

Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

**Genetické zhodnocení siků (*Cervus nippon* spp.)
z ochránářského hlediska**

Diplomová práce

Bc. Adéla Matějková

Školitel: RNDr. Jan Robovský Ph. D.

České Budějovice 2018

Matějková, A., 2018. Genetické zhodnocení siků (*Cervus nippon* spp.) z ochránářského hlediska. [Genetic evaluation of sika deer (*Cervus nippon* spp.) from a conservation point of view. Mgr. Thesis, in Czech.] - 40 pp. Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

This thesis is focused on genetic evaluation of *Cervus nippon* complex and particularly on *Cervus nippon pseudaxis* and *Cervus nippon taiouanus* kept in European *ex situ* institutions.

Key words:

Sika, *Cervus nippon*, genetic analysis, hybridization.

Prohlášení:

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 18.04.2018 Adéla Matějková

Poděkování:

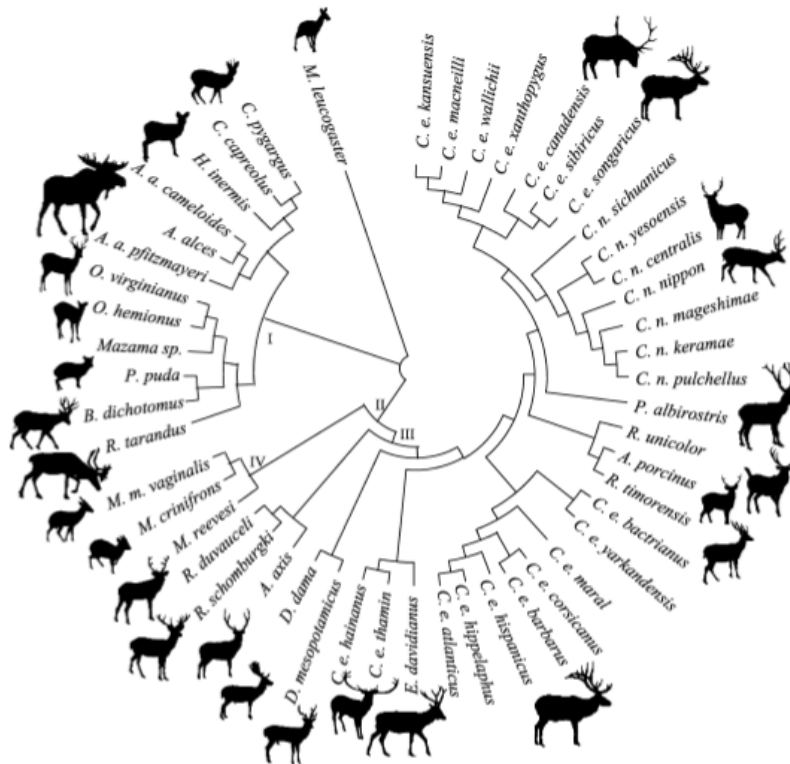
Moje poděkování patří především školiteli Janu Robovskému za jeho ochotu, odborné vedení práce a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat RNDr. Janu Pluháčkovi Ph. D. za pečlivý výběr vzorků, jakož i dalším poskytovatelům vzorků, a Tereze Holicové za zaučení v laboratoři a za další pomoc. V neposlední řadě patří poděkování mojí rodině, přáteli a spolubydlícím za podporu.

Obsah

1.	Úvod	1
2.	Cíle práce	11
3.	Materiály a metodika	12
3.1.	Vzorky	12
3.2.	Mitochondriální DNA	12
3.3.	Analýza dat	13
4.	Výsledky	16
5.	Diskuse	27
6.	Závěr	33
7.	Reference	34
8.	Přílohy	42

1. Úvod

Sikové (*Cervus nippon* nebo *Cervus nippon* spp.) jsou jeleni střední velikosti řadící se do podčeledi Cervinae a přirozeně se vyskytují ve východní Asii. Tito jeleni mohou být z taxonomického hlediska často vnímáni odlišně, buď jako druh s několika poddruhy nebo jako komplex druhů (např. Grubb 2005; Groves & Grubb 2011). Dle několika nejnovějších studií jsou sikové sesterským taxonem wapitoidních jelenů (např. Pitra et al. 2004; Groves 2006; Hassanin et al. 2012; Ludt et al. 2004), kteří jsou, stejně jako sikové, v závislosti na taxonomickém pojetí vnímáni buď jako druh *Cervus canadensis* s několika poddruhy nebo jako komplex několika druhů (např. Grubb 2005; Groves & Grubb 2011). Tato dvojice jelenů působí poněkud výstředním dojmem, a to zejména díky jejich velmi odlišnému vzhledu – sikové jsou oproti wapitoidním jelenům malí a výrazně zbarvení. Na druhou stranu takto vzhledově nesourodou dvojici spojuje řada morfologických znaků a podobná pištivá vokalizace (např. Groves 2006). Těmito dvěma, na první pohled tolik odlišným, druhům je sesterský jelen bělohubý (*Cervus albirostris*) a této trojici druhů pak sesterský jelen evropský (*Cervus elaphus*) nebo sambaři (a pak jelen evropský je další sesterskou linií) (např. Pitra et al. 2004; Ludt et al. 2004). I tento poslední druh je některými autory vnímán jako komplex druhů (např. Groves & Grubb 2011). Pro ukázkou a větší přehlednost viz kladogram čeledi Cervidae níže na základě mitochondriální DNA, konkrétně cytochromu *b* (Obr. I.)



Obr. I.: Vztahy čeledi Cervidae podle studie Pitra et al. (2004)

Sikové byli tradičně rozdělováni do cca třinácti poddruhů, a to na základě morfologických znaků (Whitehead 1993). Dělení těchto poddruhů se však s dalšími autory liší. Počty poddruhů v moderních nebo relativně moderních studiích kolísají mezi deseti až šestnácti (viz Tab. 1.). Konkrétně Groves & Grubb (1987) hovoří o deseti poddruzích, Geist (1998) o dvanácti, o čtrnácti Banwell (1999) a o šestnácti Grubb (2005). Je tedy patrné, že jednotlivé poddruhy s postupem času přibývají. V jedné z nejnovějších studií (Groves & Grubb 2011), ve které byla provedena revize druhů na základě tzv. fylogenetického konceptu druhu, byla řada poddruhů na základě diagnostických znaků povýšena na druhovou úroveň. Ve výsledku se tedy jedná o sedm druhů se šesti rozlišovanými poddruhy.

	Groves & Grubb 1987	Geist 1998	Banwell 1999	Groves 2006	Groves & Grubb 2011
<i>Cervus nippon aplodontus</i>	ANO	X	X	ANO	ANO (jako <i>C. aplodontus</i>)
<i>Cervus nippon centralis</i>	X	ANO	ANO	X	X (= syn. <i>C. aplodontus</i>)
<i>Cervus nippon grassianus</i>	X	ANO	ANO	ANO	X (= syn. <i>C. hortulorum</i>)
<i>Cervus nippon hortulorum</i>	X	ANO	X	X	ANO (jako <i>C. hortulorum</i>)
<i>Cervus nippon infelix</i>	X	X	X	ANO	X (= syn. <i>C. n. nippon</i>)
<i>Cervus nippon keramae</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO (jako <i>C. n. keramae</i>)
<i>Cervus nippon kopschi</i>	X	X	ANO	ANO	X (= syn. <i>C. pseudaxis</i>)
<i>Cervus nippon mageshimae</i>	X	X	ANO	ANO	ANO (jako <i>C. n. mageshimae</i>)
<i>Cervus nippon mandarinus</i>	X	ANO	X	ANO	X (= syn. <i>C. pseudaxis</i>)
<i>Cervus nippon mantchuricus</i>	ANO	ANO	X	ANO	X (= syn. <i>C. hortulorum</i>)
<i>Cervus nippon nippon</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO (jako <i>C. n. nippon</i>)
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO (jako <i>C. pseudaxis</i>)
<i>Cervus nippon pulchellus</i>	ANO	X	X	ANO	ANO (jako <i>C. pulchellus</i>)
<i>Cervus nippon sichuanicus</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO (jako <i>C. sichuanicus</i>)
<i>Cervus nippon soloensis</i>	ANO	ANO	X	X	X
<i>Cervus nippon taiouanus</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO (jako <i>C. taiouanus</i>)
<i>Cervus nippon yesoensis</i>	ANO	ANO	ANO	ANO	ANO (jako <i>C. aplodontus yesoensis</i>)
<i>Cervus nippon yakushimae</i>	X	X	ANO	X	ANO (jako <i>C. n. yakushimae</i>)

Tab. 1.: Validita dílčích taxonů jelena siky podle dílčích autorů.

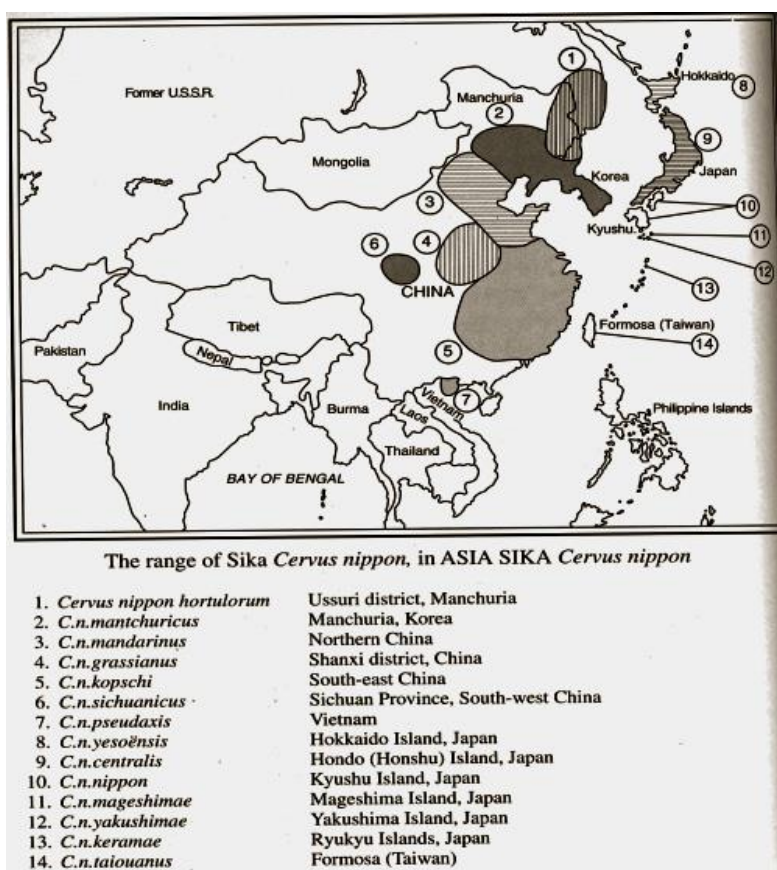
Jednotlivé poddruhy se od sebe liší především zbarvením, velikostí paroží, ale také i počtem výsad (např. Groves & Grubb 1987; Groves 2006; Groves & Grubb 2011), přičemž u největšího siky (*C. n. hortulorum*) bývá u čistokrevných jedinců výsad osm (větší počet je velmi vzácný a bývá nejčastěji důsledkem předchozího křížení různých forem siku) (McCullough 2009). Pro ukázkou rozdílů mezi druhy siku je níže uvedená tabulka dle Banwella (1999) (Tab. 2.). Dalším znakem odlišujícím siky je místo přirozeného výskytu.

Obecně je zbarvení siku v letní období kaštanové hnědé až okrové nebo žlutavě hnědě s velmi výrazným tečkováním na hřbetě, které se rozkládá směrem od středového pruhu, který bývá černohnědý až černý. Kaudální oblast je bělavá, srdcovitého tvaru. Ocas je poměrně dlouhý, světle zbarvený s tmavým pruhem. Hlava je oproti zbytku těla světlejší, v obličejové části tvoří tmavší zbarvení jakousi masku. Spodní pysk je bílý. U samců je toto zbarvení hlavy výraznější nežli u samic. Uši siku jsou zaoblené, kratší a pokryté řídkou světlou srstí. Oblast břicha je bílá v zimním období však krémová nebo šedá. Celkově se zbarvení siku v zimních měsících mění. Srst tmavne a tečkování ubývá. Všechny tyto změny se mění v závislosti na jednotlivých poddruzích (veškerý zde uváděný popis navazuje na Banwella 1999). I u siku se mohou vyskytovat melanistické formy, zejména pak u *C. n. keramae*, též jsou známy případy leucistických jedinců (Banwell 1999). Řada konvenčních poddruhů se jeví být podpořena genetickými studiemi (např. Ba et al. 2015). Genetické analýzy mitochondriální DNA také naznačují, že se sikové rozdělují na severní a jižní typy, které se liší velikostí těla a zbarvením v zimním období. Severní typy jsou oproti jižním většího vzrůstu a jejich zbarvení zimní srsti je mnohem méně výraznější (McCullough 2009). Ve větší míře se míře sikové diverzifikovali na území japonských ostrovů, a to do šesti široce akceptovaných poddruhů: *Cervus n. yesoensis*, *C. n. centralis*, *C. n. nippon*, *C. n. mageshimae*, *C. n. yakushimae* a *C. n. keramae*. I na územní japonských ostrovů jsou patrné rozdíly mezi typy severních oblastí a jižních oblastí. Největším z těchto japonských forem je *C. n. yesoensis* a nejmenším druhem je *C. n. yakushimae*. V kontinentální části se přirozeně vyskytovalo patrně pouze pět taxonů. Jsou to *C. n. hortulorum*, *C. n. sichuanicus*, *C. n. kopschi*, *C. n. mandarinus* a *C. n. grassianus*. Poslední dva zmíněné druhy jsou pravděpodobně vyhubeny.

