

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie



DIPLOMOVÁ PRÁCE

Genetická variabilita sysla obecného (*Spermophilus citellus*)
v České republice

Genetic variability in the European ground squirrel
(*Spermophilus citellus*) in Czech Republic

Magda Starcová

Vedoucí práce: RNDr. Vladimír Vohralík, CSc.

Konzultant: RNDr. Pavel Hulva, Ph.D.

Praha 2011

Prohlašuji, že diplomovou práci jsem vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury,
pod vedením školitele práce a konzultanta.

Praha 5.5.2011

Magda Starcová

Poděkování

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému školiteli RNDr. Vladimíru Vohralíkovi, CSc. za odborné vedení mé diplomové práce, za jeho ochotu, cenné rady, podněty a připomínky.

Také bych chtěla poděkovat mému konzultantovi RNDr. Pavlu Hulvovi, Ph.D. za vedení genetické části práce. Hlavně za čas, který mi věnoval při vyhodnocování výsledků a za všechny jeho rady a pomoc při sepisování diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Petře Schnitzerové, Ph.D., RNDr. Jitce Uhlíkové, Ph.D., Mgr. Janu Matějů, a všem dalším kolegům, kteří se podíleli na vzniku a hlavně koordinaci celého „sýslího“ projektu za to, že jsem se na něm mohla podílet a získat tak cenné zkušenosti.

Můj velký dík patří Mgr. Ireně Schneiderové za to, že mě naučila laboratorní metodice, za obrovskou pomoc při zpracování vzorků a především za její podporu.

Chtěla bych také poděkovat Mgr. Štěpánce Říčanové a všem ostatním, kteří nám pomáhali se sběrem genetických vzorků v terénu.

Tento projekt byl finančně podpořen grantem Ministerstvem životní prostředí České republiky (projekt č. SP/2d4/61/08).

Obsah

Abstrakt.....	5
Abstract.....	6
1. Úvod.....	7
1.1. Fylogenetická struktura tribu Marmotini.....	7
1.2. Populační struktura a sociální organizace zemních veverek.....	9
1.2.1. Rod <i>Marmota</i>	10
1.2.2. Rod <i>Cynomys</i>	10
1.2.3. Rod <i>Spermophilus</i>	11
1.3. Disperze a filopatrie.....	11
1.4. Fragmentace populací, vznik substruktury a související jevy.....	13
1.5. Ovlivnění habitatu a rozšíření živočichů v minulosti.....	16
1.6. Ovlivnění habitatu a rozšíření živočichů v historické době a v současnosti.....	18
2. Materiál a metodika.....	20
2.1. Ochránářský status druhu.....	20
2.2. Odchyty a odběr genetického materiálu.....	20
2.3. Charakteristika studovaných kolonií sysla obecného.....	22
2.4. Izolace DNA.....	22
2.5. Crossspecies analýza.....	23
2.6. PCR.....	25
2.7. Fragmentační analýza.....	26
2.8. Analýza dat.....	27
3. Výsledky.....	30
3.1. Detekce nulových alel.....	30
3.2. Genetická variabilita lokusů a populací.....	30
3.3. Korespondenční faktoriální analýza (AFC).....	34
3.4. Hierarchická Bayesiánská klastrová analýza.....	35
3.5. Allelic richness.....	42
3.6. Isolation by distance (IBD).....	43
3.7. Geneland – analýza Tessellation.....	44
3.8. Detekce recentního bottlenecku.....	45
4. Diskuze.....	46
5. Závěry.....	52
6. Použitá literatura.....	53
7. Přílohy.....	60

Abstrakt

Sysel obecný (*Spermophilus citellus*) je podle zákona o ochraně přírody i podle Červeného seznamu kriticky ohroženým druhem. V České republice, která představuje severozápadní okraj jeho areálu rozšíření, se sysel v současnosti vyskytuje na 34 lokalitách, které jsou poměrně malé a vzájemně izolované. Do střední Evropy se tento druh rozšířil v souvislosti s neolitickou deforestací. Disjunktí typ distribuce sysla byl způsoben výrazným poklesem jeho početnosti během druhé poloviny 20. století v důsledku změn polního hospodaření, fragmentace krajiny a dalších faktorů. Lze předpokládat, že tento proces zanechal stopy na genetické struktuře našich populací.

Hlavním cílem této práce byla podrobná analýza genetické variability populací sysla obecného na území České republiky a hledání korelací s dostupnými údaji o jeho biologii a demografii. Bylo použito 13 mikrosatelitových lokusů a zpracováno celkem 408 vzorků z 27 lokalit v ČR a 3 vzorky z 1 lokality v Maďarsku jako outgroup. Pomocí různých přístupů byly odhaleny detaily o substruktuře a diferenciaci jednotlivých populací, genetické variabilitě, míře inbreedingu a geografické distribuci genetické variability. Mezi studovanými populacemi byla nalezena signifikantní genetická diferenciaci, západno-východní gradient v genetickém složení populací a zóna přechodu mezi českými a moravskými populacemi. Byla potvrzena nízká genetická variabilita a značná homogenita studovaných populací sysla v České republice.

Výsledky jsou dále interpretovány v souvislosti s demografickou historií studovaného druhu, možnostmi genového toku a dalšími faktory. Populace sysla obecného v České republice mohou vykazovat redukci fitness díky inbreední depresi a dalším jevům spojeným s nízkou početností a fragmentací areálu druhu.

Klíčová slova: *Spermophilus citellus*, fragmentace populace, mikrosatelity, genetická variabilita a diferenciaci, inbreeding.

Abstract

The European ground squirrel (*Spermophilus citellus*) (hereinafter EGS) is under the Law on Nature Protection and is included as a critically endangered into the Red List of Endangered Species. In the Czech Republic, which represents the northwestern border of the species range, EGS currently occurs on 34 localities, which are relatively small and isolated from each other. The spread of this species to central Europe was connected with neolithic deforestation. Disjunctive type of distribution of EGS was caused by strong decline of its abundance during the second half of the 20th century due to changes in field management, fragmentation of landscape and other factors. It can be expected that this process left traces on the genetic structure of EGS populations.

The major objective of this study was a detailed analysis of genetic variability of EGS populations in the Czech Republic and searching for correlations with available data about its biology and demography. It was used 13 microsatellite loci and in total were processed 408 samples from 27 localities in CZ and 3 samples from one Hungarian locality as an outgroup. With aid of various methods, details of substructure and differentiation of individual populations, genetic variability, degree of inbreeding and geographic distribution of genetic variability were revealed. Between studied populations was found significant genetic differentiation, west-east gradient in genetic composition of populations and transition zone between bohemian and moravian populations. Low genetic variability and considerable homogeneity of studied populations EGS in the Czech Republic were confirmed.

Results are further interpreted in relation with demographic history, options of gene flow and other factors. The EGS population in the Czech Republic may show fitness reduction due to inbreeding depression and other phenomena connected with species low abundance and range fragmentation.

Key words: *Spermophilus citellus*, fragmented populations, microsatellites, genetic variability and differentiation, inbreeding.

1. Úvod

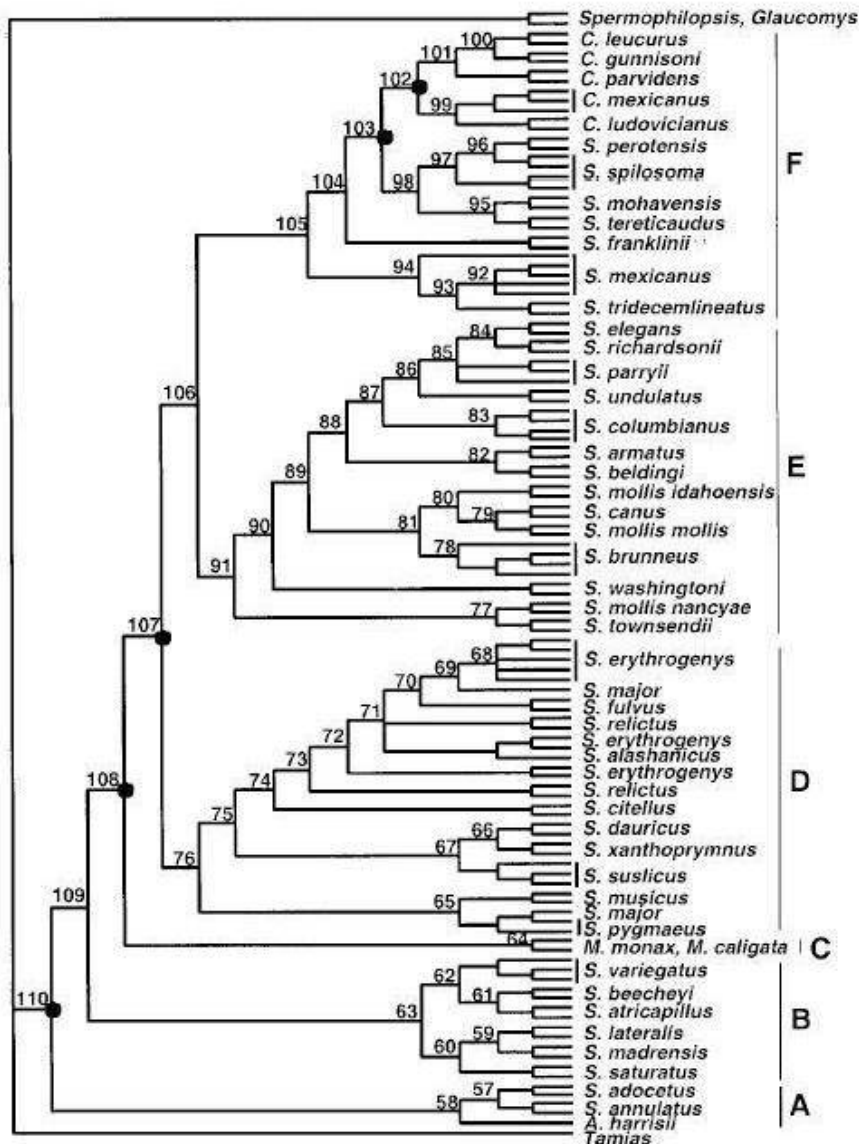
1.1. Fylogenetická struktura tribu Marmotini

Tribus Marmotini, společně s triby Protoxerini a Xerini, patří do podčeledi Xerinae, čeledi Sciuridae, podřádu Sciuromorpha a řádu Rodentia (Wilson & Reeder, 2005) a zahrnuje čtyři rody: *Ammospermophilus*, *Cynomys*, *Marmota* a *Spermophilus* (Harrison et al., 2003; Herron et al., 2004). Do rodu *Spermophilus* je zařazeno 41 druhů rozdělených do šesti podrodů: *Callospermophilus*, *Ictidomys*, *Otospermophilus*, *Poliocitellus*, *Spermophilus* a *Xerospermophilus*. Všechny výše jmenované podrody se vyskytují v Severní Americe, ale pouze zástupci podrodu *Spermophilus* jsou přítomni i v Eurasii (Thorington & Hofmann, 2005). I když patří zástupci tribu Marmotini mezi jedny z nejvíce studovaných druhů savců, fylogenetické vztahy uvnitř skupiny nebyly ještě donedávna dostatečně prostudovány. Ve své práci potvrdili Steppan et al. (2004) postavení tribu Xerini jako sesterské skupiny tribu Marmotini a monofylii celého tribu Marmotini. Harrison et al. (2003) se pomocí mitochondriální DNA (kompletní sekvence cytochromu *b*) pokusili odhalit fylogenetické vztahy mezi všemi druhy sýslů rodu *Spermophilus* a psounů (*Cynomys*). Do této studie zahrnuli také dva druhy svištů (*Marmota*) a jeden druh sysla rodu *Ammospermophilus*. V získaném fylogenetickém stromě (Obr. 1) vyšly jako bazální skupiny rody *Ammospermophilus* a dva zástupci z podrodu *Otospermophilus*. Rod *Spermophilus* jako celek je tedy zřejmě parafyletický vzhledem k rodům *Marmota* a *Cynomys*, protože rod *Marmota*, který byl dříve považován za jednu z časných fylogenetických odnoží tribu, se v této studii zařadil mezi zástupce rodu *Spermophilus*. I zástupci z rodu *Cynomys* se podle současných poznatků fylogeneticky nacházejí na taxonomické hranici rodu *Spermophilus* (Harrison et al., 2003; Herron et al., 2004).

Euroasijské zástupci podrodu *Spermophilus*, mezi které patří i syselec obecný (*Spermophilus citellus*), tvoří monofyletickou skupinu uvnitř tribu Marmotini (Harrison et al., 2003; Herron et al., 2004). Linie vedoucí k této skupině má svůj původ ve společném předkovi ze Severní Ameriky, od kterého se oddělila před nebo v období hlavní diversifikace severoamerických zemních veverek zhruba před 10-13 mil let. Tato radiace zřejmě souvisí s celosvětovými změnami klimatických podmínek (Hewitt, 2004). V Eurasii se recentně vyskytuje 12 druhů, které někteří autoři rozdělují ještě na tři podrody: *Colobotis*, *Urocitellus* a *Spermophilus* (Harrison et al., 2003). Palearktický druh syselec dlouhoocasý (*Spermophilus*

undulatus) a sysel Parryův (*S. parryii*), který má holarktické rozšíření, byli ve fylogenetickém stromě zařazeni do severoamerického kladu (Harrison et al., 2003).

Sesterským druhem sysla obecného (*S. citellus*) je nedávno nově popsán sysel taurský (*S. taurensis*) (Gündüz et al., 2007). Tyto dva druhy se od sebe odštěpily zhruba před 2,5 mil lety a jejich společný předek se oddělil od sysla maloasijského (*S. xanthopymnus*) před 5 mil lety (Gündüz et al., 2007).



Obr.1. Fylogenetický strom, založený na kompletních sekvencích cytochromu *b*, znázorňuje vztahy mezi všemi druhy syslů rodu *Spermophilus* a psounů (*Cynomys*). Jsou zde zahrnuty také dva druhy svišťů (*Marmota*) a jeden druh sysla rodu *Ammospermophilus*. Hlavní klady jsou označeny velkými písmeny (A-F). Námí studovaný *S. citellus* patří do kladu D (převzato z Harrison et al., 2003).

1.2. Populační struktura a sociální organizace zemních veverek

Zemní veverky (tribus *Marmotini*) jsou velmi rozmanitá skupina co se týče ekologických adaptací, chování, typů rozmnožovacích systémů i populační struktury.

Můžeme se u nich setkat s množstvím typů rozmnožovacích systémů od monogamního uspořádání (Goossens et al., 1998) přes různé typy polygynních systémů (Antolin et al., 2001; Davis & Murie, 1985; Boellstorff et al., 1994) až po promiskuitu (Maher & Duron, 2010). Poměrně široce rozšířeným jevem je také výskyt mimopárového páření a vícenásobné paternity (Maher & Duron, 2010; Cohas et al., 2006; Boellstorff et al., 1994). Typ rozmnožovacího systému ovlivňuje hlavně distribuce samic a jejich stupeň synchronizace sexuální receptivity během období páření (Davis & Murie, 1985). Dalé pak hrají roli také abiotické faktory jako je kvalita habitatu nebo prostorová distribuce zdrojů.

Sociální organizace zaujímá široké spektrum od spíše soliterně žijících druhů jako je svišť lesní *Marmota monax* (Armitage, 1981) až po koloniální psouny prériové *Cynomys ludovicianus* (Hoogland & Foltz, 1982) nebo v rodinách žijící sviště horské *Marmota marmota* (Goossens et al., 1998). Mezi těmito krajními variantami se nachází různé mezistupně, které Armitage (1981) ve své práci rozdělil na pět skupin podle komplexity sociálního systému:

1. v podstatě soliterně žijící druhy,
2. druhy, které agregují (tvoří kolonie) ve vhodném habitatu, ale všichni členové kolonie žijí individuálně,
3. druhy, kde samci brání skupinu samic uvnitř teritoria, ale samice žijí jednotlivě,
4. harém teritoriálního samce, ve kterém samice sdílí nory,
5. druhy tvořící multi-harémové kolonie.

Klíčovým faktorem určujícím rozdíly v sociální komplexitě svišťů je věk disperze mládřat. Rozptýlení mládřat se většinou odehrává buď v roce jejich narození, jako u sviště lesního (*Marmota monax*), nebo následující rok po první hibernaci jako u středně sociálního sviště žlutobřichého (*M. flaviventris*). Všechny ostatní druhy svišťů jsou vysoce sociální a mládřata neopouští rodinnou skupinu před dosažením pohlavní dospělosti, ke které dochází až po druhé hibernaci nebo někdy i později (Blumstein and Armitage 1998).

1.2.1. Rod *Marmota*

Za nejvíce soliterně žijící druh sviště je považován svišť lesní (*Marmota monax*) (Armitage, 1981). Jedinci se sice shlukují do skupin, ale nevznikají mezi nimi nějaké stabilnější nebo déle trvající vazby (Maher & Duron, 2010). Studie, zaměřená na charakteristiky rozmnožovacího systému, ukázala značný výskyt vícenásobných paternit a tak za rozmnožovací systém může být označena promiskuita (Maher & Duron, 2010).

Oproti tomu u sviště horského (*Marmota marmota*) je základní sociální jednotkou rodina skládající se z rodičovského (dominantního) páru, juvenilů, ročních mláďat a podřízených jedinců. Mohou zde být přítomni i satelitní jedinci žijící na okraji obhajovaného teritoria (Goossens et al., 1998). Co se týče rozmnožovacího systému, jsou svišti horští převážně monogamní, ale poměrně častá je u nich polyandrie, mimopárová páření a vícenásobné paternity (Cohas et al., 2006).

Někde mezi nimi stojí svišť žlutobřichý (*Marmota flaviventris*), kde příbuzné samice tvoří rodinné skupinky (female kin clusters) s více či méně exkluzivními domovskými okrsky (home ranges) (Armitage, 1981). Takováto skupinka se většinou skládá z jednoho samce, dvou a více dospělých samic, ročních juvenilů a mláďat (Armitage, 1991). Rozmnožovací systém tohoto druhu sviště se dá popsat jako převážně haremově-polygynní uspořádání (Armitage, 1981).

1.2.2. Rod *Cynomys*

Psoun běloocasý (*Cynomys leucurus*) je jedním z méně koloniálně žijících druhů psounů (Hoogland, 1981). Tito psouni mají dobře definované domovské okrsky, které se však zčásti vzájemně překrývají (Hoogland, 1981). Nevyskytují se zde harémy ani jiné další dělení na menší skupiny (Hoogland, 1981).

Na opačném konci spektra sociálního uspořádání se nachází psoun preriový (*C. ludovicianus*), který patří mezi koloniálně žijící zástupce tribu Marmotini. Jedinci žijí v kolonii v menších teritoriálních skupinkách, které se označují jako kotérie (coteries). Ty se skládají z rozmnožujících se jedinců, jednoho samce, dvou až čtyř samic a nerozmnožujících se jednoletých zvířat obou pohlaví (Manno et al., 2007). Kotérie představují i základní jednotku rozmnožovacího systému, který má haremově-polygynní uspořádání (Hoogland & Foltz, 1982). Dalšími koloniálně žijícími druhy psounů jsou psoun Gunnisonův (*C. gunnisoni*) a psoun Allenův (*C. parvidens*). Oba výše jmenované druhy sdílí podobné sociální uspořádání s psounem preriovým (Hoogland, 1999; Hoogland, 2001). Kolonie je rozdělena na jednotlivé skupinky – klany (clans). Ty tvoří několik samic, jejich mláďata

a jeden až dva rozmnožující se samci (Hoogland, 1999), kteří se ale běžně páří i se samicemi ze sousedních klanů. Nicméně příslušnost jedince do klanu není tak pevná jako v případě kotéří psounů prériových (Hoogland, 1999). I u těchto dvou druhů se vyskytuje poměrně vysoké procento vícenásobné paternity (Haynie et al., 2003).

1.2.3. Rod *Spermophilus*

Spermophilus mollis je považován za jeden z méně sociálních druhů sysla i přesto, že ve vhodném habitatu agreguje v systémech nor (Armitage 1981). Jeho rozmnožovací systém by se dal charakterizovat jako lottery-polygyny (Antolin et al., 2001). Samci neobhajují žádné teritorium a během období rozmnožování se snaží pářit s co největším počtem samic ve svém širším okolí.

Naopak sysel veveří (*S. beecheyi*) je koloniálně žijící druh, kde samci obhajují teritorium, které se překrývá s domovskými okrsky několika samic, ale samci si nenárokuje výhradní přístup k samicím (Boellstorff et al., 1994). Jako rozmnožovací systém se udává buď female defence polygyny a nebo promiskuita (Boellstorff et al., 1994). Tato studie také potvrdila velmi častý výskyt vícenásobné paternity ve vrhu.

Sysel Richardsonův (*S. richardsonii*) také patří mezi koloniální druhy syslů. Jeho rozmnožovacím systémem je ale male defense polygyny (Davis & Murie, 1985). Dominantní samci si hájí teritoria, kde se nachází samice nebo zdroje pro jejich nalákání. Podřízení samci jsou neteritoriální a během období páření se pohybují po širokém okolí (Davis & Murie, 1985).

Námi studovaný druh sysel obecný (*S. citellus*) patří mezi koloniálně žijící druhy syslů. Každý dospělý jedinec má svůj domovský okrsek (home range), kterému zůstává věrný (Matějů et al., 2010a). Rozmnožovací systém druhu by se dal popsat jako tzv. scramble competition polygyny (Millesi et al., 1998), kdy se během období páření snaží samci v co nejkratším čase kontaktovat co největší počet samic.

1.3. Disperze a filopatrie

Schopnost a míra disperze pozemních veverkovitých (tribus Marmotini) se liší v závislosti na pohlaví jedince a na typu rozmnožovacího a sociálního systému druhu. Dále ji ovlivňují ekologické faktory, které mají vliv na růst a dospívání jedince, populační hustota a složení sociální skupiny (Wolff, 1997; Armitage, 1999; Maher, 2006). U většiny sociálně

žijících druhů hlodavců probíhá disperze krátce po odstavení mláďat a je výraznější u samců (Wolff, 2007). Dokonce i u neteritoriálních savčích druhů prakticky všichni mladí samci dispergují (Wolff, 1997). Teritorialita, hlavně při vysoké hustotě jedinců, může bránit imigraci a emigraci vytvořením obtížně prostupné bariéry z teritorií sousedů, tzv. social fence (Wolff, 2007). Disperze může v různorodém prostředí zpomalit tempo populačního růstu (Wolff, 2007).

Srovnávací studie, kterou provedli (Devillard et al., 2004) na 11 druzích zástupců tribu Marmotini (2 druhy rodu *Marmota*, 2 *Cynomys*, 7 *Spermophilus*), ukázala, že ve všech zkoumaných případech jsou více dispergujícím pohlavím samci. Jedno z možných vysvětlení je, že s rostoucím stupněm sociality roste i kompetice samců o samice a to vede ke zvýšení samčí disperze, zatímco disperze samic zůstává stejná (Devillard et al., 2004). Emigrace samců z mateřské populace (kolonie) zamezuje vzniku inbreedingu, který zřejmě hraje hlavní roli v evoluci disperze (Devillard et al., 2004). Samice jsou oproti samcům více filopatrické a zůstávají v blízkosti místa svého narození, zde se potom vytváří skupiny příbuzných jedinců, označované jako kin clusters. Tak je tomu například u psouna Gunnisonova (*Cynomys gunnison*), kde pouze 5% samců setrvalo v teritoriu rodného klanu i po roce od odstavu, zatímco 95% samic zůstávalo v teritoriu natrvalo (Hoogland, 1999). Filopatrie samic a tvorba skupin příbuzných jedinců vede k vytvoření substruktury v rámci populace, která posléze ovlivní genetickou diversitu a efektivní velikost populace (Wolff, 2007). Filopatrie samic a opožděná disperze spojená s kin selection jsou také běžně používány při vysvětlení vzniku a evoluce sociality (Maher, 2006). Nepřátelské chování je totiž vždy přednostně zaměřeno na méně příbuzné nebo nepříbuzné klany (Armitage, 1981).

U některých druhů ale můžeme pozorovat disperzi juvenilních jedinců obou pohlaví. Jde především o monogamní druhy hlodavců, které tvoří dlouhodobější svazky a nebo o druhy, kde samec poskytuje paternální péči (Wolff, 2007). Uvádí se, že pouze u sviště lesního (*Marmota monax*) je vegetační sezóna dostatečně dlouhá, takže umožňuje mláďatům dispergovat ještě před první hibernací (Armitage, 1999). Následující rok tato zvířata dosahují pohlavní dospělosti a začínají se rozmnožovat (Armitage, 1999). Dalším druhem, který se začíná množit již v prvním roce života je psoun běloocasý (*Cynomys leucurus*), který patří mezi málo sociální druhy psounů (Hoogland, 1981). Studie, kterou provedla Maher (2006), ukazuje, že juvenilové *M. monax* ne vždy dispergují v roce narození, ale dochází zde k oddálení disperze až na následující rok. V těchto případech slouží disperze převážně jako prostředek pro nalezení vhodného místa a nepříbuzného partnera pro rozmnožování (Wolff, 2007).

Oddálení disperze na některý z následujících roků je u této skupiny poměrně běžným jevem. Zadržení jedinců v sociální skupině snižuje jejich mortalitu (Armitage, 1981). U sviště žlutobřichého (*Marmota flaviventris*) dispergují juvenilní samci většinou následující rok po první hibernaci (Schwartz et al., 1998), samice jsou filopatrické a dispergují pouze do blízkého okolí (Blumstein & Armitage, 1998), všechny ostatní druhy svišťů zůstávají v okolí mateřské nory ještě jeden nebo další dva roky a teprve poté dispergují (Armitage, 1999).

Disperze adultních jedinců a nebo masová migrace jsou méně běžné, ale vyskytují se spíše v důsledku vyčerpání zdrojů nebo velmi vysokých populačních hustot (Wolff, 2007) jako je tomu například u lumíka norského (*Lemmus lemmus*) (Kausrud et al., 2008).

Disperze, filopatrie a s tím související příbuznost jedinců v populaci (kolonii) má také zásadní vliv na dynamiku vzniku nových populací (kolonií). Manno et al. (2007) provedli studii, ve které se zaměřili na vznik nových kotéří u psounů prériových (*Cynomys ludovicianus*). Z výsledků je patrné, že s rostoucím počtem členů roste i pravděpodobnost rozdělení kolonie. Oproti tomu populační hustota a společný původ jedinců (coancestry) zřejmě nemá na rozštěpení kolonie vliv (Manno et al., 2007).

Poznatky o disperzi příbuzných jedinců jsou velmi důležité pro zjišťování role inbreedingu při odhadu efektivní velikosti populace (Wolff, 2007).

1.4. Fragmentace populací vznik substruktury a související jevy

Na genetických rozdílech uvnitř a mezi jednotlivými populacemi se podílí nejen frekvence a míra disperze jedinců, ale také typ rozmnožovacího systému (Chesser, 1991). Ten totiž zásadně ovlivňuje, které z pohlaví bude dispergovat a ovlivní více genový tok. V získaných genetických datech může být tedy genový tok podhodnocen právě v závislosti na tom, které pohlaví a do jaké míry disperguje. To také ukázala práce Okella et al. (2008) zaměřená na slona afrického (*Loxodonta africana*), kde je disperze ovlivněna ve prospěch samců. Převažujícím uspořádáním u savců (Mammalia) je samičí filopatrie a samčí disperze (Wolff, 1997).

U tribu Marmotini jsou dispergujícím pohlavím samci, zatímco samice jsou filopatrické (Devillard et al., 2004) a zůstávají blízko místa svého narození. Tak dochází k tvorbě příbuzných skupin jedinců (Hoogland, 1999). Následkem toho je vznik substruktury v rámci populace, která ovlivní jak genetickou diversitu tak i efektivní velikost populace

(Wolff, 2007). Prostorová genetická struktura je více zřejmá u semisociálních druhů jako jsou právě zemní veverka (Wolff, 2007).

Substruktura populací závisí také na tom, kde v areálu druhu se populace nachází, protože populace na jeho okraji mohou vykazovat nižší genetickou diversitu než populace v centru. U okrajových populací je snížen genový tok, který probíhá jakoby z jednoho směru, z malého počtu sousedních populací, zatímco v centru areálu probíhá z více stran (Schwarz et al., 2003). To potvrdila i studie, kterou provedli Garner et al. (2005) na druhu *Spermophilus brunneus*, kde okrajové populace vykazují nízký stupeň mikrosatelitové diversity a vysokou divergenci. V tomto případě mohou částečně hrát roli i geografické faktory prostředí, zvyšující pravděpodobnost izolace (Garner et al., 2005). Dalším možným vysvětlením je nižší efektivní velikost populace u subpopulací na okraji areálu.

