

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Genetický monitoring vybraných populací sysla
obecného v České republice**

Bakalářská práce

Vojtěch Kovařík

Školitelka: RNDr. Štěpánka Říčanová, Ph.D.

České Budějovice 2021

Kovařík, V., 2021: Genetický monitoring vybraných populací sysla obecného v České republice. [Genetic monitoring of selected European ground squirrel populations in the Czech Republic, Bc. Thesis, in Czech.] - 43 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace

This study deals with the description of genetic variability of current populations of the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*) using 12 microsatellite loci, the analysis of which showed relatively high intrapopulation variability with high proportion of heterozygous individuals, but also negative isolation and very high differentiation between populations which prevents long-term stable existence of these populations, and which requires further design of conservation measures that are also mentioned in this study.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 7. 4. 2021

Vojtěch Kovařík

Poděkování

Rád bych touto cestou poděloval své školitelce RNDr. Štěpánce Říčanové, Ph.D. za odborný dohled, za pomoc, ochotu a rady při psaní této práce a také garantovi této bakalářské práce doc. Mgr. Oldřichu Říčanovi, Ph.D. Dále bych chtěl poděkovat své rodině, přítelkyni a také všem přátelům za podporu, které se mi po celou dobu dostávalo.

Obsah

1. Úvod.....	1
1.1. Rozšíření studovaného druhu.....	1
1.2. Biologie a ekologie	3
1.3. Ochranný status druhu a důvod ohrožení	4
2. Cíle práce	8
3. Materiál a metody	9
3.1. Vzorkování.....	9
3.2. Mikrosatelity jako genetické markery.....	11
3.3. Izolace DNA.....	13
3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	13
3.5. Fragmentační analýza.....	15
3.6. Analýza molekulárních dat	15
3.6.1. Vnitropopulační genetická variabilita	16
3.6.2. Mezipopulační genetická variabilita.....	17
4. Výsledky	19
4.1. Vnitropopulační genetická variabilita	19
4.1.1. Charakteristiky genetické diverzity populací	19
4.1.2. Detekce nulových alel	22
4.2. Mezipopulační genetická variabilita	22
4.2.1. Fixační index F_{ST}	22
4.2.2. Hierarchická Bayesiánská klastrová analýza.....	24
5. Diskuse.....	28
5.1. Genetická variabilita sysla obecného	30
5.2. Genetická diference mezi populacemi sysla obecného	32
5.3. Navrhovaná opatření na ochranu studovaného druhu.....	33
6. Závěr	36
7. Seznam použité literatury	38
8. Seznam příloh	42
9. Přílohy.....	43

1. Úvod

1.1. Rozšíření studovaného druhu

Sysli rodu *Spermophilus* jsou hlodavci patřící do čeledi veverkovitých (*Sciuridae*). Tato skupina zahrnuje jak stromové, tak pozemní hlodavce a je pak dále je rozdělována na 3 hlavní podčeledi. 1) Podčeleď *Sciurinae*, do které patří druhy typických stromových veverek jako například veverka obecná (*Sciurus vulgaris*), ale i druhy létavých veverek, jako poletuška severní (*Glaucomys sabrinus*), či poletuška slovanská (*Pteromys volans*). 2) Dále pak podčeleď *Callosciurinae*, zahrnující především stromové veverky žijící v jihovýchodní Asii. 3) Poslední podčeleď se nazývá *Xerinae* a patří do ní jak sysel obecný (*Spermophilus citellus*) tak i rody jemu nejbližší příbuzné, a to například rod afrických pozemních veverek (*Xerus*), rody burunduků a čipmanků (*Eutamias*, *Tamias*), svišti (*Marmota*), psouni (*Cynomys*) a další (Kryštufek & Vohralík, 2012). Podle současných znalostí do rodu *Spermophilus* spadá skupina patnácti druhů (Helgen et al., 2009), jejichž geografické rozšíření je vymezeno na Palearktickou oblast, tedy na území Eurasie, kde zabírá pás stepí (včetně lesostepí a polopouští), který se táhne od střední Evropy až k břehům Žlutého moře v Číně (Kryštufek & Vohralík, 2012). Druhy syslů jsou zpravidla alopatrické, ale u některých druhů dochází k překrývání jejich areálů rozšíření a je zaznamenána částečná hybridizace mezi těmito druhy způsobená částečně sympatrickým výskytem. Na území severního Kazachstánu a Ruska takto žijí druhy *S. major*, *S. fulvus* a *S. erythrogenys*, kde je sympatrická zóna široká 200-240 km. Sympatrický výskyt byl zaznamenán také u druhů *S. suslicus* a *S. citellus* na území Ukrajiny, kde je sympatrická zóna značně užší (Kryštufek & Vohralík, 2012).

Sysel obecný (*Spermophilus citellus*) je druh s nejzápadnějším výskytem v porovnání s ostatními druhy rodu *Spermophilus* a svým geografickým rozšířením je v současnosti vázán na území České republiky, Slovenska, Maďarska, Rumunska, na část západní Ukrajiny, severní část Srbska, ale i na území Turecka a Moldavska (Helgen et al., 2009). V období čtvrtohor, konkrétněji v jejich starším období zvaném pleistocén, bylo rozšíření sysla obecného v průběhu let dáno zeměpisnou šířkou a změnami teplot mezi glaciály a interglaciály. Pro druhy vyžadující kontinentální klima, do kterých sysel

obecný zcela jistě spadá, byl důležitým faktorem určující rozšíření druhu navíc i gradient oceánického a kontinentálního klimatu, který byl velmi variabilní během pleistocenních glaciálních cyklů. Fosilní záznam vypovídá o tom, že sysel obecný byl více rozšířen během pleistocenních glaciálů než v interglaciálech a další studie fylogeografie rozdělila tento druh na dvě hlavní geografické skupiny, které se od sebe v průběhu let odlišovaly (Říčanová et al., 2013). Za první geografickou skupinu lze považovat tu s největší genetickou diverzitou s centrem v současném Bulharsku a za druhou pak skupinu s nejsevernějším centrem výskytu, a to v jižní části Panonské pánve ve střední Evropě mezi Alpami a Karpaty. Zvířata z této druhé skupiny pak nejspíše v průběhu glaciálních period opakovaně rozšiřovala svůj areál výskytu a kolonizovala severnější a západnější oblasti, zatímco během interglaciálů se pak stahovala zpět směrem k výše zmiňovanému centru výskytu (Říčanová et al., 2013). Expanze sysla obecného na území České republiky v holocénu souvisely i s postupným odlesňováním a vytváření habitatů vhodných pro sysly. Výskyt těchto habitatů na území České republiky umožnil růst populací, který skončil přibližně v roce 1960, kdy začalo docházet k poklesu početnosti populací až zániku některých syslích lokalit zapříčiněného především změnami využívání půdy, fragmentací a celkově častějšími a většími zásahy člověka do krajiny (Anděra & Hanzal, 1995). V roce 2007 se sysel obecný vyskytoval na území České republiky na 34 lokalitách. Za nejzápadnější rozšíření v České republice lze považovat populace obývajících lokality v Karlových Varech a mezi nejvýchodnější areály rozšíření patří lokality ve východní části Jihomoravského kraje, například Vyškov a Kyjov (Matějů et al., 2008).



Obr. 1: Mapa současného rozšíření sysla obecného (*Spermophilus citellus*). Písmeny ABC je vyznačené rozšíření poddruhů (*S. citellus citellus*, *S. citellus gradojevici*, *S. citellus karamani*) (Kryštufek & Vohralík, 2012).

1.2. Biologie a ekologie

Sysel obecný (*Spermophilus citellus*) je středně velký sysel rodu *Spermophilus*, který, stejně jako většina zvířat patřících do druhů tohoto rodu nese ancestrální znak kryptického zbarvení, což v některých případech způsobuje malou míru odlišnosti. Jejich lebka dosahuje menších rozměrů než lebka zástupců rodu psounů (*Cynomys*) a rodu svišťů (*Marmota*) a mají i značně delší a méně uhlazenou srst než ostatní zástupci pozemních veverek (Helgen et al., 2009). Oválné tělo sysla obecného dosahuje celkové délky zhruba 200 mm a hmotnosti 200-400 g (Novak, 1999). Mají středně dlouhý, válcovitý, hodně osrstěný ocas a relativně krátké končetiny. Jejich chodidla jsou pokryta krátkými stříbřitými chlupy a vyrůstají z nich poměrně málo zahnuté dráčky. Srst sysla je nahnědle nebo nažloutle šedá s častými světlými skvrnami o průměru asi 1-2 mm na dorzální části těla a nápadný je i kroužek bílé srsti okolo oka. Uši jsou redukováné a hustě pokryté krátkými chlupy, které se však neseskupují v žádné chomáče. Hlava má z profilu konvexní tvar s relativně velkýma očima, čelist je dána zubním vzorcem typickým pro rod *Spermophilus* (1/1, 0/0, 2/1, 3/3= 22) a

obsahuje hypsodontní stoličky trojúhelníkovitého tvaru. (Kryštufek & Vohralík, 2012). Samice mají 5 párů prsních bradavek a u samců je přítomna pyjová kost, která se geograficky liší a může sloužit jako rozpoznávací znak pro poddruhy *S. Citellus* (*S. citellus citellus*, *S. citellus gradojevici*, *S. citellus karamani*) (Kryštufek & Vohralík, 2012).

Druhy patřící do rodu *Spermophilus*, tedy i sysel obecný, se primárně vyskytují na otevřených pláních, stepích a tundrách v Palearktické oblasti. V zalesněných oblastech jsou omezeny na okrajové lemy, které slouží jako jejich útočiště (Helgen et al., 2009). Na území České republiky se v současnosti sysli vyskytují na plochách s krátkým travním porostem, jako jsou například kosené louky, pastviny a meze (Grulich, 1960) a na půdách vhodných pro hrabání dočasných, nebo trvalých nor (Matějů et al., 2008). Jejich potravu tvoří z největší části rostlinná složka jako například semena, oříšky, kořeny, cibulky, zrna, zelená vegetace, ale také potrava živočišná v podobě hmyzu, malých obratlovců a někdy i jejich vajíček. Sysel obecný je striktně denní živočich s největší aktivitou především ráno, jakmile slunce dostatečně ohřeje povrch. V čase největšího horka pak zalézá do nor, ve kterých ochlazuje svoji tělní teplotu (Helgen et al., 2009). Od mnohých hlodavců se odlišují zejména sociálním způsobem života v různě početných koloniích, ve kterých jsou schopni se dorozumívat pomocí variací zvukových signálů. Zimní spánek u sysla obecného trvá 5 až 5,5 měsíce při životě v nížinách, 7 až 7,5 měsíce žije-li populace v horách, a během hibernace je sysel závislý na relativně velkém množství podkožního tuku, díky němuž si v noře nemusí hromadit zimní zásoby potravy (Kryštufek & Vohralík, 2012).

Sysel obecný je důležitou součástí potravního řetězce a jeho přítomnost v ekosystému ovlivňuje další organismy, zejména zvířata na syslovi predující, kterými jsou například tchoř stepní, lasice kolčava, kuna skalní, liška obecná a nebo druhy dravců jako sokol stěhovavý, káně lesní, orel královský a orel stepní (Grulich, 1960).

1.3. Ochranařský status druhu a důvod ohrožení

Sysel obecný je v současnosti považován za ohrožený druh a u populací napříč celou Evropou dochází k poklesu v jejich počtostech. K tomuto poklesu dochází nejvíce v západním areálu rozšíření, tedy na území států Německa,

Polska a České republiky. V prvních dvou zmíněných státech je sysel obecný již považován za vyhynulého, ovšem na území Polska je snaha o reintrodukcii a dochází k *ex situ* odchovu sysla obecného v zoologických zahradách. Území státu České republiky je tedy nejzápadnější a zároveň nejsevernější výskyt populací sysla obecného (Hulová & Sedláček, 2008). Jak už je zmíněno v kapitole Biologie a ekologie, je sysel obecný vázán na stepní stanoviště, např. pole, louky, pastviny, břehy a stezky. V minulosti byla v České republice tato stanoviště čteně zastoupena a umožňovala téměř kontinuální rozšíření populací sysla, který byl dokonce lidmi považován za škůdce, pronásledován a loven. Největší pokles početnosti populací sysla obecného na území České republiky vyvolaly změny v agrotechnických opatřeních a přímá eradikace stanovišť v 2. polovině 20. století, konkrétně hluboká orba, konsolidace a scelování polí, ale také i používání pesticidů (Neragen) (Grulich, 1960). Jako výsledek všech těchto vlivů došlo na území České republiky k intenzivní fragmentaci habitatů vhodných pro sysly obecné a také ke zničení migračních koridorů, a tedy kompletnímu narušení metapopulační struktury, která je pro stabilní syslí populace nezbytná (Anděra & Hanzal, 1995). Takto méně početné populace sysla jsou pak i více náchylné na náhodné faktory prostředí, jako jsou například přívalové deště a rychlé tání ledu, které způsobují zaplavování syslích nor a velké až hromadné úhyny jedinců (Matějů et al., 2008).