Poddruh	Hmotnost (kg)	Výška v kohoutku (cm)	Délka paroží (cm)	Velikost lebky (cm)
<i>Cervus nippon centralis</i>	M: 75; F: 45	90 - 95	do 71	29
<i>Cervus nippon grassianus</i>	M: 85; F: 45-50	90 - 95	do 71	34
<i>Cervus nippon hortulorum</i>	M: 125; F: 70	100 - 110	do 88	38
<i>Cervus nippon keramae</i>	M: 30; F: 18-20	65 - 70	do 30	23
<i>Cervus nippon kopschi</i>	M: 85; F: 45	85 - 90	do 71	33
<i>Cervus nippon mageshimae</i>	M: 59; F: 36	80	do 46	26
<i>Cervus nippon mandarinus</i>	M: 110; F: 65	95 - 98	do 76	36
<i>Cervus nippon mantchuricus</i>	M: 120; F: 70-75	98 - 100	do 76	37
<i>Cervus nippon nippon</i>	M: 55; F: 35	85	do 66	28
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	M: 90; F: 50	90	do 76	34
<i>Cervus nippon sichuanicus</i>	M: 125; F: 70-75	100 - 110	do 88	38
<i>Cervus nippon taiouanus</i>	M: 110; F: 65	100 - 110	do 86	35
<i>Cervus nippon yakushimae</i>	M: 45; F: 25	70 - 75	do 30	24
<i>Cervus nippon yesoensis</i>	M: 120; F: 65-70	100	do 81	36

Tab. 2.: Srovnání průměrných velikostí nebo velikostních rozsahů poddruhů *Cervus nippon* (Banwell 1999)

Přirozený výskyt siků je, jak již bylo zmíněno, ve východní Asii. Především pak v Číně, Rusku, Vietnamu, na Korejském poloostrově, Tchaj-wanu a japonských ostrovech - viz Obr. II. Sikové již jsou již od nepaměti součástí kultury většiny těchto východních států. V Číně jim bylo přezdíváno „Mei-hua-lu“ což v překladu znamená „jelen se švestkovými květy“. V Japonsku slovo „Shika“, ze kterého vznikl název sika, znamená jelen (Banwell 1999). Paroží siků je taktéž nedílnou součástí tzv. tradiční čínské medicíny pro své paroží, ale také to mohou být zvířata posvátná, jako např. v Japonsku. Zejména pak ve městě Nara, kde se sikové volně pohybují po okolí. Jejich posvátnost zde souvisí s místní mytologií, kdy zdejší božstvo mělo do chrámu v Naře přijíždět právě na hřbetech siků (McCullough 2009). Kůže siků byly také v minulosti využívány čínskými domorodými kmeny jako způsob platby při nedostatku mincí, zlata a stříbra (McCullough 2009).



Obr. II.: Výskyt siků podle monografie Banwell (1999). Groves (2006) Banwellův *C. n. centralis* označuje jako *C. yesoensis aplodontus* a u ostrova Tsushima navíc uvádí formu *C. pulchellus*.

Z míst přirozeného výskytu byli sikové opakovaně dováženi nejprve do Evropy a později i do celého světa. Do evropských zemí byli sikové zavlečeni již na počátku 19. století. Jednalo se o několik jedinců siků japonských, kteří byli evropským státníkům darováni

japonským císařem (McCullough 2009). Dále byli sikové zavlečeni do celého světa, stejně jako i ostatní druhy jelenů, jakož to atraktivní kusy pro lov a další chov (Smith et al. 2014). Počátkem 20. století byli do Evropy dovezeni jedinci *C. n. hortulorum* z ruského Přímořského kraje. Jednalo se tedy o dva odlišné poddruhy, které díky nedostatečné znalosti všech poddruhů a jejich odlišností, byli často chováni společně a docházelo tak k jejich hybridizaci. Do Irska byli sikové dovezeni jako zdroj zvěřiny. Jednalo se o poddruh *C. n. nippon*, avšak jejich původ se jeví poněkud pochybný, protože pravděpodobně docházelo ke křížení s jinými poddruhy, a to v různé míře. Nejčastěji se pravděpodobně jednalo o křížení s poddruhem *C. n. manchuricus* (Carne 2000). Dále byli ve Velké Británii v několika zoologických zahradách a parcích chováni sikové tchajvanští (Carne 2000). Ve Woburn Abbey bylo údajně před rokem 1903 chováno 106 „japonských“ siků, 34 *C. n. manchuricus* a 12 *C. n. taiouanus* a z této skupiny bylo později dovezeno šest jedinců na Nový Zéland (McCullough 2009). Na území dnešní České republiky byli sikové od konce 19. a počátkem 20. století dováženi údajně z Japonska, východní Číny, Korej, jihovýchodní Sibíře a Ruska, zde konkrétně z oblastí řeky Ussuri (Bartoš 2009; McCullough 2009).

V místech nepůvodního výskytu dochází díky sikům k mnoha problémům. Nejen co se ničení zemědělské úrody týče, ale také poškozování lesů (Barančková et al. 2012). Další neméně vážný problém je hybridizace s původními druhy jelenů a následné narušování jejich genetické integrity (např. Goodman et al 1999). I přes to, že sikové v nepůvodních oblastních způsobují značné problémy, je mnoho rozlišovaných taxonů nebo jejich populací v místech přirozeného výskytu velmi ohroženo nebo dokonce vyhubeno (viz níže). Tato práce je konkrétněji zaměřena na dva ve volné přírodě již vyhubené druhy, a to na siku tchajvanského (*C. n. taiouanus*) a na siku vietnamského (*C. n. pseudaxis*).

Sika tchajvanský (*Cervus nippon taiouanus*) je zaslouženě nejatraktivnější druh siky vůbec. Pro siky typické tečkování se vyskytuje u obou pohlaví, a to jak v letním, tak i v zimním období. Zbarvení srsti je jasně kaštanově hnědé (Banwell 1999). Na Tchaj-wanu se tyto sikové patrně dostali díky pevninskému mostu asi před 40–10 tisíci lety (McCullough 2009). Díky využívání jejich paroží v tradiční čínské medicíně byl tento druh siky ve volné přírodě zcela vyhuben. K úbytku siků na Tchaj-wanu přispěla i první čínsko-japonská válka v roce 1895, kdy Japonsko získalo území Tchaj-wanu, ale i druhá světová válka, při které Japonci využívali všech dostupných zdrojů (McCullough 2009). V roce 2011 deník Tchaj-wan Today uvedl, že poslední volně žijící sika tchajvanský byl odloven v roce 1969 (viz také McCullough 2009). V zajetí bylo chováno několik čistokrevných jedinců tohoto druhu a to např. v Tchaj-pej Zoo

(McCullough 2009). Původně se volně žijící sikové tchajvanští na Tchaj-wanu vyskytovali v nížinách podél hor v západní části tohoto ostrova. V současné době vede tzv. monitoring v evropském prostoru Noel Carey, kdy je v současné době evidováno cca 85 chovaných jedinců (databáze Species360) viz Příloha 1.

Oproti tomu sika vietnamský (*Cervus nippon pseudaxis*) nepatří mezi tolik barevně výrazné druhy. Tečkování není tak ostře ohraničené, přesto je dobře odlišitelné. Hlavní přirozený výskyt siků vietnamských byl podél Rudé řeky a přilehlých hojně zemědělsky využívaných oblastech. Právě z takto zemědělsky využívaných oblastí začali sikové mizet nejdříve, a to již od počátků 19. století. Za vyhubeného ve volné přírodě byl tento druh prohlášen v roce 1998 (McCullough 2009), ale v současné době jsou chovány v soukromých chovech a jejich přesný počet není znám. Chovy vznikaly zejména pro produkci paroží, a ještě v osmdesátých letech se cena dospělé samice pohybovala kolem pěti tisíc amerických dolarů. Po zhroutení trhu s touto surovinou v roce 2000 klesla cena na dvě stě dolarů (McCullough 2009). V hanojské Zoo byla chována skupina siků vietnamských, ti však byli kříženi s jedinci dovezenými z ruského Vladivostoku. Jednalo se tedy o hybridy *C. n. pseudaxis* a *C. n. hortulorum* (McCullough 2009). Plemenná kniha je vedena RNDr. Janem Pluháčkem Ph. D. z ostravské zoologické zahrady. V současné době je chováno cca 343 jedinců a to ve 28 evropských, třech severoamerických a jedné asijské instituci (databáze Species360) viz Příloha 2.

Sikové ochotně hybridizují s jinými druhy jelenů. Zejména již se zmíněnými blízkými příbuznými druhy – jelenem evropským a jelenem wapiti, ale také i s axisy a jelínky (Bartoš et al. 1981). Přirozená hybridizace mezi siky a jeleny wapiti se objevuje pouze v místech jejich přirozeného výskytu v povodí řeky Ussuri v ruském Přímořském kraji. Zde se potkávají samice siků s mladými samci jelenů wapiti, se kterými se následně páří. Tato hybridizace je poměrně málo častá a dochází k ní pouze na okrajích rozšíření siků (McCullough 2009). Místní lovci mají pro hybridy vlastní označení (McCullough 2009).

V oblastech, kde jsou sikové nepůvodní, dochází kvůli hybridizaci s místními přirozeně se vyskytujícími druhy jelenů ke genetické erozi těchto původních druhů. O velikých problémech s touto hybridizací se hovoří především ve Spojeném království (převážně ve Skotsku, Anglii a Irsku) nebo i v České republice, kde chování sikové unikli do volné přírody. K jejich úniku do volné přírody přispělo především poškození ohrad a plotů obor, kde byli sikové chováni. Tato poškození byla nejčastěji způsobena větrem, spadlými stromy nebo větším množstvím sněhu. Nemalou vinu v úniku siků měla také druhá světová válka. Během války

docházelo k poškozování ohrad a některé chovy díky válce i zanikly. Mnoho chovů siků zaniklo o záhy po válce, protože je nebylo možné nadále financovat. O jelenech sika je známo, že jsou vcelku dobrými plavci, to se projevilo po jejich vysazení na ostrově Brownsea, odkud několik jedinců uplavalo (Carne 2000). Sikové se pak ve volné přírodě velmi dobře adaptovali (Carne 2000).

Hybridizace siků a jelenů evropských je možná oběma způsoby tedy s „otcem“ sikou, ale také i s „matkou“ sikou (Bartoš 2009). Častějším je první varianta. Bylo pozorováno, že samci siků v říji opouštějí svá stanoviště s nejvyšší hustotou a připojují se k harémům jelenů evropských. Samci jelenů evropských samce siků často ignorují, a to i v případech, že se samci siků pokouší pářit nebo se i spáří s laněmi jelenů evropských (Bartoš & Žirovnický 1981; Biedrzycka et al. 2012). Stejně tak bylo pozorováno páření mezi samci jelenů evropských a laněmi siků (Carne 2000). V oblasti Knapdale ve Skotsku bylo spojení laní siků se samci jelenů evropských pozorováno častěji, než páření samců siků s laněmi jelenů evropských (Carne 2000), stejně jako v některých oblastech v Irsku, kde samice siků při páření preferují buď samce jelenů evropských, nebo hybridy. A to navzdory riziku, že by kvůli jejich velikosti mohlo dojít ke zranění (Groves & Grubb 1987). Takto vzniklí hybridy jsou plodní a dále se rozmnožují. Hybridní jedinci jsou dobře rozpoznatelní v F1 generaci a jejich vzhled je pro lovce/chovatele zvláštní nebo dokonce „podezřelý“. Často také bývají z chovu vyřazeni (McCullough 2009). S dalšími generacemi se však znaky patrné u hybridů mizí a jde tedy špatně rozpoznat, jednali se hybridního nebo čistokrevného jedince (Biedrzycka et al. 2012; Senn et al. 2010). V těchto případech je potřeba sensitivní genetické analýzy. Nejčastěji je využívána analýza mitochondriální DNA a cca desítky mikrosatelitů (Smith et al. 2014; Senn et al. 2010).

