

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2011

Tereza STIBŮRKOVÁ

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE
FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ
Katedra ekologie

**GENETICKÁ DIVERZITA OHROŽENÝCH
DRUHŮ ŽIVOČICHŮ**

Bakalářská práce

Bakalant: **Tereza STIBŮRKOVÁ**
Vedoucí: **Ing. Jana SVOBODOVÁ, Ph.D.**

2011

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jany Svobodové, Ph.D. a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze 27.4.2011

.....

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala Ing. Janě Svobodové, Ph.D. za čas, který věnovala mému zasvěcení do tajů ochránářské genetiky, a posléze za odbornou pomoc při vedení mé práce a množství cenných rad a konzultací, které mi poskytla. Děkuji také celé své rodině za veškerou podporu v průběhu mého studia.

V Praze 27.4.2011

.....

Abstrakt

Genetická diverzita ohrožených druhů živočichů je výrazně ovlivňována lidskou činností. V důsledku výrazných krajinných změn jako je fragmentace prostředí či ničení biotopů dochází k narušení přirozených mechanismů v populacích volně žijících živočichů. Populace se stávají malými a izolovanými, nedochází k toků genů ani přirozené migraci. Dochází k redukci početnosti populací a s ní také k omezení genetické variability, schopnosti adaptace a reprodukční zdatnosti. Po opětovném zvětšení populace zůstává genetická diverzita obvykle oslabena a jen zřídka dochází k jejímu obnovení a potlačení vlivu inbreedingu. Aby bylo možné stanovit vhodný management ochrany ohrožených druhů, je třeba zjistit genetickou strukturu populace a také její historický vývoj. V této práci jsou proto shrnuty postupy, kterými lze detekovat redukci početnosti populace, a zároveň je porovnána vhodnost jejich užití.

Klíčová slova: efekt hrdla lahve, metody detekce bottlenecku, efekt zakladatele, genetický polymorfismus

Abstract

Genetic diversity of endangered species is strongly influenced by human activities. The natural mechanisms in populations of wild animals are disrupted as a result of significant landscape changes, such as habitat fragmentation or destruction of biotops. The populations become small and isolated, there is no gene flow or natural migration. Population sizes are reduced and also genetic variability, the ability to adapt and reproductive fitness are restricted. When population increase again, genetic diversity generally remains weak and rarely leads to its recovery and suppression of inbreeding effect. In order to establish the appropriate management of conservation of endangered species, it is necessary to determine the population genetic structure and its historical evolution. Therefore, this work summarizes the procedures which can detect a reduction in population size, and compared their suitability of use.

Key words: bottleneck effect, methods of bottleneck detection, founder effect, genetic diversity

Obsah

| | |
|--|----|
| Prohlášení..... | 2 |
| Poděkování..... | 3 |
| Abstrakt..... | 4 |
| Klíčová slova..... | 4 |
| Obsah..... | 5 |
| | |
| 1. Úvod..... | 6 |
| 2. Genetická diverzita..... | 8 |
| 2.1 Co ovlivňuje genetický polymorfismus..... | 9 |
| 2.2 Význam genetického polymorfismu..... | 11 |
| 3. Studium genetické struktury populací..... | 13 |
| 3.1 Molekulární markery..... | 14 |
| 4. Genetická diverzita ohrožených druhů živočichů..... | 17 |
| 5. Bottleneck efekt..... | 18 |
| 5.1 Detekce bottlenecku..... | 19 |
| 5.1.1 Mutační modely..... | 19 |
| 5.1.2 Metody detekce..... | 20 |
| 5.2 Srovnání a zhodnocení jednotlivých metod..... | 23 |
| 6. Návrh řešení diplomové práce..... | 25 |
| 7. Diskuze a závěr..... | 26 |
| | |
| Přehled literatury a použitých zdrojů..... | 29 |
| Příloha č. 1..... | 35 |

1. Úvod

Vznik a zánik druhů, stejně jako redukce a opětovný nárůst velikosti jejich populací (a s tím spojený bottleneck efekt), je v evoluci života procesem naprosto přirozeným a nevyhnutelným (Mayr 2001). V historii Země došlo k minimálně pěti hromadným vymíráním, kdy se celková biodiverzita snížila o velký počet druhů a u mnoha dalších došlo během těchto událostí k dočasnému, ale výraznému snížení počtu jedinců. Kolísání početnosti populací, ať již z důvodu klimatických změn, střídání dob ledových a meziledových či v důsledku přírodních katastrof, je přirozeným jevem provázejícím vývoj druhů (Flegr 2005).

V současné době je ale často existence mnoha živočišných druhů ohrožena činností člověka. V důsledku procesů jako je zemědělství či urbanizace dochází v dnešní krajině k výrazným a velice rychlým změnám (Frankham et al. 2002). Fragmentace prostředí, destrukce původních biotopů, znečištění vodních i suchozemských lokalit, introdukce nepůvodních druhů a také přímý lov vedly nejen ke snížení početnosti mnoha druhů, ale také k redukci genetické diverzity jejich populací (Hayano et al. 2004, Hájková et al. 2007). U řady druhů dochází v důsledku těchto změn ke vzniku fragmentovaných či úplně izolovaných populací (Hůlová et Sedláček 2007) a jelikož takové populace nejsou odolné vůči disturbancím a díky negativním účinkům inbreedingu nejsou schopné se změnám prostředí přizpůsobovat (Höglund 2009), ocitá se mnoho druhů na pokraji vyhynutí a některé druhy již dokonce vyhynuly úplně či přežívají pouze v zoologických zahradách (Luo et al. 2008, Acevedo et Cassinello 2009).