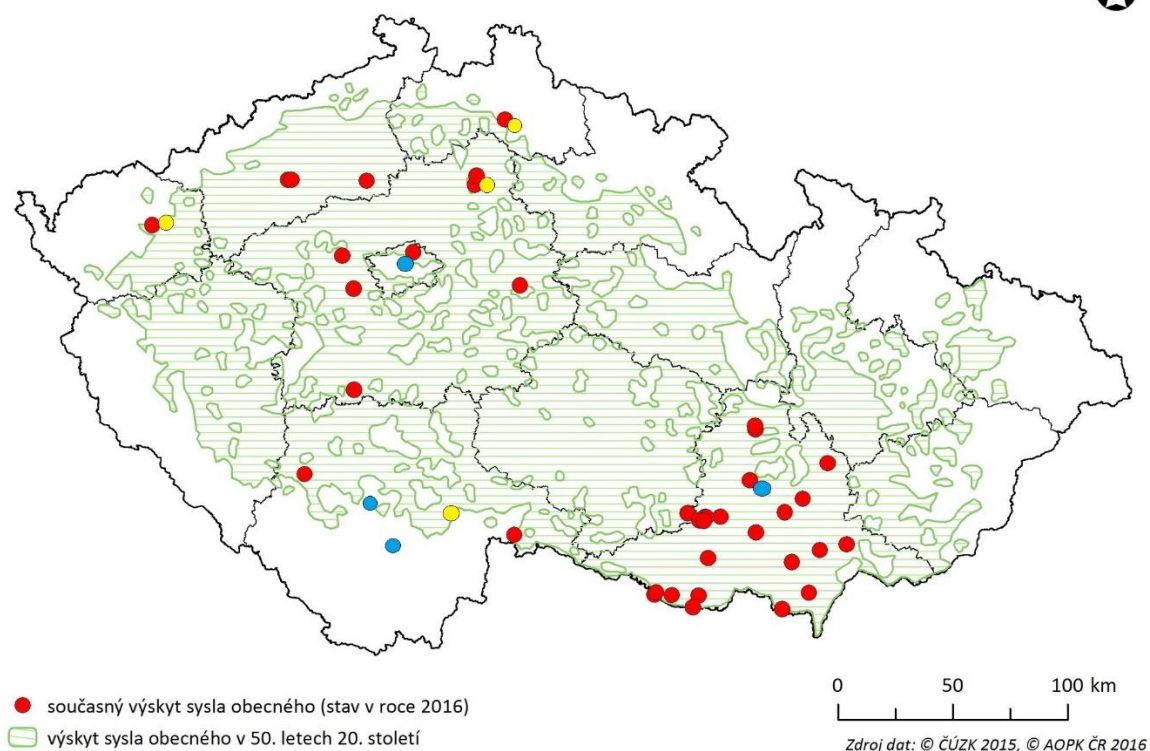
Sysel obecný (*Spermophilus citellus*) je na území České republiky považován za kriticky ohrožený druh a od roku 2008 je veden v Zákoně o ochraně přírody a krajiny č. 114/1992 Sb. jako zvláště chráněný druh, v Provděcí vyhlášce 395/1992 jako druh kriticky ohrožený. Obsažen je i v Červeném seznamu obratlovců ČR (kriticky ohrožený) a tento druh také zahrnuje Úmluva o ochraně evropských planě rostoucích rostlin, volně žijících živočichů a přírodních stanovišť (Bernská úmluva) a Směrnice č. 92/43/EEC, o ochraně přírodních stanovišť, volně žijících živočichů a planě rostoucích rostlin (Směrnice o stanovištích) (Matějů et al., 2008). Kromě záchranného programu vymezeného na území České republiky, který je platný od roku 2008 je sysel chráněn i pod záštitou celoevropského záchranného programu pro tento druh. Pro současné malé a izolované populace platí, že je jejich výskyt vázán na celkem 40 lokalit, které jsou dány trvale udržovaným krátkým travním porostem (golfové kurty, letiště, kempy...). Pro obnovení početnosti populací je důležitý jak management

lokalit, tak management genetický (Hulová & Sedláček, 2008). Co se týče *ex situ* odchovu sysla obecného na území České republiky, tak podle databáze Zootierliste dochází k odchovu sysla obecného v zoologických zahradách Praha, Brno, v zoologické zahradě Hluboká nad Vltavou a dále také v zooparku v Chomutově a v expozici záchranné stanice pro živočichy ve Vlašimi.

Ztráta přirozeného habitatu, kde probíhá stabilní management udržující krátký travní porost a také zejména vytváření antropogenních bariér jsou v současnosti jedny z největších hrozeb pro dlouhodobou existenci zbývajících populací sysla obecného. Vzdávající fragmentace prostředí zapříčiňuje ztrátu potenciálně vhodných lokalit, a tedy i ztrátu genetické variability, která byla sledována i v oblastech, kde je vysoká snaha ochrany populací syslů, například v Bulharsku (Koshev, 2008). Hodně fragmentované populace ztrácejí poměrně rychle svoji genetickou variabilitu hlavně kvůli znemožnění migrace a narušení metapopulačního systému populací, ve kterých pak silně působí genetický drift. Uvnitř těchto populací také dochází k častější příbuzenské plemenitbě a rychlé ztrátě neutrálních i adaptivních lokusů (Hulová & Sedláček, 2008). V těchto populacích není také často známa genetická variabilita populací historických předků a nelze tedy vyloučit, že je nízká genetická variabilita způsobena efektem zakladatele (Říčanová et al., 2013). K tomuto efektu dochází, když je založena nová populace za použití jedinců z původní větší populace. Tato nová populace se může velmi lišit od původní velké populace, a to jak z hlediska genotypů, tak fenotypů. Aby nedocházelo k poklesu této genetické variability, tak je velice důležitá migrace syslů obecných mezi lokalitami výskytu populací.

Genetická variabilita přírodních populací sysla obecného v nejzápadnějších částech jeho rozšíření tedy na území České republiky je po velkých úbytcích v početnosti v druhé polovině 20. století, považována za velmi nízkou s vysokou mírou inbreedingu uvnitř populací a předpokládá se, že místní přírodní populace nejsou schopny dlouhodobé existence bez uskutečněných managementových opatření. Právě za účelem posílení těchto nestabilních populací na lokalitách přírodního výskytu byly zakládány *ex situ* odchovy sysla obecného. Tyto odchovy byly v Česku zakládány především monitorovaným odchovem jedinců ze Slovenska, tedy z nejbližšího výskytu sysla obecného v Evropě, kde je početnost populací mnohem vyšší a některé byly zakládány i z původně

početných populací sysla, které se v minulosti vyskytovaly přímo na území České republiky. *Ex situ* odchovy sysla umožňují získávání jedinců, kteří jsou dostatečně geneticky variabilní, a tedy vhodní pro podporu a posílení stávajících přírodních populací na území České republiky. U těchto jedinců je potřeba zjišťovat a zaznamenávat genetické charakteristiky pomocí geneticky molekulárních analýz, aby zde byla jistota, že jsou na přírodní lokality reintrodukováni opravdu vhodní jedinci. Při introdukování *ex situ* jedinců do populací žijících v přírodě je však důležité dávat pozor, aby nedošlo k dalšímu problematickému jevu, zvanému outbreední deprese. K tomuto jevu dochází, pokud jsou introdukováni jedinci geneticky či geograficky příliš odlišní od přírodních populací, ve kterých pak dochází k narušení genetické diverzity způsobené adaptacemi na konkrétní lokalitu a celkově se snižuje fitness jedinců (Johnstone et al., 2014).



Obr. 2: Mapa rozšíření stávajících populací sysla obecného znázorňující úbytek populací v ČR. Převzato z www.zachranneprogramy.cz (9. 2. 2021) a následně pak byly do této mapy znázorněny populace studované v této práci v podobě žlutých bodů (přírodní lokality) a modrých bodů (*ex situ* lokality odchovu).

2. Cíle práce

- Hlavním cílem je porovnání velmi nízké variability původních populací sysla obecného na území České republiky s genetickou variabilitou *ex situ* odchovů a dalších přírodních lokalit, do nichž už v minulosti byly přidávány jedinci z jiných populací za účelem zvýšení životaschopnosti
- Doporučení vhodných opatření, která povedou ke zvýšení genetické variability a životaschopnosti populací
- Navržení opatření na ochranu studovaného druhu v ČR ve spolupráci s AOPK Praha

3. Materiál a metody

3.1. Vzorkování

V této práci byly zkoumány tkáňové vzorky sysla obecného (*Spermophilus citellus*), které byly sbírány na celkem osmi lokalitách v České republice napříč lety 2016 až 2019. Lokality, ze kterých vzorky pocházely, zahrnovaly místa přirozeného výskytu sysla a zároveň i vzorky z *ex situ* odchovů. Čtyři lokality výskytu ve volné přírodě dále analyzované v této práci zahrnovaly následující lokality a jejich početnosti byly zjištěny z výročních zpráv AOPK pro realizaci záchranného programu sysla obecného. Na těchto přírodních lokalitách docházelo v minulosti k posilování zde žijících populací sysla obecného z průběhu let vytvářených *ex situ* odchovů a je třeba tedy považovat tyto populace za populace smíšeného původu, tedy ne za čistě přirozené. Tyto populace lze porovnávat s populacemi čistě přírodními s výsledky vykazujícími zlepšení či zhoršení genetické struktury populací vlivem reintrodukce *ex situ* chovaných jedinců. 1) Plocha veřejného vnitrostátního letiště Hodkovice nad Mohelkou v okrese Liberec, kde byla v roce 2019 odhadovaná početnost syslí populace 60 jedinců. 2) Další lokalita Radouč v okrese Mladá Boleslav v podobě plochy u Národní přírodní rezervace Radouč dosahuje největších početností, co se českých lokalit týče a to až 700 jedinců pro rok 2019, což je významně ovlivněno častým krmením syslů obyvateli Mladé Boleslavi a návštěvníky Národní přírodní rezervace. 3) Třetí lokalitou přírodního výskytu syslů, která je zahrnuta v této práci, je plocha golfového resortu nedaleko obce Olšová Vrata u Karlových Varů. Populace syslů, zde byla opakovaně posílena vypouštěním jedinců ze Zoo Hluboká nad Vltavou (2016) a jedinců ze Zoo Norimberk (2017), díky čemuž dosahovala v roce 2019 velikosti 100 jedinců. 4) Lokalita Písečný vrch je nově založená lokalita, do které bylo v minulosti introdukováno několik desítek jedinců z *ex situ* odchovů, konkrétně ze Zoo Brno, Zoo Hluboká nad Vltavou a z umělého odchovu Rozovy a početnost této populace po opakovaných vypouštěních jedinců ze zdrojových populací se pohybovala kolem odhadovaných 50 jedinců pro rok 2019. Tyto lokality pak byly doplněny o vzorky z *ex situ* chovů, jejichž populační strukturu a genetickou variabilitu je třeba monitorovat a studovat, za účelem možnosti využití těchto populací jako zdrojových pro reintrodukci na přírodní lokality a umožnění tak *in situ* ochrany tohoto druhu. Tkáňové vzorky sysla obecného byly získány z následujících zoologických

zahrad: Zoo Praha, Zoo Brno, kde byl odchov sysla obecného zahájen v roce 2015, Zoo Hluboká nad Vltavou a dále pak i ze záchranné stanice Rozovy u Temelína, fungující od roku 2016. V odchovech Zoo Hluboká nad Vltavou, Zoo Brno a ZS Rozovy jsou chovány populace sysla obecného založené z jedinců odchycených na území Slovenska. U odchovu Zoo Praha se jedná o potomky syslů odchycených v minulosti na lokalitách v Českém středohoří a také z pražských Letňan, kde se dříve vyskytovala početná kolonie sysla obecného. Veškeré lokality společně s rokem odchyty a počty příslušných tkáňových vzorků jsou vyobrazeny v Tab. I. Všechny tkáňové vzorky sysla obecného byly získány díky spolupráci s Agenturou ochrany přírody a krajiny – AOPK Praha. Odchyty prováděli pracovníci AOPK nebo zaměstnanci Zoo v *ex situ* chovech.

Tab. I: Seznam lokalit původu analyzovaných vzorků sysla obecného (*Spermophilus citellus*), doplněné o rok, ve kterém došlo k odchyty a získání vzorků, zkratky a o samotný počet vzorků.

