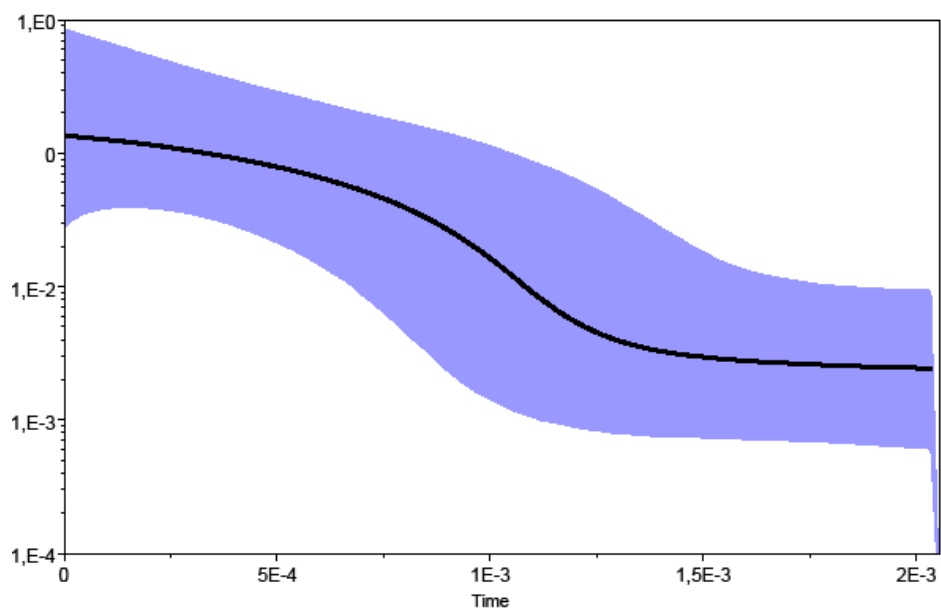
Obr.č.20 : Bayesiánský *skyline plot* spojených sekvencí mtDNA založený na náhodně vybraném vzorku ($n = 33$) ze tří skupin populací. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti $N_e\mu$ (černá linie je medián odhadu, hranice modré plochy 95% konfidenční interval).



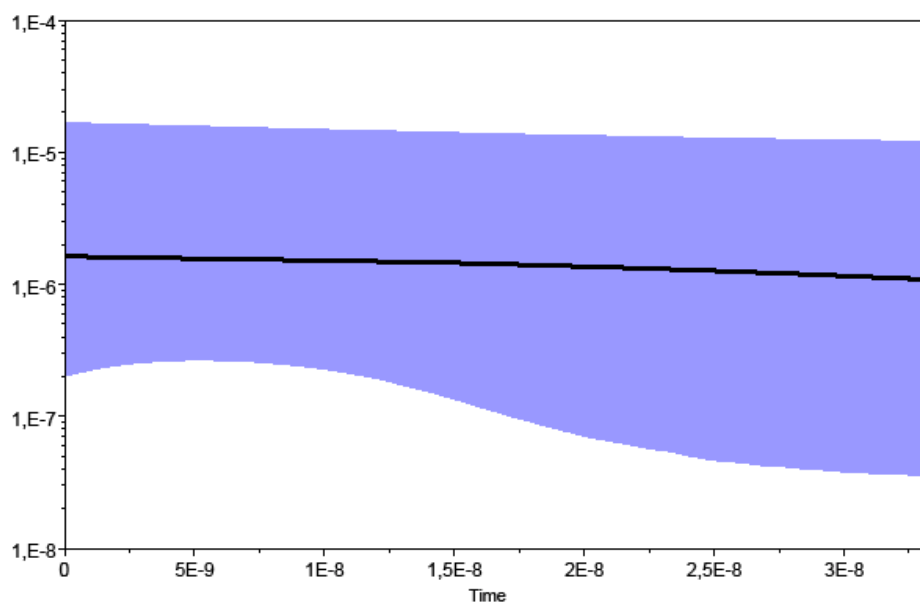
Obr.č.21 : Další bayesiánský *skyline plot* spojených sekvencí mtDNA založený na jiném náhodně vybraném vzorku ($n = 33$) ze tří skupin populací. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti $N_e\mu$ (černá linie je medián odhadu, hranice modré plochy 95% konfidenční interval).



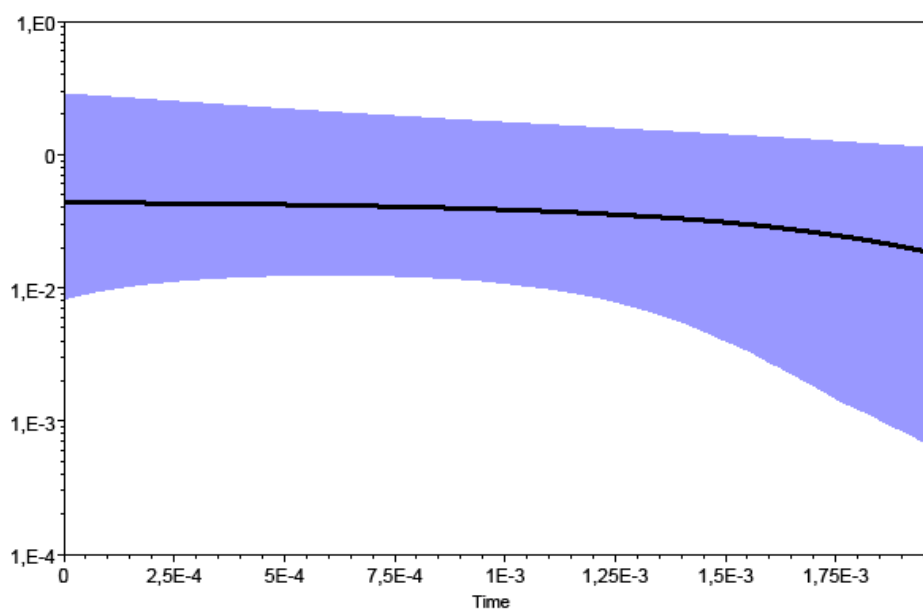
Obr.č.22 : Další bayesiánský *skyline plot* spojených sekvencí mtDNA založený na jiném náhodně vybraném vzorku ($n = 33$) ze tří skupin populací. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti $N_e\mu$ (černá linie je medián odhadu, hranice modré plochy 95% konfidenční interval).



Obr.č.23 : Bayesiánský *skyline plot* spojených sekvencí mtDNA založený na vzorcích ($n = 49$) ze Šumavy, Rychtářských vrchů a Orlických hor. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti $N_e\mu$ (černá linie je medián odhadu, hranice modré plochy 95% konfidenční interval).



Obr.č.24 : Bayesiánský *skyline plot* spojených sekvencí mtDNA založený na vzorku ($n = 16$) z populací Švédska a Kaliningradu. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti $N_e\mu$ (černá linie je medián odhadu, hranice modré plochy 95% konfidenční interval).



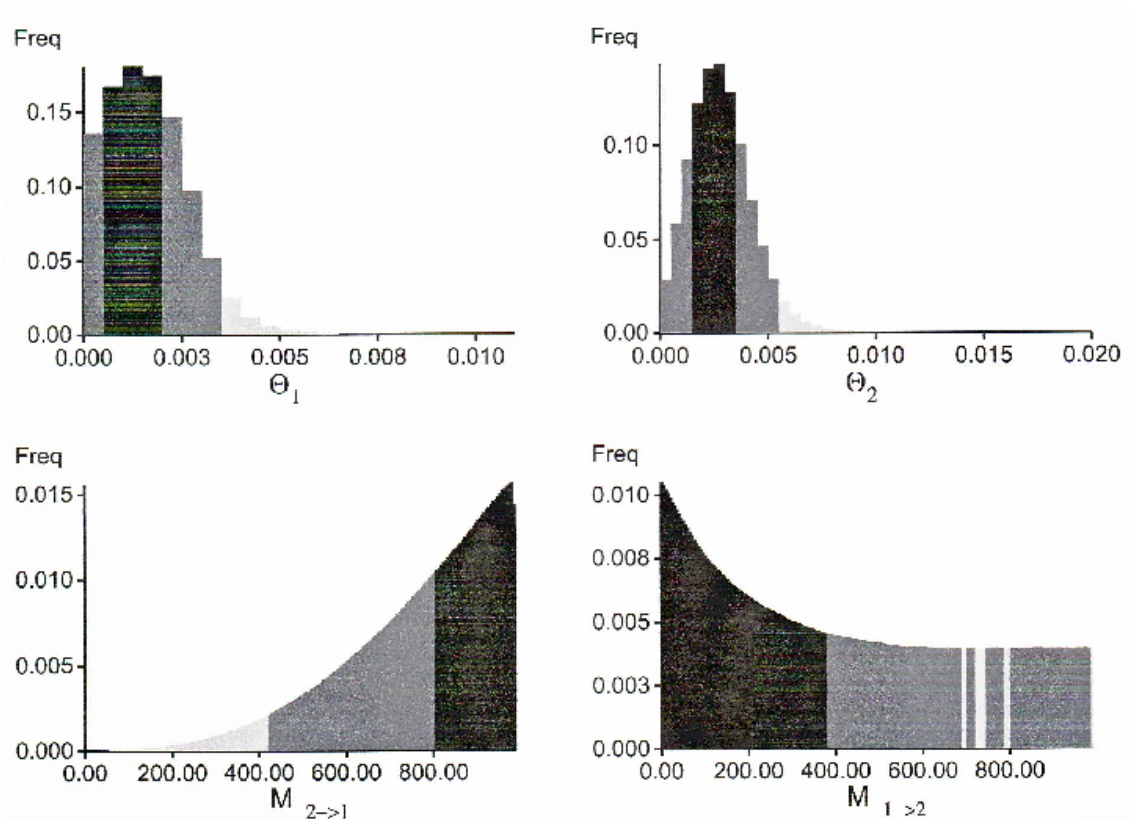
Obr.č.25 : Bayesiánský *skyline plot* spojených sekvencí mtDNA založený na vzorku ($n = 12$) z Kaliningradu. Na ose x je čas měřený v jednotkách mutace na nukleotidovou pozici, na ose y korelát populační velikosti $N_e\mu$ (černá linie je medián odhadu, hranice modré plochy 95% konfidenční interval).