Ke křížení siků ale docházelo i úmyslně, a to z několika důvodů. Ke křížení siků docházelo na farmách, kde byli sikové chováni jako zdroj paroží v lýčí, které je jednou z nedílných součástí tzv. tradiční čínské medicíny. Ke křížení, zde docházelo zejména z důvodů navýšení produkce paroží. Ke křížení siků docházelo také v oborovém chovu, a to především z důvodu již zmíněné nedostatečné znalosti jednotlivých poddruhů. Křížení mezi poddruhy siků bylo též zdokumentováno z Letního paláce v Pekingu (Banwell 1999, Groves 2006). Úmyslně byli sikové kříženi i jeleny evropskými a někteří jejich hybridní potomci byli prodáváni jako trofejní sikové pro další oborový chov (Bartoš et al. 1981). Před první světovou válkou byly ve Velké Británii prováděny experimenty s křížením poddruhů siků, tak aby byla zvýšená velikost těla (tj. větší produkce zvěřiny) a pro lepší trofejní hodnotu (Carne 2000). V hrabství County Wicklow bylo zjištěno, že 41 % ze zkoumaných siků bylo hybridy s jelenem evropským (Smith

et al.2014). Biedrzycka et al. (2012) uvádí, že 15,5 % siků východoevropských lokalit (Polsko, Kaliningradská oblast a Litva) je hybridních.

V dnešní době je hybridizace neboli křížení mezi taxony často diskutovaným tématem (pro detailní úvahy nad hybridizací viz Zajícová 2016). Především pak v ochranářském kontextu, kdy může dojít hybridizací ke ztrátám některých osobitých vlastností daných taxonů tzv. genetické erozi. Oproti tomu se ale také ukazuje, že bývá zdrojem některých vlastností, které mohou být nositelům užitečné. Je však důležité vědět, o který typ hybridizace se jedná, tedy jde-li o hybridizaci přirozenou nebo hybridizací ovlivněnou člověkem (Mayr 1964).

2. Cíle práce

Tato práce si klade několik cílů:

- 1) Analyzovat mitochondriální profil siky vietnamského a siky tchajvanského, konkrétně pro dva geny (cytochrom *b* a D-loop), ve vztahu k ostatním rozlišovaným taxonům (např. na základě topologie fylogenetického stromu, genetické distance, časový odhad diversifikace)
- 2) Určit maternální afinitu v Evropě chovaných (a deklarovaných) siků vietnamských a tchajvanských k vymezitelným liniím siků a také odhodnout jejich základní populačně-genetické charakteristiky.

První cíl by představoval v určité míře fylogenetickou meta-analýzu všech lokalizovaných GenBank-ových sekvencí pro oba mitochondriální geny, které jsou doposud jediné, které mají geograficky reprezentativní vzorkování, a vykazují míru variability, která odlišuje alespoň některé populace-linie-taxony siků.

Druhý cíl představuje pokus o částečné prověření čistokrevnosti obou evropských chovů pro další management. V případě siků vietnamských se uvažuje o introdukci do jižní Číny, u siků tchajvanských o propojení s asijskými chovy, přičemž zvláště u těch tchajvanských existuje určitá míra pochyb o čistokrevnosti. Odhad základních populačně-genetických charakteristik by měl ukázat, jak moc jsou obě populace geneticky rozmanité, a tedy z evolučního-managementového hlediska v budoucnosti ohrožené.

Samozřejmě platí, že studium jen maternálního profilu má své limity, ovšem za aktuálního *status quo* se jeví jako relativně užitečná testovatelná varianta, přinejmenším jako první krok pro případné další studium.

3. Materiály a metodika

3.1. Vzorky

Vzorky dvou taxonů, na které je tato práce zaměřena, tedy siky vietnamského (*C. n. pseudaxis*) a siky tchajvanského (*C. n. taiouanus*) byly získány z různých organizací a byly individuálně značené (např. čísla čipů, barvy značek, jména zvířat nebo chovatelská čísla). Ze Zoo Banham bylo analyzováno 10 vzorků, z West Midland Safari & Leisure Park 18 vzorků, z Corbury Park 69 vzorků, ze Zoo Ostrava čtyři vzorky, z Tierparku Berlin tři vzorky, ze Zoo Varšava jeden vzorek a jeden vzorek ze Zoo Ústí nad Labem (viz Příloha 3.).

Celkem bylo analyzováno 106 vzorků. Jednalo se o vzorky chlupů, krve nebo tkání. Chlupy a vzorky tkání byly uchovány v 96% etanolu a skladovány při -20°C. Krevní vzorky uchovávané v pufru EDTA byly skladovány při teplotě 5°C.

Školitel se též pokusil získat vzorky dalších taxonů, ale s neuspokojivým výsledkem (minimum vzorků, popř. pozdní dodání). Výběr jedinců siků vietnamských byl pečlivě proveden EEP koordinátorem taxonu RNDr. Janem Pluháčkem Ph. D. na základě plemenné knihy, abychom mohli zkusit analyzovat mitochondriální profil všech zakladatelských jedinců v záchranném programu. U siky tchajvanských tento postup nebyl možný pro omezenou chovnou evidenci (řada jedinců je navíc chována spíše oborovým způsobem, kde jsou paternity obtížně určitelné).

DNA byla izolována pomocí izolační sady Genomic DNA Mini Kit (Geneaid). Dále byla provedena amplifikace DNA metodou PCR. Na vzniklém produktu byla provedena elektroforéza na jednoprocetním agarozovém gelu. PCR produkt by dále přečištěn pomocí Gel/PCR DNA Fragments Kit (Geneaid). Přečištěná DNA byla dále poslána k sekvenaci (Eurofins).

3.2. Mitochondriální DNA

U vzorků byla provedena analýza cytochromu *b* za použití primerů cytoB A1 a cytoB B2 (Ludt et al 2004) a analýza D-loop při použití primerů L 15926 a H 00651 (Kocher et al. 1989). Původně byly použity primery jiné, a to L14724 a H15149 (Bo et al. 2006, Irwin et al.

1991) pro cytochrom *b* a L-Pro a H-Phe pro D-loop (Randi et al. 2001, Douzery & Randi 1997). S těmito primery se však nepovedlo DNA amplifikovat.

PCR proběhlo v cycleru typu Cycler XP (Bioer Technology) o celkovém objemu 25 μ l skládající se z 12,5 μ l Combi PPP Master Mixu, 8,5 μ l H₂O, po 1 μ l od každého z primerů a 2 μ l DNA.

Amplifikace cytochromu *b* byla započata denurací při 94°C po tři minuty, dále následovala ve 35 cyklech denurace při 94°C po 45 sekund, hybridizace při 54°C po 45 sekund a elongace při 72°C po dobu jedné minuty a deseti sekund, následovala závěrečná elongace při 72°C po dobu tří minut.

U některých vzorků bylo nutné PCR opakovat. Když i po zopakování PCR nebyla DNA úspěšně amplifikována, byla zopakována izolace DNA. Úprava programu amplifikace nebyla dále nutná.

Amplifikace pro D-loop byla započata denurací při 93°C po dobu dvou minut následovalo 35 cyklů denurace při 93°C po dobu jedné minuty, hybridizace po při 50°C po dobu dvou minut a elongace při 72°C po dobu tří minut. Závěrečná elongace probíhala při 72°C po dobu deseti minut. (Kocher et al. 1989).

K ověření PCR produktu byla provedena elektroforéza na jednoprocentním agarózovém gelu. Následně byly PCR produkty přečištěny pomocí setu Gel/PCR DNA Fragments Kit (Geneaid). Přečištěná DNA byla poslána na sekvenaci (Eurofins). Množství přečištěné DNA pro sekvenaci bylo 15 μ l. K DNA byl přidán také primer o objemu 2 μ l při odesílání jednotlivých vzorků nebo 4 μ l při odesílání platíčka s 96 jednotlivými zkumavkami.

3.3. Analýza dat

K sekvencím DNA ze získaných vzorků, byly přidány sekvence DNA siků z databáze GenBank a to jak pro cytochrom *b*, tak pro D-loop, u kterých jsme se se školitelem pokusili o poddruhové určení na základě lokalit (s použitím např. Banwella 1999; Grovese 2006). Jako outgroupy byly zvoleny sekvence dle Heckeberg et al. (2016) pro cytochrom *b* a dle Randi et al. (2001) pro D-loop. Cytochrome *b* byl použit jakožto standardní marker pro určování genetických odlišností s kvalitou informace stejnou či o něco lepší, než hodně používaná mitochondriální COX I (cytochrome c oxidase, subunit I) (Tobe et al. 2010), a proto mohou být získané genetické distance porovnány i s jinými skupinami savců (Bradley & Baker 2001; Baker & Bradley 2006). D-loop byl použit jako další mitochondriální gen pro získání jistějšího

výsledku, neboť by měl být variabilnější než cytochrom *b* (Nagata et al. 1998), a též k validizaci některých překvapivějších výsledků na základě cytochromu *b*.

Všechny získané sekvence byly alignovány pomocí programu MAFFT verze 7 (Katoh & Standley 2013). Alignované sekvence byly následně manuálně upravené v programu BioEdit (Hall 1999). Následně byly sekvence v programu BigBang 3 (Piálek 2009) převedeny do formátu nexus. Tento formát mohl být následně použit v programu jModelTest (Posada 2008), který vypočetl nejvhodnější substituční model DNA. Dle takto získaného modelu byla data dále zpracována fylogenetickou analýzou pomocí algoritmu „Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo“ v programu Mr.Bayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Optimální evoluční model DNA byl pro oba geny GTR+I+ Γ , s použitím Akaikeova hodnotícího přístupu v programu jModelTest (Posada 2008). Analýza proběhla při 1 000 000 generací. Prvních 300 000 a 450 000 stromů bylo odstraněno v rámci procedury „burnin“.

Genetické distance byly zjištěny pomocí vypočítány pomocí programu MEGA 5 (Tamura et al. 2011) na základě Kimurova dvou-parametrového modelu substituce pro srovnatelnost se studii Bradley & Baker 2001; Baker & Bradley 2006.

Datování bylo provedeno programem BEAST2 (Drummond et al. 2012) za použití fosilií coby kalibračních bodů (Pitra et al 2004). Konkrétně bylo použito sedm kalibračních bodů ze studie Pitra et al. (2004): 5 Mya pro skupinu *Mazama*; 7 Mya pro skupinu *Muntiacus*; 5 Mya pro skupinu *Axis*; 3,25 Mya pro skupina *Rusa*, 6 Mya pro skupinu *Cervus*, 2,25 Mya pro skupinu jelena bělohubého a 1,2 Mya pro siky. V případě jelena siky jsme se pokusili revidovat jejich dataci s použitím detailnějších revizí fosilního materiálu tohoto druhu (Kawamura 2009) a jeho datací s použitím níže uvedených studií a datací z databáze NOW (New and Old Worlds – Database od fossil mammals). Toto review naznačilo, že sikové se objevili před min. 1,2 (pokud vnímáme druh *Cervus/Pseudaxis (nippon) grayi* jako prvního siku – např. Kawamura 2009) nebo min. 2,6 milióny let (pokud vnímáme druh *Cervus perrieri* jako „prvního“ siku – např. Groves & Grub 1987; Geist 1998). K určení času rozdělení linií s 95% posteriorní pravděpodobností byl použit model „relaxed-clock“ (za předpokladu stálé velikosti populace). Konvergence a stabilita odhadovaných parametrů byla ověřena pomocí programu TRACER 1.6 (Rambaut & Drummond 2007). Maximální pravděpodobnost stromů byla získána v TREEANNOTATOR 2.4.5.0 a následně byly Výsledné stromy vizualizovaný v programu FIGTREE 1.4.3 (Drummond & Rambaut 2007; Rambaut 2009).

Úroveň genetické variability dat byla vyjádřena pomocí indexů (Nei 1987) a vypočtena pomocí programu DnaSP 4.50.2 (Rozas et al. 2008).