Přestože se početnost některých druhů v posledních letech opět zvýšila (Šťastný et al. 2006), vlivem bottleneck efektu jejich populace vykazují stále nižší genetickou diverzitu oproti populacím původním (Nyström et al. 2006, Procházka et al. 2008). V důsledku redukce genetické variability jsou pak populace i přes nárůst velikosti náchylné k vymírání při sebemenších změnách prostředí (Höglund 2009). Proto je detekce projevů bottlenecku v genetické struktuře volně žijících živočichů velmi podstatná pro zachování druhu. Ke studiu bottleneck efektu se v současné době používají metody molekulární genetiky.

Pomocí různých statistických analýz a simulací je poté z vzorků (molekulárních

markrů) současné populace možné určit, zda v populaci v minulosti došlo či nedošlo k redukci ve velikosti (Cornuet et Luikart 1996, Luikart et al. 1998, Beaumont 1999). Nicméně Larsson et al. (2008) zjistili, že vývoj početnosti populace nelze přesně určit pouze na základě vzorků současné populace a pro detekci bottleneck efektu je tedy nutné použít data získaná z historických vzorků.

Cílem mé bakalářské práce je proto shrnout poznatky studií využívajících molekulárně-genetické metody v ochraně živočichů. Dále práce podává přehled o genetické diverzitě ohrožených druhů živočichů (zejména savců a ptáků) a také o tom, jakým způsobem se v populacích hodnotí bottleneck efekt. Práce se také zabývá shrnutím metodických přístupů používaných pro hodnocení bottleneck efektu, jejich srovnáním a zhodnocením úspěšnosti. Součástí je také návrh řešení mé diplomové práce, ve které se budu zabývat vývojem početnosti populace koroptve polní (*Perdix perdix*) na území ČR a která bude řešena na katedře ekologie, pod vedením Ing. Jany Svobodové, Ph.D.

2. Genetická diverzita

Biologická diverzita všech organismů na Zemi je posuzována ze tří hledisek. Prvním je rozmanitost společenstev a ekosystémů v krajině, která zkoumá soubor typů stanovišť a ekosystémových procesů v dané oblasti. Druhým diverzita druhová zabývající se rozmanitostí a rozsahem druhů v daném ekosystému (Primack 2001). A nakonec genetická variabilita jako nejjemněji chápaná, a neméně podstatná, složka biologické rozmanitosti. Ta je základem pro výše zmíněné kategorie a vymezuje diverzitu v rámci jednotlivých druhů, jak mezi geograficky oddělenými populacemi, tak mezi jedinci jedné populace (Frankham et al. 2002).

Působením různých mechanismů (viz níže) se jedinci v populaci navzájem geneticky liší – jejich geny (tj. sekvence nukleotidů na chromozomech kódující specifické proteiny) jsou odlišné. Různé formy genu se nazývají alely a ty mohou rozdílně ovlivňovat vývoj a fyziologii organismu. Soubor všech genů a alel v populaci tvoří genofond, zatímco určitá kombinace alel je jeho genotypem (Hedrick 2005). Genetická diverzita je představována mírně odlišnými sekvencemi. Podle pořadí můžou různé sekvence DNA vyústit v různé aminokyseliny v bílkovině kódované daným lokusem. Tyto změny ve struktuře bílkovin ve spojitosti s vlivem prostředí způsobují morfologické, fyziologické a biochemické odlišnosti (fenotypový projev, Frankham et al. 2002). Fenotyp je tedy projevem genotypu jedince v určitém prostředí. Odraz genetické diverzity lze pozorovat v odlišnostech na různé úrovni, např.: pořadí nukleotidů a aminokyselin kódovaných DNA, velikost a tvar těla, barva očí, peří či srsti, ale také chování, schopnost reprodukce a zdatnost (fitness).

Genetická variabilita populace je dána jak počtem polymorfních genů (tj. genů, které mají více než jednu alelu v genomu), tak počtem alel každého polymorfního genu (Hedrick 2005). Polymorfní geny umožňují jedincům v populaci být heterozygotními pro daný gen, tj. obdržet od každého z rodičů jinou alelu tohoto genu (Frankham et al. 2002). Při hodnocení genetické variability v populacích se tedy zaměřujeme na odhad podílu polymorfních lokusů v dané populaci a podílu heterozygotních lokusů u typického jedince z dané populace (Relichová 2001). Genetický polymorfismus je definován jako dlouhodobý výskyt dvou nebo více alel v populaci v takových frekvencích, které nemohou být vysvětleny opakovaným vznikem mutace (King et al. 1996). Umožňuje populacím, aby se adaptovaly na měnící se životní prostředí. V

nových podmínkách pak mohou mít právě jedinci s určitými alelami nebo jejich kombinacemi vlastnosti potřebné pro přežití nebo reprodukci (Primack 2001, Frankham et al. 2002).

2.1 Co ovlivňuje genetický polymorfismus

Ke snížení nebo zvýšení frekvence alel v populaci může docházet vlivem přírodního výběru (**selekce**). Pokud přítomnost určité alely svého nositele zvýhodňuje oproti jedincům bez této alely, bude frekvence této alely v následujících generacích postupně stoupat (Flegr 2005). Nevýhodné alely naopak postupně ubývají, protože své nositele znevýhodňují (tzv. negativní selekce, eliminace; Mayr 2001).

Frekvence alel se v populaci náhodně mění z jedné generace na druhou podle toho, kteří jedinci se účastnili páření (Primack 2001). Tento jev se nazývá **genetický drift**. K působení genetického driftu dochází neustále v každé populaci. V malých, početně fluktuujících nebo fragmentovaných populacích jsou ale účinky driftu výrazně posíleny (Flegr 2005). Alely, které se v populaci vyskytují s nízkou frekvencí, tak mají vysokou pravděpodobnost, že se v některé generaci náhodně ztratí (Mayr 2001). Naopak může docházet také k fixaci alel nesoucích nevýhodné vlastnosti.

