

Univerzita Karlova v Praze  
Přírodovědecká fakulta  
Katedra zoologie



**Hybridní původ bobrů ve střední Evropě**  
**Hybrid origin of beavers in Central Europe**

Diplomová práce

**Alena Albrechtová**

Školitel: Pavel Munclinger

Praha 2011

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

V Praze dne: 20.8.2011

Alena Albrechtová

## **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat svému školiteli Mgr. Pavlu Munclingerovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky, které mi poskytoval po celou dobu mého výzkumu a během psaní diplomové práce.

Tato práce vznikla s podporou grantu GAUK 151210.

# Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	6
<b>Abstract</b> .....	7
<b>1. Úvod</b> .....	8
1.1 Cíle práce .....	9
<b>2. Literární přehled</b> .....	10
2.1 Bobr evropský .....	10
2.2 Historie rozšíření bobra evropského.....	11
2.3 Bobři v Čechách .....	16
2.4 Bobr kanadský v Evropě.....	20
2.5 Předchozí studie .....	20
2.6 Populační expanze.....	22
2.7 Bottleneck a jeho vliv na populační strukturu velkých evropských savců.....	24
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	27
3.1 Jaderná DNA.....	27
3.1.1 Analýza mikrosatelitových lokusů .....	27
3.1.2 PCR mikrosatelitových lokusů a fragmentační analýza .....	29
3.1.3 Identifikace alel .....	29
3.1.4 Analýza dat.....	30
3.2 Mitochondriální DNA.....	32
3.2.1 Protokol na PCR CR mtDNA.....	32
3.2.2. Kroky PCR CR mtDNA.....	32
3.2.3 Elektroforéza a sekvenace.....	33
3.2.4 Editace sekvencí .....	33
3.2.5 Analýza dat.....	33

<b>4. Výsledky</b> .....	36
4.1 Základní charakteristika mikrosatelitových lokusů a populací.....	36
4.2 AMOVA a párové Fst.....	38
4.2.1 AMOVA.....	38
4.2.2 Párové Fst.....	39
4.3 Odvození populační struktury .....	41
4.4 Prostorová analýza.....	47
4.5 AMOVA pro sekvenční data a základní charakteristika populací a haplotypů .....	50
4.6 Haplotypová síť a vztahy mezi haplotypy .....	52
<b>5. Diskuze</b> .....	55
5.1 Srovnání populací.....	55
5.2 Překvapivá variabilita ve východoevropském refugiu .....	56
5.3 Původ našich populací .....	57
5.4 Genetická variabilita našich populací.....	59
5.5 Hybridní původ či izolace našich populací.....	60
5.6 Srovnání s předchozími studii .....	61
5.7 Možnosti dalšího výzkumu .....	63
<b>6. Závěry</b> .....	64
<b>7. Použitá literatura</b> .....	65
<b>8. Apendix</b> .....	74

## Abstrakt

Diplomová práce se zabývá původem našich populací a studiem genetické variability populací bobra evropského (*Castor fiber*) na většině jeho areálu rozšíření. Podařilo se nám shromáždit vzorky DNA z našich populací, reintrodukované populace z ruské Kirovské oblasti a všech evropských a asijských refugií. V 19. století byl bobr evropský vinou přílišného lovu téměř vyhuben na celém území Eurasie. Toto kritické období přečkal jen v osmi refugiálních oblastech. V této době už přežívalo jen asi 1 200 jedinců. Díky ochraně a reintrodukcím se do dnešní doby populační stavy opět výrazně zvýšily na více než 640 000 jedinců. Je tedy evidentní, že populace bobra prošly výrazným snížením stavů (bottleneckem). Na našem území byli bobří v 18. století zcela vyhubeni. Díky migraci ze sousedních států a reintrodukčním programům se k nám však začínají od 80. let 20. století vracet. O původu bobrů v České republice se toho příliš nevědělo. Ukázalo se, že se na našem území vyskytují jedinci francouzského, německého, norského a východoevropského původu. U žádného českého bobra nebyla objevena sekvence kanadských bobrů.

Studiem mikrosatelitových lokusů (u evropského bobra byly použity poprvé) a kontrolní oblasti mitochondriální DNA jsem zjistila velké difference mezi jednotlivými populacemi. Celková variabilita těchto genetických markerů je ale velmi nízká (maximálně 4 haplotypy CR mtDNA a 1 – 7 alel na lokus). To odpovídá výraznému bottlenecku, který snižuje vliv genetického toku, naopak zvyšuje vliv genetického driftu a tím se v jednotlivých populacích udržely alternativní alely. Kromě haplotypů dříve popsanych z refugií jsme v Bělorusku a Rusku našli i šest zcela nových, což by mohlo naznačovat větší variabilitu v těchto oblastech.

**Klíčová slova:** bobr evropský (*Castor fiber*), mikrosatelitové lokusy, mitochondriální DNA, kontrolní oblast, bottleneck, genetická variabilita, hybridní původ

## Abstract

The aim of the master diploma work is to investigate origin of Czech populations and genetic variability of almost all Eurasian populations of the European beaver (*Castor fiber*). For our purposes we collected specimens from Czech populations, reintroduced population in Kirov district in Russia and all European and Asian refugia. At the end of the 19<sup>th</sup> century the species was on the verge of extinction due to overhunting, surviving only in eight isolated refugial areas. The population size at the end of the 19<sup>th</sup> century was estimated as 1 200 animals. The number of individuals has increased thanks to the legal protection and reintroductions. The current population size is estimated at 640 000. It is obvious that the populations of beaver have recently undergone severe bottleneck. Beaver was completely extirpated in the Czech Republic in the 18<sup>th</sup> century. Since the 80<sup>th</sup> of the 20<sup>th</sup> century beavers re-established in the Czech Republic due to migration from neighbouring countries and reintroduction programmes, however we knew only little about the origin of beavers in the Czech Republic. I showed that our beavers are derived from individuals in France, Germany, Norway and east Europe. Mitochondrial DNA of *Castor canadensis* has not been found in Czech beavers.

I studied microsatellite loci (first use for European beaver) and control region of the mitochondrial DNA (CR mtDNA) and I ascertained, that there are large differences between populations. The within-population variability of genetic markers is extremely low (max. 4 haplotypes CR mtDNA and 1 – 7 alleles per microsatellite locus). It corresponds to the strong bottleneck which reduced the effect of gene flow and on the other hand increased the influence of genetic drift, which resulted in discrete populations characterised by fixed alternative alleles. In Belarus and Russia we find six new CR mtDNA haplotypes. It indicates, that the variability in this areas is greater than previously suggested.

**Key words:** European beaver (*Castor fiber*), microsatellite loci, mitochondrial DNA, control region, bottleneck, genetic variability, hybrid origin

# 1. ÚVOD

Na konci osmnáctého a hlavně v devatenáctém století se vinou člověka ocitlo na pokraji vymření mnoho velkých evropských savců (např. medvěd hnědý, vlk obecný, vydra říční či bobr evropský). Hlavními příčinami byl přílišný lov zejména pro kožešinu a v neposlední řadě i ničení a fragmentace vhodných habitatů. K výraznému pronásledování a vybíjení docházelo i z důvodu konfliktů, které mezi těmito druhy a člověkem často vznikaly. V důsledku toho se početní stavy těchto druhů výrazně snížily a došlo k silné fragmentaci areálů jejich rozšíření. Díky legislativní ochraně se naštěstí tyto druhy podařilo v evropské krajině zachovat dodnes. U některých z nich se navíc v poslední době opět zvyšují početní stavy a tak se znovu stávají běžnou součástí evropské přírody.

Prodělané výrazné bottlenecky (extrémní snížení populačních stavů) ale jistě hluboce ovlivnily genetickou variabilitu v malých oddělených populacích. Bylo by proto velmi zajímavé a cenné pokusit se následky takovýchto historických událostí prozkoumat.

Vhodným modelem pro studium vlivu bottlenecků a efektu zakladatele je bobr evropský. Výhodou studia bobra je, že jsou jeho stopy v krajině poměrně dobře viditelné (stavění hrází a hloubení nor ve břehu, okusy stromů a jejich kácení). Následkem toho je velmi podrobně zmapován jak nynější, tak i historický výskyt bobra, což je jeden z hlavních předpokladů pro studium těchto efektů. Navíc jsou z literatury známy poměrně přesné údaje o početnosti bobrů v jednotlivých obdobích.

Z předchozího je zjevné, že bobr evropský, stejně jako i jiní evropští savci, prodělal výrazný bottleneck a opětovné zvýšení stavů. Navíc v jeho případě docházelo a dochází k početným reintrodukcím. V některých případech byly tvořeny populace z jedinců dovezených z různých oblastí. Tyto smíšené populace pak byly následně používány jako zdrojové i pro další reintrodukce. O původu bobrů v České republice toho bylo dosud známo velmi málo. A to zejména proto, že naše populace vznikaly jak samovolným šířením, tak i záměrným vysazováním a případně i kombinací obou možností. Zároveň se neví nic ani o tom, zda se na našem území jednotlivé poddruhy bobra evropského kříží či nikoliv. Informace o genetické struktuře a variabilitě současných populací jsou mimoto nezbytně nutné také pro tvorbu správných ochranných opatření a zavedení nových přístupů v této činnosti. Proto jsem se pokusila tuto problematiku ve své diplomové práci vyřešit.



## 1.1 Cíle práce

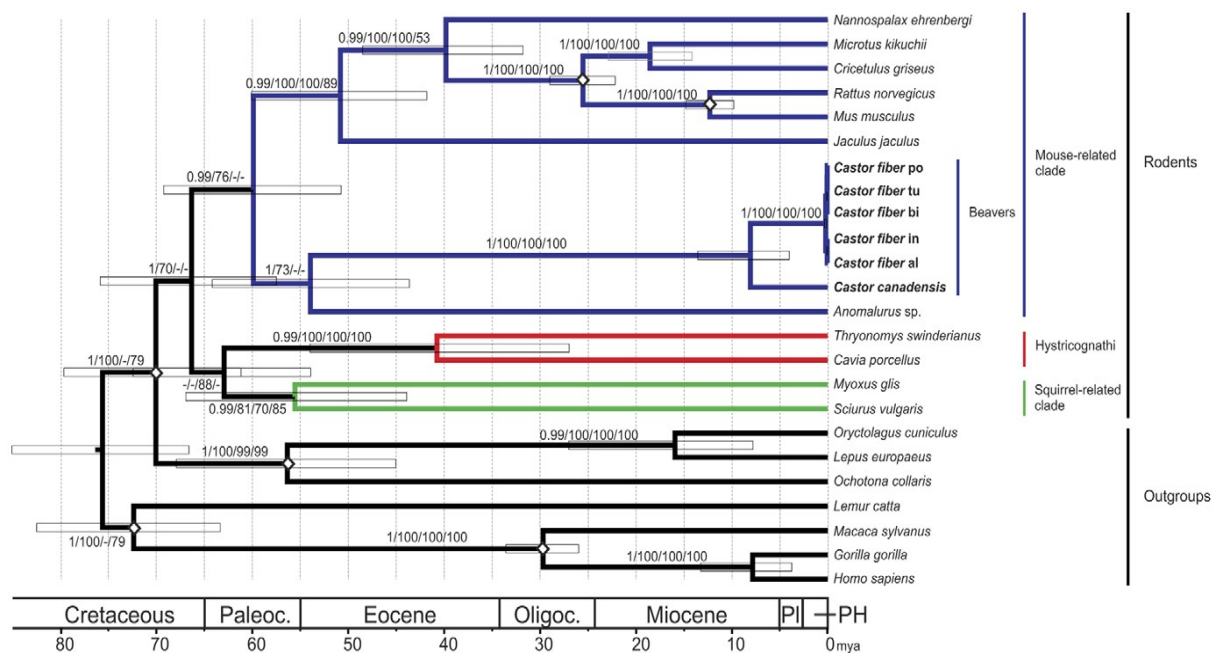
1. Určit, ze kterých refugií pocházejí bobři na našem území a odhadnout tak vliv reintrodukce a přirozeného šíření.
2. Pomocí mikrosatelitových lokusů zjistit míru izolovanosti našich populací a odhalit, zda se u nás kříží bobři pocházející z různých refugií.
3. Určit míru genetické variability našich bobrů a srovnat ji s genetickou variabilitou v refugiích.
4. Zjistit, zda data získaná studiem mikrosatelitů odpovídají předchozím studiím prováděným v refugiích.

## 2. LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 2.1 Bobr evropský

Bobr evropský (*Castor fiber*) je největší hlodavec žijící na evropském kontinentě (Nolet & Rosell 1998). Vyznačuje se semiakvatickým způsobem života a žije ve všech typech sladkovodních systémů. V severní Skandinávii žije dokonce v horách i v místech, kde vrbový porost dosahuje výšky jen po kolena a kde je led i 8 měsíců v roce (Batbold et al. 2008). Bobři jsou výhradními herbivory. Od jara až do podzimu tvoří hlavní složku jejich potravy bylinná strava (až 90 % celkového množství přijímané potravy) (Lehký & Pražák 1998). Od října do prosince spíše kácují stromy a připravují si zásoby na zimu. Tam, kde k tomu mají příležitost, využívají i kulturní plodiny – např. topinambury, kukuřici nebo cukrovou řepu (Lehký & Pražák 1998, Vorel 2006). Jsou schopni si stavět obydlí (hráze a hrady) (Lehký & Pražák 1998), i když evropský bobr se vyznačuje nižší stavební aktivitou než bobr kanadský (*Castor canadensis*). Na našem území si často místo stavby hradů hloubí nory ve břehu (Lehký & Pražák 1998, Šafář 2002). Obecně se má za to, že jsou bobři sociálně monogamní (Crawford et al. 2008a). Tomu odpovídá i snížený sexuální dimorfismus (týká se morfologie i chování – např. obrana teritoria) (Herr & Rosell 2004). Dále se domníváme, že bobři žijí v malých rodinných skupinách skládajících se ze samce se samicí a jejich mláďat (Milishnikov 2004, Crawford et al. 2008a). Není tomu tak ale vždy, protože svazky dospělců trvají jen 2-3 roky (Crawford et al. 2008a). Proto je pravděpodobné, že se některé kolonie skládají z polovičních sourozenců, přičemž následující samec toleruje nepříbuzná mláďata (Crawford et al. 2008a). Jejich sociální systém je označován jako singular breeding (Hayes 2000). Může obsahovat pomocníky (tzv. helpers) – mláďata z předchozích vrhů a příbuzné jedince, kteří mohou pomáhat s výchovou mláďat.

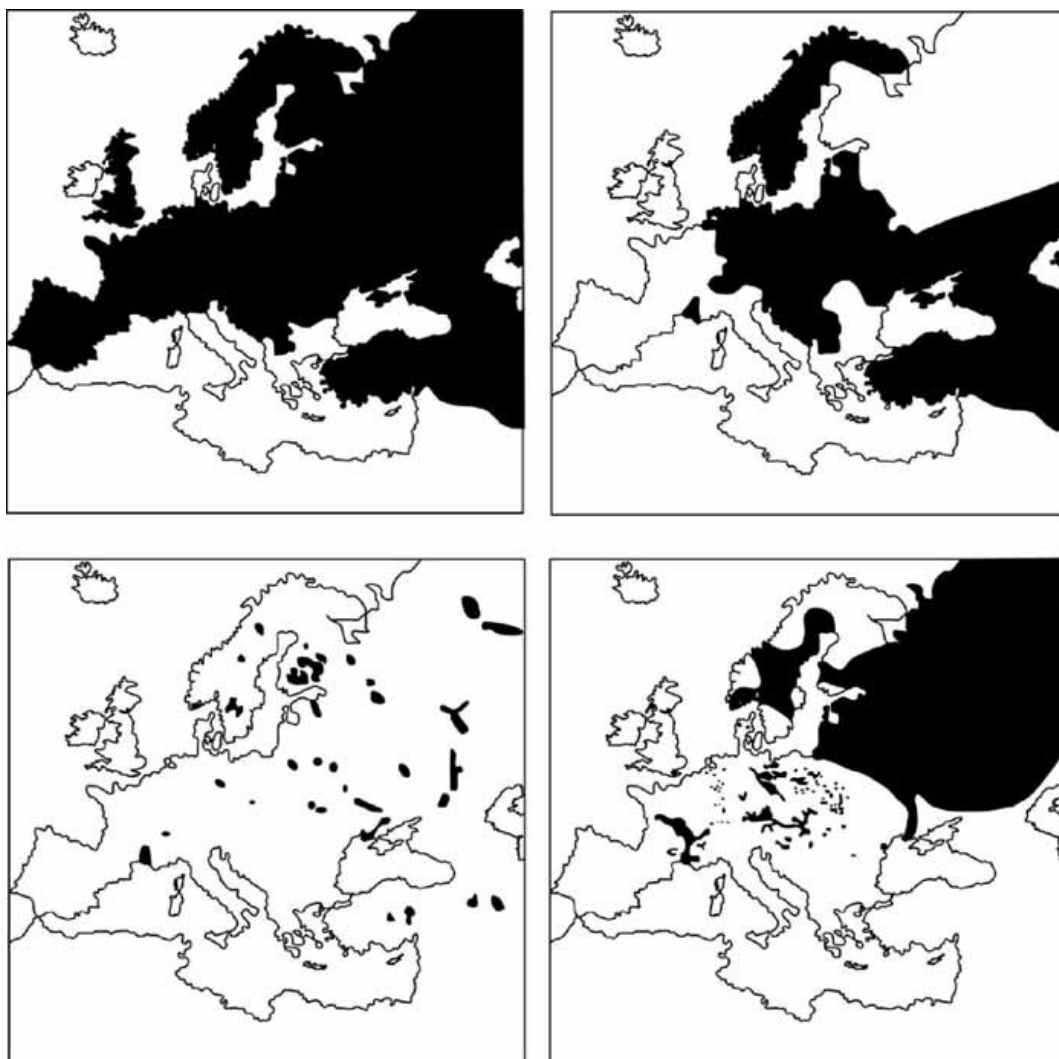
Až donedávna nebyla zcela jasná pozice bobrů na fylogenetickém stromě. V poslední době se však studiem mitochondriální DNA ukazuje, že rod *Castor* se řadí mezi myši příbuzné – obr. 1 (Horn et al. 2011). Sesterskou skupinou mu zde jsou šupinatkovití (*Anomaluridae*), se kterými sdíleli společného předka asi před 54 miliony lety. Bobři tudíž měli poměrně dlouhý čas k tomu, aby se u nich mohly vytvořit charakteristické ekologické a morfologické rysy. K oddělování bobra kanadského od bobra evropského začalo docházet asi před 8 - 7,6 miliony let, kdy začali bobři z Eurasie migrovat přes Beringův pevninský most do Severní Ameriky. Následně došlo ke geografické izolaci obou populací a to pravděpodobně vedlo k rozdělení linie *Castor* na dva druhy: *C. fiber* a *C. canadensis*. Poddruhy bobra evropského tvoří monofyletickou skupinu. Jejich společný předek žil před 210 tisíci lety.



Obr. 1: Časový strom hlodavců. Dva druhy dnes žijících bobrů se odštěpily od společného předka asi před 8-7,5 miliony let. Společný předek evropských bobrů žil před 210 tisíci lety. Zdroj: Horn et al. 2011

## 2.2 Historie rozšíření bobra evropského

Bobr evropský byl dříve běžně rozšířen po celém území Eurasie v říčních údolích zalesněných opadavými a jehličnatými lesy (Nolet & Rosell 1998, Ducroz et al. 2005, Durka et al. 2005). Jeho evropský areál sahal od Atlantiku k Uralu a od Středozemního moře k Severnímu ledovému oceánu (Vorel 2006) – obr. 2. V 19. století byl ovšem na většině svého dřívějšího areálu téměř vyhuben (Nolet & Rosell 1998, Milishnikov 2004, Babik et al. 2005, Durka et al. 2005). Hlavní příčinou byl přílišný lov (a to zejména na podzim a v zimě, kdy mohli být bobři velmi dobře lokalizováni díky kácení stromů a úpravě svých nor) a ničení vhodného habitatu (přeměna přírodních biotopů, zejména lužních lesů, mokřadů a bažin na pole a jiné hospodářské plochy – Vorel 2006). Bobři byli loveni především pro svou kožešinu a látku zvanou kastoreum (aromatická látka z velkých párových žláz nacházejících se v blízkosti análního otvoru, sloužící pro pachovou komunikaci; Ellegren et al. 1993), která se používá v medicíně a bývá také jednou ze základních látek při výrobě parfémů (Nolet & Rosell 1998, Schwab & Lutschinger 2001). Jejich ocasy navíc sloužily jako postní jídlo (byly připravovány jako ryba) (Nolet & Rosell 1998, Vorel 2006).

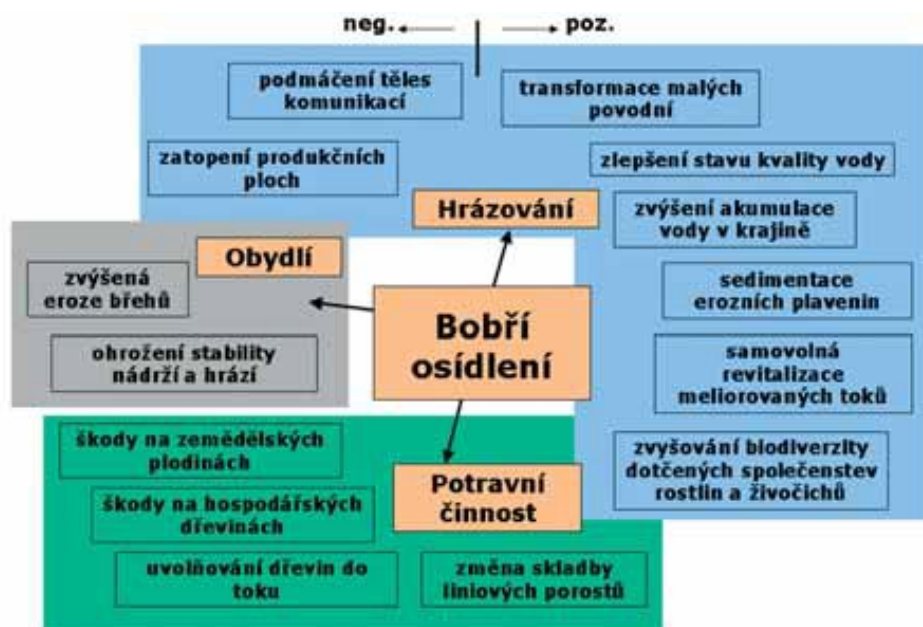


*Obr. 2: Zmenšování areálu bobra evropského v Evropě v průběhu posledního tisíciletí. Vlevo nahoře: 11. století; vpravo nahoře: 15. století; vlevo dole: počátek 20. století; vpravo dole: přelom 70. a 80. let 20. století.*

*Zdroj: Vorel 2006*

Zdá se, že k vymírání docházelo od jihu, neboť v Portugalsku, Španělsku, Řecku, Turecku, Ázerbájdžánu a Iráku byly nalezeny jen subfosílie (Nolet & Rosell 1998, Kryštufek & Vohralík 2009). Od 12. století začíná vlivem intenzivního lovu postupně mizet i ze zbylých oblastí (Šafář 2002) až následně v 16. století zmizel z Itálie a Velké Británie (Nolet & Rosell 1998). Na konci 19. století už přežíval jen v osmi izolovaných refugiálních oblastech (Durka et al. 2005): delta Rhône (Francie), střední Labe (Německo), jižní Norsko, Dněpr s Berezinou a Pripjať (Bělorusko a Ukrajina), říční systém Voroněž-Don (Rusko), řeky Konda a Sosva (východní Ural, Rusko), řeky Jenisej a Azas (Rusko) a řeka Bulgan (Mongolsko, Čína). Počet jedinců žijících v této době se odhadoval asi jen na 1 200 (Nolet & Rosell 1998, Halley & Rosell 2003). Díky ochranným opatřením v těchto osmi oblastech naštěstí bobr přežil dodnes

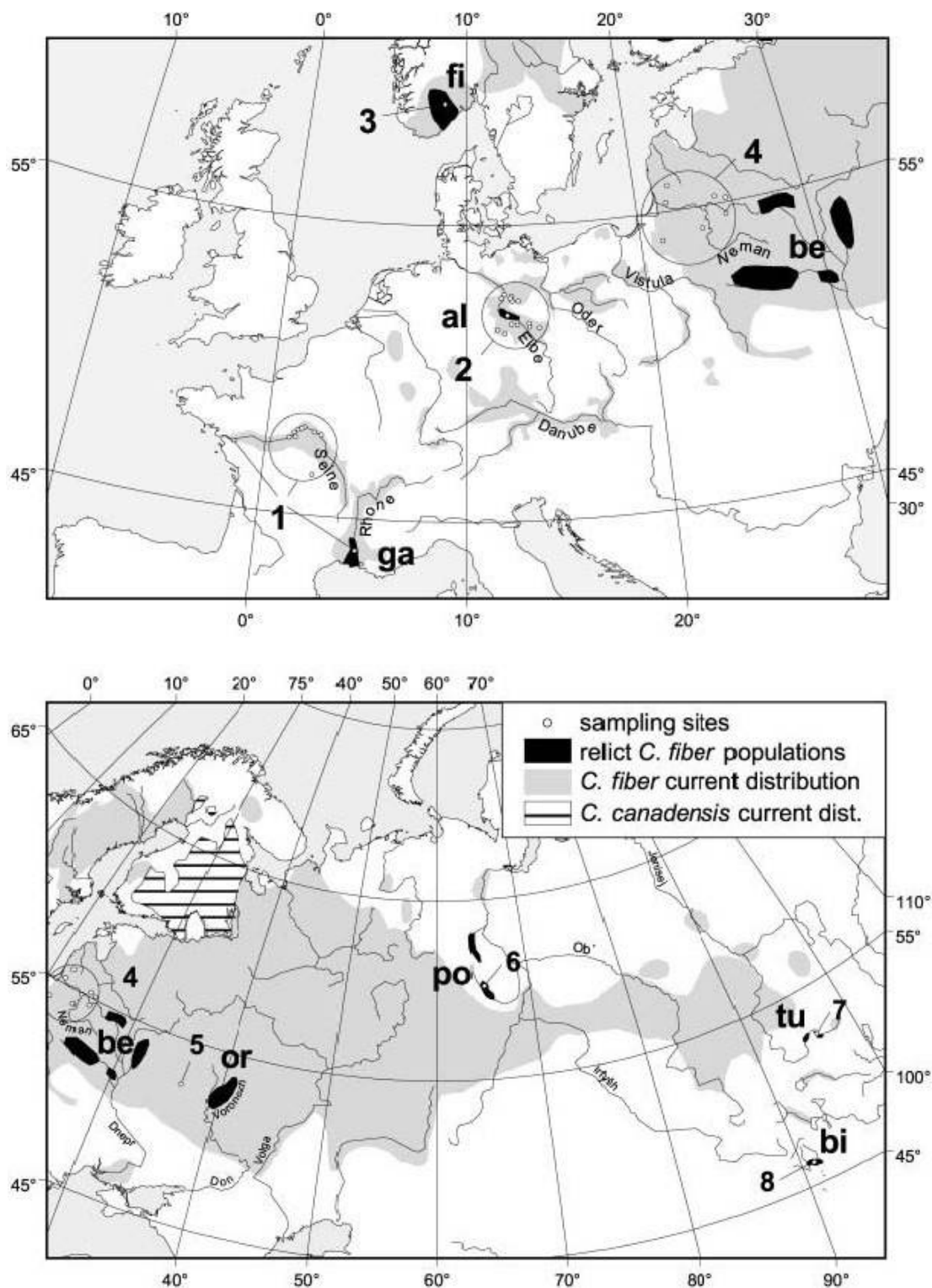
a i díky reintrodukcím se navíc podařilo bobra vrátit i do velké části původně obývaných oblastí (Halley & Rosell 2002, Durka et al. 2005). Jako první zakázalo lov bobrů Norsko v roce 1845 (Nolet & Rosell 1998) a roku 1899 se tam objevila efektivní legislativní ochrana (Halley & Rosell 2002). Po Norsku pak zavedly ochranu i všechny ostatní země, kde bobr ještě přežíval. K první reintrodukci došlo ve 20. letech 20. století ve Švédsku. K dalším reintrodukcím docházelo v Norsku, Rusku, Litvě, Finsku, Německu, Polsku, Lotyšsku, Švýcarsku, Estonsku, Mongolsku, Francii, Rakousku, Holandsku a České republice (Nolet & Rosell 1998). Díky všem těmto opatřením a také díky tomu, že je bobr natolik přizpůsobivý, že dokáže žít a rozmnožovat se i v kultivované krajině (Nolet & Rosell 1998), se v dnešní době jeho populační stavy odhadují již asi na 640 000 jedinců (Nolet & Rosell 1998, Halley & Rosell 2002, Halley & Rosell 2003, Durka et al. 2005), přičemž naprostá většina z nich se vyskytuje na území dřívějšího Sovětského svazu (Ducroz et al. 2005). V Evropě je areál rozšíření stále ještě značně disjunktní (Vorel 2006), což je způsobeno tím, že i vhodný habitat je fragmentovaný (Halley & Rosell 2002). Pokud bude současný trend pokračovat i nadále, dá se očekávat, že se v příštích desetiletích stane bobr evropský na většině území Evropy běžným druhem (Batbold et al. 2008).