Proti vzniku substruktury, genetické diferenciaci a snížení genetické variability v populaci působí genový tok prostřednictvím dispergujících jedinců. Například u druhu *Spermophilus mollis* prokázala genetická studie nízkou úroveň genetické diferenciaci mezi subpopulacemi a žádný inbreeding právě díky vysokému stupni genového toku (Antolin et al., 2001). Fragmentace velké populace na menší a izolované subpopulace naopak působí ve prospěch vzniku substruktury. Dochází ke snížení intenzity genového toku mezi jednotlivými subpopulacemi a zesílení vlivu genetického driftu (Pierpaoli et al., 2003), který snižuje celkovou genetickou variabilitu postupnou fixací alel. Jeho efekt je často vyšší u mitochondriální DNA ve srovnání s jadernou DNA (Okello et al., 2008). Jak vzrůstá geografická vzdálenost mezi jednotlivými fragmenty populace, nebo doba od jejich izolace, genetická diversity uvnitř subpopulací postupně klesá a dochází k jejich rozrůznění (Biedrzycka & Konopiński, 2008). Malé populace se také stávají náchylnějšími k problémům souvisejícím s nárůstem inbreedingu (Garner et al., 2005), který vede k vzrůstající homozygotnosti a k projevům spojeným s inbrední depresí (Hedrick & Kalinowski, 2000). Škodlivý vliv homozygotnosti zkoumali ve své práci Da Silva et al. (2005) na populaci sviště horského (*Marmota marmota*). Nevýhody homozygotů byly více patrné za zvýšených stresových podmínek v klimaticky nepříznivých letech, kdy se více projeví inbrední deprese a spojení mezi genetickou diversitou a fitness (Da Silva et al., 2005). Ztráta genetické diversity negativně ovlivňuje fitness a evoluční potenciál druhu (Garner et al., 2005), a proto je její udržení prioritou při zachování vzácných nebo ubývajících druhů.

Výše popsané jevy byly v posledních letech studovány u mnoha různých živočišných druhů. Například Saura et al. (2006) popisují genetickou variabilitu obnovených populací lososa obecného (*Salmo salar*), Campos et al. (2006) studovali genetickou variabilitu

izolovaných populací pstruha obecného (*Salmo trutta*), Pierpaoli et al. (2003) se zabývali genetickými rozdíly mezi evropskými populacemi kočky divoké (*Felis silvestris*). Avšak ne všechny déle izolované populace vykazují snížení genetickou substrukturu a zvýšení stupně inbreedingu. Například studie, kterou provedli Milton et al. (2009) na vřešťanu pláštíkovém (*Alouatta palliata*) neprokázala výskyt ani jednoho z výše jmenovaných jevů. Ve studované izolované populaci se neprokázal ani výskyt recentního bottlenecku, přestože došlo k poklesu početnosti populace (Milton et al., 2009).

Zajímavou srovnávací studii provedli Garner et al. (2005) na severním (*S. b. brunneus*) a jižním (*S. b. endemicus*) poddruhu sysla *Spermophilus brunneus*. Tento druh byl v nedávné době vystaven značnému poklesu početnosti a izolaci jednotlivých populací následkem plošnému omezení a fragmentaci habitatu (Yensen 1999) a tak se stal náchylným k inbreedingu a ztrátě genetické variability v důsledku genetického driftu. Severní poddruh ale vykazoval oproti očekávání vyšší stupeň mikrosatelitové genetické diversity, i když byl izolovaný delší dobu než jižní poddruh. Jedním z možných vysvětlení tohoto jevu je delší doba izolace jižního poddruhu nebo značný bottleneck efekt předtím, než došlo k izolaci populací (Garner et al., 2005). Rozsah ztráty genetické variability v populaci podstupující bottleneck závisí na mnoha faktorech: doba trvání bottlenecku, velikost populace a přítomnost či absence jemnější genetické struktury.

Při šíření druhu se projevuje tzv. efekt zakladatele způsobený fragmentací habitatu a vytvořením bariér omezujících disperzi, který může signifikantně ovlivnit genetickou diversitu v izolovaných populacích (Hedrick & Kalinowski, 2000). Studie provedená Brodersem et al. (1999), která se zabývala efektem zakladatele a jeho vlivem na genetickou variabilitu losa (*Alces alces*), prokázala, že po založení populace z několika jedinců došlo ke ztrátě genetické variability. Během jedné takovéto události došlo k průměrné redukci 22% pozorované heterozygotity a ztrátě téměř 46% pro dvě po sobě jdoucí události (Broders et al., 1999). I když došlo ke značné redukci genetické variability, nebyly nalezeny žádné negativní následky na fitness, které by ovlivnily životaschopnost populací. Recentně vzniklé populace losa mají srovnatelné množství genetické variability jako některé dlouho ustavené populace, které neprošly redukcí početnosti (Broders et al., 1999). Manno et al. (2007) zkoumali genetické rozdíly mezi nově vytvořenými koteriemi psouna prérivového (*Cynomys ludovicianus*), které vznikly rozštěpením původní koterie. Genetické rozdíly nebyly signifikantní ihned v roce po rozdělení a byly ekvivalentní genetickým rozdílům mezi ostatními koteriemi až po 3 až 4 letech (Manno et al. 2007).

1.5. Ovlivnění habitatu a rozšíření živočichů v minulosti

Molekulární hodiny kalibrované podle fosílií často korelují divergenci druhů a podruhů s paleoklimatickými, orogenickými nebo tektonickými změnami, které na ně měly podstatný vliv (van Tuinen et al., 2004). Rod *Spermophilus* je holarkticky rozšířen, vyskytuje se přes temperátní a arktickou Eurasii od centrální Evropy do Číny, Mongolska a Sibíře, a přes západní část Severní Ameriky od Aljašky po Mexiko (Thorington & Hoffmann, 2005). Z rozšíření rodu vyplývá, že hlavními paleoklimatickými změnami, které měly v minulosti vliv na izolaci a divergenci populací, byly nárůst a úbytek kontinentálního ledového pokryvu během Kvartéru (Hewitt, 2004). Na rozšíření jednotlivých druhů během tohoto období měly největší vliv zeměpisná šířka a topografie oblasti jejich výskytu (horské hřebeny, řeky, velká jezera, apod.) Při nárůstu ledového pokryvu opakovaně docházelo k posunu temperátních a tropických oblastí směrem k rovníku a s klesajícím množstvím srážek se redukovaly tropické lesy a narůstaly pouště (Hewitt, 2004). Tento pohyb vegetačních pásem následovaly živočišné druhy (Whorley et al., 2004; Kryštufek et al., 2009; van Tuinen et al., 2008). Ledový pokryv dosáhl posledního glaciálního maxima před 23 000 - 18 000 lety (Hewitt, 1999).

V Evropě v této době dosahoval ledovec až k 52° severní šířky a permafrost k 47° severní šířky (Hewitt, 1999). Po ústupu ledovce docházelo k rychlé postglaciální rekolonizaci z jižně položených refugií směrem na sever (Hewitt, 1999), která mohla vytvořit oblasti s redukovanou genetickou variabilitou vlivem opakovaného efektu zakladatele (Hewitt, 2000). V Evropě byla tři hlavní refugia na velkých poloostrovech: Pyrenejském, Apeninském a Balkánském. Druhy se také do Evropy šířily z přilehlých oblastí jako je okolí Kaspického moře a Kavkazu (Hewitt, 1999). Některé druhy ale mohly přežít i v severněji položených refugiích, v oblasti střední Evropy to byly např. Karpaty (Kotlík et al., 2006). Řada taxonů v těchto oblastech dodnes vykazuje vyšší taxonomickou a genetickou variabilitu (Hewitt, 2004), protože měly dostatek času divergovat a nahromadit genetické rozdíly (Hewitt, 1999).

Situace v Severní Americe během zalednění se od Evropy poměrně lišila. Ledovcový pokryv zde zasahoval až k 40° severní šířky (Hewitt, 2000). Velký vliv na rozšíření druhů měla, a stále má, odlišná orientace severoamerických pohoří, která jsou převážně v severo-jížním směru, zatímco v Evropě převládá směr západo-východní. Proto je vhodnější vnímat Severní Ameriku jako několik regionů lišících se geografii, klimatem a s tím spojenou historií druhů (Hewitt, 2000). Situaci v severozápadní části Severní Ameriky lze analogizovat s Evropou, ale postglaciální rekolonizace regionu probíhala z více směrů: ze severu, jihu

a východu (Hewitt, 2004). Jihovýchodní část Severní Ameriky, která plnila funkci refugia, se zdá být druhově bohatší než Jižní Evropa (Hewitt, 2000).

O glaciální historii evropských stepních druhů obratlovců je doposud velmi málo známo. Během období glaciálů docházelo k expanzi stepních biotopů a živočichů vázaných na tyto habitaty, zatímco během interglaciálu se šířily porosty teplomilnějších dřevin a stepi se fragmentovaly a ustupovaly (Roebroeks et al., 1992). Existence balkánského refugia pro stepní druhy byla potvrzena v práci Kryštufka et al. (2009), kde se pomocí mitochondriální DNA podařilo odhalit tři hlavní fylogeografické linie sysla obecného (*Spermophilus citellus*). První hlavní linie je Jižní linie zahrnující jižní okraj areálu druhu (Řecko, Evropská část Turecka, Bulharsko, Rumunsko a Ukrajina), druhá hlavní linie se dělí na dvě sublinie. Linií Jakupica, která je okrajovým izolátem na vysokohorském stepním ostrově v centrální Makedonii a Severní linií zahrnující severní populace v prostoru od Srbska až po Slovensko a Českou Republiku (Kryštufek et al., 2009). K oddělení Jižní a Severní linie došlo zhruba před 0,58 mil. let, odštěpení linie Jakupica od Severní linie se odehrálo o něco později, před 0,30 mil. let (Kryštufek et al., 2009). Tato doba odpovídá i odhadům časové divergence mezi pěti fyloskupinami sysla maloasijského (*Spermophilus xanthoprimum*) (Gündüz et al., 2007). Nejpravděpodobnější scénář evoluční historie sysla obecného od středního pleistocenu je brzká vikariance ancestrálních populací do dvou hlavních fylogeografických linií (Severní a Jižní), které zůstaly později efektivně izolované (Kryštufek et al., 2009). V každé z hlavních linií byly populace pravděpodobně opakovaně fragmentovány tehdy, když se krátkostébelná step zmenšovala během expanze vysokostébelné stepi, keřů a nebo lesů (Kryštufek et al., 2009). Populace tak přežívaly v izolovaných habitatech a diferenciovaly se díky genetickému driftu nebo rozdílné selekci (Kryštufek et al., 2009). Zřejmě už v této fázi šíření došlo k redukci genetické variability vlivem efektu zakladatele, genetického driftu a po sobě následujících bottlenecků.

Van Tuinen et al. (2008), kteří studovali fylogeografii severoamerického sysla horského (*Spermophilus armatus*), odhalili 3 fylogeografické linie: Severovýchodní, Severozápadní a Jižní, která je nejrozšířenější a také nejvíce geneticky variabilní. Oddělení dvou severních linií od Jižní se událo poměrně brzy v historii druhu, zhruba před 0,43 mil. let a k rozštěpení severních linií došlo před 0,33 mil. let, což odpovídá poslední velké sopečné aktivitě v oblasti. Zjištěný demografický signál expanze v Jižní a Severovýchodní linii se shoduje s odledněním v pozdním Pleistocenu a následnou postglaciální rekolonizací některých severněji položených oblastí (van Tuinen et al., 2008). Tento pattern rozpadu na linie vlivem měnícího se prostředí koreluje se studií Kryštufka et al. (2009). K podobným

výsledkům dospěli také Whorley et al. (2004), kteří studovali fylogeografii severoamerického sysla běloocasého (*Ammospermophilus leucurus*).

1.6. Ovlivnění habitatu a rozšíření živočichů v historické době a v současnosti

V historické době i v současnosti mělo největší vliv na rozšíření mnoha živočišných druhů působení člověka. Ať už se jedná o zavlečení nepůvodních druhů (Peacock et al., 2009) nebo o ovlivňování jejich životního prostředí (Milton et al., 2009). U mnoha druhů živočichů můžeme v současné době pozorovat fragmentaci habitatu, izolaci populací a následkem toho i snižování genetické variability (Saura et al., 2006; Campos et al., 2006; Pierpaoli et al., 2003). To s sebou přináší negativní dopady na fitness a evoluční potenciál druhu (Garner et al., 2005).

Již od počátku existence lidské civilizace ovlivňoval člověk prostředí, ve kterém žil. Za první významný milník je považována neolitická zemědělská revoluce, která se začala šířit z oblasti Blízkého Východu před cca 9 000 - 5 000 lety (Hewitt, 2000). Od dob antiky byly v Evropě pro získání zemědělské půdy káceny obrovské plochy lesních porostů (Cremene et al., 2005) a tak docházelo k vytváření a rozšiřování kulturní stepi. Tím vznikaly vhodné podmínky pro šíření stepních druhů z východní až do střední Evropy. Během 20. století však postupně narůstal tlak na výnosy v zemědělství a tak docházelo ke změnám ve způsobu hospodaření a využívání krajiny. Tyto změny (např. zcelování malých polí do větších celků, hluboká orba, rušení nebo zarůstání mezí) měly za následek redukci stepních biotopů ve východní Evropě (Cremene et al., 2005).

V současnosti je zřejmě největším problémem jak evropských tak i severoamerických stepních ploch jejich stále pokračující fragmentace vlivem lidské činnosti. Souvisejícím problémem je přeměna původních habitatů, zejména pro zemědělské účely. To může vyústit až v izolaci jednotlivých subpopulací okolním nevhodným habitatem. Například u severoamerického sysla horského (*Spermophilus armatus*) došlo k lokální extinkci jedné z mitochondriálních linií v důsledku klimatických změn a přeměně habitatu (van Tuinen et al., 2008). Také ve východní Evropě vedl rapidní vývoj industrializace a zemědělství k velmi rychlé ztrátě vhodných habitatů a dramatické redukci v rozšíření a početnosti sysla perličkového (*Spermophilus suslicus*) v západní části jeho areálu na území Polska a Ukrajiny (Biedrzycka & Konopiński, 2008). Na poklesu početnosti se mohou podílet i další faktory, jako například zavlečení nepůvodních druhů rostlin, jak tomu bylo v případě

severoamerického sysla *Spermophilus brunneus*, kde invaze nepůvodních druhů trav narušila přirozené cykly požárů (Yensen, 1991).

Stepní biotopy jsou důležité z hlediska výskytu mimořádně vysoké diversity rostlin a bezobratlých živočichů s množstvím endemických druhů. Jsou také považovány za refugia mnoha ohrožených živočišných druhů, které jsou vázány na otevřené habitaty (Cremene et al., 2005).

2. Materiál a metodika

2.1. Ochranařský status druhu

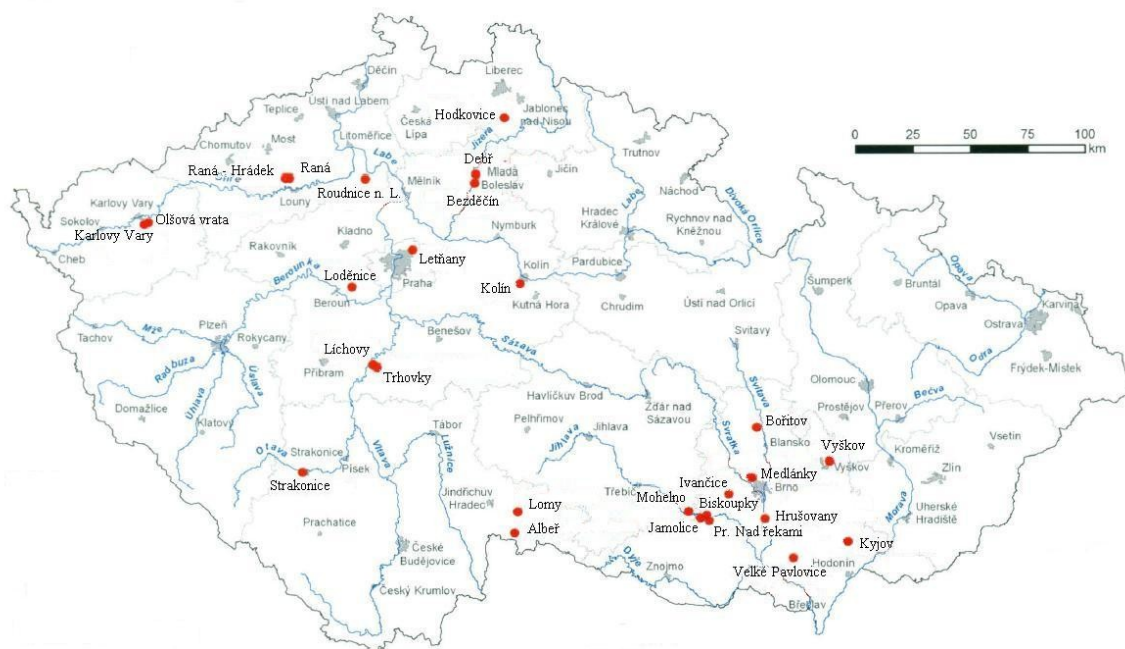
Sysel obecný (*Spermophilus citellus*) je dle národní legislativy řazen mezi kriticky ohrožené druhy naší fauny. V téže kategorii je uveden v Červeném seznamu ohrožených druhů obratlovců České republiky. Proto byla pro účely tohoto výzkumu, podpořeného grantem Ministerstva životního prostředí ČR – projekt č. SP/2d4/61/08, udělena výjimka (01658/CK/2008) ze zákona č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů.

2.2. Odchyty a odběr genetického materiálu

Sběr vzorků pro molekulární studie probíhal v letech 2008, 2009 a 2010 na území České republiky a Maďarska. Každý vzorek, tak jak jsou dále zmiňovány v této práci, představuje jednoho jedince sysla obecného. Sysli byli odchyťováni za použití stahovacích ok nebo živochytných pastí, do kterých byla umístěna návnada (kus jablka). Nastražené pasti a oka byly kontrolovány zhruba každých 15 minut, aby se zamezilo zbytečnému stresování chycených zvířat (zákon č. 246/1992 Sb., na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů). Chycenému syslovi byla zastřižena srst na špičce ocasu, aby nedošlo k opakovanému odběru vzorku ze stejného jedince. K získání genetického vzorku bylo zvoleno použití minimálně invazivních metod – biopsie z ušního boltce nebo stěr bukání sliznice pomocí nylonových odběrových štětečků používaných ve forenzní genetice (4N6 DNA swabs, Copan). Genetický materiál byl uchováván v 1,5 ml mikrozkrumavkách v čistém ethanolu – krátkodobě (v terénu) při pokojové teplotě a následně dlouhodobě při teplotě -20°C. Celkem bylo získáno 408 vzorků ze 27 lokalit v České republice a 3 vzorky z 1 lokality v Maďarsku – letiště v Szegedu (Tab. 1 a Obr. 2 a 3).

lokality	zkratka	počet vzorků	lokality	zkratka	počet vzorků
Letňany	LE	19	Medlánky	ME	20
Trhovky	TR	14	Bořitov	BO	21
Lichovy	LI	1	PR.Nad řekami	NŘ	14
Kyjov	KY	18	Hrušovany	HR	10
Vyškov	VY	21	Velké Pavlovice	VP	7
Kolín	KO	17	Hodkovice	HO	2
Lomy	LO	2	Roudnice n. L.	RL	24
Loděnice	LOD	48	Raná - Hrádek	RH	21
Jamolice	JA	22	Raná	RA	18
Strakonice	ST	10	Olšová Vrata	OV	3
Debr	DE	15	Mohelno	MO	18
Ivančice	IV	5	Biskoupky	BI	1
Karlovy Vary	KV	34	Albeř	AL	10
Bezděčín	BE	13	Mařarsko-Szeged	HU	3

Tab. 1. Seznam lokalit, kde byl proveden odchyt sýslů, jejich zkratky a počet získaných vzorků.



Obr. 2. Přehled lokalit, na kterých byl sbírán náš materiál na území ČR (mapa převzata a upravena podle Matějů et al. 2010a).



Obr. 3. Poloha maďarské lokality, kde byl sbírán materiál (mapa převzata a upravena z <http://www.budarentals.com/Apartments/budapest/Budapest/Budapest-Map.aspx>).

2.3. Charakteristika studovaných kolonií sysla obecného

V současné době se sysel obecný vyskytuje na území České republiky na cca 35 vzájemně izolovaných lokalitách, z nichž některé jsou již blízko svému zániku. Poslední publikovaný odhad početnosti syslů byl proveden v roce 2008 a v této době dosahovalo pouze 12 kolonií počtu 100 a více jedinců. Celkový počet syslů na území ČR, odhadovaný na základě letních stavů (tedy včetně tohoročních mláďat) tehdy činil cca 3600 jedinců (Matějů et al. 2008). Podrobnější údaje o vývoji početnosti jednotlivých kolonií a přírodních podmínkách jejich lokalit podávají Matějů et al. (2008, 2010a).

2.4. Izolace DNA

Izolace byla provedena komerčně dodávanými kity - DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) a NucleoSpin (Macherey Nagel). Byl dodržen postup podle protokolu dodávaného výrobcem. Pro získání DNA byla použita vždy jen polovina odebraného vzorku (u tkáně) nebo byly pro izolaci použity buňky získané jako peleta po centrifugaci lihu, ve kterém byl uložen

nylonový odběrový štěteček. Originální protokol od výrobce kitu (Qiagen) byl upraven ve 3 bodech:

1. ve druhém kroku izolace bylo rozděleno přidání proteinázy K do dvou kroků. Pro samotnou lyzi tkáně bylo použito místo předepsaných 20 μl pouze 15 μl . Po uplynutí doby potřebné pro lyzi (6-8 hodin) bylo přidáno zbylých 5 μl a vzorek se dal ještě na 10 minut inkubovat. Tím se omezila míra autodigestce enzymu,

2. v sedmém kroku protokolu bylo sníženo množství elučního pufru AE z původních 200 μl na 150 μl , aby byla získána DNA o větší koncentraci,

3. krok osm (opakování eluce) byl vynechán, protože při použitém množství tkáně byla většina izolované DNA získána při prvním promytí pufrům AE.

Úspěšnost izolace byla ověřena provedením gelové elektroforézy. Koncentrace a čistota získané DNA byla zjištěna měřením absorpčního spektra na Spektrofotometru ND-1000 (Nanodrop®) v sekvenační laboratoři biologické sekce PřF UK. Dle potřeby byla získaná DNA naředěna na koncentraci 1–10 $\text{ng}/\mu\text{l}$ podle tabulky 2.

ng/ μl	DNA (μl)	H ₂ O (μl)
1 – 10	20	0
10 – 20	10	10
20 – 30	6,7	13,3
>30	4	16

Tab. 2. Ředění vyizolované DNA v závislosti na koncentraci zjištěné spektrofotometrem.

2.5. Crossspecies analýza

Nejdříve byla provedena rešerše článků zabývajících se identifikací mikrosatelitových lokusů a vytvořeny vhodné primery k jejich amplifikaci u zástupců podčeledi Marmotinae (Stevens et al., 1997; Da Silva et al., 2003; Gondek et al., 2006; Hanslik & Kruckenhauser, 2000; Jones et al., 2005; Kyle et al., 2004; May et al., 1997). Při výběru mikrosatelitových lokusů pro druh *Spermophilus citellus* byla vzata v úvahu fylogenetická pozice druhu v rámci podčeledi (Harrison et al., 2003). Pro zjištění použitelnosti vybraných primerů byla provedena

crossspecies analýza na souboru 24 jedinců z různých populací České republiky a ze srovnávací populace z Maďarska. Na základě získaných výsledků bylo vybráno 13 mikrosatelitových lokusů pro následující analýzy (Tab. 3). Podle publikovaných T_{an} a zjištěných délek alel byly lokusy rozděleny do tří sad, tak aby se PCR a fragmentační analýzy daly provést v multiplexech. Byly nasynthetizovány fluorescenčně značené primery amplifikující tyto lokusy.

Sada 1 – ST10, Ssu7, Ssu17, Ssu15, MA066 ($T_{an}=52^{\circ}\text{C}$)

Sada 2 – Ssu13, MS56, IGS-110b, Ssu8, MS41 ($T_{an}=53^{\circ}\text{C}$)

Sada 3 – MA091, Ssu5, Ssu1, ($T_{an}=59^{\circ}\text{C}$)

lokus	přístupové číslo GeneBank	jednotka opakování	sekvence primeru (5'—> 3')	fluorescenční značení
ST10	AF254436	(CA)12	F: TTGTGATCCTCCAGGGAGTT R: GTGATTTCCAAACCCCATTC	6FAM™
Ssu7	DQ227412	(GA)13	F: TTTGAGGACCAGGACATCGT R: GCCACTACACCTCTCCTTGC	PET®
Ssu17	DQ227417	(GAT)14	F: CCCAAAAGGGAACAAAGCTA R: TGATTCAAAGATGCAAACATCC	6FAM™
Ssu15	DQ227415	(TC)3G(TC)3G(CT)10	F: CTAAGCACCACATACAAAGATG R: TCCCTTCCACCCATTGAC	VIC®
MA066	AY197783	(CA)14	F: AATATGTTAAGGCAGTTCTAGC R: GTTCTTCCCTGATATGGAAAGATGATGT	PET®
Ssu13	DQ227414	(CA)11	F: GCATTTGAGAAGGTCTGGTGAG R: CTGAGGGAAAGCGAGGAGAG	6FAM™
MS56	AF259377	(CA)14	F: CAGACTCCCACCAAGTGACC R: CCTGATCTATGTAGGTTCCAT	NED™
IGS-110b	U73698	(TGC)9	F: CCATGGAAGCATGTCTGGTG R: TGCTTCCCTGATTTCAAAGTTGC	PET®
Ssu8	DQ227413	(AC)17	F: AGTCGTGTCCAGCTTGTGTG R: AAATTGGGATGATAAGCAGAGG	NED™
MS41	AF259373	(GT)11	F: GGTGTATATGGGAATAGGGGG R: GCCTTCAAATCAAAGCAGGTTG	PET®
MA091	AY197784	(CA)20	F: CCTGTGTGAGTCCTGGAGTC R: AGCCATTTAGGTTACATCTGC	VIC®
Ssu5	DQ227411	(AG)12	F: CAACATAGTGAGACCCCATC R: AAGTCATCCCTGCCCTAAT	NED™
Ssu1	DQ227409	(AC)10	F: AGGTGGGTGTGAGAACTTGC R: AACTCAGGCTGGTGTGTGA	NED™

Tab. 3. Přehled mikrosatelitových primerů, jejich přístupových čísel do GeneBank, jednotek opakování a fluorescenčního značení.

2.6. PCR

Vlastní PCR reakce probíhaly v termocykleru iCycler™ Thermal Cycler (BIO–RAD) za použití kitu Multiplex PCR (Qiagen). Složení reakční směsi pro PCR je uvedeno v tabulce 4. a poměr složek (forward a reverse primer, pufr TE) jednotlivých multiplexových sad v tabulce 5. Objem DNA v reakční směsi byl optimalizován podle síly fluorescenčního signálu a množství vyskytujících se artefaktů po provedení fragmentační analýzy. Nastavení teplot a počtu cyklů termocykleru pro multiplexy je v tabulkách 6, 7 a 8. Byly provedeny předběžné analýzy, kde se ověřovala úspěšnost amplifikace pomocí PCR gelovou elektroforézou.

	V_{final} (μl)
PCR master mix	5
primer mix A	1
primer mix B	1
Rnase-free water	2
DNA	1 (1-10 ng/μl)
celkem	10

Tab. 4. Koncentrace reakční směsi pro PCR mikrosatelitů.

sada	lokus	F (μl)	R (μl)	TE (μl)
1A	ST10	2,5	2,5	
	Ssu7	2,5	2,5	
doplněno				240
1B	Ssu17	2,5	2,5	
	Ssu15	2,5	2,5	
	MA066	5	5	
doplněno				230
2A	Ssu13	2,5	2,5	
	MS56	2,5	2,5	
	IGS-110b	2,5	2,5	
doplněno				235
2B	Ssu8	2,5	2,5	
	MS41	2,5	2,5	
doplněno				240
3A	MA091	2,5	2,5	
	Ssu5	2,5	2,5	
doplněno				240
3B	Ssu1	2,5	2,5	
doplněno				245

Tab. 5. Množství forward (F), reverse primerů (R) a pufru TE v jednotlivých primer mixech.

cyklus	krok	T (°C)	t (min)
1 (1x)	1	95	15:00
2 (30x)	1	94	0:30
	2	52	1:30
	3	72	1:00
3 (1x)	1	60	45:00
4 (1x)	1	20	0:00

Tab. 6. Nastavení programu termocyklieru pro PCR mikrosatelitů – multiplex 1.

cyklus	krok	T (°C)	t (min)
1 (1x)	1	95	15:00
2 (30x)	1	94	0:30
	2	53	1:30
	3	72	1:00
3 (1x)	1	60	45:00
4 (1x)	1	20	0:00

Tab. 7. Nastavení programu termocyklieru pro PCR mikrosatelitů – multiplex 2.

cyklus	krok	T (°C)	t (min)
1 (1x)	1	95	15:00
2 (30x)	1	94	0:30
	2	59	1:30
	3	72	1:00
3 (1x)	1	60	45:00
4 (1x)	1	20	0:00

Tab. 8. Nastavení programu termocyklieru pro PCR mikrosatelitů – multiplex 3.