Pokud ovšem mezi jednotlivými oddělenými populacemi dochází k určitému **toku genů**, který je zajištěn **migrací** jedinců, je účinnost působení genetického driftu velice omezena (Flegr 2005). Při migraci dochází k přemísťování jedinců z jedné populace do druhé a k jejich vzájemnému křížení. Dokonce i slabý tok genů mezi populacemi minimalizuje ztráty genetického polymorfismu. Bez ohledu na velikost populace stačí k omezení fixace nových mutací genetickým driftem jediný nově přichozí jedinec na generaci (Frankham et al. 2002).

Také pravidelné **mutace** v rámci populací zvyšují genetickou variabilitu a vyvažují tak působení genetického driftu (Primack 2001). Během mutace dochází k náhlým změnám ve struktuře genetického materiálu, tedy ke změnám genových (a alelových) četností (Frankham et al. 2002). Mutace jsou jediným zdrojem nových genetických variant v populaci, ale dochází k nim v poměrně malé míře a genetickou

strukturu proto ovlivňují jen velmi pozvolna (Relichová 2001).

Častějším důvodem snížení genetické diverzity, než je rozpad populace na řadu menších izolovaných populací, je kombinace genetického driftu s celkovou redukcí počtu jedinců v populaci (Flegr 2007). Takové populace jsou pak náchylnější k letálním genetickým projevům, jako jsou inbrední deprese, outbrední deprese a ztráta evoluční pružnosti. Tyto jevy mohou přispět k dalšímu poklesu velikosti populace a ke zvýšení pravděpodobnosti vyhynutí (Thornhill in Primack 2001).

K **inbrední depresi** dochází vlivem příbuzenského křížení. Ve většině přirozených populací existují různé mechanismy, které takovému křížení brání, je-li však populace obzvláště malá a výběr partnera není náhodný, pak tyto mechanismy selhávají. Vlivem inbrídinku dochází ke snížení heterozygotnosti a tím pádem zvýšení homozygotnosti, ale také k expresi škodlivých alel zděděných po obou rodičích (Höglund 2009). K **outbrední depresi** potom dochází křížením jedinců z geograficky oddělených a geneticky odlišných populací. Takto vzniklí potomci mohou být slabší či neplodní v důsledku neslučitelnosti chromozomů zděděných po jejich rodičích. Mohou také postrádat speciální kombinaci genů umožňující přežití v rámci určitých lokálních podmínek (Primack 2001).

Dalšími jevy, při kterých je výrazně snížena genetická variabilita populace díky účinkům genetického driftu, jsou **efekt hrdla lahve** (bottleneck effect) a **efekt zakladatele** (founder effect). Při bottleneck efektu dochází k přechodnému, často velmi drastickému, poklesu velikosti populace, který je po zlepšení podmínek následován opětovným nárůstem počtu jedinců na původní nebo ještě vyšší hodnotu (Flegr 2005). Bottleneck efekt se projevuje prudkým posílením významu genetického driftu (Höglund 2009). Všechny existující genetické možnosti se do malého množství potomstva nevejdou a v populaci tak dochází ke ztrátě vzácných alel. Když se velikost populace časem opět obnoví, ztracené alely zůstávají ztraceny, a genetická variabilita je tak trvale snížena (Frankham et al. 2002). Vlivem bottleneck efektu může dojít k fixaci alel nevýhodných znaků, které by se jinak v populaci prosadily jen těžko (Primack 2001, více viz v kapitole 7.).

Efekt zakladatele (founder effect) se projevuje při kolonizaci nového území, kdy několik jedinců (v krajním případě jediný pár či oplodněná samice) opustí původní

velkou populaci a založí populaci novou (Primack 2001, Frankham et al. 2002). Tito zakladatelé mohou svým potomkům předat pouze omezenou část genetické variability, která byla přítomna v původní populaci (Wayne et al. 1991, Biebach et al. 2009). Efekt obou těchto jevů na genetickou variabilitu je stejný, proto je v textu dále nebudu rozlišovat.

2.2 Význam genetického polymorfismu

Genetická diverzita populací je zapotřebí pro schopnost druhu přizpůsobit se měnícím se podmínkám životního prostředí, ať už klimatickým změnám v důsledku globálního oteplování, znečišťování, introdukci nových konkurenčních druhů nebo adaptabilitě chorob a parazitů (Frankham et al. 2002). Aby se populace s těmito změnami vyrovnala, musí se neustále přizpůsobovat a vyvíjet, jinak dojde k jejímu vyhynutí. Genetická diverzita v populaci tedy odráží její evoluční potenciál (Flegr 2005). V populacích, které mají minimální genetickou variabilitu, nemůže dojít k evolučním změnám, zatímco populace s vysokou mírou genetické variability se změnám životního prostředí dokáží postupně přizpůsobit (Frankham et al. 2002). Také v ekologických a mikroevolučních procesech má existence vnitropopulačního polymorfismu značný význam. Z hlediska ekologie je důležité, že polymorfní populace dokáže čerpat z různorodějších zdrojů a díky tomu využívá své prostředí ekonomičtěji (Flegr 2005). Polymorfní druh je také méně zranitelný náhodnými fluktuacemi podmínek prostředí, neboť díky němu může část populace přežít i během drastických změn (Frankham et al. 2002).

Nízká genetická rozmanitost se vztahuje také ke snížení reprodukce a zdatnosti (fitness). Ztráta genetické diverzity je tedy přímo spojena s úrovní inbreedingu a ten pak vede ke snížení reprodukční schopnosti (Brook et al. 2002). Existuje významný vztah mezi celkovou střední hodnotou heterozygotnosti populace a její zdatností (Reed et Frankham 2001).