IV.7 GENETICKÝ TOK

Genetický tok mezi populacemi byl analyzován s pomocí dvou dostupných programů. Pro Migrate byl poměr tranzicí a transverzí stanoven dle předchozích výsledků jako 2,25. Pro následující výpočty byla jako první použita populace z Bulharska, Turecka a Kavkazu a jako druhá pak populace vzniklá náhodným výběrem 33 jedinců z kontinuálního areálu. Výsledný mezipopulační tok genů se zdá být nízký v obou směrech. Jeho hodnota se pohybuje okolo jednoho imigranta na generaci a to v případě obou zkoumaných populací. Nízká hodnota autokorelace však naznačuje, že odhad toku genů z kontinuálního areálu do oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu je značně nejistý (viz.tab.č.16). Dle posteriorních distribucí se zdá, že tok genů z oblasti Kavkazu do kontinuálního areálu bude ještě nižší (viz.obr.č.26).

parametr	průměrná hodnota	autokorelace	počet imigrantů na generaci
θ_1	0,00148	0,80365	
θ_2	0,00278	0,77680	
$M_{2 \rightarrow 1}$	772,3	0,18662	1,143004
$M_{1 \rightarrow 2}$	422,7	0,70441	1,175106

Tab.č.16 : Genetický tok mezi populací z Bulharska, Turecka a Kavkazu a populací z kontinuálního areálu



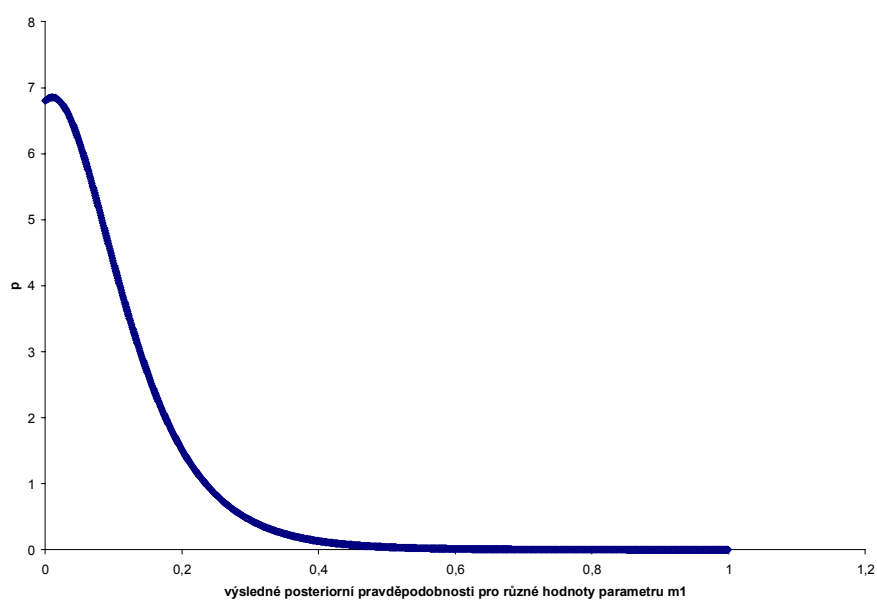
Obr.č.26 : Výsledné posteriorní distribuce pro jednotlivé parametry

V programu IM byla jako první použita populace Bulharska, Turecka a Kavkazu a jako druhá pak opět populace 33 jedinců z kontinuálního areálu. Výpočty potvrdily nízký a asymetrický tok genů mezi zkoumanými oblastmi. Zdá se, migrace je vyšší ve směru z kontinuálního areálu do oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu (přibližně 5 migrantů na generaci). Parametry m_1 , m_2 a q_1 dosahovaly velmi dobrých odhadů (viz.graf č. 15, 16 a 17). Nejpravděpodobnější hodnota pro q_1 (parametr pro výchozí populaci, viz.graf č.19) byla zhruba čtyřikrát menší než pro dnešní populaci Bulharska, Turecka a Kavkazu. Hodnota q_2 , která odpovídá efektivní velikosti populace v kontinuálním areálu, byla s největší pravděpodobností na hodnotě desetkrát vyšší než pro populaci Bulharska,

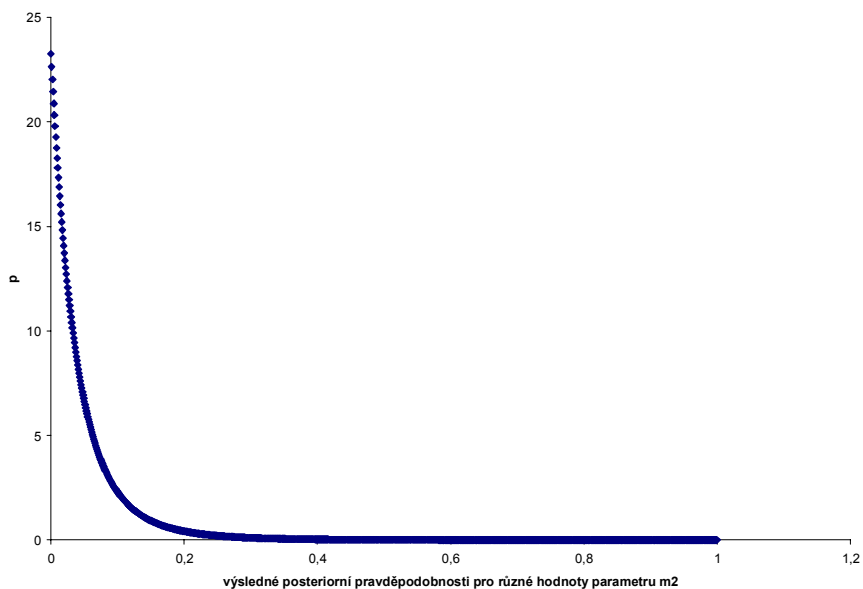
Turecka a Kavkazu (viz.graf č.18). Nejnižší odhady parametru ESS (effective sample size) dosahovaly hodnot vyšších než 100.

parametr	průměrné hodnoty
q1	94,6659
q2	1923,3383
qA	30,2491
m1	0,1024
m2	0,0507

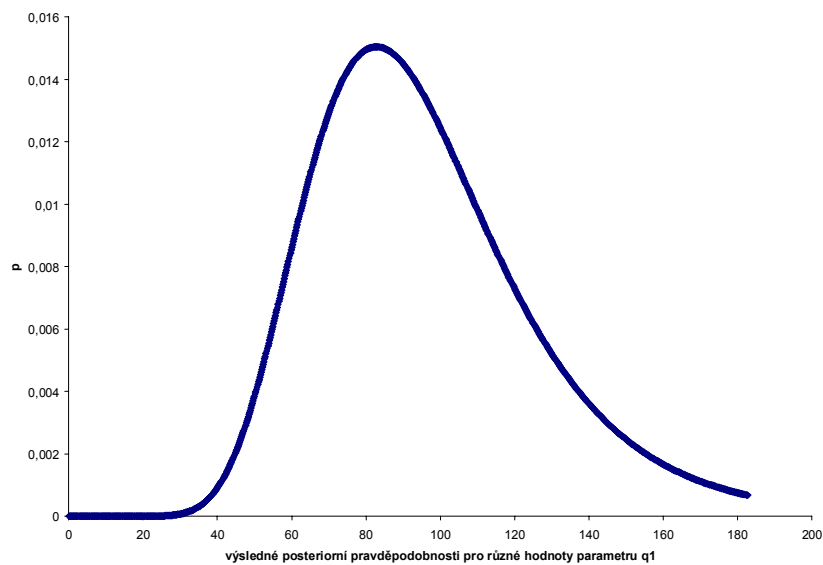
Tab.č.17: Průměrné hodnoty jednotlivých parametrů (q1, m1 pro oblast Bulharska,Turecka, Kavkazu; q2, m2 pro kontinuální areál)



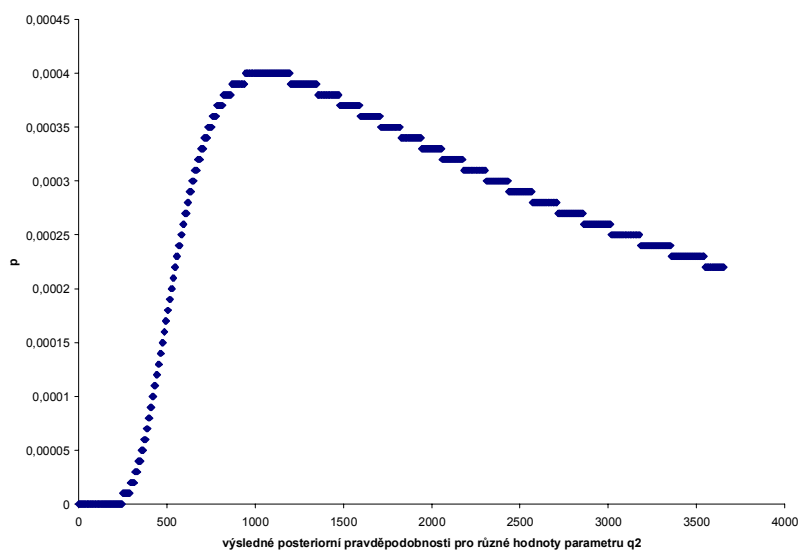
Graf č.15 : Posteriorní pravděpodobnosti parametru m1