Obr. 3: Činnost bobrů a jejich dopad na krajinu  
Zdroj: Vorel 2006

Rozšiřování bobrů do hospodářsky využívané krajiny však často vede ke konfliktům mezi nimi a lidmi (Nolet & Rosell 1998). Bobři mohou způsobovat perforace rybníčních a protipovodňových hrází, zatopení čistíren odpadních vod, kácení hospodářských, zpevňujících a okrasných dřevin, uvolňování dřevin do vodních toků a vznik potenciálních povodňových bariér ve formě hrází (Vorel 2006) – obr. 3. Stavění bobřích hrází může mít negativní efekt na migraci a reprodukci anadromních ryb, jako je např. losos obecný (*Salmo salar*) nebo pstruh obecný (*Salmo trutta*), které jsou oblíbeným cílem sportovních rybářů (Parker & Rønning 2007). Nad bobřími hrázemi se snižuje rychlost proudu, tím se zrychluje zanášení míst vhodných pro tření ryb a v nádržích se zvyšuje teplota vody, což může být pro ryby suboptimální.

Bobr evropský se dělí na osm poddruhů, které odpovídají výše zmíněným osmi refugiálním oblastem: *Castor fiber galliae*, *C. f. albicus*, *C. f. fiber*, *C. f. belorussicus* (totéž jako *C. f. vistulanus* – starší označení, ale bobři z místa, odkud pocházel exemplář použitý k popisu, byli vyhubeni – Ducroz et al. 2005), *C. f. orientoeuropaeus*, *C. f. pohlei*, *C. f. tuvunicus* a *C. f. birulai* (Šafář 2002, Durka et al. 2005) – obr. 4. Kvůli tvorbě umělých hybridních populací na velké části Ruska je někdy nemožné rozlišit, jestli patří jedinec k poddruhu *C. f. belorussicus* nebo *C. f. orientoeuropaeus* (Ducroz et al. 2005). Proto se pro takováto zvířata někdy používá označení *C. f. spp.* Je zvláštní, že populace z každého refugia tvoří samostatný poddruh, protože většina z těchto oblastí byla nejspíše kolonizována až po ledových dobách (Halley & Rosell 2002). Způsobeno to může být tím, že každá z populací je odvozena z malého počtu jedinců (často i méně než 200) a proto na ně měl velký vliv efekt zakladatele a také lokální adaptace na místní podmínky. Zdá se, že mezi těmito oblastmi existuje určitá klinální variabilita ve velikosti jedinců, přičemž se zvětšují od východu na západ a od severu k jihu (Nolet & Rosell 1998). Dosud se neví, zda je tato variabilita zapříčiněna geneticky nebo má svůj základ v ekologických podmínkách prostředí. Proto se tyto geografické formy mohou nazývat jednoduše podle oblasti výskytu: bobři z Rhône, labští bobři, skandinávští bobři, běloruští bobři (používám též označení východoevropští), voroněžští bobři, zápososibiřští bobři (používám též označení Yugra), bobři z Tuvy a mongolští bobři – pořadí odpovídá výše uvedeným názvům poddruhů (Nolet & Rosell 1998).



Obr. 4: Světle šedé plochy představují dnešní rozšíření bobra Evropského, černé oblasti představují osm refugiálních oblastí, ve kterých bobr přežíval na konci 19. století (ga - *C. f. galliae*, al - *C. f. albicus*, fi - *C. f. fiber*, be - *C. f. belorussicus*, or - *C. f. orientoeuropaeus*, po - *C. f. pohlei*, tu - *C. f. tuvinius*, bi - *C. f. birulai*). Na vyšrafovaném území ve Finsku byl vysazen bobr kanadský. Horní obrázek zachycuje Evropu, dolní Asii.  
Zdroj: Durka et al. 2005

Při určování původu některých populací se objevují jisté komplikace, neboť během některých reintrodukcí nebyl kladen přílišný důraz na původ vysazovaných bobrů (Nolet & Rosell 1998). Ze zvířat pocházejících z různých geografických oblastí byly tvořeny nové smíšené populace (Halley & Rosell 2002, Durka et al. 2005), které navíc fungují jako zdrojové populace pro další reintrodukce. Takovým příkladem může být vypouštění bobrů ve vodním systému Dunaje. V Bavorsku a Rakousku byli vypuštěni bobři pocházející ze Švédska, Polska, Ruska a Francie (Nolet & Rosell 1998, Schwab & Lutschinger 2001, Halley & Rosell 2002, Durka et al. 2005). Tyto smíšené populace se posléze dostaly z Bavorska a Rakouska i do České republiky (Nolet & Rosell 1998, Schwab & Lutschinger 2001). Bobři smíšeného původu z Bavorska byli dále vysazováni i v Maďarsku, Chorvatsku, Belgii či Rumunsku (Schwab & Schmidbauer 2001, Halley & Rosell 2002). Dalším příkladem vytváření smíšených populací byly reintrodukce bobrů z Francie, Německa, Norska a Polska do třiceti různých oblastí ve Švýcarsku, které probíhaly mezi lety 1956 a 1977 (Nolet & Rosell 1998). Takovéto smíšené populace mají vyšší stupeň proteinového polymorfismu, heterozygotnosti a DNA variability než původní refugiální populace (Saveljev & Milishnikov 2002).

## 2.3 Bobři v Čechách

Na území Čech, Moravy a Slezska žil kdysi bobr relativně hojně (Vorel 2006). Ovšem pro svou kožešinu, maso nebo kvůli jejich škodlivosti byli bobři velmi intenzivně loveni (Lehký & Pražák 1998). Z toho důvodu byli v polovině 18. století na našem území zcela vyhubeni (Lehký & Pražák 1998, Šafář 2002, Vorel 2006). Koncem 18. a v 19. století zavedli Schwarzenbergové bobří farmové chovy na svých majetcích v jižních Čechách (Šafář 2002). Následně byli vypouštěni i do volné přírody zejména na Třeboňsku (Nežárka, Lužnice, Stará a Nová řeka) a jižní Moravě. Od roku 1833 byli bobři znovu intenzivně loveni, a tak se stalo, že v roce 1882 uhynul poslední jedinec. Tím tedy v našich zemích vyhynul bobr již podruhé.

Jeden z posledních bobrů na území České republiky byl uloven na severní Moravě u Olomouce (Kostkan & Lehký 1997). V této oblasti naštěstí přetrval relativně dobře zachovaný aluviální les, který je vhodným stanovištěm pro bobra evropského (Kostkan & Lehký 1997). Hlavním fenoménem této oblasti je fluviální ekosystém řeky Moravy, která má stále přírodní charakter koryta s mnoha meandry, bohatou břehovou vegetací a mnoha postranními kanály. Proto zde – v CHKO Litovelské Pomoraví - mohlo být v letech 1991, 1992 a 1996 vysazeno 22 jedinců poddruhu *Castor fiber vistulanus* pocházejících ze



severovýchodního Polska a Litvy (Kostkan & Lehký 1997, Lehký & Pražák 1998, Šafář 2002, John et al. 2010). Této populaci se poměrně dobře daří (po třech letech od vypuštění začala kolonizovat říční systém – John et al. 2010) a zdá se, že celkem rychle roste. Na přelomu let 1991 a 1992 se v oblasti nacházelo 5 jedinců, v letech 1995/1996 už to bylo 40 bobrů (Kostkan & Lehký 1997) a roku 1998 už dokonce kolem 50 (Lehký & Pražák 1998). Všechny skupiny bobrů zde dávají přednost norám ve břehu a žádní si nestavějí hráze.

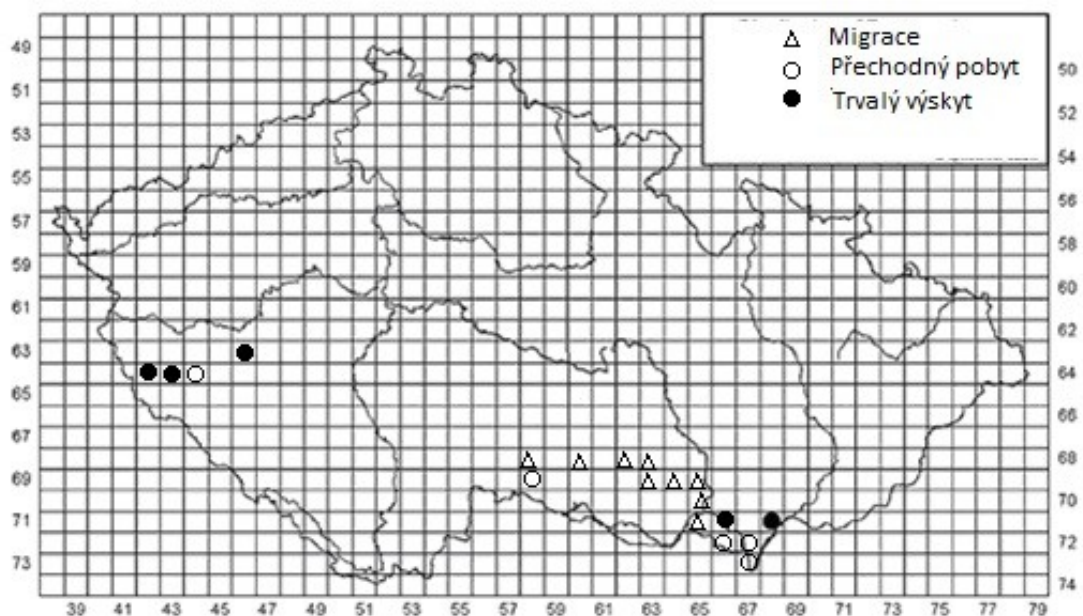
Na Děčínsku na Labi byl poslední bobr uloven roku 1722 (Benda & Šutera 1996). V poslední době se ale bobři na dolní tok řeky Labe (mezi Střekov v Ústí nad Labem a státní hranici) vrátili z refugiální populace na středním Labi v Německu, kde žije původní poddruh *Castor fiber albicus*. Je zřejmé, že migrují z tradičních lokalit v Německu až k nám na českou část toku řeky Labe. Od podzimu 1992 se na Labi vyskytují bobři pravidelně. V roce 1993 vytvořili kolonii nedaleko Děčína (Lehký & Pražák 1998). V říjnu 1994 zde už došlo i k reprodukci a v květnu 1995 byly nalezeny dva bobří hrady (Benda & Šutera 1996). Od konce 90. let lze naši labskou populaci bobra evropského považovat za stabilizovanou (Šafář 2002).

V letech 1966 – 1981 byly prováděny reintrodukce v Rakousku a Bavorsku a migrací se odtud bobři dostali na počátku osmdesátých let i k nám (Lehký & Pražák 1998). V Rakousku byl vysazen skandinávský (*Castor fiber fiber*) a východoevropský (*Castor fiber vistulanus*) poddruh a také bobr kanadský (*Castor canadensis*). Někteří z těchto jedinců a jejich potomci k nám pak migrovali a od roku 1988 se na jižní Moravě (Dyje, Morava, Kyjovka) vyskytuje stálá populace (Benda & Šutera 1996, Lehký & Pražák 1998), která se navíc šíří proti proudu Moravy – obr. 5. Překvapivé je, že se bobři objevili dokonce i v centru Břeclavi a zdá se, že jim vůbec nevádí blízká přítomnost lidí. Bobři vysazení v CHKO Litovelské Pomoraví se začali rozmnožovat a nejpozději od roku 1992 migrovali na jih po toku Moravy mimo CHKO. Ke kontaktu s jihomoravskou populací došlo nejspíše v letech 1998 nebo 1999, ale mohlo se tak stát už i dříve (Šafář 2002) – obr. 6.

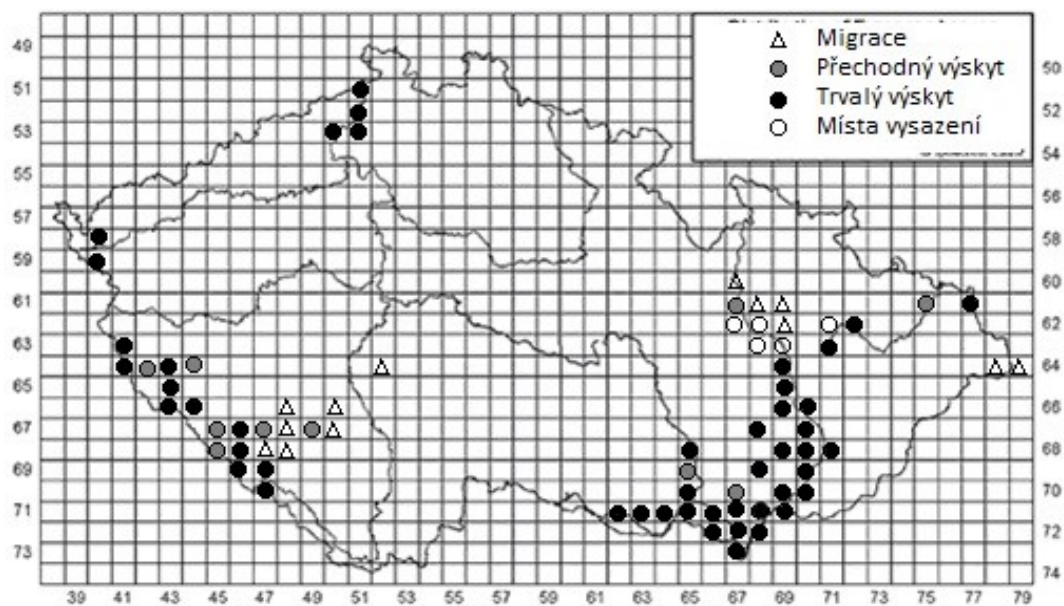
V České republice docházelo i k dalším reintrodukčním projektům (Kostkan & Lehký 1997). Bylo to například na jižní Moravě na řekách Morava a Dyje, jiný projekt byl plánován v západních Čechách v Doupovských horách. Další projekty ve východních a jižních Čechách byly zamítnuty kvůli nebezpečí plynoucího z blízkosti rybníků a zavlažovacích kanálů. V průběhu 90. let dochází k výrazné invazi ze všech sousedních zemí (Šafář 2002). Tak se k nám přirozeným způsobem rozšířili bobři na Kateřinský potok na Tachovsku a asi kolem roku 1995 zde vytvořili stálou populaci (Benda & Šutera 1996, Lehký & Pražák 1998), i když první ohryzy zde byly objeveny již v roce 1991 (Šafář 2002).

Ve druhé polovině 90. let se bobr objevil i na Šumavě a v podhůří Šumavy (Šafář 2002). Z povodí Vltavy na Žďárecké slati se dostali v roce 1998 dále do povodí Otavy a jeden jedinec se dostal až do Písku.

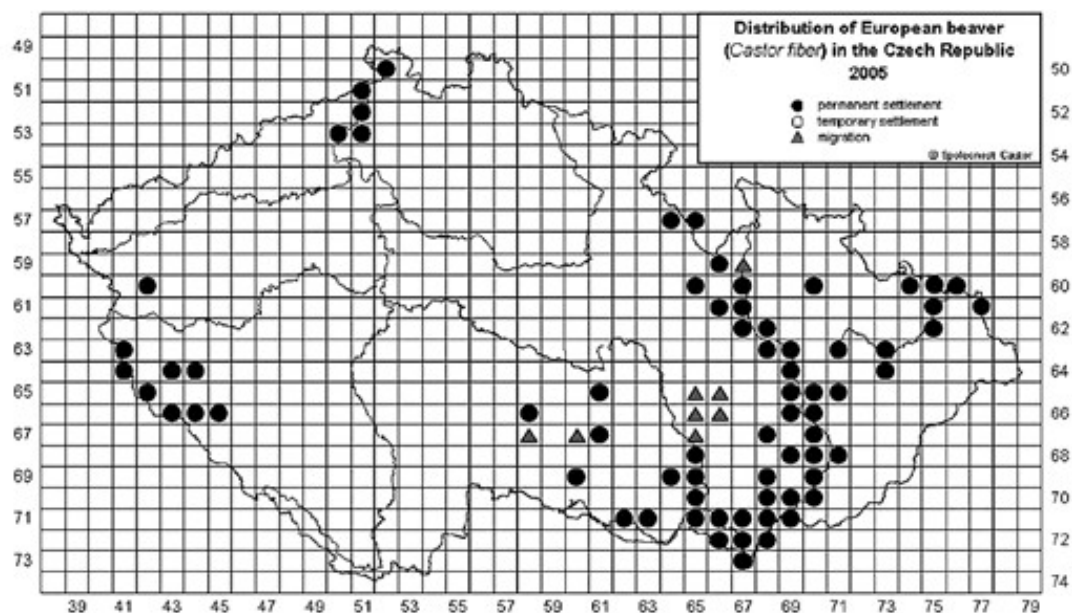
V současnosti se trvalé populace vyskytují od středního toku Moravy až po soutok s Dyjí, dále na severní Moravě, na dolním Labi a v západních Čechách (Vorel 2006) – obr. 7. Bobr je na našem území pod přísnou ochranou (Vorel 2006). V naší legislativě je řazen mezi „kriticky ohrožené“ druhy (Šafář 2002). V některých místech je již ale tak hojný, že tato ochrana zdánlivě ztrácí do jisté míry smysl (Vorel 2006). V roce 2002 se na našem území vyskytovalo 300 - 350 jedinců (Šafář 2002). Početnost druhu ale ještě není na takové úrovni, aby bylo nutné ji snižovat lovem (Vorel 2006). Navíc vzhledem k tomu, že populace existují pouze krátkou dobu (maximálně několik desítek let), nejsou ještě příliš stabilní. Lov by je mohl narušit do té míry, že by bobří opět mohli začít z naší krajiny mizet. Cílem řízené ochrany je také to, aby se zabránilo rozšíření bobrů do oblastí, které nejsou vhodné pro rozvoj populací (jižní Čechy z důvodu vysoké koncentrace rybníků a vodních nádrží) a také aby se do volné přírody nedostal bobr kanadský, který se tu dosud nevyskytoval a nevyskytuje.



Obr. 5: Rozšíření bobra evropského na území České republiky do roku 1989. Plný kroužek představuje trvalý výskyt (nejméně dvouletý), prázdný kroužek přechodný výskyt (minimálně několik týdnů) a trojúhelník znázorňuje migraci (krátkodobý výskyt). Zdroj: podle Šafář 2002



Obr. 6: Rozšíření bobra evropského na území České republiky v letech 1990-1999. Černý kroužek představuje trvalý výskyt, šedý kroužek přechodný výskyt, trojúhelník znázorňuje migraci a prázdné kroužky označují místa, kde byli v letech 1991, 1992 a 1996 vysazeni jedinci z Polska a Litvy.  
Zdroj: podle Šafář 2002



Obr. 7: Rozšíření bobra evropského na území České republiky v roce 2005. Černý plný kroužek znázorňuje stabilní výskyt (nejméně dvouletý). Trojúhelník vyjadřuje přechodné osídlení.  
Zdroj: Vorel 2006

## 2.4 Bobr kanadský v Evropě

V některých oblastech Finska a v Karélii (Saveljev & Milishnikov 2002, Durka et al. 2005, Batbold et al. 2008), ve Francii na Seině a v Rakousku na Dunaji (Nolet & Rosell 1998, Schwab & Lutschinger 2001), ale i na území Polska (Šafář 2002) byl vysazen zcela nepůvodní bobr kanadský (*Castor canadensis*). Ten je plodnější než bobr evropský, protože mívá 3 – 4 mláďata za rok (bobr evropský má v průměru 2,8 mláďat – Starikov & Anchugov 2009, ale v Kirovské oblasti až 3,4 mladých na samici – Saveljev & Milishnikov 2002) a často se rozmnožuje už ve dvou letech (Nolet & Rosell, 1998). To je hlavním důvodem, proč velmi úspěšně kompetuje s evropským bobrem. Například právě ve Finsku a Karélii je dnes populace kanadského bobra početnější než populace znovu vysazeného bobra evropského (Šafář 2002). Naproti tomu se zdá, že v Rakousku, Francii ani Polsku žádný z vysazených kanadských bobrů nepřežil, případně tam, kde to bylo možné, byli odstraněni (Halley & Rosell 2002, Batbold et al. 2008). Žádný kanadský bobr nebyl zaznamenán ani při studiu mtDNA německých populací (Horn et al. 2010).

Zatím ale nebylo zjištěno, že by docházelo k jejich křížení (Nolet & Rosell, 1998). To je způsobeno tím, že mají různý karyotyp (různý počet chromozomů). Bobr evropský má 48 chromozomů zatímco bobr kanadský jen 40 (Nolet & Rosell 1998). Způsobeno je to Robertsonovskou fúzí 8 párů chromozomů u *C. canadensis*. Vzhledově a chováním jsou si ale tyto dva druhy velmi podobné. Jejich rozlišení je možné studiem karyotypu nebo analýzou allozymů (Kuehn et al. 2000). Obě tyto možnosti jsou ale složité a drahé, protože se musí zvířata kvůli odběru vzorků uspávat. Jinou, neinvazivní, metodou sběru vzorků je použití kořínků chlupů, kde je dost DNA k tomu, aby se mohla provést PCR. Oba druhy se pak dají rozlišit pomocí mitochondriálního cytochromu b. Další metodou, schopnou odlišit evropského a kanadského bobra, je použitím RAPD (Kautenburger & Sander 2008). Zdá se, že bobr kanadský nebyl vysazován v žádné z osmi reliktních oblastí (Durka et al. 2005).

## 2.5 Předchozí studie

Dosavadní studie zkoumající genetickou rozdílnost nejsou úplně jednoznačné a často si i protirečí (Durka et al 2005). Ellegren et al. (1993, 1994) zaznamenali velmi nízkou variabilitu při studiu hlavního histokompatibilního komplexu a při použití metody DNA fingerprintingu. V souladu s tímto zjištěním jsou i výsledky studie provedené Babikem et al. (2005), který také zkoumal MHC. Kautenburger & Sander (2008) při studiu labské refugiální populace a dvou reintrodukovaných populací v Rakousku a Bavorsku (původ vysazených jedinců

nejspíše z Polska a Ruska) zaznamenali vysokou genetickou podobnost v rámci i mezi těmito populacemi. Z toho vyvodili, že neexistuje jasná podpora pro rozrůzněnou populační strukturu mezi studovanými poddruhy. Oproti tomu Milishnikov & Saveljev (2001) zaznamenali relativně vysokou genetickou variabilitu u bobrů z Ruska a Běloruska při použití allozymových markerů.

Durka et al. (2005) zkoumal kontrolní oblast mitochondriální DNA (CR mtDNA) u jedinců z Francie, Německa, Norska, Polska, Litvy, Ruska a Mongolska. Celkem bylo nalezeno 16 různých haplotypů. Každý haplotyp se vyskytoval pouze v určité geografické oblasti a navíc žádný nebyl sdílený více poddruhy zároveň. V každé oblasti se navíc vyskytoval jeden dominantní haplotyp. Genetické rozdíly v rámci jednotlivých populací byly velmi malé. K podobným výsledkům dospěla i studie Ducroz et al. (2005), když v pěti východních populacích objevil 12 haplotypů CR mtDNA. Tato velmi nízká vnitropopulační variabilita by mohla být důsledkem nedávno prodělaného bottlenecku. Na počátku 20. století totiž žádné z refugií nemělo více než 300 jedinců a ve francouzském a ruském žilo dokonce jen 30 bobrů (Nolet & Rosell 1998, Halley & Rosell 2002, Durka et al. 2005). V takto malých populacích měl nejspíše velký vliv genetický drift, jehož působením se mohla ztratit velká část mtDNA haplotypů (Ducroz et al. 2005). Haplotypy ze západní Evropy (*C. f. albicus*, *C. f. fiber* a *C. f. galliae*) jsou si velmi blízké a proto klastrují spolu do jedné skupiny (Durka et al. 2005, Horn et al. 2010). Ostatní poddruhy se od západoevropských liší a i přesto, že si nejsou tolik podobné, také spadají do monofyletické skupiny. Na základě existence dvou hlavních fylogenetických skupin se usuzuje, že bobří přežívali poslední dobu ledovou minimálně ve dvou glaciálních refugiích.

Jiná dřívější studie (Babik et al. 2005) se zabývala imunitními geny – konkrétně genem DRB z komplexu MHC (major histocompatibility complex). Geny MHC jsou obecně považovány za nejvíce polymorfní geny u obratlovců (Radwan et al. 2010). Polymorfismus je dlouhodobě udržován balancující selekcí vyvolanou patogeny. Například u lidí mají některé MHC geny až stovky alel, u velkých obratlovců to jsou desítky. Je to proto, že heterozygoti mohou na povrchu svých buněk prezentovat více odlišných patogenních peptidových antigenů, které mohou být následně rozpoznány T-buňkami (Ellegren et al. 1993, Penn et al. 2002, Babik et al. 2005). Z toho vyplývá, že heterozygoti by měli být méně náchylní k infekcím, případně by se jim mohli lépe bránit a tudíž mají oproti homozygotům výhodu (Penn et al. 2002). Navíc by jedinci s více variantami MHC chránícími před infekcí měli mít velkou kompetitivní výhodu oproti parazitovaným jedincům (Babik et al. 2005). Proto je výhodné se pářit s nepříbuznými jedinci, kteří mají různý genotyp. Jejich potomci by spíše

mohli být heterozygoti – takový výběr partnerů se označuje jako MHC-disasortativní páření (Penn et al. 2002). Proto je výhodné, že někteří živočichové, např. myš domácí (*Mus musculus*), dokáží poznat příbuzného jedince na základě podobnosti MHC komplexu (Mannig et al. 1992) a tím pádem si vybrat k páření nepříbuzného jedince. Naproti tomu je variabilita MHC značně snižována bottlenecky a fragmentací populací (Radwan et al. 2010). Ve studii Babika et al. (2005) bylo nalezeno ve všech refugiálních oblastech dohromady jen deset unikátních alel. Ve většině populací byla zafixována jen jedna unikátní alela – byly monomorfní (pro srovnání: např. v malém úseku hybridní zóny dvou poddruhů myši domácí bylo nalezeno 17 alel DRB - Čížková et al. 2011; v sedmi populacích *Arvicola terrestris* se vyskytuje 16 alel – Bryja et al. 2007; u druhu *Spalax ehrenbergi* naopak nebyly nalezeny vůbec žádné geny náležející do podtřídy DR – Nizetić et al. 1987). Jen bobři ze západní Sibíře (*C. f. pohlei*) byli pro gen DRB polymorfní. Byly u nich nalezeny celkem čtyři alely. Přitom žádná z objevených alel nebyla sdílena dvěma nebo více populacemi zároveň. V souladu s tím jsou i výzkumy MHC a použití metody DNA fingerprinting u skandinávských bobrů (Ellegren et al. 1993, Ellegren et al. 1994), které také ukázaly jejich monomorfnost. To odpovídá předpokladu, že v populacích, které prošly bottleneckem, jsou vzácné alely vlivem silného driftu ztraceny (Radwan et al. 2010).