Lokalita	Rok	Zkratka	počet vzorků
Hluboká	2018	H118	15
	2017	H117	19
	2016	H116	10
Hodkovice nad Mohelkou	2019	Hod	4
Písečný vrch	2018	PV18	2
	2019	PV19	5
Rozovy	2018	Roz18	44
	2017	Roz17	25
Karlovy Vary	2018	KV18	16
	2019	KV19	8
Brno	2017	B17	10
	2018	B18	10
Praha	2018	P18	11
	2017	P17	10
Radouč	2019	Rad	9

3.2. Mikrosatelity jako genetické markery

Mikrosatelit je úsek DNA s opakujícími se mono-, di-, tri- nebo tetranukleotidovými jednotkami. Za mikrosatelity jsou tedy považovány krátké sekvence nukleotidů (obvykle 2-6 párů bází), které tvoří tandemové repetice (TR), jsou široce rozšířeny napříč celým genomem organismu, lokalizované jak v kódujících, tak nekódujících oblastech genů a jsou i častými centry výskytu polymorfismů a mutací. Tyto sekvence byly v historii postupně detekovány napříč eukaryotními genomy a s rozvojem polymerázové řetězové reakce (PCR) v osmdesátých letech 20. století se staly nejučinnějšími používanými genetickými markery (Jarne & Lagoda, 1996). Jaderné mikrosatelity dnes hrají významnou roli při studování molekulární populační genetiky, identifikaci chorob, studování patogeneze, evoluce druhů a mohou nám poskytovat i informace o sociálním chování druhů, které jinak žijí skrytým způsobem života (Henshaw, 2020). Časté využívání mikrosatelitů jako genetických markerů pro studie genetické rozmanitosti v přírodních populacích je také zapříčiněno kodominancí, velkou početností, multi-alelickou povahou těchto markerů. Nejběžnější způsob, jak v současnosti mikrosatelity detekovat je navržení jejich PCR primerů, kterou jsou jedinečné pro jeden lokus v genomu a také párů bází na obou stranách opakující se části genu. Jeden pár PCR primerů bude tedy fungovat pro každého jedince druhu a bude produkovat rozdílně velké produkty pro každý různě dlouhý mikrosatelit (Marwal & Gaur, 2020).

V této práci bylo pro tkáňové vzorky použito celkem 12 mikrosatelitových lokusů (viz Tab. II). Ty byly originálně navrženy pro jiné hlodavce z čeledi *Sciuridae* (*Marmota marmota*, *Spermophilus brunneus brunneus*, *Spermophilus suslicus*), konkrétně to byly lokusy ST10, MS41, MS45, MS56 (Hanslik & Kruckenhauser, 2000), IGS-1, IGS-110b (May et al., 1997) a lokusy Ssu1, Ssu5, Ssu7, Ssu8, Ssu15, Ssu16 (Gondek et al., 2006). Tyto lokusy byly rozděleny do třech multiplexů (A, B, C) dále využívaných pro PCR reakci stejně jako v práci Říčanová et al., (2011).

Tab. II: Souhrnná tabulka obsahující mikrosatelitové lokusy použité v této práci. Informace o opakujícím se motivu a sekvenci primeru ve směru 5' - 3' převzaty ze studií Hanslik & Kruckenhauser (2000), Gondek et al. (2006) a May et al. (1997).

název lokusu	opakující se motiv	sekvence primeru 5' - 3'	Značení
ST10	(CA) ₁₂	CCATCTCCTGACATTTAATA TTGTGATCCTCCAGGGAGTT	FAM
MS41	(GT) ₁₁	GGTGTATATGGGAATAGGGGG GCCTTCAAATCAAAGCAGGTTG	HEX
MS45	(GT) ₁₃	CTGTCTCTTTGTCCCTGCC CTCCTTACCATCATCTTTCCG	TET
MS56	(CA) ₁₄	CAGACTCCCACCAGTGACC CCTGATCTATGTAGGTTCCAT	FAM
IGS-1	(CA) ₂₀	ATAACAGCACCCCTGCTCCAC AATCCATCCTCTACCTGTAATGC	TET
IGS-110B	(TGC) ₉	CCATGGAAGCATGTCTGGTG TGCTTCCTGATTTCAAAGTTGC	FAM
Ssu1	(AC) ₁₀	AGGTGGGTGTGAGA ACTTGC AACTCAGGCTGGTGTTGTGA	FAM
Ssu5	(AG) ₁₂	CAACATAGTGAGACCCCATC AAGTCATCCCTGCCCTAAT	NED
Ssu7	(GA) ₁₃	TTTGAGGACCAGGACATCGT GCCACTACACCTCTCCTTGC	VIC
Ssu8	(AC) ₁₇	AGTCGTGTCCAGCTTGTGTG AAATTGGGATGATAAGCAGAGG	NED
Ssu15	(TC) ₃ G(TC) ₃ G(CT) ₃	CTAAGCACCATACAAAGATG TCCCTTCCACCCATTGAC	VIC
Ssu16	(GAT) ₁₄	AACCCTTTCTGTTTCCCTTCA TGGGGTTAGCAAATGATGGT	PET

Metody popsané v kapitolách 3.3. – 3.5. (Izolace DNA, Polymerázová řetězová reakce a Fragmentační analýza) nebyly prováděny autorem této práce, ale byla poskytnuta již hotová data pro další analýzu popsanou v kapitole 3.6.

3.3. Izolace DNA

Od odchyty a získání vzorků genetické informace byly po celou dobu tyto tkáňové vzorky uchovávány v mikrozkuvkách s 96 % ethanolem. DNA z tkáňového vzorku sysla obecného pak byla extrahována za použití komerčního kitu JETQuick Tissue DNA Spin Kit; Genomed GmGH (Říčanová et al., 2011).

3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce – polymerase chain reaction (PCR) je dnes už zcela běžná laboratorní metoda, která se používá k efektivní výrobě mnoha kopií (v řádech milionů až miliard) nějaké konkrétní oblasti DNA ze vzorku. Tato oblast DNA může být zcela libovolná v závislosti na tom, co je cílem studie, například to mohou být geny, u kterých se usiluje o poznání jejich exprese a funkce v organismu nebo také genetické markery, které mohou být použity k přiřazování určitých dílčích faktorů ke komplexnějšímu jevu. Cílem PCR je obvykle vytvoření dostatečného množství cílené DNA, která je pak následně analyzována nebo použita jiným způsobem (sekvenování, gelová elektroforéza, ...).

Stejně jako DNA v živém organismu potřebuje pro svou replikaci enzym DNA polymerázu, tak i do reakce PCR je začleněn enzym Taq polymeráza, který stejně jako DNA polymeráza vytváří nové vlákno DNA, podle již existujícího templátového vlákna. Pro funkci tohoto enzymu je nezbytná přítomnost primeru – jednovláknových, krátkých sekvencí nukleotidů (obvykle řetězec 20 nukleotidů), sloužících jako výchozí bod syntézy DNA. Pro každou PCR reakci je zapotřebí dvou primerů, které jsou speciálně navrženy tak, aby lemovaly cílovou oblast, která bude kopírována. Jsou jim tedy dány sekvence, díky nimž se budou vázat na protilehlá vlákna templátové DNA.

PCR reakce probíhá ve fázích třech po sobě jdoucích kroků. První z těchto tří kroků se nazývá denaturace, při které dochází k zahřátí celého vzorku složeného z výše zmíněných komponentů na vysokou teplotu (průměrně 96 °C), což způsobí narušení vazeb vodíkových můstků mezi dvěma vlákny DNA. Tím dojde k rozvolnění těchto vláken za vzniku dvou jednovláknových řetězců DNA.

Následující druhý krok je nazýván annealing, při kterém se celá reakce ochladí zhruba na 55 °C, čímž se umožní navázání primerů na jejich komplementární sekvence v tuto chvíli již jednovláknové DNA. Třetím a finálním krokem je elongace, při které se teplota reakce zvýší na 72 °C, tedy na teplotu, při které je aktivní Taq polymeráza syntetizující nové vlákno DNA. V typické PCR reakci dochází k 25 až 35 opakováním tohoto cyklu na jejichž konci získáme po relativně krátké době velké množství nově nasyntetizované DNA. Tyto produkty PCR se poté oddělí buď gelovou nebo kapilární elektroforézou.

Všech 12 mikrosatelitových lokusů použitých v této práci bylo amplifikováno ve třech multiplexových setech rozdělených následujícím způsobem. Set A (teplota ve fázi annealingu, $T_A = 52$ °C) obsahoval lokusy ST10, Ssu5, Ssu15, Ssu16, set B (teplota ve fázi annealingu, $T_A = 55$ °C) obsahoval lokusy IGS-1, IGS-110b, Ssu7, Ssu1 a poslední set C (teplota ve fázi annealingu, $T_A = 53$ °C) obsahoval zbývající lokusy MS45, MS56, MS41 a Ssu8. Samotná PCR reakce proběhla za použití QIAGEN Multiplex PCR kitu (Říčanová et al., 2011) za podmínek znázorněných v Tabulce III.

Tab. III: Teploty (°C), délka průběhu (min) a počet cyklů PCR reakcí, pro všechny tři multiplexy A, B, C.

set	Lokusy	PCR reakce			
		fáze	teploty	čas	cykly
A	ST10, Ssu5, Ssu15, Ssu16	Denaturace	95 °C	15 min	1x
		Annealing	94 °C	0,5 min	35x
			52 °C	1,5 min	
Elongace	72 °C	1 min	1x		
B	IGS-1, IGS-110b, Ssu7, Ssu1	Denaturace	95 °C	15 min	1x
		Annealing	94 °C	0,5 min	35x
			55 °C	1,5 min	
Elongace	72 °C	1 min	1x		
C	MS45, MS56, MS41, Ssu8	Denaturace	95 °C	15 min	1x
		Annealing	94 °C	0,5 min	35x
			53 °C	1,5 min	
Elongace	72 °C	1 min	1x		

3.5. Fragmentační analýza

Fragmentační analýza byla provedena firmou SEQme s.r.o., kde byly fluorescenčně označené produkty polymerázové řetězové reakce pro každý multiplexový set analyzovány v sekvenátoru fungujícím na principu kapilární elektroforézy. Data ze sekvenátoru pak byla manuálně analyzovaná v programu Geneious prime v. 2.4 2020, doplněného o Geneious Microsatellite Plugin (Biomatters).

V této fázi jsem obdržel data ke zpracování, tj. odečítal jsem alely pro 12 mikrosatelitových lokusů a zaznamenával je pro všech 198 jedinců a následně pak analyzoval získaná molekulární data.

3.6. Analýza molekulárních dat

Pro další práci byla molekulární data zkoumána dvěma přístupy, kterými lze na získaná data pohlížet. V prvním přístupu byla data seřazena podle lokalit místa odběru společně s rokem, kdy došlo ke sběru tkáňových vzorků sysla obecného. Tohoto přístupu bylo využíváno k pozorování významné změny během jednotlivých let. Druhým přístupem bylo seřazení dat jen podle lokalit místa

odběru vzorků sysla obecného na území ČR nezahrnující roky, kdy odběr probíhal. Tento přístup byl využit hlavně k získání obecné a celkové informace o populacích na jednotlivých lokalitách.

3.6.1. Vnitropopulační genetická variabilita

K popsání genetické variability uvnitř jednotlivých populací byly použity základní charakteristiky běžně užívané v populační genetice. Tyto popisné charakteristiky byly počítány v několika počítačových programech sloužících speciálně k získávání těchto charakteristik vypovídajících o vlastnostech populací.

Mezi nejzákladnější charakteristiky popisující genetickou variabilitu patří alelická bohatost (allelic richness = AR), očekávaná heterozygotnost (expected H_e) a pozorovaná heterozygotnost (observed H_o), které slouží k výpočtům odchylky od ideálního stavu, tedy odchylky od Hardy-Weinbergovi rovnováhy. Tato rovnováha, nebo také Hardy-Weinbergův zákon pro dvě alely je definován rovnicí $(p + q)^2 = 1$, častěji je však udáván rovnicí zahrnující genotypy jedinců v populaci $p^2 + 2pq + q^2 = 1$. Tento ideální stav platí jen tehdy, jsou-li splněny podmínky definující panmiktickou populaci. Jak allelic richness očekávaná a pozorovaná heterozygotnost, tak i samotný test na Hardy-Weinbergovu rovnováhu byly vypočítány v programu GenA1EX v. 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Test na Hardy-Weinbergovu rovnováhu byl následně doplněn i o hladinu signifikance, která byla dopočítána podle Bonferroniho korekce (Bonferroni, 1936).