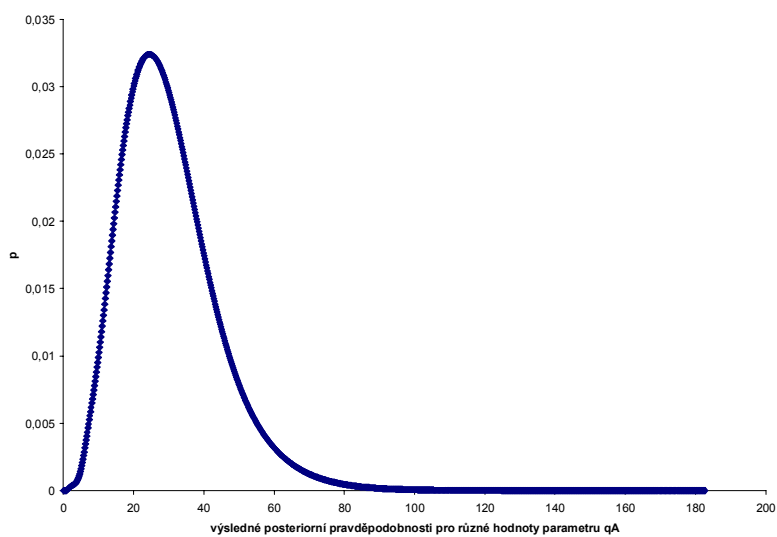
Graf č.16 : Posteriorní pravděpodobnosti parametru m2



Graf č.17 : Posteriorní pravděpodobnosti parametru q1



Graf č.18 : Posteriorní pravděpodobnosti parametru q2



Graf č.19 : Posteriorní pravděpodobnosti parametru qA

V. DISKUZE

V.1 VYSOKÝ TOK GENŮ MEZI POPULACEMI

Z předchozích analýz sekvencí mtDNA je na první pohled patrný nezvykle vysoký počet haplotypů. U 82 jedinců jsem našla 72 haplotypů. V rámci populací neexistuje žádný široce rozšířený obecný haplotyp. Většina haplotypů je tedy zcela unikátních. Na druhou stranu se však některé haplotypy vyskytovaly ve více než jedné populaci. Populace se společným výskytem haplotypu byly i překvapivě vzdálené. Jako příklad lze uvést haplotyp „183Anad“, který byl zjištěn jak u populace z oblasti Kamčatky, tak ve střední i severozápadní Asii a ve střední Evropě.

Haplotypové sítě zkonstruované dvěma různými přístupy byly v obou případech značně komplexní. Je z nich patrné, že zřejmě dochází k vysokému toku genů mezi izolovanými a kontinuálními populacemi. Například některé haplotypy, které byly rozpoznány u vzorků z oblasti střední Evropy, byly nejvíce příbuzné haplotypům ze střední či východní Asie. To by poukazovalo na fakt, že populace jak v kontinuálním areálu, tak ty izolované na jeho západním okraji, jsou dosti promíchané.

Srovnatelná data pro pěvce migrující na velké vzdálenosti v literatuře bohužel téměř chybí. Jednou z výjimek je slavík modráček *Luscinia svecica* (Zink et al.2003), kde v haplotypovém stromě také chybí jasná geografická struktura, ale druh je právě nejspíše ve střední fázi diferenciacce mezi panmixií a reciproční monofylií. Stejně charakteristiky vykazuje i zvonek zelený (*Carduelis chloris*, Merilä 1997), který také nemá haplotypy nikterak geograficky strukturované. Navíc se v rámci severní Evropy také šířil až během posledního století a na okrajích areálu se vyskytuje v izolovaných populacích stejně jako hýl rudý.

K promíchání jedinců mezi populacemi může docházet na zimovišti v oblasti Indie či Nepálu, které je společné pro mnoho populací druhu. Mláďata se zde mohou připojit k adultům, kteří ovšem nemusí pocházet z jejich původní populace, a spolu s nimi poté na jaře táhnou zpět na hnízdiště. Oproti mláďatům vykazují dospělci vysokou *fidelitu* (tj. věrnost hnízdišti). Jednou zahnízdívší ptáci se pak už pravidelně vracejí na hnízdní lokality. Proto může být promíchání populací spojováno jen se zpětným šířením mláďat. Ze studie Albrechta z roku 1998 lze vysledovat, že například u českých populací bylo v letech 1970 – 2002 okroužkováno celkem 2734 ptáků, avšak pouze 117 z nich bylo zpětně pozorováno.

Z toho pouze 10 hlášení se týká juvenilů a zbývajících 107 hlášení jsou adultní ptáci. Celkem 96 jedinců potom vykazuje úplnou věrnost místu okroužkování.

Hýla rudého lze považovat za druh s vysokou diverzitou. Z porovnání nukleotidové diverzity vyplývá, že se izolované populace příliš neliší od ostatních palearktických kontinuálních populací. Dle Pavlové et al.(2005a) nabývala nukleotidová diverzita u populací z kontinuálního areálu průměrné hodnoty 0,0044 (v rozsahu od 0,0024 do 0,0056). Stejně tak i průměrná nukleotidová diverzita u námi zkoumaných izolovaných populací dosahuje podobné hodnoty, tedy 0,0040 (v rozsahu 0,0022 – 0,0053).

V.2 PŘEKVAPIVÁ IZOLACE JIHOZÁPADNÍCH POPULACÍ

Navzdory výše prokázané promíchanosti populací a intenzivnímu toku genů je však zřejmé, že se na jihozápadě areálu jasně odděluje zřetelně izolovaná skupina. Tento fakt podpořilo hned několik různých provedených analýz. Jedná se o skupinu jedinců z Bulharska, Turecka a Kavkazu. Ti se zřetelně oddělili od ostatních již ve fylogenetickém stromě. Celkově měla tato větev sice nižší podporu, ale její členění na vnitřní podskupiny již vykazuje vysokou hodnotu *posterior probability* (0,95). Nicméně v rámci této zřetelně odštěpené větve nejsou vzorky jasně rozdělené. Nebyl zde pozorován jeden zakládající společný haplotyp, ale naopak se zde vyskytuje mnoho navzájem odlišných haplotypů, které jsou zcela náhodně promíchané.

Skupina jedinců z této oblasti se dále také vyčlenila od zbývajících areálu při zkonstruování haplotypových sítí, v nichž vykazovala trend podobající se *star-like patternu*.

Při analýze molekulární variance bylo zřejmé, že je oblast Bulharska, Turecka a Kavkazu odlišná a izolovaná od všech zbývajících populací - jak od těch obývajících kontinuální areál, tak i těch na jeho západním okraji. Navíc zkonstruování křivky *inetrmatch distribution* potvrdilo, že populace z jihozápadní oblasti mají jiný původ než ty v kontinuálním areálu. Osídlování Bulharska, Turecka a Kavkazu proběhlo zřejmě zcela nezávisle.

Počátek uvažované izolace populací na jihozápadě areálu (Bulharsko, Turecko, Kavkaz) může být vysvětlen hned několika způsoby. První možnost je, že se několik jedinců do této oblasti dostalo migrací z kontinuálního areálu. V oblasti Kavkazu se poté usadili a jejich populace se zde dále vyvíjejí v relativní izolaci. Jsou však možná i další alternativní vysvětlení. Lze například uvažovat, že kavkazský areál by mohl být dříve propojen s oblastí střední Asie. Toto spojení však časem zaniklo. Proto jsou populace z této oblasti v současnosti izolované. Poslední možností by bylo, že jak populace v kontinuálním areálu, tak ty izolované na jeho jihozápadě by vznikaly ze samostatných populací. Pak by ovšem tyto dvě skupiny

musely být recipročně monofyletické. Tento fakt se ale s pomocí fylogenetického stromu neprokázal.

Jedinci z kavkazské oblasti jsou považováni za samostatný klastř i u dalších druhů pěvců s širokým palearktickým rozšířením. Například se průkazně vyčleňují u střízlíka obecného *Troglodytes troglodytes* (Drovetski et al. 2004), konipase bílého *Motacilla alba* (Pavlova 2005b) a lejska malého *Ficedula parva* (Zink et al. 2008).

Není však běžné, že by výše zmíněné druhy zasahovaly určitou částí svých populací také do oblasti jižní Evropy. Z tohoto hlediska se zdají být výsledky této práce jako zcela unikátní. Zkoumaný druh *Carpodacus erythrinus* se totiž nedávno (v letech 2006 – 2007) začal objevovat také právě v oblasti Bulharska. Z provedených analýz vyplývá, že vzorky získané z této oblasti, jsou velmi blízce příbuzné těm z oblasti Kavkazu.

Výše zmíněné pozorování navíc souhlasí se studií Pavlové et al. (2005a), jenž také považuje Kavkaz za samostatnou linii oddělenou od kontinuálního areálu. Navíc Pavlova et al. (2005a) a Hudec (1983) dále uvádí i zimní pozorování několika jedinců v jižní Evropě. Také Cramp et al. (1994) poukazuje na další možné zimoviště v oblasti východního Izraele. Populace na jihozápadě by tedy mohly mít i jiné nově vznikající zimoviště, které by bylo odlišné od zimoviště kontinuální populace v oblasti jižní Asie. Nicméně tuto možnost by bylo třeba ještě více podložit a podrobněji prozkoumat.