Význam genetické rozmanitosti jak z hlediska dlouhodobého (udržení adaptivního evolučního potenciálu), tak i krátkodobého (zachování reprodukční zdatnosti) je primárním zaměřením ochranné genetiky (Frankham et al. 2002). Znalosti genetické struktury jedinců se využívá pro management ochrany ohrožených druhů. A

to jak v zajetí (ochrana ex situ, mimo přirozené prostředí), tak v přirozených podmínkách (in situ). Dlouhodobým cílem programů ochrany ex situ je založení nové generace v přírodě (tj. zakládání nových populací vyhynulých druhů v místech, kde v minulosti tento druh prokazatelně žil), k čemuž je nutné vybudovat v zajetí silnou základnu zdatných jedinců vhodných k reintrodukci (Primack 2001). Je potřeba zajistit čistou genetickou linii, zabránit příbuzenskému křížení a tím i ztrátě genetické variability. Pro chovy v zajetí jsou proto vedeny mezinárodní plemenné knihy a managementová opatření zahrnují také poradenství při výběru jedinců pro páření či reintrodukci do volné přírody (Primack 2001).

Příkladem takové reintrodukce může být zubr evropský (*Bos bonasus*) či kůň převalského (*Equus przewalskii*). Obě zvířata z volné přírody úplně vymizela a jejich záchrana spočívala na chovu zoologických zahrad, který byl založen velmi malým počtem jedinců. Zubr byl ve volné přírodě vyhuben roku 1921 (Ehrlich et Ehrlich 1981) a v zajetí v té době přežívalo pouhých 13 zvířat. V současné době se na světě vyskytuje něco okolo 3000 jedinců a zoo z celého světa poskytují zvířata do reintrodukčních programů v Evropě (Pucek et al. 1996). Situace koně převalského je velice podobná. Ten byl ve volné přírodě naposledy spatřen v roce 1954 (Ehrlich et Ehrlich 1981). K jeho záchraně bylo použito 12 jedinců ze zoologických zahrad a také jedna klisna koně domácího, jejíž vliv byl eliminován důsledným genetickým managementem. Celosvětová ex-situ populace se rychle rozrůstala a v současné době čítá více než 1700 jedinců (Volf 2004). V roce 1991 byla zahájena úspěšná reintrodukce několika stád na území Mongolska a Číny. Obnova populací s takto nízkým počtem zakládajících jedinců vyžaduje velmi propracovaný genetický management, jehož úkolem je eliminovat příbuzenské křížení a tím i ztrátu genetické variability (Frankham et al. 2002). To se v případě reintrodukované populace zubra ovšem zdaleka nedaří. Tokarská et al. (2011) ve své studii zjistili, že genetická variabilita zubra je velice nízká a heterozygotnost této populace není ani z poloviny tak velká jako u blízce příbuzného bizona amerického (*Bison americana*). Také stupeň inbreedingu je obrovský a dosahuje více než 50%.

Pokud druh v přírodě ještě zcela nevyhynul, mohou být k reintrodukci využíváni také jedinci z jiných lokalit, kde se daný druh ještě volně vyskytuje. Při takovémto přesunu je ale nutné vždy dosazovat jedince z lokálně co nejpůvodnějších populací, a tudíž s co nejpodobnějším genotypem, jako měla populace původní (Höglund

2009). K takovému typu reintrodukce u nás došlo např. v případě úspěšného znovuzaložení populace rysa ostrovida (*Lynx lynx*) na Šumavě (česko-bavorská populace). Na české straně Šumavy bylo v letech 1982-1989 vypuštěno 17 divokých rysů pocházejících ze Slovenska (Červený et al. 2006). Celý proces byl ovšem proveden pouze na základě porovnávání přírodních podmínek a tedy bez předchozí znalosti genetické struktury reintrodukovaných jedinců (Schadt et al. 2002). Vůbec tak nebylo zohledněno, zda nově vznikající populace genotypově odpovídá populaci původní a zda tedy reintrodukovaní jedinci budou schopni adaptovat se na šumavské podmínky. Současný stav více než 20 let od reintrodukce dokazuje prozatimní úspěšnost této akce z hlediska životaschopnosti populace. Otázkou ovšem zůstává, zda tomu tak bylo šťastnou náhodou či v tomto případě přežití zajistila pouhá podobnost přírodních podmínek v ČR a na Slovensku.

Také ochrana volně žijících populací ohrožených druhů zahrnuje důkladný monitoring a odvíjí se od znalostí jejich genetické struktury (Frankham et al. 2002). Zvláště je-li populace fragmentovaná a tvoří izolované subpopulace, může právě znalost genetické diverzity jednotlivých subpopulací přispět k výběru vhodného managementu. Do subpopulací, které trpí nízkou početností, mohou být vypouštěni další jedinci z ex situ chovu či z jiných lokalit. Tím dochází k simulaci přirozeného toku genů a tedy k omezení rizika ztráty genetické variability (Primack 2001).

3. Studium genetické struktury populací

Studium genetické diverzity volně žijících živočišných populací a faktorů, které ji mohou ovlivňovat, je možné pomocí molekulárně-genetických metod. Tato velmi rychle se rozvíjející oblast výzkumu vedla ke vzniku nového vědního oboru – molekulární ekologie. Jejím cílem je pochopit příčiny formující genetickou proměnlivost a zároveň objasnit procesy, kterými genetická variabilita ovlivňuje životaschopnost populací (Bryja et Hájková 2005). Studium genetické diverzity v populacích vzácných a ohrožených druhů jsou potom hlavní náplní ochranné genetiky (conservation genetics). Ta aplikuje poznatky obecné a populační genetiky na problémy týkající se ochrany druhů. Zabývá se také genetickým managementem malých populací (např. problematika inbreedingu, reintrodukcí, omezeného toku genů), řešení taxonomických otázek či využití molekulárně-genetických analýz při

studiu biologie a ekologie zkoumaných druhů (Frankham et al. 2002).