K počítání odchylky od Hardy-Weinbergovy (HW) rovnováhy bylo využito další charakteristiky genetické variability zvané koeficient inbreedingu (F_{IS}). Tento index je považován za značně citlivější alternativu k odhadnutí odchylky od HW rovnováhy. F_{IS} nabývá hodnot od -1, kdy je v populaci dostatek potenciálních náhodných partnerů, nedochází k inbreedingu, a tedy ke značnému poklesu genetické variability způsobené inbrední depresí, do 1, kdy je v populaci nedostatek náhodných partnerů, dochází k inbreedingu a poklesu genetické variability související v převahou homozygotních jedinců. Tento index byl pro všechny populace vypočítán v programu Genetix v. 4.05 (Belkhir et al., 1996). V tomto programu byla získána i statisticky signifikantní hodnota F_{IS} pro 95 % konfidenční interval za použití 10 000 permutací.

Z dalších použitých počítačových softwarů byl využit program FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007) k odhadnutí frekvence nulových alel pro každý lokus a každou populaci za použití EM (Expectation Maximization) algoritmu (Dempster et al., 1977) při 1000 opakování. Tento test slouží především k testování chybovosti PCR reakce, tedy nasednutí primerů na špatné místo, což zapříčiňuje vznik falešné alely, tj. získání špatných dat pro další molekulární analýzu.

3.6.2. Mezipopulační genetická variabilita

K určení rozdílu genetické variability mezi jednotlivými populacemi byl použit fixační index F_{ST} , který je v současnosti běžně používán v populační genetice. Jedná se o párově porovnávané rozdíly ve frekvenci alel mezi jednotlivými populacemi. Hodnoty tohoto indexu se pohybují od 0 (populace nejsou mezi sebou odlišné) do 1 (populace jsou mezi sebou zcela odlišné a nemají společné žádné alely genů). Ve skutečnosti bývají hodnoty F_{ST} indexu mezi populacemi výrazně nižší než 1, ale vzhledem ke společnému předkovi může být mezi populacemi většina alel společná. V těchto případech se frekvence společných alel pro několik populací mohou postupně odlišovat v důsledku genetického driftu a příbuzenského křížení, vyskytujících se nezávisle v každé populaci, což vede k náhodné změně frekvence alel. Párové hodnoty pro fixační index F_{ST} byly vypočítány v programu FreeNA (Chapuis & Estoup, 2007), za použití ENA korekce (korekce na nulové alely) a 1000 provedených permutací. V tomto programu byly získány i statisticky významné hodnoty, porovnané s konfidenčním intervalem ($P < 0,05$).

Jako další použitou analýzou byla tzv. Bayesiánská klastrová analýza realizovaná v programu Structure v. 2.3.4 (Pritchard et al., 2000). Tato analýza je využívána k identifikaci struktury v určitých datech, přesněji tedy k vytvoření homogenní skupiny případů, pokud neznáme jejich předešlé seskupení. Na základě výsledků je možno pozorovat a vybrat nejvhodnější rozdělení populací do takzvaných klastrů K . K odhadnutí nejvhodnějšího počtu klastrů byla spuštěna analýza napřed pro K od 1 do 15 a pak pro K od 1 do 8 za použití admixture modelu. V obou analýzách bylo provedeno 10 opakování pro každé K s délkou tzv. burnin periody 100 000 a s počtem 500 000 opakování. Výsledky této

analýzy byly vyneseny do grafu a na základě hodnot ΔK zobrazených v grafu pak bylo vybráno nejlepší rozdělení populací v podobě určitého K .

4. Výsledky

4.1. Vnitropopulační genetická variabilita

4.1.1. Charakteristiky genetické diverzity populací

V této práci bylo úspěšně zgenotypováno a dále analyzováno 198 jedinců sysla obecného (*Spermophilus citellus*) pocházejících z celkem 8 populací analyzovaných odděleně pro jednotlivé roky, kde byl prvním přístupem k molekulárním datům brán každý rok jako samostatná populace. Úspěšně bylo použito všech 12 výše zmíněných mikrosatelitových lokusů. Alelická bohatost (AR) dosahovala hodnot od 1,667 (Hodkovice nad Mohelkou 2019 a Písečný vrch 2018) až do hodnoty 2,833 dosažené v populaci Brno 2017. Průměrná hodnota alelické bohatosti napříč všemi populacemi byla 2,255. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) nabývala větší variability než heterozygotnost očekávaná (H_e). Pro populace z *ex situ* odchovů byly nejmenší hodnoty H_o 0,319 u populace Hluboká 2018 a největší 0,642 u populace Brno 2017. Hodnoty H_e byly nejmenší u populace Hluboká 2016 a to 0,281 a největší hodnota byla taktéž u populace Brno 2017 a to 0,488. Co se týká populací z přírodních lokalit výskytu tak zde bylo zjištěno rozmezí hodnot H_o od 0,259 (Radouč) do 0,500 (Písečný vrch 2018) a H_e zde dosahovala hodnot od 0,263 (Radouč) do 0,393 (Písečný vrch 2019). Průměrná hodnota H_o napříč všemi populacemi byla 0,449 a pro H_e byla tato hodnota 0,352. V Tab. IV jsou vyznačené i hodnoty testu Hardy-Weinbergovy rovnováhy, kde u dvou populací docházelo k velmi výrazné odchylce od HW rovnováhy.

Až na populaci Radouč 2019 vycházely všechny hodnoty koeficientu inbreedingu záporně s nejnižší hodnotou -0,667 u populace Písečný vrch 2018, která se však neprojevila jako signifikantní a za nejnižší signifikantní hodnotu je tedy považována hodnota -0,344 vyskytující se u populace Hluboká 2016. Průměrná hodnota koeficientu inbreedingu (F_{IS}) je -0,235. Nízké a signifikantní hodnoty napříč téměř všemi populacemi svědčí o dostatku potenciálních náhodných partnerů, nepřítomnosti inbreedingu a převaze heterozygotních jedinců.

Tab. IV: Genetická variabilita za použití genetických markerů (založeno na 12 mikrosatelitových lokusů), rozdělená podle jednotlivých populací a let vzorkování sysla obecného (*Spermophilus citellus*) na území ČR.

Populace	N	Mikrosatelity				
		AR	H _o	H _e	HWE	F _{IS}
Hluboká 2018	15	2,333	0,319	0,319	0,095	-0,034
Hluboká 2017	19	2,333	0,423	0,343	0,029*	-0,161*
Hluboká 2016	10	1,833	0,392	0,281	0,228	-0,344*
Hodkovice nad Mohelkou 2019	4	1,667	0,375	0,289	0,546	-0,279
Písečný vrch 2018	2	1,667	0,500	0,292	1,888	-0,667
Písečný vrch 2019	5	2,167	0,483	0,393	0,304	-0,219
Rozovy 2018	44	2,750	0,436	0,391	<0,001	-0,093*
Rozovy 2017	25	2,750	0,573	0,466	0,165	-0,233*
Karlovy Vary 2018	16	2,500	0,438	0,361	0,552	-0,156*
Karlovy Vary 2019	8	2,000	0,406	0,298	0,116	-0,323*
Brno 2017	10	2,833	0,642	0,488	0,019*	-0,295*
Brno 2018	10	2,750	0,617	0,475	0,011*	-0,287*
Praha 2018	11	2,083	0,424	0,311	0,012*	-0,294*
Praha 2017	10	2,333	0,442	0,320	<0,001	-0,279*
Radouč 2019	9	1,833	0,259	0,263	0,032*	0,024

N: velikost vzorku, AR: allelic richness, H_o: pozorovaná (observed) heterozygotnost, H_e: očekávaná (expected) heterozygotnost, HWE: hodnoty P Hardy-Weinbergovy rovnováhy, označené podle toho zda jsou signifikantní s odpovídající hladinou signifikance (*- P < 0,05, **- P < 0,01, označení <0,001- P < 0,001), F_{IS}: koeficient inbreedingu (*- označení signifikantních hodnot P < 0,05).

U populací rozdělených podle druhého přístupu, tedy seřazení dat jen podle lokalit místa odběru vzorků sysla obecného na území ČR nezahrnující roky, dosahovala alelická bohatost rozmezí hodnot od 1,667 (Hodkovice nad Mohelkou) do 2,917 (Rozovy) a její průměr napříč všemi lokalitami dosahoval hodnoty 2,427. Pozorovaná heterozygotnost (H_o) byla nejnížší u populace na

lokalitě Radouč (0,259) a nejvyšší u populace v Brně (0,629). U očekávané heterozygotnosti (H_e) byla nejmenší hodnota pozorován u populace na lokalitě Radouč a to 0,263 a největší hodnota byla pozorována u populace na lokalitě Brno a to 0,490. Průměrná hodnota H_o byla 0,434 a H_e byla 0,378. V tomto případě byly od Hardy-Weinbergovi rovnováhy silně odchýleny 3 z 8 populací.

Nejnižší signifikantní hodnota pro koeficient inbreedingu dosahovala hodnoty -0,266 u populace v Brně a nejvyšší hodnota pak nabývala hodnot 0,024 pro populaci na lokalitě Radouč. Až na hodnotu z lokality Radouč byly všechny hodnoty koeficientu inbreedingu záporné a spíše se přibližující -1 s průměrnou hodnotou F_{IS} -0,140. To stejně jako v předešlém případě svědčí o velkém zastoupení heterozygotů a není předpokládáno, že by docházelo k příbuzenskému křížení.

Tab. V: Genetická variabilita za použití genetických markerů (založeno na analýze 12 mikrosatelitových lokusů), rozdělená podle místa odběru vzorků pro sysla obecného (*Spermophilus citellus*) na území ČR.

Lokalita	N	Mikrosatelity				
		AR	H_o	H_e	HWE	F_{IS}
Hluboká	44	2,500	0,376	0,340	<0,001	-0,097*
Hodkovice nad Mohelkou	4	1,667	0,375	0,289	0,546	-0,279
Písečný vrch	7	2,167	0,488	0,394	0,567	-0,228
Rozovy	69	2,917	0,484	0,453	<0,001	-0,067*
Karlovy Vary	24	2,500	0,427	0,345	0,006**	-0,159*
Brno	20	3,083	0,629	0,490	0,002**	-0,266*
Praha	21	2,750	0,433	0,398	<0,001	-0,078
Radouč	9	1,833	0,259	0,263	0,032*	0,024

N: velikost vzorku, AR: allelic richness, H_o : pozorovaná (observed) heterozygotnost, H_e : očekávaná (expected) heterozygotnost, HWE: hodnoty P Hardy-Weinbergovy rovnováhy, označené podle toho zda jsou signifikantní s odpovídající hladinou signifikance (*- $P < 0,05$, **- $P < 0,01$, označení <0,001- $P < 0,001$), F_{IS} : koeficient inbreedingu (*- označení signifikantních hodnot $P < 0,05$).

4.1.2 Detekce nulových alel

Výsledky pro odhady nulových alel pro jednotlivé populace, které jsou rozdělené podle místa a roku sběru vzorků, a lokusy jsou obsažené v příloze č. 1. Stejně tak byl zhotoven odhad nulových alel pro populace rozdělené jen podle lokalit místa odběru vzorku sysla obecného na území ČR, které jsou obsaženy v příloze č. 2. V obou případech byly za významnou přítomnost nulové alely považovány ty hodnoty, které dosahovaly větší hodnoty než 0,15. Celkem byly nalezeny 4 hodnoty přesahující toto číslo v mikrosatelitových lokusech Ssu15, Ssu1, MS45 a MS56. Tyto alely pak mohou zkreslovat výsledky statistik, ale protože se jedná jen o několik případů, a ne pro všechny lokality/populace, nebyly vyřazeny z analýz.

4.2. Mezipopulační genetická variabilita

4.2.1. Fixační index F_{ST}

Párové hodnoty fixačního indexu byly opět počítány pro oba přístupy, kterými bylo na populace pohlíženo. Hodnoty v případě prvního přístupu, tedy rozdělení populací na základě lokalit i let, kdy odchyt probíhal, dosahovaly rozmezí hodnot od 0,003 mezi populacemi Karlovy Vary 2018 a Karlovy Vary 2019 a také mezi populacemi Brno 2017 a Brno 2018 až po nejvyšší párovou hodnotu 0,589 mezi populacemi Radouč a Písečný vrch 2018. Průměrná hodnota fixačního indexu F_{ST} pro všechny populace dosahovala hodnoty 0,341, tedy většina párových hodnot byla větší než 0,25 a byly blíže 1, což vypovídá o velmi silné genetické variabilitě mezi populacemi sysla obecného. Tabulka obsahující všechny párové hodnoty mezi všemi jednotlivými populacemi je obsažena v příloze č. 3, kde byla i znázorněna barevná škála řadící hodnoty do kategorie jejich genetické variability podle rozmezí hodnot uvedených v legendě pod tabulkou.