Pavlová et al. (2005a) již dříve usuzuje, že ptáci pocházející z Krasnodaru (Kavkaz) patří i z hlediska barevnosti a dalších morfologických znaků k subspecii *Carpodacus erythrinus kubanensis*. Liší se tedy od jedinců z kontinuálního areálu (subsp. *Carpodacus erythrinus erythrinus*) nepatrně větším tělem a růžovějším odstínem červené barvy. Barevnost však nemůže být jediným kritériem rozlišení populací. Jak plyne ze studie Albrechta et al. (2009) je zbarvení tohoto druhu značně proměnlivé a kolísá i v rámci jediné lokality. Na rozlišování subspecií jen na základě odstínu se tedy nelze příliš spoléhat. Náznak podobného barevnostního trendu byl pozorován i při odchytu jedinců v oblastech Bulharska a Turecka. Jedinci z těchto oblastí by se dle barevnosti spíše přidružovali k subspecii *Carpodacus erythrinus kubanensis*.

Populace izolované v oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu tedy zřejmě jeví jak genetickou, tak i fenotypovou divergenci od kontinuálního areálu a jsme v tomto místě velmi pravděpodobně svědky počínající speciace.

V.3 PŮVOD IZOLOVANÝCH FRAGMENTOVANÝCH POPULACÍ NA ZÁPADĚ AREÁLU DRUHU

Haplotypy jedinců z České republiky se také ve většině případů jeví jako unikátní. 41 jedinců utvořilo 39 výhradně středoevropských haplotypů. Tyto haplotypy se mezi sebou neprolínaly ani v rámci jednotlivých českých lokalit, čili co lokalita to jedinečné haplotypy. Pouze dva české haplotypy byly stejné jako u vzorků z oblasti Kamčatky a šest jedinců vykazovalo haplotyp shodný s haplotypem ze střední Asie. Tomu odpovídá i uspořádání v haplotypové síti, kdy haplotypy z České republiky neutvořily žádnou jasně vymezenou skupinu, ale spojovaly se jak s haplotypy ze severozápadní či střední Asie, tak s haplotypy z oblasti Kamčatky.

Stejně tak to platilo i pro haplotypy ze severní Evropy (Švédsko, Kaliningrad), z nichž však pouze jeden vzorek měl haplotyp totožný s haplotypem ze střední Asie. Zbývajících čtrnáct haplotypů bylo opět unikátních. Z haplotypové sítě je dále patrné, že jedinci ze severní oblasti tvořili nejčastěji skupiny spolu s haplotypy ze střední Evropy a spolu s nimi se pak připojovaly k různým lokalitám v rámci Asie.

Dle fylogenetického stromu lze potvrdit, že jedinci z České republiky poměrně často klastrují se vzorky z Kaliningradu a Švédska. Spolu s nimi se poté připojují ke vzorkům jak ze severozápadní, tak ze střední či východní Asie. Tento fakt opět koresponduje se závěrem, že všechny populace jsou značně promíchané.

Podle analýzy molekulární variance se dá usuzovat, že se vzorky z České republiky neliší od populací v kontinuálním areálu. To však neplatí pro analýzu vzorků ze severní Evropy. Dle křivky *intermatch distribution* je navíc možné, že jsou populace ze severní i střední Evropy trochu odlišné od populací v kontinuálním areálu. To potvrzuje předpoklad, že populace hýla rudého není panmiktická. Díky prokázanému vysokému toku genů je však obtížné rozlišit, zda je odlišnost mezi populacemi výsledkem expanze či stochastických procesů.

Z dalšího srovnávání izolovaných evropských populací je zřejmé, že rozdělení na dvě skupiny (severní a střední oblast Evropy) nevysvětlí dostatečně variabilitu mnou zjištěných sekvencí. Dle analýzy molekulární variance se jedinci z České republiky neliší signifikantně od jedinců pocházejících z oblasti severní Evropy. I pokud jsem analyzovala jednotlivé populace zvlášť (tedy nikoli jako jedinou populaci pro střední či severní Evropu), pak byl

výsledek analýzy molekulární variance obdobný. Jednotlivé populace z České republiky a severní Evropy se opět navzájem nelišily. Ve fylogenetickém stromě často utvořili jedinci z českých populací oddělenou větev, která však byla blízce příbuzná právě vzorkům ze severní Evropy.

Na základě porovnání křivek *intermatch distribution* se však zdá, že kolonizační vlna severních oblastí by přeci jen mohla být odlišná od té, která probíhala v České republice. Analýza *intermatch distribution* navíc poukázala na fakt, že všechny izolované české populace expandovaly ze společné ancestrální populace. Stejně tak i populace z oblasti Kaliningradu a Švédska vznikaly zřejmě ze stejné původní populace.

Je ovšem velmi obtížné chtít všechny tyto trendy analyzovat zcela přesně. Vzhledem k faktu, že *fidelita* byla prokázána pouze u adultů (Albrecht 1998), tak zde svou nezanedbatelnou roli opět může hrát šíření juvenilů. Dále je třeba mít stále na paměti, že rozdíly mezi populacemi mohou vznikat nejen díky jejich rozdílnému původu, ale také díky stochastickým populačně-genetickým procesům jako je třeba *surfing* (tj. oblast s nejvyšší frekvencí mutací nemusí být místem jejich vzniku) (Excoffier et Ray 2008, Excoffier et al. 2009). Nakolik by se tento jev projevil právě u hýla rudého není prozatím známo. Komplikací v těchto úvahách může být migrace a zároveň vysoké promíchání populací. Je však jisté, že je v tomto případě lepší vyvarovat se zjednodušeným tvrzením jako například tomu, že geneticky odlišné populace musejí mít nutně odlišný původ.

V.4 MEZIPOPULAČNÍ TOK GENŮ

Přesné prozkoumání genetického toku je u většiny z izolovaných populací bohužel značně obtížné. Dostupné metody a programy, které se touto otázkou zabývají, totiž často předpokládají, že zkoumaná populace byla stabilní po relativně dlouhou dobu (alespoň 4N_e generací). Například v oblasti České republiky nelze tento předpoklad splnit, protože hýl rudý zde průkazně hnízdí teprve od roku 1962 (Kozák 1963). Doba trvání stabilní populace by však pro přesné výpočty musela být evidentně značně delší. Z tohoto důvodu byly pro účely analýzy toku genů použity pouze populace z Bulharska, Turecka a Kavkazu a náhodně vybraný vzorek reprezentující populaci z kontinuálního areálu.

Na základě fylogenetického stromu by se dalo usuzovat, že tok genů mezi kontinuálním areálem a jihozápadní oblastí je asymetrický. Čtyři jedinci odchycení v kavkazské oblasti, kteří se objevili na různých místech stromu mimo skoro monofyletický klád Bulharsko + Turecko + Kavkaz, pak naznačují, že do této oblasti nejspíše namigrovali z kontinuálního

areálu. Zdá se navíc, že je genetický tok omezen pouze na oblast severního Kavkazu, což by mohlo podpořit jednu z hypotéz o vzniku izolace v této oblasti.

Dle výsledků z programu Migrate je genetický tok mezi oběma oblastmi velmi nízký a asymetrický. Nabývá hodnot okolo jednoho imigranta na generaci. Dle posteriorních distribucí se však zdá, že hodnota toku genů z oblasti Kavkazu do kontinuálního areálu bude ještě nižší. I přes to, že analýza byla počítána na relativně dlouhý běh, tak se některé hodnoty autokorelace jeví jako velmi nízké, avšak jsou v souladu s výsledkem fylogenetického stromu. Z důvodu nízké autokorelace není například odhad genetického toku z kontinuálního areálu zcela jistý.

Výsledky z programu IM odpovídají taktéž asymetrickému toku genů. Míra migrace je však velmi malá a opět větší ve směru z kontinuálního areálu do oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu. Opakované běhy analýzy poskytly stejné výsledky.

Předchozí výsledky jsou odlišné od studie Pavlové et al. (2005a), která pozorovala opačný asymetrický tok genů směrem z Kavkazu a to jak do moskevské oblasti, tak do Jekaterinburgu. Opakované běhy analýzy poskytly stejné výsledky.

Finální rozřešení této otázky genetického toku je však značně obtížné, protože v obou případech byla použita pouze mitochondriální DNA. Jedná se tedy o analýzu jediného lokusu, což ovšem pro jednoznačný závěr nemůže být dostačující.

V.5 DEMOGRAFICKÁ HISTORIE POPULACÍ

Z předchozích pozorování hýla rudého je zdokumentováno, že se do oblasti střední a severní Evropy rozšířil poměrně nedávno. Většina autorů se shoduje, že největší expanzi na evropském kontinentu prodělal ve dvou vlnách na začátku 19.století (Turček 1960, Hudec 1983, Šťastný 1991, Cramp & Perrins 1994, Albrecht 1996).

Demografická historie populací byla testována hned několika způsoby. Hřebenovitý *pattern* fylogeografického stromu vypočteného na základě analýzy všech vzorků (tj. i se vzorky ze studie Pavlové et al. 2005a) byl shodný s předpokladem prodělané expanze.