## 2.6 Populační expanze

Je zajímavé, že i přes zjevnou výraznou ztrátu genetické variability došlo u bobra evropského v průběhu 20. století k výrazné populační expanzi po nedávno prodělaném bottlenecku (Nolet & Rosell 1998, Halley & Rosell 2003, Babik et al. 2005). I u populací, které jsou monomorfní pro MHC DRB, byl zaznamenán výrazný vzrůst populačních stavů (Nolet & Rosell 1998, Babik et al. 2005). Je ovšem pravda, že i Radwan et al. (2010) ve svém review píše, že našli řadu studií o druzích, které prodělaly bottleneck a následkem toho mají omezenou MHC variabilitu. Přesto tyto druhy přežily a často se jejich populace i zvětšují. Je ale zajímavé, že přestože většina populací bobra evropského se úspěšně zvětšuje a rozšiřuje svůj areál rozšíření, asijské reliktní populace (*C. f. tuvinicus*, *C. f. pohlei*, *C. f. birulai*) stále zůstávají malé (Nolet & Rosell 1998, Saveljev & Milishnikov 2002, Durka et al. 2005, Batbold et al. 2008). Jen u mongolské populace došlo k mírnému zvýšení početních stavů, nejspíše díky několika provedeným reintrodukcím a translokacím (Nolet & Rosell 1998); navíc jsou zdejší bobři chráněni jako velmi vzácný druh (Batbold et al. 2008).

Z toho tedy vyplývá, že prodělaný rapidní bottleneck neměl drastický vliv na životaschopnost a plodnost bobrů (Ellegren et al. 1993). V některých refugiálních populacích se však vinou snížené genetické variability objevují různé anomálie. Např. u německé labské populace se poměrně často (u 8,7 % jedinců) vyskytují dentální abnormality (Piechocki 1977). Zdá se, že bobři jsou schopní dlouhodobě přežívat v koloniích o velikosti 15 - 30 jedinců (Milishnikov 2004). To by mohlo být způsobeno tím, že jsou díky své populační struktuře do jisté míry tolerantní vůči obdobím inbreedingu (Ellegren et al. 1993). Jak již bylo zmíněno dříve, žijí v malých koloniích, často složených z jedné rodiny. Mladí jedinci kolonii opouštějí. Jejich disperze je omezená jen na rodný vodní systém. Proto je poměrně vysoká pravděpodobnost, že se spolu mohou pářit příbuzní jedinci. Předpokládá se, že takovýto periodický inbreeding by mohl kombinací genetického driftu a selekcí proti recesivním homozygotům očistit genetický pool od škodlivých recesivních alel (Ellegren et al. 1993).

Existují názory, že genetická diverzita by byla nejlépe chráněna a zachována udržováním životaschopných populací ve všech osmi refugiálních oblastech (Nolet & Rosell 1998, Halley & Rosell 2002). Žijí v nich totiž původní bobři, kteří nemají smíšený původ. Při reintrodukcích by pak měli být vysazováni pouze jedinci z nejbližších geografických oblastí (Nolet & Rosell 1998). Minimální efektivní velikost populace byla stanovena na 500 jedinců (i když Milishnikov 2004 stanovil minimální efektivní velikost kolonie jen na 3 až 10 zvířat a označil jí za pravděpodobně nejnižší u savců). Této velikosti dosáhly čtyři západnější evropské refugiální populace (bobři z Rhône, Labe, Norska a Běloruska) a také bobři z Mongolska. Jak už ale bylo zmíněno výše, tři zbývající populace zůstávají stále malé a ani zdaleka nedosahují požadované velikosti (Nolet & Rosell 1998). Důležité je ale znát úroveň genetické variability v těchto oblastech. Podle dřívějších výsledků se zdá, že populace ve Skandinávii (Norsku a Švédsku) mají malou genetickou diverzitu (Ellegren et al. 1993), naopak bobři ve voroněžském refugiu si stále zachovali vysokou genetickou variabilitu (Nolet & Rosell 1998).

Při reintrodukcích se zdá, že po vysazení nejprve dochází k fázi velmi pomalého populačního růstu (tzv. lag fáze) (Hartman 1994). Děje se tak z toho důvodu, že po vysazení mála zvířat na rozsáhlý neobydlený úsek řeky je pro ně obtížné se navzájem nalézt a najít si partnera (Halley & Rosell 2002, Halley & Rosell 2003). Pak ovšem následuje období rychlého růstu populačních stavů (Hartman 1994). Tak tomu bylo například i v Lotyšsku, kde byly do roku 1935 vysazeny 3 páry, v roce 1950 se zde vyskytovalo asi 78 jedinců, v roce 1973 to už bylo 1400 a v roce 1990 tam žilo již asi 50000 bobrů (Halley & Rosell 2002). V ruské Kurganské oblasti došlo k rapidnímu populačnímu růstu po téměř třiceti letech od

vysazení (Starikov & Anchugov 2009). Následně ovšem (v průměru po 25 až 35 letech od kolonizace koryta řeky) bobří vyčerpají potravní zdroje v oblasti, neboť jejich potrava potřebuje poměrně dlouhý čas na regeneraci (Hartman 1994). Z toho důvodu následně dochází i ke snižování stavů bobrů. Bobří nejprve v první fázi osidlují optimální habitaty (a to tak, že často nejdříve osidlují vzdálenější než blízká místa), po jejich vyčerpání se uchylují i do suboptimálních a okrajových oblastí (John et al. 2010). Proto se můžeme setkat i s doporučením, aby byli bobří během fáze růstu částečně loveni (Hartman 1994). Tím by se dalo vyhnout nekontrolovatelné expanzi, vyčerpání potravy a následnému úbytku jedinců. Tato pravidla platí zejména pro oblasti, kde se již nevyskytuje jeden z mála přirozených nepřátel bobra, a tím je vlk (*Canis lupus*). V přítomnosti vlka zřejmě nedochází v počáteční fázi k tak masivní populační explozi (Hartman 1994).

## **2.7 Bottleneck a jeho vliv na populační strukturu velkých evropských savců**

Jak bylo zmíněno již v úvodu, výrazné snížení početních stavů v posledních staletích prodělaly i jiné druhy velkých evropských savců. Je pravděpodobné, že ani u těchto druhů se tato událost neobešla bez následků a je tedy zajímavé porovnat následky těchto bottlenecků na genetickou diverzitu takto postižených populací.

Jedním z nejvýznamnějších historických procesů, které ovlivňovaly genetickou diferenciaci mnoha druhů, byla izolace v různých refugiích – jak glaciálních (Taberlet et al. 1998) tak novodobějších, která vznikala působením člověka v 18. a 19. století. Evropská biota prodělala během posledních pár milionů let velmi výrazné klimatické změny (Taberlet et al. 1998). K významným oscilacím docházelo v průběhu posledních 700 tisíc let. Během čtvrtohor docházelo ke zmenšování a opětovné expanzi areálu rozšíření mnoha druhů, přičemž při snižování teploty docházelo k vymírání severních populací (Taberlet et al. 1998). Tento proces vedl k bottleneckům, jejichž následkem došlo ke ztrátě genetické diverzity. Dá se předpokládat, že největší diverzita by pak měla být v jižních refugiích (Taberlet et al. 1998).

K dalším výrazným bottleneckům pak docházelo i v průběhu 19. století, kdy byly různé druhy velkých evropských savců velmi intenzivně loveny lidmi – např. medvěd hnědý (Taberlet & Bouvet 1994) nebo vydra říční (Hájková et al. 2007).

Stejně jako bobr evropský, tak i medvěd hnědý (*Ursus arctos*) kdysi obýval většinu evropského kontinentu (Taberlet & Bouvet 1994). MtDNA medvěda hnědého jasně ukazuje



na rozdělení do dvou linií – na západno- a východoevropskou, což je zřejmý pozůstatek přežívání čtvrtohorních ledových dob v oddělených refugiích (Sommer & Benecke 2005). Od poloviny 19. století se jeho areál rozšíření vlivem přílišného lovu a ničením vhodného habitatu výrazně zmenšil. V západní, střední i jižní Evropě se v dnešní době vyskytují jen malé izolované populace (Taberlet & Bouvet, 1994, Saarma & Kojola 2007).

Studiem 17 mikrosatelitových lokusů medvěda hnědého byla odhalena silná populační struktura, sestávající ze čtyř geneticky odlišných skupin (Tammeleht et al. 2010). Zatímco tři tyto skupiny jsou omezeny pouze na malé geografické oblasti (Estonsko, jižní Finsko a Leningradská oblast v Rusku), čtvrtá zabírá rozsáhlé území mezi severním Finskem a Archangelskem a Kirovskou oblastí v Rusku. Studie mitochondriální i jaderné DNA ukázaly, že velkou část severozápadní Eurasie obývá jen jedna široce rozšířená genetická skupina. I u medvěda byl při studiu krátkého úseku kontrolní oblasti zaznamenán nízký stupeň genetické variability a to zejména v rámci jednotlivých populací (Taberlet & Bouvet, 1994). Najdou se ovšem i výjimky: populace na středním východě vykazuje vysoký stupeň genetické diverzity (Calvignac et al. 2009). V každé z populací byl také nalezen unikátní mtDNA haplotyp. Jen v místech, kde se setkává více populací je haplotypů výrazně více (Saarma & Kojola 2007). Situace u medvěda je tedy velmi podobná tomu, co se dosud zjistilo o bobru evropském.

Velmi podobná je situace i u vlka obecného (*Canis lupus*) (Taberlet & Bouvet, 1994). V historické době byli vlci rozšířeni po téměř celé holarktidě (Pilot et al. 2006). V dnešní době jsou však západoevropské populace silně fragmentované (Pilot et al. 2006) a to vlivem člověka – snižováním početních stavů lovením, ničením habitatu a úbytkem kořisti (Wayne et al. 1992). I zde obsahuje většina současných populací unikátní mtDNA haplotypy – vlivem genetického driftu se v každé populaci zafixovala jiná alela (Wayne et al. 1992). Celkem bylo ve Starém světě nalezeno 7 haplotypů a všechny jsou si velmi podobné. Ale i v populacích vlka jsou rozdíly – populace ve východní Evropě mají zpravidla více než jeden haplotyp a většina haplotypů je široce rozšířena (Pilot et al. 2006).

Podobný osud jako bobra potkal i vydra říční (*Lutra lutra*). Populační stavy vydry říční se začaly výrazněji snižovat od poloviny 19. století do druhé poloviny 20. století vlivem přílišného lovení, ničením habitatu a potravních zdrojů (Hájková et al. 2007). To vedlo v některých místech k vymření vydry říční a fragmentaci jejích populací v západní a střední Evropě. V poslední době se její stavy opět zvyšují. Studiem mtDNA bylo v evropských populacích objeveno jen 20 různých haplotypů (Mucci et al. 2010). Jejich haplotypová síť má charakter star-like pattern s jedním široce rozšířeným haplotypem, což naznačuje demografickou expanzi – pravděpodobně z jednoho glaciálního refugia. Stejně jako u bobrů, i

u vydry má většina populací jeden nebo jen několik málo haplotypů. Ukázalo se také, že vlivem asi šedesátileté izolace tvoří česká populace geneticky odlišnou skupinu od slovenské populace (Hájková et al. 2007). To bylo potvrzeno i ve studii Mucci et al. 2010.

### 3. MATERIÁL A METODIKA

Pro cíle mé diplomové práce jsem analyzovala krevní a tkáňové vzorky bobra evropského, které se podařilo shromáždit v Laboratoři pro výzkum biodiverzity na katedře zoologie PřF UK v Praze. Tyto vzorky byly získány s podporou grantu Ministerstva životního prostředí České republiky VaV/620/1/03 a SP/2d4/52/07 a také díky mezinárodní spolupráci. Ze sbírek Waltera Durky (UFZ Center for Environmental Research Leipzig-Halle GmbH) pocházejí vzorky z většiny evropských a asijských refugií, od Alexandera Saveljeva (Zhitkov Russian Research Institute of Game Management and Fur Farming) jsou vzorky z východní Evropy a Ruska.

Pro účely mé diplomové práce bylo analyzováno téměř 300 vzorků z celkem 23 populací z České republiky a všech evropských a asijských refugií.

Zaměřila jsem se na studium jaderné DNA pomocí mikrosatelitových lokusů a také na mitochondriální DNA – konkrétně kontrolní oblast (control region mtDNA – CR mtDNA).

DNA byla izolována kitem DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN). Koncentrace DNA nebyla měřena. Izolace poskytla DNA v 300  $\mu$ l pufru. Toto pak bylo použito přímo do dalších reakcí.

#### 3.1 Jaderná DNA

##### 3.1.1 Analýza mikrosatelitových lokusů

Jadernou DNA jsem zkoumala pomocí mikrosatelitových lokusů. Ty do té doby byly použity pouze na bobra kanadského, na bobra evropského však nikoliv. Použili jsme mikrosatelitové lokusy, které byly ve Spojených státech amerických navrženy na příbuzného bobra kanadského (Crawford et al. 2008a, Crawford et al. 2008b, Pelz-Serrano et al. 2009). U kanadských bobrů bylo navrženo 19 lokusů, přičemž většina z nich byla poměrně polymorfních. Pro všechny tyto lokusy byla provedena cross-species amplifikace u bobra evropského (Pelz-Serrano et al. 2009). Úspěšně amplifikovat se podařilo 12 z dříve publikovaných lokusů. Ty však nejsou tolik polymorfní jako u *C. canadensis* – tři lokusy jsou u bobra evropského dokonce monomorfní. Použití mikrosatelitových lokusů by mohlo umožnit studium na populační úrovni a také by mohlo vést k lepšímu managementu ochrany těchto druhů.

Pro studium jaderné DNA jsem použila 12 lokusů: Cca4, Cca5, Cca8, Cca13, Cca18, Cca 19 (Crawford et al. 2008b); Cca20, Cca56, Cca62, Cca76, Cca92 a Cca112 (Pelz-Serrano et al. 2009). Bližší specifikace lokusů viz. tab. 1. Ve výsledných analýzách se ale počítá jen s

11 z nich. V průběhu laboratorních prací byly totiž vyměněny kapiláry na sekvenátoru v Laboratoři sekvenace DNA na UK, kde byly vzorky zpracovávány. To mělo za následek posun ve velikosti alel vůči standardu oproti situaci před výměnou kapilár. Tento efekt se u jedenácti lokusů podařilo odfiltrout. Lokus Cca112 ale musel být z dalších analýz vyřazen.

Z použitých fluorescenčně značených primerů se podařilo odladit jeden multiplex. Primery byly ze zásobního roztoku smíchány do jednoho primer mixu. Koncentrace primerů v zásobním roztoku byla 0,1 mM. Množství používaných primerů je znázorněné v tabulce 1. Následně byla směs primerů doplněna do 100  $\mu$ l destilovanou vodou (tedy 37,4  $\mu$ l).

Lokus	Značení	Sekvence primeru	Množství použité pro 100 $\mu$ l pr. mix ( $\mu$ l)
Cca4	FAM	F: GATTTTCAGACACAGCCACCA	4
		R: AGTGATGGGATTGAACTCCAG	4
Cca5	VIC	F: TGCTTTCATCTGCTCTATGAAAAT	0,3
		R: CAGTGATGAAGGGAAGAGGAA	0,3
Cca8	PET	F: GGGCTCAGAGGAAAAAGGAG	8
		R: GATCAGGCAAAAGGCTGGTA	8
Cca13	VIC	F: CCCTAGACTTTGATTATACGG	1
		R: AGGTTGCCTAGAGAGAGGTGTG	1
Cca18	PET	F: CTGCTGTGGGATCTTGGATT	4
		R: TGGTATGTGCTACACAGAAAACAA	4
Cca19	FAM	F: CAGGAGATGGAGACAAAAGGAT*	2
		R: GCCATACGTAGTCCCCTTTG*	2
Cca20	PET	F: AGGAATAAGGCTGCATTGGAT*	2
		R: GGTGTGTGGTTCAAGTGCAA*	2
Cca56	NED	F: GCAGAGCACCAATAAAATCC	2
		R: CAAGAGTCCAGTGTGTGCTG*	2
Cca62	VIC	F: CCAAGTGAATTAACATACCCATCA*	2
		R: GAAAATCCCGGAGAATGGAT*	2
Cca76	PET	F: CCCATAGAACCCAAAGCAG	2
		R: CCATGCTATGTGGCATTTTT*	2
Cca92	NED	F: TCCTTGACTCTGGGCATG	2
		R: ACTGTGGAAGCTCTGGGAGT*	2
Cca112	FAM	F: CCCAAAAAAGATGTTCTT	2
		R: TCTAAACCAGCAAAGTCAA*	2

Tab. 1: Použité primery, jejich sekvence a množství ve 100  $\mu$ l pr. mixu. F – forward,

R - reverse, \* primery s jinými sekvencemi, než byly navržané pro *C. canadensis*

Na PCR jsem použila 3  $\mu$ l DNA a 5  $\mu$ l reakční směsi. Celkový objem na jeden vzorek byl tedy 8  $\mu$ l. Reakční směs byla namíchána ze 4  $\mu$ l Type-it Multiplex PCR Master Mix, 2x (Qiagen) a 1  $\mu$ l primer mixu (tab. 2).

### 3.1.2 PCR mikrosatelitových lokusů a fragmentační analýza

Všechny PCR reakce byly prováděny v thermocyleru Mastercycler (Eppendorf, Německo).

Program PCR viz. tab. 3.

Složky PCR směsi	Objem na 1 vzorek (μl)
Type-it Multiplex PCR MM	4
Primer mix	1
DNA	3
Celkový objem	8

Tab. 2: Protokol na PCR mikrosatelitových lokusů

Teplota	Délka	Počet cyklů
95 °C	5 min	1x
95 °C	30 s	
56 °C	90 s	30x
72 °C	30 s	
60 °C	30 min	1x

Tab. 3: Program PCR pro mikrosatelitové lokusy

V dalším kroku byly PCR produkty připraveny na fragmentační analýzu. K odečtení délky amplifikovaných fragmentů byl použit standard Gene Scan 500LIZ size standard (Applied Biosystems). Na jeden vzorek se připravovala směs z 9 μl formamidu a 0,25 μl standardu. Do konečné reakce bylo použito 9 μl této směsi a 1 μl PCR produktu. Takto připravené vzorky byly denaturovány při 95 °C po dobu 2 minut. Fragmentační analýza byla provedena v Laboratoři sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě UK.

### 3.1.3 Identifikace alel

Data, která jsem získala fragmentační analýzou, jsem dále manuálně zpracovávala v programu GeneMarker (Softgenetics). V tomto programu byly od použitého standardu odečteny velikosti jednotlivých alel pro každý lokus a každého jedince. Ty byly následně zaznamenány do tabulky v Excelu.

### 3.1.4 Analýza dat

Jednoduchá statistika byla počítána v programu R 2.13.0. V programu Cervus 3.0.3 (Field Genetics) byly zjištěny počty alel na jednotlivých lokusech a vypočítány hodnoty obou heterozygotností – očekávané  $H(\text{Exp})$  a pozorované  $H(\text{Obs})$  heterozygotnosti.

Pokud je populace rozdělená na subpopulace, jsou tyto subpopulace méně heterozygotní, než by bylo v nedělené populaci. Genetický drift způsobuje, že v malých populacích se ustálí jiné frekvence alel a k zafixování alel dojde rychleji než ve větších nediferencovaných populacích. Pokles heterozygotnosti způsobený rozdělením populace se obvykle stanovuje použitím F-statistiky. Párové  $F_{ST}$  mezi populacemi a jeho průkaznost jsem získala pomocí programu GenAlEx6 (Peakall & Smouse 2006).  $F_{ST}$  jako jeden z typů F-statistiky popisuje distribuci genetické diverzity uvnitř a mezi populacemi. Také se mu říká fixační index.  $F_{ST}$  je inbreední koeficient uvnitř subpopulací vztažený ke koeficientu celkovému. Vyjadřuje míru genetické rozdílnosti mezi subpopulacemi, tzn. jaký má vliv rozdělení populace na subpopulace. Dosahuje hodnot 0 až 1. Čím je hodnota  $F_{ST}$  nižší, tím jsou si jednotlivé populace více podobné. Wright (1978) navrhl pro jednoduché 2-alelické systémy, že hodnoty větší než 0,25 již naznačují značnou odlišnost populací. Pro hypervariabilní markery s mnoha alelami mohou být hodnoty výrazně nižší. Pokud jsou všechny subpopulace v Hardy-Weinbergově rovnováze se stejnou frekvencí alel, potom se  $F_{ST}$  rovná nule. Lze ho definovat jako míru odlišnosti mezi heterozygotností uvnitř populace (mezi subpopulacemi) a potenciální frekvencí heterozygotů v populaci, která by nastala za předpokladu, že by se jedinci pářili náhodně a neasortativně. Podle Wrighta se počítá:

$$F_{ST} = (H_T - H_S) / H_T = 1 - (H_S / H_T)$$

V programu GenAlEx se analogicky k  $F_{ST}$  pro kodominantní-genotypová data používá odhad  $\Phi_{PT}$ . V tomto případě je potlačena variabilita uvnitř jedinců. Vzorec pro výpočet je:

$$\Phi_{PT} = V_{AP} / (V_{AP} + V_{WP})$$

$V_{AP}$  je variabilita mezi populacemi,  $V_{WP}$  je variabilita uvnitř populací.

V tomtéž programu jsem vypočítala analýzu molekulární variance (AMOVA), která vyjadřuje poměr variability v rámci a mezi populacemi. Amova je metoda odhadu populační diferenciace přímo z molekulárních dat.

V GenAlExu jsem získala i seznam privátních alel vyskytujících se v jednotlivých populacích.

Fstat 2.9.3 (Goudet 2001) byl použit pro zjištění počtu alel na jednotlivých lokusech v jednotlivých populacích. Dalšími z výstupů tohoto programu byly také výpočty Fis pro

jednotlivé populace a stanovení genové diverzity. Genová diverzita je průměrná očekávaná heterozygotnost na lokus v populaci. Fis je inbreední koeficient individuí vztažený na subpopulaci. Vyjadřuje míru snížení heterozygotnosti individua vlivem nenáhodného páření uvnitř subpopulace.

$$F_{is} = 1 - (H_i/H_s)$$

V programu Genetix 4.05.2 byla provedena korespondenční analýza. Ta je vhodná pro analýzu mnohorozměrných kategorizovaných dat a pátrá po vnitřní struktuře v datech – to, zda jsou si některé objekty bližší než ostatní (Zima et al. 2004). Dokáže snížit původní počet proměnných na menší počet transformovaných proměnných.

Program Structure 2.3.3 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003, Falush et al. 2007) rozděluje jedince do K skupin (clusterů). Je to volně dostupný software, který používá genotypová data pro vyřešení populační struktury. Dokáže odvodit přítomnost odlišných populací a zařadit do nich jedince. Použit byl admixture model, který předpokládá smíšený původ jedinců (jedinci zdělili části svého genomu od předků z různých populací). Analýza byla nastavena na 300 000 burn-in a počet MCMC opakování byl 600 000. Hodnota K byla nastavena na 1 - 17 a pro každou se počítalo 10 iterací.

CorrSieve 1.6-1 (Campana et al. 2011) filtruje výstupy Q hodnot z programu Structure. CorrSieve byl použit pro výpočet  $\Delta K$  a  $\Delta F_{ST}$ . Tyto výpočty pomáhají určit hodnotu optimálního K.

StructureSum (Ehrich et al. 2007) byl použit pro shrnutí výstupů z programu Structure. Všechny výpočty zde provedené slouží k určení optimální hodnoty K. Jsou to grafická znázornění  $\ln P(D)$ , koeficientu podobnosti mezi všemi dvojicemi běhů ze Strukturu pro dané K,  $\Delta K$  (snaží se určit optimální K metodou podle Evano et al. 2005) a koeficient zvaný clusteredness, který popisuje, zda jsou jedinci zařazeni spíše do jednotlivých skupin (každý jedinec je s velkou pravděpodobností zařazen do jediné skupiny) než do kombinace několika skupin (jedinci jsou spíše buď hybridního původu nebo je jejich zařazení nejasné). Zároveň se zde vytváří průměry Q matic pro individua, které jsou výstupem z programu Structure. Tato průměrná matice pak slouží jako vstupní soubor pro program Distruct.

Pro odhalení populační struktury byly použity ještě programy BAPS (Bayesian Analysis of Population Structure; Corander & Marttinen 2006, Corander et al. 2008) a TESS. BAPS byl spuštěn vícekrát s různým nastavením pro K max. Jako model byl zvolen admixture. V programu TESS byly nastaveny parametry pro výpočet následujícím způsobem: počet

skupin byl pro různé běhy nastaven na  $K = 2, 3, 4, \dots, 15$ , pro každé deset opakování. Celkový počet kroků byl 200 000, z toho burn-in 50 000. Použitý model byl opět s admixture.

Pro grafické znázornění populační struktury byl použit program Distruct (Rosenberg 2004). Jako zdrojová data se použily výstupy z programu Structure, BAPS a TESS – Q matice pro individua a pro populace.

## 3.2 Mitochondriální DNA

### 3.2.1 Protokol na PCR CR mtDNA

Použity byly dva primery: Thr-L15926 (5'-CAATTCCCCGGTCTTGTAACCC-3') a DL-H16340 (5'-CCTGAAGTAGGAACCCAGATG-3') (Durka et al. 2005), které amplifikují kontrolní oblast mitochondriální DNA.

Primery byly nejprve ze zásobního roztoku (koncentrace 0,1 mM) desetkrát naředěny destilovanou vodou (v poměru 1 : 9) na výslednou koncentraci 0,01 mM. PCR jsem provedla v celkovém objemu 30  $\mu$ l na jeden vzorek. Použila jsem 10  $\mu$ l DNA a 20  $\mu$ l reakční směsi. Na PCR byla použita polymeráza a pufr DNA polymerase a Reaction Buffer 10x s 2 mM  $MgCl_2$  (Biotools). Protokol viz tab. 4.

### 3.2.2. Kroky PCR CR mtDNA

Všechny PCR reakce byly opět prováděny na thermocycleru Mastercycler (Eppendorf, Německo). Protokol viz. tab. 5.