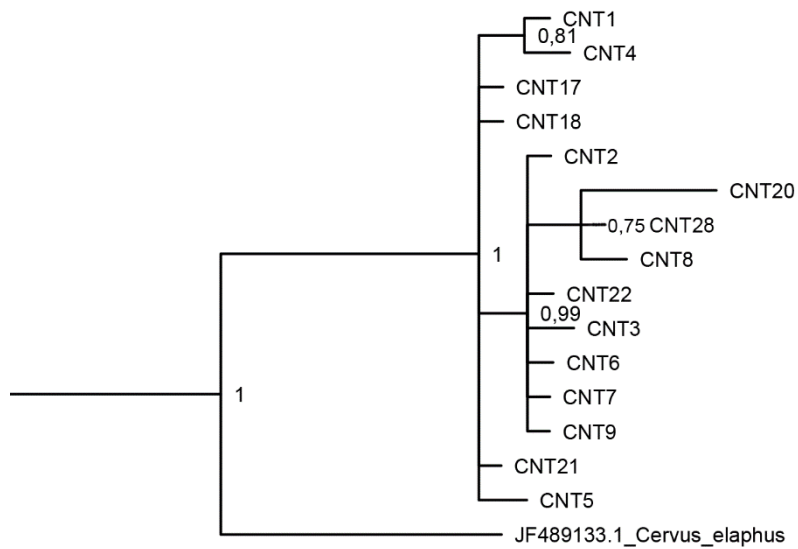
4. Výsledky

Fylogenetické-fylogeografické zhodnocení bylo provedeno ve dvou variantách – na základě čistě GenBank-ových dat a druhá varianta k těmto datům připojuje i má data, pro určení mitochondriálních afinit zoo zvířat.

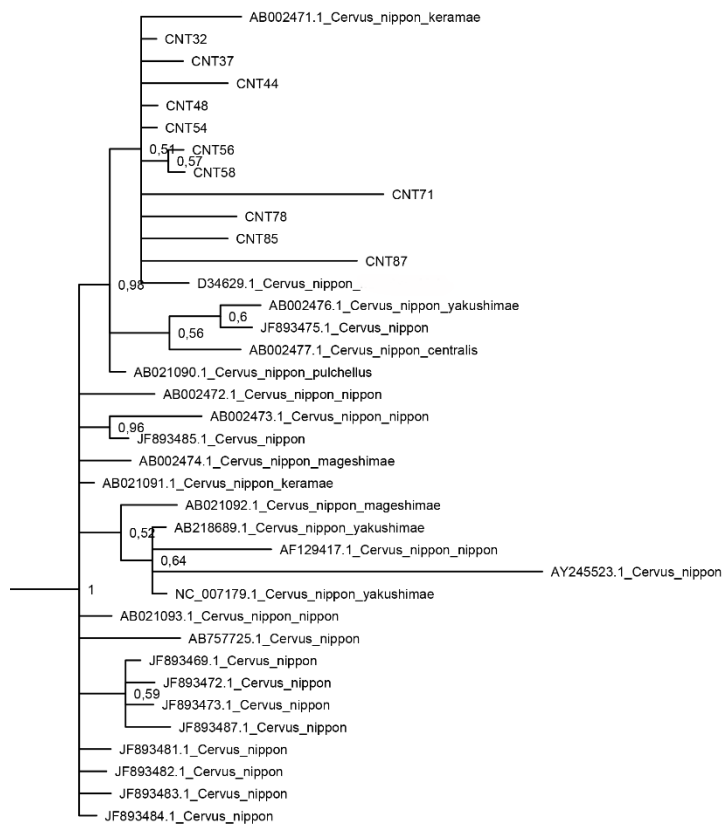
Bayesovská analýza cytochromu b pro GenBank-ové sekvence dělí naprostou většinu sik do tří velmi dobře podpořených skupin (tedy s podporou (=posteriorní pravděpodobnost) \geq 95%) viz Obr. III. Sesterskou skupinou siků jsou jeleni wapiti (*C. canadensis*), této skupině pak jelen bělohubý (*C. albirostris*) a jim pak jelen evropský (*C. elaphus*) (výsledky odpovídají řadě studií, pro review viz např. Groves & Grubb 2011); kompletní fylogenetický strom je přiložen na CD). První skupina (skupina I) zahrnuje druhy z jižních japonských ostrovů. Druhá skupina (skupina II) odpovídá druhům ze severních japonských ostrovů. Třetí skupina zahrnuje druhy kontinentální a dále se dělí na pět podpořených skupin. První z těchto pěti skupin zahrnuje druhy ze severní Číny a Mandžuska (*C. n. hortulorum*). Druhá skupina zahrnuje siky vietnamské (*C. n. pseudaxis*), třetí skupina zahrnuje siky tchajvanské (*C. n. taiouanus*) čtvrtá skupina je opět dobře podpořena a zahrnuje siky Dybovského (*C. n. hortulorum*) – označeno v kladogramu a tabulkách níže jako sika Dybovského 2. Poslední skupina odpovídá sikům z východnějších a jižnějších částí Číny (*C. n. sitchuanicus*, *C. n. kopschi*, *C. n. mandarinus*) – označeno v kladogramu a v tabulkách jako „východní Čína“. Silnou vazbu k podskupinám v rámci skupiny III nevykazuje sekvence JN709895. Z této vcelku geograficky slušně vymezené struktury vybočuje sekvence jen *C. n. aplodontus* D34629 ve skupině I.

Data siků získaná z databáze GenBank tvoří monofyletickou skupinu. Výjimkou je zde jeden jedinec označený jako *Cervus nippon* (AJ304501.1). V tomto případě, se ale jedná pravděpodobně o špatné určení druhu, ve skutečnosti se jedná sambara (*Rusa unicolor*).

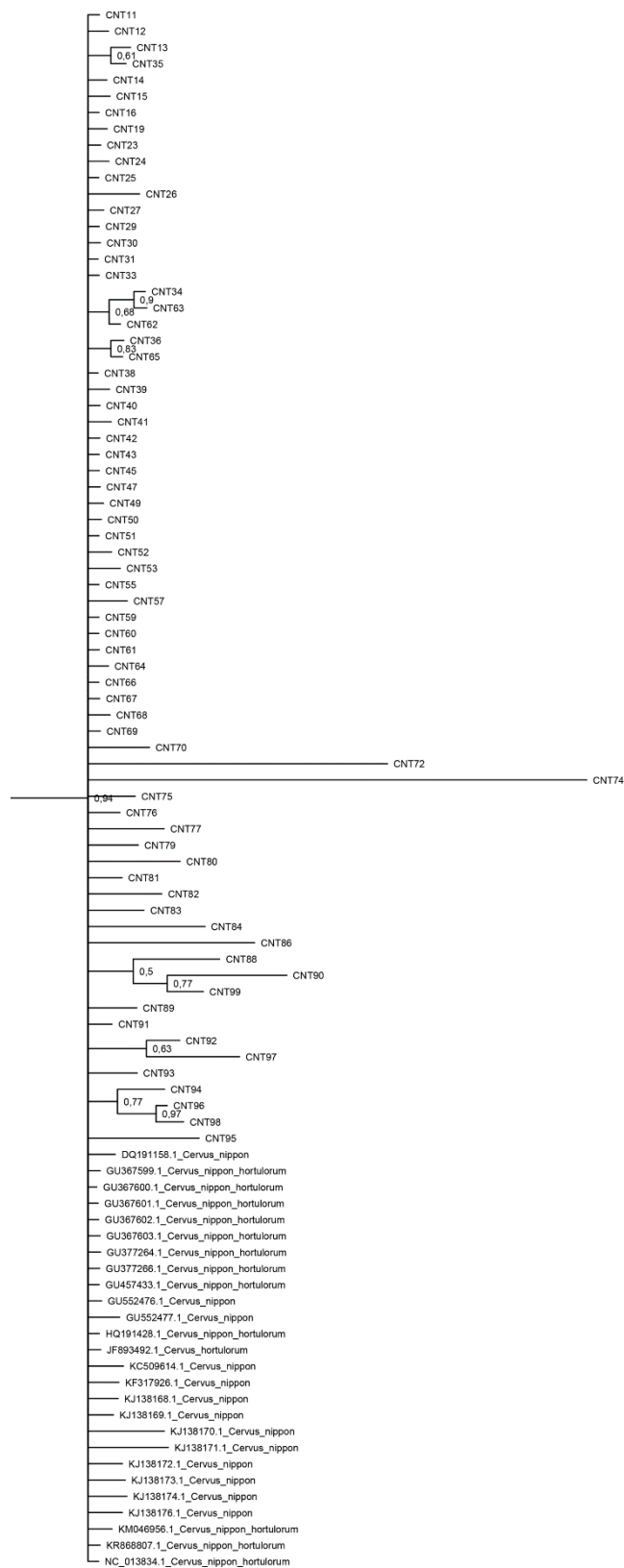
Z bayesovské analýzy cytochromu *b* pro GenBank-ové sekvence a sekvence získané pro zoo-zvířata vyplynulo, že někteří jedinci v evropském prostoru označovaní jako sika tchajvanský vykazují silné afinity k jelenu evropskému (*Cervus elaphus*), konkrétně jde o tyto jedince CNT1-CNT9, CNT17, CNT18, CNT20, CNT21, CNT22, CNT28 viz Obr. IV, dále k sikům z jižních japonských ostrovů, konkrétně vzorky CNT32, CNT 37; CNT44, CNT48, CNT54, CNT56, CNT58, CNT71, CNT78, CNT85, CNT87 viz Obr. V. a zbytek k sikům ze severní Číny a Mandžuska (*C. n. hortulorum*) viz Obr. VI. Vzorky těchto jedinců byly získány z Zoo Banham a z West Midland Safari & Leisure Park.



Obr. IV.: Mitochondriální afinity siků tchajvanský k jelenu evropskému (*Cervus elaphus*), na základě bayesovské analýzy cytochromu *b*.

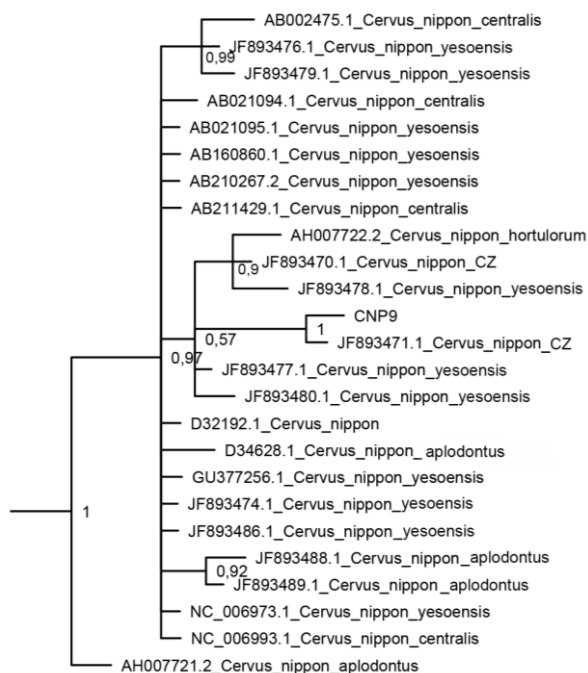


Obr. V.: Mitochondriální afinita vzorků siků tchajvanských CNT32, CNT 37; CNT44, CNT48, CNT54, CNT56, CNT58, CNT71, CNT78, CNT85, CNT87 k sikům z jižních japonských ostrovů na základě bayesovské analýzy cytochromu *b*.



Obr. VI: Umístění ostatních vzorků siků tchajvanských mezi siky ze severní Číny a Mandžuska na základě bayesovské analýzy cytochromu *b*.

Vzorky siků vietnamských získaných pro tuto analýzu vykazovaly afinitu ke skupině siků vietnamských. Výjimkou byl pouze vzorek CNP9, který vykazoval afinitu k sikům severních japonských ostrovů viz Obr. VII.