Možné šíření je patrné i z porovnání haplotypů. Na několika místech haplotypové síť se totiž vyskytl náznak *star-like patternu*, který naznačuje recentní expanzi. Tento vzor lze vypořadovat jak u jedinců z oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu, tak u některých jedinců například z oblasti Kamčatky.

Testy neutrality (Tajimovo D a Fuovo F_s) izolovaných populací většinou vyšly signifikantně (tj. v hodnotách odlišných od nuly). Tento trend může naznačovat recentní expanzi. U některých populací však výsledné hodnoty nebyly průkazně odlišné od nuly

(například švédská populace). Zdá se tedy, že data nepodporují předpoklad dlouhodobě stabilní populace a k expanzi mohlo dojít, avšak signál není příliš silný.

Zcela signifikantně negativní vycházely testy neutrality až při porovnání celých oblastí (Bulharsko + Turecko + Kavkaz, severní + střední Evropa). Důvod může být zcela jednoduchý. Při analýze populací propojených do oblastí vzrostl totiž zřejmě počet vzorků na optimální množství. Taktéž hodnoty Rozasova R_2 vycházely u datasetů s malým počtem vzorků (Švédsko, Bulharsko, Turecko) jako nesignifikantní. U populací ze Šumavy, Rychtářských vrchů a Kaliningradu však tento test prokázal signifikantní expanzi.

Další analýzy byly provedeny pomocí metody *mismatch distribution* a navíc přes nejnovější metodu Byesiánských skyline plotů. Výsledky obou typů analýz opět mohou podléhat zkreslení výsledků při nedostatečném množství vzorků. Z tohoto důvodu nešlo zahrnout do analýz populace z Orlických hor, Švédska ani z Tadžikistánu. Některé z konstruovaných křivek *mismatch distribution* byly unimodální. Ty pak souhlasí s modelem náhlé populační expanze. Jednalo se například o křivky vytvořené pro oblast Bulharsko + Turecko + Kavkaz, Šumavu i pro Kaliningard. Nicméně část z křivek *mismatch distribution* se naopak jevila jako vícervrcholová, což může být artefaktem díky malému počtu vzorků pro jednotlivé populace. Multimodální byla například křivka pro Rychtářské vrchy, Bulharsko a Turecko.

Co se týče *skyline plotů*, tak se sice neukázal průkazný populační růst, protože konfidenční intervaly byly příliš široké, ale u všech zkoumaných populací měla linie trendu velmi podobný průběh. To naznačuje, že se populační změna udála v přibližně stejném období a měla vesměs velmi podobné charakteristiky jak u populací v kontinuálním areálu, tak u těch z oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu. Samotné oddělení jednotlivých populací však nelze zcela přesně datovat. Bohužel v současnosti není známa přesná mutační rychlost (μ) analyzovaných oblastí mtDNA. Bylo by jistě možné, a snad i žádoucí, tuto mezeru ve znalostech divergence linií doplnit. V budoucnu by šlo získat sekvence další oblasti mtDNA - například *cytochromu b*. Poté by bylo možné se pokusit přes sekvence několika vzorků z Bulharska, Turecka, Kavkazu a z kontinuálního areálu určit čas oddělení jednotlivých populací. Mutační rychlost tohoto markeru je sice známa (Nabholz et al. 2008, Nabholz et al. 2009), ale i přes to by odhady divergence linií byly stále pouze dosti hrubé.

V.6 DALŠÍ MOŽNOSTI ROZŠÍŘENÍ VÝZKUMU

Při stanovování hypotéz a závěrů ohledně analýz se musí z části také počítat s faktem, že historie jednoho genu neodráží nutně celou historii druhu. V budoucnu by jistě bylo lepší zanalyzovat ještě další lokusy. Je možné všechny vzorky podrobit například analýzám na krevní parazity a jejich linie. Podobným problémem se již zabýval Petr Synek (2009), který v rámci své diplomové práce zkoumal původce ptačí malárie u hýla rudého na katedře parazitologie PřF UK. Již výše navrženou hypotézu odlišných jihoevropských zimovišť by mohla potvrdit i analýza radioizotopů získaných z peří. Dospělci zkoumaného druhu totiž nepelichají dříve než dosáhnou zimoviště (Stjernberg 1979). Díky tomuto materiálu by tedy bylo možné získat další informace ohledně migračního chování hýla rudého.

VI. ZÁVĚRY

- 1) Většina ze zjištěných haplotypů byla zcela unikátní. Celkem 82 jedinců z izolovaných populací se rozdělilo v 72 haplotypů.
- 2) Izolované populace ze střední a severní Evropy neutvořily ve fylogenetickém stromě jasně vymezenou skupinu. Často klastrovaly jak s populacemi ze severozápadní Asie, tak ze střední či východní Asie. Populace jsou zřejmě dosti promíchané a výsledný strom vykazoval minimální geografickou strukturu.

Na základě komplexních sítí haplotypů se dá usuzovat, že dochází k vysokému toku genů mezi populacemi. Všechna pozorování naznačila, že se většina izolovaných populací příliš neliší od ostatních kontinuálních populací.
- 3) Od kontinuálního areálu a západních izolovaných populací se průkazně lišily pouze populace z oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu. Ve fylogenetickém stromě se vzorky z této oblasti spojily ve vysoce podpořený, samostatný klastr, který naznačil jasnou izolaci oblasti od zbytku areálu. Utvořily navíc oddělenou skupinu i při konstrukci haplotypových sítí.
- 4) Zakladatelé populací izolovaných na západním okraji areálu pocházeli zřejmě z kontinuálního areálu. Populační změna se v jednotlivých oblastech udála v přibližně stejném období a měla velmi podobné charakteristiky. Dle analýzy molekulární variance se populace v severní oblasti mírně liší od kontinuálního areálu. Z porovnání populací z České republiky a ze severní Evropy bylo zřejmé, že se navzájem neliší. Na základě porovnání křivek *intermatch ditribution* se však zdá, že kolonizační vlna severních oblastí by přeci jen mohla být odlišná od té, která probíhala v České republice.
- 5) Populace z Bulharska, Turecka a Kavkazu vznikaly z jiné původní populace než ostatní izolované populace. Demografická historie populace této oblasti však zřejmě probíhala podobně jako v případě ostatních izolovaných populací. Navíc se populační změna pravděpodobně udála i ve stejném časovém období.

- 6) Populační expanze byla posléze potvrzena dle křivky *mismatch distribution* jak u šumavské a kaliningradské populace, tak u vzorků z oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu. Přes několik různých testů neutrality byla expanze vesměs prokázána i pro další izolované populace s více jak čtyřmi vzorky např. pro Rychtářské vrchy.
- 7) Zdá se, že jsme v oblasti Bulharska, Turecka a Kavkazu možná svědky počínající speciace druhu. Tato speciace může mít spojitost se vznikem nových zimovišť v oblasti jižní Evropy či Izraele.
- 8) Mé výsledky naznačují, že počáteční stadia speciace můžeme překvapivě najít i u dálkových migrantů, u nichž je navíc poměrně vysoký tok genů mezi jednotlivými populacemi.

VII. POUŽITÁ LITERATURA

- Albrecht, T.** (1996). Šíření hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) v jižních Čechách. *Sylvia* 32, 19 – 28.
- Albrecht, T.** (1998). Ekologie hýla rudého na Šumavě. Diplomová práce katedry Zoologie PřFUK, 110 p.
- Albrecht, T.** (2008). Hýl rudý *Carpodacus erythrinus* in Cepák, J., Klvaňa, P., Škopek, J. (2008). Atlas migrace ptáků České a Slovenské republiky. Aventinum, Praha.
- Albrecht, T., Vinkler, M., Schnitzer, J., Poláková, R., Munclinger, P., Bryja, J.** (2009). Extra-pair fertilizations contribute to selection on secondary male ornamentation in a socially monogamous passerine. *Journal of Evolutionary Biology* 22, 2020 – 2030.
- Arbogast, B., Kenagy, G.J.** (2001). Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography* 28, 819 – 825.
- Avise, J.C., Arnold, J., Martin Ball, R.** (1987). Intraspecific phylogeography – Mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 489 – 522.
- Avise, J.C.** (1989). Gene trees and organismal histories - a phylogenetic approach to population biology. *Evolution* 43, 1192 – 1208.
- Avise, J.C.** (1998b). Pleistocene phylogeographic effects on avian populations and the speciation process. *Proceedings of the Royal Society of London* 265, 457 – 463.
- Avise, J.C.** (2000). *Phylogeography – the history and formation of species*. Harvard University Press, London.
- Ballard, J.W.** (2004). The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular Ecology* 13, 729-744.

- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A.** (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
- Beerli, P.** (2006): Comparison of Bayesian and maximum likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics* 22(3), 341 – 345.
- Beerli, P.** (2008): Migrate version 3.0 - a maximum likelihood and Bayesian estimator of gene flow using the coalescent. Distributed over the internet at website <http://popgen.scs.edu/migrate.html>.
- Beneš, B.** (1971). Výskyt hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) v Hrubém Jeseníku. Sborník Česko Slezského muzea Opava 20, 86 – 87.
- Bensch, S., Hasselquist, D.** (1999). Phylogeographic population structure of great reed warblers: an analysis of mtDNA control region sequences. *Biological Journal of the Linnean Society* 66, 171 – 185.
- Bensch, S., Grahn, M., Müller, N.** (2009). Genetic, morphological, and feather isotope variation of migratory willow warblers show gradual divergence in a ring. *Molecular Ecology* 18, 3087 – 3096.
- Berthold, P.** (2001). Bird migration – a general survey. Oxford University Press, New York.
- Berthold, P.** (2003). Avian migration. Springer-Verlag, New York.
- Bělka, T.** (1979). Hýl rudý (*Carpodacus erythrinus*) v Orlických horách. *Živa* 3, 109.
- Björklund, M.** (1989a). Microgeographic variation in the Song of the Scarlet Rosefinch. *Ornis Scandinavica* 20, 255 – 264.
- Björklund, M.** (1989b). Male contests in the scarlet rosefinch (*Carpodacus erythrinus*) in relation to asymmetries in resource holding power and pairing status. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 25, 137 – 140.