Složky PCR směsi	Objem na 1 vzorek ( $\mu$ l)	Zdrojová koncentrace
Pufr	3	
dNTPs	3	2 mM
Primer F	2	0,01 mM
Primer R	2	0,01 mM
polymeráza	0,2	
H <sub>2</sub> O	9,8	
DNA	10	
Celkový objem	30	

Tab. 4: Protokol na PCR CR mtDNA



Teplota	Délka	Počet cyklů
96 °C	4 min	1x
96 °C	40 s	
55 °C	45 s	35x
72 °C	60 s	
72 °C	10 min	1x

Tab. 5: Program na PCR pro CR mtDNA

### 3.2.3 Elektroforéza a sekvenace

Výsledek PCR byl kontrolován pomocí elektroforézy na agarózovém gelu. Použila jsem gel 1 %. Pro kontrolu správného průběhu elektroforézy se ke vzorkům na gel přidával standard GeneRuler 100bp Plus DNA Ladder (Fermentas). Elektroforéza byla nastavená na napětí 100 V a běžela po dobu 30 minut. Po tuto dobu migrovaly vzorky DNA ke kladné elektrodě (anoda). V případě, že PCR proběhla zdárně, byly vzorky odeslány na sekvenaci do korejské firmy Macrogen. Odesláno bylo veškeré zbývající množství PCR produktů (tedy 25 µl od každého vzorku) a naředěný forward primer, který byl použit už při amplifikaci (v případě oboustranné sekvenace se odesílal forward i reverse primer). Primery se posílaly v samostatných zkumavkách (jejich koncentrace byla 0,01 mM) a to v množství 10 µl na každý z prvních pěti vzorků a 5 µl na každý další vzorek.

### 3.2.4 Editace sekvencí

Z přichozích sekvencí jsem v případě oboustranné sekvenace vytvořila v programu DNA Baser 3.2.5 (Heracle Software, Lilienthal, Německo) contig. Tím jsem obě sekvence spojila v jednu výslednou, která byla zároveň i o něco delší a lépe se hodila pro následné analýzy.

Sekvence jsem editovala a alignovala v programu BioEdit 7.0.9.0 (Hall 1999) s pomocí Clustal W (Thompson et al. 1994). Případné chyby v sekvencích, způsobené špatným rozpoznáním programem, byly opraveny manuálně. Výsledná délka sekvencí byla upravena na 489 bází.

### 3.2.5 Analýza dat

Celkem se mi podařilo získat 142 sekvencí. Pro účely analýzy jsem do mého datasetu použila i data uvedená v práci Durka et al. (2005), kde bylo osekvenováno 152 jedinců pocházejících

z většiny refugiálních oblastí. Výsledky této i předchozí práce Ducroz et al. (2005) jsou uloženy v genetické bance (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>; přístupové kódy AY623632-43 a DQ088700-03). Šestnáct unikátních haplotypů, které jsou zde uloženy, bylo použito jako referenčních pro porovnání s našimi vzorky.

Data jsem si rozdělila do jednotlivých haplotypů v online programu FaBox, ve kterém jsem si připravila i vstupní soubor pro další analýzy.

Pro znázornění vztahů mezi haplotypy jsem použila dva programy. V programu Network 4.6.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com>, Bandelt et al. 1999) byla metodou Median-joining vytvořena haplotypová síť. Pro kontrolu a podporu výsledků jsem použila ještě program TCS1.21 (Clement et al. 2000).

Pro odhad polymorfismu DNA jsem použila nukleotidovou a haplotypovou diverzitu. Obě jsem vypočítala v programu DnaSP5.10.01 (Librado & Rozas 2009). Nukleotidová diverzita se označuje jako  $\pi$  a představuje průměrný počet rozdílných nukleotidů mezi dvěma sekvencemi DNA. Odhad nukleotidové diverzity získáme standardizací průměrného počtu párových nukleotidových rozdílů ( $\Pi$ ) přes celkovou délku sekvence DNA ( $L$ ). Pokud je páření v populaci náhodné (panmiktické), potom je nukleotidová diverzita odhadem heterozygotnosti na molekulární úrovni.

$$\pi = \Pi/L$$

Haplotypová diverzita se pak dá vypočítat podle vztahu:

$$\Pi = \frac{N}{N-1} \sum_i x_i^2$$

Jako další z výstupů programu DnaSP jsem získala hodnoty Tajimova D. Jeho účelem je rozlišit mezi DNA sekvencemi vyvíjejícími se náhodně (neutrálně) a vyvíjejícími se nenáhodnými procesy (directional selekce a balancing selekce, demografické expanze nebo kontrakce, genetic hitchhiking nebo introgrese). Frekvence neutrálních mutací se v populaci mění náhodně vlivem genetického driftu. Síla genetického driftu závisí na populační velikosti. Úkolem Tajimova D je identifikovat sekvence, které neodpovídají modelu neutrální teorie při rovnováze mezi mutacemi a genetickým driftem. Negativní hodnota znamená nadbytek low frequency polymorfismů, což naznačuje populační expanzi (např. po bottlenecku nebo selekčním vymetení) a/nebo purifying selekci. Pozitivní Tajimovo D znamená nízkou úroveň low a high frequency polymorfismů, naznačující snížení populační velikosti a/nebo balancing selekci.

AMOVA pro sekvenční data byla vypočítána v programu GenAlEx6. Snaží se určit genetickou strukturu porovnáním jednotlivých haplotypů a jejich frekvence v populaci. Umožňuje hierarchické rozdělení genetické variability mezi populacemi a odhad F statistik.

## 4. VÝSLEDKY

### 4.1 Základní charakteristika mikrosatelitových lokusů a populací

Celkem se nám podařilo získat a analyzovat vzorky 283 jedinců z 23 oblastí Eurasie (tab. 7) – viz. Appendix. V těchto oblastech je zahrnuto i všech osm refugií, ve kterých bobr přežíval na konci 19. století. Všechny ostatní populace vznikly samovolným šířením z těchto refugií, nebo záměrným vysazováním. Pro analýzy bylo nakonec použito celkem 11 mikrosatelitových lokusů.

V našich populacích jsou všechny lokusy polymorfní. Počet alel byl ale poměrně nízký, v rozpětí od dvou do sedmi alel na lokus. To je výrazně méně, než bylo zjištěno u populací bobra kanadského. Tomu odpovídají i poměrně nízké hodnoty heterozygotností. Pouze u lokusu Cca76 byla hodnota pozorované heterozygotnosti vyšší než 0,5 a také jen pro tento lokus byla pozorovaná heterozygotnost vyšší než hodnota očekávané heterozygotnosti. Pro všechny ostatní lokusy byla  $H(\text{Obs})$  výrazně nižší než  $H(\text{Exp})$ . Pozorovaná heterozygotnost se pohybovala od 0,007 do 0,583 (tab. 6).

Lokusy	Počet alel	<i>C. fiber</i>			<i>C. canadensis</i>		
		N	H(Obs)	H(Exp)	Počet alel	H(Obs)	H(Exp)
Cca19	7	283	0.314	0.726	12	0.87	0.82
Cca4	7	254	0.339	0.796	10	0.70	0.77
Cca5	4	271	0.166	0.343	11	0.32	0.62
Cca62	6	282	0.301	0.744	7	0.46	0.82
Cca13	4	283	0.261	0.634	6	0.45	0.48
Cca92	5	281	0.281	0.577	6	0.56	0.76
Cca56	5	282	0.216	0.667	5	0.36	0.33
Cca20	2	280	0.007	0.108	7	0.23	0.78
Cca76	2	283	0.583	0.491	12	0.56	0.78
Cca18	2	283	0.184	0.394	5	0.50	0.51
Cca8	4	225	0.173	0.613	10	0.80	0.84

Tab. 6: Základní charakteristiky jednotlivých lokusů.  $N$  představuje počet zgenotypovaných jedinců,  $H(\text{obs})$  je pozorovaná heterozygotnost a  $H(\text{Exp})$  je očekávaná heterozygotnost. Pro srovnání jsou uvedeny i údaje z literatury o *C. canadensis* (Crawford et al. 2008b, Pelz-Serrano et al. 2009)

Fis vyjadřuje snížení heterozygotnosti jedince vinou nenáhodného páření v populaci. Vysoké hodnoty Fis by pak měly naznačovat vysokou míru inbreedingu. Hodnoty Fis, které jsme získali pro námi studované populace jsou celkem nízké a proto tedy nenaznačují, že by v současné době docházelo v jednotlivých subpopulacích k inbreedingu.

Z tabulky 7 je jasné vidět, že nově založené populace mají vyšší průměrný počet alel na lokus (jednostranný Wilcoxon rank sum test,  $W = 37.5$ ,  $p\text{-value} = 0.04188$ ). V refugiálních populacích je nejméně 1,182 alely na lokus (Francie, Tuva, Mongolsko) a nejvíce 2,364 (běloruský Minsk). V nově založených populacích pak tato proměnná dosahuje hodnot 1,273 (Bavorsko a Durynsko, což jsou populace jen s jedním studovaným jedincem) až 2,727 (Litva). Z toho tedy vyplývá, že nové populace jsou o poznání heterogennější než refugia.

Tomu odpovídají i hodnoty genové diverzity, které představují průměrné očekávané heterozygotnosti. Výrazně vyšší (jednostranný Wilcoxon rank sum test,  $W = 7$ ,  $p\text{-value} = 0.001931$ ) jsou v reintrodukovaných populacích (od 0,125 v ČR na Labi do 0,419 v Českém lese) než v refugiích (0,056 v Mongolsku a Tuvě až 0,325 v Minsku). To tedy znamená, že nově založené populace jsou výrazně heterozygotnější (tab. 7).

Populace	Počet jedinců	Fis	Průměrný počet alel na lokus	Genová diverzita
<b>Refugia:</b>				
Francie	8	0,243	1,182	0,060
Německo - Labe	20	-0,073	1,273	0,096
Norsko	17	-0,181	1,546	0,243
Bělorusko - Grodno	5	0,042	2,000	0,323
Bělorusko - Minsk	21	-0,157	2,364	0,325
Bělorusko - Gomel'	1	*	1,500	*
Bělorusko - Vitebsk	7	-0,488	1,636	0,262
Rusko - Voroněž	16	0,044	1,546	0,190
Rusko - Tuva	43	-0,172	1,182	0,056
Rusko - Yugra	9	0,371	1,364	0,112
Mongolsko	7	-0,121	1,182	0,056
<b>Nově založené populace:</b>				
Polsko	7	0,175	2,273	0,359
Litva	34	0,013	2,727	0,392
Česká republika - Labe	15	-0,338	1,455	0,125
Německo - Bavorsko	1	*	1,273	*
Německo - Durynsko	1	*	1,273	*
Česká republika - Český les	7	0,163	2,182	0,419
Česká republika - Kladensko	1	*	1,333	*
Rumunsko	1	*	1,546	*
Česká republika - jižní Morava	35	0,018	2,546	0,399
Česká republika - Litovelské				
Pomoraví	5	-0,156	2,000	0,393
Rusko - Kirov	17	-0,015	2,273	0,365
Rusko - Sibiř	5	-0,143	2,091	0,318

Tab. 7: Charakteristika jednotlivých populací. \*Hodnoty Fis a genové diverzity není možné počítat pro populace s jedním jedincem.

## 4.2 AMOVA a párové Fst

Do těchto analýz byly zahrnuty pouze populace čítající více než jednoho jedince. Vyřazeno bylo proto pět populací (Bělorusko-Gomel', z Německa Bavorsko a Durynsko, Z České republiky kladenská populace a jedinec z Rumunska).

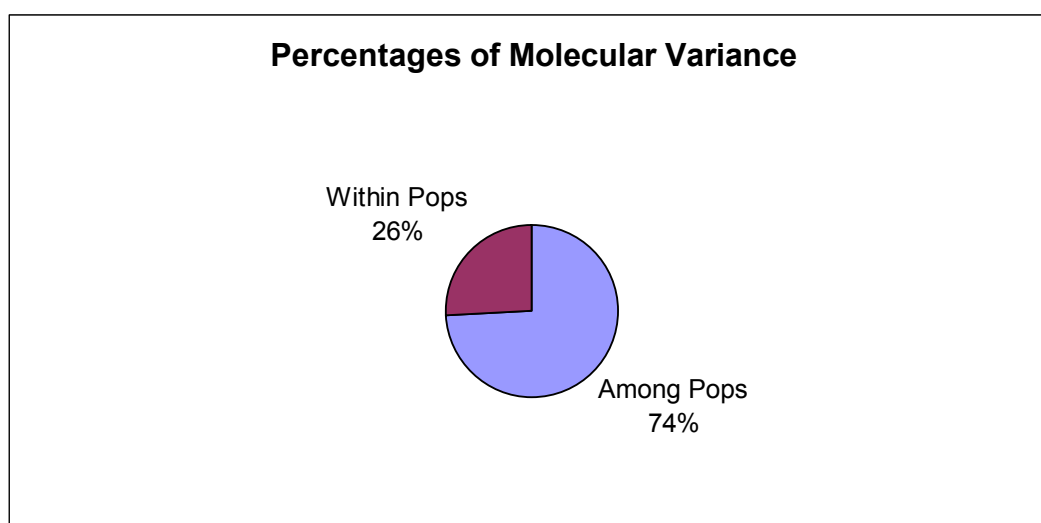
### 4.2.1 AMOVA

Analýza molekulární variance jasně ukázala, že největší část variability (74 %) se dá vysvětlit rozdělením na subpopulace a že je tedy toto dělení oprávněné. Mnohem méně variability (26 %) se pak vyskytuje v rámci populací (tab. 8 a graf 1). I hodnota  $\Phi_{ST}$  (je analogické  $F_{ST}$ ) jasně ukazuje na vysokou diferenciaci jednotlivých populací a je jednoznačně průkazná (tab. 8).

Source	Stupně volnosti	SS	MS	Est. Var.	%
Mezi populacemi	17	1938,502	114,030	7,445	74 %
V rámci populací	260	673,204	2,589	2,589	26 %
Celkem	277	2611,706	116,619	10,035	

Stat	Value	Prob
$\Phi_{ST}$	0,742	< 0,001

Tab. 8: Výsledky analýzy molekulární variance pro mikrosatelitová data



Graf 1: Graf znázorňující výsledek výpočtu AMOVA- rozdělení genetické variability v rámci a mezi populacemi.

#### 4.2.2 Párové Fst

Párové Fst bylo vypočítáno podle Weira a Cockerhama (1984) a je uvedeno v tabulce 9. Takovéto Fst je opatřeno korekcí na velikost vzorku a počet subpopulací. Byly vzájemně porovnávány všechny populace (čítající více než jednoho jedince), aby bylo možné posoudit jejich rozrůznění. Takováto míra rozdílnosti subpopulací je způsobena snížením genetického toku a následným výrazným vlivem genetického driftu na jednotlivé subpopulace.

Kromě tří hodnot (zvýrazněny červeně) byly všechny signifikantní (tj.  $p < 0,05$ ). Velmi vysoké hodnoty, které se při párovém srovnání často objevily, naznačují velmi vysokou diferenciaci populací. V některých případech (např. při srovnání populací z Francie, Německa či z Tuvy s ostatními populacemi) se tyto hodnoty téměř blíží k jedné. Znamená to, že v těchto subpopulacích jsou fixovány alternativní alely.

Jedny z nejnižších hodnot vyšly při porovnání populací z Německa (Labe) a české části toku Labe (0,0271), běloruských populací z Minsku a Grodna (0,0190) a bobrů z Grodna a Litovelského Pomoraví (0,1610). Tyto hodnoty vyšly navíc nesignifikantně. Tyto údaje naznačují, že jsou si porovnávané populace navzájem podobné.

Očividné jsou i vysoké hodnoty při srovnání francouzských bobrů se všemi ostatními (až 0,9658 Francie – Tuva). Nápadná je výrazně nižší hodnota při porovnání Francie – Český les (0,3891), což by naznačovalo vzájemnou podobnost těchto dvou populací. Obdobná je situace i u německých jedinců. Hodnoty párového srovnání dosáhly až 0,9568 (Německo – Tuva). Jediná výrazně nižší je pro Německo – Labe (0,0271). Velmi odlišné od ostatních jsou i populace z Norska, Tuvy, Yugry a Mongolska.

O něco nižší hodnoty a tedy i větší podobnost se ukázala při vzájemném porovnávání východoevropských populací (Polsko, Litva, Grodno, Minsk, Vitebsk) a také při jejich srovnání s bobry z Litovelského Pomoraví a jižní Moravy.

Německo	0,9304																
Norsko	0,8360	0,8699															
Polsko	0,7885	0,8562	0,6179														
Litva	0,7070	0,7749	0,5409	0,1899													
Grodno	0,8413	0,8848	0,7011	0,3919	0,3409												
Minsk	0,7939	0,8449	0,6761	0,3652	0,3355	0,0190											
Vitebsk	0,9083	0,9184	0,7622	0,3843	0,1491	0,6805	0,6378										
Voroněž	0,8622	0,8961	0,8151	0,5867	0,5880	0,7310	0,6855	0,7650									
Tuva	0,9658	0,9568	0,8916	0,8898	0,8095	0,9326	0,8864	0,9455	0,9325								
Yugra auth. distr.	0,9163	0,9159	0,8218	0,6765	0,6184	0,8010	0,7579	0,8250	0,7899	0,9517							
Mongolsko	0,9520	0,9343	0,8341	0,7725	0,7326	0,8788	0,8339	0,9195	0,8740	0,9390	0,8684						
Labe	0,9315	0,0271	0,8572	0,8394	0,7525	0,8734	0,8297	0,9164	0,8915	0,9586	0,9130	0,9377					
Český les jižní Morava	0,3891	0,8311	0,6395	0,4703	0,4938	0,5211	0,5967	0,5944	0,7029	0,9098	0,7326	0,7730	0,8067				
Litovelské Pomoraví	0,6456	0,7322	0,4296	0,3243	0,3028	0,3140	0,2926	0,5144	0,5482	0,7805	0,6074	0,6790	0,7038	0,4580			
	0,8262	0,8901	0,5953	0,1948	0,1409	0,1610	0,1922	0,5569	0,6777	0,9188	0,7582	0,8485	0,8800	0,4752	0,2076		
Kirov	0,7433	0,8234	0,6195	0,2483	0,2117	0,4336	0,4588	0,3573	0,4708	0,8688	0,6076	0,7530	0,8032	0,4817	0,2782	0,2848	
Sibiř	0,8443	0,8933	0,7090	0,2444	0,3026	0,5592	0,5163	0,6093	0,5788	0,9325	0,6032	0,8587	0,8862	0,4607	0,2902	0,3910	0,2059
	Francie	Německo	Norsko	Polsko	Litva	Grodno	Minsk	Vitebsk	Voroněž	Tuva	Yugra auth. distr.	Mon- golsko	Labe	Český les	jižní Morava	Lit. Pomor.	Kirov

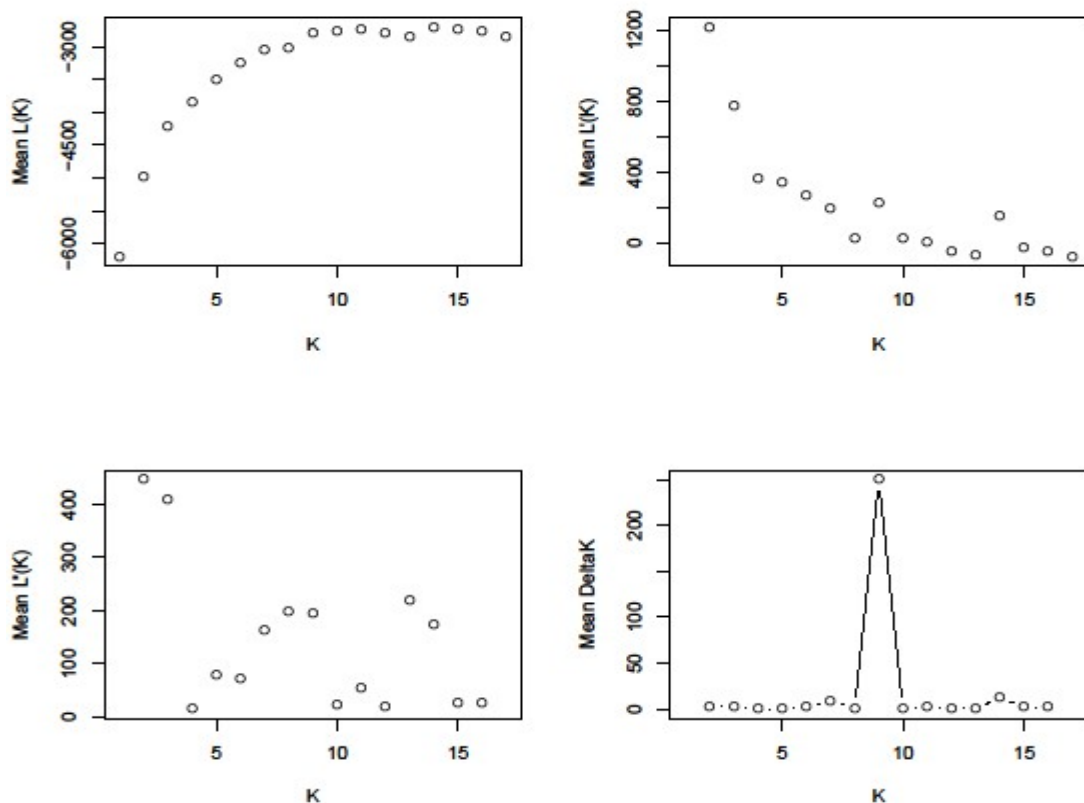
Tab. 9: Párové *Fst* pro dvojice populací obsahující více než jednoho jedince. Hladina průkaznosti byla nastavena na 0,05. Červené hodnoty jsou neprůkazné, ostatní hodnoty jsou signifikantní. Žluté  $0,05 > p > 0,001$  a neoznačené  $p \leq 0,001$ .



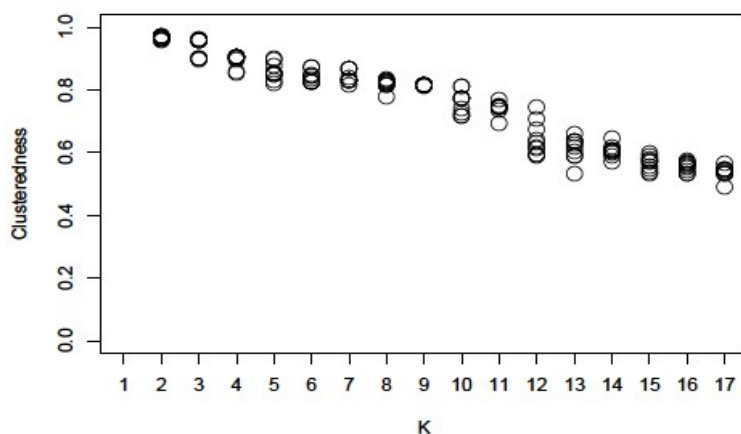
### 4.3 Odvození populační struktury

Do těchto analýz byli zahrnuti úplně všichni jedinci ze všech 23 populací. Populační strukturu jsem se pokusila určit použitím tří programů – Structure, BAPS a TESS.

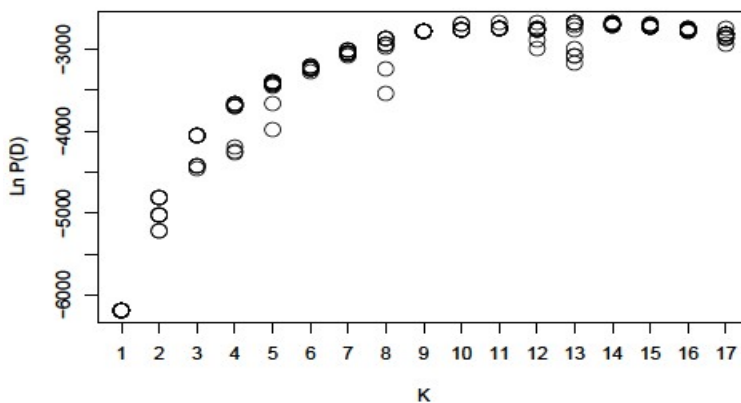
Pro výpočty z programu Structure se jako optimální ukázalo rozdělení jedinců do devíti skupin ( $K = 9$ ). Potvrdily to i výsledky z programu StructureSum, který právě slouží k určení optimálního počtu skupin. Při porovnání průměrných  $\Delta K$  pro všechna  $K$  podle Evano et al. 2005 je jasně viditelný vrchol v  $K = 9$  (graf 2). A i u ostatních výstupů je zřejmé, že spolu nejlépe konvergují běhy právě pro  $K = 9$  (graf 3, graf 4 a graf 5). Metodou popsanou v Campana et al. 2011, kdy se zkoumají změny v hodnotách  $F_{st}$  vůči jednotlivým  $K$ , byla hodnota optimálního  $K$  stanovena na  $K = 2$  (graf 6). To však není biologicky příliš validní a proto se dá předpokládat, že správnější bude rozdělení na devět skupin. I Campana et al. totiž píše, že v některých případech je pro určení  $K$  vhodnější použít metodu sledující  $\Delta K$  a v jiných případech  $\Delta F_{ST}$ .



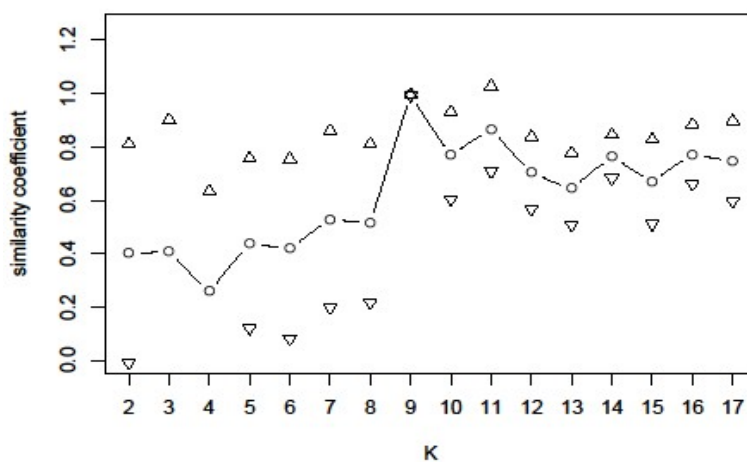
Graf 2: Metoda určení optimálního  $K$  podle metody Evano et al. 2005. Hodnota správného  $K$  se dá nejlépe odvodit z grafu pro průměrné  $\Delta K$  – vytváří jasný peak.