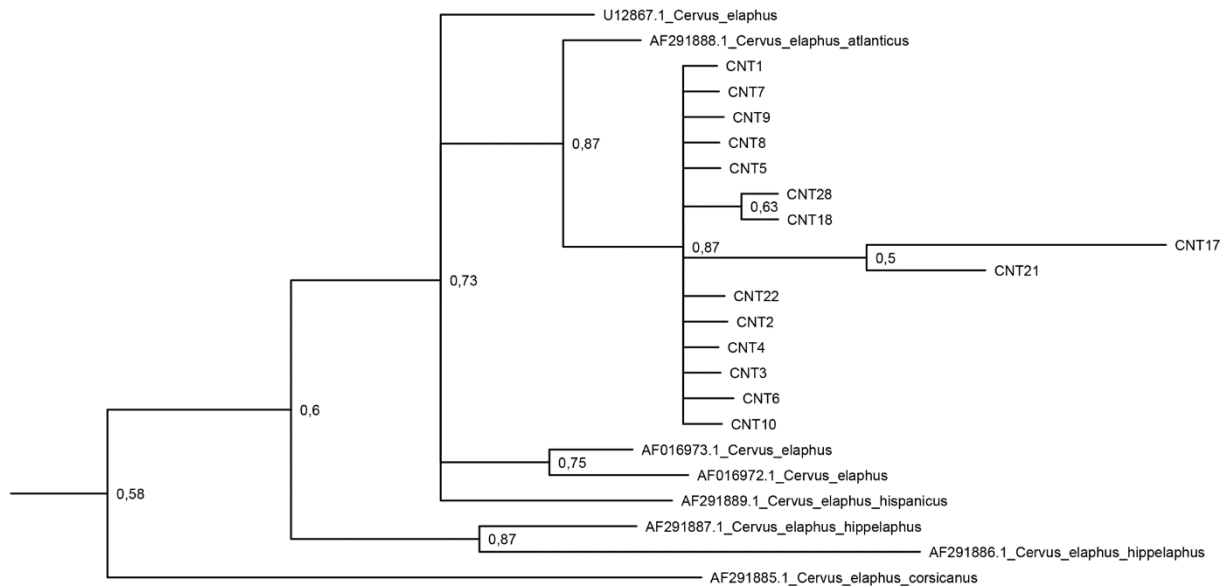
Obr. VII.: Mitochondriální afinita vzorku siky vietnamského CNP9 k druhů siků ze severních japonských ostrovů na základě bayesovské analýzy cytochromu *b*.

Protože, jak již bylo zmíněno, některé vzorky jsou ve výsledném stromě pro cytochrom *b* zařazeny mezi jeleny evropské, byl pro kontrolu analyzován i pro D-loop se stejným postupem. Vznikl tak strom pouze pro data získaná z databáze GenBank a posléze strom pro obě skupiny získaných dat. Výsledný strom s daty s databáze GenBank rozděloval siky na stejné skupiny druhů jako v případě cytochromu *b* (výsledný strom přiložen na CD). Podpora těchto skupin byla ale překvapivě nižší (výřez z kladogramu s podpořenými skupina přiložen na CD z důvodu jeho velikosti).

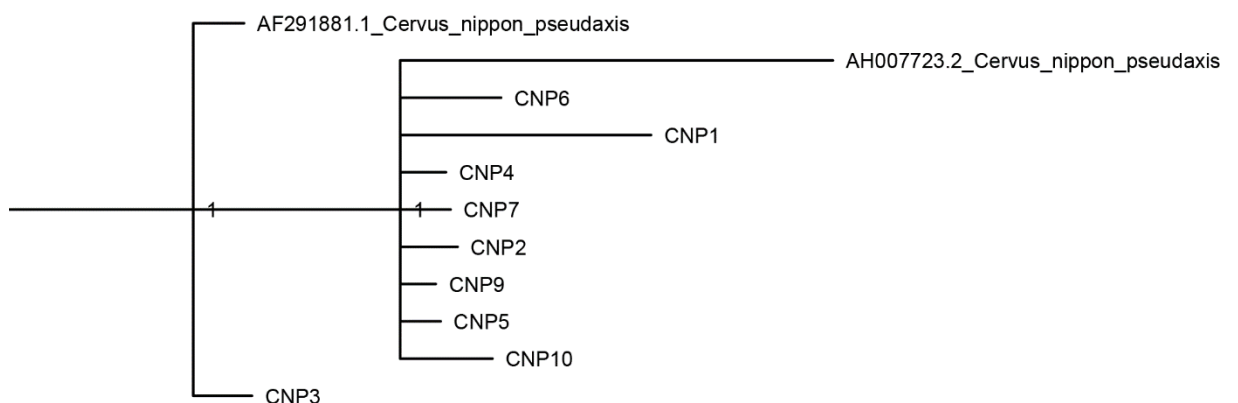
Vzorky siků tchajvanských z evropských zoo se zařadily do stejných skupin jako v případě cytochromu *b*, kromě těchto vyjímek – jedinci navázaní na jelena evropského se v cytochromu *b* a D-loop liší ve dvou případech. Prvním je CNT 20, který se objevil ve skupině jelena evropského pro cytochrom *b*, v analýze D-loopu zapadl do skupiny siků severní Číny a Mandžuska (*C. n. hortulorum*). V druhém případě se jedná o jedince CNT10, který vykazuje vazbu ke skupině jelena evropského v analýze D-loopu. Ve výsledcích analýzy pro cytochrom

b se tento vzorek neobjevil, protože i přes opakované pokusy se nepodařilo amplifikovat DNA pro tento úsek genu.

Vzorky siky vietnamského vykazují stejné vazby jako podle cytochromu b, jen vzorek siky vietnamského CNP9 se podle D-loop(u) zařadil mezi ostatní siky vietnamské (Obr. IV).



Obr. VIII: Mitochondriální afinita vzorků CNT1-CNT10, CNT17, CNT18, CNT21, CNT22, CNT28 k jelenům evropským (*Cervus elaphus*) na základě bayesovské analýzy D-loopu.



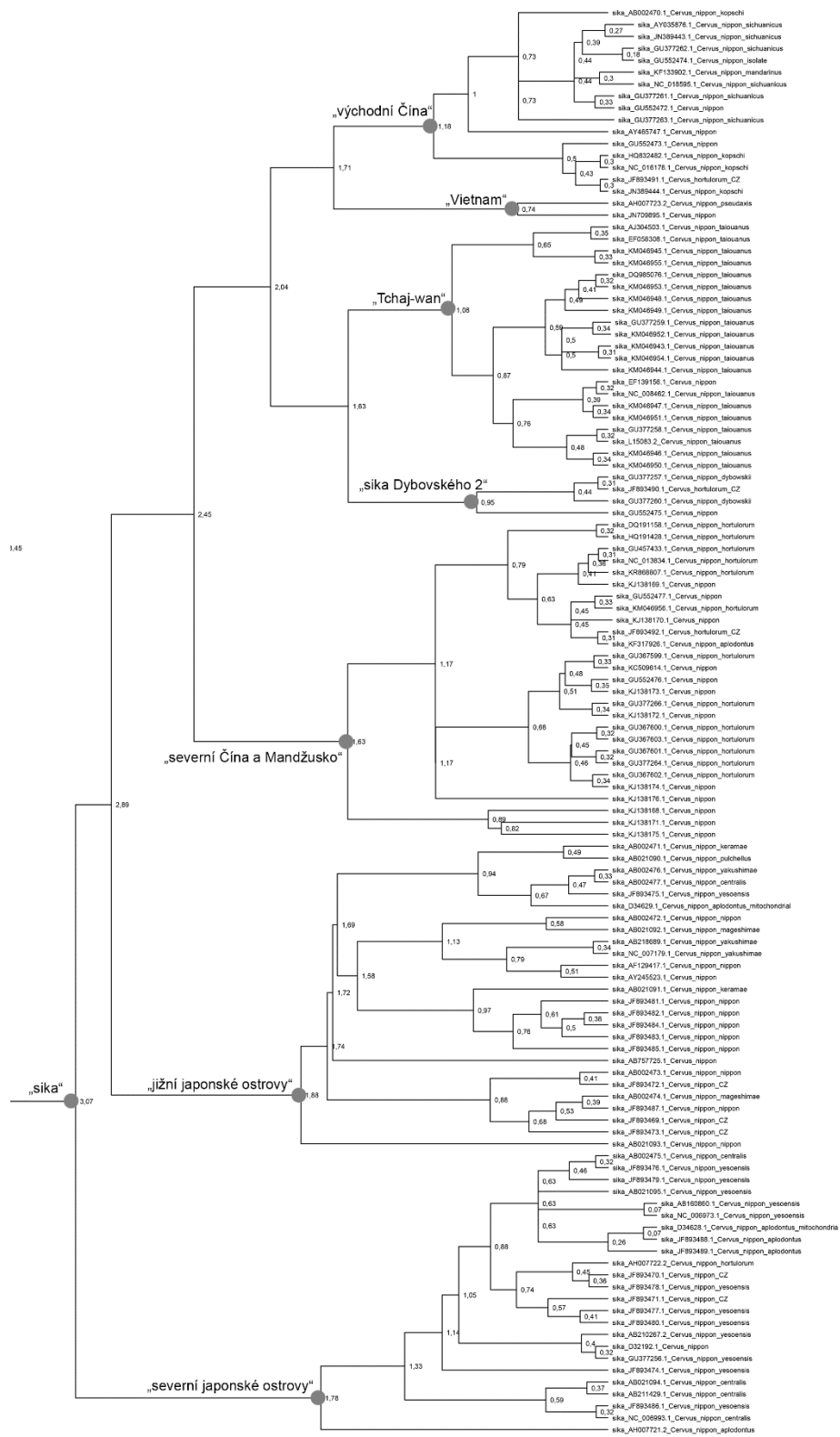
Obr. IX: Mitochondriální afinita vzorku CNP9 k sikům vietnamských na základ analýzy D-loopu.

Výsledky pokusu o datování jsou uvedeny v tabulce níže (Tab. III. A Obr. X.– ve formě průměrné hodnoty) a to jak pro původ všech siků, tak pro dílčí dobře podpořené linie. Celkový výsledný strom pro jelenovité s průměrnými hodnotami odhadu pro TMRCA je přiložen na CD

z důvodu jeho velikosti. Tato analýza byla provedena pro cytochrom *b*, a to z důvodu lepší srovnatelnost s jinými studiemi.

Linie	TMRCA	95% HDP
„sika“	3,07	1,79 – 4,16
„jižní japonské ostrovy“	1,88	0,8 – 2,77
„severní japonské ostrovy“	1,78	0,65 – 2,59
„severní Čína a Manžusko“	1,63	0,65 – 2,39
„Vietnam“	0,74	0- 1,44
„Tchaj-wan“	1,08	0,33 – 1,58
„sika Dybovského 2“	0,95	0,13 – 1,46
„východní Čína“	1,18	0,56 – 2,33

Tab. III.: Výsledné hodnoty (průměrné, 95% rozpětí) datování skupin siku.



Obr. X.: Odhadované datace diverzifikace siků – u podpořených linií jsou vyznačeny nody, pro které jsou uvedeny odhady v tabulce (Tab. III.). Datování bylo provedeno programem BEAST2 pro cytochrom *b*.

Výsledkem výpočtů genetické variability dat bylo nalezení 77 haplotypů vykazující 229 polymorfních míst (pro celkem 180 použitých sekvencí). Pro detail viz tabulka (Tab. IV). Sika vietnamský vykazuje, oproti jiným sika, obstojnou míru variability a sika tchajvanský naopak variabilitu nižší.

Genetické distanční matrice pro skupiny sika jsou znázorněny v tabulce (Tab. V). Pro detail je na CD uvedena tabulka všech genetických distancí pro jelenovité.

skupiny	počet vzorků	počet haplotypů	haplotypová diverzita Hd	nukleotidová diverzita (Jukes-Cantor-corrected) Pi(JC)	průměrný počet rozdílů v nukleotidech k	počet polymorfních míst
východní Čína	21	5	0,7	0,00328	3,352	13
severní Čína a Mandžusko	91	31	0,69	0,00872	8,5	141
severní japonské ostrovy	24	12	0,717	0,00218	2,409	17
Vietnam	8	8	1	0,00977	10,357	29
Tchaj-wan	12	3	0,53	0,00056	0,576	2
jižní japonské ostrovy	24	18	0,971	0,00447	4,873	27

Tab. IV: Odhady základních populačně genetických charakteristik pro dílčí vymezené skupiny na základě cytochromu *b*.

skupiny	jižní japonské ostrovy	severní japonské ostrovy	severní Čína a Mandžusko	Vietnam	Tchaj-wan	sika Dybovského2	východní Čína
jižní japonské ostrovy		3,9%	3,40%	2,40%	4,80%	3,90%	5,30%
severní japonské ostrovy	3,9%		3,30%	2,60%	3,90%	3,30%	3,40%
severní Čína a Mandžusko	3,40%	3,30%		3,10%	2%	2,20%	1,70%
Vietnam	2,40%	2,60%	3,10%		1,50%	1,80%	1,70%
Tchaj-wan	4,80%	3,90%	2%	1,50%		1,10%	1,70%
sika Dybovského	3,90%	3,30%	2,20%	1,80%	1,10%		1,10%
východní Čína	5,30%	3,40%	1,70%	1,70%	1,70%	1,10%	

Tab. V.: Genetické distance na základě analýzy cytochromu *b*.