Vznik ochranářské genetiky je úzce svázán s objevením a rozvojem polymerázové řetězové reakce (PCR), která umožňuje získat dostatek genetického materiálu i z velmi malých vzorků (Šmarda et al. 2005). Pro amplifikaci specifických úseků DNA tak stačí kapka krve, velmi malé množství tkáně a dokonce i vzorek trusu či vývržků potravy (které obsahují epitelové buňky ze sliznic studovaného živočicha) nebo muzejní materiál (kosti, peří, srst). Pro získání genetické informace pomocí PCR již tedy není nutné daného jedince usmrtit a dokonce nemusí dojít ani k přímému kontaktu a jeho vyrušování (Bryja et Hájková 2005). Je tak možné získat dostatečný počet vzorků pro genetické analýzy bez ovlivnění životaschopnosti populace (Kalinowski et al. 2005). Takové metody jsou ale spojeny s určitými omezeními, které způsobuje především malé množství a nízká kvalita izolované DNA (Bryja et Hájková 2005).

3.1 Molekulární markery

Jako molekulární markery se označují známé sekvence DNA, které mohou být jednoduše identifikovány (Relichová 2001). Využitím molekulárních markerů lze pomocí různých metod snadno určit rozdíly v genetické informaci, kterou nesou sledovaní jedinci. Genetická variabilita ohrožených druhů živočichů je nejčastěji analyzována za použití genetických markerů, které jsou považovány za neutrální (tj. neprojevují se ve fenotypu jedince a nepodléhají selekci). Jsou to např. isoenzymy, mikrosatelity či jednonukleotidové polymorfizmy (Höglund 2009). V této kapitole uvádím hlavní výhody a nevýhody markerů, které jsou nejčastěji používané pro studium struktury populací ohrožených druhů živočichů.

Isoenzymy jsou různé formy téhož enzymu (v metabolismu mají stejnou funkci), které se v důsledku rozdílného pořadí aminokyselin v jejich primární struktuře liší některou ze svých vlastností (např. nábojem, katalytickou aktivitou ap.). Separace izoenzymů pak spočívá v jejich různě rychlé migraci při elektroforéze škrobového gelu. Isoenzymy však nemohou charakterizovat celý genom a odhalit celkovou genetickou diverzitu, neboť reprezentují jen jeho kódující úseky a celá řada změn v pořadí aminokyselin se na jejich pohyblivosti v rámci elektroforézy vůbec neprojeví

(Frankham et al. 2002). Studie založené na zkoumání allozymů jsou v současnosti stále méně běžné. A to především ze dvou důvodů: Za prvé je velice pravděpodobné, že k některým z pozorovaných změn uvnitř a mezi populacemi dochází vlivem selekce (o čemž lze ale zřejmě uvažovat i u mikrosatelitů). Druhým důvodem je, že pro získání isoenzymů je potřeba velké množství více kvalitní tkáně a tudíž častěji vyžadují zabití studovaného organismu (Höglund 2009).

Narozdíl od isoenzymů **mikrosatelity** lze získat i z velmi malého množství DNA a proto je jejich využití při studiu ohrožených druhů živočichů výhodnější (Höglund 2009). Mikrosatelity jsou tandemově se opakující úseky DNA, které jsou složeny z krátkých opakujících se jednotek (repeticí) nejčastěji o délce 2-6 párů bází. Repetice jsou vytvářeny obvykle dinukleotidy až hexanukleotidy (Frankham et al. 2002). Mikrosatelity lze podle opakující se sekvence dělit na dokonalé, nedokonalé, přerušené nebo složené (Oliveira et al. 2006). Dokonalé (perfect) mikrosatelity nejsou přerušeny žádnou bází (...TATATATATATA...), zatímco nedokonalé (imperfect) jsou přerušeny jinými páry bází (...TATATA**T**CTATATA...). Díky vysoké mutační rychlosti jsou mikrosatelity velmi polymorfní. To znamená, že se v rámci jedné populace nacházejí v různých variantách. Tato rozmanitost alel je v laboratoři snadno zjištělná a umožňuje nám sledovat genetickou variabilitu mezi jednotlivými druhy, v rámci jednoho druhu, či v rámci jedinců uvnitř jedné populace (Tautz 1989). Využití mikrosatelitů je pro jejich variabilitu, celogenomovou distribuci, velké množství v genomu a pro možnost rychlého screeningu velmi široké. Své uplatnění nacházejí především při studiu příbuzenských vztahů, určování paternity, nebo při studiu parametrů populačně-genetické struktury, jako je tok genů a jeho bariéry, efektivní velikost populace nebo odchylky od Hardy Weinbergovy rovnováhy (Chambers et MacAvoy 2000). Narůstající znalosti o výskytu mikrosatelitů v genomu volně žijících druhů spolu s velmi propracovanou teorií populační genetiky vedly k tomu, že mikrosatelity se staly nejčastěji používanými znaky pro studium genetické struktury populací, a to včetně populací ohrožených druhů (Bryja et Hájková 2005).

Mitochondriální DNA (mtDNA) je název pro genetickou informaci obsaženou v mitochondriích. Jedná se zpravidla o malou kruhovou molekulu, skládající se obvykle z 37 genů, z nichž většina kóduje tRNA, zbývající potom rRNA a mRNA (v té jsou kódovány proteiny účastníci se elektronového transportu a oxidativní fosforylace mitochondrie). Jako molekulární marker má mtDNA mnohé výhody.