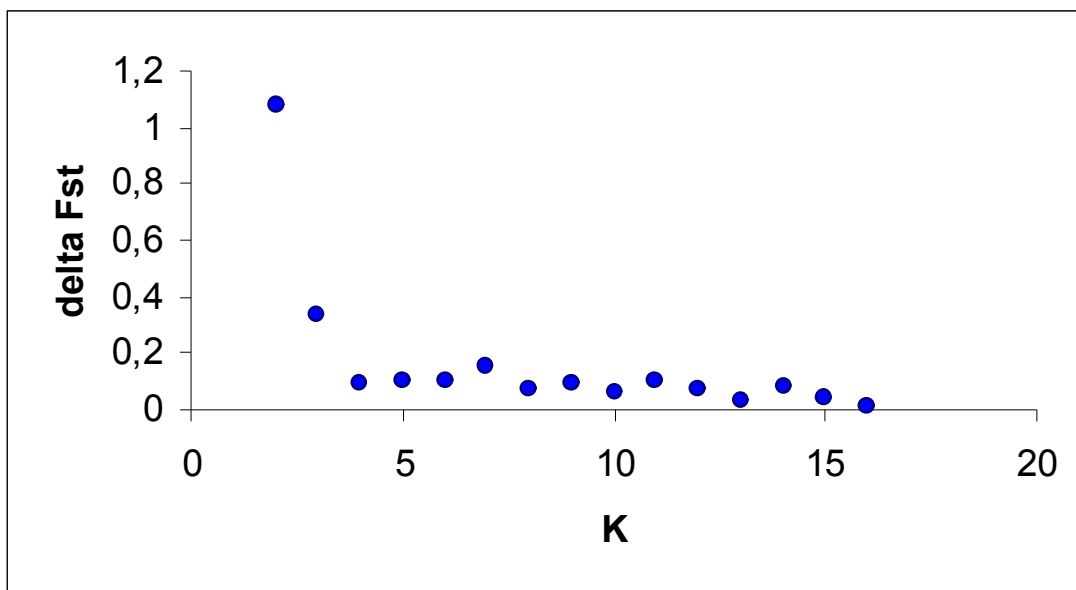
Graf 3: Grafické znázornění koeficientu zvaného Clusteredness, který ukazuje, zda jsou konkrétní jedinci zařazeni spíše do jedné skupiny než do kombinace několika skupin, což by naznačovalo nejspíše hybridní původ



Graf 4: Odhad posteriorních pravděpodobností pro jednotlivá K

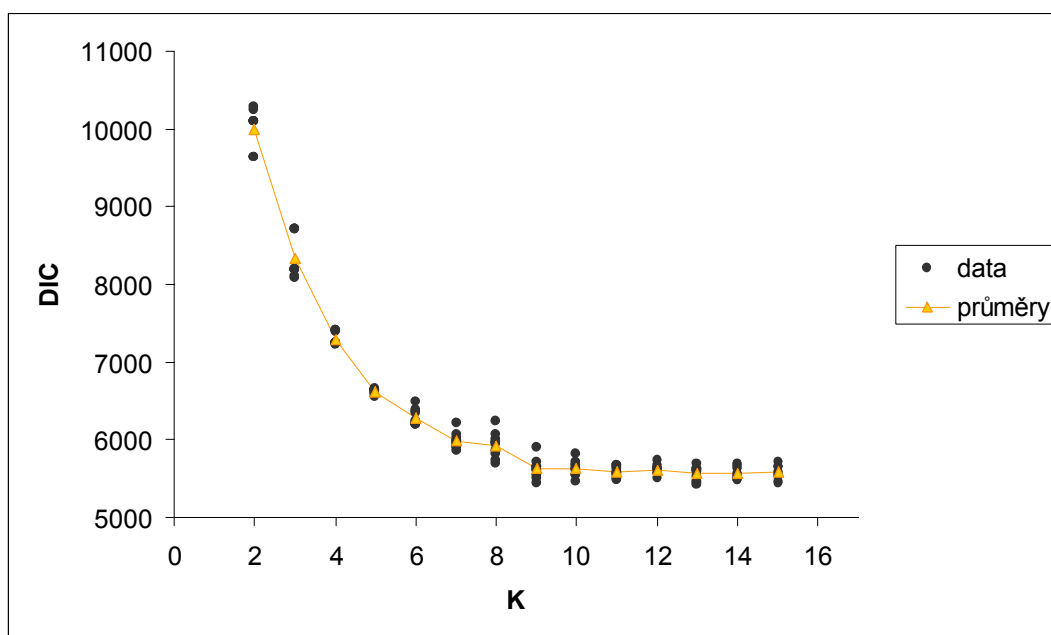


Graf 5: Koeficient podobnosti jednotlivých běhů pro každé K



Graf 6: Metoda určení optimálního K podle metody navržené Campanem et al. 2011

V programu TESS jsme optimální hodnotu K určili porovnáním hodnot DIC (výstup z programu) pro jednotlivé běhy. Jako ideální se ukázala ta hodnota, kde se křivka lomí a začíná vytvářet plató (graf 7), což bylo  $K = 9$  (stejně jako ve Structure). Pro vizualizaci jsme pak vybrali takový běh, který měl pro  $K = 9$  nejnižší hodnotu DIC. Pro BAPS jsme provedli celkem deset běhů. Pro šest z nich vyšlo jako optimální  $K = 12$ , pro čtyři to bylo  $K = 13$ . Proto jsme výslednou vizualizaci provedli pro obě K (obr. 9).



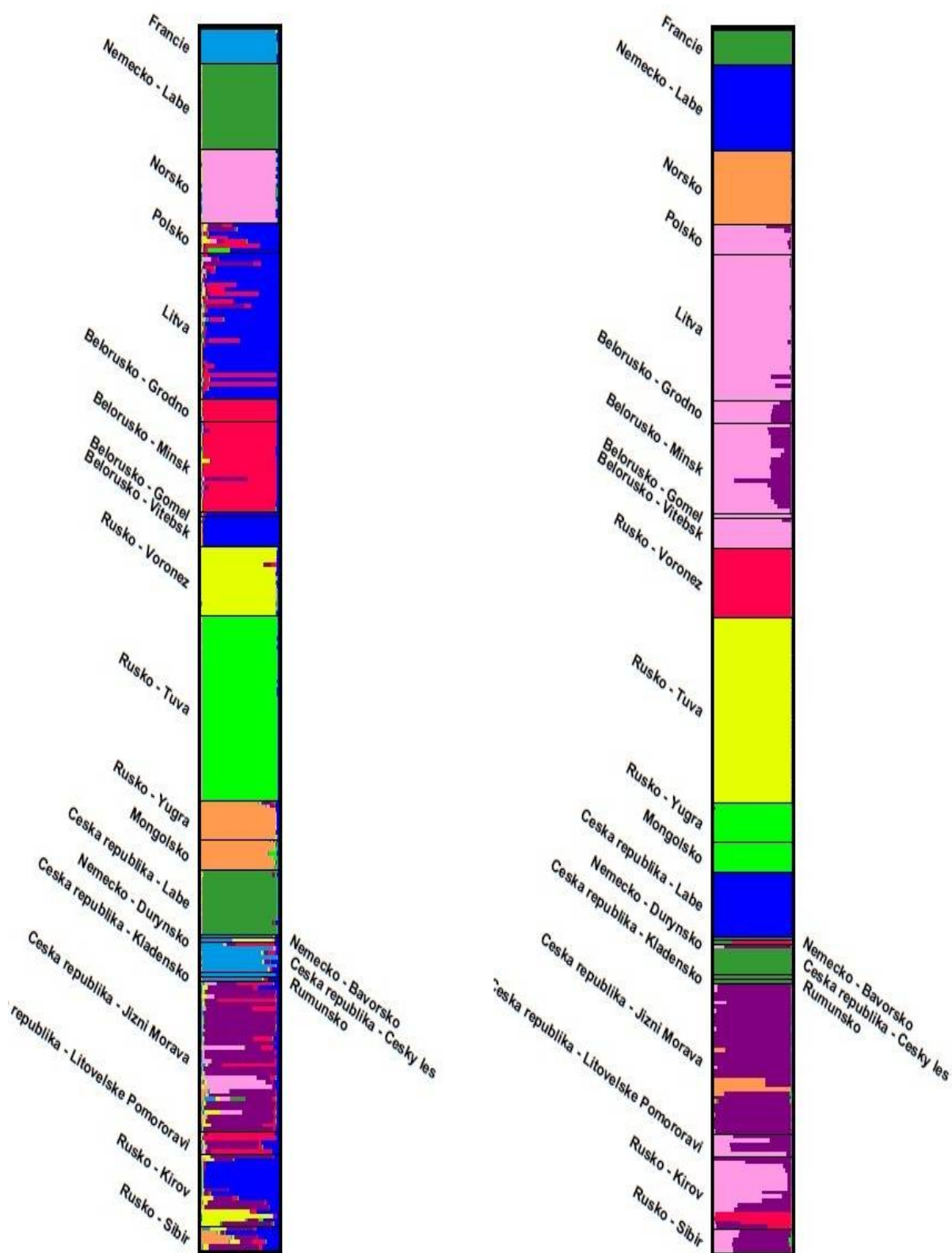
Graf 7: Odhad optimálního K, pro výpočty v programu TESS. Optimální hodnota je v místě, kde se křivka lomí a vytváří plató ( $K = 9$ )

V programu Structure se jasně ukázalo (obr. 8), že spolu velmi dobře klastrují (vykazují vysokou podobnost ve výsledcích genetických analýz) populace z Německa a našeho Labe, z Francie a Českého lesa, a překvapivě i jedinci ze dvou refugií (Yugra a Mongolsko) mají stejný vzor. U žádné z refugiálních populací nebyla zaznamenána téměř žádná hybridizace. Protože jsme všechny bobry z Běloruska považovali za představitele jednoho refugia, je zajímavé, že dvě běloruské populace (Grodno, Minsk) mají evidentně úplně jiný vzor než zbylé dvě (Gomel' a Vitebsk).

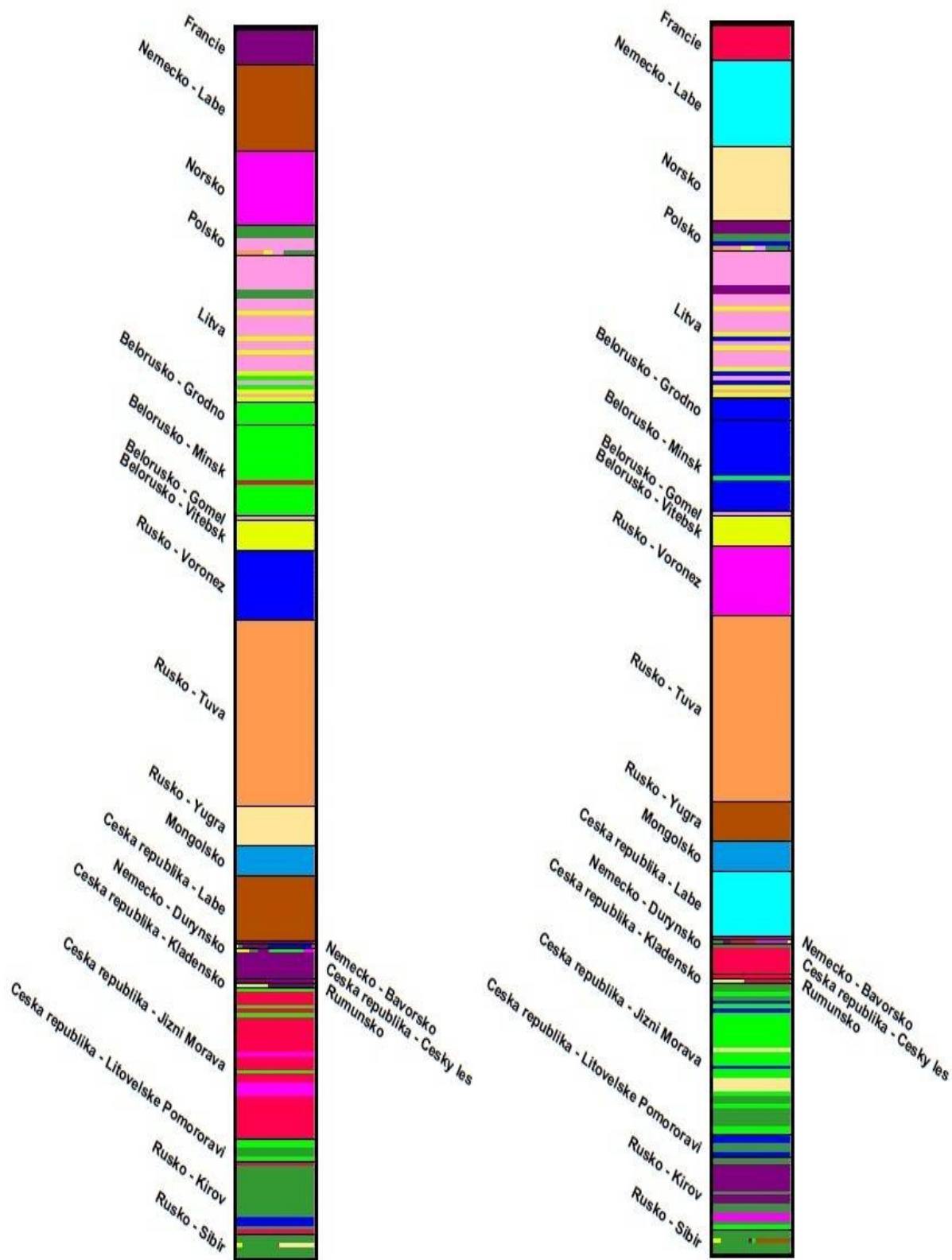
Naproti tomu v téměř všech reintrodukovaných populacích je jasně patrný hybridní původ. Jedinci z Polska a Litvy vykazují stejný vzor, který odráží stopy zejména běloruských refugií a v menší míře také voroněžského a norského. Naše hybridní populace v Litovelském Pomoraví a na jižní Moravě spolu vykazují stejný unikátní vzor. Objevuje se v nich náznak původu z Běloruska a Norska. Největší část variability ale vykazuje zcela nový vzor, přičemž tento se nenachází v žádné jiné populaci a proto nevíme nic ani o jeho původu. Patrný je i vliv běloruských a voroněžských bobrů na nově vytvořenou populaci v Kirově. Sibiřská populace je pak směsí běloruských, voroněžských a západosibiřských (případně mongolských) vzorů.

Ze všech nově vzniklých populací, pouze naše labská populace nenaznačuje žádný hybridní původ a dobře klastruje s jedinci z německého Labe. Jedinci z Českého lesa až na drobné výjimky pak zase velmi dobře klastrují s francouzskou populací. Objevují se u nich ale i známky běloruského původu.

Tyto výsledky byly potvrzeny i použitím dalších dvou klastrovacích programů – BAPS (obr. 9) a TESS (obr. 8). Drobný rozdíl se objevil při použití programu TESS, kde všechny běloruské populace a i jedinci z Polska a Litvy mají téměř totožný vzor. Celkově jsou výsledky z tohoto programu „čistší“ než ze Structure. Další malá změna se vyskytla při použití programu BAPS (obr. 9), když se vzor mongolské a západosibiřské populace (dosud klastrující spolu) zcela odlišil. Jinak jsou si ale výsledky ze všech tří programů (Structure, BAPS a TESS) velmi podobné.



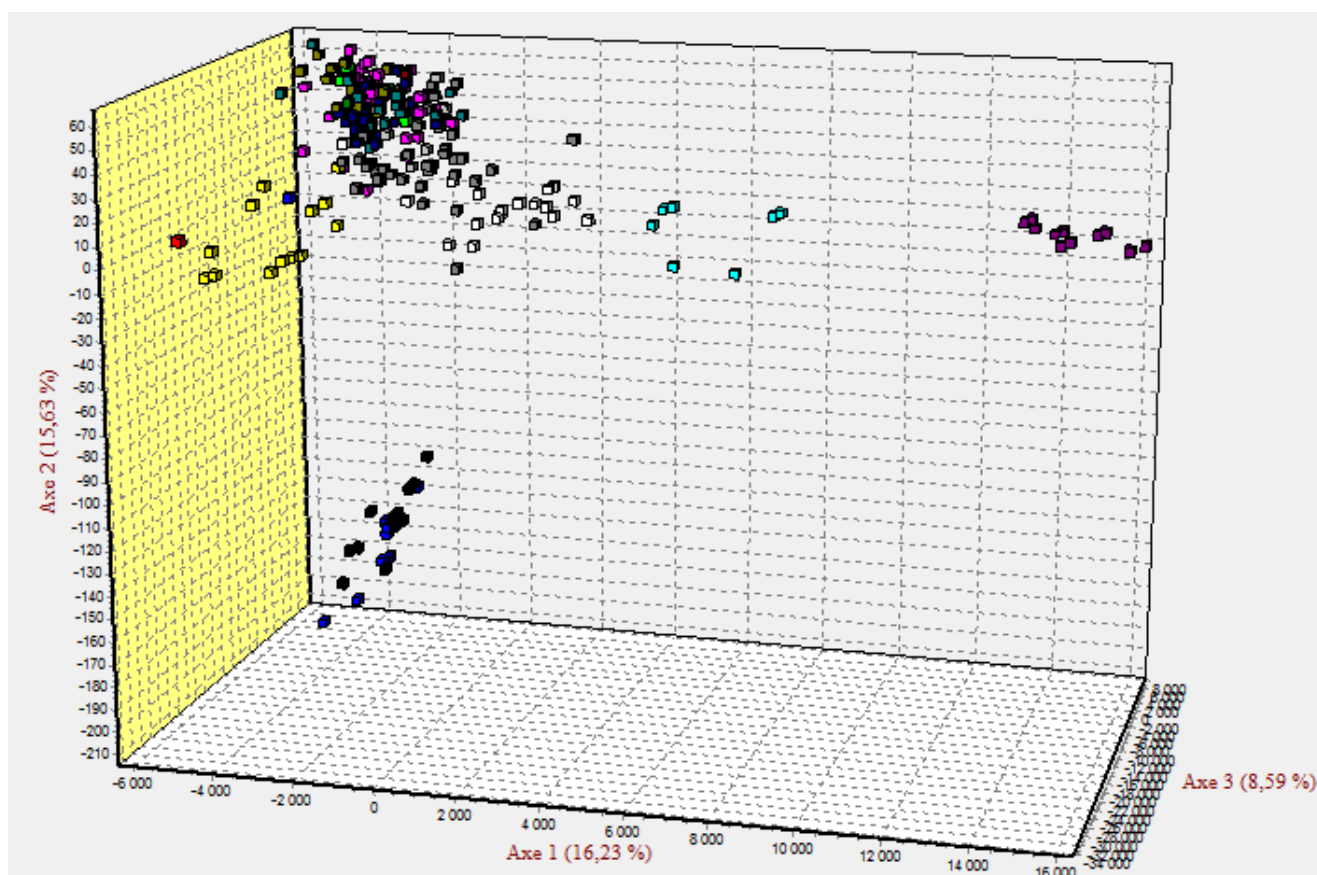
Obr. 8: Populační struktura získaná v programech Structure (vlevo) a TESS (vpravo)



Obr. 9: Populační struktura získaná v programu BAPS pro  $K = 12$  (vlevo) a  $K = 13$  (vpravo)

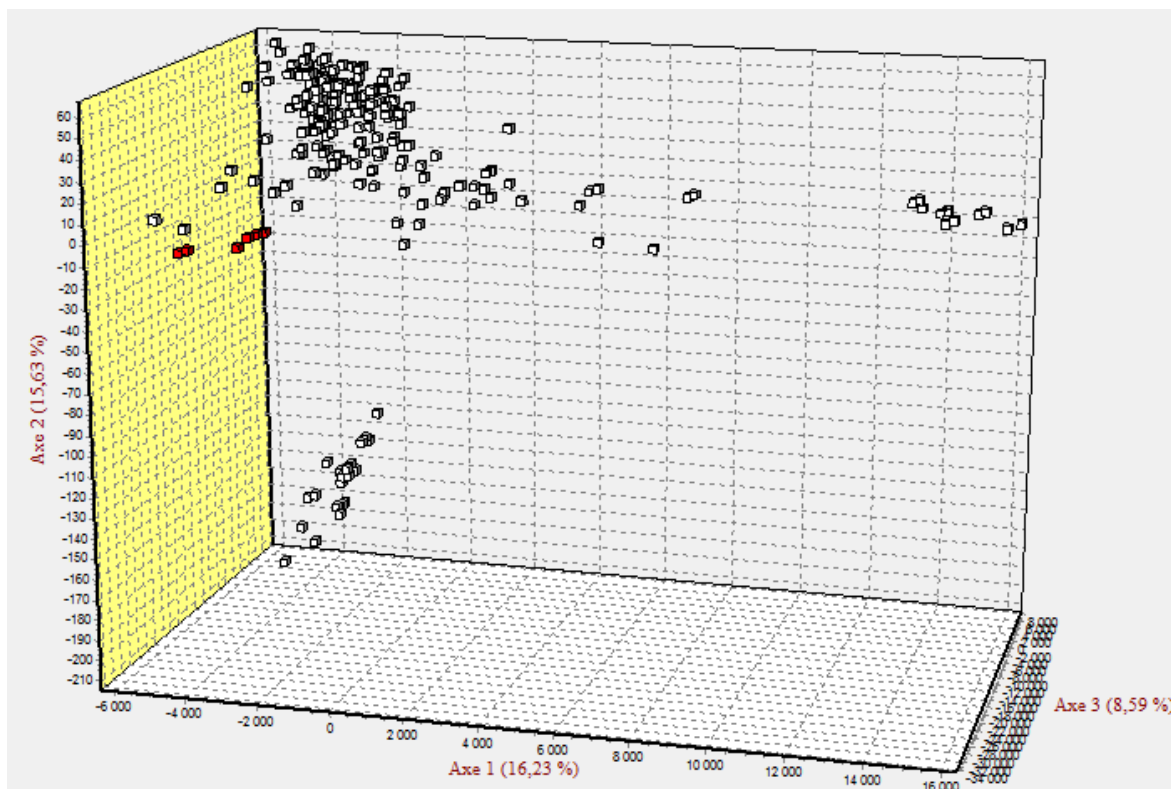
## 4.4 Prostorová analýza

Použitím korespondenční analýzy se ukázalo, že v použitých datech existuje určitá vnitřní struktura. Na obrázku 10 jsou barevně znázorněny všechny studované populace. Každé populaci zde odpovídá jedna barva. Je zde vidět, že většina populací se shlukuje do jedné oblasti v levém horním rohu. Z tohoto shluku se odděluje jen několik populací. Nejvzdálenější je skupina zcela vpravo (tmavě fialová), která pochází z Tuvy. V jejím nejbližším sousedství je světle modrá skupina, která odpovídá mongolským bobrům. Obě tyto skupiny jsou jasně odděleny od hlavního shluku. Odpovídá tomu i geografická poloha těchto dvou populací. Jak bylo vidět již na obr. 4, tyto dvě populace se nacházejí poměrně blízko sebe a obě jsou pak vzdálené od všech ostatních.

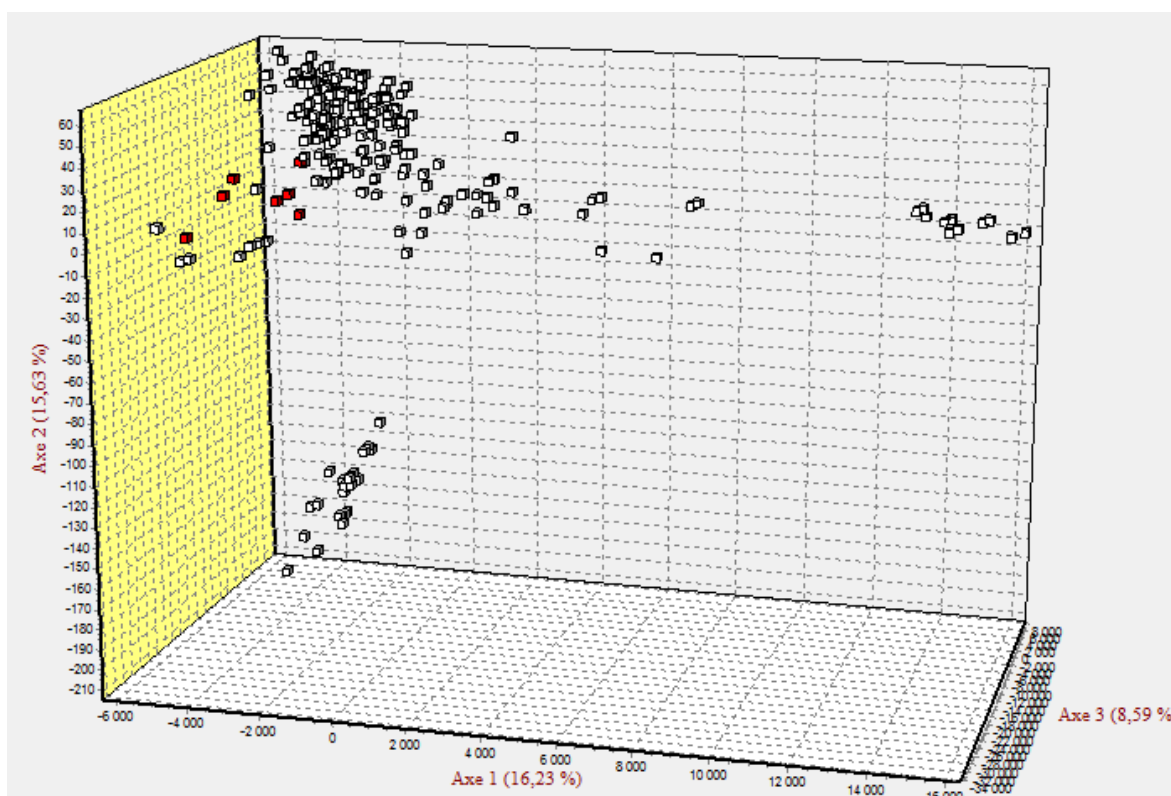


Obr. 10: Korespondenční analýza zobrazující všechny studované populace. Každá z populací je znázorněna jinou barvou.

Další dvě vydělující se skupiny jsou pro přehlednost znázorněny v samostatných obrázcích. Na obr. 11 a obr. 12 jsou zvýrazněny populace z Francie a Českého lesa, které velmi nápadně vytvářejí jednu skupinu nalevo od hlavního shluku. Řadí se mezi ně i jedinec z Bavorska (na obr. 10 červeně) a Kladenska (na obr. 10 modrý bod uprostřed žlutých bodů).



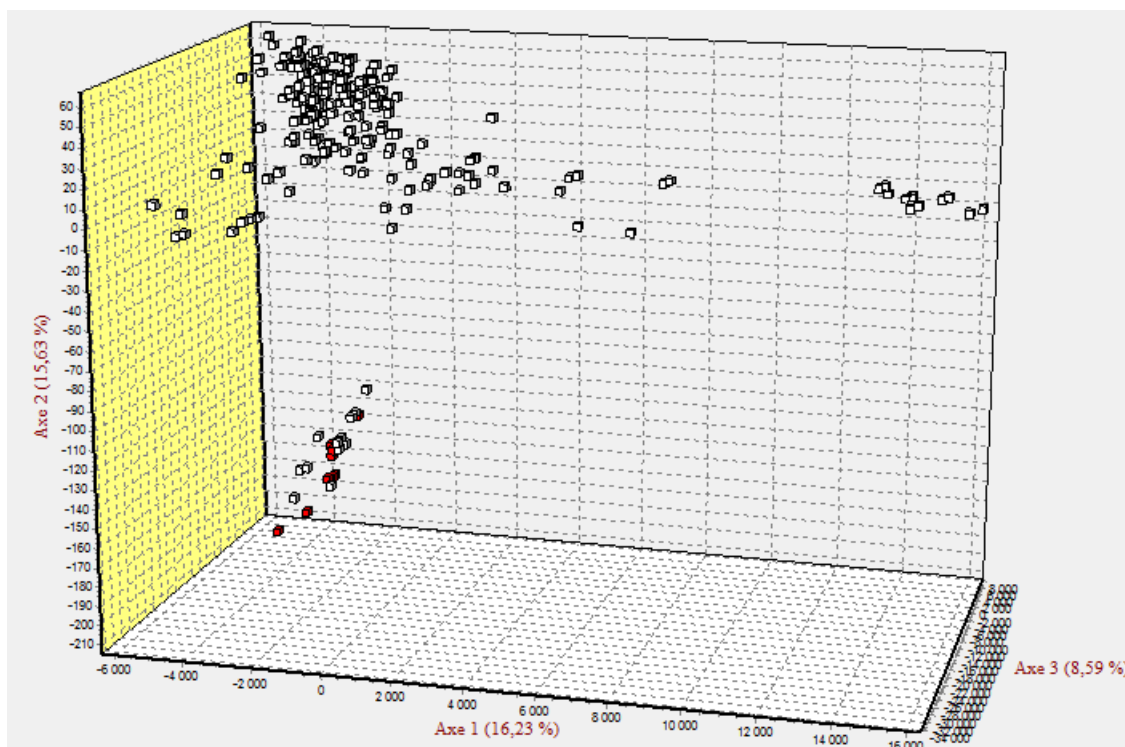
Obr. 11: Francouzská populace v korespondenční analýze



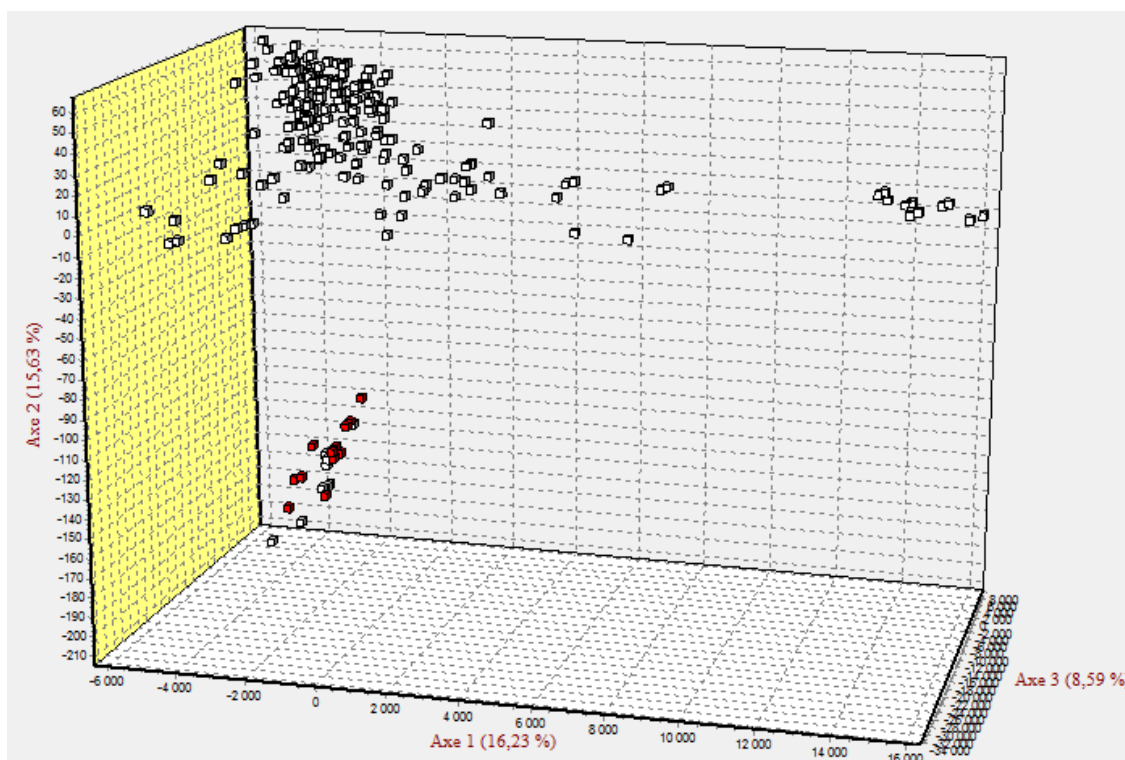
Obr. 12: Zvýraznění jedinci z Českého lesa v korespondenční analýze



Další populace, které jasně tvoří samostatnou skupinu, pocházejí z německého a českého úseku Labe (obr. 13 a obr. 14). Tyto dvě populace tvoří zcela zřejmě jednu skupinu, která je navíc velmi výrazně oddělená od ostatních.