5. Diskuse

Jak již bylo uvedeno v úvodu, sikové jsou středně velcí jeleni z východní Asie. Konkrétně se vyskytují v Číně, Rusku, Vietnamu, na Korejském poloostrově, Tchaj-wanu a japonských ostrovech. Několik populací-taxonů je však již vyhubeno (např. *C. n. mandarinus* a *C. n. grasianus*, viz Ba et al. (2013)). Tato práce je zaměřena na dva kriticky ohrožené druhy – siku vietnamského (*C. n. pseudaxis*) a siku tchajwanského (*C. n. taiouanus*), který je výrazně odlišný díky své skvrnitosti i v zimním období, protáhlému tělu a relativně slabému paroží (Groves 2006). I přes to, že některé druhy v původních oblastech ubývají, zůstávají i nadále nedílnou součástí některých východních kultur, ať už jsou vnímány jako posvátní tvorové nebo jsou součástí tzv. tradiční čínské medicíny, kde je využíváno jejich paroží v lýči (Banwell 1999; McCullough 2009). Z tohoto důvodu byli sikové nejen loveni, zejména pak na Tchaj-wanu, což byl jeden z hlavních důvodů, proč zde vyhynuli. Zde a i jinde vznikaly i speciální farmy a některé fungují i dodnes (McCullough 2009). Sikové nebyli chováni pouze jako zdroj paroží, ale díky svému atraktivnímu vzhledu byli chováni i pro okrasu např. v pekingské Letním paláci (Banwell 1999; Groves 2006; McCullough 2009). V důsledku této atraktivity je třeba uvažovat, že u tohoto druhu mohlo docházet k toku genů mezi dílčími populacemi vlivem dovozu živých zvířat do zájmových chovů, řada farmových chovů má jistě směsný původ (Groves 2006; McCullough 2009). Později byli sikové dovezeni do Evropy, z počátku jako politické dary a atraktivní zvířata, po čase i jako zdroj kvalitní zvěřiny. Z Evropy pak byli sikové zavlečeni i do zbytku světa (např. na Nový Zéland – Banwell 1999).

Sikové se však ze zajetí, zejména pak z oborových chovů, dostali v nepůvodních oblastech do volné přírody, kde se dobře adaptovali (Carne 2000). Únik siků v nepůvodních oblastech vedl k několika problémům. Dochází zde nejen ke škodám v zemědělství a lesnictví (Barančková et al. 2012), ale také k hybridizaci s místními druhy jelenů, především pak s jelenem evropským (*Cervus elaphus*). Zejména z tohoto důvodu se sikové stali středem zájmu mnoha odborníků a předmětem řady studií včetně genetických šetření (McCullough 2009).

Z metodického hlediska byly u siků analyzovány především geny mitochondriální. Z těchto genů se nejčastěji jednalo o cytochrom *b* (např. Bo et al. 2006; Cook et al. 1998) nebo D-loop (např. Cook et al. 1998; Wu et al. 2005). Analyzovány byly i geny jaderné (α -lactalbumin, amelogenin (Yamauchi et al. 2000; Matsimoto et al. 2015) nebo mikrosatelity (např. Thévenon et al. 2004; Krojerová-Prokešová et al. 2013). Z taxonomického hlediska se

tyto studie věnují především siků z japonských ostrovů (např. Nagata et al. 1998; Yamada et al. 2007), u kterých jsou dobře morfologicky odlišitelné formy ze severních a jižních oblastí (Groves 2006) a v posledních cca deseti letech se studie začínají věnovat i kontinentálním druhům siků (např. Yang et al. 2012; Shao et al. 2014). Kontinentální formy a formy z japonských ostrovů se od sebe mohou lišit způsobem vokalizace a barvou lýčí, kdy kontinentální formy mají lýčí červené a ty z japonských ostrovů mají lýčí černé (Groves 2006). V několika posledních letech se začínají objevovat studie, které se obě tyto skupiny siků analyzují už společně, což je jistě nejlepší způsob, jak odhalit jejich evoluční historii (Ba et al. 2013).

Pro tato genetická šetření u siků je hned několik důvodů. Především vyjasnění taxonomie, mapování evoluce – především u ostrovních forem siků (Japonsko a Tchaj-wan) (např. Yamada et al. 2007), dále pak snaha o odhad diverzifikace jednotlivých forem siků (např. Ba et al. 2013), odhad populačně-genetických parametrů pro dílčí poddruhy nebo populace z hlediska genetické zdatnosti (fitness) nebo také k odhalení pytláctví (Yang et al. 2012). Jedná se ale také o studie, které se zabývají původem vysazených populací (např. Barančková et al. 2012).

Řada studií se též věnovala detekci hybridních jedinců. Převážně se jedná o hybridizaci mezi siky a jinými druhy jelenovitých, zvláště pak o odhalení hybridů s jelenem evropským (*C. elaphus*), nebo jednotlivými poddruhy siků (McCullough 2009). Použití těchto metod také pomáhá odhalit směr a rozsah toku genů (Goodman et al. 1999). S jejich pomocí byla též potvrzena realizovatelnost předpokládané hybridizace u řady taxonů, které byly předtím udávány většinou na základě dokladovaného chovu v lidské péči (např. Gray 1954) nebo ve volné přírodě (Bartoš et al. 1981). Co se siků týče, jsou z těchto studií deklarována následující hybridní spojení: *C. n. hortulorum* x *C. n. nippon* a naopak; *C. n. nippon* x *C. elaphus* a naopak; *C. n. nippon* x *C. n. taiouanus* a naopak. Potomci těchto křížení jsou plodní.

V případě nejčastěji studované hybridizace jelenů evropských a evropských populací siků, které jsou pravděpodobně odvozeny od japonských siků a siky Dybovského (*C. n. hortulorum*) nebo jejich hybridů (McCullough 2009), se ukazuje, že některé populace jelenů evropských jsou sikou velmi významně znehodnocovány. To je nejvíce patrné například ve Skotsku (např. Goodman et al. 1999). Dodejme, že hybridní povaha jedinců (popř. jejich hybridů) zůstává často skryta, a to jak z behaviorálního, tak z fenotypového hlediska (Senn et al. 2010; Biedrzycka et al. 2012). Jak již bylo zmíněno v úvodu, nejlépe jsou hybridní jedinci vzhledově

rozpoznatelní v F1 generaci a posléze jejich odlišitelnost klesá. Odstranění nebo vyřazení těchto jedinců z chovu je pak tedy složité a je nutné použít vhodnou analýzu DNA.

V případě v mé práci studovaných ohrožených a ve volné přírodě vyhubených siku (tj. *C. n. pseudaxis* a *C. n. taiouanus*) lze tedy uvažovat hybridizaci s jelenem evropských (Biedrzycka et al. 2012; Senn et al.) a mezi samotnými poddruhy siku, zejména pak se sikou Dybovského (McCullough 2009).

Ke genotypizaci jedinců byly v mé práci použity dva markery mitochondriální DNA – cytochrom *b* a D-loop. Cytochrom *b* byl použit jakož-to standardní a přiměřeně variabilní marker pro určování genetických rozdílů (viz níže). D-loop byl použit jakož-to další, ještě více sensitivnější (viz např. Nagata et al. 1998) mitochondriální gen pro validizaci některých neočekávaných výsledků na základě analýzy cytochromu *b*. Analýza pomocí námi zvolených markerů je prvním pokusem o genetický screening obou těchto ohrožených taxonů na území Evropy. Cytochrom *b* se jevil jako přiměřeně variabilní gen, který v případě určování genetických distancí umožňuje srovnání s jinými savci (Baker & Bradley 2006; Bradley & Baker 2001). Empirické vlastnosti cytochromu *b* ukazují na jeho lepší parametry vůči protěžované COX I (Tobe et al. 2010). Naše snaha o využití jaderných markerů selhala pro omezené fylogenetické informace u těchto markerů u jednotlivých poddruhů. V případě genu SRY dokonce i pro druhy, kdy nevykazuje jakoukoli variabilitu napříč poddruhy v komplexu *C. elaphus* – *C. canadensis* – *C. nippon* (např. Barbosa et al. 2010; Yamazaki et al. 2011). Z hlediska dalších perspektiv se nabízí (napříč institucemi ne vždy jednoduše přenositelná) analýza mikrosatelitů nebo senzitivnějších genetických/genomických markerů (např. SNPs).

Z fylogenetického-fylogeografického hlediska studia siku je nápadná dichotomie studií. Ty se buď zabývají studiem forem siku z japonských ostrovů nebo forem kontinentálních (viz výše), byť dochází už také ke kombinování obou forem (Cook et al. 1998, Ba et al. 2013; pro review též Groves 2006; Groves & Grubb 2011). Náš pokus zahrnul všechny dostupné sekvence z databáze GenBank. Výsledky analýz jsou *de facto* dosti kompatibilní s těmito posledními komplexnějšími studii či review. Napříč metodám i genům se jeleni sika jako monofyletická skupina ukazují jako sesterská skupina jelenům wapiti (*C. canadensis*), této dvojici je sesterský jelen bělohuby (*C. albirostris*) a až této trojici je sesterský komplex jelena evropského (*C. elaphus*). Bayesovská analýza jak pro cytochrom *b*, tak pro D-loop rozdělila siky na tři větší skupiny: siky jižních japonských ostrovů, siky severních japonských ostrovů a na siky kontinentální, která se dělí na další podskupiny, což je kompatibilní s některými studie (např. Cook et al. 1998; Nagata et al. 1998; Pitra et al. 2004;

Groves 2006; Groves & Grubb 2011; Ba et al. 2013). Náš pokus o fylogenetické zhodnocení též vykazuje několik implikací. Ukazuje se že jakási „víra“ v jednoho siku může být zavádějící, i přes všeobecný konsensus, že mitochondriální geny oproti jaderným markerům mají tendenci vykazovat větší míru strukturace, ty pak mohou, ale i nemusí být potvrzeny jadernými markery – klasický rozpor „gene tree“ x „species tree“ (např. Zachos et al. 2013). Pokud by byla silná podpora těchto linií zvažována z taxonomického hlediska, nabízí se především porovnání s nejnovější revizí siku (Groves & Grubb 2011). Hierarchicky pohlíženo, naše výsledky naznačují genetickou podporu jejich druhů (nicméně tuto podporu vztahujeme k faktu, že některé linie se jeví osobitě, nikoliv v taxonomické úrovni, tj. neprovedli jsme analýzy prověřující delimitaci druhů) – *C. nippon*, *C. aplodontus*, *C. hortulorum*, *C. sichuanicus*, *C. taiouanus* a *C. pseudaxis*, nikoliv ale *C. pulchellus*. Na jejich poddruhové úrovni naše výsledky nenaznačují jimi naznačovanou osobitost *C. nippon mageshimae*, *C. n. yakushimae*, *C. n. keramae* nebo *C. aplodontus aplodontus* a *C. a. yesoensis*. V kontextu k této revizi z roku 2011 můžeme říct, že *C. n. kopschi* není na základě našich výsledků synonymním s *C. n. pseudaxis*, jak bylo v této monografii původně navrhováno. I přes to že některé malé formy (např. *C. n. keramae*) nejsou geneticky podpořené, mohou být morfologicky velmi osobitě (Groves 2006, Groves & Grubb 2011). V těchto případech mohly rozdíly vzniknout velmi rychle, což lze soudit i z jiných doložených případů u jelenovitých (např. Lister et al 1989).

Pro srovnávání druhových nebo poddruhových úrovní jsou běžně využívané genetické distance. U těchto distancí je snaha stanovit jakési univerzální hodnoty pro určení druhů (např. Zachose & Lovary 2010). I přes kritický pohled některých autorů (např. Groves et al. 2007) se jedná o vcelku užitečný ukazatel osobitosti linií/taxonů. Nými získané hodnoty distancí mezi liniemi a konvenčně uznávanými poddruhy siku (1,1-5,3%) převážně spadají do kategorie tzv. kategorie mezidruhových/vnitrodruhových distancí se stanoveným rozmezím 2-11% (Baker & Bradley 2006; Bradley & Baker 2001). Popravdě tato klasifikace se ukázala ne moc říkající, proto lze poznamenat, že do našeho rozmezí hodnot a distancí by zapadly distance mezi těmito konvenčně uznávanými druhy jelenovitých: *Cervus nippon* x *C. albirostris* nebo k *C. elaphus* nebo k *C. timorensis* nebo k *C. canadensis* nebo k *Rusa marianna*, *Cervus albirostris* x *C. canadensis*, *Cervus schomburgkii* x *C. duvaucelii*, *Rusa marianna* x *R. alfredi*, *Muntiacus feae* x *M. crinifrons*, *Muntiacus putaonensis* x *M. truongsonensis*, *Muntiacus rooseveltorum* x *M. muntjak* nebo k *M. truongsonensis*, *Mazama*

chunyi x *M. gouazoupira*, *Mazama bororo* x *M. americana* nebo k *M. nana*, *Mazama nana* x *M. americana*, *Mazama rufina* x *M. bricenii*, *Pudu mefistophiles* x *Mazama bricenii*..