- Björklund, M.** (1990). Mate choice is not important for female reproductive success in the Common Rosefinch. *The Auk* 107, 35 – 44.
- Bozhko, S.E.** (1974). The ecology of the nesting period in the Scarlet Grosbeak, *Carpodacus erythrinus* Pall., in the Parks of Leningrad. *Acta Ornithologica* 14, 39 – 57.
- Bozhko, S.E.** (1980). Der Karmingimpel. Neues Brehm Bücherei, A.Ziemsen Verlag, Wittenberg Lutherstadt.
- Bridle, J.R.** (2001). Spatial structure and habitat variation in a grasshopper hybrid zone. *Evolution* 55, 1832 – 1843.
- Buehler, D.M, Baker, A.J.** (2003). Characterization of the red knot (*Calidris canutus*) mitochondrial control region. *Genome* 46, 565 – 572.
- Bušek, O.** (1990). Obratlovci Doupovských hor. Sborník Západočeského Muzea Plzeň 76, 1 – 52.
- Clement, M., Posada, D., Crandall, K.A.** (2000). TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10), 1657-1660.
- Cooper, S. J. B., Ibrahim, K. M., Hewitt, G. M.** (1995). Postglacial expansion and genome subdivision in the European grasshopper *Chorthippus parallelus*. *Molecular Ecology* 4, 49 –60.
- Cramp, S., Perrins, C.M.** (1994). The Birds of Western Palearctic vol.VIII.. Oxford University Press, Oxford.
- Černý, W.** (2004). Ptáci. Aventinum, Praha.
- Darola, J.** (1977). Príspevok k súčasnej etape expansie červenáka karmínového (*Carpodacus erythrinus* PALL 1770) na Slovensku. *Biológia* 32, 111 – 120.

- Dementev, G.P.** (1954). Birds of the Soviet Union. Sovetskaya Nauka 5, Moscow.
- Dickinson, E.C.** (2003). Complete checklist of the birds of the world. Christopher Helm, London.
- Drovetski, S.V., Rohwer, R.M., Fdeev, I.V., Nesterov, Y.V.** (2004a). Complex biogeographic history of a Holarctic passerine. Proceedings of the Royal Society of London, Series B, 271, 545 – 551.
- Drovetski, S.V., Zink, R.M., Fadeev, I.V., Koblik, Y.A.** (2004b). Mitochondrial phylogeny of *Locustella* and related genera. Journal of Avian Biology 35, 105 – 110.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B., Pybus, O.G.** (2005). Bayesian Coalescent Inference of Past Population Dynamics from Molecular Sequences. Molecular Biology and Evolution 5, 1185–1192.
- Drummond, A.J., Rambaut, A.** (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. BMC Evolutionary Biology 7, 214.
- Dvorak, M.** (1993). Atlas der Brtuvögel Österreichs. Umweltbundesamt, Wien.
- Edwards, S., Bensch, S.** (2009). Looking forwards or looking backwards in avian phylogeography? A comment on Zink and Barrowclough 2008. Molecular Ecology 18, 2930 – 2933.
- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J.** (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics 131, 479-491.
- Excoffier, L.** (2004). Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion : lessons from the infinite-island model. Molecular Ecology 13(4), 853 – 864.

- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S.** (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Excoffier, L., Ray, N.** (2008). Surfing during population expansions promotes genetic revolutions and structuration. *Trends in Ecology and Evolution* 23(7), 347-351.
- Excoffier, L., Foll, M., Petit, R.J.** (2009). Genetic Consequences of Range Expansions. *Annual Review of Ecology and Systematics* 40, 481–501.
- Feriancová, Z.** (1959). Niekólko ornitologických poznámok z okolia Oravsekej priehrady. *Biologia* 14, 872 – 876.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., Hurst, G.D.D.** (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology* 18, 4541–4550.
- Habet, J.C., Schmitt, T. & Müller, P.** (2005). The fourth paradigm pattern of postglacial range expansion of European terrestrial species: the phylogeography of the Marbled White butterfly (*Satyrinae, Lepidoptera*). *Journal of Biogeography* 32, 1489–1497.
- Hackett, S.J.** (1996). Molecular phylogenetics and biogeography of tangersin the genus *Ramphocelus* (Aves). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 5, 368 – 382.
- Hagemeijer, W.J.M.** (1997). *The EBCC Atlas of European Breeding Birds*. T & A D Poyser, London.
- Hall, T.A.** (1999). BioEdit: a user–friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.
- Hansson, B., Bensch, B.D.** (2000). Increase of genetic variation over time in a recently founded population of great reed warblers (*Acrocephalus arundinaceus*) revealed by microsatellites and DNA fingerprinting. *Molecular Ecology* 9, 1529–1538.
- Hewitt, G.M.** (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405, 907–913.

- Hewitt, G.M.** (2001). Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10, 537-549.
- Hey, J., Wakeley, J.** (1997). A coalescent estimator of the population recombination rate. *Genetics* 145, 833-846.
- Hey, J., Nielsen, R.** (2004). Multilocus methods for estimating population sizes, migration rates and divergence time, with applications to the divergence of *Drosophila pseudoobscura* and *D. persimilis*. *Genetics* 167, 747-760.
- Hill, A.** (1986). Die Einwanderung des Karmingimpels (*Carpodacus erythrinus*) in die Bundesrepublik Deutschland. *Acta Ornithologica* 38, 72 – 84.
- Hudec, K.** (1983). Fauna ČSSR – Ptáci díl 3/II.. Academia, Praha.
- Huson, D.H.** (2007). Dendroscope – an interactive tree drawer. *BMC Evolutionary Biology* 8, 460.
- Irwin, D.E., Bensch, S., Price, T.D.** (2001). Speciation in a ring. *Nature* 409, 333 – 337.
- Irwin, D.E.** (2005). Birds of two worlds – the ecology and evolution of migration. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- Józefik, M.** (1960). Modyfikacje poł'udniowo – zachodniej granicy zasięgu *Erythrina erythrina* (Pall.) na przestrzeni dwóch ostatnich stuleci. *Ornitologische Mitteilungen* 5, 307 – 324.
- Jung, N.** (1983). Struktur und Faktoren der Expansion des Karmingimpels, *Carpodacus erythrinus*, in Europa und Kleinasien. *Beiträge Vogelkunde* 29, 249 – 273.
- Kidd, D.M., Ritchie, M.G.** (2006). Phylogeographic information systems : putting the geography into phylogeography. *Journal of Biogeography* 33, 1851 – 1865.
- Kinzelbach, R.** (1995). Karmingimpel *Carpodacus erythrinus* im 15. und 16. Jahrhundert am Oberrhein. *Vogelwelt* 116, 285 – 292.

- Kondělka, D.** (1970). Hnízdění hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) u Bohumína. *Sylvia* 18, 246 – 247.
- Korsten, M., Ho, S.Y.W., Davidson, J., Pahn, B., Vulla, E., Roth, M., Tumanov, I.L., Kojola, I., Andersone-Lilley, Z., Ozolins, J., Pilot, M., Mertzanis, Y., Giannakopoulos, A., Vorobiev, A.A., Markov, N. Saveljev, A.P., Lyapunova, E.A., Abramova, A.V., Mannil, P., Valdmann, H., Pazetnov, S.V., Pazetnov, V.S., Rokov, A.M., and Saarma, U.** (2009). Sudden expansion of a single brown bear maternal lineage across northern continental Eurasia after the last ice age: a general demographic model for mammals?. *Molecular Ecology* 18, 1963–1979.
- Kostadinova, I.** (2007). Important Bird Areas in Bulgaria and NATURA 2000. Bulgarian Society for the Protection of Birds, Sofia.
- Kozák, V.** (1963). Hnízdění hýla rudého *Erythrina erythrina* e. (Pall.1770) v r. 1962 na Moravě. *Zoologické Listy* 12, 357 – 359.
- Kuhner, M. K., Yamato, J., and Felsenstein, J.** (1995). Estimating effective population size and mutation rate from sequence data using Metropolis-Hastings sampling. *Genetics* 140, 1421 – 1430.
- Kvist, L., Martens, J., Ahola, A.** (2001). Phylogeography of a Palaearctic sedentary passerine, the willow tit *Parus montanus*. *Journal of Evolutionary Biology* 14, 930 – 941.
- Kvist, L., Martens, J., Higuchi, H.** (2003a). Evolution and genetic structure of the great tit *Parus major* komplex. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 270, 1447 – 1454.
- Kvist, L., Martens, J., Nazarenko, A.A.** (2003b). Paternal Leakage of Mitochondrial DNA in the Great Tit *Parus major*. *Molecular Biology and Evolution* 20, 243 – 247.