Obr. 13: Korespondenční analýza – červeně zvýrazněná populace z Německa.



Obr. 14: Korespondenční analýza s červeně zvýrazněnou českou labskou populací.

Všechny tyto údaje odpovídají i vysokým hodnotám párového  $F_{ST}$ . Tedy že labské, francouzská, mongolská a tuvinská populace jsou geneticky výrazně diferenciované a odlišné od ostatních.

## 4.5 AMOVA pro sekvenční data a základní charakteristika populací a haplotypů

Pro následující analýzy bylo použito 290 sekvencí kontrolní oblasti mitochondriální DNA bobra evropského celkem z 19 populací (z celkových 23 populací čítajících 294 jedinců byly vyřazeny 4 populace o jednom jedinci).

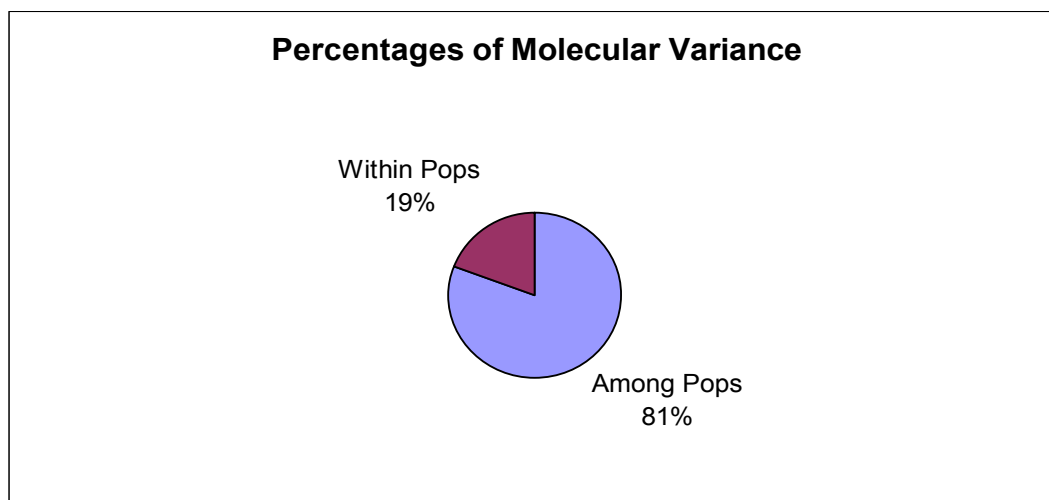
Analýza molekulární variance ukázala, že největší část variability (81 %) v sekvencích se vyskytuje mezi jednotlivými populacemi (tab. 10 a graf 8). Uvnitř populací je pak variability mnohem méně (19 %). Z toho vyplývá, že rozdělení do jednotlivých populací je opravdu smysluplné. I vysoká hodnota  $\Phi_{ST}$  jasně ukazuje na rozdílnost populací.

Source	Stupně volnosti	SS	MS	Est. Var.	%
Mezi populacemi	18	104,249	5,792	0,382	81 %
V rámci populací	271	24,654	0,091	0,091	19 %
Celkem	289	128,903	5,883	0,473	

Stat	Value	Prob
$\Phi_{ST}$	0,808	< 0,001

Tab. 10: Výsledky analýzy molekulární variance pro sekvence



Graf 8: Graf zobrazující rozložení genetické variability v rámci a mezi populacemi

Ve všech studovaných populacích se vyskytovalo poměrně málo haplotypů (od 1 do 4). Kromě již dříve známých haplotypů bylo objeveno i šest nových. Ty byly označeny *nh1* – *nh6*. Všechny nově objevené haplotypy se vyskytují výhradně ve východní Evropě, v Rusku a v oblastech kam byli východoevropští bobři vysazeni.

Každý haplotyp je omezený na výskyt u jedinečného poddruhu v určité geografické oblasti. Ve všech populacích byl vždy jeden haplotyp dominantní, mající alespoň 50 % výskyt. Nejvíce různých haplotypů (4) bylo nalezeno v Tuvě (tab. 11). Haplotypy uvnitř refugiálních populací se většinou liší jen jednou mutací.

populace	počet jedinců	Haplotyp (počet jedinců)	$\pi$	Hd	Tajimovo D
BY - Grodno	5	nh2			
BY - Minsk	15	nh2			
BY - Vitebsk	7	nh4 (1); nh5 (6)	0,01115	0,286	-1,68016
CZ - Český les	12	ga1 (11); nh1 (1)	0,00137	0,167	-1,74687
CZ - jižní Morava	39	fi1 (34); nh1 (5)	0,00612	0,229	-0,09416
CZ - Labe	17	al1			
CZ - Litovelské Pomoraví	5	nh1			
DE	27	al1 (26); al2 (1)	0,00015	0,074	-1,15354
FR	17	ga1			
LT	12	in2 (9); in3 (3)	0,00168	0,409	0,68788
PO	9	in2			
MG	12	bi1 (2); bi2 (6); bi3 (4)	*	*	*
NO	19	fi1			
RU - Azas river (Tuva)	39	tu1 (31); tu2 (3); tu3 (1); tu4 (4)	0,0009	0,36	-1,29186
RU - Kirov	16	nh1 (13); nh3 (1); nh4 (2)	0,00493	0,342	-0,01634
RU - Kondiskyj Zakaznik (Yugra)	10	po1 (9); po2 (1)	0,00041	0,2	-1,11173
RU - Orěl	7	in1			
RU - Sibiř	6	nh1 (4); nh6 (2)	0,0219	0,533	1,36057
RU - Voroněž	16	nh1			
DE - Durynsko	1	ga1			
DE - Bavorsko	1	nh1			
RO - řeka Mures	1	nh1			
CZ - Kladensko	1	ga1			

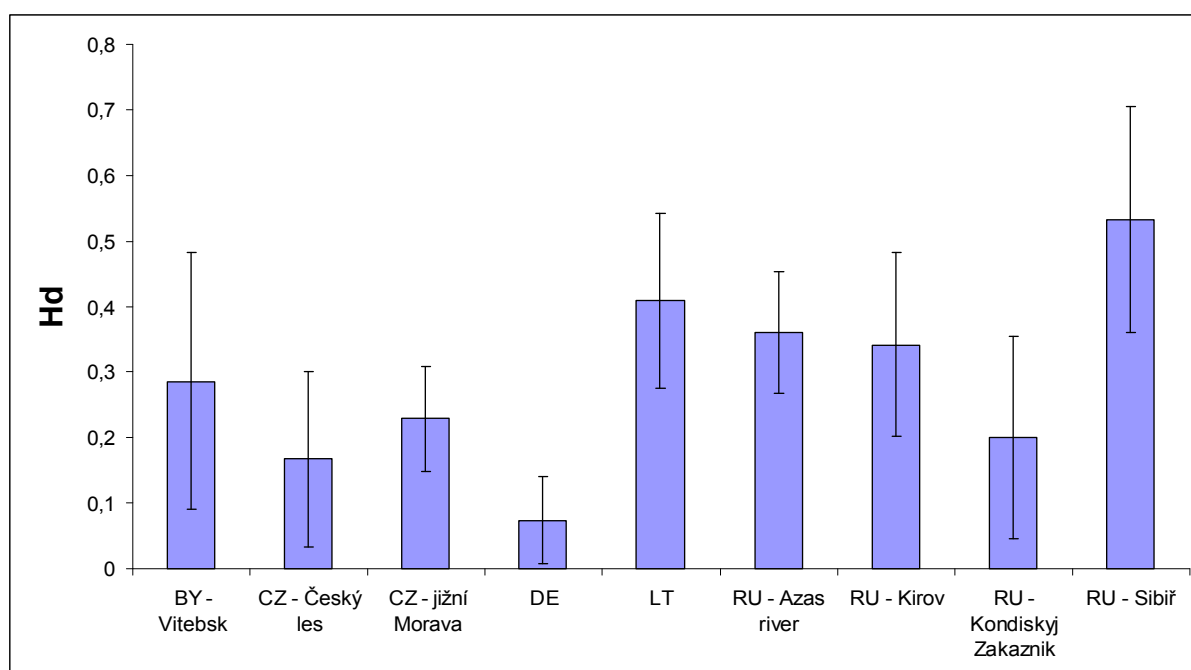
Tab. 11: Přehled všech populací a v nich se vyskytujících haplotypů. Analýza genetické diverzity byla provedena jen u populací obsahujících více haplotypů. U těch majících pouze jeden haplotyp nelze diverzitu počítat.  $\pi$  = nukleotidová diverzita, Hd = haplotypová diverzita. \*Tři mongolské haplotypy se mezi sebou liší jen deletcemi a program DnaSP použitý pro výpočet je považuje za jediný haplotyp. Proto u nich nejsou uvedeny hodnoty nukleotidové a haplotypové diverzity a Tajimova D.

Nukleotidová diverzita (tab. 11) byla vesměs poměrně nízká. V mnoha populacích ji nebylo možno ani počítat, protože se v nich vyskytoval pouze jeden haplotyp. Přestože se u mongolské populace vyskytují tři haplotypy, nebyla pro ni nukleotidová diverzita vypočítána.

Tyto haplotypy se totiž liší jen jednou, respektive dvěma delecemi. Výrazně nejvyšších hodnot (až o jeden řád) dosahovala v oblasti Sibíře a běloruského Vitebsku. Nejnižší byla v německé populaci (0,00015).

S haplotypovou diverzitou je situace obdobná jako s nukleotidovou. Pro populace s jedním haplotypem nemá smysl ji počítat. Nejvyšší hodnotu měla opět v sibiřské populaci (0,533) a poměrně vysoká byla i pro Litvu (tab. 11). Výrazně nejnižší byla opět v Německu (0,074). Haplotypová diverzita a její směrodatné odchylky pro jednotlivé populace jsou znázorněny v grafu 9.

Většina hodnot Tajimova D má záporné znaménko (tab. 11). To by odpovídalo našemu předpokladu populační expanze po nedávno prodělaném bottlenecku. Pro populace z Litvy a Sibíře ale vyšla hodnota Tajimova D kladná. To by mělo naznačovat snižování velikosti populace nebo balancující selekci.

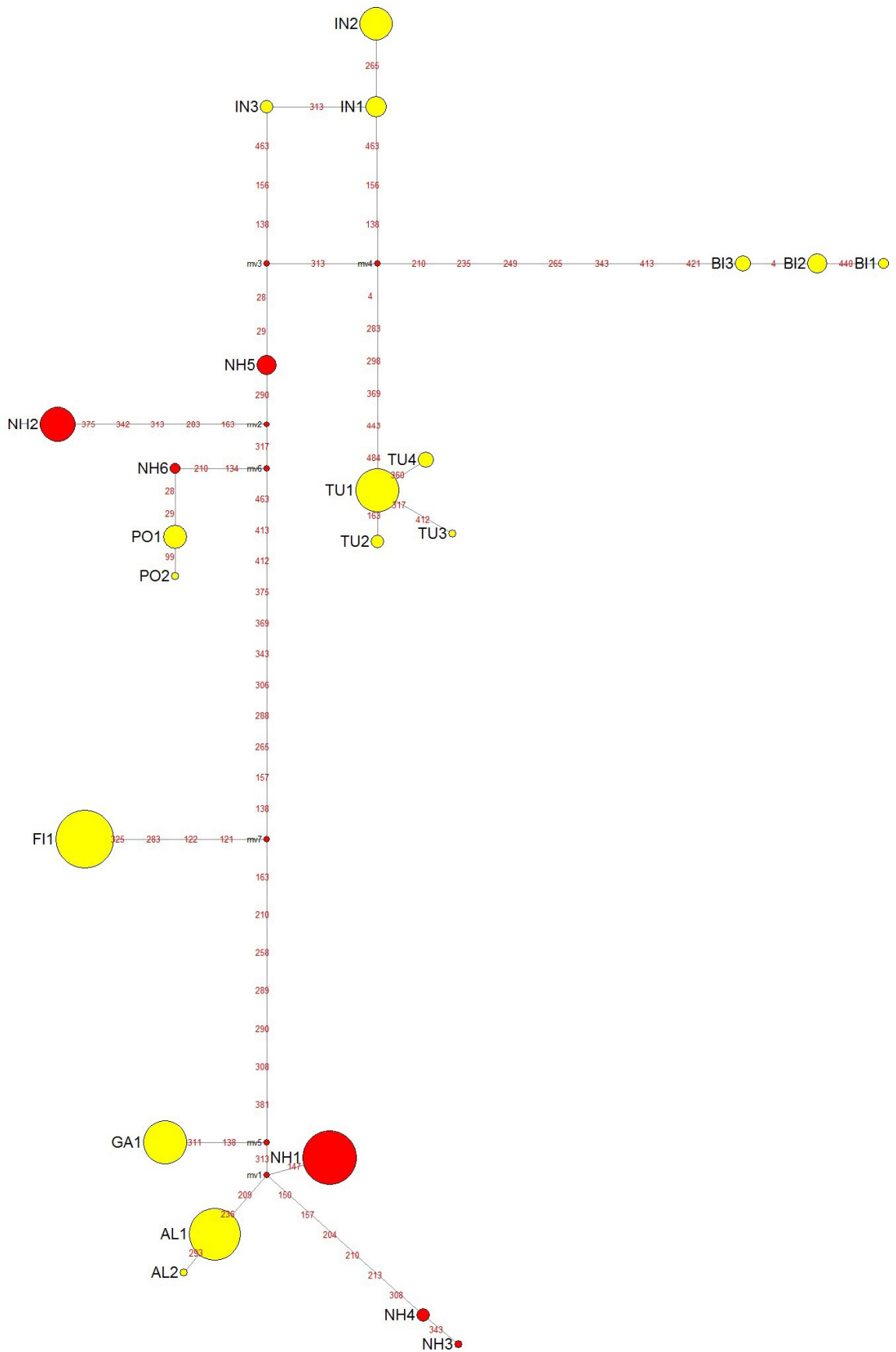


Graf 9: Haplotypová diverzita a její směrodatné odchylky

## 4.6 Haplotypová síť a vztahy mezi haplotypy

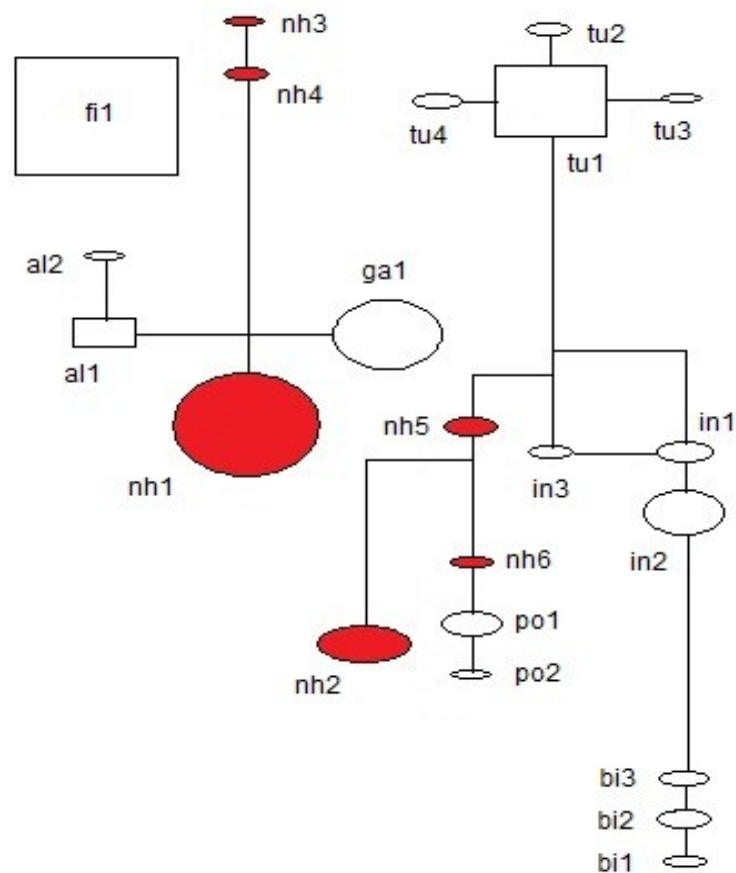
Pro tvorbu haplotypové sítě bylo použito všech 294 sekvencí kontrolní oblasti mtDNA bobrů z 23 oblastí. Celková délka sekvencí byla 489 bází.

Pro znázornění vztahů mezi jednotlivými haplotypy byla vytvořena haplotypová síť v programu Network (metodou Median-Joining; obr. 15). Obdobná síť byla vytvořena i v programu TCS (obr. 16).



Obr. 15: Haplotypová sieť zrekonštruovaná metódou Median-Joining. Nové objevené haplotypy jsou vybarveny červeně. Čísla na spojnicích znázorňují odlišná místa sekvencí.

Dosud se v populacích bobra evropského podařilo objevit celkem málo haplotypů (celkem 22). Z toho šest haplotypů bylo nově objeveno při mém výzkumu v rámci diplomové práce. Těchto šest haplotypů je ve výsledné haplotypové síti vybarveno červeně a označeny jsou *nh1* – *nh6*. Je zjevné, že haplotypy pocházející z jednoho refugia jsou si velmi podobné a většinou se liší jen jednou či dvěma mutacemi (např. *in1* - *in3*, *bi1* - *bi3*, *tu1* - *tu4*, *po1* a *po2* nebo *al1* a *al2*; obr. 15). Z celkové topologie sítě se zdá, jako by západoevropské haplotypy (*al1*, *al2*, *ga1* a *fi1*) tvořily jednu skupinu a ostatní haplotypy druhou. Podobný výsledek přináší i haplotypová síť z programu TCS (obr. 16), kde se část sítě se západoevropskými haplotypy ani nespojila s těmi z východních oblastí. Zajímavé je ovšem umístění nově objevených haplotypů. Přestože byly objeveny u populací z východní Evropy a Ruska, začlenily se jak mezi západoevropské haplotypy tak mezi haplotypy z východních areálů rozšíření (obr. 15).



Obr. 16: Haplotypová síť vytvořená v programu TCS. Červeně označené jsou nově objevené haplotypy.

## 5. DISKUZE

### 5.1 Srovnání populací

Z předchozích výsledků je jasně vidět, že použité mikrosatelitové lokusy jsou u bobra evropského mnohem méně polymorfní než u bobra kanadského (jednostranný Wilcoxon rank sum test,  $W = 15$ ,  $p\text{-value} = 0.001424$ ). V naší studii byly sice všechny lokusy polymorfní, ale počet alel na jednotlivých lokusech byl celkem nízký – od 2 (3 lokusy) do 7 (2 lokusy). Naproti tomu u bobra kanadského se na stejných lokusech nacházelo 2 – 12 alel (Crawford et al. 2008b, Pelz-Serrano et al. 2009). I hodnoty pozorované heterozygotnosti jsou u námi studovaných populací výrazně nižší než u amerických populací bobra kanadského (jednostranný Wilcoxon rank sum test,  $W = 14$ ,  $p\text{-value} = 0.001258$ ). Dá se předpokládat, že tento výrazně nižší polymorfismus pozorovaný u bobra evropského je způsobený nedávno prodělaným bottleneckem a razantním snížením populačních stavů. Dalším důvodem může být fakt, že primery, které jsme použili, byly původně navrženy pro studium kanadského bobra. Vedlejším efektem takovéto cross-species amplifikace totiž může být právě nižší počet zjištěných alel (Ellegren et al. 1995).

Refugiální populace bobra evropského jsou mnohem méně variabilní než nově založené nebo reintrodukované populace. Vyplývá to jak z hodnot průměrného počtu alel na lokus, tak z genové diverzity. Větší heterozygotnost nově založených populací je nejspíše odrazem toho, že tyto populace často vznikly smísením bobrů z různých oblastí (refugií). Vzhledem k tomu, že AMOVA jasně ukázala, že největší podíl variability se nachází mezi jednotlivými populacemi, je zřejmé, že se mezi sebou populace celkem hodně odlišují. Je proto nabíledni, že když se smísí takovéto geneticky rozdílné populace, výsledný mix bude o poznání heterozygotnější než zdrojové populace.

Hodnoty párového  $F_{ST}$  jsou v několika případech enormně vysoké. Tak tomu je např. při porovnávání francouzských, německých či tuvinských populací s ostatními. Hodnoty při takovýchto srovnáních se často blíží až k jedné. Z toho se tedy dá vyvodit, že zmíněné populace se velmi liší od ostatních. Tyto velké rozdíly by pak nejspíše naznačovaly jejich izolaci od ostatních. Jasná odlišnost těchto tří populací byla potvrzena i prostorovou analýzou. I zde populace z Německa, Francie a Tuvy vytvořily tři jasně odlišné skupiny, které byly navíc i poměrně vzdálené od centrálního shluku tvořeného všemi ostatními jedinci. Souhlasně s tím vyšly i výsledky z programu Structure a dalších klastrovacích programů. Ani zde se neobjevily žádné známky hybridizace v těchto populacích. Odpovídalo by tomu i geografické rozmístění, neboť tyto populace jsou dosti vzdálené od všech ostatních refugií

(jižní Francie, střední tok Labe a řeky Jenisej a Azas v Rusku). A navíc je v těchto oblastech i v dnešní době areál rozšíření bobra evropského značně disjunktní.

Výrazně nižší hodnoty  $F_{ST}$  vyšly při srovnání Minsk – Grodno. I v klastrovacích programech mají tyto dvě populace téměř shodný pattern. Je to nejspíše proto, že běloruské populace z Minsku a Grodna jsou si geograficky poměrně blízké a z toho nejspíše vyplývá i jejich genetická podobnost.

Ve všech populacích, co jsme studovali, jsme zaznamenali velmi málo haplotypů. Často se dokonce v celé populaci vyskytuje jen jeden. Navíc žádný ze studovaných haplotypů nebyl široce rozšířen – v každém refugiu se vyskytují jedinečné haplotypy. Nejvíce jich bylo v Tuvě a to čtyři. Pokud už se ale v některém refugiu vyskytuje více haplotypů než jeden, jsou si velmi podobné – liší se jednou či dvěma mutacemi.

## 5.2 Překvapivá variabilita ve východoevropském refugiu

Při studiu populací bobra evropského jsme kromě již dříve popsaných haplotypů našli i šest zcela nových, které neodpovídaly žádným známým sekvencím. Tyto nové haplotypy jsme pojmenovali *nh1* – *nh6*.

Nejprve jsme objevili dosud neznámý haplotyp *nh1*. Poprvé jsme ho zaznamenali v oblasti Litovelského Pomoraví. Považovali jsme za celkem pravděpodobné, že se jedná o haplotyp přítomný v některém z refugií, který však díky malému samplingu doposud unikl pozornosti. Vzhledem k tomu, že do oblasti Litovelského Pomoraví byli reintrodukováni jedinci pouze z Polska a Litvy (Kostkan & Lehký 1997, Lehký & Pražák 1998, Šafář 2002, John et al. 2010), usoudili jsme, že původ tohoto haplotypu bude nejspíše někde ve východní Evropě. Posléze jsme ovšem haplotyp *nh1* detekovali i v dosud neprozkoumaném voroněžském refugiu. Z toho se tedy dá usuzovat, že by původ tohoto haplotypu mohl být právě někde v oblasti Voroněže. Je to dosti pravděpodobné, protože do oblasti severovýchodního Polska (odkud pocházeli jedinci přivezení do Litovelského Pomoraví) byli reintrodukováni jedinci právě z Voroněže (Nolet & Rosell 1998).

V oblasti východoevropského refugia (v Bělorusku) jsme pak našli další velmi odlišné nové haplotypy – *nh2*, *nh4* a *nh5*. Vyplývá z toho, že toto refugium bude nejspíše podstatně heterogennější, než jsme se dříve domnívali a je docela možné, že jeho celková variabilita stále nebyla odhalena. Odpovídají tomu i výsledky studia mikrosatelitových lokusů, kde mají jedinci z Grodna a Minsku úplně jiný vzor než ti z Gomelu a Vitebsku (v programu Structure a BAPS). Je ovšem velmi zajímavé, že haplotypy *nh4* a *nh5* (nalezené



v oblasti běloruského Vitebsku) jsou velmi rozdílné a liší se mnoha mutacemi. Haplotypy v rámci ostatních refugií jsou si totiž jinak velmi podobné.

Pro původ těchto haplotypů ve východoevropském a voroněžském refugiu svědčí i fakt, že haplotypy *nh1* a *nh4* jsme objevili i v introdukované populaci v Kirovské oblasti (Rusko). Ta totiž vznikla smísením jedinců právě z Běloruska a Voroněže (Milishnikov & Saveljev 2001). V Kirově byl objeven ještě další nový haplotyp, označený jako *nh3*. Nebyl nalezen v žádné jiné populaci. A protože se nápadně podobá haplotypu *nh4* (liší se jen jednou mutací), dá se předpokládat, že zde i vznikl.