Párové hodnoty fixačního indexu F_{ST} pro populace rozdělené podle lokalit místa odběru vzorků sysla obecného jsou vyneseny v Tab. VI. Nejmenší hodnota tohoto indexu byla zjištěna mezi lokalitami Písečný Vrch a Rozovy a její velikost byla 0,085. Lokalitu Rozovy však lze brát jako jednu ze zdrojových populací, ze kterých byla nově založena populace na lokalitě Písečný vrch, a proto lze tuto malou hodnotu F_{ST} předpokládat. Druhá nejmenší párová hodnota fixačního indexu byla tedy zjištěna mezi populacemi na lokalitách *ex situ* odchovů Praha a Brno a činila 0,145. Mezi těmito populacemi je tedy střední míra genetické

diferenciace. Za nejvyšší párovou hodnotu fixačního indexu je považována hodnota 0,461 mezi populacemi na lokalitách Hluboká a Radouč. Průměrná hodnota F_{ST} dosáhla hodnoty 0,306, což lze považovat za velmi silnou genetickou diferenciaci mezi populacemi.

Tab. VI: Párové hodnoty fixačního indexu F_{ST} podle lokalit odběru vzorků *Spermophilus citellus* na území ČR.

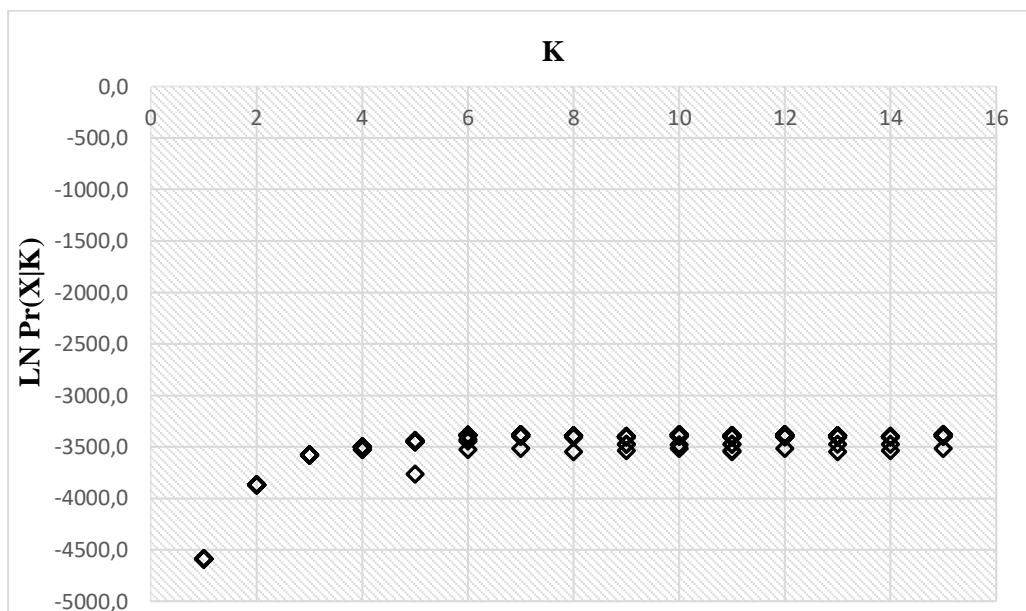
	Hl	Hod	PV	Roz	KV	B	P	Rad
Hl	0,000							
Hod	0,213	0,000						
PV	0,386	0,391	0,000					
Roz	0,348	0,365	0,085	0,000				
KV	0,147	0,231	0,311	0,288	0,000			
B	0,273	0,179	0,261	0,270	0,216	0,000		
P	0,289	0,162	0,342	0,323	0,155	0,145	0,000	
Rad	0,461	0,332	0,503	0,439	0,458	0,245	0,266	0,000

Hl: Hluboká, Hod: Hodkovice nad Mohelkou, PV: Písečný vrch, Roz: Rozovy, KV: Karlovy Vary, B: Brno, P: Praha, Rad: Radouč.

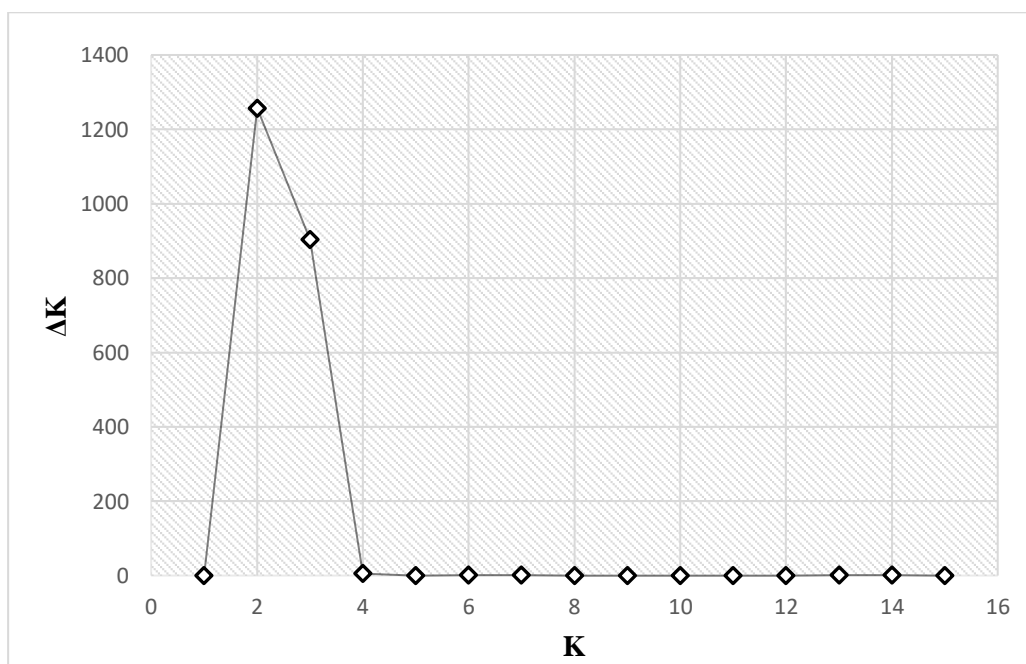
Rozsahy hodnot fixačního indexu F_{ST} : $0,05 < F_{ST} < 0,15$... střední genetická diferenciace (zeleně), $0,15 < F_{ST} < 0,25$... silná genetická diferenciace (žlutě), $F_{ST} > 0,25$... velmi silná genetická diferenciace (červeně).

4.2.2. Hierarchická Bayesiánská klastrová analýza

Po průběhu hierarchické Bayesiánské klastrové analýzy a následném vynesení výsledků této analýzy do grafu v podobě ΔK bylo vybráno nejlepší rozdělení populace do dvou klastrů, tedy K2. Zde je patrné, že lokality Rozovy a Písečný vrch tvoří jeden klaster (skupinu), a v druhém klastru (skupině) je zbytek lokalit.

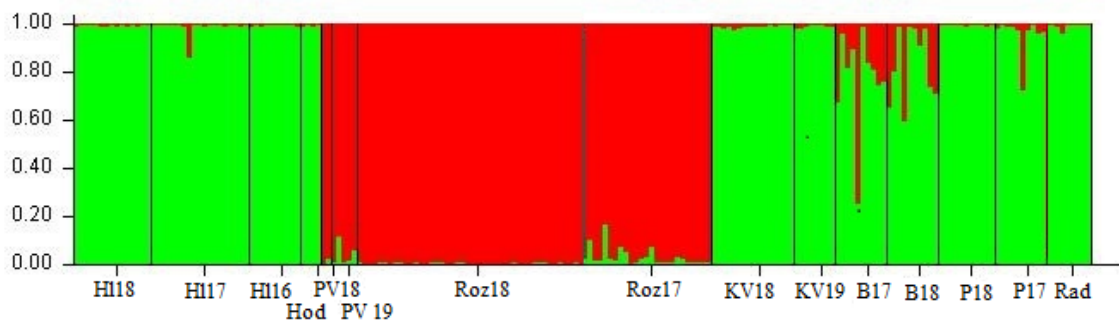


Obr. 3: Graf znázorňující výsledky klastrové analýzy s LN (likelihood) probability hodnoty na ose Y a počtem testovaných klastrů na ose X.



Obr. 4: Graf s hodnotami ΔK pro jednotlivé klastry ($K=1-15$).

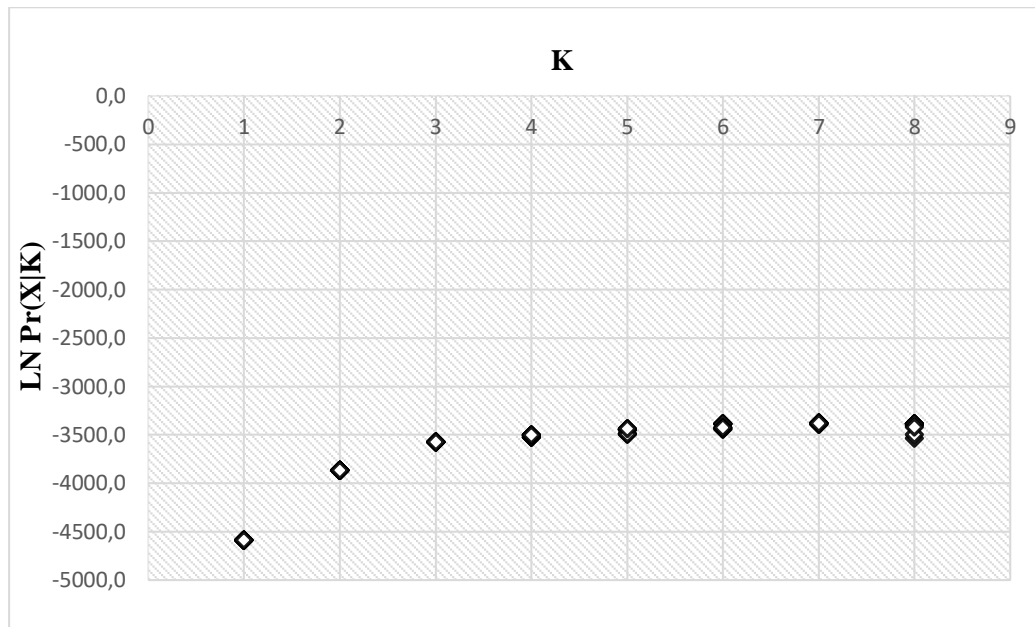
K2



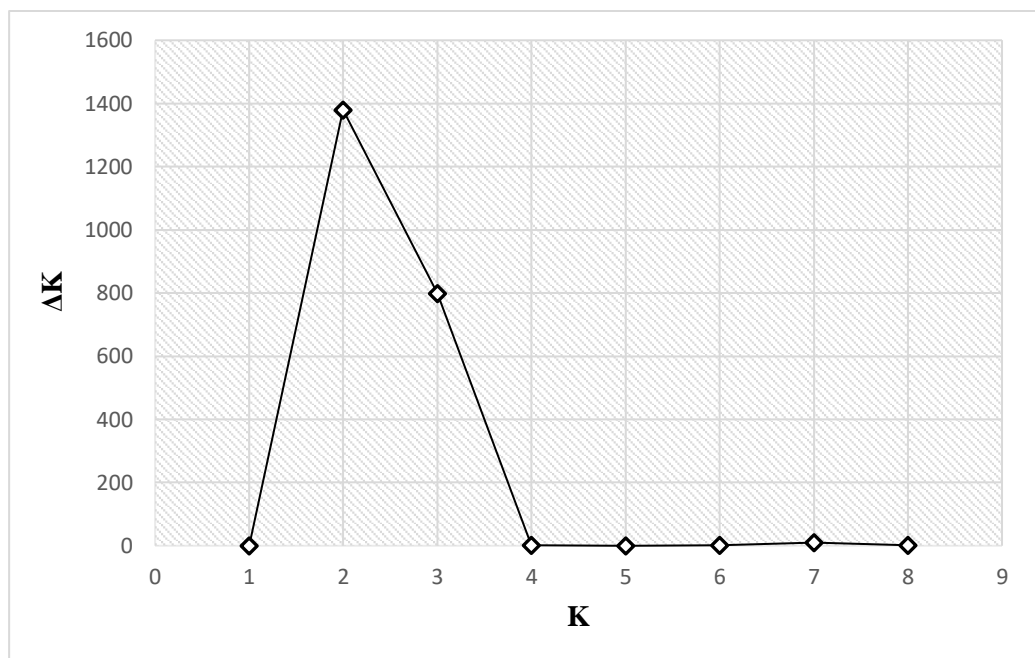
Obr. 5: Sloupcový graf znázorňující Bayesiánskou klastrovou analýzu pro nejvhodnější rozdělení populací na dvě skupiny ($K=2$).