Vyvíjí se rychleji než jaderná DNA (Brown et al. 1979), různé oblasti mitochondriálního genomu se vyvíjejí různou rychlostí a navíc zde nedochází k rekombinacím (Hayashi et al. 1995). Analýzy mtDNA jsou téměř od jejich objevení využívány pro studium fylogenetických vztahů. Fylogenetické analýzy umožňují najít vztahy mezi jednotlivými populacemi, identifikovat centra historického výskytu jednotlivých druhů (refugia) a zkoumat směr a intenzitu šíření jejich populací vedoucí k současnému areálu výskytu (Mayr 2001). Určitým omezením pro analýzy na základě mtDNA je její maternální dědičnost, která umožňuje sledovat vývoj populace jen v mateřské linii. Je tedy vhodné doplnit informace použitím sekvencí na jaderných genech – ať už na autozomech s biparentální dědičností nebo gonozomech s dědičností parentální (Hare 2001).

Polymorfismus délek amplifikovaných fragmentů (**AFLP**) je metoda, která se využívá pro získání multilokusových genetických dat na bázi DNA fingerprintingu. Genomická DNA je rozstříhána pomocí restrikčního enzymu a na její konce jsou připojeny krátké úseky syntetické DNA o známé sekvenci (adaptory) (Frankham et al. 2002). Výhodou metody AFLP je její opakovatelnost a také moderní přístup vizualizace získaných fragmentů (Höglund 2009).

Také metoda polymorfismu délky restrikčních fragmentů (**RFLP**) využívá schopnosti restrikčních enzymů rozstříhat DNA na požadované sekvence. Takto upravená DNA je poté převedena na gel, kde jsou dle odlišné velikosti separovány jednotlivé úseky (Frankham et al. 2002). Hlavní výhodou použití RFLP je nízká cena a jednoduché provedení. Vyhodnocení je ovšem často velice komplikované a výsledky bývají nejednoznačné. Navíc je pro tuto metodu potřeba velké množství vysoce kvalitní DNA a proto nebývá pro studium populací ohrožených živočichů často využívána (Höglund 2009).

Jednonukleotidové polymorfismy (SNP) jsou odlišnosti v sekvencích DNA, které vznikají záměnou jednoho nukleotidu (A, T, C nebo G) v příslušné DNA sekvenci. Tato místa jsou ve velkém množství (přibližně každých 300-1000 bp) přítomné v kódujících i nekódujících oblastech jádrové i organelové DNA a mají podobné využití jako mikrosatelity (identifikace jedinců, stanovení genetické variability, populačně genetické analýzy atd., Morin et al. 2004). V porovnání s mikrosatelity mají ale SNP řadu výhod. Zatímco znalosti o mutační rychlosti mikrosatelitů jsou velice omezené

a interpretace výsledků je tedy značně komplikovaná, procesy podílející se na tvorbě SNP jsou jednoduché a srozumitelné (Höglund 2009). Přesto se v současné době SNP využívají se především pro studium modelových organismů (Höglund 2009). Avšak v některých současných studiích jsou SNP již využívány také pro studium volně žijících živočichů (např. Demontis et al. 2010).

4. Genetická diverzita ohrožených druhů živočichů

Obecně platí, že malé a ohrožené populace mají menší genetickou variabilitu v porovnání s taxonomicky příbuznými neohroženými druhy (Spielman et al. 2004) a proto jsou při změnách podmínek prostředí náchylnější k vyhynutí (Primack 2001). V populacích, ve kterých v minulosti došlo k výraznému snížení velikosti, obvykle dochází především vlivem inbrední deprese také k redukci genetické diverzity (Höglund 2009). Taková situace byla pozorována např. v české populaci sysla obecného (*Spermophilus citellus*). Fragmentace krajiny v České a Slovenské republice způsobila rozdělení populace sysla do pouhých několika malých a izolovaných subpopulací (Cepáková et Hůlová 2002). Studie šesti z nich za použití 5 mikrosatelitových lokusů jako genetických markerů ukázala velmi vysoký stupeň inbreedingu v jednotlivých populacích ($F_{is} = 0,34-0,90$) a také silnou diferenciaci mezi nimi (Hůlová et Sedláček 2007). Podobná situace je pozorována také v populacích mnoha ohrožených druhů ptáků na ostrovech poblíž Nového Zélandu. Vzdálenost ostrovů tvoří přirozenou bariéru mezi populacemi a tak mezi nimi postupně dochází k výrazné diferenciaci a na jednotlivých ostrovech pak také ke snížení genetické variability a zvýšení stupně inbreedingu (Hudson et al. 2000, Lambert et al. 2005). Ovšem některým druhům novozélandských ptáků se zřejmě v důsledku občasných migrací daří udržovat vysokou genetickou diverzitu a známky působení inbreedingu nevykazují (Lindsay et al. 2008, Brekke et al. 2011).

Ovšem ani v případě nepřítomnosti migrace nemusí ottleneck efekt vždy vést ke snížení heterozygotnosti. Pokud populace po dočasné redukci početnosti rychle vzrůstá, může se dřívější úroveň heterozygotnosti obnovit, třebaže je počet alel silně zredukován (Primack 2001). V takových případech je genetická diverzita po opět obnovení a příznaky inbreedingu nejsou vůbec patrné (Höglund 2009). Takový vývoj byl zaznamenán dokonce i u některých populací, které byly založeny pouze