Poslední nově nalezený haplotyp byl označen *nh6*. Nalezen byl v oblasti Yugra a proto není ani moc překvapující, že se nejvíce podobá haplotypům z oblasti Kondiskyj Zakaznik (Yugra) označeným *po1* a *po2*. Liší se od nich jen dvěma respektive třemi mutacemi.

Naše studium CR mtDNA naznačilo existenci dvou skupin – západní (Francie, Německo a Norsko) a východní (Polsko, Litva, Tuva, Kondiskyj Zakaznik a Mongolsko). Toto rozdělení je podpořeno i prací Durka et al. (2005), kde byla fylogenetickými analýzami odhalena také přítomnost dvou mtDNA linií. Velmi zajímavé je ale umístění některých nově objevených haplotypů v haplotypové síti. Konkrétně se jedná o *nh1*, *nh3* a *nh4*. Ty totiž byly umístěny mezi západoevropské haplotypy do blízkosti německých a francouzských haplotypů. To je zajímavé, vzhledem k tomu, že všechny nově objevené haplotypy pocházejí výhradně z běloruských a ruských (Voroněž, Kirov a západní Sibiř) populací. Vysvětlením by mohl být fakt, že v minulosti měli bobři kontinuální areál, kde docházelo ke styku glaciálních refugií.

### 5.3 Původ našich populací

V dnešní době se na našem území nachází čtyři stálé populace bobra evropského: Český les, Labe, Litovelské Pomoraví a jižní Morava.

Z literatury je známo, že na území České republiky se dostali bobři z německé části Labe a to samovolným šířením (Benda & Šutera 1996). V labské populaci jsme objevili pouze haplotyp *all*, který se vyskytuje i u německé populace. Na shodný původ těchto dvou populací ukazuje i prostorová analýza, kde spolu tvoří jednu skupinu jasně oddělenou od všech ostatních a také výsledky z klastrovacích programů. Zde je jasně vidět, že německá i naše labská populace mají téměř identický vzor. Na něm je dobře patrné, že v nich nedochází k žádným hybridizacím. Souhlasně navíc vyšla i hodnota  $F_{ST}$ , která je pro srovnání Labe – Německo velmi nízká a tím pádem značí velkou podobnost populací.

Do Českého lesa pronikli bobří také samovolně, a to z bavorské reintrodukované populace (Schwab & Lutschinger 2001, Halley & Rosell 2002). Je známo, že v Bavorsku byli vysazováni jedinci nejrůznějšího původu (z Norska, Běloruska, Francie a snad i z Voroněže – Halley & Rosell 2002). U analyzovaných jedinců z Českého lesa jsme objevili převážně haplotyp *gal*. U jednoho jedince se však vyskytoval nový *nhl*. To je tedy v souladu s výše zmíněnými údaji o reintrodukci v Bavorsku. Podle přítomných haplotypů se zdá, že se k nám dostali jedinci, kteří měli svůj původ ve Francii a Voroněži (a potvrdila se tím i reintrodukce z této oblasti). Haplotyp *nhl* byl nalezen i u jedince z poměrně blízké lokality v Bavorsku. Haplotyp *gal* pak byl objeven také u jedince odchyceného ve Svárově na Kladensku, což naznačuje potenciální možnosti kolonizace rozsáhlejší oblasti ze západních Čech. Korespondenční analýza také jasně ukázala, že bobří z Francie a Českého lesa jsou si velmi podobní a vytváří v ní samostatnou skupinu. Shodný výsledek byl získán i v programech Structure, BAPS a TESS, kde spolu tyto dvě populace velmi dobře klastrují a také analýzou  $F_{ST}$ , při které vyšlo pro srovnání Francie – Český les výrazně nižší číslo než při srovnání francouzské populace s kteroukoliv jinou.

Podle literatury byli do oblasti Litovelského Pomoraví v 90. letech vysazováni bobří ze severovýchodního Polska a Litvy (Kostkan & Lehký 1997, Lehký & Pražák 1998, Šafář 2002, John et al. 2010). To by podporovaly i poměrně nízké hodnoty párového srovnání těchto oblastí s Litovelským Pomoravím. Velmi nízká (i když nesignifikantní) vyšla i hodnota pro Litovelské Pomoraví – Grodno. To by mohlo být tím, že Grodno leží v Bělorusku blízko hranic s Polskem a Litvou a z této oblasti byli údajně použiti i jedinci pro již uvedenou reintrodukci do Litovelského Pomoraví. Je ovšem zářející, že v Litovelském Pomoraví byl objeven pouze haplotyp *nhl*, ale ten nebyl ani v Polsku ani v Litvě dosud zaznamenán. Dokonce nebyla jeho přítomnost zjištěna ani v sousedním běloruském refugiu. Je ovšem možné, že je toto refugium diverzifikovanější než jsme si mysleli a přítomnost haplotypu *nhl* se nám zatím pouze nepodařilo zaznamenat. Na druhou stranu je ovšem také možné, že záznamy o provedené reintrodukci nejsou přesné a mohli být použiti i jedinci z okolí Voroněže či Kirovské oblasti. Tuto poslední domněnku ale nepotvrzují výsledky z programu Structure. Podle nich se jedinci z Litovelského Pomoraví voroněžským bobřům absolutně nepodobají (i hodnoty  $F_{ST}$  pro Litovelské Pomoraví – Voroněž vyšly celkem vysoké). Částečně se podobají populacím z Polska, Litvy, Grodna a Minsku, což by podporovalo reintrodukci z východoevropského refugia. Spíše ale vykazují vlastní unikátní vzor, který je velmi podobný jedincům z jižní Moravy (viz níže).

Na jižní Moravu se bobři dostali v osmdesátých letech 20. století migrací z rakouského Dunaje (Halley & Rosell 2002, Šafář 2002). Tam byli vysazeni jedinci skandinávského a východoevropského poddruhu a také bobr kanadský (Lehký & Pražák 1998). V naší studii jsme na jižní Moravě zaznamenali dva haplotypy. Byl to severský *fil* a nový *nhl*. V souladu s tím jsou i výsledky z programu Structure. Je zde patrný vliv norského a běloruského refugia. Celkový vzor jedinců z jižní Moravy je však unikátní a příliš neodpovídá jedincům z refugií. Tento fakt dobře odpovídá jejich původu z nedostatečně ovzorkovaného východoevropského refugia. Svědčí pro to i hodnoty párového  $F_{ST}$ , které vyšly nejnižší právě pro srovnání j. Morava – Polsko, j. Morava – Litva, j. Morava – Grodno a j. Morava – Minsk. Shodný unikátní vzor mají i jedinci z Litovelského Pomoraví. Není to ani příliš překvapivé, neboť nejpozději v letech 1998 nebo 1999 se obě populace žijící na řece Moravě setkaly (Šafář 2002).

Jak již bylo zmíněno výše, v Rakousku na Dunaji byl kromě poddruhů bobra evropského vysazen i příbuzný bobr kanadský. Vzhledem k migraci jedinců z této oblasti k nám, by se u nás mohl kanadský bobr čistě teoreticky vyskytovat. Zdá se ale, že jedinci druhu *Castor canadensis* na Dunaji nejspíše již vyhynuli (Schwab & Lutschinger 2001) a ani u žádného českého bobra jsme nezaznamenali sekvenci bobra kanadského.

## 5.4 Genetická variabilita našich populací

V našich populacích jsme ve srovnání s příbuzným kanadským bobrem zaznamenali poměrně malou variabilitu. Počet alel na mikrosatelitových lokusech byl celkem nízký. Nachází se u nich jen jedna až čtyři alely na lokus, což je výrazně méně než u příbuzného druhu *Castor canadensis*. Tento rozdíl pravděpodobně odpovídá výrazným bottleneckům (snížení počtu jedinců) v historii evropských bobrů a obecnému snížení genetické variability u tohoto druhu. Nejnižší počet alel byl zaznamenán u labských bobrů (maximálně dvě alely), nejvyšší naopak u jihomoravské populace (na pěti lokusech tři alely a na jednom dokonce čtyři).

Ukázalo se, že české populace z jižní Moravy, Litovelského Pomoraví a Českého lesa jsou o poznání heterozygotnější než refugiální populace bobra evropského. Vyšší variabilita by mohla být způsobena např. hybridním původem. Tomu by odpovídal i fakt, že je z literatury známo, že do Českého lesa se dostali bobři z velmi smíšené bavorské populace (Halley & Rosell 2002). Na jižní Moravu domigrovali bobři z rakouského Dunaje (Šafář 2002), kde byl vysazen norský a východoevropský poddruh (Lehký & Pražák 1998) a v Litovelském Pomoraví byl vysazen také východoevropský poddruh (Kostkan & Lehký

1997). Na konci 90. let pak došlo ke kontaktu populací z Litovelského Pomoraví a jižní Moravy (Šafář 2002). Proto není ani moc překvapivé, že hodnoty udávající průměrný počet alel na lokus a genovou diverzitu jsou v porovnání s refugii celkem vysoké.

Jen u české labské populace jsou tyto hodnoty dosti nízké (nejnižší ze všech nově založených populací majících více než jednoho jedince). Svou hodnotou by se spíše řadily mezi refugiální populace. To tedy znamená extrémně nízkou genetickou variabilitu. Tato skutečnost je podporována i faktem, že naši labští bobři odvozují svůj původ nejspíše jen od německé labské populace, jak je uváděno v literatuře (Benda & Šutera 1996, Šafář 2002).

Ve všech studovaných populacích jsme zaznamenali jen jeden až dva haplotypy CR mtDNA. V Českém lese a na jižní Moravě, kde byly nalezeny haplotypy dva, se vždy jeden (*gal* respektive *fil*) vyskytoval výrazně častěji než druhý (v obou případech *nhl*). Nukleotidová a haplotypová diverzita se pro populace s jedním haplotypem nedá počítat. Pro již zmiňované populace se dvěma haplotypy vyšly obě hodnoty dosti nízké, i když o něco vyšší jsou přece jen pro jižní Moravu, neboť zde přítomné haplotypy (*fil* a *nhl*) jsou dosti odlišné.

Populace bobra evropského se na našem území od 80. let neustále rozrůstají a obsazují stále větší a větší území. Tomu odpovídají i jasně záporné hodnoty Tajimova D, které znamenají populační expanzi.

Celkově jsou ale naše populace velmi málo polymorfní. Nejnižší variabilita byla zaznamenána u labských jedinců, nejvyšší naopak na jižní Moravě.

## 5.5 Hybridní původ či izolace našich populací

Naše výsledky jasně ukazují na izolaci českých labských bobrů a jejich unikátní původ z německého labského refugia. Tuto domněnku podporují jak nízké hodnoty párového srovnání těchto dvou populací, tak výsledky prostorových analýz a klastrovacích programů. Tato izolovanost labské populace a z ní vyplývající extrémně nízká genetická variabilita s sebou nese i jisté komplikace, jako jsou různé tělesné abnormality (Piechocki 1977).

Naopak všechny ostatní populace vykazují jasné známky hybridního původu. Jak již v literárním přehledu bylo naznačeno a tímto naším výzkumem posléze prokázáno, je nesporné, že tyto populace byly založeny jedinci pocházejícími z různých refugiálních oblastí. Hlavními důkazy jsou vyšší hodnoty genové diverzity než v refugiích, naznačující vyšší heterozygotnost našich populací a přítomnost haplotypů pocházejících z různých území.

## 5.6 Srovnání s předchozími studii

Dřívější studie zkoumající kontrolní oblast mitochondriální DNA (Ducroz et al. 2005, Durka et al. 2005) odhalily velmi nízký stupeň genetické variability a ukázaly velkou populační strukturovanost ve všech částech areálu rozšíření. V souladu s tím jsou i naše výsledky analýzy mikrosatelitových lokusů ze všech refugiálních a několika reintrodukovaných populací. Analýza molekulární variance prokázala, že největší část genetické variability (74 %,  $\Phi_{ST} = 0,742$ ) se nachází mezi populacemi a tedy že jedinci uvnitř populací jsou si velmi podobní. I hodnoty párových srovnání jednotlivých refugií jasně ukazují na diferenciaci mezi všemi populacemi. Vnitropopulační variabilita je pak velmi nízká. I ve skandinávských populacích byl metodou DNA fingerprintingu a studiem MHC zjištěn extrémně nízký stupeň genetické variability (Ellegren et al. 1993). Je to nejspíše následek velmi silného populačního bottlenecku a následné drastické ztráty genetické diverzity. Populace přežívaly v geograficky vzdálených a izolovaných populacích. Proto u nich přestal probíhat tok genů a velký vliv tak získal genetický drift. Značná část původního genetického poolu tak byla jistě navždy ztracena. Tato zjevná populační struktura může být i následkem již dříve existující genetické struktury, neboť bobří se obvykle šíří podél řek a tak mohl být genetický tok již dříve omezen jen na jednotlivá povodí.

V rozporu s našimi i předchozími výsledky je studie Kautenburger & Sander (2008). Zde použitím RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) zaznamenali v původní populaci na Labi a dvou reintrodukovaných populacích v Bavorsku a Rakousku velmi vysokou genetickou podobnost. Naopak neprokázali žádnou populační strukturu. To zcela odporuje našemu zjištění, že německá labská populace se velmi liší od všech ostatních (kromě našeho Labe). Je ale nutné podotknout, že metoda RAPD je dosti problematická, neboť při jejím použití se mohou vyskytovat artefakty (Rabouam et al. 1999, Atienzar & Jha 2006). Proto je její aplikace pro populační studie poněkud sporná.

U bobří populace z Kirovské oblasti byla DNA fingerprintingem zaznamenána značná variabilita (Ellegren et al. 1993). I my jsme v Kirovské oblasti zaznamenali větší počet alel na lokus a tři různé haplotypy mtDNA. Je to ale nejspíše způsobeno tím, že zdejší populace vznikla smísením jedinců z více různých refugií a tudíž se zde i zkombinovala variabilita v těchto refugiích přítomná. Tím se stalo, že je tato populace variabilnější než zdrojové refugiální populace. Pomocí jaderné i mitochondriální DNA jsme prokázali původ kirovské populace z bobřů žijících ve Voroněži a Bělorusku. Stejných zjištění jako my dosáhli i

Milishnikov & Saveljev (2001) použitím allozymových lokusů a i oni v této oblasti zaznamenali relativně vysoký stupeň polymorfismu.

Ve východní Evropě Ducroz et al. 2005 zaznamenali velmi homogenní a nediferenciovanou populaci. Již oni ale uvažovali, že to může být jen nedostatečně velkým počtem vzorků a tím mohli přehlédnout velkou část variability. V našem výzkumu jsme měli k dispozici i vzorky z nových oblastí východoevropského refugia a skutečně se ukázalo, že je v tomto refugiu přítomná mnohem větší genetická variabilita než se dosud myslelo.

Při dřívějším studiu mtDNA (Ducroz et al. 2005) vyšla jako nejodlišnější populace z Mongolska a také byla považována za bazální skupinu. Naproti tomu ale v našem výzkumu jaderné DNA se jako nejvíce vzdálená ukázala být populace z Tuvy. A to jak na základě výsledků prostorové analýzy, tak podle extrémně vysokých hodnot párového srovnání a jedinečného překvapivě homogenního vzoru jedinců z Tuvy v klastrovacích programech. Odpovídá tomu i skutečnost, že je tato populace dosti geograficky izolovaná od všech ostatních a hlavně že v tomto refugiu přežilo 19. století jen velmi málo jedinců, asi 30 – 40 (Nolet & Rosell 1998), a tím pádem zde došlo vinou genetického driftu k výrazné ztrátě genetické variability. Je velmi překvapivé, že právě mongolská populace (zcela nejvýchodnější ze všech) v programech Structure a TESS klastruje se záposibiřskou populací. Jedno z možných vysvětlení je, že by tyto dvě populace mohly mít stejný původ. I když jsou od sebe velmi vzdálené, obě se nacházejí v jednom povodí Ob – Irtyš. Otázkou tedy zůstává, zda mají opravdu stejný původ, nebo jejich podobnost vznikla konvergencí, či je to jen důsledek nějaké metodické chyby.

Podle předchozích poznatků (Durka et al. 2005) se zdá, že západoevropské a východní haplotypy tvoří dvě jasně odlišitelné jednotky. Potvrdili to i Horn et al. (2010). Je to vysvětlováno přečkáním ledových dob ve dvou glaciálních refugíích. Tuto představu ale dosti kazí skutečnost, že námi nově objevené haplotypy byly nalezeny sice jen ve východních oblastech, ale na haplotypové síti se zařadily i mezi západoevropské haplotypy. S našimi dosavadními poznatky se ale tento fakt nedá uspokojivě vysvětlit.

Horn et al. (2010) tvrdí, že na hranici Polska a Německa vznikla hybridní zóna, kde by se křížily labský a běloruský poddruh. Údajně se tam vyskytují jedinci s černou srstí (jaderný, recesivně děděný znak, vyskytující se u běloruské populace) a zároveň labským haplotypem. My jsme však studiem mikrosatelitových lokusů mezi německými labskými bobry žádné hybridní jedince nenalezli. Také je ovšem možné, že se přímo na Labe tyto hybridy jen ještě nedostali. Souhlasně s citovanými autory jsme ale v materiálu z Durynska objevili francouzský haplotyp s francouzským vzorem mikrosatelitů.

## 5.7 Možnosti dalšího výzkumu

Důkladné určení původu našich bobrů a detailnější studium genetické variability může mít zásadní vliv pro praktická rozhodnutí týkající se ochrany našich populací. Objevily se názory, že by hlavním cílem ochrany bobra v Evropě moho být udržení absolutně nehybridních populací popsaných poddruhů (Halley & Rosell 2002). Důraz by měl být při reintrodukcích kladen na vysazování nejbližších geografických forem (Nolet & Rosell 1998). Jak se ale ukazuje např. v labské populaci, která je dosud izolovaná, výrazné snížení genetické variability, z této izolace plynoucí, má za následek například dentální abnormality. Tato skutečnost pak může snižovat i viabilitu takto postižených jedinců. Proto by možná bylo vhodnější neklást takový důraz na udržení geneticky čistých subpopulací.

Zajímavé by také bylo důkladnější studium imunitního systému. Podle jediné provedené studie se zdá, že ve většině refugiálních populací bobra evropského se vyskytuje jen jedna alela genu DRB z komplexu MHC. To je velmi zajímavé, protože tyto geny patří obecně mezi nejpolymorfnější. Proto by bylo dobré ještě důkladněji prozkoumat všechna refugia a a prozkoumat také variabilitu dalších složek imunitního systému, např. Toll-like receptorů.

V neposlední řadě by bylo jistě zajímavé podrobněji prozkoumat strukturu bobřích rodin a ověřit, zda představa monogamních rodin odpovídá skutečnosti.

## 6. ZÁVĚRY

- 1) Genetická variabilita všech zkoumaných refugiálních populací je velmi nízká, zejména ve srovnání s variabilitou příbuzného bobra kanadského. Velmi nízký byl jak počet alel na jednotlivých mikrosatelitových lokusech, tak počet zjištěných haplotypů.
- 2) Jen ve východoevropském a západosibiřském refugiu byla objevena větší diverzita než se dosud předpokládalo. Byly zde objeveny nové haplotypy a mikrosatelitové lokusy vykazují unikátní vzor.
- 3) Původ našich bobrů je složitý. Labská populace vznikla přirozeným šířením z německé labské populace. Do Litovelského Pomoraví byli bobři v 90. letech 20. století reintrodukováni. Populace na jižní Moravě a v Českém lese vznikly šířením ze sousedních států (Rakousko a Německo), kde předtím docházelo k reintrodukcím. Je tedy zřejmé, že velký význam měly jak reintrodukce, tak přirozené šíření.
- 4) Naše labská populace může svůj původ odvozovat pouze z německé populace (má jen haplotyp *all*). Bobři v Českém lese obsahují převážně francouzský haplotyp *gal*, i když se u nich objevil i nový voroněžský haplotyp *nhl*. V Litovelském Pomoraví se nachází jen haplotyp *nhl*. Ten je přítomen i u jedinců z jižní Moravy. U nich se však nachází i severský haplotyp *fil*.
- 5) Populace na Labi je zatím zcela izolovaná. Jinak na našem území zcela jistě dochází ke křížení jednotlivých poddruhů. Navíc již jistě došlo ke kontaktu populace z Litovelského Pomoraví a jižní Moravy. Důkazem toho je i stejný unikátní vzor mikrosatelitových lokusů.
- 6) Genetická variabilita našich populací je ve srovnání s kanadským bobrem velmi nízká, ovšem ve srovnání s variabilitou pozorovanou v refugiích je o poznání vyšší. Toto platí pro obě populace na řece Moravě a v Českém Lese, které mají hybridní původ. Labská populace však stále zůstává velmi málo variabilní. Nejspíše je to proto, že je na rozdíl od ostatních izolovaná.
- 7) Předchozí studie zkoumající kontrolní oblast mitochondriální DNA jsou v dobré shodě s naším výzkumem za použití mikrosatelitových lokusů. Oboje odhalilo celkově nízký stupeň genetické variability a výraznou populační strukturu.



## 7. POUŽITÁ LITERATURA

- Atienzar, F. A. & Jha, A. N.** (2006) The random amplified polymorphic DNA (RAPD) assay and related techniques applied to genotoxicity and carcinogenesis studies: A critical review. *Mutation Research* 613, 76-102.
- Babik, W., Durka, W. & Radwan, J.** (2005) Sequence diversity of the MHC DRB gene in the Eurasian beaver (*Castor fiber*). *Molecular Ecology* 14, 4249-4257.
- Bandelt, H.-J., Forster, P. & Röhl, A.** (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
- Batbold, J., Batsaikhan, N., Shar, S., Amori, G., Hutterer, R., Kryštufek, B., Yigit, N., Mitsain, G. & Muñoz, L.J.P.** (2008) *Castor fiber*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.4. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>.
- Benda, P. & Šutera, V.** (1996) Bobr evropský (*Castor fiber albicus Matschie*) na řece Labi. *Ochrana Přírody* 51 (3), 73–75.
- Bryja, J., Charbonnel, N., Berthier, K., Galan, M. & Cosson, J.-F.** (2007) Density-related changes in selection pattern for major histocompatibility complex genes in fluctuating populations of voles. *Molecular Ecology* 16, 5084-5097.
- Calvignac, S., Hughes, S. & Hänni, C.** (2009) Genetic diversity of endangered brown bear (*Ursus arctos*) populations at the crossroads of Europe, Asia and Africa. *Diversity and Distributions* 15, 742-750.
- Campana, M. G., Hunt, H. V., Jones, H. & White, J.** (2011) CorrSieve: software for summarizing and evaluating Structure output. *Molecular Ecology Resources* 11 (2), 349-352.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K. A.** (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9 (10), 1657-1660.

- Corander, J. & Marttinen, P.** (2006) Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Molecular Ecology* 15, 2833-2843.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J. & Tang, J.** (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics* 9, číslo článku 539.
- Crawford, J. C., Liu, Z., Nelson, T. A., Nielsen, C. K. & Bloomquist, C. K.** (2008a) Microsatellite analysis of mating and kinship in beavers (*Castor canadensis*). *Journal Of Mammalogy* 89 (3), 575–581.
- Crawford, J., Liu, Z., Nelson, T., Nielsen, C. & Bloomquist, C.** (2008b) Isolation and characterization of microsatellite loci in the beaver (*Castor canadensis*). *Molecular Ecology Resources* 8, 616-618.
- Čížková, D., Gouy de Bellocq, J., Baird, S.J.E., Piálek, J. & Bryja, J.** (2011) Genetic structure and contrasting selection pattern at two major histocompatibility complex genes in wild house mouse populations. *Heredity* 106, 727-740.
- Ducroz, J.-F., Stubbe, M., Saveljev, A. P., Heidecke, D., Samjaa, R., Ulevičius, A., Stubbe, A. & Durka, W.** (2005) Genetic variation and population structure of the Eurasian beaver *Castor fiber* in eastern Europe and Asia. *Journal Of Mammalogy* 86 (6), 1059–1067.
- Durka, W., Babik, W., Ducroz, J.-F., Heidecke, D., Rosell, F., Samjaa, R., Saveljev, A. P., Stubbe, A., Ulevičius, A. & Stubbe, M.** (2005) Mitochondrial phylogeography of the Eurasian beaver *Castor fiber* L. *Molecular Ecology* 14, 3843–3856.
- Ehrich, D., Gaudeul, M., Assefa, A., Koch, M., Mummenhoff, K., Nemomissa, S., IntraBiodiv Consortium & Brochmann, C.** (2007) Genetic consequences of Pleistocene range shifts: Contrast between the Arctic, the Alps and the East African mountains. *Molecular Ecology* 16, 2542-2559.

- Ellegren, H., Hartman, G., Johansson, M. & Anderson, L.** (1993) Major histocompatibility complex monomorphism and low levels of DNA fingerprinting variability in a reintroduced and rapidly expanding population of beavers. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 90 (17), 8150–8153.
- Ellegren, H., Johansson, M., Hartman, G. & Andersson, L.** (1994) DNA fingerprinting with the human 33.6 minisatellite probe identifies sex in beavers *Castor fiber*. *Molecular Ecology* 3, 273-274.
- Ellegren, H., Primmer, C. R. & Sheldon, B. C.** (1995) Microsatellite ‘evolution’: directionality or bias? *Nature Genetics* 11 (4), 360-362.
- Evano, G., Regnaut, S. & Goudet, J.** (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14, 2611-2620.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K.** (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164, 1567-1587.
- Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K.** (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes* 7 (4), 574-578.
- Goudet, J.** (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Hájková, P., Pertoldi, C., Zemanová, B., Roche, K., Hájek, B., Bryja, J. & Zima, J.** (2007) Genetic structure and evidence for recent population decline in Eurasian otter populations in the Czech and Slovak Republics: implications for conservation. *Journal of Zoology* 272, 1-9.

- Hall, T. A.** (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Research* 41, 95-98.
- Halley, D. J. & Rosell, F.** (2002) The beaver's reconquest of Eurasia: status, population development and management of a conservation success. *Mammal Review* 32 (3), 153-178.
- Halley, D. J. & Rosell, F.** (2003) Population and distribution of European beavers (*Castor fiber*). *Lutra* 46 (2), 91-101.
- Hartman, G.** (1994) Long-term population development of a reintroduced beaver (*Castor fiber*) population in Sweden. *Conservation biology* 8 (3), 713–717.
- Hayes, L. D.** (2000) To nest communally or not to nest communally: a review of rodent communal nesting and nursing. *Animal Behaviour* 59, 677-688.
- Herr, J. & Rosell, F.** (2004) Use of space and movement patterns in monogamous adult Eurasian beavers (*Castor fiber*). *Journal of Zoology* 262 (3), 257-264.
- Horn, S., Teubner, Ja., Teubner, Je. & Heidecke, D.** (2010) Mitochondrial DNA of beavers (*Castor*) in Germany. *Artenschutzreport* 26, 72-78.
- Horn, S., Durka, W., Wolf, R., Ermala, A., Stubbe, A., Stubbe, M. & Hofreiter, M.** (2011) Mitochondrial genomes reveal slow rates of molecular evolution and the timing of speciation in beavers (*Castor*), one of the largest rodent species. *PLoS ONE* 6 (1), e14622.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A.** (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics* 23(14), 1801-1806.
- John, F., Baker, S. & Kostkan, V.** (2010) Habitat selection of an expanding beaver (*Castor fiber*) population in central and upper Morava River basin. *European Journal of Wildlife Research* 56 (4), 663-671.