2.7. Fragmentační analýza

Směs pro fragmentační analýzu obsahovala 7,5 µl formamidu, 0,5 µl velikostního standardu (Gene ScanTM 500 LIZ Size Standard, Applied Biosystems) a 2 µl PCR produktu. Tato směs byla denaturována v termocyklieru iCyclerTM Thermal Cycler (BIO–RAD) při teplotě 95°C po dobu 5 minut. Následně byla zchlazena na teplotu 4°C nebo skladována při teplotě -20°C. Fragmentační analýza proběhla v sekvenčním centru PřF UK na sekvenátoru ABI Prism 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) s polymerem POP4.

2.8. Analýza dat

V programu GeneMarker V1.80 (www.softgenetics.com) byly odečteny délky jednotlivých alel. Během odečítání bylo přihlédnuto k možnému výskytu artefaktů *in vitro* amplifikace. Celkem bylo zpracováno 408 jedinců z České republiky a 3 jedinci z Maďarska (délky alel v příloze 1). V následujících analýzách, pokud není uvedeno jinak, byl použit dataset všech 411 jedinců.

Výskyt možných chyb při genotypování jedinců, jako je výskyt nulových alel a artefaktů vzniklých *in vitro* amplifikací, byl testován v programu Micro-Checker (van Oosterhout et al., 2004).

Základní popisné charakteristiky jednotlivých mikrosatelitových lokusů a populací byly vypočítány pomocí programu GenePop V4 (Rousset, 2008) a Genetix 4.0.5.2 (Belkhir et al., 2004). Byla zjištěna distribuce frekvencí alel v každém lokusu, frekvence výskytu nulových alel a vazebná rovnováha. Dále byly vypočítány hodnoty F_{ST} (fixační index) a F_{IS} (koeficient inbreedingu) v programu FSTAT (Goudet, 2001). Fixační index (F_{ST}) měří snížení heterozygotity subpopulací, ke kterému dochází vlivem genetického driftu u subpopulací při snížení genového toku. Může nabývat rozmezí od 0, kdy se žádná diferenciace nevyskytuje, až do 1, kdy jsou v subpopulacích fixovány odlišné alely. Hodnoty pod 0,05 můžeme považovat za slabou genetickou diferenciaci, rozmezí od 0,05 do 0,15 považujeme za střední genetickou diferenciaci, hodnoty od 0,15 do 0,25 poukazují na silnou genetickou diferenciaci, hodnoty nad 0,25 znamenají velmi silnou genetickou diferenciaci. Koeficient inbreedingu (F_{IS}) popisuje také snížení heterozygotity, ale v důsledku příbuzenského křížení mezi jedinci. Rozsah možných hodnot je od -1, kdy v populaci nejsou přítomní žádní homozygoti, až do +1, kdy nejsou přítomní žádní heterozygoti.

Dále byl použit program Cervus 3.0 (Kalinowski et al., 2007) pro zjištění počtu jednotlivých alel, výpočet očekávané (H_e) a pozorované heterozygotity (H_o) jednotlivých lokusů.

Ke zhodnocení genetické variability populacemi byla použita allelic richness zahrnutá v programu FSTAT (Goudet, 2001). Výhodou této statistické metody je, že srovnává genetickou variabilitu nezávisle na počtu vzorků z jednotlivých populací. Do této analýzy nebylo zahrnuto 6 vzorků (TR-8, TR-14, VY-3, BO-11, BE-7, KO-1) s chybějícími daty u některého z lokusů.

Pro první náhled na získaná mikrosatelitová data byla zvolena korespondenční faktoriální analýza (AFC) provedená programem Genetix 4.0.5.2. (Belkhir et al., 2004), která

patří mezi mnohorozměrné klastrové analýzy zdůrazňující kovarianci mezi daty (v tomto případě genotypy).

Data byla dále analyzována pomocí hierarchické Bayesiánské klastrové analýzy v programu Structure 2.2 (Pritchard et al., 2000), která dokáže lépe znázornit substrukturu obsaženou v datech. Počet zadaných K (klastrů) byl od 2 do 28 a vyjadřuje počet subpopulací, pro které byla hledána podpora v datech. Při nastavení programu byl zadán admixture model, independent allele frequency model, délka burn-in periody 100 000 kroků a počet opakování MCMC 1 000 000 kroků. Podporu výsledků pro jednotlivá K jsme znázornili vynesáním hodnoty $L(K)$ a upravené statistiky ΔK podle Evanno et al. 2005. Nejdříve byly vypočteny hodnoty $L'(K) = L(K) - L(K - 1)$, potom hodnoty $|L''(K)| = |L'(K + 1) - L'(K)|$ a v posledním kroku hodnoty $\Delta K = |L''(K)| / \text{variance } L(K)$.

V získaných datech byla také testována přítomnost jevu „isolation by distance“ (IBD). Projevem IBD je vyšší genetická podobnost geograficky bližších populací oproti populacím vzdálenějším. Sledovaný znak má v takovém případě klinální charakter rozšíření ve sledované oblasti. Matice pairwise F_{ST} byla vypočítána za pomoci programu GenePop V4 (Rousset, 2008) a matice geografických vzdáleností v Geographic distance matrix generator 1.2.3. (Ersts, 2011). IBD byla znázorněna vynesáním parametru $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ oproti logaritmu geografické vzdálenosti. Byla spočtena regresní přímka pomocí metody RMA (Reduced Major Axis), signifikance vztahu mezi oběma maticemi byla testována pomocí Mantelova testu přes Isolation By Distance Web Service V3.16 (Jensen et al., 2005).

Data byla dále testována v programu Bottleneck (Cornuet & Luikart, 1996), který detekuje vliv recentního ($2N_e - 4N_e$ populací) bottlenecku na genetickou diversitu pomocí detekce poměru H_e a equilibrium gene diversity (H_{eq}). Parametry byly nastaveny podle doporučení autorů pro mikrosatelitová data (TPM - two-phase mutation model, 95% single-step mutations, 5% multi-step mutations, variance among multiple steps = 12, 10 000 opakování pro každý run). Převaha H_e byla testována pomocí one-tailed Wilcoxonova testu. Některé populace byly z analýzy vyřazeny z důvodu nízkého počtu jedinců (LI, LO, IV, VP, HO, OV, BI, HU).

I když použité vzorkování neodpovídalo typické landscape genetics studii, testovali jsme analýzu prostorové distribuce genetické variability pomocí přístupu tessellation, který je součástí softwaru Geneland (Guillot et al., 2008) a řadí se také mezi Bayesiánské klastrové analýzy. Tato metoda hledá subpopulace, které jsou přibližně v Hardy-Weinbergově rovnováze a graficky znázorňuje jejich prostorové rozmístění. Byl nastaven corelated model, spatial model, null allele model, počet opakování MCMC 1 000 000 kroků a byla ukládána

každá 100. generace. V této analýze byl z datasetu vypuštěn monomorfní lokus Ssu13 (Gondek et al., 2006) a vzorky z maďarské populace z důvodu příliš vysoké geografické vzdálenosti.

3. Výsledky

3.1. Detekce nulových alel

Výsledky získané analýzou datasetu v programu Micro-Checker ukazují na přítomnost nulových alel ve většině polymorfních lokusů, kromě monomorfního Ssu13 (Tab. 9). Grafy pozorovaných a očekávaných frekvencí homozygotů pro jednotlivé lokusy jsou v příloze 2. Nadbytek homozygotů může být připsán spíše silnému Wahlundově efektu, jako následek genetické fragmentace populací, než nadměrnému výskytu nulových alel.

3.2. Genetická variabilita lokusů a populací

Celkem byly úspěšně zanalyzovány genetické vzorky získané z 408 jedinců sysla obecného (*Spermophilus citellus*) z 28 lokalit v České republice a vzorky ze 3 jedinců v jedné maďarské populaci, která nám v následujících analýzách posloužila jako outgroup. Tyto vzorky tvořily výsledný dataset ($n = 411$). Dvanáct ze třinácti vybraných mikrosatelitových lokusů bylo polymorfních s počtem alel od 2 do 7 (průměrně 3,77). Lokus Ssu13 (Gondek et al., 2006) je zřejmě ve většině populací v České republice monomorfní, pouze s jednou alelou. Distribuce frekvencí alel v jednotlivých mikrosatelitových lokusech je uvedena v příloze 3.

Pozorovaná (H_0) a očekávaná (H_e) heterozygozita všech lokusů dosahovala hodnot $H_0 = 0,161 - 0,348$ (průměrně 0,2388) a $H_e = 0,294 - 0,701$ (průměrně 0,4529). Ke zhodnocení genetické rozdílnosti mezi jednotlivými lokusy byl použit fixační index (F_{ST}) a koeficient inbreedingu (F_{IS}). Byla nalezena signifikantní genetická diferenciacce mezi všemi studovanými lokusy. Hodnoty F_{ST} nabývaly rozsahu od 0,3304 do 0,5388 (průměrně 0,437), což značí velmi silný stupeň diferenciacce mezi studovanými lokusy. Rozsah hodnot koeficientu inbreedingu dosahoval od -0,1323 do 0,4463 (průměrně 0,0852), což naznačuje výskyt inbreedingu. Nejvyšší allelic richness měl lokus MA091 (1,344) a nejnižší měl monomorfní Ssu13 (1,000), průměrná hodnota vypočítaná ze všech lokusů byla 1,2692. Rozsah velikosti alel, počet alel na lokus, hodnoty očekávané a pozorované heterozygozity, fixačního indexu, koeficientu inbreedingu a allelic richness jednotlivých mikrosatelitových lokusů jsou v tabulce 10.

		Lokusy												
		ST10	Ssu7	Ssu17	Ssu15	MA066	Ssu13	MS56	IGS-110b	Ssu8	MS41	MA091	Ssu5	Ssu1
Populace	LE	0	-0,2053	-0,2745	0,0241	-0,0267	0	0,0856	0,0579	0,2027	0	-0,0823	-0,1636	0,0878
	TR	0	-0,0026	-0,0026	0,2782	-0,0742	0	-0,1292	0	0,0326	-0,1548	-0,3453	0	0,0232
	KY	0,2758	0,1498	0,1486	-0,0384	0,0972	0	-0,0398	-0,0871	-0,0673	0,0978	-0,0016	0,0488	0,1536
	VY	0,1182	0,178	-0,2763	0,1235	0,1229	0	-0,0482	-0,0742	-0,2714	-0,1003	0,2556	0,0812	0,0225
	KO	0,3276	0,0792	0	0	-0,4059	0	-0,1255	-0,0597	0	-0,1598	-0,1147	0,0618	0,0762
	LOD	-0,067	0	-0,0321	-0,1587	0	0	-0,0211	0	-0,1372	0,0908	0,1475	0	0,0821
	JA	0,4142	0,1078	0,0435	0	0,1023	0	0,1006	0,1335	0	0	0,1619	-0,0483	0,232
	ST	0	0	-0,2929	-0,6838	-0,2929	0	0	0	-0,136	0,0487	-0,1056	-0,1056	0,2649
	DE	0	-0,0575	0	0,0937	-0,1191	0	-0,0881	-0,2697	0	-0,2946	0,0259	-0,1093	-0,2697
	IV	0	-0,5528	0,0797	0,0395	0	0	-0,3675	0	0	-0,1056	-0,1056	-0,1056	-0,1056
	KV	0,0384	-0,0925	0	0	0,1034	0	0	-0,0148	0	0	-0,0607	0	0,2823
	BE	-0,1229	0,1598	0	0,0351	0,1544	0	-0,1679	-0,069	-0,1679	0,0702	0,0459	0	0,1375
	ME	0,3844	0	-0,2929	0,3093	-0,0513	0	0,1723	-0,0253	-0,1056	-0,0253	-0,1633	0	-0,1127
	BO	0	0	-0,0013	0,17	-0,0317	0	0	0,0653	-0,0756	-0,1548	-0,1548	-0,0013	0,0326
	NŘ	0,3797	0,0851	-0,0742	0	-0,0256	0	-0,1136	0,0605	-0,0364	-0,1136	-0,2346	0	0
	HR	0,2361	-0,2366	0,2218	0,1142	0,1593	0	0,0487	0,0233	-0,0837	-0,3442	0,0649	0	-0,0513
	VP	0	-0,2441	-0,1548	-0,1548	-0,2441	0	-0,0549	-0,036	-0,0875	0,1892	-0,4655	-0,622	0,1339
	RL	0	-0,134	-0,0341	0,3251	-0,0211	0	-0,2094	0,177	-0,2362	0	-0,0871	0	0
	RH	-0,0488	-0,0488	-0,1341	0,2606	-0,0241	0	-0,0259	-0,2763	-0,0688	0,0529	-0,1111	0	0,0404
	RA	0,1486	0	-0,0893	0,241	0,1785	0	-0,1463	-0,0572	-0,0871	-0,1181	-0,0025	0	0
MO	0,3769	-0,1181	0,2761	-0,0563	0,0174	0	-0,0572	-0,0647	0	-0,0282	-0,0282	0	0,1176	
AL	0	-0,1056	0	0	0,0797	0	0,0908	-0,2254	-0,0513	0	-0,1056	0	0	

Tab. 9. Odhady frekvence nulových alel získané pomocí programu Micro-Checker, pro jednotlivé lokusy a populace. Žlutě označené hodnoty značí výskyt nulové alely. Do analýzy nebyly zahrnuty populace s nízkým počtem vzorků (LI, LO, HO, BI, OV, HU).

lokus	rozsah velikosti	počet alel	He	Ho	F _{ST}	F _{IS}	allelic richness
ST10	122 - 127	4	0,425	0,161	0,3304	0,4463	1,221
Ssu7	165 - 167	2	0,443	0,229	0,4626	0,0633	1,298
Ssu17	196 - 199	2	0,497	0,319	0,3907	-0,0306	1,289
Ssu15	188 - 191	3	0,587	0,251	0,4705	0,2141	1,330
MA066	238 - 248	4	0,576	0,348	0,3586	0,0754	1,338
Ssu13	175	1	-	-	-	-	1
MS56	108 - 116	4	0,467	0,263	0,4485	0,0045	1,312
IGS-110b	130 - 151	7	0,485	0,280	0,4105	0,0433	1,299
Ssu8	225 - 233	5	0,530	0,321	0,4779	-0,1323	1,312
MS41	197 - 203	5	0,426	0,202	0,5388	0,0021	1,260
MA091	150 - 174	6	0,701	0,341	0,4902	0,0711	1,344
Ssu5	143 - 150	3	0,294	0,170	0,4510	-0,0305	1,202
Ssu1	210 - 217	3	0,456	0,220	0,3986	0,2142	1,247
průměrně		3,77	0,4529	0,2388	0,437	0,0852	1,2692

Tab. 10. Charakteristiky mikrosatelitových lokusů. Rozsah velikosti alel, počet alel, He = očekávaná heterozygotita, Ho = pozorovaná heterozygotita, F_{ST} = fixační index, F_{IS} = koeficient inbreedingu a hodnoty allelic richness.

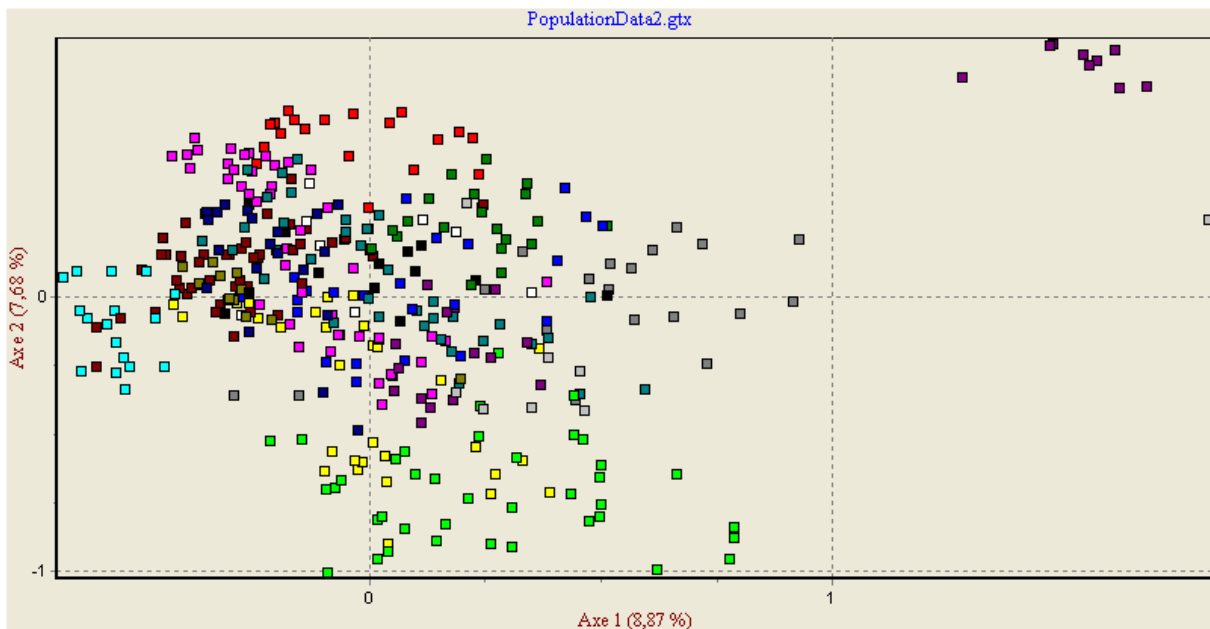
Pozorovaná (H_o) heterozygotita zkoumaných populací nabývala rozmezí od $H_o = 0,4923$ (HU) do $0,0718$ (OV), druhé nejvyšší hodnoty po maďarském vzorku (HU) dosahuje populace z Velkých Pavlovic (VP) s hodnotou $0,4252$. Očekávaná heterozygotita (H_e) dosahovala $H_e =$ od $0,0598$ (OV) do $0,4103$ (HU), druhé nejvyšší hodnoty dosáhla populace z Kyjova (KY) s hodnotou $0,3935$. Průměrně $H_o = 0,2668$ a $H_e = 0,2440$. Výpočet pairwise F_{ST} pro dvojice studovaných populací odhalil signifikantní genetickou diferenciaci mezi populacemi (Příloha 4). Hodnoty nabývaly rozsahu od $0,0127$ (LI – HU), to značí slabou genetickou diferenciaci, do $0,8125$ (LI – BI), což ukazuje na velmi silnou genetickou diferenciaci. Pro české populace je průměrná hodnota pairwise F_{ST} $0,4346$ a po zahrnutí maďarských vzorků $0,4293$. V obou případech se jedná o velmi silnou genetickou diferenciaci. Koeficient inbreedingu (F_{IS}) pro jednotlivé populace dosahoval hodnot od $-0,333$ (HO) do $0,343$ (JA) (průměrně $0,0601$), po vyloučení maďarských vzorků byl průměr $0,0506$. To naznačuje výskyt inbreedingu ve studovaných populacích. Rozsah hodnot pro allelic richness se pohyboval od $1,072$ (OV) do $1,492$ (HU), průměr byl $1,267$. Druhé nejvyšší hodnoty po maďarském vzorku (HU) dosahuje populace z Velkých Pavlovic (VP) s hodnotou $1,425$. Zjištěné hodnoty očekávané a pozorované heterozygotity, koeficientu inbreedingu a allelic richness pro jednotlivé populace jsou shrnuty v tabulce 11.

populace	zkratka	He	Ho	F _{IS}	allelic richness
Letňany	LE	0,2594	0,2664	0,013	1,266
Trhovky	TR	0,2627	0,2726	0,039	1,273
Líchovy	LI	0,0769	0,1538	0	1,154
Kyjov	KY	0,3935	0,4048	0,181	1,405
Vyškov	VY	0,3603	0,3691	0,196	1,367
Kolín	KO	0,2690	0,2772	0,068	1,278
Lomy	LO	0,1827	0,2436	0,077	1,244
Loděnice	LOD	0,2112	0,2134	-0,029	1,213
Jamolice	JA	0,2786	0,2851	0,343	1,285
Strakonice	ST	0,2169	0,2283	-0,155	1,228
Debrž	DE	0,3347	0,3462	-0,131	1,346
Ivančice	IV	0,2615	0,2906	-0,067	1,291
Karlovy Vary	KV	0,1136	0,1152	0,237	1,115
Bezděčín	BE	0,2951	0,3070	0,134	1,309
Medlánky	ME	0,2055	0,2107	0,183	1,211
Bořitov	BO	0,2534	0,2595	0,007	1,259
PR.Nad řekami	NŘ	0,2341	0,2428	0,145	1,243
Hrušovany	HR	0,3819	0,4020	0,126	1,402
Velké Pavlovice	VP	0,3948	0,4252	-0,122	1,425
Hodkovice	HO	0,0962	0,1282	-0,333	1,128
Roudnice n. L.	RL	0,2181	0,2227	0,110	1,223
Raná - Hrádek	RH	0,3248	0,3327	-0,002	1,333
Raná	RA	0,2577	0,2651	0,133	1,265
Olšová Vrata	OV	0,0598	0,0718	-0,091	1,072
Mohelno	MO	0,1992	0,2049	0,233	1,205
Biskoupky	BI	0,1538	0,3077	0	1,308
Albeř	AL	0,1254	0,1320	0,071	1,132
Maďarsko-Szeged	HU	0,4103	0,4923	0,317	1,492
průměrně		0,2440	0,2668	0,0601	1,267

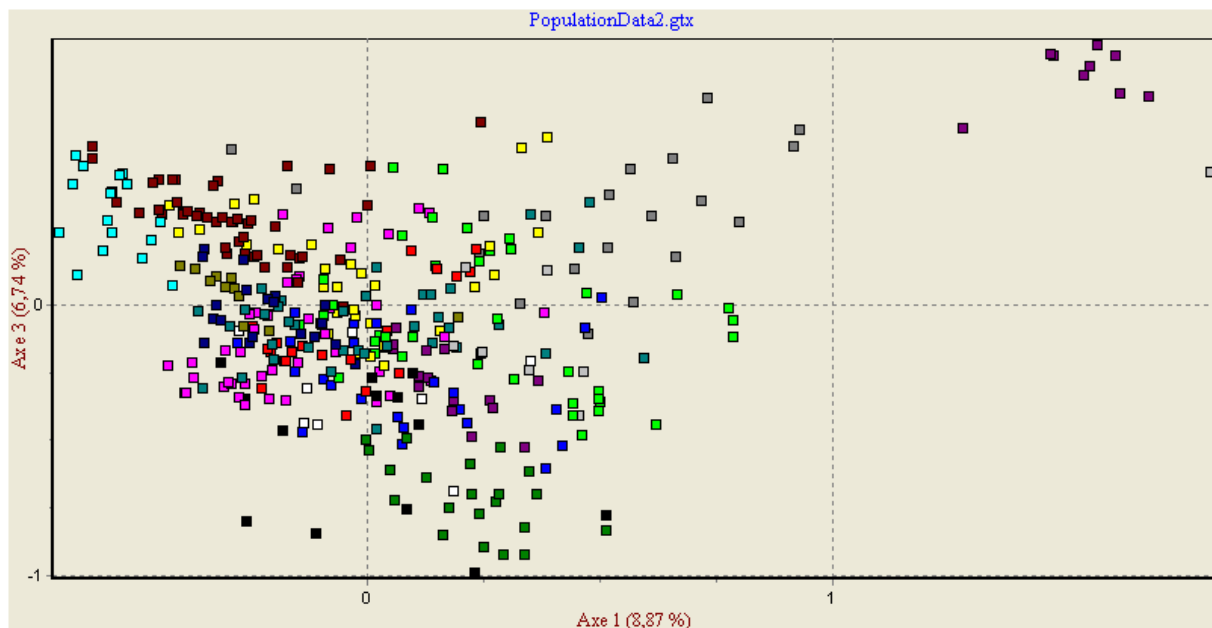
Tab. 11. Popisné charakteristiky studovaných populací. He = očekávaná heterozygotita, Ho = pozorovaná heterozygotita, F_{IS} = koeficient inbreedingu a hodnoty allelic richness. Charakteristiky pro některé populace nebyly vypočítány z důvodu nízkého počtu vzorků.

3.3. Korespondenční faktoriální analýza (AFC)

Pro vizualizaci genetických vztahů mezi jednotlivými populacemi byla zvolena korespondenční faktoriální analýza (AFC). V analýze byl použit celý získaný dataset ($n = 411$). Výsledky potvrdily výskyt signifikantní genetické diference mezi jednotlivými zkoumanými populacemi (Obr. 4 a 5). Jedinci tvoří shluky, které odpovídají jejich geografickému původu. Z grafu je také patrná genetická exklusivita některých demů, například populace z lokality Alberž (skupina bodů v pravém horním rohu), která je viditelně oddělena od ostatních vzorků.



Obr. 4. Faktoriální korespondenční analýza vizualizuje kovarianci v mnohorozměrných datech (mezi jednotlivými genotypy). Zde ukazuje vztah prvního versus druhého hlavního faktoru variability. Některé populace v grafu jsou vyznačeny stejnými barvami, protože v programu nelze nastavit více než 16 barev.



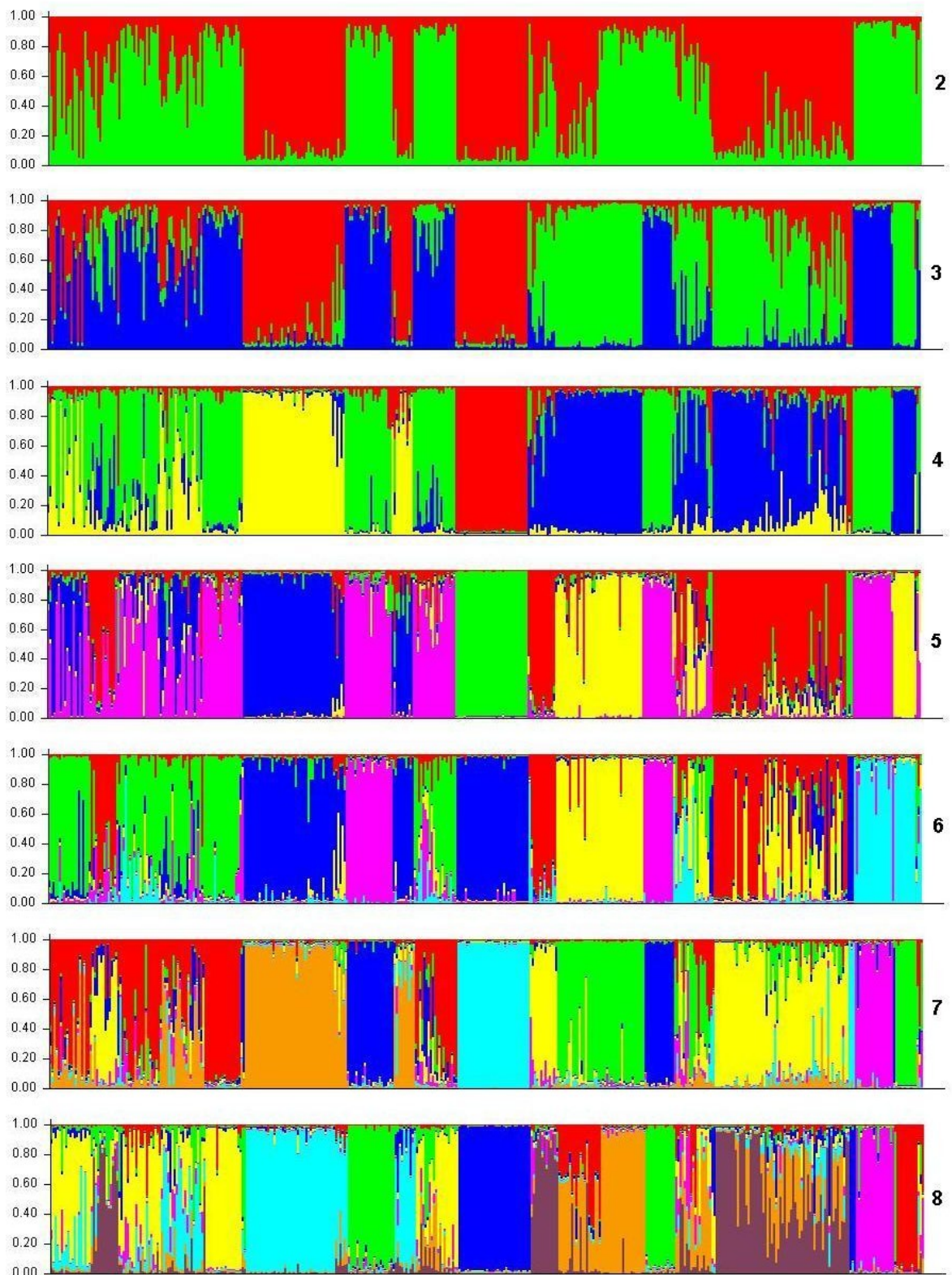
Obr. 5. Faktoriální korespondenční analýza vizualizuje kovarianci v mnohorozměrných datech (mezi jednotlivými genotypy). Zde ukazuje vztah prvního versus druhého hlavního faktoru variability. Některé populace v grafu jsou vyznačeny stejnými barvami, protože v programu nelze nastavit více než 16 barev.