HI18: Hluboká 2018, HI17: Hluboká 2017, HI16: Hluboká 2016, Hod: Hodkovice nad Mohelkou 2019, PV18: Písečný vrch 2018, PV19: Písečný vrch 2019, Roz18: Rozovy 2018, KV18: Karlovy Vary 2018, KV19: Karlovy Vary 2019, B17: Brno 2017, B18: Brno 2018, P18: Praha 2018, P17: Praha 2017, Roz17: Rozovy 2017, Rad: Radouč 2019.

Opět byly hierarchickou Bayesiánskou klastrovou analýzou analyzovány i populace rozdělené jen na základě lokalit místa odběru vzorků, kde se v potaz nebere rok sbírání vzorků. Do tohoto rozdělení spadá tedy jen 8 lokalit oproti 15 původním lokalitám, které jsou rozděleny i podle roku sběru dat. I pro tyto hodnoty se po vynesení do grafu v podobě ΔK prokázalo jako nejvhodnější rozdělení do dvou klastrů, K2. Zde je také patrné, že lokality Rozovy a Písečný vrch tvoří jeden klast (skupinu), a v druhém klastru (skupině) je zbytek lokalit. Dále je možné v tomto grafu pozorovat částečné sdílení alel s lokalitou Brno, což lze předpokládat, jelikož právě populace z lokalit Brno a Rozovy byly použity jako zdrojové populace pro nově založenou lokalitu Písečný vrch a celkově to tedy vypovídá o tom, že jedinci odchyceni na lokalitě Písečný vrch byly potomky jedinců z lokality Brno, a hlavně pak z lokality Rozovy.

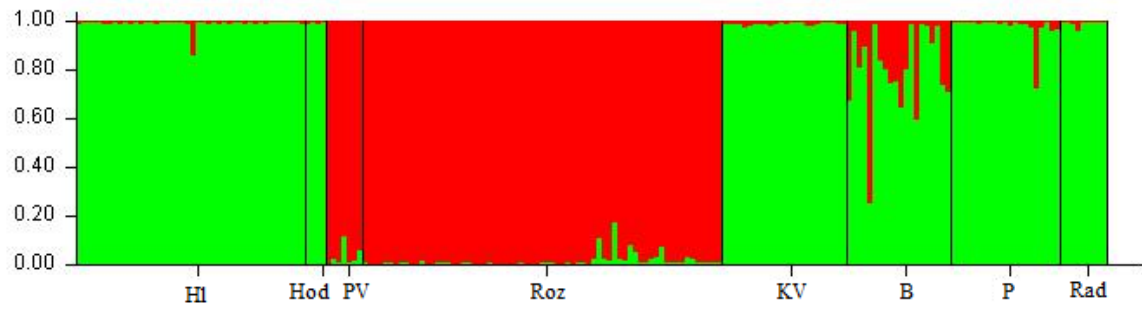


Obr. 6: Graf znázorňující výsledky klastrové analýzy s LN (likelihood) probability hodnoty na ose Y a počtem testovaných klastrů na ose X.



Obr. 7: Graf s hodnotami ΔK pro jednotlivé klastry (K=1-8).

K2



Obr. 8: Sloupcový graf znázorňující Bayesiánskou klastrovou analýzu analýzu pro nejvhodnější rozdělení populací na dvě skupiny ($K=2$).

HI: Hluboká, Hod: Hodkovice nad Mohelkou, PV: Písečný vrch, Roz: Rozovy, KV: Karlovy Vary, B: Brno, P: Praha, Rad: Radouč.

5. Diskuse

V současné době lze v mnohých studiích zabírajících se ochranou obratlovců pozorovat stále rostoucí obavy z dopadu antropogenních vlivů na přírodní strukturu ekosystémů, mezi které patří zejména fragmentace, degradace až úplná ztráta habitatů, které slouží jako útočiště terestrických savců (Johnstone et al., 2014). Jednou z největších potíží spojených s touto problematikou, bývá to, že ke ztrátě habitatu, fragmentaci a degradaci stanovišť dochází často současně a je pak obtížné izolovat dopady každého z těchto procesů. K porozumění populacím druhů žijících v člověkem narušovaných habitatech se využívá demografických studií, které mohou přinášet informace o tom, zda u populace dochází k poklesu a zda je populace ohrožena. K pochopení, proč dochází k poklesu u popisované populace jsou však ale nezbytné další funkční studie, které musí zahrnovat v úvahu celý organismus v aspektech jeho ekologie, fyziologie a genetiky. Takové studie pak mohou být užitečné jako ochrannářské nástroje, například pozorovaný fyziologický stres vyvolaný změnami prostředí, může deterministicky snížit fitness a celkově tedy přežívání populace. Tento fyziologický stres by měl být tedy považován za potenciální brzký varovný signál i v populacích, které se jinak jeví jako nedotčené a stabilní (Homyack, 2010). V práci Johnstone et al. (2014), která se zabývala vlivem fragmentace a degradace na populace malých savců, byl dokázán obrovský dopad fragmentace, který v průběhu 200 let způsobil na území Austrálie zhruba polovinu všech extinkcí druhů malých savců a dále také zvyšující se ohrožení recentních druhů. Dopady lidské činnosti na krajinu ohrožují v současnosti stále více druhů a za hlavní faktor zániku izolovaných populací v přírodě dnes považujeme ztrátu genetické variability, bez jejíž analýzy a popisu jsou dnes již veškerá navrhovaná ochrannářská opatření nemožná. Právě studium genetické struktury populací nám dnes umožňuje určovat nejen životaschopnost jednotlivých populací napříč všemi druhy živočichů, ale s porovnáním s daty z minulosti lze i předpovídat další vývoj populace v budoucnosti. Hlavním předpokladem pro zmiňovanou analýzu genetické variability, která může sloužit k následovnému navrhování ochrannářských opatření je dostupnost a použitelnost genetických markerů. Tento předpoklad může představovat konkrétní překážku u mnoha druhů živočichů, například u druhů medvědů, ale i jiných šelem, které mají ze své podstaty nízkou

úroveň genetické variace v důsledku faktoru jako je nízká hustota populací nebo nízká efektivní velikost populace (Paetkau & Strobeck, 1994).

U poklesů biodiverzity savců nehraje jedinou roli jen fragmentace a celková devalvace stanovišť, ale u druhů malých savců a často i u druhů predátorů docházelo v minulosti k častým konfliktům s lidmi. Druhy malých savců jsou ještě dnes často považovány za škůdce, a to opět v důsledku zvyšujícího se tlaku lidské činnosti (Delibes-Mateos et al., 2011). Ačkoliv považováni za škůdce, představují původní druhy malých savců klíčové druhy v ekologických systémech, což často vytváří konflikt mezi ochranáři a zemědělci, na jejichž ploše se studovaný druh vyskytuje a vzniká tak často potřeba zaštitit ochranu těchto druhů, které lidi často považují za škůdce, pod zákon, a tedy vytváření záchranných programů pro jednotlivé druhy. Za typický příklad takového druhu lze kromě králíka divokého, psouna préríjního, pišťuchy střeozemní považovat i křečka polního (*Cricetus cricetus*), který podobně jak tito ostatní malí savci utrpěl velké úbytky početnosti populací zapříčiněné změnami způsobu hospodaření a odchytém především v západoevropských zemích (Smulders et al., 2003). Ve studii Smulders et al. (2003) bylo dokázáno, že tento pokles v populacích křečka polního způsobil ztrátu veškeré rozmanitosti na studovaném MHC (major histocompatibility complex) a dalších lokusů napříč dánskými populacemi. Díky řadě zjištění vycházejících ze studií jako tato se v současnosti lze setkávat se stále větší potřebou vytvářet pro takto ohrožená zvířata *ex situ* ochranářské programy, ve kterých by však neměly být kříženy poddruhy křečka polního (*Cricetus cricetus*), které v průběhu let vznikly jako důsledek odlišných přírodních podmínek v různých lokalitách výskytu (Smulders et al., 2003). *Ex situ* odchovy druhů jsou v současnosti považovány za důležitý nástroj v programech ochrany druhů a současné strategie těchto chovaných populací dnes vychází z teoretických modelů, které byly testovány na modelových druzích, nebo vyhodnoceny pomocí údajů plemenných knih. Dochází však ke stále většímu zastoupení molekulárně genetických studií, díky kterým bylo možné obecné zjištění, že minimální počet zakladatelů nové populace se pohybuje okolo 15 jedinců a populace v odchovech by měla dosahovat 100 jedinců pro minimalizaci ztráty genetické variability (Witzenberger & Hochkirch, 2011) a tedy získání vhodných jedinců pro reintrodukci na *in situ* lokality konkrétního druhu.

Problematikou ohrožení sysla obecného (*Spermophilus citellus*) v centrální Evropě, a tedy i na území České republiky, se už v minulosti zaobíraly studie Hulová (2005), Hulová & Sedláček (2008), Starcová (2011), Říčanová et al. (2011), Říčanová et al. (2013). V těchto studiích jsou analyzovány populace pokrývající celý dnešní areál rozšíření druhu, a právě díky informacím obsažených v těchto pracích lze porovnávat data přirozených lokalit výskytu s *ex situ* lokalitami a lokalitami, kde už probíhala reintrodukce, které jsou v této bakalářské práci analyzovány a u kterých lze předpokládat zlepšení v populačně genetické struktuře. Provádění navazujících a rozšiřujících studií v následujících letech je zcela nezbytné pro získání informací o dalším vývoji genetické struktury populací sysla obecného, na které má enormní dopad způsob využívání krajiny člověkem, který se neustále zvětšuje a ať už přímo, či nepřímo ohrožuje strukturálně populace a počty kriticky ohroženého sysla obecného. Oproti výše zmíněným pracím, které popisovaly především populace sysla obecného ve volné přírodě, a jejich výsledky popisovaly strukturu a vývoj těchto populací, tato bakalářská práce se zaměřuje na *ex situ* odchovy sysla obecného (Zoo Hluboká nad Vltavou, Zoo Praha, Zoo Brno, ZS Rozovy) a byla zde zmapována variabilita těchto odchovů a možnost využití těchto jedinců pro reintrodukce a podporu přírodních stávajících populací sysla obecného, které jsou v této práci také zahrnuty.

5.1. Genetická variabilita sysla obecného

Při porovnání charakteristik genetické diverzity populací získaných v této práci, zahrnující lokality s managementovými zásahy s těmi popsány v pracích Starcová (2011) a Říčanová et al. (2011) byla pozorována značná změna v charakteristikách podávajících informaci o struktuře populací. Průměrná pozorovaná heterozygotnost H_o pro populace získaná v této práci byla 0,4486 s největší hodnotou 0,642 (*ex situ* odchov Brno 2017) a 0,500 (Písečný vrch), což při porovnání s analyzovanými daty v práci Starcová (2011), která zahrnovala celkem 27 českých přirozených lokalit, kde po odebrání jedné maďarské lokality byla průměrná a nejvyšší hodnota H_o 0,258 a 0,425 (Velké Pavlovice), vypovídá o poměrně velmi zvětšené heterozygotnosti současných populací, ve kterých již probíhala reintrodukce, *ex situ* chovů oproti přirozeným lokalitám v minulosti. Stejný vzrůst heterozygotnosti byl pozorován při porovnání s daty získanými v práci Říčanová et al. (2011), zahrnující i přírodní

populace na území Maďarska a Slovenska, kde průměrná očekávaná heterozygotnost H_e pro české populace byla 0,333, tedy také o něco menší než průměrná očekávaná heterozygotnost získaná v této bakalářské práci, která nabývala hodnoty 0,353 s nejvyšší hodnotou 0,393 u nově lokality Písečný vrch založené z jedinců *ex situ* chovů Zoo Hluboká nad Vltavou, ZS Rozovy a Zoo Brno. Tyto výsledky lze porovnání dat obsažených v této práci s daty popisující lokality přirozeného výskytu jsou zásadním zjištěním a naplnění hlavního cíle této práce informující o výrazném zlepšení genetické struktury v populacích, kde byl již vykonáván management formou reintrodukce geneticky vhodných jedinců z *ex situ* odchovů.