Míru osobitosti linií/taxonů též udává i jejich stáří. Naše odhady naznačují stáří siků na 3,07 mil. let (1,75-4,16). Tyto odhady jsou vyšší, než dokládají některé dosavadní studie. Ba et al. (2013) například udává stáří siků mezi 1,75-2,08 miliony let. Konkrétně třeba Kawamura (2009) uvažuje stáří siků od středního pleistocénu, ovšem jím, se siky synonymizovaní fosilní jelena (např. *Pseudaxis/Cervus grayi*) mají fosilní záznam mnohem starší (blíže viz kapitola Materiál a metody). Lze tedy, snad i oprávněně spekulovat o původu např. tchajvanských siků, kteří se jeví staršími než původně zvažovaných 40 tisíc let (McCullough 2009). Námi získaná hodnota pro stáří siků vietnamských 0,74 mil. let (0-1,44) a u siků tchajvanských 1,08 mil. let (0,33-1,58). Jakkoliv, vztahy kontinentálních x japonských siků jsou kolísavé, a tedy ne zcela jistě zrekonstruovatelné z hlediska vzájemného původu (viz např. Ba et al. 2013, naše výsledky), oba zde studované sikovité (vietnamský a tchajvanský) jsou součástí těchto kontinentálních.

Z hlediska zde studovaných zoo-jedinců platí, že většina maternálních linií siky vietnamského (*C. n. pseudaxis*) se sdružuje do jedné linie s GenBank-ovou sekvencí/GenBankovými sekvencemi. To, z ochrannářského hlediska působí velmi povzbudivě. Zvláštní pozornost (tj. opakované prověření) si však zaslouží jedinec chovaný ve varšavské Zoo (CNP 9), který se k této linii, v analýze pro cytochrom *b* oproti analýze D-loop, neřadí.

V případě siků, kteří byli pro analýzu získáni coby sikovité tchajwanští (*C. n. taiouanus*), výsledky tolik pozitivní nejsou. Část těchto vzorků prokazatelně vykazuje afinitu k jelenu evropskému (*C. elaphus*) a ostatní vzorky k jedincům ze severní Číny a Mandžuska (*C. n. hortulorum*) nebo siků z jižních japonských ostrovů. Díky tomuto zjištění se tedy evropský chov siků tchajvanský nejeví tak ochrannářsky významný. Je ale nutné provést další šetření a též zvážit aspekt mitochondriální rekombinace, kdy by se mohla část mitochondriální DNA přenášet jak po maternální linii, tak i po parentální (Leducq et al. 2017), nicméně v případě nekvalitních sekvencí jsme vždy přistupovali k opakovaným izolacím, PCR a re-sequenci.

Naše analýza dále naznačila, že některé sekvence, které pocházejí z databáze GenBank, patří k chybně určeným druhům, jak již bylo zmíněno ve výsledcích. Tato skutečnost je známá, a proto je důležitá jistá pečlivost a kritičnost při práci.

Výsledky analýzy genetické diverzity siků (Tab. IV.) ukazují na poměrně vysoký počet haplotypů. Pokud bychom popisovali genetickou rozmanitost na příkladu počtu haplotypu, pak nejvyšší počet má sika Dybovského, což by mohlo poukazovat na nezdecimovaný stav tamějších populací (přitom zde došlo k velkému poklesu stavů siků ve 40. letech 20. století – McCullough 2009), naopak čínské populace se jeví být geneticky zredukované, ale je třeba samozřejmě zohlednit i počet studovaných jedinců. Slušný počet haplotypů má severní i jižní japonská linie (jižní více, což může značit tamější větší stabilitu-přívětivost klimatických a vegetačních poměrů v průběhu pleistocénu – např. Ohdachi et al. 2015) Naopak počet haplotypů je nízký, a to jak z hlediska očekávatelného odštěpení od kontinentálních populací, tak z hlediska úbytku způsobeného člověkem (McCullough 2009), u siky tchajvanského. U siky vietnamského ale záchovný tedy program disponuje zajímavou variabilitou, díky které se tento taxon do budoucna snad udrží. Thévenon et al. (2004) uvádí na základě mikrosatelitů, že porovnávaná diverzita siků vietnamských chovaných v zoologických zahradách a siků vietnamských chovaných na farmách ve Vietnamu je srovnatelná (i přes větší počet jedinců získaných z farem), a mohli by představovat dostatečně variabilní zdroj pro možnou reitrodukcí a udržení tohoto taxonu. Barančeková et al. (2012) uvádí, že diverzita siků chovaných v České republice je vyšší než u volně žijící populace v Rusku. To je však přisuzováno poklesu stavu siků ve 40. letech 20. století (McCullough 2009). Krojerová-Prokešová et al. (2013) porovnávali populace siků (označovaných jako *C. n. hortulorum*) chovaných v České republice a populací *C. n. hortulorum* v Přímořském kraji, genetická variabilita obou populací byla nízká a populace českých siků nesla stoby křížení s druhy z japonských ostrovů a jihovýchodní Číny.

6. Závěr

Ze zde představených výsledků vyplývá, že sikové zahrnují několik osobitých linií, jejichž stáří není zanedbatelné, mezi tyto nejosobitější linie patří i sika vietnamský a sika tchajvanský.

Z mé prvotní analýzy mitochondriální DNA vyplývá, že evropské chovy disponují z hlediska variability a čistokrevnosti hodnotným chovem siky vietnamského, ale sika tchajvanský dochovaný v Evropě je patrně ovlivněn mitochondriální introgrésí jiných poddruhů siku, a dokonce i jelena evropského.

Pro definitivní závěry bude však nutné další a detailnější zhodnocení za použití jiných genetických markerů (např. mikrosatelitů). A to jak z fylogenetického hlediska, tak pro věrohodnou detekci hybridních jedinců a rozsahu introgrese.

7. Reference

- Ba, H., Yang F., Xing, X., & Li, C. (2015). Classification and phylogeny of sika deer (*Cervus nippon*) subspecies based on the mitochondrial control region DNA sequence using an extended sample set. *Mitochondrial DNA* 26(6), 373–379.
- Baker, R. J., & Bradley, R. D. (2006). Speciation in mammals and the Genetic Species Concept. *J. Mammal.* 87(4), 643–662
- Banwell, D. B. (1999). The sika in New Zealand. *Sika deer. Biology and management of native and introduced populations.* Springer, Berlin and Heidelberg and New York.
- Barančková, M., Krojerová-Prokešová, J., Voloshina, I. V., Myslenkov, A. I., Kawata, Y., Oshida, T., Lamka, J., & Koubek, P. (2012). The origin and genetic variability of the Czech sika deer population. *Ecological Research*, 27(6), 991–1003.
- Barbosa, A. M., & Carranza, J. (2010). Lack of geographic variation in Y-chromosomal introns of red deer (*Cervus elaphus*). *Journal of Negative Results*, 7(1), 1–4.
- Bartoš, L. (2009). Sika deer in continental Europe. In McCullough D. R., Takatsuki S., Kaji K. (eds.) *Sika Deer: Biology and Management of Native and Introduced Populations* (pp.573–594). Springer, Berlin.
- Bartoš, L., Hyánek, J., & Žirovnický J.(1981). Hybridization between Red and Sika deer. I. Craniological analysis. *Zool. Anz.*, 207(5/6), 260–270.
- Bartoš, L., Hyánek, J., & Žirovnický J.(1981). Hybridization between Red and Sika deer II. Phynotype analysis. *Zool. Anz.*, 207(5/6), 271–287.

Biedrzycka, A., Solarz, W., & Okarma, H. (2016). Hybridization between native and introduced species of deer in Eastern Europe. *J. Mammal.* 93(5), 1331–1341.

Bo, L., Bai, S., Xu, Y., Zhang, W., & Ma, J. (2006). Identification of sika deer and red deer using partial cytochrome b and 12s ribosomal RNA genes. *Journal of Forestry Research*, 17(2), 160–162.

Bradley, R. D., & Baker, R. J. (2001). A test of the Genetic Species Concept: cytochrome-*b* sequences and mammals. *J. Mammal.*, 82(4), 960–973.

Carne, P. (2000). *Deer of Britain and Ireland*. Swan Hill Press, Shrewsbury.

Cook, C. E., Wang, Y., & Sensabaugh, G. (1999). A Mitochondrial control region and cytochrome *b* phylogeny of Sika deer (*Cervus nippon*) and report of tandem repeats in the control region. *Mol. Phyl. Evol.*, 12(1), 47–56.

Douzery, E., & Randi, E. (1997). The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. *Molecular Biology and Evolution*, 14(11), 1154–1166.

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969–1973.

Geist, V. (1998). *Deer of the World: Their Evolution, Behaviour, and Ecology*. Stackpole books.

Goodman, S. J., Barton, N. H., Swanson, G., Abernethy, K., & Pemberton, J. M. (1999). Introgression through rare hybridization: A genetic study of a hybrid zone between red and sika deer (genus *Cervus*) in Argyll, Scotland. *Genetics*, 152(1), 355–371.

Gray, A. P. 1954. Mammalian hybrids; a check-list with bibliography. Commonwealth Agricultural Bureaux, Farnham Royal, Bucks, United Kingdom

Groves, C. (2006). The genus *Cervus* in eastern Eurasia. *European Journal of Wildlife Research*, 52(1), 14–22.

Groves, C., & Grubb, P. (2011). *Ungulate Taxonomy*. The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Groves, C. P., Cotterill, F. P. D., Gippoliti, S., Robovský, J., Roos, C., Taylor, P. J., & Zinner, D. (2017). Species definitions and conservation: a review and case studies from African mammals. *Conservation Genetics*, 18(6), 1247–1256.

Groves, C. P., & Grubb, P. (1987). Relationships of Living Deer. In Wemmer, C. M. (ed.) *Biology and Management of the Cervidae* (pp. 23-59). Smithsonian Institution Press, Washington.

Grubb, P. (2005). Order Artiodactyla. In Wilson, D. E. & Reeder, D.M. (eds.) *Mammal Species of the World, Third Edition* (pp. 637–722). The Johns Hopkins University Press, Baltimore.

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. <https://doi.org/citeulike-article-id:691774>

Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammer, C., Jansen Van Vuuren, B., Matthee, C., & Couloux, A. (2012). Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus-Biologies*, 335(1), 32–50.

Heckeberg, N. S., Erpenbeck, D., Wörheide, G., & Rössner, G. E. (2016). Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. *PeerJ*, 4, e2307.

Huelsenbeck, J. P., & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754–755.

Irwin, D. M., Kocher, T. D., & Wilson, A. C. (1991). Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32(2), 128–144.

Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, 30(4), 772–780.

Kawamura, Y. (2009). Fossil record of sika deer in Japan. In McCullough D. R., Takatsuki S., Kaji K. (eds.) *Sika Deer: Biology and Management of Native and Introduced Populations* (pp. 11 - 25). Springer, Berlin.

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Edwards, S. V., Paabo, S., Villablanca, F. X., & Wilson, A. C. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(16), 6196–6200.

Krojerova-Prokesova, J., Barančková, M., Voloshina, I., Myslenkov, A., Lamka, J., & Koubek, P. (2013). Dybowski's sika deer (*Cervus nippon hortulorum*): Genetic divergence between natural Primorian and introduced Czech populations. *Journal of Heredity*, 104(3), 312–326.

Leducq, J. B., Henault, M., Charron, G., Nielly-Thibault, L., Terrat, Y., Fiumera, H. L., ... & Landry, C. R. (2017). Mitochondrial recombination and introgression during speciation by hybridization. *Molecular Biology and Evolution*, 34(8), 1947–1959.

Lister, A. M. (1989). Rapid dwarfing of red deer on Jersey in the last interglacial. *Nature*, 342(6249), 539.

Ludt, C. J., Schroeder, W., Rottmann, O., & Kuehn, R. (2004). Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31(3), 1064–1083.

Matsumoto, Y., Yamashiro, T., & Yamashiro, A. (2015). Evidence of pre-introduction hybridization of Formosan sika deer (*Cervus nippon taiouanus*) on Okinoshima, Wakayama Prefecture, Japan, based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Conservation Genetics*, 16(2), 497–502.

Mayr, E. (1963). *Animal Species and Evolution*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

McCulloch, D. R., Takatsuki, S., & Kaji, K. (2009). *Sika Deer. Biology and Management of Native and Introduced Populations*. Springer, Berlin.