3.4. Hierarchická Bayesiánská klastrová analýza

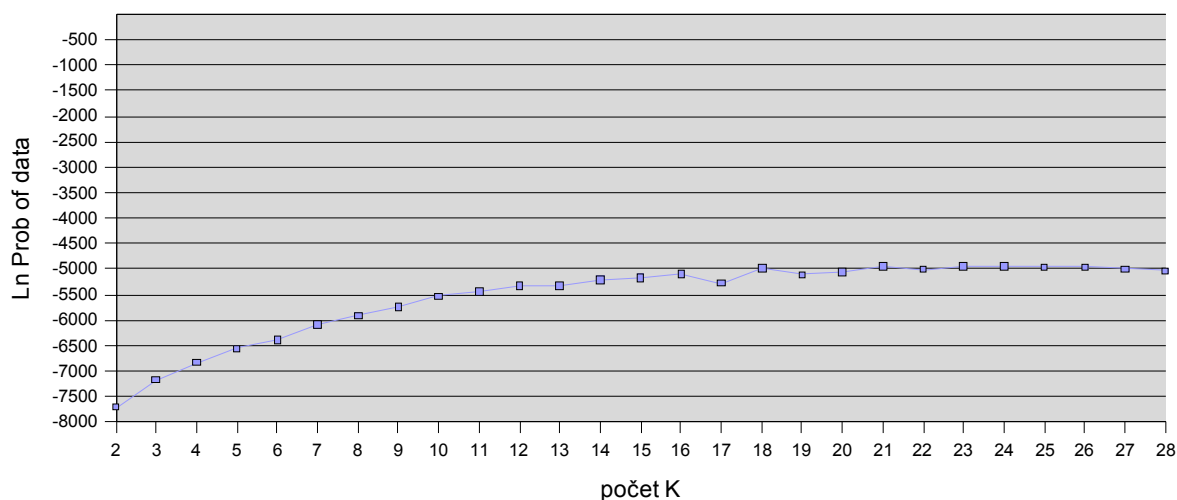
Další použitou analýzou, která vizualizuje substrukturu v genetických datech, byla hierarchická Bayesiánská klastrová analýza zahrnutá v programu Structure. Tato metoda určuje posteriorní pravděpodobnost zařazení individuálních genotypů do určitého klastru pro různá K (počet klastrů).

Vypočítali jsme pravděpodobnost zařazení do subpopulací při nastavení $K = 2$ až 28. Rozdělení jednotlivých genotypů do klastrů při rostoucí komplexitě použitého modelu ($K = 2$ až 8) je znázorněno na obrázku 6. Každý jedinec je představován vertikálním sloupcem, který je rozdělen na K barevných segmentů, odpovídajících posteriorní pravděpodobnost zařazení jedince do určité subpopulace.

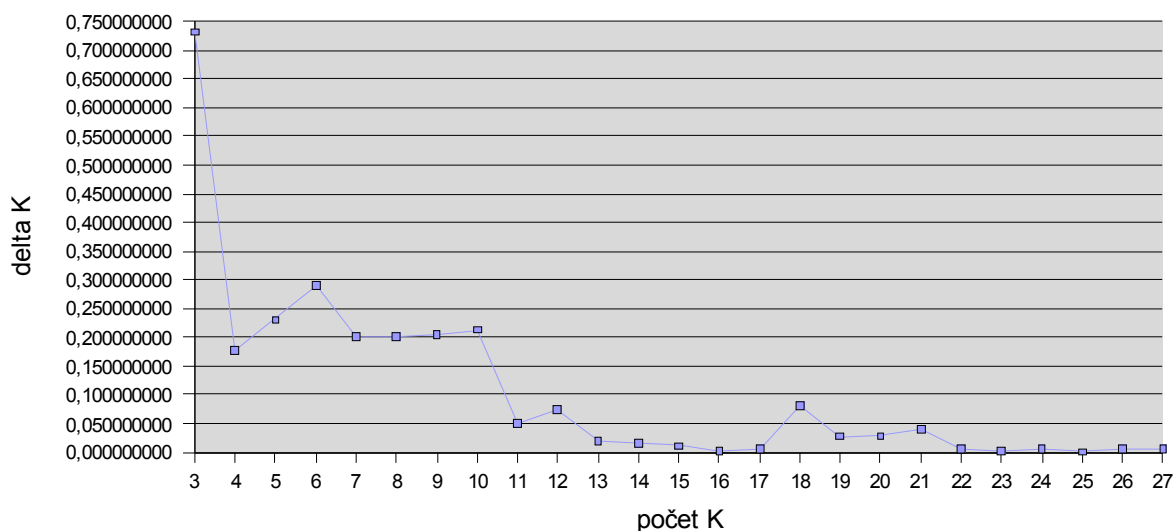
Po vynesení hodnot pro \ln probability of data a ΔK do grafů (Obr. 7 a 8) se jeví jako nejvhodnější počet klastrů $K = 2$.



Obr. 6. Sloupcový graf Bayesiánské klastrové analýzy, pro $K = 2$ až 8 , každý barevný segment odpovídá posteriorní pravděpodobnosti zařazení každého ze 411 jedinců (genotypů) do dané subpopulace.

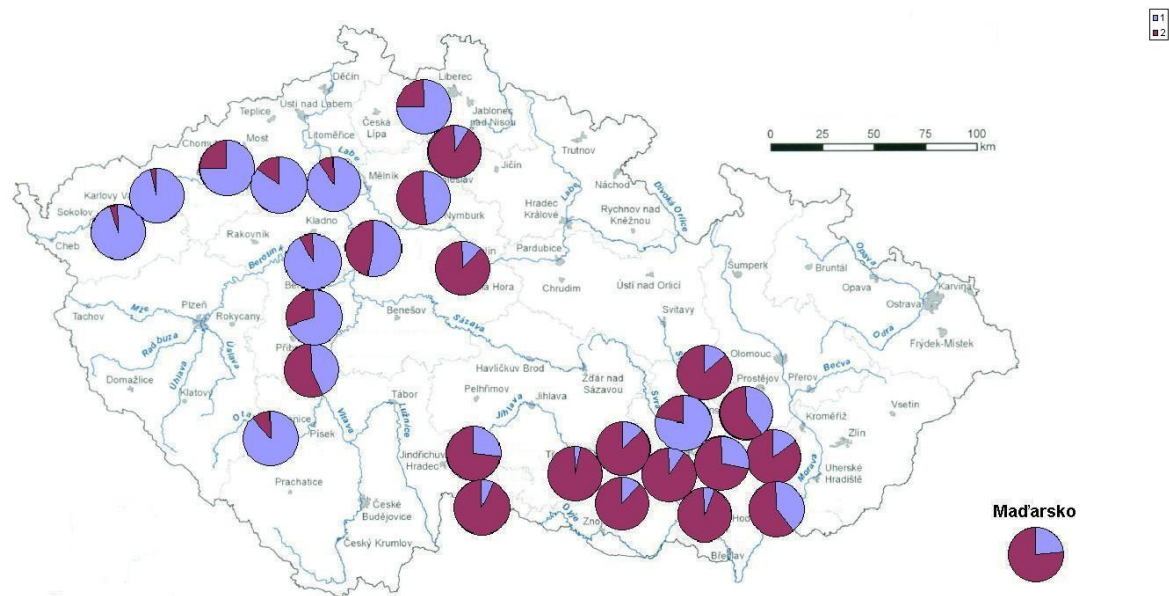


Obr. 7. Hodnoty Probability Ln likelihood pro testovaný počet K.

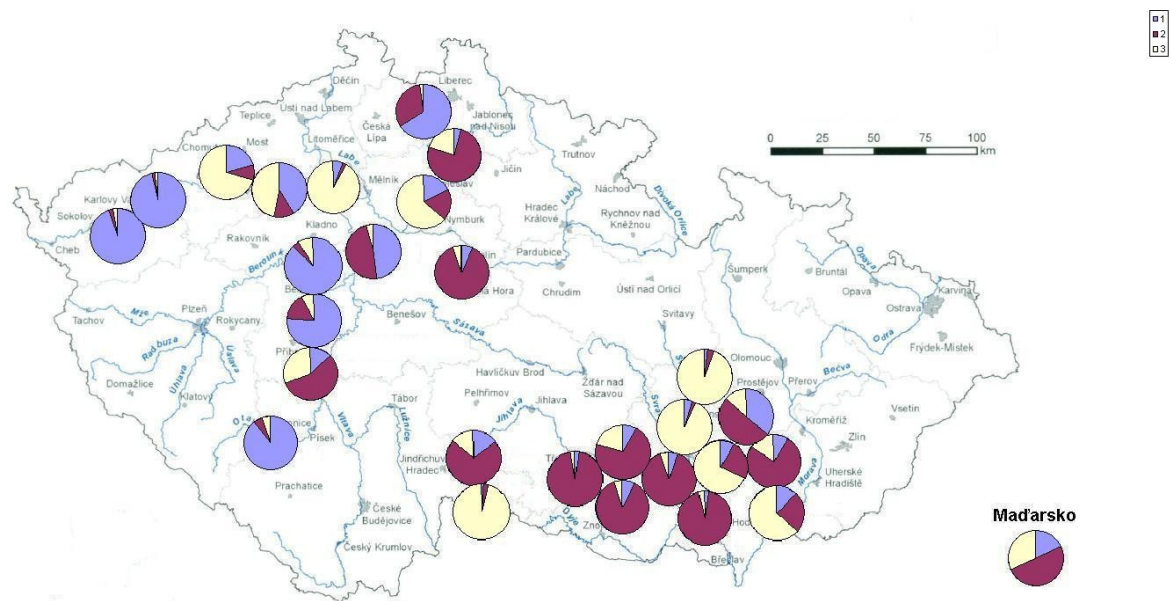


Obr. 8. Vynesené hodnoty ΔK pro testovaný počet K.

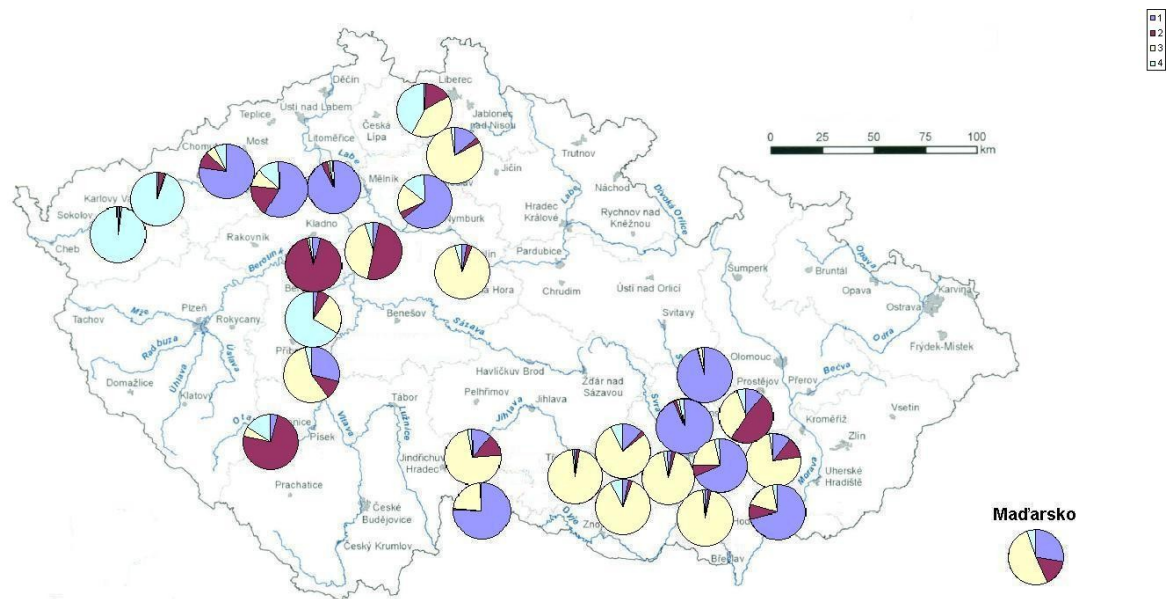
Vynesení genetické struktury studovaných populací do map při různých hodnotách K umožňuje vizualizovat geografickou distribuci genetické variability sysla obecného v České republice (Obr. 9 až 15). Pro $K = 2$ je viditelná relativně náhlá zóna přechodu, odpovídající zhruba oddělení hercynské a panonské oblasti (v západní subpopulaci je dále viditelná klinální variabilita), s rostoucím počtem K je patrná jemnější geografická struktura populací na daném území. Při nízkém počtu K je zřetelný především gradient genetického složení populací od jihovýchodu na severozápad a rozdílný status hercynské oblasti, naopak při vyšším počtu K je dobře viditelná exklusivita některých demů, např. populace na lokalitě Albeř.



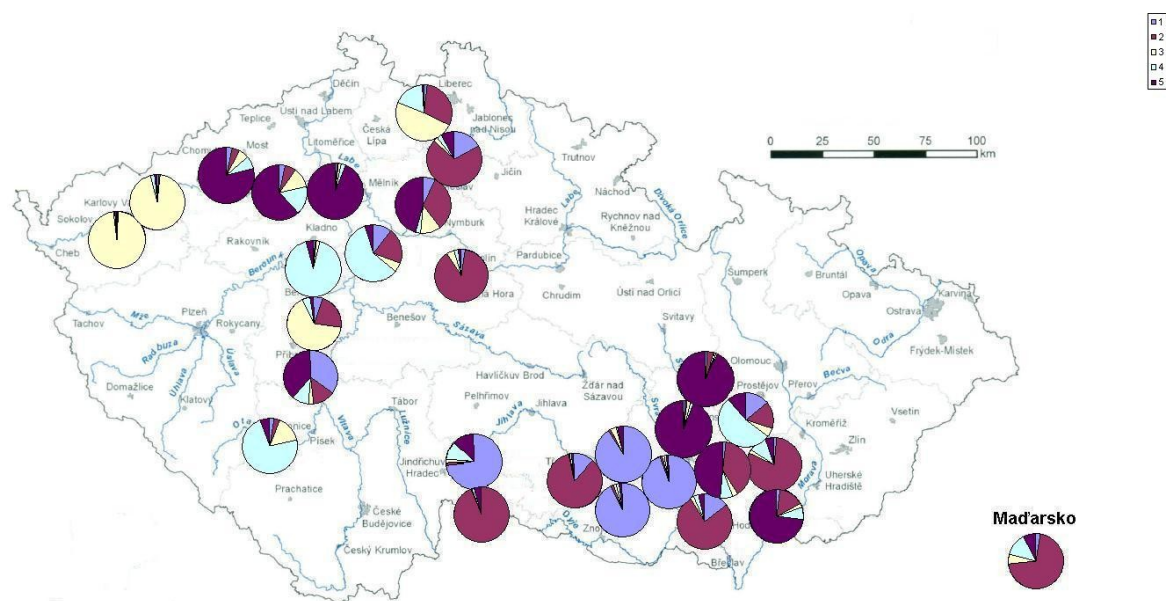
Obr. 9. Segmenty koláčových grafů na mapě znázorňují sumy příslušných posteriorních pravděpodobností pro jednotlivé kolonie při $K = 2$ (mapový podklad převzat z Matějů et al. 2010a).



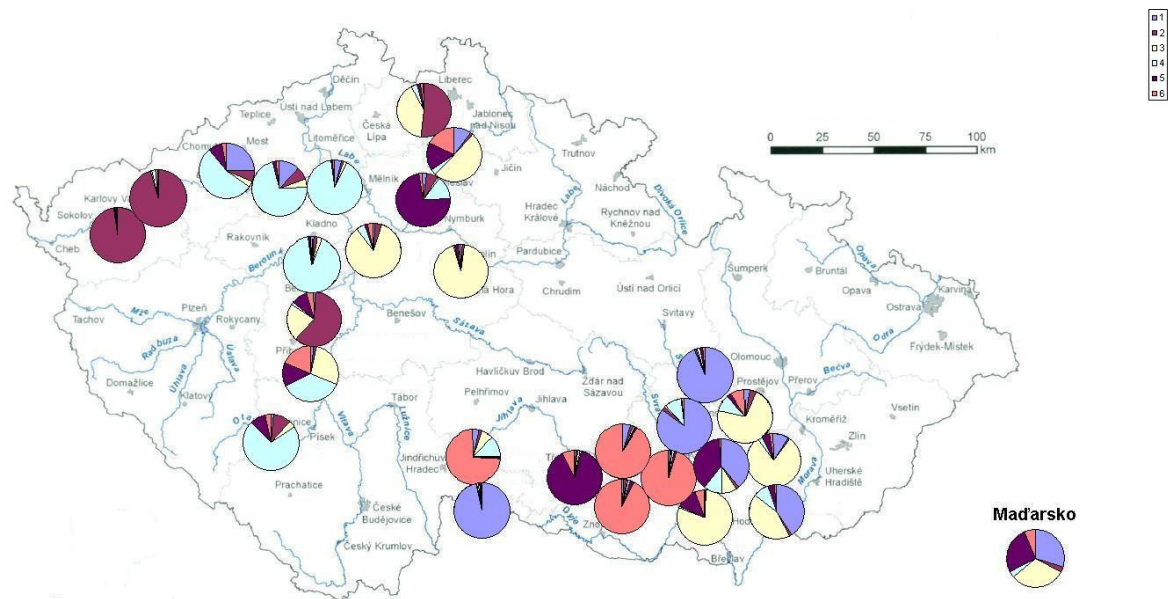
Obr. 10. Segmenty koláčových grafů na mapě znázorňují sumy příslušných posteriorních pravděpodobností pro jednotlivé kolonie při $K = 3$ (mapový podklad převzat z Matějů et al. 2010a).



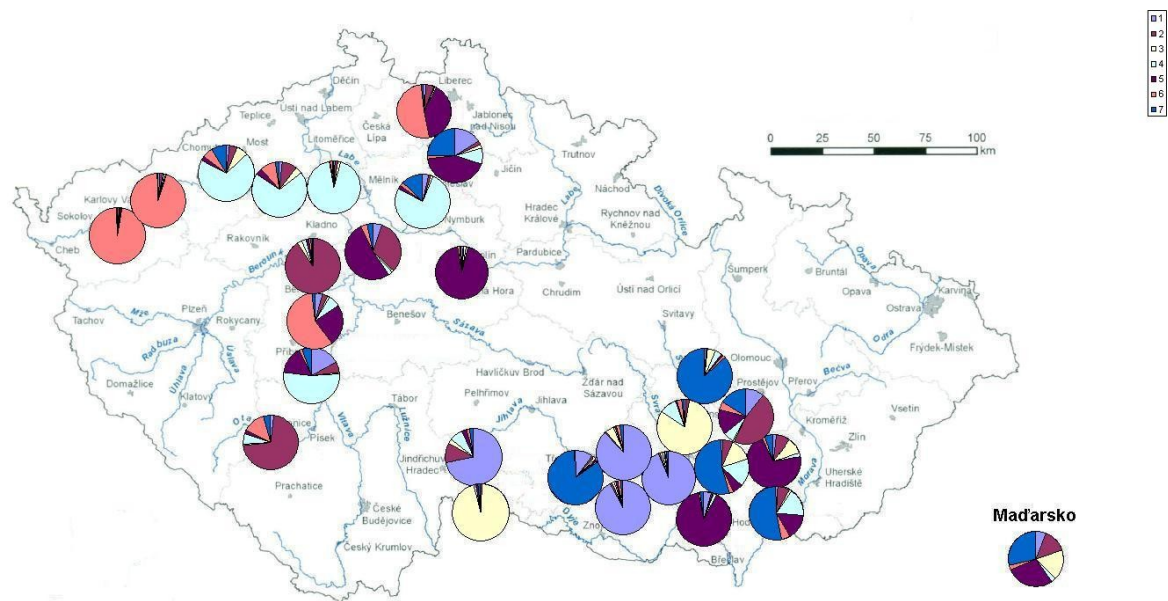
Obr. 11. Segmenty koláčových grafů na mapě znázorňují sumy příslušných posteriorních pravděpodobností pro jednotlivé kolonie při $K = 4$ (mapový podklad převzat z Matějů et al. 2010a).



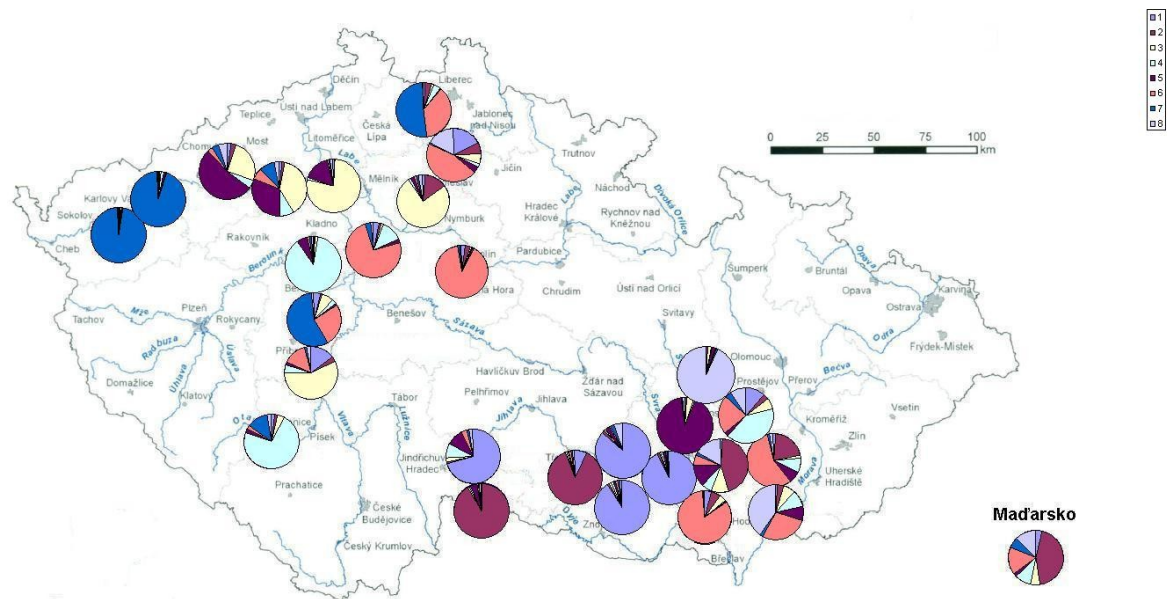
Obr. 12. Segmenty koláčových grafů na mapě znázorňují sumy příslušných posteriorních pravděpodobností pro jednotlivé kolonie při $K = 5$ (mapový podklad převzat z Matějů et al. 2010a).



Obr. 13. Segmenty koláčových grafů na mapě znázorňují sumy příslušných posteriorních pravděpodobností pro jednotlivé kolonie při $K = 6$ (mapový podklad převzat z Matějů et al. 2010a).



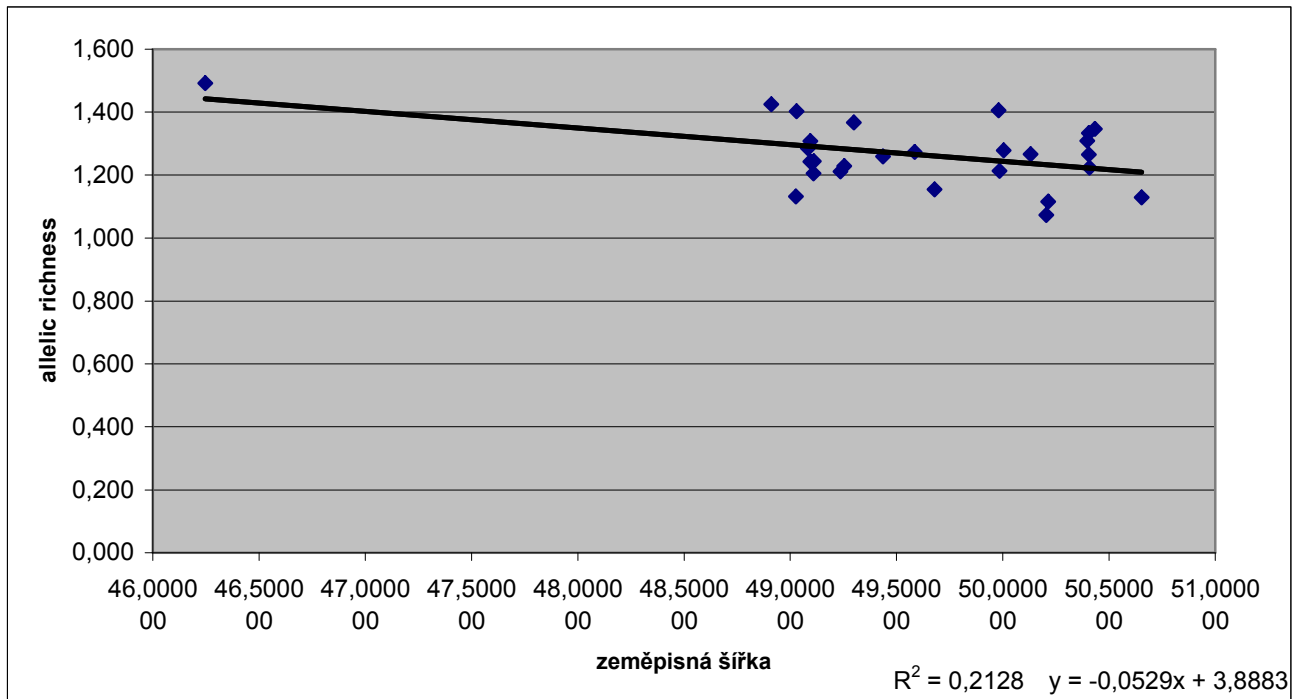
Obr. 14. Segmenty koláčových grafů na mapě znázorňují sumy příslušných posteriorních pravděpodobností pro jednotlivé kolonie při $K = 7$ (mapový podklad převzat z Matějů et al. 2010a).



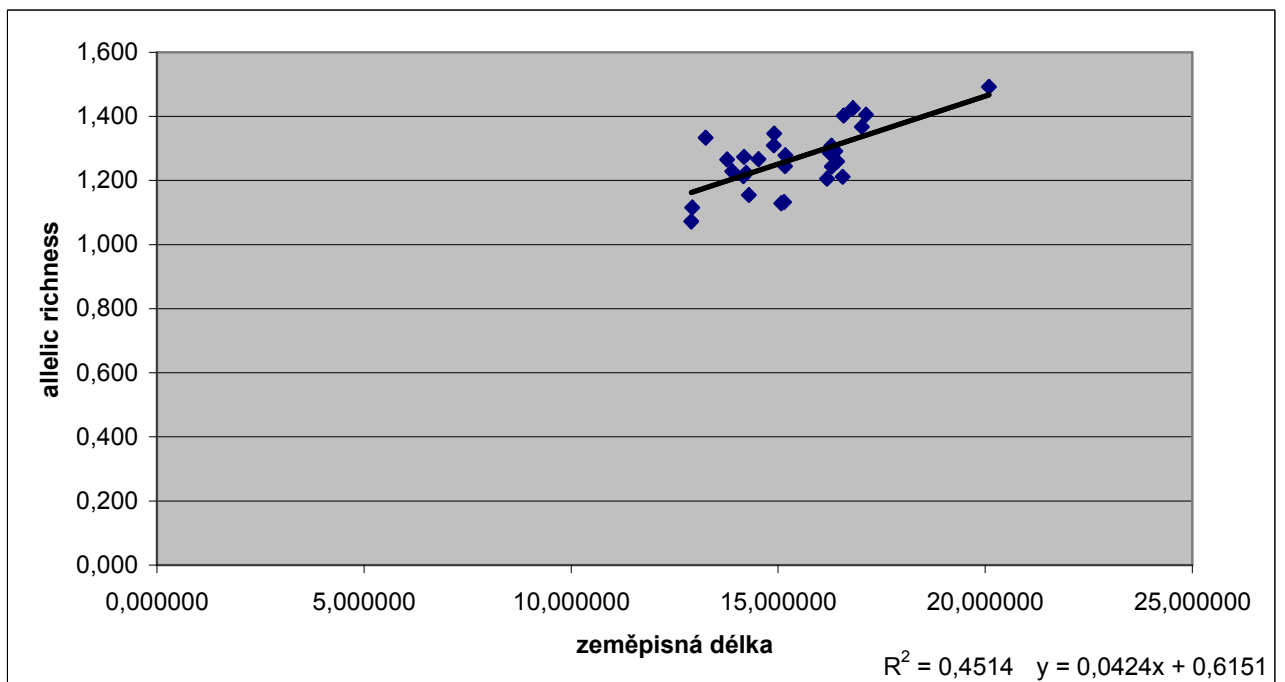
Obr. 15. Segmenty koláčových grafů na mapě znázorňují sumy příslušných posteriorních pravděpodobností pro jednotlivé kolonie při $K = 8$ (mapový podklad převzat z Matějů et al. 2010a).