K největšímu rozdílu však docházelo, při porovnání koeficientu inbreedingu F_{IS} . Jeho hodnoty v této práci se od sebe napříč populací příliš nelišily, tedy nabývaly rozmezí -0,667 až 0,024 a jejich průměrná hodnota byla -0,235. To při porovnání s průměrnými hodnotami F_{IS} z ostatních prací 0,051 (Starcová, 2011) a 0,353 pro české populace (Říčanová et al., 2011) značí velký rozdíl v genetické struktuře populací. V studovaných populacích v této práci, které procházejí reintrodukčním managementem již nedochází k inbreedingu na rozdíl od původních přirozených populací, kde je zaznamenán jeho silný vliv. Za příčinu tohoto rapidního vzrůstu lze považovat vzrůstající početnosti populací sysla obecného na jeho lokalitách v ČR napříč lety 2000-2020, čemuž napomáhaly právě reintrodukce *ex situ* jedinců z odchovů Zoo Praha, Zoo Brno, Zoo Hluboká nad Vltavou a ZS Rozovy. V odchovech Zoo Hluboká nad Vltavou, Zoo Brno a ZS Rozovy jsou v současnosti chovány populace sysla obecného založené z jedinců odchycených na území Slovenska. U odchovu Zoo Praha se jedná o potomky syslů odchycených v minulosti na lokalitách v Českém středohoří a také z pražských Letňan, kde se v minulosti vyskytovala početná kolonie sysla obecného. V těchto odchovech pak dochází ke kontrolovanému chovu a zachování co největší možné heterozygotnosti kombinací partnerů z různých populací. Tito jedinci pak po jejich cíleném transportu na lokality volného výskytu sysla obecného mohou kumulativně zvyšovat heterozygotnost a fitness těchto populací. Vyšší hodnoty koeficientu inbreedingu v odkazovaných pracích mohou být také způsobeny vyšší přítomností nulových alel napříč studovanými mikrosatelitovými lokusy, jejichž přítomnost byla častější než v této bakalářské práci, viz příloha č.1.

5.2. Genetická diferenciace mezi populacemi sysla obecného

Jak je již zmíněno výše, populace sysla obecného v České republice jsou svojí geografickou pozicí nejzápadnějším areálem výskytu druhu *Spermophilus citellus* a s rostoucí vzdáleností od centra rozšíření lze tedy očekávat rozdíl mezi populacemi v ČR a populacemi směrem na jihovýchod (Slovensko, Maďarsko, Rumunsko a Bulharsko), ve kterých je značně vyšší genetická variabilita, než u populací v severozápadním areálu rozšíření, která je hlavně dána různou intenzitou genového toku (Říčanová et al., 2013).

V této práci bylo využito fixačního indexu F_{ST} k popsání genetické diferenciace mezi jednotlivými populacemi sysla obecného. Jeho hodnoty vycházely v rozmezí od 0,003 až po nejvyšší párovou hodnotu 0,589. Průměrná hodnota tohoto fixačního indexu F_{ST} pro všechny populace dosahovala hodnoty 0,341 a mezi většinou populací byla získána hodnota velmi silné genetické diferenciace (viz příloha č. 2). Stejně tak tomu bylo i v práci Starcová (2011), ve které bylo zaznamenáno rozmezí hodnoty od 0,013 do 0,813 a průměrná hodnota tohoto indexu pouze pro české vzorky zde byla 0,435, což také vypovídá o velmi silné genetické diferenciaci mezi jednotlivými českými populacemi sysla podobně jako v práci Říčanová et al. (2011). Rozdíl výsledků jednotlivých prací lze předpokládat kvůli rozdílnému množství zkoumaných a popisovaných populací sysla obecného, co však lze pro tyto hodnoty považovat za společné, jsou jejich vysoké hodnoty blíže spíše 1, což svědčí o izolovanosti jednotlivých populací a absenci migrace jedinců mezi jednotlivými populacemi. To je opět způsobeno vysokou fragmentizací ekosystémů pro sysla vhodných, budováním antropogenních bariér, a tedy omezení genového toku mezi populacemi samotnými. Ačkoliv je v této studii zaznamenáno zjevné zlepšení vnitropopulační genetické struktury setrvává dodnes u populací jejich velmi vysoká míra diferenciace a izolovanost. Udržování genetické variace, a tedy zamezení inbrední deprese v současných populacích závisí na rovnováze mezi genetickým driftem a tokem genů, jež oba formují genetickou strukturu populace. Význam genetického driftu do značné míry závisí na efektivní velikosti populace, tok genů bývá však ovlivněn schopností šíření jedinců druhu a stupněm izolace mezi populacemi. Jedinci druhu *Spermophilus citellus* nejsou schopni překonávat tak velké vzdálenosti jaké jsou mezi jednotlivými lokalitami jejich areálů rozšíření a je zde zcela znemožněno obnovení metapopulační struktury populací,

u které můžeme předpokládat velmi vysokou pravděpodobnost umožnění dlouhodobé životaschopnosti pro sýslí populace (Ćosić et al., 2013). Kromě fixačního indexu F_{ST} poukazovala na výskyt genetické diferenciacce mezi populacemi sýsla i hierarchická Bayesiánská klastrová analýza.

5.3. Navrhovaná opatření na ochranu studovaného druhu

Ačkoliv při porovnávání výročních zpráv AOPK týkajících se záchranného programu sýsla obecného lze pozorovat vzrůst početnosti v populacích sýsla obecného na území České republiky a zlepšení jejich genetické struktury, jsou tyto populace stále považovány za izolované a neschopné dlouhodobé existence bez ochrannářských zásahů člověka. Co se týče aktivní ochrany sýsla obecného (*Spermophilus citellus*), je tento druh považován za jeden nejběžnějších předmětů translokačních a reintrodukčních programů, které bývají většinou úspěšné (Matějů et al., 2010). Za účelem zachování tohoto druhu je nezbytné znát jeho habitatové preference, nelze tedy jedince sýsla obecného reintrodukovat na travnaté plochy, které jsou vlhké, či s vysokým travním porostem. Důležitým faktorem při hledání potenciálně vhodných stanovišť je zejména půdní složení a struktura lokality, tedy hloubka půdy a procentuální zastoupení písčové, bahenní a jílové frakce půdy. Pro sýsla obecného je neoptimálnější hloubka půdy nejméně 50 cm, kde tvoří šterková frakce méně než 2 %, podíl písku tvoří kolem 60 %, podíl bahna kolem 30 % a podíl jílové frakce je menší než 7 % (Kenyeres et al., 2018). Tyto parametry určují nejen možnosti rekolonizace sýsla obecného, ale také výskyt populací na malých ploškách v rozlehlém homogenním habitatu, kde by byly tyto plošky, a tedy i nory sýslů propojené navzájem koridory umožňující migraci a metapopulační stav populace. Vhodné půdní podmínky nejsou jediné, co je potřeba pro zachování robustní a dlouhodobé populace. Sýsel obecný netoleruje hodně keřového porostu, a také vysoký travní porost, který znemožňuje vizuální komunikaci mezi jedinci a zejména pak zpozorování blízkého se nebezpečí v podobě predátora, například jezevce lesního (*Meles meles*), lišky obecné (*Vulpes vulpes*) a v blízkosti lidských obydlí a farem mohou být významným predátorem i kočky domácí (*Felis catus*) (Lobová & Halp, 2014). Na výše zmíněných lokalitách je tedy třeba udržovat extenzivní systém redukce vysokých travních porostů a bezlesí ať už způsobem kosení alespoň dvakrát ročně, který může být vhodným managementem i pro ostatní chráněné druhy, zejména hmyz a vyšší rostliny, a nebo extenzivní pastvou dobytka (ovce,

kozy, skot) vyvíjející na rostliny selekční tlak pastvou. Za nejlepší poměr zastoupení těchto spásačů lze považovat 0,1-0,2 jednotky dobytka na jeden hektar plochy (Kenyeres et al., 2018). Tento management je potřeba realizovat ještě před samotnou reintrodukcí sysla obecného na vhodná stanoviště.

Kromě výše zmíněných managementových opatření je vyloženě nezbytné, aby v následujících letech stále probíhal podrobný monitoring stávajících přírodních i *ex situ* chovaných populací, který umožní získání cenných informací, použitelných pro realizaci dalších ochranných opatření, která budou nejlépe odpovídat aktuální situaci lokalit výskytu sysla obecného. Syslí populace ale mohou ohrožovat i zcela náhodné vlivy prostředí v podobě přívalových dešťů, nebo rapidního tání ledu (Matějů et al., 2008). Dochází pak k zaplavování nor syslů a k hromadným úhynům v syslích populacích. V období, kdy mohou tyto přírodní faktory zásadně ovlivňovat početnost populací, by bylo vhodné menší a méně stabilnější populace dodatečně přikrmovat, čímž by mělo dojít k poklesu mortality v tomto nepříznivém ročním období. Dodatečným, ale neméně důležitým opatřením pro ochranu sysla obecného je možné považovat vzdělávací a osvětovou činnost cílenou na obyvatele České republiky informující o důležitosti tohoto malého a na první pohled nevýznamného hlodavce o jeho zcela podstatné a důležité roli v ekosystému české krajiny. S tím souvisí i cíleně informovat obyvatele lokalit, v jejichž blízkosti se populace sysla obecného vyskytují (Radouč a ostatní lokality výskytu sysla, blízké lidskému osídlení), o problematickém chování, které může negativně ovlivňovat syslí populace, jako například považování syslů obecných spíše za městskou atrakci než za divoké chráněné zvíře. Jejich dodatečným, často nevhodným přikrmováním návštěvníky lokalit se sice zvětšuje početnost těchto populací, která se však projeví nedostatkem volné plochy pro tyto hlodavce a absencí dalšího zdroje v podobě přístupné přirozené potravy. Společně s hlazením tedy dochází k jistému prohlubování pozitivního vztahu k člověku a tím pádem nebezpečnost k potenciálnímu nebezpečí, které v těchto oblastech představují kočky domácí, často chované jako domácí mazlíčci s možností volného pohybu i na územích, která jsou kvůli výskytu sysla obecného vedena jako chráněná, ale také i přítomnost psů, kteří mohou ničit nory syslů. Další snahou pro zlepšení situace týkající se sysla obecného by měla být snaha nechovat v zoologických zahradách pouze exotická zvířata, ale i naše regionální ohrožená zvířata, na která se často

zapomíná. Sysel obecný je pak takto často přehlíženým druhem, který ačkoliv je kriticky ohrožený, tak není zastoupen ve většině zoologických zahrad České republiky.

6. Závěr

Populace sysla obecného v České republice, u kterých byla v této práci provedena analýza jejich genetické variability za použití 12 mikrosatelitových lokusů, se jeví svojí vnitřní genetickou strukturou jako geneticky různorodé. Tyto *ex situ* odchované populace a populace, které již jsou *ex situ* jedinci posilovány vykazují zlepšení v genetické struktuře oproti ohroženým přirozeným lokalitám v minulosti. Za nejvýznamnější výsledky jsou v této práci považovány vysoké hodnoty pozorovaných heterozygotností, které dosahovaly největších hodnot $H_o = 0,642$ u *ex situ* odchovu v Zoo Brno a 0,500 u nově založené přírodní lokality Písečný vrch. Hodnoty koeficientu inbreedingu byly ve všech populacích v záporných hodnotách s nejnižší hodnotou (F_{IS}) -0,344 v odchovu Zoo Hluboká z roku 2016. Poměrně vysoká genetická variabilita a nepřítomnost inbreedingu jak v dnešních posilovaných přírodních populacích, tak ve všech populacích *ex situ* odchovu dokazuje zlepšení genetické struktury přírodních lokalit, na kterých proběhla reintrodukce a i to, že jedinci chovaní v *ex situ* odchovech jsou zcela vhodní pro reintrodukci na *in situ* lokality výskytu sysla obecného (*Spermophilus citellus*) ať už za účelem posílení, nebo nového založení syslích lokalit. Získaná velmi vysoká míra diferenciace a izolovanosti mezi jednotlivými lokalitami výskytu sysla obecného (vysoké hodnoty indexu F_{ST}) stále představuje překážku k vytvoření zcela stabilních přírodních populací v lokalitách, mezi kterými jsou moc velké vzdálenosti, které jedinci sysla obecného nedokážou kvůli své omezené migrační schopnosti překonat. Tyto izolované populace pak mohou být častěji ovlivněny inbrední depresí, která může mít negativní dopad na další vývoj populace, zejména snížení jejich početností.

Navrhovaná ochranná opatření v této práci kladou důraz zejména na popis charakteristik (složení půdy) možných lokalit nového výskytu sysla obecného, na kterých by byla možná reintrodukce *ex situ* chovaných jedinců, což by postupným vývojem mohlo obnovit propojenost dnes izolovaných syslích populací migračními koridory. Navrhovaný stálý management možných nových míst pro reintrodukci, podrobné monitorování vývoje současných populací a cílená osvěta týkající se vztahu *Spermophilus citellus*-člověk, jsou v této práci také považována za velmi důležitá ochranná opatření zvyšující životaschopnost ať již současných, nebo budoucích populací sysla obecného.

V budoucnu je určitě třeba provedení dalších studií většího počtu populací sysla, než je zkoumáno v této bakalářské práci, ideálně zahrnující všechny možné lokality výskytu sysla obecného na území České republiky.