Nagata, J., Masuda, R., Kaji, K., Kaneko, M., & Yoshida, M. C. (1998). Genetic variation and population structure of the Japanese sika deer (*Cervus nippon*) in Hokkaido Island, based on mitochondrial D-loop sequences. *Molecular Ecology*, 7(7), 871–877.

NOW - New and Old Worlds - Database of fossil mammals [online]. Helsinki: The NOW Database, 2008 [cit. 2017-12-12]. Dostupné z: <http://pantodon.science.helsinki.fi/now/index.php>

Ohdachi, S. D., Ishibashi, Y., Iwasa, M. A., & Saitoh T. (2009). The wild mammals of Japan. Shoukadoh Book Sellers, Kyoto.

Piálek L. (2009). BigBang 3 software.

Pitra, C., Fickel, J., Meijaard, E., & Groves, C. P. (2004). Evolution and phylogeny of old world deer. *Mol. Phylog. Evol.*, 33(3), 880–895.

Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256.

Randi E., Mucci, N., Claro-Hergueta, F., Bonnet, A., & Douzery, E. J. P. (2001). A mitochondrial DNA control region phylogeny of the Cervinae: speciation in *Cervus* and implications for conservation. *Animal Conservation*, 4(1), 1–11.

Rambaut, A. (2009). FigTree v1.3.1: Tree Figure Drawing Tool. Available from. <http://treebioedacuk/software/figtree/>.

Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2012). Tracer v1. 4. 2007.

Rozas, J., Librado, P., Sánchez-De, I., Barrio, J. C., Messeguer, X., & Rozas, R. (2008). DnaSP. Universitat de Barcelona, Spain.

Senn, H. V., Swanson, G. M., Goodman, S. J., Barton, N. H., & Pemberton, J. M. (2010). Phenotypic correlates of hybridisation between red and sika deer (genus *Cervus*). *Journal of Animal Ecology*, 79(2), 414–425.

Shao, Y., Zha, D., Xing, X., Su, W., Liu, H., & Zhang, R. (2016). Complete mitochondrial genome sequence of northeastern sika deer (*Cervus nippon hortulorum*). *Mitochondrial DNA*, 27(1), 469–470.

Smith, S. L., Carden, R. F., Coad, B., Birkitt, T., & Pemberton, J. M. (2014). A survey of the hybridisation status of *Cervus* deer species on the island of Ireland. *Conservation genetics*, 15(4), 823–835.

Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731–2739.

Tobe, S.S., Kitchener, A. C., & Linacre, A. M. T. (2010). Reconstructing mammalian phylogenies: a detailed comparison of the cytochrome *b* and cytochrome oxidase subunit I mitochondrial genes. *PLoS ONE*, 5, e14156.

Thévenon, S., Thuy, L. T., Ly, L. V, Maudet, F., Bonnet, A., Jarne, P., & Maillard, J.-C. (2004). Microsatellite analysis of genetic diversity of the Vietnamese Sika Deer (*Cervus nippon pseudaxis*). *Journal of Heredity*, 95(1), 11–18.

Whitehead, G. K. (1993). *The Encyclopaedia of deer*. Swan Hill Press, Shrewsbury.

Wu, H., Wan, Q. H., Fang, S. G., & Zhang, S. Y. (2005). Application of mitochondrial DNA sequence analysis in the forensic identification of Chinese sika deer subspecies. *Forensic Science International*, 148(2–3), 101–105.

Yamada, M., Hosoi, E., Nagata, J., Tamate, H. B., & Tado, H. (2007). Phylogenetic relationship of the southern Japan lineages of the sika deer (*Cervus nippon*) in Shikoku and Kyushu Islands, Japan. *Mammal Study*, 32(3), 121–127.

Yamauchi, K., Hamasaki, S. I., Miyazaki K., Kikusui, T., Takeuchi, Y., & Mori, Y. (2000). Sex determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in sika deer (*Cervus nippon*). *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(6), 669–671.

Yamazaki, S., Motoi, Y., Nagai, K., Ishinazaka, T., Asano, M., & Suzuki, M. (2011). Sex determination of Sika deer (*Cervus nippon yessoensis*) using nested PCR from feces collected in the field. *Journal of Veterinary Medical Science*, 73(12), 1611–1616.

Yang, C., Li, P., Zhang, X., & Guo, Y. (2012). The complete mitochondrial genome of the Chinese Sika deer (*Cervus nippon* Temminck, 1838), and phylogenetic analysis among Cervidae, Moschidae and Bovidae. *Journal of Natural History*, 46(27–28), 37–41.

Nei, M (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.

Zachos, F. E., & Lovari, S. (2013). Taxonomic inflation and the poverty of the Phylogenetic Species Concept - A reply to Gippoliti and Groves. *Hystrix*, 24(1), 1–3.

Zajícová, V. (2016). Hybridizace krokodýlů z evolučního a ochranného hlediska. Bakalářská práce PřF JU, České Budějovice.

8. Přílohy

Příloha 1.: Aktuální počty siků tchajvanských.

<i>Cervus nippon taiouanus</i> / Taiwanese sika deer	Male	Female	Other	Birth (last 12 month)	Group M.	Group F.	Group O.	Total	
Region/Institute									
Region: Asie - 1 institute									
TAIPEI / Taipei Zoo	4	3	1	2	0	0	0	8	
Region: Evropa 3 institute									
BANHAM / ZSEA Banham Zoo Ltd.	0	0	0	13	13	21	0	34	
BEWDLEY / West Midland Safari & Leisure Park Ltd	3	26	0	3	0	0	0	29	
OBTERRE / Parc de la Haute Touche (MNHN)	6	5	0	2	0	0	0	11	
Region: Severní Amerika 1 institute									
NY BRONX / Bronx Zoo/Wildlife Conservation Society	0	3	0	0	0	0	0	3	
Celkem									85

Příloha 2.: Aktuální počty siků vietnamských.

<i>Cervus nippon pseudaxis</i> / Indochinese sika deer	Male	Female	Other	Birth (last 12 months)	Group M.	Group F.	Group O.	Total
Region/Institute								
All 32 Institutions, 3 Regions								
Region: Asie 1 instituce								
SAIGON / Saigon Zoo & Botanical Gardens	2	3	9	2	0	0	0	14
Region: Evropa 28 institucí								
AGRATE / Parco Faunistico La Torbiera	1	3	0	0	0	0	0	4
BERLIN TP / Tierpark Berlin-Friedrichsfelde GmbH	5	5	0	3	0	0	0	10
BRATISLAV / Zoologicka Zahrada Bratislava	2	2	2	0	0	0	0	6
ERFURT / Thuringer Zoopark Erfurt	1	5	0	1	0	0	0	6
GORLITZ / Naturschutz-Tierpark Goerlitz	2	3	0	0	0	0	0	5
GUERNO / Parc Zoologique de Chateau de Branféré	1	0	0	0	1	0	0	2

HAMBURG / Tierpark Hagenbeck GmbH	10	6	0	5	0	0	0	16
HILVARENB / Safaripark Beekse Bergen	2	14	0	4	0	0	0	16
KARLSRUHE / Zoologischer Stadtgarten Karlsruhe	2	6	1	3	0	0	0	9
KATOWICE / Silesian Zoological Garden	4	9	0	6	0	0	0	13
KRONBERG / Opel-Zoo von Opel Hessische Zoostiftung	8	6	0	5	0	0	0	14
LISIEUX Z / CERZA Centre d'Etude et de Recherche Zoologique Augeron	3	12	23	5	0	0	0	38
NEUNKIRCH / Neunkircher Zoologischer Garten GmbH	1	3	0	0	0	0	7	11
NYIREGYHA / Nyíregyházi Állatpark Nonprofit KFT (Sosto Zoo)	1	3	0	0	0	0	0	4
OBTERRE / Parc de la Haute Touche (MNHN)	9	8	2	6	0	0	0	19
OLOMOUC / Zoologická zahrada Olomouc	1	9	0	3	0	0	0	10
OSTRAVA / Zoologická zahrada Ostrava	1	7	0	4	0	0	0	8
OVERLOON / Zoo Parc Overloon	1	5	0	0	0	0	0	6

PEAKWILD / The Peak Wildlife Project	1	7	3	3	0	0	0	11
PEAUGRES / Safari de Peaugres	3	30	0	0	0	0	0	33
POZNAN / Ogród Zoologiczny w Poznaniu	3	7	0	0	0	0	0	10
SOFIAZOO / Sofia Zoological Gardens	1	3	6	3	0	0	0	10
TREGOMZOO / Parc Zoologique de Tregomeur	1	4	0	0	0	0	0	5
USTI / Usti nad Labem Zoo	2	10	0	9	0	0	0	12
VIENNA / Schönbrunner Tiergarten GmbH	1	3	0	0	0	0	0	4
WARSAW / Miejski Ogród Zoologiczny Warsaw	5	5	0	3	0	0	0	10
WOBURNLTD / Woburn Safari Park	4	6	1	3	0	0	0	11
ZAMOSCZSM / Ogród Zoologiczny im. Stefana Milera	2	1	0	1	0	0	0	3
Region: Severní Amerika 3 instituce								
AKRON / Akron Zoological Park	1	0	0	0	0	0	0	1
SD-WAP / San Diego Zoo Safari Park	5	7	0	5	0	0	0	12

WILDS / The Wilds	4	6	0	0	0	0	0	10
Celkem								343

Příloha 3.: Seznam získaných vzorků a zdrojových institucí.

Druh	Označení vzorku	Zdrojová organizace	Originální značení vzorku	Pohlaví	Typ vzorku
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	CNP1	Zoo Ostrava	nelze zveřejnit	F	chlupy
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	CNP2	Zoo Ostrava	nelze zveřejnit		chlupy
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	CNP3	Zoo Ostrava	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	CNP4	Zoo Ostrava	nelze zveřejnit	F	chlupy
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	CNP5	Tierpark Berlin	nelze zveřejnit	M	krev EDTA
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	CNP6	Tierpark Berlin	nelze zveřejnit	F	krev EDTA
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	CNP7	Tierpark Berlin	nelze zveřejnit	F	krev EDTA
<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	CNP9	Warsaw	nelze zveřejnit	M	krev

<i>Cervus nippon pseudaxis</i>	CNP10	Zoo Ústí nad Labem	nelze zveřejnit	M	krev
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT1	Banham ZOO	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT2	Banham ZOO	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT3	Banham ZOO	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT4	Banham ZOO	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT5	Banham ZOO	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT6	Banham ZOO	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT7	Banham ZOO	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT8	Banham ZOO	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT9	Banham ZOO	nelze zveřejnit	F	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT10	Banham ZOO	nelze zveřejnit	F	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT11	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	-	krev EDTA

<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT12	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	M	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT13	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	-	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT14	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	ulk M	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT15	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	M	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT16	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	M	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT17	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	F	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT18	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	-	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT19	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	M	krev EDTA

<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT20	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	-	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT21	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	-	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT22	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	F	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT23	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	-	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT24	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	-	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT25	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	M	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT26	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	M	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT27	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	M	krev EDTA

<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT28	West Midland Safari & Leisure Park	nelze zveřejnit	-	krev EDTA
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT29	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT30	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT31	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT32	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT33	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT34	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT35	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT36	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT37	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT38	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT39	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň

<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT40	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT41	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT42	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT43	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT44	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT45	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT47	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT48	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT49	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT50	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT51	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT52	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT53	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň

<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT54	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT55	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT56	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT57	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT58	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT59	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT60	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT61	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT62	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT63	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT64	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT65	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT66	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň

<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT67	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT68	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT69	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT70	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT71	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT72	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT74	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT75	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT76	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT77	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT78	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT79	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT80	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy

<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT81	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT82	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT83	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT84	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT85	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT86	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT87	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT88	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT89	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT90	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT91	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT92	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT93	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	tkáň

<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT94	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	tkáň
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT95	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT96	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT97	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT98	Cornbury Park	nelze zveřejnit	F	chlupy
<i>Cervus nippon taioanus</i>	CNT99	Cornbury Park	nelze zveřejnit	M	chlupy

Přílohy na CD:

- Kompletní bayesovský fylogenetický strom pro cytochrom *b*.
- Kompletní bayesovský fylogenetický strom pro D-loop.
- Bayesovský fylogenetický strom – skupiny siků pro D-loop.
- Celkový datovaný strom jelenovitých s průměrnými hodnotami diverzifikačních časů pro cytochrom *b*.
- Bayesovský strom se zoo-vzorky pro cytochrom *b*.
- Bayesovský strom se zoo-vzorky pro D-loop.
- Kompletní tabulka genetických distancí pro cytochrom *b*.