- Lemberk, V.** (1995). Hnízdní výskyt hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) ve Východních Čechách v letech 1993 – 1994. *Panurus* 6, 73 – 82.
- Librado, P., Rozas, J.** (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Liebers, D., Knijff, P., Helbig, A.J.** (2004). The herring gull complex is not a ring species. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, 271, 893 – 901.
- Lynch, M.**(1998). Deleterious mutation accumulation in organelle genomes. *Genetica* 103, 29-39.
- Martens, J., Kessler, P.** (2000). Territorial song and song neighbourhoods in the Scarlet Rosefinch *Carpodacus erythrinus*. *Journal of Avian Biology* 31, 399 – 411.
- Merilä, J.** (1997). Historical demography and present day population structure of the greenfinch *Carduelis chloris* – an analysis of mtDNA control-region sequences. *Evolution* 51, 946 – 956.
- Miles, P.** (1969). Der Karmingimpel (*Carpodacus erythrinus* PALLAS) als Brutvögel im Gebiet den Riesengebirge – Nationalparkes. *Opera Concorctica* 6, 85 – 91.
- Miles, P.** (1987). Některé poznatky z vertikálního rozšíření ptactva v Krkonoších. *Živa* 17, 188 – 191.
- Mindell, D.P.** (1998). Multiple independent origins of mitochondrial gene order in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 10693 - 10697.
- Moore, W.S.** (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation : mitochondrial gene tree versus nuclear gene trees. *Evolution* 49, 718 – 726.
- Moritz, C., Dowling, T.E., Brown, W.M.** (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: Relevance for population biology and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 269 – 292.

- Moritz, C., Faith, D.P.** (1998). Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7, 419 – 429.
- Mühlstein, L.** (1979). Hýl rudý na Šumavě. *Živa* 27, 109.
- Müller, S.** (1973b). Das Vorkommen des Karmingimpels (*Carpodacus erythrinus*) in Norddeutschland. *Corax* 4, 112-130.
- Nabholz, B., Glémin, S., Galtier, N.** (2008). Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals—the longevity hypothesis. *Molecular Biology and Evolution* 25, 120–130.
- Nabholz, B., Glémin, S., Galtier, N.** (2009). The erratic mitochondrial clock: variations of mutation rate, not population size, affect mtDNA diversity across birds and mammals. *BMC Evolutionary Biology* 9, 54 – 67.
- Nikolov, S.CH., Ragyov, D., Linnartz, L.** (2008) Observation of the Common Rosefinch *Carpodacus erythrinus* in Bulgaria in 2006 and 2007. *Acrocephalus* 29, 55 – 57.
- Ödeen, A., Björklund, M.** (2003). Dynamics in the evolution of sexula traits : losses and gains, radiation and convergence in yellow wagtails *Motacilla flava*. *Molecular Ecology* 12, 2113 – 2130.
- Pavlova, A., Zink, R.M., Drovetski, S.V.** (2003). Phylogeographic patterns in *Motacilla flava* and *M.citreola* : species limits and population history. *The Auk* 120, 744 – 758.
- Pavlova, A., Zink, R.M., Rohwer, S.** (2005a). Evolutionary history, population genetics, and gene flow in the common rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 36, 669 – 681.
- Pavlova, A.** (2005b). Mitochondrial DNA and plumage evolution in the white wagtail *Motacilla alba*. *Journal of Avian Biology* 36, 322 – 336.

- Pavlova, A., Rohwer, S., Drovetski, S.V.** (2006). Different Post-Pleistocene History of Eurasian Parids. *Journal of Heredity* 97, 389 – 402.
- Posada, D., Crandall, K.A.**, (1998). Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14, 817–818.
- Posada, D.** (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25(7), 1253-1256.
- Prokop, P.** (1986). Brutvogelkartierung 1981 bis 1985. Vorläufiges Endergebnis Folge 42
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J.** (2002a). Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution* 12, 2092–2100.
- Ramos-Onsins, S.E., Rozas, J.** (2002b). Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. *Molecular Biology and Evolution* 19, 2092-2100.
- Risberg, L.** (1970). Immigration of the Scarlet Grosbeak *Carpodacus erythrinus* into Sweden and studies of its breeding biology. *Var Fagelvärld* 29, 77-89.
- Rodriguez, F., Oliver, J.F., Marin, A., Medina, J.R.** (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology* 142, 485–501.
- Rogers, A.R., Harpending, H.** (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9, 552-569.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P.** (2003). MrBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572-1574.
- Seddon, J.M., Santucci, F., Reeve, N.J., Hewitt, G.M.** (2001). DNA footprints of European hedgehogs, *Erinaceus europaeus* and *E. concolor*: Pleistocene refugia, postglacial expansion and colonization routes. *Molecular Ecology* 10 (9), 2187–2198.
- Sherry, S.T.** (1994a). IWave: An interpopulation sequence comparison module. Department of Anthropology, Pennsylvania State University. Distributed over the internet at website <http://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/sherry/iwave>.

- Sherry, S.T., Rogers, A.R., Harpending, H., Soodyall, H.** (1994b). Mismatch distributions of mtDNA reveal recent human population expansions. *Human Biology* 66 (5), 761.
- Schneider, S.** (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: Application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 3, 1079–1089.
- Schnitzer, J.** (2003). Signalizace rodičovských investic samců sociálně monogamních pěvců. Diplomová práce katedry Zoologie PřFUK, 51 p.
- Souček, J.** (1992). Hnízdění a potrava hýla rudého v Jeseníkách. *Živa* 4, 180.
- Stepanyan, L.S.** (2003). Conspectus of the Ornithological Fauna of Russia and Adjacent Territories. *Accademkniga, Moscow*.
- Stjernberg, T.** (1979). Breeding biology and population dynamics of the Scarlet Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Acta Zoologica Fennica* 157, 1-88.
- Stjernberg, T.** (1985). Recent expansion of the Scarlet Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*) in Europe. *Proceedings of the International Ornithology Congress* 18, 743 – 753.
- Svensson, L.** (2004). Ptáci severní Afriky a Blízkého východu. Svojtka, Praha.
- Štollmann, A.** (1967). Dalšie údaje o červenákovi karmínovom z Oravy. *Biologia Bratislava* 22, 860 – 865.
- Synek, P.** (2009). Původci ptačí malárie a ostatní hemosporida hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*). Diplomová práce katedry parazitologie PřFUK, 116p.
- Šťastný, K.** (1984). Naši pěvci. Státní pedagogické nakladatelství, Praha.
- Šťastný, K., Bejček, V.** (1987). Atlas hnízdního rozšíření ptáků v ČSSR 1973 / 77. Academia, Praha.

- Šťastný, K.** (1991). Šíření hýla rudého (*Carpodacus erythrinus* Pall.) v českých zemích. *Panurus* 3, 27 – 36.
- Šťastný, K., Bejček, V.** (1997). Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 1985-89. H&H, Jinočany.
- Šťastný, K., Bejček, V., Hudec, K.** (2006). Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 2001 – 2003. Aventinum, Praha.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Hausser, J.** (1994). Chromosomal versus mitochondrial DNA evolution: tracking the evolutionary history of the southwestern European populations of the *Sorex araneus* group (Mammalia, Insectivora). *Evolution* 48, 623–636.
- Tarr, C.L.** (1995). Primers for amplification and determination of mitochondrial control-region sequences in oscine passerines. *Molecular Ecology* 4, 527 – 529.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673–4680.
- Turček, F.J.** (1960). Hniezdenie červenáka *Carpodacus erythrinus erythrinus* v oblasti Vysokých Tatier na Slovensku. *Sborník prác o TANAP* 4, 247 – 254.
- Turček, F.J.** (1963). The expansion of the Scarlet Grosbeak's nesting area in Slovakia. *Aquila* 69, 169 – 171.
- Uimaniemi, L., Orell, M., Kvist, L.** (2003). Genetic variation of the Siberian tit *Parus cinctus* populations at the regional level: a mitochondrial sequence analysis. *Ecogeography* 26, 98 – 106.
- Vinkler, M.** (2007). Mate choice in Scarlet Rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). Diplomová práce katedry Zoologie PřFUK, 71 p.

- Walters, M.** (2007). Ptačí vejce. Knižní klub, Praha.
- Watterson, G. A.** (1975). On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Population Biology* 7, 256-276.
- Wenink, P.W., Baker, A.J., Tilanus, M.G.J.** (1993). Hypervariable-control-region sequences reveal global population structuring in a long-distance migrant shorebird, the Dunlin (*Calidris alpina*). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 94 – 98.
- Yohannes, E.** (2008). Philopatry of winter moult area in migratory Great Reed Warblers *Acrocephalus arundinaceus* demonstrated by stable isotope profiles. *Journal of Ornithology* 149, 261–265.
- Zink, R.M.** (1995). Evidence from molecular systematics for decreased avian diversification in the Pleistocene Epoch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 5832 – 5835.
- Zink, R.M., Drovetski, S.V., Rohwer, S.** (2002a). Phylogeographic patterns in the great spotted woodpecker *Dendrocops major* across Eurasia. *Journal of Avian biology* 33, 175 – 178.
- Zink, R.M., Drovetski, S.V., Questiau, S.** (2003). Recent evolutionary history of the bluethroat *Luscinia svecica* across Eurasia. *Molecular Ecology* 12, 3069 – 3075.
- Zink, R.M., Drovetski, S.V., Rohwer, S.** (2006). Selective neutrality of mitochondrial ND2 sequences, phylogeography and species limits in *Sitta europea*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40, 679 – 686.
- Zink, R.M., Pavolva, A., Drovetski, S.** (2008). Mitochondrial phylogeographies of five widespread Eurasian bird species. *Journal of Ornithology* 149, 399 – 413.
- Zink, R.M., Barrowclough, G.F.** (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology* 17, 2107 – 2121.