3.5. Allelic richness

Po vynesení allelic richness proti zeměpisné šířce (Obr. 16) a délce (Obr. 17) je patrný trend poklesu směrem k okrajům areálu (na sever a západ). Signál je ale slabý v důsledku nízkého počtu alel na jednotlivých lokusech.



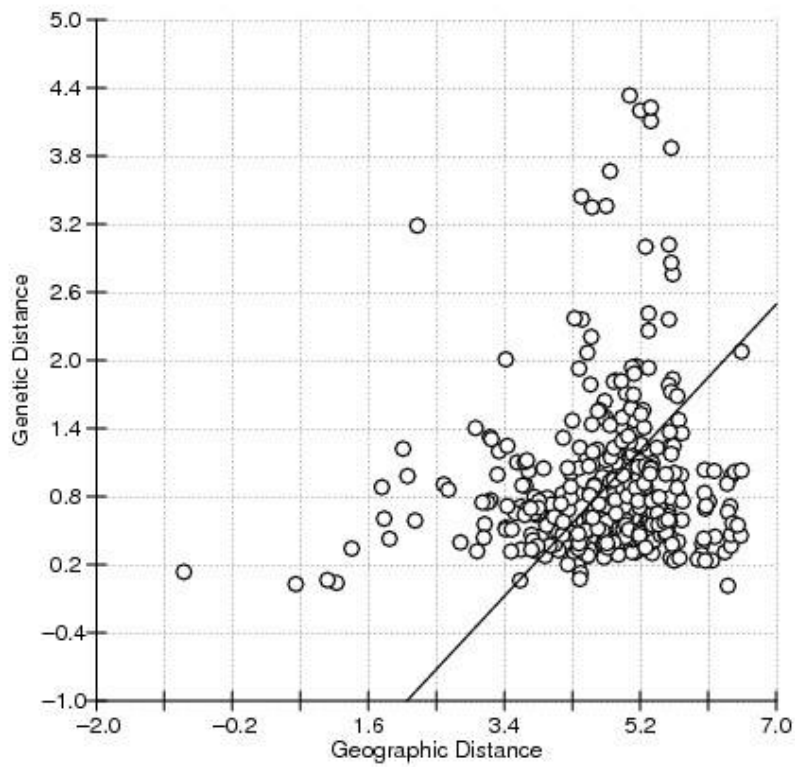
Obr. 16. Závislost allelic richness na zeměpisné šířce.



Obr. 17. Závislost allelic richness na zeměpisné délce.

3.6. Isolation by distance (IBD)

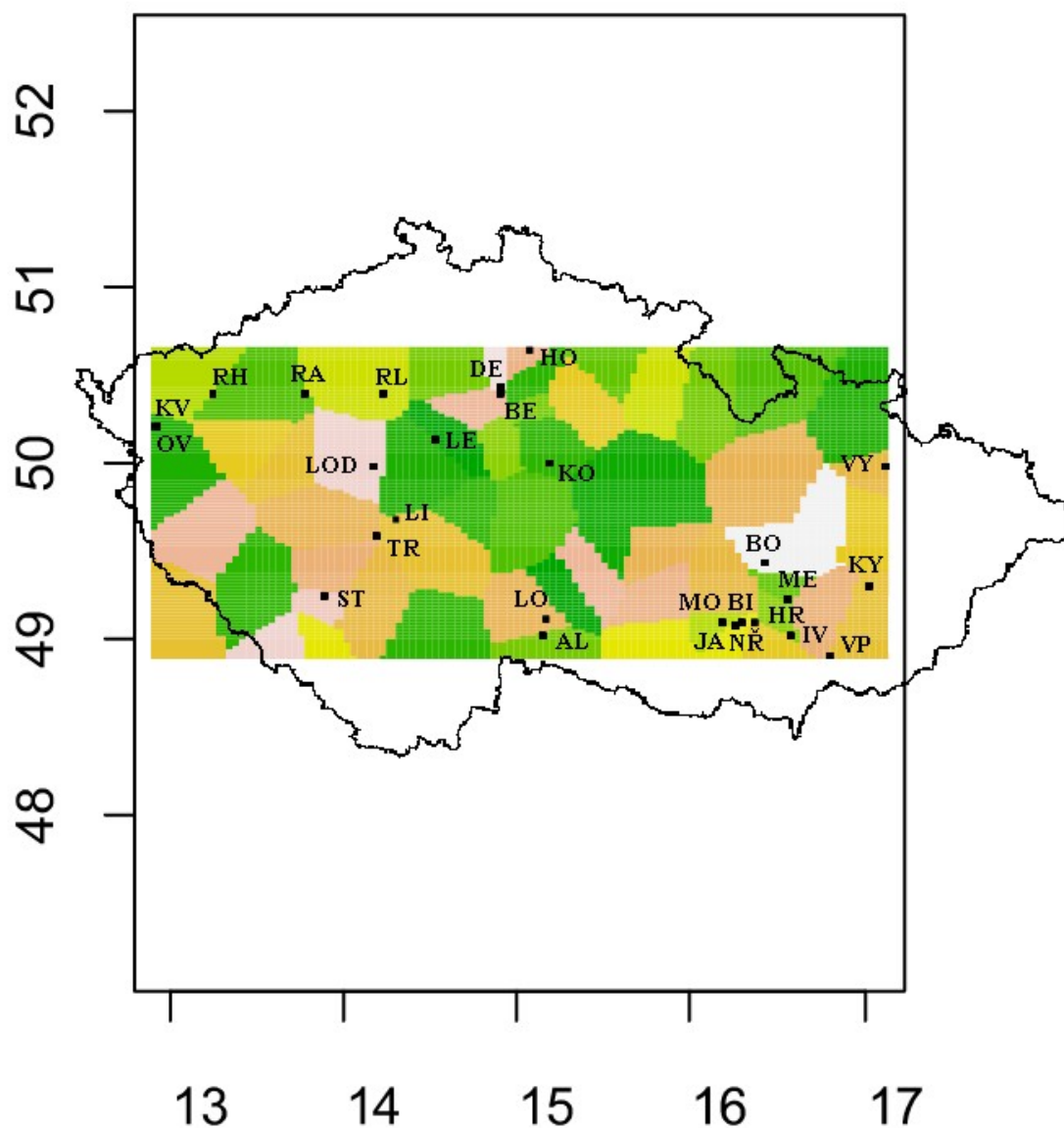
V našich datech jsme také testovali výskyt isolation by distance (IBD). Signifikantní korelace mezi maticemi nebyla nalezena. Mantelův test naznačuje absenci isolation by distance u českých populací sysla ($r = 0.0990$, $p = 0.1154$; Obr. 18).



Obr. 18. Vztah genetické a geografické vzdálenosti studovaných populací.

3.7. Geneland - analýza Tesselation

Tato analýza je součástí softwaru Geneland (Guillot et al., 2008) a patří mezi Bayesiánské klastrové analýzy. Na získaném obrázku č. 19 můžeme vidět příslušnost jednotlivých populací do 25 klastrů a jejich prostorové uspořádání na daném území.



Obr. 19. Příslušnost studovaných populací k jednotlivým klastřům zjištěná v programu Geneland.

3.8. Detekce recentního bottlenecku

V programu Bottleneck jsme testovali přítomnost vlivu recentních redukcí efektivní velikosti populace v jednotlivých koloniích. Signifikalantní signál existence recentního bottlenecku (p -value $< 0,05$) jsme našli ve dvou populacích: v Kolíně (KO) a v Debři (DE) (Tab. 12).

populace	zkratka	p-value
Letňany	LE	0,11621
Trhovky	TR	0,15039
Kyjov	KY	0,33862
Vyškov	VY	0,28467
Kolín	KO	0,02441
Loděnice	LOD	0,15625
Jamolice	JA	0,28516
Strakonice	ST	0,37109
Debř	DE	0,00195
Karlovy Vary	KV	0,50000
Bezděčín	BE	0,13770
Medlánky	ME	0,53906
Bořitov	BO	0,08203
PR.Nad řekami	NŘ	0,24805
Hrušovany	HR	0,55078
Roudnice n. L.	RL	0,23047
Raná - Hrádek	RH	0,44922
Raná	RA	0,36719
Mohelno	MO	0,57715
Albeř	AL	0,71875

Tab. 12. Hodnoty p -value studovaných populací. Žlutě vyznačeny jsou hodnoty, signifikantně naznačující výskyt bottlenecku. Vyřazeny populace (LI, LO, IV, VP, HO, OV, BI, HU) z důvodu nízkého počtu vzorků.

4. Diskuze

V této genetické studii jsme se zaměřili na podrobné zhodnocení genetické variability zbytkových populací sysla obecného (*Spermophilus citellus*) na území České republiky. Z celkového počtu 35 lokalit, které jsou na území ČR známy (Matějů et al., 2008), jsme získali genetické vzorky z 408 jedinců odchycených na 27 lokalitách a jako outgroup jsme použili 3 vzorky ze 3 jedinců získaných na jedné lokalitě v Maďarské republice.

Ke zkoumání genetické diversity našeho modelového druhu jsme použili mikrosatelity, které v současné době patří mezi nejpoužívanější molekulární markery v populačně genetických studiích (Oliveira et al., 2006). Uplatňují se například ve studiích zaměřených na populační strukturu, demografii, landscape genetics, individuální identifikaci a určování paternity. Mají mnoho výhodných vlastností - hojný výskyt v genomu většiny organismů, vysoký stupeň polymorfismu a heterozygotity (Baker et al., 1999). U druhů, kde zatím mikrosatelitové lokusy nebyly lokalizovány, lze použít primery vyvinuté pro blízké příbuzné druhy (tzv. cross-species amplifikace; Jaarola et al., 2007). S rostoucí fylogenetickou vzdáleností ale pravděpodobnost úspěšného použití klesá. Navíc mohou mikrosatelitové lokusy, v takovém případě, vykazovat nižší variabilitu. Tento jev je znám jako ascertainment bias (Webster et al., 2002). V současné době se dá pro vyhledávání mikrosatelitových lokusů použít i next generation sequencing.

Současné rozšíření a variabilita sysla obecného (*Spermophilus citellus*) odráží pleistocenní a holocenní alopatrické jevy související s ústupem stepních biotopů počátkem holocenu, neolitickou expanzí spojenou s rozšířením kulturní stepi i zmenšení a fragmentaci areálu sysla ve 20. století v důsledku změn krajiny vlivem moderního zemědělství a urbanizace. Tento druh se proto stává modelovým taxonem pro výzkum výše zmíněných jevů.

Zjištěné hodnoty popisných charakteristik jednotlivých populací a lokusů naznačují sníženou genetickou variabilitu a heterozygotnost popsanou již Hulovou & Sedláčkem (2008). Průměrná pozorovaná (H_o) heterozygotnost českých populací byla 0,2585. Očekávaná heterozygotnost (H_e) zkoumaných populací dosahovala $H_e =$ od 0,0598 (OV) do 0,4103 (HU), druhé nejvyšší hodnoty dosáhla populace z Kyjova (KY) s hodnotou 0,3935, průměrně $H_e = 0,2440$. Průměrná hodnota H_e pouze pro české populace je 0,2378, Hulová & Sedláček (2008) ve své práci uvádí hodnotu $H_e = 0,332$.

Pairwise F_{ST} pro dvojice studovaných populací odhalil signifikantní genetickou diferenciaci mezi populacemi. Hodnoty nabývaly rozsahu od 0,0127 (LI – HU), to značí slabou genetickou diferenciaci, do 0,8125 (LI – BI), což ukazuje na velmi silnou genetickou diferenciaci. Pro české populace je průměrná hodnota pairwise F_{ST} 0,4346 a po zahrnutí maďarských vzorků dosahuje hodnoty 0,4293. V obou případech se jedná o velmi silnou genetickou diferenciaci. Naše výsledky ukazují na vyšší stupeň genetické difrenciace než popsali ve své práci Hulová & Sedláček (2008), kde byl rozsah hodnot F_{ST} od 0,0609 (LET – KYJ) do 0,3561 (KV – TR) a průměr pro české populace byl 0,158. Vzhledem k vyššímu počtu studovaných populací v naší práci, se rozdíl ve výsledcích předpokládal.

Naopak koeficient inbreedingu (F_{IS}) nám vyšel nižší než Hulové & Sedláčkovi (2008). Rozmezí hodnot bylo od -0,333 (HO) do 0,343 (JA) (průměrně 0,0601), bez maďarských vzorků byl průměr 0,0506. Výskyt příbuzenského křížení je pravděpodobný v koloniích s pozitivní hodnotou koeficientu inbreedingu. Silná inbrední deprese se v malých populacích neočekává (protože recesivní alely se silně negativním vlivem na fitness se nemohou udržet v heterozygotních genotypech). Kolonie s výskytem inbreedingu mohou být ale ovlivněny genetickou zátěží, ztrátou heterozygotnosti a hromaděním alel s mírně negativním vlivem na fitness, což může potenciálně vyústit v jevy označované jako „mutational meltdown“ a „extinction vortex“.

Rozsah hodnot pro allelic richness se pohyboval od 1,072 (OV) do 1,492 (HU), průměrně 1,267. Když nebudeme brát v úvahu vzorky z Maďarska, dosahuje druhé nejvyšší hodnoty 1,425 populace z Velkých Pavlovic (VP). Průměrná hodnota allelic richness pro populace vzrůstá směrem od západu na východ. Signál je sice slabý z důvodů nízkého počtu alel na mikrosatelitových lokusech, ale i tak naše výsledky potvrzují klinální charakter variability. To odpovídá i výsledkům práce Biedrzycky & Konopińskiego (2008).

Signifikantní výskyt recentního bottlenecku jsme našli pouze u dvou studovaných českých populací sysla (KO a DE) z dvaceti testovaných. Biedrzycka & Konopiński (2008) ve své studii našli nadbytek heterozygotů u 6 z 10 nejzápadnějších populací sysla perličkového (*S. suslicus*). Je možné, že naše výsledky jsou ovlivněny nízkým počtem studovaných jedinců ve většině testovaných populací.

U zkoumaných populací nebyl nalezen signifikantní výskyt isolation by distance (IBD), to odpovídá výsledkům práce Hulové & Sedláčka (2008). Zřejmě vlivem fragmentace a ztráty habitatu spojeným se snížením nebo zamezením genetického toku, genetický drift působil nezávisle v každé populaci (Hulová & Sedláček, 2008).

Provedená korespondenční faktoriální analýza (AFC) i hierarchická Bayesiánská klastrová analýza ukazují výskyt genetické diferenciace mezi studovanými populacemi. To se shoduje s předešlými výsledky studie provedené Hulovou & Sedláčkem (2008). Vzhledem k nízkým disperzním možnostem druhu se určitý stupeň diferenciace mezi populacemi předpokládá, ale vypočítané hodnoty fixačního indexu naznačují velmi silnou genetickou diferenciaci a nepřítomnost genového toku. Genetická diferenciace je důsledkem procesů probíhajících v malých populacích jako je efekt zakladatele, Wahlundův efekt, genetický drift a inbreeding. Náhodný drift může být v populacích s nízkou efektivní velikostí velmi intenzivní a vede k rychlé ztrátě genetické variability. K podobným závěrům dospěli i Biedrzycka a Konopiński (2008), kteří porovnávali genetickou variabilitu sysla perličkového (*Spermophilus suslicus*) ve dvou oblastech s rozdílným stupněm spjitosti habitatu. Negativní dopad výše jmenovaných jevů je navíc znásoben fragmentací a izolací jednotlivých populací. Stupeň genetické diversity uvnitř a divergence mezi populacemi souvisí se stupněm fragmentace areálu rozšíření druhu (Garner et al., 2005). Silná populační struktura a snížená genetická diversity zjištěná v naší práci je pravděpodobně způsobena relativně recentní expanzí druhu a následnou fragmentací jeho areálu rozšíření. K té dochází u obou studovaných středoevropských druhů syslů zhruba v posledních 50ti letech a souvisí s rozvojem industrializace a zemědělství (Biedrzycka & Konopiński, 2008; Hulová & Sedláček, 2008). Landscape genetics přístup v programu Geneland zdůraznil signál související s diferenciací a genetickou exkluzivitou jednotlivých kolonií.

Izolace a fragmentace areálu ale nemusí vést k výše uvedeným jevům ve všech případech. Studie, kterou provedli Garner et al., 2005 na dvou poddruzích severoamerického sysla *Spermophilus brunneus*, ukázala, že severní poddruh (*S. b. brunneus*) vykazuje, oproti očekávání, vysokou mikrosatelitovou diversity a pouze nízkou až střední diferenciací mezi populacemi. A to i přesto, že jsou populace severního poddruhu izolované déle než populace jižního poddruhu (*S. b. endemicus*). To naznačuje spíše starý bottleneck nebo efekt zakladatele než recentní redukci genetické variability, zřejmě lze určitý stupeň izolace tolerovat bez ztráty genetické diversity. V souladu s předešlými výsledky práce Hulové & Sedláčka (2008) je genetická variabilita sysla obecného v populacích České republiky nízká. To může být způsobeno několika faktory. K prvnímu ochuzení genetické variability ancestrálních populací zřejmě došlo již během šíření druhu z balkánského refugia vlivem efektu zakladatele a opakovaných bottlenecků (Kryštufek et al., 2009). Podobný pattern nízké mikrosatelitové diversity způsobené vlivem bottlenecku ukazují i populace jižního poddruhu *S. brunneus* (Garner et al., 2005). Nižší pozorovanou heterozygotnost v nově založených

populacích, v porovnání se zdrojovými populacemi, vlivem efektu zakladatele potvrdila práce Broderse et al. (1999), kteří studovali kanadské populace losa (*Alces alces*).

Dalším faktorem ovlivňujícím genetickou variabilitu populací je jejich geografická pozice v rámci areálu druhu. Populace na okraji areálu totiž mívají sníženou genetickou variabilitu oproti populacím vyskytujícím se blíže k centru vlivem rozdílné intenzity genového toku (Schwartz et al., 2003). Tomu odpovídá i nízký stupeň genetické diferenciacce mezi centrálními populacemi (Garner et al., 2005). Česká republika představuje nejzápadnější okraj areálu sysla obecného (Obr. 20) a tak lze předpokládat, že i tento fakt se mohl podepsat na snížené genetické variabilitě našich populací.



Obr. 20. Areál rozšíření sysla obecného (*Spermophilus citellus*) (IUCN, 2008).

Z pohledu fylogeografické historie patří populace sysla obecného (*S. citellus*) v České republice k severní mitochondriální linii (Kryštufek et al., 2009). Říčanová et al., 2011 rozdělili na základě studia MHC genů a mikrosatelitů tuto Severní linii sysla obecného ještě na Západní a Východní linii. Západní populace, obývající přibližně území České republiky, jsou vysoce fragmentované s nízkým nebo žádným genovým tokem, sníženou genetickou variabilitou a vysokým stupněm inbreedingu. Oproti tomu Východní populace, obývající Slovensko a Maďarsko, mají vyšší genetickou variabilitu s vyšším stupněm disperze a vykazují nižší vliv inbreedingu (Říčanová et al., 2011). Tato zjištění odpovídají charakteru rozšíření sysla obecného v České republice (Matějů et al. 2008) – kompletně izolované populace a na Slovensku – místy ještě zbytky více-méně souvislého výskytu, jinde již nastupující fragmentace (Ambros, 2008). Podobný pattern rozdělení můžeme pozorovat i u populací sysla perličkového (*S. suslicus*) v Polsku a na Ukrajině. Západní izoláty na území Polska vykazují nižší genetickou diversitu než souvislé populace na Ukrajině (Biedrzycka & Konopiński, 2008).

Z našich výsledků vyplývá, že zjištěná genetická variabilita má do jisté míry klinální (jihovýchod - severozápad) charakter. Předěl mezi hercynskými a panonskými populacemi vede na úrovni hranic Čech a Moravy, přičemž lokality Lomy a Albeř na Jindřichohradecku již patří do panonských populací. S rostoucím počtem K je patrná jemnější genetická struktura populací na daném území a můžeme sledovat postupnou diferenciaci populací a exkluzivitu některých demů – např. lokalita Albeř. Tato lokalita se od všech ostatních odlišuje velmi brzy, což naznačuje její možný původ z rakouských populací, které dodnes obývají nížiny a přilehlé pahorkatiny kolem Dunaje v Dolním Rakousku. Nejbližší lokality sysla zde leží jen cca 50 km od Albeře (Spitzenberger, 2001). Podobnosti mezi geograficky blízkými populacemi jsou zřejmě důsledkem společného původu ať už přirozeného (např. Raná a Raná – Hrádek) nebo způsobeného umělým transferem (např. Karlovy Vary – letiště a Olšová Vrata). Kolonie na lokalitě Karlovy Vary byla téměř jistě založena jedinci, kteří byli odchyceni z lokality Olšová Vrata pro projekt reintrodukce sysla na lokalitu Vítkův vrch v CHKO Slavkovský les v letech 2000 – 2001. Lokalita Vítkův vrch později zanikla a sysli se odtud odstěhovali na Karlovarské letiště, které se nachází zhruba 350 metrů od této lokality (Matějů et al. 2010b). Získaná genetická data tuto hypotézu podporují.

Porozumět zákonitostem genetické diversity a divergence mezi zbývajícími populacemi sysla obecného (*Spermophilus citellus*) v České republice je důležité proto, aby

bylo možné designovat strategii ochranného managementu tak, aby byly co nejvíce omezeny další ztráty jeho genetické variability působením genetického driftu, inbreedingu a Wahlundovu efektu.

5. Závěry

- Pomocí různých přístupů byla prokázána velmi silná genetická diferenciace mezi studovanými populacemi sysla obecného (průměr pairwise F_{ST} pro české populace byl 0,4346).
- Diferenciace mezi koloniemi je důsledkem procesů probíhajících v malých populacích (efekt zakladatele, genetický drift, Wahlundův efekt, inbreeding aj.), které jsou ještě zesíleny vlivem fragmentace areálu rozšíření a vzájemné izolace kolonií.
- Genetická variabilita vykazuje klinální pokles směrem k severu a západu, tedy k okraji areálu rozšíření sysla.
- Byl zjištěn náhlý zlom v genetickém složení populací, zhruba odpovídající hranici mezi hercynskou a panonskou částí areálu.
- Populace na lokalitě Albeř (okr. J. Hradec) se v použitých analýzách odděluje od ostatních velmi brzy, což naznačuje její možný původ z rakouských populací obývajících nížiny a přilehlé pahorkatiny kolem Dunaje.
- Podobnosti mezi některými geograficky blízkými populacemi jsou zřejmě důsledkem společného původu (např. Raná a Raná – Hrádek).
- Genetická data potvrdila původ populace na lokalitě Karlovy Vary z jedinců odchycených na lokalitě Olšová Vrata pro účel reintrodukce na lokalitu Vítkův vrch v CHKO Slavkovský les v letech 2000 – 2001.

6. Použitá literatura:

- Ambros M.** 2008: Stav poznania rozšírenia sysľa pasienkového (*Spermophilus citellus*) na Slovensku v rokoch 1996 až 2008. *Lynx*, n.s., 39: 219-233.
- Antolin M. F., Van Horne B., Berger M. D., Jr., Holloway A. K., Roach J. L. & Weeks R. D., Jr.** 2001: Effective population size and genetic structure of a Piute ground squirrel (*Spermophilus mollis*) population. *Canadian Journal of Zoology* 79: 26-34.
- Armitage K. B.** 1981: Sociality as a Life-History Tactic of Ground Squirrels. *Oecologia* 48: 36-49.
- Armitage K. B.** 1991: Social and population dynamics of Yellow-bellied marmots: results from long-term research. *Annual review of Ecology and Systematics* 22: 379-407.
- Armitage K. B.** 1999: Evolution of sociality in marmots. *Journal of Mammalogy* 80: 1-10.
- Baker R. J., Makova K. D. & Chesser R. K.** 1999: Microsatellites indicate a high frequency of multiple paternity in *Apodemus* (Rodentia). *Molecular Ecology* 8: 107-111.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F.** 2004: Logiciel sous Windows (tm) pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions: CNRS UMR. 5000. Université de Montpellier II, Montpellier.
- Biedrzycka A. & Konopiński M. K.** 2008: Genetic variability and the effect of habitat fragmentation in spotted suslik *Spermophilus suslicus* populations from two different regions. *Conservation Genetics* 9: 1211-1221.
- Biedrzycka A. & Radwan J.** 2008: Population fragmentation and major histocompatibility complex variation in the spotted suslik, *Spermophilus suslicus*. *Molecular Ecology* 17: 4801-4811.
- Blumstein D. T. & Armitage K. B.** 1998: Life history consequence of social complexity: a comparative study of ground-dwelling sciurids. *Behavioral Ecology* 9: 8-19.
- Boellstorff D. E., Owings D. H., Penedo M. C. T. & Hersek M. J.** 1994: Reproductive behaviour and multiple paternity of California ground squirrels. *Animal Behaviour* 47: 1057-1064.
- Broders H. G., Mahoney S. P., Montevecchi W. A. & Davidson W. S.** 1999: Population genetic structure and the effect of founder events on the genetic variability of moose, *Alces alces*, in Canada. *Molecular Ecology* 8: 1309-1315.
- Campos J. L., Posada D. & Morán P.** 2006: Genetic variation at MHC, mitochondrial and microsatellite loci in isolated populations of Brown trout (*Salmo trutta*). *Conservation genetics* 7: 515-530.
- Cohas A., Yoccoz N. G., Da Silva A., Goossens B., Allainé D.** 2006: Extra-pair paternity in the monogamous alpine marmot (*Marmota marmota*): the roles of social setting and female mate choice. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 59: 597-605.

- Cornuet J. M. & Luikart G.** 1996: Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014.
- Cremene C., Groza G., Rakosy L., Schileyko A. A., Baur A., Erhardt A. & Baur B.** 2005: Alterations of steppe-like grasslands in eastern Europe: a threat to regional biodiversity hotspots. *Conservation Biology* 19: 1606-1618.
- Da Silva A., Luikart G., Allainé D., Gautier P., Taberlet P. & Pompanon F.** 2003: Isolation and characterization of microsatellites in European alpine marmots (*Marmota marmota*). *Molecular Ecology Notes* 3: 189-190.
- Da Silva A., Luikart G., Yoccoz N. G., Cohas A. & Allainé D.** 2005: Genetic diversity-fitness correlation revealed by microsatellite analyses in European alpine marmots (*Marmota marmota*). *Conservation Genetics* 7: 371-382.
- Davis L. S. & Murie J. O.** 1985: Male territoriality and the mating system of Richardson's ground squirrels (*Spermophilus richardsonii*). *Journal of Mammalogy* 66: 268-279.
- Devillard S., Allainé D., Gaillard J. M. & Pontier D.** 2004: Does social complexity lead to sex-biased dispersal in polygynous mammals? A test on ground-dwelling sciurids. *Behavioral Ecology* 15: 83-87.
- Ersts P. J.** 2011: Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. Available from http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg. Accessed on 2011-4-21.
- Garner A., Rachlow J. L. & Waits L. P.** 2005: Genetic diversity and population divergence in fragmented habitats: Conservation of Idaho ground Squirrels. *Conservation Genetics* 6: 759-774.
- Gondek A., Verduijn M. & Wolff K.** 2006: Polymorphic microsatellite markers for endangered spotted suslik, *Spermophilus suslikus*. *Molecular Ecology Notes* 6: 359-361.
- Goossens B., Graziani L., Waits L. P., Farand E., Magnolon S., Coulon J., Bel M. C., Taberlet P., Allainé D.** 1998: Extra-pair paternity in the monogamous Alpine marmot revealed by nuclear DNA microsatellite analysis. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 43: 281-288.
- Goudet J.** 2001: FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).
- Guillot G., Santos F., & Estoup A.** 2008: Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics* 24: 1406-1407.
- Gündüz İ., Jaarola M., Tez C., Yenyurt C., Polly P. D., Searle J. B.** 2007: Multigenic and morphometric differentiation of ground squirrels (*Spermophilus*, *Sciuridae*, *Rodentia*) in Turkey, with a description of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 916-935.