- Kautenburger, R. & Sander, A.C.** (2008) Population genetic structure in natural and reintroduced beaver (*Castor fiber*) populations in Central Europe. *Animal Biodiversity and Conservation* 31 (2), 25 – 35.
- Kostkan, V. & Lehký, J.** (1997) The Litovelské Pomoraví floodplain forest as a habitat for the reintroduction of the European beaver (*Castor fiber*) into the Czech Republic. *Global Ecology and Biogeography Letters* 6, 307–310.
- Kryštufek, B. & Vohralík, V.** (2009) Mammals of Turkey and Cyprus, Rodentia II: Cricetinae, Muridae, Spalacidae, Calomyscidae, Capromyidae, Hystricidae, Castoridae. *Univerza na Primorskem, Znanstveno-raziskovalno središče, Založba Annales, Koper*.
- Kuehn, R., Schwab, G., Schroeder, W. & Rottmann, O.** (2000) Differentiation of *Castor fiber* and *Castor canadensis* by noninvasive molecular methods. *Zoo Biology* 19 (6), 511–515.
- Lehký, J. & Pražák, O.** (1998) Návrat bobrů. *Veronica* 3.
- Librado, P. & Rozas, J.** (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Manning, C. J., Wakeland, E. K. & Potts, W. K.** (1992) Communal nestling patterns in mice implicate MHC genes in kin recognition. *Nature* 360, 581-583.
- Milishnikov, A. N.** (2004) Population-genetic structure of beaver (*Castor fiber* L., 1758) communities and estimation of effective reproductive size  $N_e$  of an elementary population. *Russian Journal of Genetics* 40 (7), 772-781.
- Milishnikov, A. N. & Saveljev, A. P.** (2001) Genetic divergence and similarity of introduced populations of European beaver (*Castor fiber* L., 1758) from Kirov and Novosibirsk oblast of Russia. *Russian Journal of Genetics* 37 (1), 108–111.

- Mucci, N., Arrendal, J., Ansorge, H., Bailey, M., Bodner, M., Delibes, M., Ferrando, A., Fournier, P., Fournier, Ch., Godoy, J. A., Hájková, P., Hauer, S., Heggberget, T. M., Heidecke, D., Kirjavainen, H., Krueger, H.-H., Kvaloy, K., Lafontaine, L., Lanszki, J., Lemarchand, Ch., Liukko, U.-M., Loeschke, V., Ludwig, G., Madsen, A. B., Mercier, L., Ozolins, J., Paunovic, M., Pertoldi, C., Piriz, A., Prigioni, C., Santos-Reis, M., Sales Luis, T., Stjernberg, T., Schmid, H., Suchentrunk, F., Teubner, J., Tornberg, R., Zinke, O. & Randi, E. (2010)** Genetic diversity and landscape genetic structure of otter (*Lutra lutra*) populations in Europe. *Conservation Genetics* 11 (2), 583-599.
- Nizetić, D., Figueroa, F., Dembić, Z., Nevo, E. & Klein, J. (1987)** Major histocompatibility complex gene organization in the mole rat *Spalax ehrenbergi*: Evidence for transfer of function between class II genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84 (16), 5828-5832.
- Nolet, B. A. & Rosell, F. (1998)** Comeback of the beaver *Castor fiber*: an overview of old and new conservation problems. *Biological Conservation* 83 (2), 165–173.
- Parker, H. & Rønning, Ø. C. (2007)** Low potential for restraint of anadromous salmonid reproduction by beaver *Castor fiber* in the Numedalslågen river catchment, Norway. *River Research and Applications* 23, 752-762.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2006)** GENALEX 6: genetic analyses in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.
- Pelz-Serrano, K., Munguia-Vega, A., Piaggio, A. J., Neubaum, M., Munclinger, P., Pártl, A., Van Riper, Ch. & Culver, M. (2009)** Development of nine new microsatellite loci for the American beaver, *Castor canadensis* (Rodentia: Castoridae), and cross-species amplification in the European beaver, *Castor fiber*. *Molecular Ecology Resources* 9, 551-554.
- Penn, D. J., Damjanovich, K. & Potts, W. K. (2002)** MHC heterozygosity confers a selective advantage against multiple-strain infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (17), 11260-11264.

- Piechocki, R.** (1977) Zahnanomalien beim Elbebiber, *Castor fiber albicus*. Hercynia N.F. (Leipzig) 14 (2), 187-195.
- Pilot, M., Jedrzejewski, W., Branicki, W., Sidorovich, V. E., Jedrzejewska, B., Stachura, K. & Funk, S. M.** (2006) Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology* 15, 4533-4553.
- Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P.** (2000) Inference of population structure from multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.
- Rabouam, C., Comes, A. M., Bretagnolle, V., Humbert, J.-F., Periquet, G. & Bigot, Y.** (1999) Features of DNA fragments obtained by random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays. *Molecular Ecology* 8, 493-503.
- Radwan, J., Biedrzycka, A. & Babik, W.** (2010) Does reduced MHC diversity decrease viability of vertebrate populations? *Biological Conservation* 143, 537-544.
- Rosenberg, N. A.** (2004) DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4, 137-138.
- Saarma, U. & Kojola, I.** (2007) Matrilineal genetic structure of the brown bear population in Finland. *Ursus* 18 (1), 30-37.
- Saveljev, A. & Milishnikov, A.** (2002) Biological and genetic peculiarities of cross-composed and aboriginal beaver populations in Russia. *Acta Zoologica Lituanica* 12 (4), 397-402.
- Schwab, G. & Lutschinger, G.** (2001) The return of the beaver (*Castor fiber*) to the Dunabe watershed. In Czech, A. & Schwab, G.: *The European Beaver in a new millennium. Proceedings of 2<sup>nd</sup> European Beaver Symposium, 27.-30. Sept. 2000, Białowieża, Poland.* Carpathian Heritage Society, Kraków. 47-50.

- Schwab, G. & Schmidbauer, M.** (2001) The Bavarian beaver re-extroductions. In Czech, A. & Schwab, G.: The European Beaver in a new millennium. Proceedings of 2<sup>nd</sup> European Beaver Symposium, 27.-30. Sept. 2000, Białowieża, Poland. Carpathian Heritage Society, Kraków. 51-53.
- Sommer, R. S. & Benecke, N.** (2005) The recolonization of Europe by brown bears *Ursus arctos* Linnaeus, 1758 after the Last Glacial Maximum. Mammal Review 35 (2), 156-164.
- Starikov, V. P. & Anchugov, S. A.** (2009) The state of European beaver (*Castor fiber* L., 1758) population in Kurgan oblast. Russian Journal of Ecology 40 (5), 351-355.
- Šafář, J.** (2002) Novodobé rozšíření bobra evropského (*Castor fiber* L., 1758) v České republice. Příroda 13, 161–196.
- Taberlet, P. & Bouvet, J.** (1994) Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. Proceedings of the Royal Society of London, Series B-Biological Sciences 255, 195-200.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.-G. & Cosson, J.-F.** (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. Molecular Ecology 7, 453-464.
- Tammeleht, E., Remm, J., Korsten, M., Davison, J., Tumanov, I., Saveljev, A., Männil, P., Kojola, I. & Saarma, U.** (2010) Genetic structure in large, continuous mammal populations: the example of brown bears in northwestern Eurasia. Molecular Ecology 19, 5359–5370.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & Gibson, T. J.** (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22, 4673-4680.



**Vorel, A.** (2006) Program péče o populaci bobra evropského. *Ochrana přírody* 61 (7), 202-207.

**Wayne, R. K., Lehman, N., Allard, M. W. & Honeycutt, R. L.** (1992) Mitochondrial DNA variability of the gray wolf: Genetic consequences of population decline and habitat fragmentation. *Conservation Biology* 6 (4), 559-569.

**Weir, B. S. & Cockerham, C.C.** (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38 (6), 1358-1370.

**Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P. & Piálek, J.** (2004) *Genetické metody v zoologii*. Univerzita Karlova v Praze, Nakladatelství Karolinum.

## 8. APENDIX

Seznam použitých vzorků s jejich charakteristikami (původ, pořadové číslo odpovídající označení v programu Structure a haplotyp – uveden jen v případě, že byl zjišťován v naší laboratoři a pro účely této diplomové práce). Pro ostatní vzorky byly převzaty haplotypy z článku Durka et al. 2005.

Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu- lace	Haplo- typ
208	FR	Bracieux, Loir-et-Cher	Bracieux, Loir-et-Cher	1	1	
106	FR	Oblast Vaucluse	Dolní tok Rhône	2	1	
217	FR	Oblast Vaucluse	Dolní tok Rhône	3	1	
196	FR	Escrignelles, Loiret		4	1	
204	FR	Lestiou, Loir-et-Cher	Lestiou, Loir-et-Cher	5	1	
215	FR	Oblast Vaucluse	Dolní tok Rhône	6	1	
216	FR	Oblast Vaucluse	Dolní tok Rhône	7	1	
218	FR	Oblast Vaucluse	Dolní tok Rhône	8	1	
107	DE	Bruchgraben Kühnau, Kr. Dessau	Bruchgraben Kühnau, Kr. Dessau	9	2	
97	DE	Buckower See, bei Rathenow, Kr: Havelland	Buckower See, bei Rathenow, Kr: Havelland	10	2	
103	DE	Buch, Kr. Stendal	Buch, Kr. Stendal	11	2	
104	DE	Buch, Kr. Stendal	Buch, Kr. Stendal	12	2	
15	DE	Falkenberg, Kr. Elbe-Elster	Falkenberg, Kr. Elbe-Elster	13	2	
10	DE	Hohennauen-Parey, Kr. Havelland	Hohennauen-Parey, Kr. Havelland	14	2	
9	DE	Jeßnitz, Kr. Bitterfeld	Jeßnitz, Kr. Bitterfeld	15	2	
11	DE	Kr. Elbe-Elster	Kr. Elbe-Elster	16	2	
100	DE	Kuhlhausen, Havel, Kr: Stendal	Kuhlhausen, Havel, Kr: Stendal	17	2	
4	DE	Lauchhammer, Kr. Senftenberg	Lauchhammer, Kr. Senftenberg	18	2	
99	DE	Leinersee, Kr. Dessau	Leinersee, Kr. Dessau	19	2	
98	DE	Lutherstein, Dübener Heide,	Lutherstein, Dübener Heide,	20	2	
108	DE	Muldebrücke Dessau-Roßlau, Kr. Dessau	Muldebrücke Dessau-Roßlau, Kr. Dessau	21	2	
17	DE	Plauer See, Kr. Brandenburg	Plauer See, Kr. Brandenburg	22	2	
12	DE	Uebigau, Kr. Elbe-Elster	Uebigau, Kr. Elbe-Elster	23	2	
5	DE	Uebigau/Falkenberg, Kr. Elbe-Elster	Uebigau/Falkenberg, Kr. Elbe-Elster	24	2	
13	DE	Uebigau/Wahrenbrück, Kr. Elbe-Elster	Uebigau/Wahrenbrück, Kr. Elbe-Elster	25	2	
14	DE	Uebigau/Wahrenbrück, Kr. Elbe-Elster	Uebigau/Wahrenbrück, Kr. Elbe-Elster	26	2	

Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu-lace	Haplo-tyt
8	DE	Wublitz (A10), Kr. Potsdam-Mark	Wublitz (A10), Kr. Potsdam-Mark	27	2	
16	DE	Wüsteneutzsch, Kr. Merseburg/Querfurt	Wüsteneutzsch, Kr. Merseburg/Querfurt	28	2	
55	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	29	3	
49	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	30	3	
53	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	31	3	
42	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	32	3	
45	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	33	3	
46	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	34	3	
47	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	35	3	
48	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	36	3	
50	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	37	3	
51	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	38	3	
52	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	39	3	
54	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	40	3	
56	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	41	3	
57	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	42	3	
58	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	43	3	
59	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	44	3	
61	NO	Bö, Telemark	Bö, Telemark	45	3	
111	PL	Fluß Pasłęka, Warminsko-Mazurskie	Fluß Pasłęka, Warminsko-Mazurskie	46	4	
110	PL	Fluß Pasłęka, Warminsko-Mazurskie	Fluß Pasłęka, Warminsko-Mazurskie	47	4	
113	PL	Fluß Pasłęka, Warminsko-Mazurskie	Fluß Pasłęka, Warminsko-Mazurskie	48	4	
114	PL	Nördlich von Kętrzyn, Warminsko-Mazurskie	Nördlich von Kętrzyn, Warminsko-Mazurskie	49	4	
115	PL	Nördlich von Kętrzyn, Warminsko-Mazurskie	Nördlich von Kętrzyn, Warminsko-Mazurskie	50	4	
116	PL	Nördlich von Kętrzyn, Warminsko-Mazurskie	Nördlich von Kętrzyn, Warminsko-Mazurskie	51	4	
117	PL	Nördlich von Kętrzyn, Warminsko-Mazurskie	Nördlich von Kętrzyn, Warminsko-Mazurskie	52	4	
96	LT	Giedraiciai, Moletai	Giedraiciai, Moletai	53	5	
70	LT	Giedraiciai, Moletai	Giedraiciai, Moletai	54	5	
63	LT	Giedraiciai, Moletai	Giedraiciai, Moletai	55	5	
92	LT	Giedraiciai, Moletai	Giedraiciai, Moletai	56	5	
93	LT	Giedraiciai, Moletai	Giedraiciai, Moletai	57	5	
94	LT	Giedraiciai, Moletai	Giedraiciai, Moletai	58	5	
95	LT	Giedraiciai, Moletai	Giedraiciai, Moletai	59	5	
81	LT	Kaunas	Kaunas	60	5	
86	LT	Kirsna, Lazdijai	Kirsna, Lazdijai	61	5	
87	LT	Kirsna, Lazdijai	Kirsna, Lazdijai	62	5	
78	LT	Raseinai	Raseinai	63	5	
79	LT	Raseinai	Raseinai	64	5	

Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu-lace	Haplo-tyt
91	LT	Šilute	Šilute	65	5	
62	LT	Šilute	Šilute	66	5	
90	LT	Šilute	Šilute	67	5	
74	LT	Ukmerge	Ukmerge	68	5	
73	LT	Ukmerge	Ukmerge	69	5	
76	LT	Ukmerge	Ukmerge	70	5	
77	LT	Ukmerge	Ukmerge	71	5	
65	LT	Vilkaraistis; Moletai	Vilkaraistis; Moletai	72	5	
72	LT	Vilkaraistis; Moletai	Vilkaraistis; Moletai	73	5	
82	LT	Vilkaraistis; Moletai	Vilkaraistis; Moletai	74	5	
64	LT	Vilkaraistis; Moletai	Vilkaraistis; Moletai	75	5	
66	LT	Vilkaraistis; Moletai	Vilkaraistis; Moletai	76	5	
67	LT	Vilkaraistis; Moletai	Vilkaraistis; Moletai	77	5	
68	LT	Vilkaraistis; Moletai	Vilkaraistis; Moletai	78	5	
69	LT	Vilkaraistis; Moletai	Vilkaraistis; Moletai	79	5	
71	LT	Vilkaraistis; Moletai	Vilkaraistis; Moletai	80	5	
84	LT	Vilkavistis	Vilkavistis	81	5	
85	LT	Vilkavistis	Vilkavistis	82	5	
83	LT	Vilkavistis	Vilkavistis	83	5	
80	LT	Zemaitija National Park, Plunge	Zemaitija National Park, Plunge	84	5	
88	LT	Zemaitija National Park, Plunge	Zemaitija National Park, Plunge	85	5	
89	LT	Zemaitija National Park, Plunge	Zemaitija National Park, Plunge	86	5	
GR14	BY	Grodno	West Berezina river, Neman watershed	87	6	nh2
GR38	BY	Grodno	West Berezina river, Neman watershed	88	6	nh2
GR39	BY	Grodno	West Berezina river, Neman watershed	89	6	nh2
GR40	BY	Grodno	West Berezina river, Neman watershed	90	6	nh2
GR41	BY	Grodno	West Berezina river, Neman watershed	91	6	nh2
Mi13	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	92	7	nh2
Mi18	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	93	7	nh2
Mi19	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	94	7	nh2
Mi20	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	95	7	
Mi21	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	96	7	nh2
Mi22	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	97	7	nh2
Mi23	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	98	7	
Mi24	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	99	7	

Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu- lace	Haplo- typ
Mi25	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	100	7	
Mi26	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	101	7	nh2
Mi27	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	102	7	nh2
Mi28	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	103	7	nh2
Mi29	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	104	7	
Mi30	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	105	7	nh2
Mi31	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	106	7	nh2
Mi32	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	107	7	nh2
Mi33	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	108	7	nh2
Mi34	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	109	7	nh2
Mi35	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	110	7	
Mi36	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	111	7	nh2
Mi37	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed	112	7	
Mi17	BY	Minsk	West Berezina river, Neman watershed		7	nh2
G10	BY	Gomeľ	Ptich river, Pripjat watershed	113	8	
V2	BY	Vitebsk	Obol river, West Dvina watershed	114	9	nh5
V3	BY	Vitebsk	Obol river, West Dvina watershed	115	9	nh5
V1	BY	Vitebsk	Obol river, West Dvina watershed	116	9	nh5
V4	BY	Vitebsk	Obol river, West Dvina watershed	117	9	nh5
V5	BY	Vitebsk	Obol river, West Dvina watershed	118	9	nh4
V6	BY	Vitebsk	Obol river, West Dvina watershed	119	9	nh5
V7	BY	Vitebsk	Obol river, West Dvina watershed	120	9	nh5
1VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	121	10	nh1
2VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	122	10	nh1
3VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	123	10	nh1
4VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	124	10	nh1
5VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	125	10	nh1
6VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	126	10	nh1

Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu- lace	Haplo- typ
7VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	127	10	nh1
8VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	128	10	nh1
9VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	129	10	nh1
10VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	130	10	nh1
11VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	131	10	nh1
12VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	132	10	nh1
13VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	133	10	nh1
14VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	134	10	nh1
15VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	135	10	nh1
17VO	RU	Voroněž	Voroněžská přírodní rezervace	136	10	nh1
180	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	137	11	
190	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	138	11	
166	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	139	11	
171	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	140	11	
175	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	141	11	
177	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	142	11	
178	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	143	11	
182	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	144	11	
18	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	145	11	
20	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	146	11	
21	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	147	11	
23	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	148	11	
24	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	149	11	
25	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	150	11	
26	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	151	11	
27	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	152	11	
30	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	153	11	
31	RU	Tuva	Azas river, Todzha distrikt	154	11	

Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu- lace	Haplo- typ
32	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	155	11	
33	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	156	11	
37	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	157	11	
38	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	158	11	
39	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	159	11	
40	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	160	11	
41	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	161	11	
164	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	162	11	
165	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	163	11	
167	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	164	11	
168	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	165	11	
169	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	166	11	
170	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	167	11	
172	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	168	11	
173	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	169	11	
176	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	170	11	
181	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	171	11	
184	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	172	11	
185	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	173	11	
186	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	174	11	
187	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	175	11	
188	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	176	11	
189	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	177	11	
193	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	178	11	
194	RU	Tuva	Azas river, Todzha district	179	11	
132	RU	Yugra auth.distr	Konda river, Irtysh watershed	180	12	
133	RU	Yugra auth.distr	Konda river, Irtysh watershed	181	12	
140	RU	Yugra auth.distr	Konda river, Irtysh watershed	182	12	

Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu- lace	Haplo- typ
134	RU	Yugra auth.distr	Konda river, Irtysh watershed	183	12	
139	RU	Yugra auth.distr	Konda river, Irtysh watershed	184	12	
141	RU	Yugra auth.distr	Konda river, Irtysh watershed	185	12	
135	RU	Yugra auth.distr	Konda river, Irtysh watershed	186	12	
137	RU	Yugra auth.distr	Konda river, Irtysh watershed	187	12	
138	RU	Yugra auth.distr	Konda river, Irtysh watershed	188	12	
121	MG	Khovd aimak	Bulgan Gol	189	13	
128	MG	Khovd aimak	Bulgan Gol	190	13	
129	MG	Khovd aimak	Bulgan Gol	191	13	
125	MG	Khovd aimak	Bulgan Gol	192	13	
127	MG	Khovd aimak	Bulgan Gol	193	13	
126	MG	Khovd aimak	Bulgan Gol	194	13	
131	MG	Khovd aimak	Bulgan Gol	195	13	
11	CZ	Labe	Podskalí	196	14	al1
24	CZ	Labe	Boletice	197	14	al1
17	CZ	Labe	Nebočady	198	14	al1
19	CZ	Labe	Svádov	199	14	al1
2	CZ	Labe	Svádov	200	14	al1
7	CZ	Labe	Svádov	201	14	al1
1	CZ	Labe	Svádov	202	14	al1
14	CZ	Labe	Svádov	203	14	al1
34	CZ	Labe	Boletice	204	14	al1
60	CZ	Labe	Ploučnice	205	14	al1
59	CZ	Labe	Boletice	206	14	al1
30	CZ	Labe	Boletice	207	14	al1
35	CZ	Labe	Chaloupka	208	14	al1
21	CZ	Labe	Ploučnice	209	14	al1
20	CZ	Labe	Povrly	210	14	al1
38	CZ	Labe	Svádov		14	al1
LA2	CZ	Labe	ZOO Děčín, Povrly		14	al1
58	D	Bavorsko	Regensburg	211	15	nh1
	DE	Durynsko	Řeka Saale	212	16	ga1
32	CZ	Český les	Hraniční - Střeble	213	17	ga1
16	CZ	Český les	Sklárna	214	17	ga1
25	CZ	Český les	Hraniční potok	215	17	ga1
52	CZ	Český les	Všeruby	216	17	ga1
35	CZ	Český les	Liščí u Nýrska	217	17	ga1
6	CZ	Český les	Václavský rybník	218	17	ga1
16	CZ	Český les	Žebrácký žďár	219	17	nh1
15	CZ	Český les	Farský horní		17	ga1



Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu- lace	Haplo- typ
64	CZ	Český les	Chajda		17	ga1
17N	CZ	Český les	Farský horní		17	ga1
20N	CZ	Český les	Hraničky		17	ga1
CL4	CZ	Český les	Farský horní		17	ga1
LA1	CZ	Kladensko	Svárov	220	18	ga1
	RO	západní Rumunsko	řeka Mures	221	19	nh1
61	CZ	jižní Morava	Dyje, Pastvisko, ZOO Brno	222	20	fi1
31	CZ	jižní Morava	Dyje, Janohrad	223	20	
8	CZ	jižní Morava	Dyje, zámecký park	224	20	fi1
39	CZ	jižní Morava	Jihlava, Dalešice	225	20	nh1
10	CZ	jižní Morava	Dyje, kanál	226	20	fi1
12	CZ	jižní Morava	Lednice, Nová Dyje	227	20	fi1
9	CZ	jižní Morava	Lednice, Janohrad	228	20	nh1
40	CZ	jižní Morava	Lednice, Janohrad	229	20	fi1
13	CZ	jižní Morava	Lednice, Pastvisko	230	20	fi1
28	CZ	jižní Morava	Lednice	231	20	fi1
27	CZ	jižní Morava	Lednice, Nejdeč	232	20	fi1
26	CZ	jižní Morava	Lednice, Nová Dyje	233	20	fi1
54	CZ	jižní Morava	Nová Dyje	234	20	fi1
46	CZ	jižní Morava	Nová Dyje	235	20	fi1
53	CZ	jižní Morava	Nová Dyje	236	20	fi1
55	CZ	jižní Morava	Milovice, spodní kanál u VDNM	237	20	fi1
41	CZ	jižní Morava	Lednice, Nová Dyje	238	20	fi1
42	CZ	jižní Morava	Bulhary	239	20	fi1
51	CZ	jižní Morava	Bulhary	240	20	fi1
57	CZ	jižní Morava	Lednice, Nová Dyje	241	20	fi1
45	CZ	jižní Morava	Milovice, Křivé jezero	242	20	fi1
10	CZ	jižní Morava	Lednice, Nová Dyje	243	20	
23	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	244	20	
27	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	245	20	
33	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	246	20	
12	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	247	20	fi1
4	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	248	20	fi1
13	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	249	20	fi1
18	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	250	20	
29	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	251	20	
34	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	252	20	
22	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	253	20	nh1
11	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	254	20	fi1
5	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	255	20	
2	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží	256	20	nh1
23	CZ	jižní Morava	Dyje, Pastvisko, kanál		20	fi1

Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu- lace	Haplo- typ
43	CZ	jižní Morava	Nová Dyje		20	fi1
44	CZ	jižní Morava	Bulhary, Nová Dyje		20	fi1
47	CZ	jižní Morava	Bulhary		20	fi1
48	CZ	jižní Morava	Zámecká Dyje		20	fi1
49	CZ	jižní Morava	Milovice, Křivé jezero		20	fi1
50	CZ	jižní Morava	Lednice, Nová Dyje		20	fi1
8N	CZ	jižní Morava	Bulhary, Nová Dyje		20	fi1
3	CZ	jižní Morava	Dyje, Janohrad		20	nh1
14N	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží		20	fi1
15N	CZ	jižní Morava	Břeclav - město		20	fi1
7N	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží		20	fi1
9N	CZ	jižní Morava	Soutok - Podluží		20	fi1
33	CZ	Litovelské Pomoraví	Nové Hrady	257	21	nh1
4	CZ	Litovelské Pomoraví	Nové Hrady	258	21	nh1
5	CZ	Litovelské Pomoraví	Vrapač	259	21	nh1
22	CZ	Litovelské Pomoraví	Vrapač	260	21	
62	CZ	Litovelské Pomoraví	Vrapač	261	21	nh1
25N	CZ	Litovelské Pomoraví	Vrapač		21	nh1
K62	RU	Kirov	Cheptsas river, near Ardashi, Vyatka watershed	262	22	nh1
K51	RU	Kirov	Kotelnich, Vyatka watershed	263	22	nh3
K58	RU	Kirov	Kotelnich, Vyatka watershed	264	22	nh1
K59	RU	Kirov	Kotelnich, Vyatka watershed	265	22	nh1
K52	RU	Kirov	Kotelnich, Vyatka watershed	266	22	nh1
K53	RU	Kirov	Kotelnich, Vyatka watershed	267	22	nh1
K54	RU	Kirov	Kotelnich, Vyatka watershed	268	22	nh1
K55	RU	Kirov	Kotelnich, Vyatka watershed	269	22	nh1
K56	RU	Kirov	Kotelnich, Vyatka watershed	270	22	nh4
K57	RU	Kirov	Kotelnich, Vyatka watershed	271	22	nh1
K60	RU	Kirov	Cheptsas river, near Ardashi, Vyatka watershed	272	22	nh1
K61	RU	Kirov	Kama river (upper), near Perm region border	273	22	nh1
K63	RU	Kirov	Belaya Kholunitsa river, Vyatka watershed	274	22	nh1
1Ki	RU	Kirov	Slobodskoi distr., Cheptsas watershed	275	22	

Označ. vzorku	Země	Oblast	Lokalita	Číslo ve Structure	Popu- lace	Haplo- typ
2Ki	RU	Kirov	Slobodskoi distr., Cheptsas watershed	276	22	nh1
3Ki	RU	Kirov	Slobodskoi distr., Cheptsas watershed	277	22	nh4
4Ki	RU	Kirov	Slobodskoi distr., Cheptsas watershed	278	22	nh1
S1	RU	Yugra auth.distr	Kuma river, Konda watershed	279	23	nh1
S2	RU	Yugra auth.distr	Satyginski Tuman, Konda watershed	280	23	nh6
S3	RU	Yugra auth.distr	Kanda river, near Satyginski Tuman	281	23	nh6
S4	RU	Sverdlovskaya oblast'	Chornaya river, left tribut. Tavda river	282	23	nh1
S5	RU	Yugra auth.distr	Landina river, tribut. Kuma river, Konda watershed	283	23	nh1
S6	RU	Kondinski district	Vesnice Mortka, rozvodí řek Konda a Tavda		23	nh1