VIII. PŘÍLOHY

Příloha č.1 : Seznam použitých vzorků s jejich charakteristikami

Laboratorní kód vzorku	Lokalita	Geografická poloha	Rok odchytu	Pohlaví	Věk	Číslo kroužku	Název haplotypu		
18 (2000hn4F)	Želnaava, Šumava	48°48' N, 13°57' E	2000	F	sad	N440738	201SUMA		
24 (2000hn5F)			2000	F	sad	T966563	202SUMA		
31 (2000hn6F)			2000	F	sad	T980448	203SUMA		
43 (2000hn9F)			2000	F	sad	T995467	155IRKU		
62 (2001hn16F)			2001	F	sad	TA1003	205SUMA		
1217 (2006X8)			2006	M	ad	N543628	177IRKU		
1218 (2006X9)			2006	M	ad	N543629	207SUMA		
1219 (2006X10)			2006	M	ad	N452346	208SUMA		
1220 (2006X12)			2006	M	ad	N543630	209SUMA		
1221 (2006X13)			2006	M	ad	N543631	210SUMA		
1223 (2007X2)			2007	M	sad	N521337	211SUMA		
1224 (2007X3)			2007	M	ad	N521338	212SUMA		
1225 (2007X4)			2007	M	ad	N521339	212SUMA		
1227 (2007X6)			2007	M	ad	N543628	214SUMA		
1228 (2007X7)			2007	M	ad	N521341	215SUMA		
1230 (2007X9)			2007	M	ad	N521343	216SUMA		
1231 (2007X10)			2007	M	ad	N521345	217SUMA		
61 (2001hn16M)			2001	M	ad	T980710	218SUMA		
80 (2000hn14M)			2000	M	ad	T995473	219SUMA		
81 (2001hn20F)			2001	F	sad		220SUMA		
115 (2001hn6M)			2001	M	ad	TA1004	155IRKU		
116 (2001hn6F)			2001	F	sad		222SUMA		
149 (2003M5)			2003	M	ad	TA21080	223SUMA		
156 (2001M5)			2001	M	ad	T868548	224SUMA		
204 (2002hn10M)			2002	M	ad	TA1025	225SUMA		
287 (2003hn10F)			2003	F	sad	N492203	226SUMA		
301 (2003hn13F)			2003	F	sad	TA24481	176IRKU		
306 (2003hn14M)			2003	M	ad	N492204	228SUMA		
307 (2003hn14F)			2003	F	sad	N492202	229SUMA		
19A			Rychtářky, Žďárské vrchy	49°40' N, 16°05' E	2005	F	sad	N 517 331	230RYCH
20A					2005	F	sad	N 517 332	230RYCH
22A					2005	F	sad	N 517 334	183ANAD
25A					2005	F	sad	N 517 338	183ANAD
26A	2005	M			ad	N 517 339	234RYCH		
30A	2005	M			sad	N 517 344	177IRKU		
31A	2005	F			sad	N 517 345	236RYCH		
35A	2005	M			sad	N 517 371	237RYCH		

Laboratorní kód vzorku	Lokalita	Geografická poloha	Rok odchyty	Pohlaví	Věk	Číslo kroužku	Název haplotypu
36A			2005	F	sad	N 517 372	177IRKU
40A			2005	M	ad	T 918 640	239RYCH
9B			2006	M	ad	N 517 382	240RYCH
10B			2006	M	ad	T 918 686	241RYCH
12B			2006	F	ad	N 517 337	242RYCH
13B			2006	F	ad	N 517 384	243RYCH
15B			2006	M	ad	N 547 801	244RYCH
16B			2006	M	sad	N 517 385	245RYCH
17B			2006	M	sad	N 517 386	246RYCH
18B			2006	F	sad	N 517 387	247RYCH
2 (2KH58446)	Götaälv, Švédsko	57°53' N, 12°01' E	6.5.2007	M	ad		248SWED
3 (2KH58447)			2007	F	ad		249SWED
4 (2KH58448)			24.6.2007	M	ad		250SWED
6 (2KH58452)			24.7.2007	F	ad		251SWED
TB44206	Orlické záhoří, Orlické hory	50°16' N, 16°28' E	2005	M	ad		252ORLI
TB44216			2005	M	ad		253ORLI
MU 107	Lyangar, Tadžikistán	37°47' N, 72°41' E	19.7.2008	M	ad		254PAMI
MU 109	Dzhaushangoz, Tadžikistán	37°21' N, 72°28' E	1.8.2008	F	ad		255PAMI
3971	Rybachiy, Kaliningradská obl.	55°09' N, 20°50' E	2003	M	ad		256KALI
13961			2004	M	ad		257KALI
14780			2004	F	ad		258KALI
13991			2004	F	sad		259KALI
3875			2003	M	ad		260KALI
4638			2003	M	ad		261KALI
13934			2004	F	sad		176IRKU
14306			2004	M	ad		263KALI
14348			2004	M	ad		257KALI
4741			2003	F	ad		265KALI
15836			2004	M	sad		266KALI
14966			2004	M	sad		267KALI
MU 111	Razlog, Bulharsko	41°52' N, 23°26' E	10.6.2009	M	ad	A002913	268BULG
MU 113			11.6.2009	M	ad	A002915	269BULG
MU 114			12.6.2009	M	sad	A002921	270BULG
MU 115	Osegovo planina, Bulharsko	42°11' N, 22°30' E	13.6.2009	M	ad	A002922	271BULG
MU 116	Stara planina, Bulharsko	42°43' N, 24°58' E	16.6.2009	M	sad	A002923	272BULG
MU 117			16.6.2009	M	ad	A002924	273BULG
347950	Yakh Tangai Sar, Pakistán	34°0' N, 72°40' E	25.8.1990	M	ad		177IRKU
MU 126	Aksu, Turecko	41°14' N, 36°18' E	27.7.2009	M	ad		275TURK

Laboratorní kód vzorku	Lokalita	Geografická poloha	Rok odchyty	Pohlaví	Věk	Číslo kroužku	Název haplotypu
MU 128	Gerce obasi, Turecko	40°43' N, 37°57' E	28.7.2009	M	ad		276TURK
MU 129	Cambasi, Turecko	40°39' N, 37°56' E	29.7.2009	M	ad		277TURK
MU 130	Naznara, Turecko	40°59' N, 41°20' E	2.8.2009	M	sad		278TURK
MU 132	Pisenkaya, Turecko	40°57' N, 41°16' E	4.8.2009	juv	juv		279TURK
MU 133			4.8.2009	juv	juv		279TURK
MU 136			4.8.2009	F	ad		281TURK
MU 137			4.8.2009	M	ad		282TURK

216Suma G T . A . T C T T T .
217Suma A . T C T T T . G .
218Suma A A T T T T . G .
219Suma G A C A T T T . G .
220Suma GA . T A A G G
221Suma G A A T T T T
222Suma A TT . A T C T T
223Suma A T A T T T
224Suma A GA A T C T
225Suma G A A C T A T
226Suma T A A T T T
227Suma G A A C T T T
228Suma G A . A A C T T T
229Suma G A A C T G T
230Rych A A C T T T
231Rych A A C T T T
232Rych A A A T T T
233Rych A A A C . C T T
234Rych A A C . C T C T
235Rych A A G A . G A G C T
236Rych A A A A A T T
237Rych G A A C C A T A
238Rych A A G A . G A G C T
239Rych A A A A A T A
240Rych A A G A A C T
241Rych A A G A A T T
242Rych G A A T TG C T T T
243Rych A A G G A . G A G C T
244Rych A A G G C A A G C T
245Rych G A A A C C T
246Rych G A A A C C T
247Rych A A G G C T A . G A G C T
248Swed G A A A C A A T T
249Swed G A A A C C C T
250Swed G A A T C T C T G T
251Swed G GA . A A C C G T T
252Orli G A A AT G C T CT
253Orli G A A AT G C T TC A
254Pami G . A A A G G C . C . T
255Pami GA A A G G C . C . T

256Kali	A	G	A	A	C	T	A	G	T	T		
257Kali	A	T	A	A	C	C	T	C	T	T		
258Kali	A	A	A	A	T	C	T	G	T	T		
259Kali	A	T	G	A	C	T	T	A	T	T		
260Kali	A	T	A	A	G	C	T	G	T	T		
261Kali	A	T	GA	A	C	C	T	G	C	T		
262Kali	A	A	A	A	C	T	T	T	T	T		
263Kali	G	T	A	G	A	C	T	T	T	T		
264Kali	G	A	A	T	A	A	C	C	C	T		
265Kali	A	A	A	A	T	C	C	T	T	T		
266Kali	A	A	A	A	G	C	A	T	C	G	C	T
267Kali	G	A	A	G	A	C	G	T	T	T	T	
268Bulg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
269Bulg	CA	A	A	A	C	A	T	A	T	A	A	C
270Bulg	A	A	C	A	A	T	A	T	A	A	A	C
271Bulg	T	A	A	A	A	A	A	A	T	A	T	A
272Bulg	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
273Bulg	A	A	A	A	T	A	A	A	A	T	A	A
274Paki	A	A	A	A	G	A	A	A	G	C	T	T
275Turk	A	A	A	A	A	A	A	T	A	A	A	C
276Turk	G	G	A	A	A	A	A	T	T	ACCA	T	T
277Turk	G	A	A	A	A	A	A	T	T	ACCA	T	A
278Turk	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	C
279Turk	G	A	A	A	A	A	A	T	T	A	A	C
280Truk	G	A	A	A	A	A	T	T	T	A	A	C
281Turk	G	A	T	A	A	A	T	T	T	A	A	C
282Turk	A	A	A	A	A	A	T	T	T	A	A	C