- Hanslik S. & Kruckenhauser L.** 2000: Microsatellite loci for two European sciurid species (*Marmota marmota*, *Spermophilus citellus*). *Molecular Ecology* 9: 2163-2165.
- Harrison R.G., Bogdanowicz S. M., Hoffmann R. S., Yensen E. & Sherman P. W.** 2003: Phylogeny and Evolutionary History of the Ground Squirrels (Rodentia: Marmotinae). *Journal of Mammalian Evolution* 10: 249-276.
- Haynie M. L., Van Den Bussche R. A., Hoogland J. L. & Gilbert D. A.** 2003: Parentage, multiple paternity, and breeding success in Gunnison's and Utah prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 84: 1244-1253.
- Hedrick P. W. & Kalinowski S. T.** 2000: Inbreeding depression in conservation biology. *Annual review of Ecology and Systematics* 31: 139-162.
- Helgen K. M., Cole F. R., Helgen L. E. & Wilson D. E.** 2009: Genetic revision in the holarctic ground squirrel genus *Spermophilus*. *Journal of Mammalogy* 90: 270-305.
- Herron M. D., Castoe T. A. & Parkinson Ch. L.** 2004: Sciurid phylogeny and the paraphyly of Holarctic ground squirrels (*Spermophilus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31: 1015-1030.
- Hewitt G. M.** 1999: Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-122.
- Hewitt G. M.** 2000: The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hewitt G. M.** 2004: Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B* 359: 183-195.
- Hoogland J. L.** 1981: The evolution of coloniality in white-tailed and black-tailed prairie dogs (Sciuridae: *Cynomys leucurus* and *C. ludovicianus*). *Ecology* 62: 252-272.
- Hoogland J. L.** 1999: Philopatry, dispersal, and social organization of Gunnison's prairie dogs. *Journal of Mammalogy* 80: 243-251.
- Hoogland J. L.** 2001: Black-tailed, Gunnison's, and Utah prairie dogs reproduce slowly. *Journal of Mammalogy* 82: 917-927.
- Hulová Š. & Sedláček F.** 2008: Population genetic of the European ground squirrel in the Czech Republic. *Conservation Genetics* 9: 615-625.
- Hoogland J. L. & Foltz D. W.** 1982: Variance in Male and Female Reproductive Success in harem-Polygynous Mammal, the Black-Tailed Prairie Dog (Sciuridae: *Cynomys ludovicianus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 11: 155-163.
- Chesser R. K.** 1991: Influence of Gene Flow and Breeding Tactics on Gene Diversity Within Populations. *Genetics* 129: 573-583.
- IUCN 2008:** <http://www.iucnredlist.org/apps/redlist/details/20472/0/rangemap>

- Jaarola M., Ratkiewicz M., Ashford R. T., Brunhoff C. & Borkowska A.** 2007: Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the field vole, *Microtus agrestis*, and their cross-utility in the common vole, *Microtus arvalis*. *Molecular Ecology Notes* 7: 1029-1031.
- Jensen J. L., Bohonak A. J. & Kelley S. T.** 2005: Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.16. <http://ibdws.sdsu.edu/>
- Jones R. T., Martin A. P., Mitchell A. J., Collinge S. K. & Ray Ch.** 2005: Characterization of 14 microsatellite markers for the black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*). *Molecular Ecology Notes* 5: 71-73.
- Kalinowski S. T., Taper M. L. & Marshall T. C.** 2007: Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16: 1099-1106.
- Kausrud K. L., Mysterud A., Steen H., Vik J. O., Østbye E., Cazelles B., Framstad E., Eikeset A. M., Mysterud I., Solhøy T. & Stenseth N. Chr.** 2008: Linking climate change to lemming cycles. *Nature* 456: 93-98.
- Kotlík P., Deffontaine V., Mascheretti S., Zima J., Michaux J. R. & Searle J. B.** 2006: A northern glacial refugium for bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103: 14860-14864.
- Kryštufek B., Bryja P. & Bužan E.V.** 2009: Mitochondrial phylogeography of the European ground squirrel, *Spermophilus citellus*, yields evidence on refugia for steppic taxa in the southern Balkans. *Heredity* 103: 129-135.
- Kyle C. J., Karels T. J., Clark B., Strobeck C., Hik D. S. & Davis C. S.** 2004: Isolation and characterization of microsatellite markers in hoary marmots (*Marmota caligrata*). *Molecular Ecology Notes* 4: 749-751.
- Maher Ch. R.** 2006: Social Organization in Woodchucks (*Marmota monax*) and its Relationship to Growing Season. *Ethology* 112: 313-324.
- Maher Ch. R. & Duron M.** 2010: Mating system and paternity in woodchucks (*Marmota monax*). *Journal of Mammalogy* 91: 628-635.
- Manno T. G., Dobson F. S., Hoogland J. L. & Foltz D. W.** 2007: Social group fission and gene dynamics among black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Journal of Mammalogy* 88: 448-456.
- Matějů J., Nová P., Uhlíková J., Hulová Š., & Cepáková E.** 2008: Distribution of the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*) in the Czech Republic in 2002-2008. *Lynx* 39: 277-294.
- Matějů J., Hulová Š., Nová P., Cepáková E., Marhoul P. & Uhlíková J.** 2010a: Záchraný program sysla obecného (*Spermophilus citellus*) v České republice [Action plan for the European Ground Squirrel (*Spermophilus citellus*) in the Czech Republic. Praha: Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. 80pp.

- Matějů J., Řičanová Š., Ambros M., Kala B., Hapl E. & Matějů K.** 2010b: Reintroductions of the European Ground Squirrel (*Spermophilus citellus*) in Central Europe (Rodentia: Sciuridae). *Lynx*, n.s., 41:175-191.
- May B., Gavin T. A., Sherman P. W. & Korves T M.** 1997: Characterization of microsatellite loci in the Northern Idaho ground squirrel *Spermophilus brunneus brunneus*. *Molecular Ecology* 6: 399-400.
- Millesi E., Huber S., Dittami J., Hoffmann I., Daan S.** 1998: Parameters of mating effort and success in male European ground squirrels, *Spermophilus citellus*. *Ethology* 104: 298-313.
- Milton K., Lozier J. D. & Lacey E. A.** 2009: Genetic structure of an isolated population of mantled howler monkeys (*Alouatta palliata*) on Barro Colorado Island, Panama. *Conservation Genetics* 10: 347-358.
- Nei M.** 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Okello J. B. A., Masembe Ch., Rasmussen H. B., Wittemyer G., Omondi P., Kahindi O., Muwanika V. B., Arctander P., Douglas-Hamilton I., Nyakaana S. & Siegismund H. R.** 2008: Population Genetic Structure of Savannah Elephants in Kenya: Conservation and Management Implications. *Journal of Heredity* 99: 443-452.
- Oliveira E. J., Pádua J. G., Zucchi M. I., Vencovsky R. & Carneiro Vieira M. L.** 2006: Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 294-307.
- Peacock M. M., Beard K. H., O'Neill E. M., Kirchoff V. S. & Peters M. B.** 2009: Strong founder effects and low genetic diversity in introduced populations of Coqui frogs. *Molecular Ecology* 18: 3603-3615.
- Pierpaoli M., Biró Z. S., Herrmann M., Hupe K., Fernandes M., Ragni B., Szemethy L. & Randi E.** 2003: Genetic distinction of wildcat (*Felis silvestris*) populations in Europe, and hybridization with domestic cats in Hungary. *Molecular Ecology* 12: 2585-2598.
- Pritchard J. K., Stephens M. & Donnelly P.** 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Roebroeks W., Conard N. J. & van Kolfschoten T.** 1992: Dense forests, cold steppes, and the Paleolithic settlement of northern Europe. *Current Anthropology* 33: 551-567.
- Rousset F.** 2008: GENEPOP ' 007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- Řičanová Š., Bryja J., Cosson J. F., Choleva L., Gedeon C., Ambros M. & Sedláček F.** 2011: Depleted genetic variation of the European ground squirrel in Central Europe in both microsatellites nad major histocompatibility complex gene: implications for conservation. *Conservation Genetics*: DOI 10.1007/s10592-011-0213-1

- Saura M., Caballero P., Caballero A. & Morán P.** 2006: Genetic variation in restored Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) populations in the Ulla and Lerez rivers, Galicia, Spain. *Journal of Marine Science* 63: 1290-1296.
- Schwartz O. A., Armitage K. B. & Van Vuren D.** 1998: A 32-year demography of yellow-bellied marmots (*Marmota flaviventris*). *Journal of Zoology* 246: 337-346.
- Schwartz M. K., Mills L. S., Ortega Y., Ruggiero L. F. & Allendorf F.W.** 2003: Landscape location affects genetic variation of Canada lynx (*Lynx canadensis*). *Molecular ecology* 12: 1807-1816.
- Spitzenberger F.** 2001: Die Säugetierfauna Österreichs. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, 895 pp.
- Steppan S. J., Storz B. L. & Hoffmann R. S.** 2004: Nuclear DNA phylogeny of the squirrels (Mammalia: Rodentia) and the evolution of arboreality from c-myc and RAG1. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30: 703-719.
- Stevens S., Coffin J. & Strobeck C.** 1997: Microsatellite loci in Columbian ground squirrels *Spermophilus columbianus*. *Molecular Ecology* 6: 493-495.
- Thorington R. W., Jr. & Hoffmann R. S.** 2005: Family Sciuridae. Pp: 754 – 818. In: Wilson D. E. & Reeder D. M. (eds.): *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*. 3rd ed., Baltimore: John Hopkins University Press, 2142 pp.
- van Oosterhout C., Hutchinson W. F., Wills D. P. M. & Shipley P.** 2004: Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- van Tuinen M., O'Keefe K., Ramakrishnan U. & Hadly E. A.** 2008: Fire and ice: genetic structure of the Uinta ground squirrel (*Spermophilus armatus*) across the Yellowstone hotspot. *Molecular Ecology* 17: 1776-1788.
- van Tuinen M., Ramakrishnan U. & Hadly E. A.** 2004: Studying the effect of environmental change on biotic evolution: past genetic contributions, current work and future directions. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London A* 362: 2795-2820.
- Webster M. T., Smith N. G. C. & Ellegren H.** 2002: Microsatellite evolution inferred from human-chimpanzee genomic sequence alignments. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 8748-8753.
- Whorley J. R., Alvarez-Castañeda S. T. & Kenagy G. J.** 2004: Genetic structure of desert ground squirrels over a 20-degree-latitude transect from Oregon through the Baja California peninsula. *Molecular Ecology* 13: 2709-2720.
- Wilson D. E. & Reeder D. A.** (eds.) 2005: *Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference*. Baltimore: The Johns Hopkins University Press, 2142 pp.
- Wolff J. O.** 1997: Population regulation in mammals: an evolutionary perspective. *Journal of Animal Ecology* 66: 1-13.

Wolff J. O. 2007: Social biology of rodent (review). *Integrative Zoology* 2: 193-204.

Yensen E. 1991: Taxonomy and distribution of the Idaho ground squirrel, *Spermophilus brunneus*. *Journal of Mammalogy* 72: 583-600.

7. Přílohy

Příloha 1. Délky mikrosatelitových alel. Chybějící data jsou vyznačena nulou.

	ST10		Ssu7		Ssu17		Ssu15		MA066		Ssu13		MS56		IGS-110b		Ssu8		MS41		MA091		Ssu5		Ssu1	
LE-1	123	123	165	167	196	196	188	191	238	238	175	175	114	114	151	151	231	231	197	197	172	172	147	147	210	216
LE-2	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	112	114	142	151	231	231	197	197	172	172	143	147	216	216
LE-4	123	123	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	145	145	231	231	197	197	170	172	143	147	216	216
LE-5	123	123	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	112	114	145	145	231	231	197	197	172	172	143	147	216	216
LE-6	123	123	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	112	114	151	151	231	231	197	197	172	172	143	147	216	216
LE-7	123	123	165	167	196	199	188	188	238	238	175	175	114	114	151	151	231	231	197	197	170	172	147	147	210	210
LE-8	123	123	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	112	114	145	145	231	231	197	197	172	172	143	143	216	216
LE-9	123	123	165	167	196	196	188	191	238	238	175	175	114	114	151	151	231	231	197	197	172	172	143	147	216	216
LE-10	123	123	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	145	151	231	231	197	197	172	172	143	147	216	216
LE-11	123	123	165	167	196	199	191	191	238	238	175	175	112	112	142	145	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
LE-12	123	123	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	112	114	145	151	231	231	197	197	170	172	143	147	210	216
LE-13	123	123	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	145	145	231	231	197	197	170	172	143	147	216	216
LE-14	123	123	165	167	196	196	191	191	238	238	175	175	112	112	142	151	231	231	197	197	170	172	147	147	216	216
LE-15	123	123	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	172	172	143	147	210	216
LE-16	123	123	167	167	196	196	188	191	238	238	175	175	114	114	142	145	231	231	197	197	170	172	147	147	216	216
LE-17	123	123	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	112	112	142	151	231	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LE-18	123	123	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	145	231	231	197	197	170	172	147	147	216	216
LE-19	123	123	165	167	196	199	188	191	238	238	175	175	112	114	142	151	229	229	197	197	170	172	143	147	210	216
LE-20	123	123	165	167	196	199	191	191	238	238	175	175	112	114	142	151	231	231	197	197	170	172	143	147	216	216
TR-1	123	123	165	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	116	151	151	227	231	197	197	170	172	147	147	210	216
TR-2	123	123	165	167	196	199	190	190	238	238	175	175	114	114	151	151	231	231	197	197	170	172	147	147	216	216
TR-3	123	123	165	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	151	151	227	231	197	197	170	172	147	147	216	216
TR-4	123	123	165	165	196	199	190	190	238	238	175	175	114	116	151	151	227	231	197	201	170	170	147	147	210	216
TR-5	123	123	167	167	199	199	190	190	238	238	175	175	112	114	151	151	227	231	197	197	170	170	147	147	216	216

TR-6	123	123	167	167	196	199	190	190	238	238	175	175	114	114	151	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
TR-7	123	123	165	165	196	196	190	190	238	238	175	175	114	114	151	151	227	227	197	201	170	172	147	147	216	216
TR-8	123	123	165	167	199	199	190	0	238	238	175	175	112	114	151	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
TR-9	123	123	165	167	199	199	190	190	238	238	175	175	114	116	151	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
TR-10	123	123	165	165	199	199	190	190	238	238	175	175	112	116	151	151	227	231	197	197	170	172	147	147	210	216
TR-11	123	123	165	165	196	199	190	190	238	238	175	175	112	114	151	151	227	227	197	197	170	170	147	147	210	216
TR-12	123	123	167	167	196	199	190	190	238	242	175	175	112	114	151	151	231	231	197	201	170	172	147	147	216	216
TR-13	123	123	165	167	196	196	190	190	238	238	175	175	114	114	151	151	227	231	197	201	170	172	147	147	210	210
TR-14	123	123	165	167	196	196	188	0	238	242	175	175	114	116	151	151	231	231	197	197	170	172	147	147	210	216
LI-1	123	123	165	167	199	199	191	191	242	242	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	143	147	217	217
KY-1	123	123	167	167	199	199	188	191	238	248	175	175	112	114	142	142	225	229	197	197	172	172	143	143	210	210
KY-2	123	123	167	167	199	199	188	191	248	248	175	175	112	116	142	151	229	233	197	202	170	172	143	147	210	210
KY-3	122	126	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	112	112	142	142	225	231	201	201	172	172	147	147	210	210
KY-4	123	123	165	165	199	199	188	191	238	238	175	175	112	112	142	142	225	231	197	201	152	172	143	143	216	216
KY-5	122	122	165	167	199	199	188	190	238	238	175	175	112	112	142	142	225	229	197	197	172	172	143	147	210	216
KY-6	123	123	167	167	196	196	188	191	238	238	175	175	112	112	142	142	225	229	197	197	172	172	143	147	210	210
KY-7	122	126	167	167	199	199	188	188	238	248	175	175	112	114	142	142	233	233	197	197	172	172	143	143	210	210
KY-8	123	123	165	167	199	199	188	188	238	238	175	175	112	112	142	142	225	229	197	202	172	172	143	147	210	210
KY-9	122	126	167	167	199	199	190	190	238	238	175	175	112	114	142	142	225	231	197	201	172	172	143	143	210	210
KY-10	123	123	165	167	199	199	188	191	238	242	175	175	112	112	142	142	229	233	197	197	152	172	147	147	210	216
KY-11	123	123	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	112	114	142	151	225	229	197	197	172	172	147	147	210	216
KY-12	122	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	172	143	147	210	210
KY-13	123	123	165	165	199	199	188	191	238	242	175	175	112	114	142	142	229	233	197	197	152	172	143	147	210	210
KY-14	123	123	167	167	199	199	188	188	238	242	175	175	112	114	142	142	225	231	197	197	170	172	147	147	210	216
KY-15	122	122	167	167	199	199	188	191	238	248	175	175	112	112	142	142	229	229	197	197	172	172	143	147	210	216
KY-16	123	123	167	167	196	199	191	191	242	242	175	175	112	116	142	142	225	229	201	201	172	172	143	143	216	216
KY-17	123	123	165	167	196	199	188	190	238	238	175	175	112	112	142	142	225	225	197	201	152	172	143	147	216	216
KY-18	123	123	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	112	112	142	151	225	229	197	200	170	170	143	143	210	210
VY-1	123	123	165	165	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	172	172	147	147	210	216

VY-2	123	123	167	167	196	199	188	191	238	240	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	170	172	143	143	210	216
VY-3	123	126	165	167	196	199	188	0	238	240	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	170	172	143	150	216	216
VY-4	123	126	165	167	196	199	188	191	238	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	201	170	170	143	147	210	216
VY-5	123	126	165	165	196	196	188	190	242	242	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	143	150	210	210
VY-6	123	123	165	165	196	199	188	190	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	143	143	210	210
VY-7	123	123	165	165	196	199	188	188	238	242	175	175	114	114	142	142	231	231	197	201	170	170	147	150	210	216
VY-8	123	123	165	165	196	196	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	143	143	210	216
VY-9	123	123	167	167	196	199	188	188	238	240	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	143	143	216	216
VY-10	126	126	165	165	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	143	143	210	216
VY-11	123	126	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	114	116	142	142	231	231	197	197	172	172	143	143	210	210
VY-12	123	123	165	167	196	196	188	190	240	240	175	175	114	114	142	142	227	231	197	201	172	172	143	143	210	216
VY-13	123	126	165	167	196	196	188	190	238	240	175	175	114	114	142	151	225	231	197	197	172	172	143	150	210	210
VY-14	123	126	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	143	143	210	216
VY-15	123	123	165	165	196	199	188	188	238	238	175	175	112	114	142	142	227	231	197	201	152	152	143	143	216	216
VY-16	122	122	165	167	196	196	188	188	238	238	175	175	114	114	142	151	227	231	197	197	170	172	143	143	216	216
VY-17	122	126	165	165	196	196	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	143	147	210	216
VY-18	123	123	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	143	143	210	210
VY-19	122	122	165	167	196	196	188	191	238	238	175	175	114	114	142	151	227	231	197	197	170	172	143	143	216	216
VY-20	123	123	165	165	196	196	188	188	240	240	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	172	172	143	147	210	216
VY-21	123	126	165	165	196	199	190	190	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	152	143	143	216	216
KO-1	123	123	165	167	199	199	191	191	238	242	175	175	108	112	151	151	231	231	197	197	170	172	147	147	210	0
KO-2	123	123	165	165	199	199	191	191	238	242	175	175	108	112	141	151	231	231	197	197	172	172	143	147	210	210
KO-3	123	123	165	167	199	199	191	191	238	242	175	175	108	112	142	142	231	231	197	201	172	172	143	147	216	216
KO-4	123	123	165	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	112	151	151	231	231	197	201	172	172	143	147	210	216
KO-5	123	123	165	167	199	199	191	191	242	242	175	175	112	112	151	151	231	231	197	197	172	172	143	147	210	216
KO-6	122	122	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	112	142	151	231	231	197	197	170	172	147	147	210	210
KO-7	123	123	167	167	199	199	191	191	242	242	175	175	112	112	142	151	231	231	197	197	170	172	143	143	216	216
KO-8	123	123	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	112	151	151	231	231	197	201	170	172	147	147	216	216
KO-9	123	123	167	167	199	199	191	191	242	242	175	175	112	112	151	151	231	231	197	197	170	172	147	147	216	216

KO-10	123	123	165	167	199	199	191	191	242	242	175	175	112	112	142	151	231	231	197	201	170	170	147	147	210	216
KO-11	123	123	165	165	199	199	191	191	238	242	175	175	112	112	142	151	231	231	197	201	170	170	143	143	216	216
KO-12	123	123	165	165	199	199	191	191	242	242	175	175	112	112	151	151	231	231	197	197	170	172	147	147	210	216
KO-13	123	123	165	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	112	142	151	231	231	197	197	172	172	143	147	216	216
KO-14	123	123	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	112	151	151	231	231	197	197	170	172	147	147	210	216
KO-15	123	123	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	112	151	151	231	231	197	197	170	172	143	147	210	216
KO-16	122	122	165	165	199	199	191	191	242	242	175	175	108	112	142	151	231	231	197	197	170	172	143	143	216	216
KO-17	122	122	165	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	112	142	151	231	231	197	197	170	172	143	147	216	216
LO-1	123	123	165	167	196	199	191	191	238	238	175	175	116	116	151	151	227	231	197	197	170	170	147	147	216	216
LO-2	123	123	165	165	196	199	188	188	238	238	175	175	116	116	142	151	227	233	197	197	170	170	147	147	216	216
LOD-2	123	126	167	167	196	199	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-3	123	126	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-4	123	126	167	167	196	196	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-5	126	126	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-6	123	123	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-7	126	126	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-10	126	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-13	123	123	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	170	172	147	147	210	216
LOD-14	126	126	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-15	123	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	170	170	147	147	216	216
LOD-16	123	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	200	200	172	172	147	147	216	216
LOD-17	126	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	170	172	147	147	216	216
LOD-18	123	126	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	170	172	147	147	216	216
LOD-19	123	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	112	114	142	142	227	231	197	200	170	172	147	147	216	216
LOD-20	126	126	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-21	123	123	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-22	123	126	167	167	199	199	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-23	123	126	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	170	170	147	147	216	216
LOD-24	126	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	170	147	147	216	216

LOD-25	123	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-26	123	123	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	200	170	172	147	147	216	216
LOD-27	123	126	167	167	199	199	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	170	172	147	147	210	216
LOD-28	123	123	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	170	172	147	147	216	216
LOD-29	123	126	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	200	170	172	147	147	216	216
LOD-30	123	123	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	112	114	142	142	227	231	197	197	170	170	147	147	216	216
LOD-31	123	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	170	172	147	147	216	216
LOD-32	126	126	167	167	196	196	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-33	123	126	167	167	199	199	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-34	123	126	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
LOD-35	123	126	167	167	196	199	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-36	123	123	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	210	210
LOD-37	123	123	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	170	172	147	147	210	216
LOD-38	123	123	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	170	172	147	147	210	216
LOD-39	123	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-40	123	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	170	172	147	147	210	216
LOD-42	123	126	167	167	196	199	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-43	123	126	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-44	123	123	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	170	170	147	147	210	210
LOD-45	126	126	167	167	199	199	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-46	123	126	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	200	172	172	147	147	216	216
LOD-47	123	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	172	172	147	147	216	216
LOD-49	123	126	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	170	170	147	147	216	216
LOD-50	123	126	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	152	147	147	210	216
LOD-51	123	126	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	172	147	147	216	216
LOD-52	123	123	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	152	152	147	147	210	216
LOD-53	123	126	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	152	172	147	147	216	216
LOD-54	123	126	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	150	152	147	147	210	216
LOD-55	123	123	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	172	147	147	210	216

JA-1	123	123	165	167	199	199	188	188	238	238	175	175	116	116	151	151	231	231	197	197	170	172	147	147	216	216
JA-2	122	122	165	167	196	199	188	188	238	248	175	175	116	116	151	151	231	231	197	197	170	170	143	147	216	216
JA-3	123	123	165	167	196	196	188	188	238	238	175	175	114	116	151	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
JA-4	122	122	165	165	196	196	188	188	238	238	175	175	114	116	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
JA-5	123	123	165	165	196	199	188	188	242	248	175	175	116	116	151	151	231	231	197	197	170	172	147	147	216	216
JA-6	123	123	165	165	196	196	188	188	248	248	175	175	116	116	142	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
JA-7	123	123	165	165	196	196	188	188	238	238	175	175	116	116	151	151	231	231	197	197	170	170	143	147	216	216
JA-8	123	123	165	165	199	199	188	188	248	248	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
JA-9	123	123	167	167	196	196	188	188	248	248	175	175	114	116	151	151	231	231	197	197	170	170	147	147	210	216
JA-10	123	123	165	165	196	199	188	188	238	248	175	175	114	116	151	151	231	231	197	197	170	170	143	147	216	216
JA-11	122	122	165	165	199	199	188	188	248	248	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
JA-12	123	123	165	165	196	196	188	188	238	248	175	175	116	116	151	151	231	231	197	197	170	170	143	147	216	216
JA-13	122	122	165	165	196	196	188	188	238	238	175	175	114	114	151	151	231	231	197	197	150	152	147	147	216	216
JA-14	123	123	165	165	196	196	188	188	238	238	175	175	114	116	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
JA-15	122	122	165	167	196	199	188	188	238	248	175	175	114	116	142	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
JA-16	122	122	167	167	196	199	188	188	238	248	175	175	114	116	142	142	231	231	197	197	170	170	143	147	216	216
JA-17	122	122	167	167	196	199	188	188	248	248	175	175	114	116	142	151	231	231	197	197	170	170	143	143	216	216
JA-18	122	122	165	165	196	199	188	188	238	248	175	175	116	116	142	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
JA-19	122	122	165	167	196	199	188	188	238	238	175	175	116	116	151	151	231	231	197	197	170	170	143	147	216	216
JA-20	122	122	165	167	196	196	188	188	238	238	175	175	116	116	142	142	231	231	197	197	150	152	143	147	216	216
JA-21	123	123	165	165	196	199	188	188	238	248	175	175	114	114	151	151	231	231	197	197	170	170	143	147	217	217
JA-22	122	122	165	167	196	196	188	188	238	248	175	175	116	116	142	151	231	231	197	197	170	170	143	147	217	217
ST-1	123	123	167	167	199	199	188	188	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	202	202	168	170	143	147	217	217
ST-2	123	123	167	167	196	199	188	191	238	242	175	175	114	114	142	142	231	231	201	201	170	170	147	147	216	216
ST-3	123	123	167	167	199	199	188	191	238	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	202	170	170	147	147	216	216
ST-5	123	123	167	167	199	199	188	191	238	242	175	175	114	114	142	142	231	231	197	202	170	170	147	147	216	216
ST-6	123	123	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	202	202	170	170	147	147	216	216
ST-7	123	123	167	167	199	199	188	191	238	242	175	175	114	114	142	142	231	231	202	202	170	170	147	147	216	216
ST-8	123	123	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	202	202	170	170	143	147	216	216

ST-9	123	123	167	167	196	199	188	191	238	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	202	168	170	147	147	216	216
ST-10	123	123	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	201	170	170	147	147	216	216
ST-11	123	123	167	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	202	170	170	147	147	216	216
DE-1	123	123	165	167	199	199	188	191	240	242	175	175	114	116	142	151	231	231	197	201	170	170	143	147	210	216
DE-2	123	123	165	167	199	199	188	191	238	242	175	175	114	114	151	151	231	231	197	201	170	170	143	143	216	216
DE-3	123	123	165	167	199	199	188	188	242	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	201	152	152	143	147	210	216
DE-4	123	123	165	167	199	199	188	191	238	240	175	175	112	114	151	151	231	231	201	201	152	170	147	147	210	216
DE-5	123	123	165	165	199	199	188	188	242	242	175	175	114	116	151	151	231	231	197	197	152	170	143	147	216	216
DE-6	123	123	165	165	199	199	188	191	238	242	175	175	114	116	151	151	231	231	197	197	152	170	143	147	216	216
DE-7	123	123	165	167	199	199	188	188	238	242	175	175	114	116	142	151	231	231	197	201	152	152	143	147	210	216
DE-8	123	123	165	167	199	199	188	191	240	242	175	175	114	116	151	151	231	231	197	201	152	170	143	143	216	216
DE-9	123	123	165	165	199	199	188	188	238	242	175	175	114	114	151	151	231	231	197	201	150	152	143	147	216	216
DE-10	123	123	165	165	199	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	201	152	152	143	143	210	216
DE-11	123	123	165	165	199	199	191	191	238	238	175	175	112	116	142	151	231	231	197	201	152	170	143	143	210	216
DE-12	123	123	167	167	199	199	188	191	238	242	175	175	112	114	142	151	231	231	197	201	152	152	143	143	216	216
DE-13	123	123	165	167	199	199	191	191	240	242	175	175	112	114	151	151	231	231	197	197	170	172	143	147	216	216
DE-14	123	123	165	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	151	231	231	197	201	152	170	143	143	210	216
DE-15	123	123	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	116	151	151	231	231	197	201	170	170	143	147	216	216
IV-1	123	123	165	167	199	199	188	190	238	238	175	175	112	116	151	151	231	231	197	197	170	172	143	147	210	216
IV-2	123	123	165	167	196	199	188	191	238	238	175	175	112	112	151	151	231	231	203	203	172	172	147	147	210	216
IV-3	123	123	165	167	199	199	190	190	238	238	175	175	112	116	151	151	231	231	197	203	172	172	147	147	210	210
IV-4	123	123	165	167	196	199	191	191	238	238	175	175	112	116	151	151	231	231	197	203	172	172	147	147	216	216
IV-5	123	123	165	165	196	196	188	191	238	238	175	175	112	112	151	151	231	231	197	203	172	172	147	147	210	216
KV-1	123	123	167	167	196	196	191	191	242	242	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
KV-2	126	126	167	167	196	196	191	191	242	242	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	217	217
KV-3	123	126	167	167	196	196	191	191	248	248	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	217	217
KV-4	123	126	167	167	196	196	191	191	242	248	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	217	217
KV-5	123	126	165	167	196	196	191	191	242	248	175	175	114	114	130	142	231	231	197	197	170	170	147	147	217	217
KV-6	123	123	167	167	196	196	191	191	248	248	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216