jediným párem, což bylo sledováno např. v populaci poštolky mauricijské (*Falco punctatus*). Populace poštolky se začala zmenšovat s postupným ničením přirozených lesních porostů. Po roce 1940 ale došlo k rapidnímu poklesu početnosti v souvislosti s počátkem užívání insekticidu DDT, který zapříčinil ztenčení skořápek a snížení počtu vylíhnutých mláďat. V roce 1974 již populace byla omezena na jeden jediný pár, ale díky intenzivnímu managementu čítala o 20 let později již více než 400 jedinců. Ačkoli tato populace pochází z jediných dvou předků, nevykazuje žádné znaky inbrední deprese (Groombridge et al. 2000). Jedním z možných vysvětlení takového vývoje genetické struktury je, že během výrazné redukce počtu jedinců, došlo nejenom ke ztrátě prospěšné genetické variability, ale také ke ztrátě alel způsobujících inbrední depresi. Populace, která ztratila tyto škodlivé alely, pak dokáže odolávat vlivu příbuzenského křížení, aniž by na ni působila inbrední deprese (Höglund 2009). Také v případě ohroženého nosorožce indického (*Rhinoceros unicornis*), jehož efektivní velikost populace byla v roce 1962 redukována na pouhých 21-28 jedinců, nejsou ani o 30 let později pozorovány žádné známky inbrední deprese. Ačkoli je tento druh na pokraji vyhynutí, proteinová elektroforéza vykazuje stále velmi vysokou míru heterozygotnosti ($H_o = 9,9\%$, Dinerstein 1990).

5. Bottleneck efekt

Při bottleneck efektu dochází v populaci ke změně frekvence výskytu některých alel, další alely jsou ztraceny, jiné naopak fixovány (Frankham et al. 2002). Obvykle tak dochází ke snížení genetické diverzity. Otázkou je, jak rychle a zda vůbec může populace, poté co prošla bottleneck efektem, opět obnovit svou genetickou variabilitu. Rychlost takové obnovy závisí na mnoha parametrech, jako je intenzita redukce početnosti či následná rychlost růstu populace, rychlost vzniku nových mutací, případná migrace a vliv přírodního výběru (Relichová 2001).

V této souvislosti se bottleneck někdy dělí na „long neck“ (populace prochází „dlouhým hrdlem lahve“, obnova početnosti i genetické variability trvá velmi dlouhou dobu nebo k ní nedojde vůbec) a „hourglass“ (neboli přesýpací hodiny, populace projde rychlou redukcí velikosti a ta následně opět naroste a s ní stoupá i genetická diverzita, Hedrick 2005).

Vzhledem ke zvýšení rizika vyhynutí, kterým je náhlé snížení velikosti populace obvykle provázeno (Frankham et al. 2002), je velice důležité dokázat rozpoznat populace, ve kterých k bottlenecku došlo, aby následně bylo možné účinné zaměření ochrany druhu a také volba vhodného managementu cíleného na zmírnění potenciálně negativních důsledků redukce početnosti (Höglund 2009). Bohužel, je často obtížné přesně určit, zda v populaci v minulosti došlo k bottlenecku, neboť obvykle neznáme početnost studované populace v historii. Proto byly vyvinuty specializované metody, které dokážou nalézt důkazy nedávného ale i historického snížení populační početnosti za využití molekulárně-genetických poznatků.

5.1 Detekce bottlenecku

Existují různé metody, kterými lze hodnotit, zda ve studované populaci v minulosti došlo k redukci v počtu jedinců. Pomocí výpočtů, statistických analýz či simulací mutačních procesů dle mutačních modelů. Většina z těchto metod je implementována do počítačových softwarů, které jsou schopny vložená data zpracovat a vyhodnotit.

5.1.1 Mutační modely

Teoretické mutační modely se používají k odvození očekávaného počtu alel v populaci z pozorované heterozygotnosti (Hedrick 2005). Velmi důležitou otázkou při analýzách historického vývoje populací je stanovit, který mutační model by měl být aplikován, aby z molekulárních dat správně určil genetické parametry populace. Pro zjišťování, zda v populaci došlo k redukci početnosti se obvykle používají tyto tři modely.

Infinite alleles model (IAM) (Kimura & Crow 1964) a **Stepwise mutation model** (SMM) (Kimura & Ohta 1978) jsou mutační modely, které představují dva extrémní způsoby introdukce nových alel do populace (Chakraborty et al. 1992). Zatímco v IAM modelu vzniká nová alela náhodně každou mutací, dle SMM modelu nová alela vzniká vždy adicí či delecí jedné repetice (Kimura et al. 1978). Nicméně

adici či delecí nukleotidu, případně repetice, mohou vznikat totožné alely (homoplasie). Ani jeden model však homoplasii nebere v úvahu, což znamená že nové alely, byť vzniklé odlišným mechanismem, jsou pro ně identické (IBD - identical by descent) (Cornuet et Luikart 1996). Je tedy nutné studovat více lokusů, aby byla vyloučena chyba zapříčiněná homoplasiami (Cornuet et Luikart 1996).

Two phase model (TPM) (Di Rienzo et al. 1994) je kombinací předchozích dvou modelů vytvořenou speciálně pro studium mikrosatelitů. Na rozdíl od SMM zde dochází ke změně (adici či delecí) v řetězci o více než jednu repetici, poskytuje tedy realističtější obraz průběhu vývoje nových sekvencí DNA (Lawler 2008).

5.1.2 Metody detekce

BOTTLENECK

Program **BOTTLENECK** (Piry et al. 1999) je počítačový software užívaný pro zjišťování genetických znaků výrazné redukce početnosti populace, ke které došlo v nedávné minulosti. Podstatou detekce bottlenecku je zjistit, zda se genetická diverzita odchýlila od rovnováhy mezi mírou mutace a driftu (mutation-drift equilibrium, Garza 2006), která v populaci nastává, pokud dochází ke vzniku nových alel mutacemi a souběžně k jejich eliminaci působením genetického driftu (Hedrick 2005). Populace, u nichž je předpokládáno nedávné snížení jejich efektivní velikosti (N_e , tj. počet jedinců, kteří se přímo účastní reprodukce a svými geny tak ovlivňují genetickou variabilitu dané populace, Höglund 2009), vykazují sníženou heterozygotnost ($H_e = 1 - \sum p_i^2$, kde p_i je frekvence i -té alely) a počet alel na lokus. Jelikož vzácné alely (tj. alely s frekvencí $< 0,01$) z populace mizí daleko rychleji než alely s vyšší frekvencí, počet alel na lokus klesá rychleji než heterozygotnost (Cornuet et Luikart 1996). Naměřená heterozygotnost (H_e) populace se tak stává vyšší či nižší, než je heterozygotnost očekávaná dle mutation-drift equilibrium (H_{eq}) (Piry et al. 1999).