7. Seznam použité literatury

- Anděra, M., Hanzal, V. (1995). Projekt "Sysel". Podúkol A: mapování výskytu sysla obecného (*Spermophilus citellus*) na území České republiky. Zpráva o řešení I. a II. Etapy, 1994–1995, 41pp. (nepubl.).
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme, F. (1996-2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bonferroni, C. E. (1936). Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità, Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze.
- Ćosić, N., Řičanová, Š., Bryja, J., Penezić, A., & Ćirović, D. (2013). Do rivers and human-induced habitat fragmentation affect genetic diversity and population structure of the European ground squirrel at the edge of its Pannonian range? *Conservation Genetics*, 14, 345–354.
- Delibes-Mateos, M., Smith, A. T., Slobodchikoff, C. N., & Swenson, J. E. (2011). The paradox of keystone species persecuted as pests: A call for the conservation of abundant small mammals in their native range. *Biological Conservation*, 144, 1335–1346.
- Dempster, A.P., Laird, N. M., Rubin, D. B. (1977). *Maximum Likelihood from Incomplete Data via the EM Algorithm*. *J Roy. Stat. Soc. B*, 39, 1–38.
- Gondek, A., Verduijn, M., & Wolff, K. (2006). Polymorphic microsatellite markers for endangered spotted suslik, *Spermophilus suslicus*. *Molecular Ecology Notes*, 6, 359–361.
- Grulich, I. (1960). Sysel obecný *Citellus citellus* L. v ĀSSR. Práce Brněnské základny ĀSAV, 32, 473–563.

- Hanslik, S., Kruckenhauser, L. (2000). Microsatellite loci for two European sciurid species (*Marmota marmota*, *Spermophilus citellus*). *Molecular Ecology*, *9*, 2163–2165.
- Helgen, K. M., Cole, F. R., Helgen, L. E., & Wilson, D. E. (2009). Generic revision in the holarctic ground squirrel genus *spermophilus*. *Journal of Mammalogy*, *90*, 270–305.
- Henshaw, M. T. (2000). Microsatellite loci for the social wasp *Polistes dominulus* and their application in other polistine wasps. *Molecular Ecology*, *9*, 2155–2157.
- Homyack, J. A. (2010). Evaluating habitat quality of vertebrates using conservation physiology tools. 332–342.
- Hulová, Š., Sedláček, F. (2008). Population genetic structure of the European ground squirrel in the Czech Republic. *Conservation Genetics*, *9*, 615–625.
- Chapuis, M. P., Estoup, A. (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.*, *24*, 621–631.
- Johnstone, C. P., Lill, A., & Reina, R. D. (2014). Habitat loss, fragmentation and degradation effects on small mammals: Analysis with conditional inference tree statistical modelling. *Biological Conservation*, *176*, 80–98.
- Kenyeres, Z., Bauer, N., Nagy, L., & Szabó, S. (2018). Enhancement of a declining European ground squirrel (*Spermophilus citellus*) population with habitat restoration. *Journal for Nature Conservation*, *45*, 98–106.
- Koshev, Y. S. (2008). Distribution and status of the European Ground Squirrel (*Spermophilus citellus*) in Bulgaria. *Lynx (Praha)*, *n. s.*, *39*, 251–261.
- Kryštufek, B., Vohralík, V. (2012). Taxonomic revision of the Palaearctic rodents (*Rodentia*). *Sciuridae: Xerinae 1 (Eutamias and Spermophilus)*. *Lynx (Praha)*, *n.s.*, *42*, 17–108.

- Lobbová, D., Hapl, E. (2014). Conservation of European ground squirrel (*Mammalia: Rodentia*) in Slovakia: Results of current reintroduction programme. *Slovak Raptor Journal*, 8, 105–112.
- Marwal, A., Gaur, R. K. (2020). Molecular markers: tool for genetic analysis. In *Animal Biotechnology*. INC
- Matějů, J., Řičanová, Š., Ambros, M., Kala, B., Hapl, E., & Matějů, K. (2010). Reintroductions of the European Ground Squirrel (*Spermophilus citellus*) in Central Europe (*Rodentia: Sciuridae*). *Lynx, n.s. (Praha)*, 41, 175–191.
- Matějů, J., Uhlíková, J., & Nová, P. (2008). Záchranný program sysla obecného v České republice. In *Výskum a ochrana cicavcov na Slovensku VIII. Zborník referátov z konferencie (Zvolen 12.–13. 10. 2007)*.
- May, B., Gavin, T. A., Sherman, P. W., Korves, T. M. (1997). Characterization of microsatellite loci in the Northern Idaho ground squirrel *Spermophilus brunneus brunneus*. *Mol. Ecol.*, 6, 399–400.
- Novak, R.M. (1999). Walker's Mammals of the World (Volume II), šesté vydání, The John Hopkins University Press.
- Paetkau, D., Strobeck, C. (1994). Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology*, 3, 489–495.
- Peakall, R., Smouse, P. E. (2012). GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multicolour genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Řičanová, Š., Bryja, J., Cosson, J. F., Gedeon, C., Choleva, L., Ambros, M., & Sedláček, F. (2011). Depleted genetic variation of the European ground squirrel in Central Europe in both microsatellites and the major histocompatibility complex gene: Implications for conservation. *Conservation Genetics*, 12, 1115–1129.

- Řičanová, Š., Koshev, Y., Řičan, O., Čosić, N., Čirović, D., Sedláček, F., & Bryja, J. (2013). Multilocus phylogeography of the European ground squirrel: Cryptic interglacial refugia of continental climate in Europe. *Molecular Ecology*, *22*, 4256–4269.
- Smulders, M. J. M., Snoek, L. B., Booy, G., & Vosman, B. (2003). Complete loss of MHC genetic diversity in the Common Hamster (*Cricetus cricetus*) population in The Netherlands. Consequences for conservation strategies. *Conservation Genetics*, *4*, 441–451.
- Starcová, M. (2011). Genetická variabilita sysla obecného (*Spermophilus citellus*) v České republice Genetic variability in the European ground squirrel (*Spermophilus citellus*) in Czech Republic. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta. Diplomová práce. 60 pp.
- Witzenberger, K. A., & Hochkirch, A. (2011). Ex situ conservation genetics: a review of molecular studies on the genetic consequences of captive breeding programmes for endangered animal species. *Biodivers Conserv*, *20*, 1843–1861.

Internetové zdroje

www.zachranneprogramy.cz 9. 2. 2021

www.zootierliste.de 11. 3. 2021

8. Seznam příloh

Příloha č. 1: Odhadované frekvence nulových alel napříč lokusy pro populace sysla obecného (*Spermophilus citellus*) na území ČR.

Příloha č. 2: Odhadované frekvence nulových alel napříč lokusy pro populace sysla obecného (*Spermophilus citellus*) podle místa odběru vzorků na území ČR.

Příloha č. 3: Párové hodnoty fixačního indexu F_{ST} podle jednotlivých populací *Spermophilus citellus* na území ČR.

9. Přílohy

Příloha č. 1: Odhadované frekvence nulových alel napříč lokusy pro populace sysla obecného (*Spermophilus citellus*) na území ČR.

	ST10	Ssu5	Ssu15	Ssu16	IGS-1	IGS-110b	Ssu7	Ssu1	MS45	MS56	MS41	Ssu8
Hl18	0,138	0,048	0,000	0,000	0,001	0,050	0,004	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000
Hl17	0,000	0,111	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Hl16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001	0,000
Hod	0,001	0,001	0,153	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,153	0,055	0,000	0,000
PV18	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001
PV19	0,001	0,000	0,205	0,000	0,055	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001
Roz18	0,000	0,001	0,037	0,000	0,034	0,000	0,000	0,000	0,045	0,010	0,001	0,000
Roz17	0,000	0,000	0,000	0,000	0,126	0,000	0,000	0,000	0,000	0,034	0,001	0,000
KV18	0,000	0,000	0,028	0,000	0,042	0,000	0,000	0,110	0,000	0,000	0,001	0,000
KV19	0,000	0,001	0,030	0,000	0,042	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000
B17	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
B18	0,000	0,000	0,000	0,000	0,025	0,000	0,000	0,000	0,048	0,000	0,000	0,000
P18	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,030	0,000
P17	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,172	0,000	0,000	0,001	0,000
Rad	0,001	0,000	0,111	0,055	0,001	0,055	0,000	0,000	0,102	0,178	0,098	0,000

Hl18: Hluboká 2018, Hl17: Hluboká 2017, Hl16: Hluboká 2016, Hod: Hodkovice nad Mohelkou 2019, PV18: Písečný vrch 2018, PV19: Písečný vrch 2019, Roz18: Rozovy 2018, KV18: Karlovy Vary 2018, KV19: Karlovy Vary 2019, B17: Brno 2017, B18: Brno 2018, P18: Praha 2018, P17: Praha 2017, Roz17: Rozovy 2017, Rad: Radouč 2019. Žlutě zvýrazněné hodnoty jsou považovány za nulové alely.

Příloha č. 2: Odhadované frekvence nulových alel napříč lokusy pro populace sysla obecného (*Spermophilus citellus*) podle místa odběru vzorků na území ČR.

	ST10	Ssu5	Ssu15	Ssu16	IGS-1	IGS-110b	Ssu7	Ssu1	MS45	MS56	MS41	Ssu8
Hl	0,000	0,056	0,033	0,000	0,001	0,015	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Hod	0,001	0,001	0,153	0,001	0,001	0,000	0,000	0,000	0,153	0,001	0,000	0,000
PV	0,001	0,000	0,144	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,049	0,048	0,000	0,001
Roz	0,000	0,000	0,020	0,000	0,122	0,000	0,000	0,000	0,066	0,000	0,001	0,000
KV	0,000	0,000	0,029	0,000	0,042	0,000	0,000	0,102	0,000	0,001	0,001	0,000
B	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
P	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,321	0,019	0,000	0,119	0,000
Rad	0,001	0,000	0,111	0,055	0,001	0,055	0,000	0,000	0,001	0,178	0,098	0,000

Hl: Hluboká, Hod: Hodkovice nad Mohelkou, PV: Písečný vrch, Roz: Rozovy, KV: Karlovy Vary, B: Brno, P: Praha, Rad: Radouč. Žlutě zvýrazněné hodnoty jsou považovány za nulové alely.

Příloha č. 3: Párové hodnoty fixačního indexu F_{ST} podle jednotlivých populací *Spermophilus citellus* na území ČR.

	Hl18	Hl17	Hl16	Hod	PV18	PV19	Roz18	Roz17	KV18	KV19	B17	B18	P18	P17	Rad
Hl18	0,000														
Hl17	0,054	0,000													
Hl16	0,064	0,051	0,000												
Hod	0,250	0,171	0,325	0,000											
PV18	0,426	0,418	0,480	0,494	0,000										
PV19	0,400	0,375	0,403	0,377	0,045	0,000									
Roz18	0,423	0,397	0,418	0,425	0,102	0,102	0,000								
Roz17	0,341	0,318	0,317	0,366	0,207	0,165	0,143	0,000							
KV18	0,195	0,129	0,159	0,215	0,330	0,281	0,347	0,255	0,000						
KV19	0,226	0,119	0,168	0,280	0,424	0,345	0,379	0,269	0,003*	0,000					
B17	0,297	0,243	0,280	0,194	0,292	0,210	0,323	0,226	0,198	0,212	0,000				
B18	0,308	0,257	0,292	0,180	0,349	0,264	0,357	0,236	0,219	0,243	0,003*	0,000			
P18	0,435	0,370	0,470	0,224	0,537	0,451	0,483	0,374	0,319	0,389	0,236	0,214	0,000		
P17	0,341	0,257	0,318	0,306	0,427	0,341	0,396	0,258	0,075	0,127	0,217	0,209	0,309	0,000	
Rad	0,494	0,449	0,521	0,332	0,589	0,493	0,510	0,417	0,442	0,515	0,287	0,237	0,224	0,454	0,000

Hl18: Hluboká 2018, Hl17: Hluboká 2017, Hl16: Hluboká 2016, Hod: Hodkovice nad Mohelkou 2019, PV18: Písečný vrch 2018, PV19: Písečný vrch 2019, Roz18: Rozovy 2018, KV18: Karlovy Vary 2018, KV19: Karlovy Vary 2019, B17: Brno 2017, B18: Brno 2018, P18: Praha 2018, P17: Praha 2017, Roz17: Rozovy 2017, Rad: Radouč 2019.

Rozsahy hodnot fixačního indexu F_{ST} : $0,00 < F_{ST} < 0,05$... malá genetická diferenciace (modře), $0,05 < F_{ST} < 0,15$... střední genetická diferenciace (zeleně), $0,15 < F_{ST} < 0,25$... silná genetická diferenciace (žlutě), $F_{ST} > 0,25$... velmi silná genetická diferenciace (červeně).

(*): označení pro statisticky významné hodnoty ($P < 0,05$).