BE-7	123	123	165	167	199	199	188	188	242	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	150	152	147	147	210	0
BE-8	123	123	167	167	199	199	188	190	242	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	170	170	147	147	217	217
BE-9	123	123	167	167	199	199	188	190	242	242	175	175	114	114	142	151	227	231	197	201	170	170	147	147	217	217
BE-11	123	123	167	167	199	199	190	190	242	242	175	175	114	114	139	151	227	231	197	201	152	170	147	147	217	217
BE-13	123	123	165	167	199	199	188	188	242	242	175	175	114	114	142	151	227	231	197	197	150	152	147	147	210	217
BE-14	123	123	167	167	199	199	188	190	242	242	175	175	114	114	139	151	231	231	201	201	152	170	147	147	217	217
BE-16	123	123	167	167	199	199	188	188	242	242	175	175	114	114	151	151	231	231	197	201	152	170	147	147	210	217
BE-17	123	126	165	167	199	199	190	190	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	197	201	152	152	147	147	217	217
BE-19	123	123	165	165	199	199	190	190	238	242	175	175	112	114	151	151	231	231	201	201	152	152	147	147	217	217
BE-20	123	123	165	167	199	199	190	190	238	242	175	175	112	114	151	151	231	231	197	201	152	152	147	147	217	217
BE-21	123	126	167	167	199	199	188	190	242	242	175	175	112	114	142	151	231	231	201	201	152	152	147	147	210	217
BE-24	123	126	165	165	199	199	188	190	242	242	175	175	114	114	151	151	227	231	197	200	152	170	147	147	217	217
ME-1	123	123	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	152	147	147	216	216
ME-2	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	152	147	147	210	216
ME-3	123	123	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	233	233	197	202	150	152	147	147	210	210
ME-4	123	123	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	152	147	147	210	216
ME-5	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	150	152	147	147	216	216
ME-6	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	231	233	197	197	152	152	147	147	216	216
ME-7	122	122	167	167	196	199	190	190	238	242	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	152	147	147	216	216
ME-8	123	123	167	167	196	196	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	152	147	147	210	216
ME-9	122	122	167	167	196	196	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	231	233	197	197	152	152	147	147	210	216
ME-10	123	123	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	152	147	147	210	216
ME-11	123	123	167	167	196	199	190	190	238	238	175	175	114	116	142	142	233	233	197	197	150	152	147	147	210	216
ME-12	123	123	167	167	196	196	191	191	242	242	175	175	116	116	142	151	233	233	197	197	152	152	147	147	210	216
ME-13	123	123	167	167	196	196	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	150	152	147	147	210	210
ME-14	123	123	167	167	196	196	190	190	238	242	175	175	114	114	142	142	231	233	197	197	152	152	147	147	210	216
ME-15	122	122	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	152	147	147	210	216
ME-16	122	122	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	150	152	147	147	210	216
ME-17	122	122	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	152	147	147	210	216

ME-18	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	152	152	147	147	216	216
ME-19	123	123	167	167	196	196	191	191	242	242	175	175	114	114	142	142	233	233	197	197	150	152	147	147	210	216
ME-20	122	122	167	167	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	231	233	197	197	152	152	147	147	210	210
BO-1	123	123	165	165	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	231	233	201	201	152	152	150	150	210	216
BO-2	123	123	165	165	196	199	191	191	238	240	175	175	114	114	142	142	231	233	197	201	152	152	147	147	216	216
BO-3	123	123	165	165	196	199	191	191	242	242	175	175	114	114	151	151	231	233	201	201	152	152	147	147	210	216
BO-4	123	123	165	165	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	151	231	231	201	201	152	152	147	147	210	216
BO-5	123	123	165	165	196	199	191	191	238	240	175	175	114	114	151	151	231	233	201	201	150	152	147	150	216	216
BO-6	123	123	165	165	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	201	201	152	152	147	150	210	210
BO-7	123	123	165	165	196	196	191	191	238	240	175	175	114	114	142	151	231	233	201	201	150	152	147	150	216	216
BO-8	123	123	165	165	199	199	191	191	238	240	175	175	114	114	151	151	231	233	197	201	150	152	147	150	210	210
BO-9	123	123	165	165	196	196	191	191	238	242	175	175	114	114	151	151	233	233	201	201	152	152	147	150	210	216
BO-10	123	123	165	165	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	231	231	201	201	150	152	147	150	210	216
BO-11	123	123	165	165	196	196	190	0	238	238	175	175	114	114	142	151	231	233	197	201	150	152	147	147	216	216
BO-12	123	123	165	165	196	196	191	191	240	242	175	175	114	114	142	151	231	233	201	201	152	152	147	147	216	216
BO-13	123	123	165	165	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	151	151	231	233	197	201	152	152	147	150	210	210
BO-14	123	123	165	165	196	196	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	231	233	201	201	152	152	147	150	210	216
BO-15	123	123	165	165	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	151	151	233	233	197	201	152	152	147	147	216	216
BO-16	123	123	165	165	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	151	151	231	231	201	201	152	152	147	147	210	216
BO-17	123	123	165	165	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	233	233	201	201	152	152	150	150	216	216
BO-18	123	123	165	165	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	233	233	201	201	152	152	147	150	216	216
BO-19	123	123	165	165	196	196	191	191	238	238	175	175	114	114	142	151	233	233	201	201	150	152	147	147	210	216
BO-20	123	123	165	165	196	196	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	231	233	201	201	152	152	147	147	216	216
BO-21	123	123	165	165	196	196	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	231	233	197	201	152	152	147	147	210	216
NŘ-1	122	122	167	167	196	196	188	188	248	248	175	175	116	116	142	151	231	231	197	200	170	172	147	147	216	216
NŘ-2	123	123	165	167	199	199	188	188	238	238	175	175	116	116	142	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
NŘ-3	122	122	165	165	196	199	188	188	238	238	175	175	114	116	151	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
NŘ-4	123	123	165	165	196	199	188	188	238	238	175	175	116	116	142	151	231	231	197	197	152	170	147	147	216	216
NŘ-5	123	123	165	165	196	199	188	188	238	248	175	175	116	116	142	142	231	231	197	200	152	170	147	147	216	216

NŘ-6	123	123	165	165	196	199	188	188	238	248	175	175	116	116	151	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
NŘ-7	123	123	165	165	196	199	188	188	238	238	175	175	114	116	142	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
NŘ-8	123	123	165	167	196	199	188	188	238	248	175	175	116	116	151	151	231	231	197	197	152	170	147	147	216	216
NŘ-9	123	123	165	165	196	199	188	188	238	238	175	175	114	116	151	151	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
NŘ-10	123	123	165	167	196	199	188	188	238	238	175	175	116	116	151	151	231	233	197	197	170	170	147	147	216	216
NŘ-11	123	123	165	167	199	199	188	188	238	248	175	175	116	116	142	142	231	231	197	197	152	170	147	147	216	216
NŘ-12	122	122	165	165	199	199	188	188	238	238	175	175	116	116	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
NŘ-13	123	123	165	167	196	196	188	188	238	248	175	175	116	116	142	151	231	231	197	197	152	170	147	147	216	216
NŘ-14	122	122	167	167	196	196	188	188	238	248	175	175	116	116	142	151	231	231	197	200	170	170	147	147	216	216
HR-1	123	123	165	167	199	199	188	191	238	238	175	175	112	114	142	151	231	233	201	202	152	172	147	147	210	210
HR-2	123	126	165	167	196	196	191	191	238	238	175	175	112	116	142	142	231	233	197	201	170	172	147	147	210	210
HR-3	123	126	167	167	199	199	188	190	238	248	175	175	114	114	142	151	227	227	201	201	152	152	147	147	210	210
HR-4	123	123	167	167	196	199	190	190	238	238	175	175	114	116	142	142	227	231	201	202	150	152	147	147	210	210
HR-5	123	123	165	165	196	196	188	191	238	242	175	175	112	112	151	151	231	231	201	201	152	152	147	147	210	216
HR-6	123	123	165	167	199	199	188	190	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	201	202	152	152	147	147	210	210
HR-7	123	123	165	167	199	199	188	190	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	201	201	170	172	147	147	210	210
HR-8	122	122	165	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	151	227	231	201	202	152	152	147	147	210	210
HR-9	123	123	165	167	199	199	191	191	238	238	175	175	112	114	142	151	227	233	201	201	152	152	147	147	210	210
HR-10	122	122	165	167	199	199	191	191	242	242	175	175	112	114	142	142	227	231	201	202	152	172	147	147	210	210
VP-1	123	123	167	167	196	196	191	191	238	242	175	175	112	114	148	151	227	231	197	202	152	172	147	150	216	216
VP-2	123	123	165	167	196	199	188	191	238	238	175	175	112	112	142	151	227	231	197	202	172	172	147	150	210	210
VP-3	123	123	165	167	196	196	191	191	238	242	175	175	114	116	142	148	227	231	202	202	152	172	147	150	216	216
VP-4	123	123	165	165	196	199	188	191	242	242	175	175	112	114	151	151	227	227	202	202	152	172	150	150	216	216
VP-5	123	123	165	167	196	196	191	191	238	242	175	175	114	116	142	148	231	231	202	202	152	172	147	150	216	216
VP-6	123	123	165	167	196	196	191	191	238	242	175	175	112	112	148	151	227	231	197	197	152	172	147	150	210	216
VP-7	123	123	165	167	196	196	191	191	238	242	175	175	114	116	142	142	231	231	197	197	172	172	147	150	210	216
HO-1	123	126	167	167	196	199	188	191	248	248	175	175	112	112	142	142	231	231	197	197	172	172	147	147	216	216
HO-2	126	126	167	167	196	196	188	191	248	248	175	175	112	112	142	142	231	231	197	197	172	172	147	147	216	216
RL-1	123	123	167	167	196	196	190	190	238	242	175	175	114	114	151	151	227	231	197	197	152	152	147	147	216	216

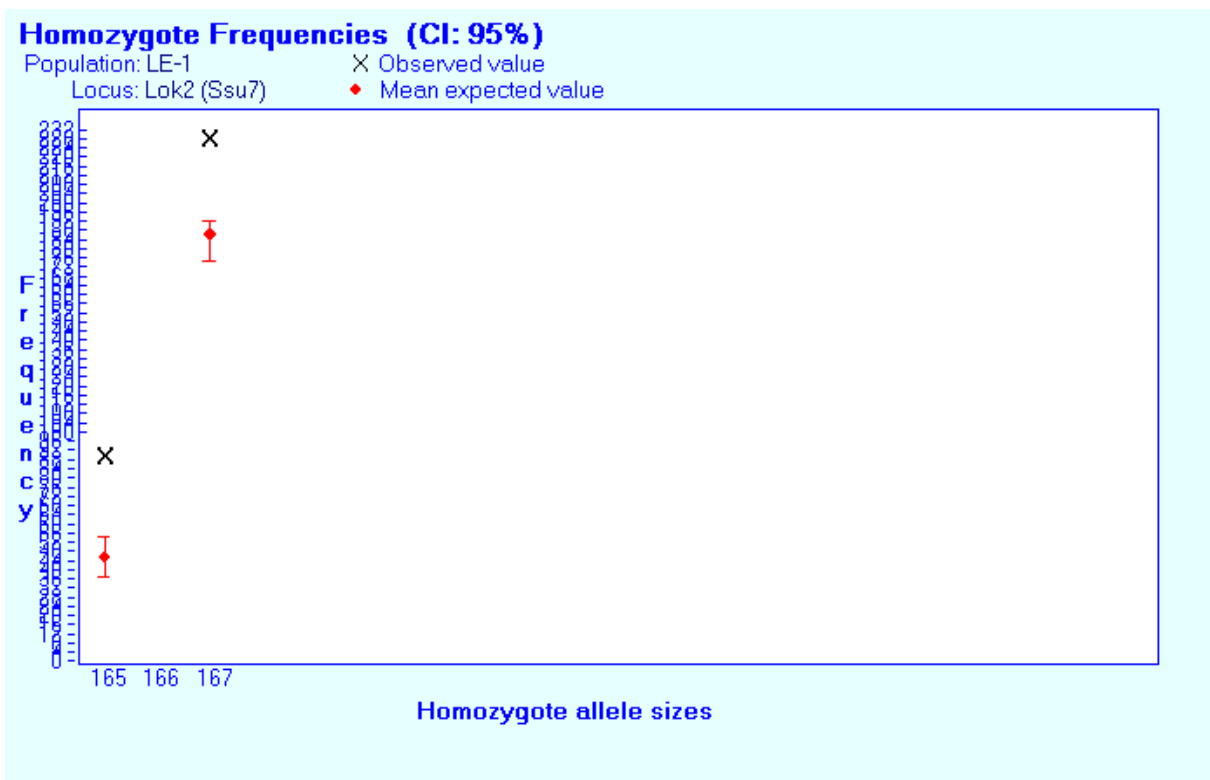
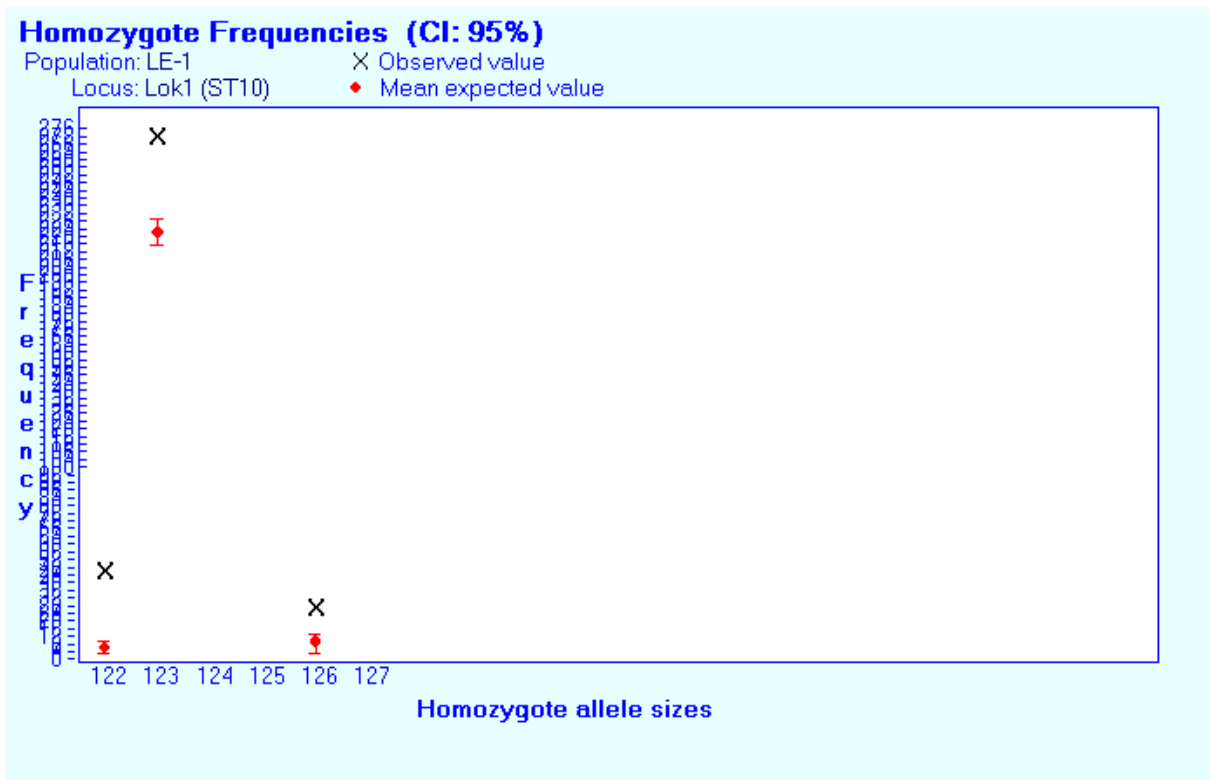
RL-2	123	123	167	167	196	196	190	190	238	242	175	175	114	114	142	151	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-3	123	123	167	167	196	199	190	190	238	238	175	175	112	114	142	151	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-4	123	123	167	167	199	199	190	190	238	242	175	175	114	114	151	151	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-5	123	123	167	167	196	196	190	190	242	242	175	175	112	114	142	142	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-6	123	123	165	167	196	199	190	190	238	242	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-7	123	123	165	167	196	196	190	190	242	242	175	175	114	114	142	142	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-8	123	123	167	167	196	199	190	190	238	242	175	175	114	114	151	151	227	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-9	123	123	167	167	196	199	190	190	238	242	175	175	112	114	142	151	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-10	123	123	167	167	196	196	190	190	240	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	150	152	147	147	216	216
RL-11	123	123	165	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-12	123	123	167	167	196	196	190	190	238	238	175	175	112	114	142	142	227	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-13	123	123	165	167	196	196	190	190	238	242	175	175	112	114	142	142	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-14	123	123	167	167	196	199	190	190	242	242	175	175	114	114	151	151	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-15	123	123	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	151	151	227	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-16	123	123	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	151	227	231	197	197	150	152	147	147	216	216
RL-17	123	123	165	167	196	199	188	190	238	242	175	175	112	114	142	142	227	231	197	197	150	152	147	147	216	216
RL-18	123	123	167	167	196	199	190	190	242	242	175	175	114	114	151	151	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-19	123	123	165	167	196	196	190	190	238	242	175	175	112	114	142	142	227	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-20	123	123	167	167	196	196	190	190	242	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-21	123	123	167	167	196	199	190	190	238	238	175	175	112	114	142	142	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-22	123	123	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	114	142	151	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-23	123	123	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	151	227	227	197	197	152	152	147	147	216	216
RL-24	123	123	167	167	196	199	190	190	238	242	175	175	114	114	142	151	227	227	197	197	150	152	147	147	216	216
RH-1	123	123	167	167	196	199	191	191	242	242	175	175	116	116	142	151	231	231	201	202	152	170	147	147	216	216
RH-3	123	123	165	167	196	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	142	227	231	197	201	152	174	147	147	216	216
RH-4	123	123	167	167	196	196	191	191	238	242	175	175	114	116	142	142	231	231	197	201	152	152	147	147	216	216
RH-5	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	227	231	197	197	152	170	147	147	210	216
RH-6	123	123	167	167	196	196	191	191	238	242	175	175	114	116	142	142	231	231	197	197	152	170	147	147	210	216
RH-7	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	116	142	142	231	231	197	201	152	152	147	147	210	216

RH-8	123	123	167	167	196	199	188	190	238	238	175	175	114	116	142	142	231	231	197	197	152	152	147	147	210	210
RH-9	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	227	227	197	197	152	152	147	147	210	216
RH-10	123	123	167	167	196	199	188	190	238	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	170	147	147	216	216
RH-11	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	116	142	142	227	231	197	201	152	152	147	147	210	216
RH-12	123	123	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	151	231	231	197	201	152	174	147	147	210	216
RH-13	123	123	167	167	196	199	191	191	242	242	175	175	114	116	142	142	227	231	202	202	152	172	147	147	217	217
RH-14	123	126	167	167	196	199	190	190	238	242	175	175	114	116	142	151	227	231	197	197	152	172	147	147	216	216
RH-15	123	123	167	167	199	199	191	191	242	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RH-16	123	123	167	167	196	199	191	191	242	242	175	175	114	116	142	151	227	231	197	201	152	172	147	147	216	216
RH-17	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	197	152	152	147	147	210	216
RH-18	123	123	167	167	199	199	191	191	242	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	152	172	147	147	210	216
RH-19	123	123	165	167	196	196	190	190	238	238	175	175	114	114	142	142	227	227	197	201	172	174	147	147	216	216
RH-20	123	123	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	151	227	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RH-21	123	123	167	167	199	199	188	190	238	242	175	175	114	114	142	151	227	233	201	201	152	172	147	147	216	216
RH-22	123	126	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	227	231	197	201	152	152	147	147	216	216
RA-1	123	123	167	167	196	199	188	188	238	242	175	175	112	114	142	151	231	231	197	197	152	172	147	147	216	216
RA-2	126	126	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	150	152	147	147	216	216
RA-3	123	126	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	114	151	151	231	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RA-4	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	152	172	147	147	216	216
RA-5	123	123	167	167	196	199	191	191	242	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	201	172	174	147	147	216	216
RA-6	123	126	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	152	152	147	147	216	216
RA-7	123	123	167	167	199	199	188	191	238	238	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	150	152	147	147	216	216
RA-8	123	123	167	167	199	199	188	190	238	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	152	172	147	147	216	216
RA-9	123	123	167	167	196	199	188	191	242	242	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	168	172	147	147	216	216
RA-10	123	123	167	167	199	199	190	190	242	242	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	172	174	147	147	216	216
RA-11	123	123	167	167	196	196	191	191	242	242	175	175	114	114	142	142	227	231	197	201	152	172	147	147	216	216
RA-12	123	123	167	167	199	199	191	191	242	242	175	175	112	114	142	142	231	231	197	201	152	152	147	147	216	216
RA-13	123	123	167	167	196	199	188	191	242	242	175	175	114	114	142	151	227	231	197	197	172	174	147	147	216	216
RA-14	123	123	167	167	196	199	191	191	238	238	175	175	114	116	142	142	231	231	197	197	152	152	147	147	216	216

RA-15	123	123	167	167	196	199	191	191	238	242	175	175	112	114	142	142	231	231	197	201	152	152	147	147	216	216
RA-16	123	123	167	167	196	196	188	188	242	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	172	172	147	147	216	216
RA-17	123	123	167	167	196	199	190	190	242	242	175	175	112	114	142	142	231	231	197	197	152	172	147	147	216	216
RA-18	123	123	167	167	199	199	188	190	242	242	175	175	114	114	142	151	231	231	197	197	172	174	147	147	216	216
OV-1	123	126	167	167	196	196	191	191	242	248	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
OV-2	126	126	167	167	196	196	191	191	238	248	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
OV-3	126	126	167	167	196	196	191	191	248	248	175	175	114	114	142	142	231	231	197	197	170	170	147	147	216	216
MO-1	123	123	165	165	199	199	188	188	248	248	175	175	114	116	142	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-2	123	123	165	165	196	196	188	188	248	248	175	175	116	116	142	142	231	231	197	201	172	172	147	147	216	216
MO-3	123	123	165	167	199	199	188	188	238	248	175	175	114	116	142	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	216
MO-4	123	123	165	165	199	199	188	188	238	248	175	175	114	114	142	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-5	123	123	165	167	199	199	188	188	238	248	175	175	114	116	151	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-6	123	123	165	165	199	199	188	188	238	238	175	175	114	114	142	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-7	122	122	165	165	199	199	188	188	248	248	175	175	114	114	142	142	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-8	123	123	165	167	199	199	188	188	248	248	175	175	114	116	142	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-9	123	123	165	165	199	199	188	191	248	248	175	175	114	114	142	142	231	231	201	201	172	172	147	147	210	216
MO-10	122	122	165	165	199	199	188	188	248	248	175	175	114	116	142	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-11	122	122	165	165	196	196	188	188	248	248	175	175	114	116	142	142	231	231	201	201	172	172	147	147	210	216
MO-12	123	123	165	167	199	199	188	188	248	248	175	175	114	116	151	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-13	123	123	165	165	199	199	188	188	238	248	175	175	114	116	142	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-14	122	122	165	165	199	199	188	188	248	248	175	175	116	116	142	142	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-15	123	123	165	165	199	199	188	190	238	248	175	175	114	116	142	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-16	123	123	165	165	199	199	188	188	248	248	175	175	114	116	142	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
MO-17	122	122	165	165	199	199	188	188	238	248	175	175	116	116	142	151	231	231	201	201	170	172	147	147	210	210
MO-18	123	123	165	165	199	199	188	188	248	248	175	175	116	116	151	151	231	231	201	201	172	172	147	147	210	210
BI2-1	123	123	165	165	196	196	188	188	238	238	175	175	114	116	151	151	231	233	197	200	168	170	147	147	216	216
AL-1	122	122	167	167	199	199	191	191	242	242	175	175	112	114	151	151	225	227	200	200	152	152	147	147	210	210
AL-2	122	122	167	167	199	199	191	191	242	242	175	175	112	112	142	151	225	225	200	200	152	152	147	147	210	210
AL-3	122	122	165	167	199	199	191	191	238	242	175	175	112	114	151	151	225	225	200	200	152	152	147	147	210	210

AL-4	122	122	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	112	114	142	151	225	225	200	200	152	152	147	147	210	210
AL-5	122	122	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	114	114	151	151	225	225	200	200	150	152	147	147	210	210
AL-6	122	122	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	151	151	225	225	200	200	152	152	147	147	210	210
AL-7	122	122	167	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	151	151	225	225	200	200	152	152	147	147	210	210
AL-8	122	122	165	167	199	199	191	191	238	238	175	175	114	114	151	151	225	225	200	200	152	152	147	147	210	210
AL-9	122	122	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	225	225	200	200	150	152	147	147	210	210
AL-10	122	122	167	167	199	199	191	191	238	242	175	175	114	114	142	151	225	225	200	200	152	152	147	147	210	210
HU-2	123	123	165	167	199	199	191	191	242	242	175	175	114	114	142	145	227	231	197	200	172	172	147	150	210	216
HU-5	122	122	165	165	199	199	188	190	242	242	175	175	112	112	142	151	231	231	197	197	168	168	147	147	210	216
HU-13	122	127	165	165	199	199	191	191	242	248	175	175	114	116	142	151	225	225	197	200	172	172	150	150	210	210

Příloha 2. Porovnání pozorované a očekávané frekvence homozygotů v programu Micro-Checker.



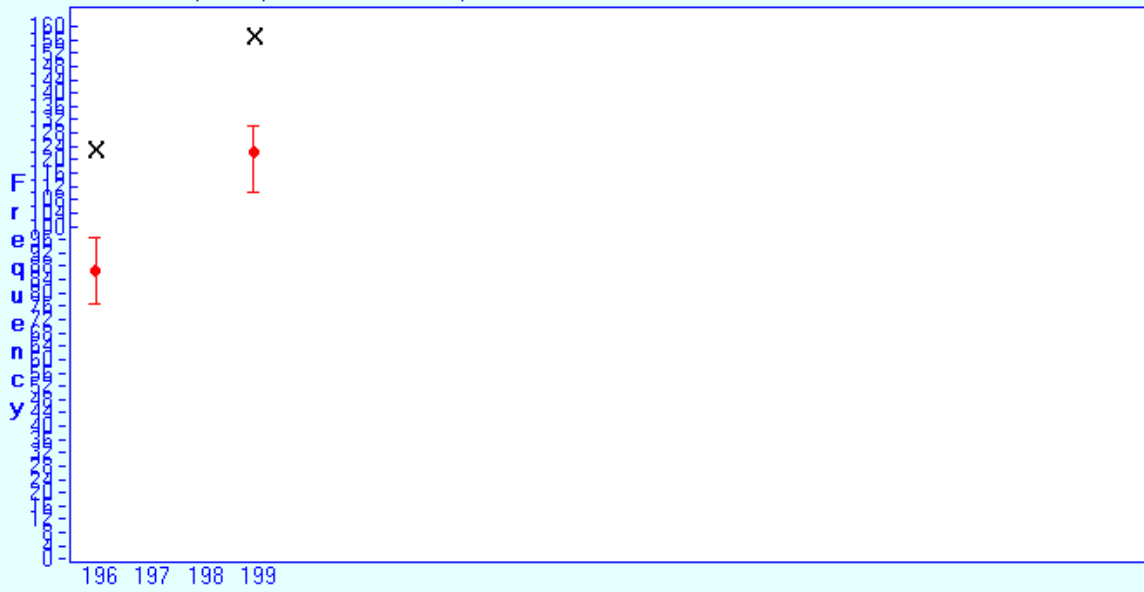
Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: LE-1

Locus: Lok3 (Ssu17)

X Observed value

• Mean expected value



Homozygote allele sizes

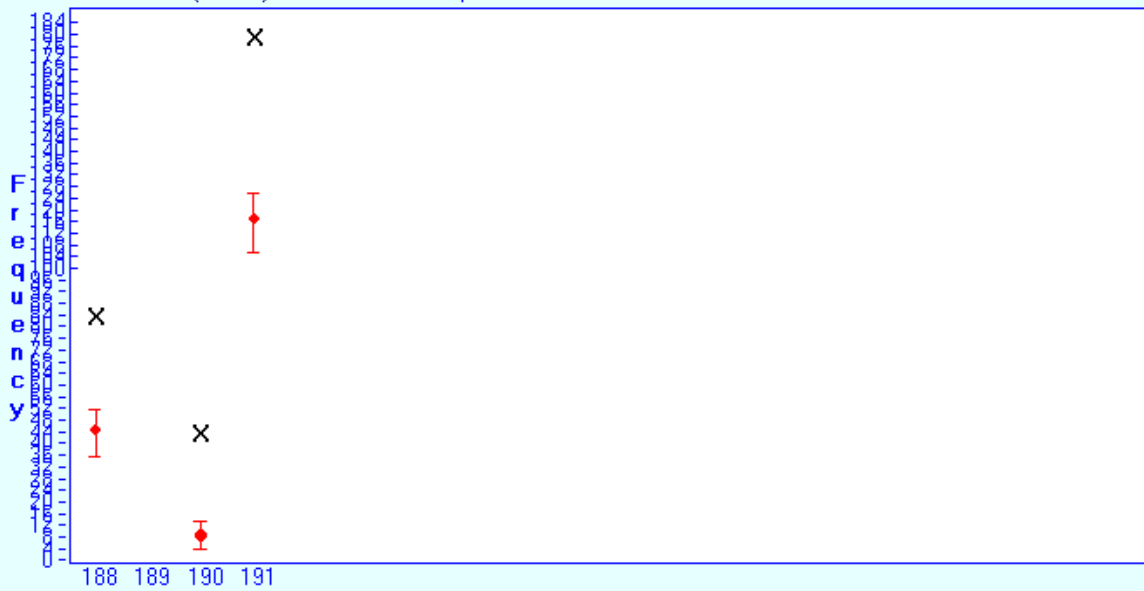
Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: LE-1

Locus: Lok4 (Ssu15)

X Observed value

• Mean expected value



Homozygote allele sizes

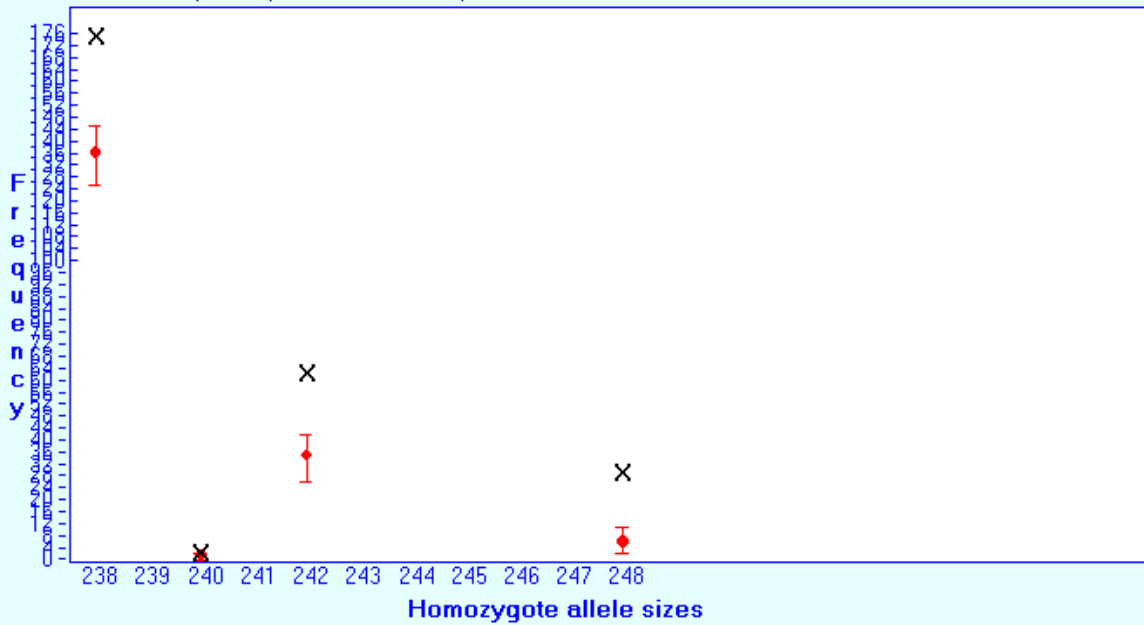
Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: LE-1

X Observed value

Locus: Lok5 (MA066)

• Mean expected value



Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: LE-1

X Observed value

Locus: Lok6 (Ssu13)

• Mean expected value



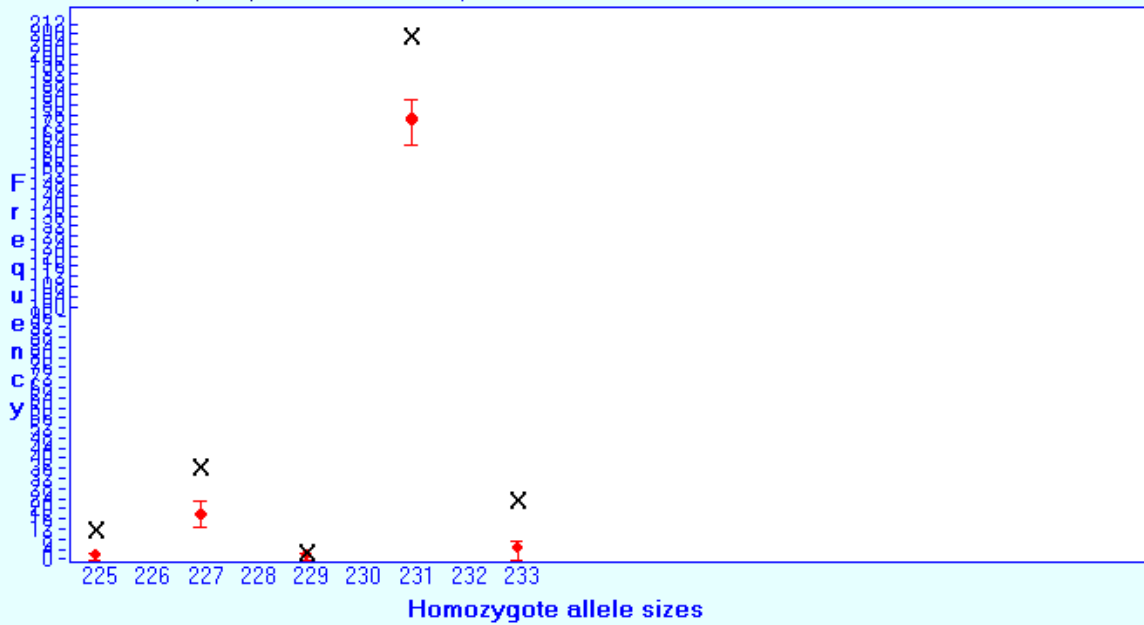
Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: LE-1

Locus: Lok9 (Ssu8)

X Observed value

• Mean expected value



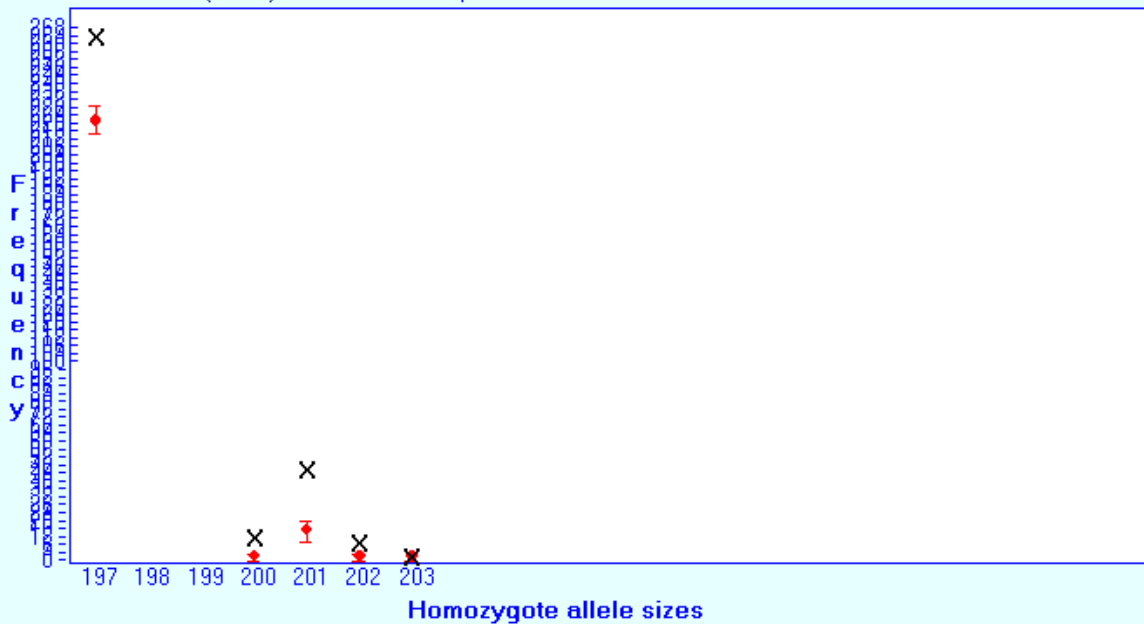
Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: LE-1

Locus: Lok10 (MS41)

X Observed value

• Mean expected value



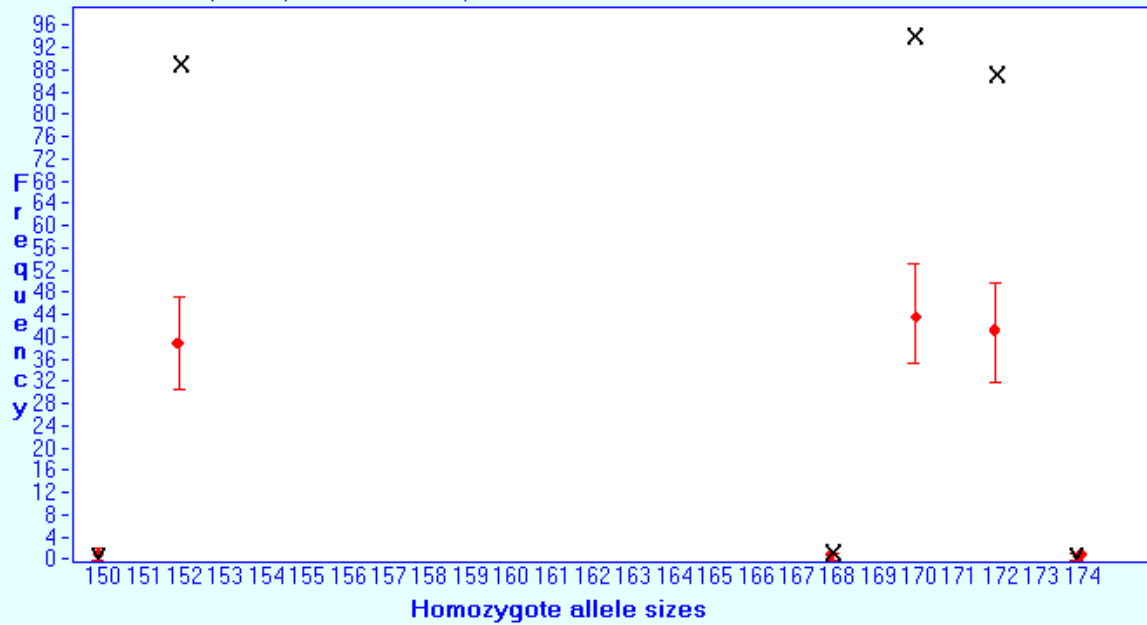
Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: LE-1

X Observed value

Locus: Lok11 (MA091)

• Mean expected value



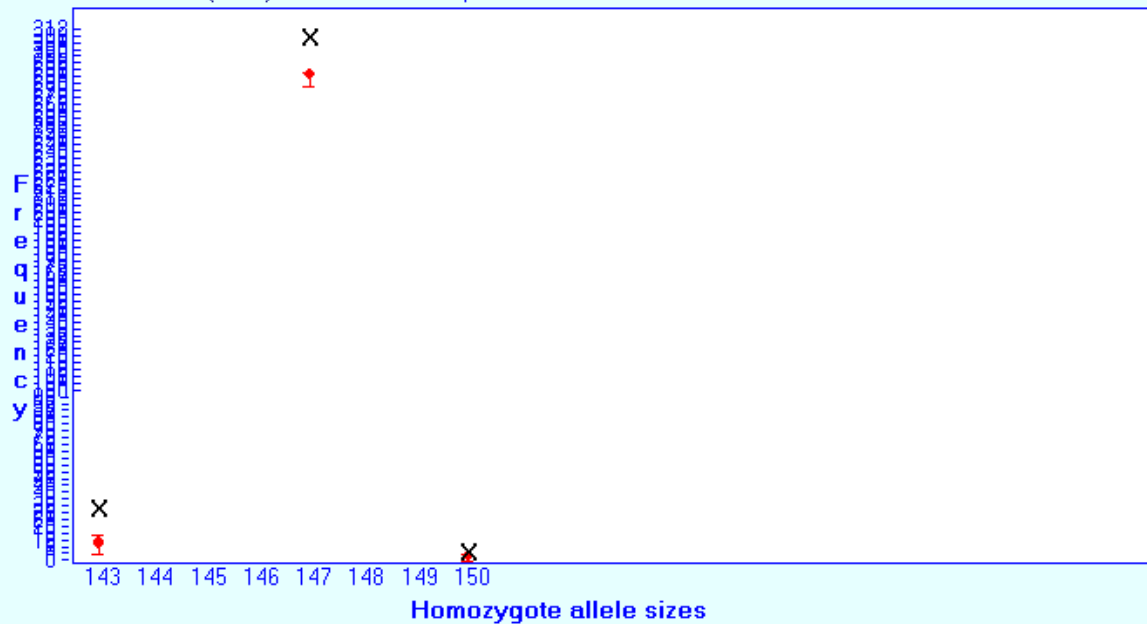
Homozygote Frequencies (CI: 95%)

Population: LE-1

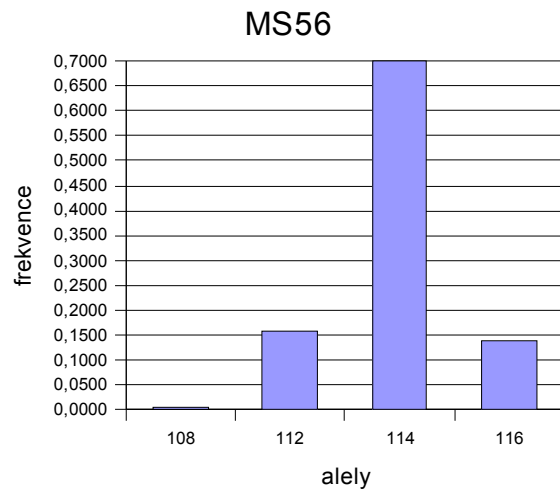
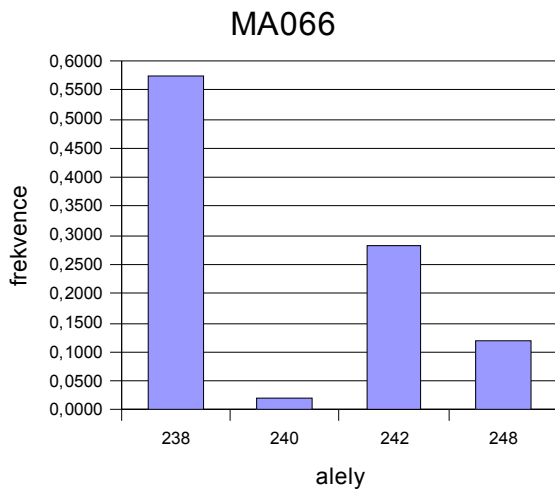
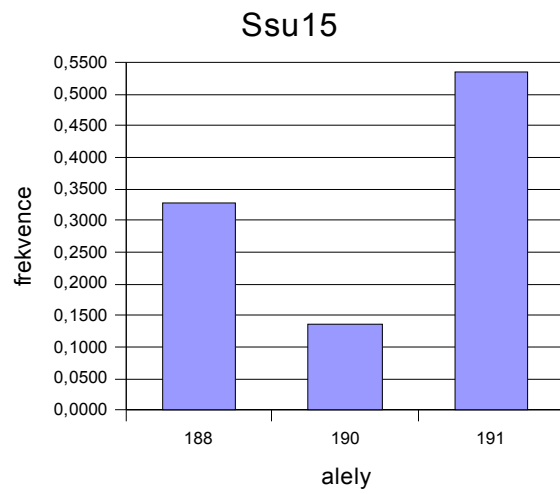
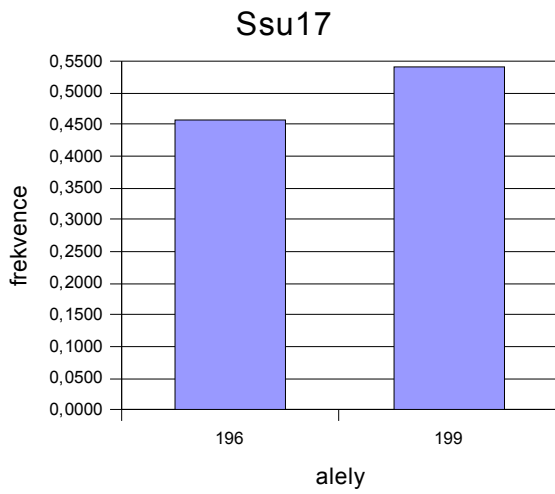
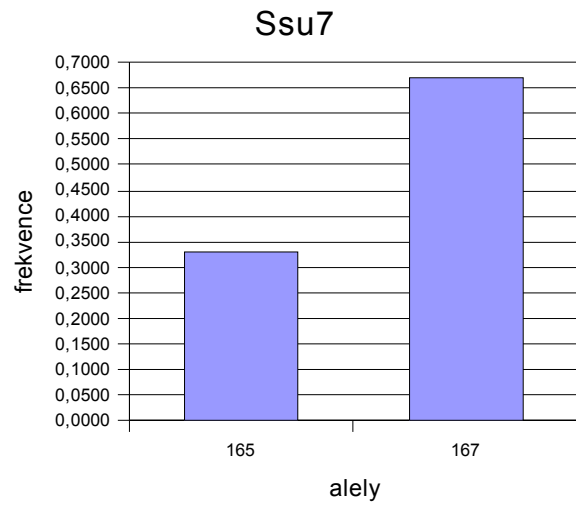
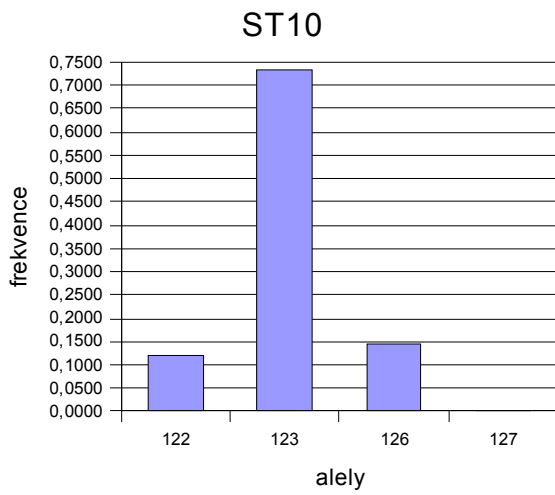
X Observed value

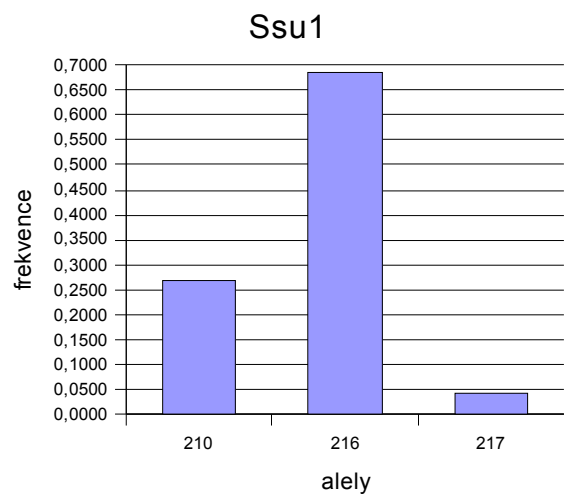
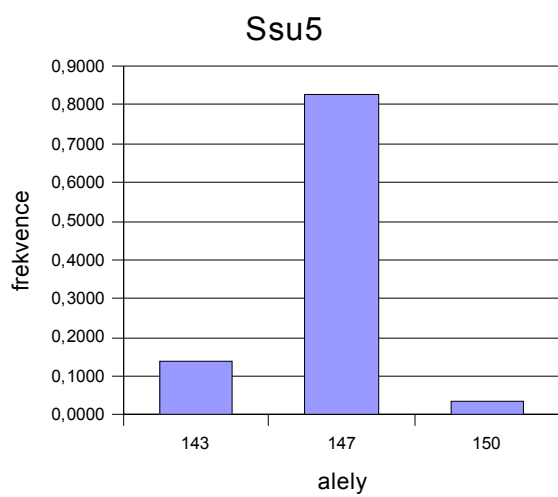
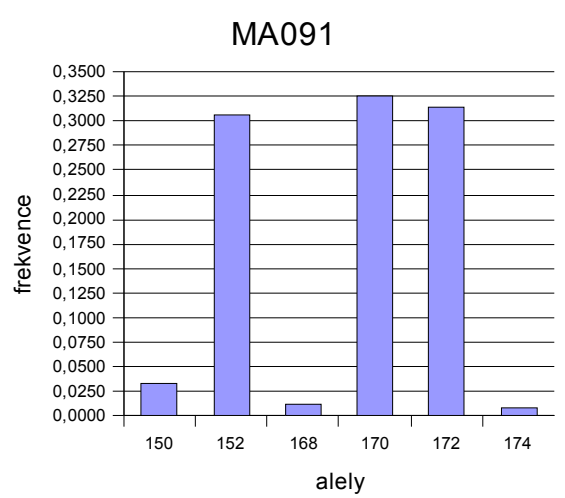
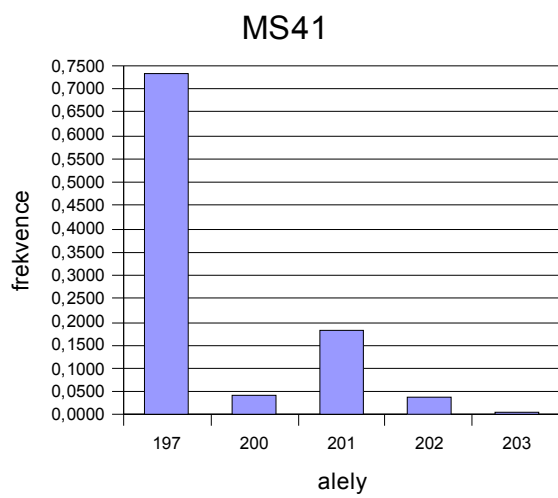
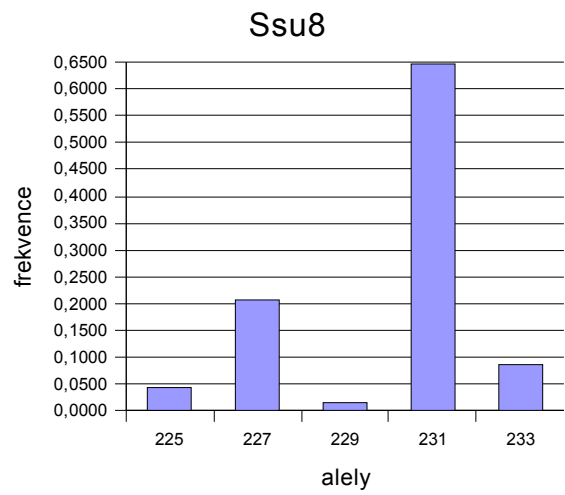
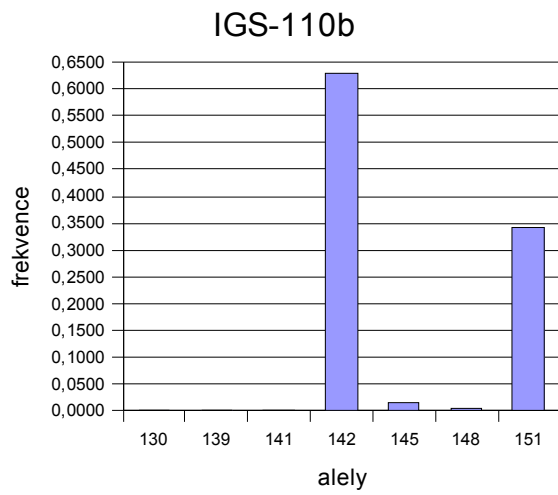
Locus: Lok12 (Ssu5)

• Mean expected value



Příloha 3. Distribuce frekvencí alel v jednotlivých mikrosatelitových lokusech. Není zde uveden monomorfní lokus Ssu13.





Příloha 4. Pairwise F_{ST} pro studované populace.

Populace	LE	TR	LI	KY	VY	KO	LO	LOD	JA	ST	DE	IV	KV	BE
LE														
TR	0,2784													
LI	0,4411	0,4753												
KY	0,3092	0,3830	0,2865											
VY	0,2451	0,3491	0,2755	0,2263										
KO	0,3097	0,3676	0,3250	0,2754	0,3986									
LO	0,3584	0,2126	0,5316	0,3447	0,3406	0,4120								
LOD	0,3444	0,4431	0,5241	0,3361	0,3201	0,5017	0,4824							
JA	0,3614	0,3183	0,4338	0,4148	0,3243	0,4369	0,1607	0,4885						
ST	0,3818	0,4135	0,4223	0,3490	0,3402	0,4743	0,4541	0,2844	0,4264					
DE	0,3164	0,2989	0,2488	0,2995	0,2914	0,2169	0,3066	0,4698	0,3068	0,3543				
IV	0,2622	0,2337	0,5366	0,2762	0,3527	0,2571	0,3329	0,5163	0,3703	0,5259	0,2973			
KV	0,5096	0,6214	0,5995	0,5958	0,4973	0,6134	0,7070	0,5162	0,5542	0,5509	0,5992	0,7339		
BE	0,4722	0,3553	0,2184	0,3813	0,4162	0,3997	0,4647	0,5124	0,4418	0,4162	0,2544	0,4137	0,6449	
ME	0,4280	0,5126	0,5369	0,3815	0,3954	0,5444	0,5483	0,4157	0,5450	0,4694	0,4932	0,5839	0,5545	0,5144
BO	0,4422	0,4355	0,5137	0,4528	0,3884	0,4928	0,4744	0,5554	0,5060	0,5053	0,3372	0,4730	0,6406	0,4452
NR	0,3973	0,3345	0,5343	0,4170	0,3826	0,4574	0,1111	0,4909	0,0378	0,4445	0,3256	0,3765	0,6326	0,4612
HR	0,3782	0,3302	0,3172	0,2086	0,2930	0,3720	0,3410	0,4037	0,4340	0,3282	0,2794	0,2835	0,6275	0,2594
VP	0,2301	0,3302	0,3352	0,2757	0,2394	0,2999	0,2847	0,4427	0,3953	0,3690	0,2920	0,2490	0,5760	0,3992
HO	0,4072	0,5533	0,7857	0,2948	0,3717	0,4403	0,6607	0,4715	0,4486	0,5823	0,4983	0,4989	0,6118	0,5547
RL	0,4156	0,3486	0,5516	0,4337	0,3951	0,5119	0,4739	0,3982	0,5030	0,4347	0,4319	0,5223	0,5896	0,4118
RH	0,2563	0,3035	0,2714	0,2868	0,2868	0,3371	0,3249	0,2536	0,4010	0,2223	0,2580	0,3654	0,4168	0,2798
RA	0,2451	0,3526	0,3286	0,3283	0,3162	0,3323	0,4302	0,2684	0,4082	0,2834	0,2791	0,4073	0,4239	0,3203
OV	0,4185	0,5288	0,7706	0,4515	0,3715	0,5402	0,6933	0,4477	0,4410	0,4861	0,4972	0,6471	0,0269	0,5628
MO	0,5638	0,5377	0,6310	0,4155	0,4514	0,5335	0,5949	0,5950	0,4687	0,5955	0,4336	0,4623	0,7512	0,4666
BI	0,3520	0,2362	0,8125	0,3657	0,2750	0,4926	0,0682	0,5571	0,0602	0,5130	0,3140	0,2991	0,7409	0,4322
AL	0,6455	0,6412	0,7700	0,4623	0,5868	0,5992	0,7611	0,6442	0,6584	0,6881	0,5611	0,6740	0,8042	0,5710
HU	0,4161	0,3991	0,0127	0,1910	0,2766	0,2362	0,3081	0,4967	0,4095	0,4770	0,2672	0,3002	0,6750	0,3162