Ke zjištění, zda populace vykazuje či nevykazuje nadbytek heterozygotnosti, jsou v softwaru **BOTTLENECK** navrženy tři základní statistické testy – znaménkový test, test standardního rozdílu a Wilcoxonův test. Wilcoxonův test je obecně doporučován, je-li zkoumáno méně než 20 lokusů (Cornuet et Luikart 1996). Nicméně, kdy je vhodné

použít test znaménkový a test standartního rozdílu se v literatuře už neuvádí. Nulovou hypotézou pro daný test je potom nesignifikantní nadbytek heterozygotnosti, pozorovaný nadbytek heterozygotnosti je hypotézou alternativní a značí, že populace v minulosti prošla bottleneck efektem (Piry et al. 1999). K dosažení výsledku velké statistické síly je doporučeno použít minimálně 10 polymorfních lokusů (mikrosatelitů či izoenzymů) a odběr vzorků nejméně 30 jedinců (Cornuet et Luikart 1996).

Při testování bottleneck efektu lze v programu BOTTLENECK použít všechny tři typy mutačních modelů (IAM, SMM i TPM) nezávisle. Pro selektivně neutrální lokusy v populaci blízké mutation-drift equilibrium (tedy s konstantní efektivní velikostí populace) je zde přibližně stejná pravděpodobnost, že lokus ukáže mírný nadbytek nebo mírný nedostatek heterozygotnosti. Nicméně v populacích, které vykazují redukcí jejich efektivní velikosti v nedávné době, většina lokusů obvykle prokáže nadbytek heterozygotnosti, tj. signifikantní bottleneck efekt (Luikart et Cornuet 1998 *in* Piry et al. 1999).

V programu BOTTLENECK je implementován také „mode-shift“ test pro hodnotu L (Luikart et al. 1998). Tato metoda provádí grafický test narušení distribuce alelových frekvencí. Tento test vychází z poznatku, že vzácné alely bývají během bottlenecku ztraceny s větší pravděpodobností než alely běžné. Všechny lokusy ze studovaného vzorku se tedy během analýzy rozdělí do 10 kategorií dle alelových frekvencí (od alel vzácných po běžné). Pokud se poté v kategorii vzácných frekvencí bude nacházet méně alel než kategoriích ostatních (distribuce alel není „L-shaped“), pak v populaci došlo k redukcí početnosti (Piry et al. 1999).

M Ratio

Garza et Williamson (2001) ukazují, jak lze M Ratio (poměr počtu alel a rozsahu alelové velikosti) využít pro vzorky mikrosatelitů při detekci redukcí efektivní velikosti populace. Tato jednoduchá metoda sleduje distribuci alelových frekvencí v tandemově se opakujících úsecích DNA. Distribuce alelových frekvencí nese informaci o genetické diverzitě (frekvence alel a celkový počet alel, k) a prostorové diverzitě (rozdíl mezi počtem opakování alel a celkovým rozsahem alelové velikosti, r). Je-li populace redukována ve velikosti, dojde k zesílení působení genetického

driftu a některé alely mohou být ztraceny. Nicméně, protože ztráta každé alely je příčinou zmenšení k , ale pouze ztráta největší či nejmenší alely vede ke zmenšení r , předpokládá se, že velikost k je snižována rychleji než velikost r . Proto lze očekávat, že M Ratio ($M=k/r$), bude menší v populacích, které prošly působením bottleneck efektu, než v populacích s vyrovnanou velikostí. Výpočet hodnot pro M Ratio a hodnocení výsledků jsou v současné době implementovány do některých počítačových softwarů (např.: CRITICAL M, GENEPOP, GENETIX atd., Garza 2006). Výhodou M Ratio oproti programu BOTTLENECK je schopnost této metody úspěšněji detekovat bottleneck, který trval několik generací nebo zasáhl populaci, u které posléze došlo k demografické obnově (Williamson-Nateson 2005).

MSVAR

Další software, který lze využít ke zjištění, zda ve studované populaci došlo k poklesu a/nebo nárůstu ve velikosti (a to jak v současnosti, tak v historii), je MSVAR (Storz et Beaumont 2002). Program odhaduje pravděpodobnost vývoje distribuce několika genealogických a demografických parametrů použitím Markov Chain Monte Carlo simulací, které jsou založeny na pozorované distribuci alel na mikrosatelitových lokusech a počtu jejich opakování v populaci (Beaumont 1999) a pomocí Bayesiánské analýzy. Tato metoda odhaduje demografické parametry, které upozorňují na změny velikosti populace v čase. To předpokládá, že v určitém okamžiku v minulosti (t_a) začíná stabilní populace o velikosti N_1 růst nebo se zmenšovat až do své současné velikosti (N_0). Tento model používá SMM, ve kterém je míra mutací (Θ) rovna $2N_0u$, kde u je počet mutací na lokus (Hedrick 2005). Metoda odhaduje tři parametry: míra růstu populace ($\lambda=N_0/N_1$, kde $\lambda>1$ indikuje zvětšující se populaci a $\lambda<1$ znamená úbytek velikosti populace). Dobu, od které se populace začala měnit ($t_r = t_a/N_0$) a rychlost mutací (Θ). Narozdíl od Bottlenecku a M Ratio, počítá MSVAR i s působením migrace a je tedy schopen odhalit i dlouhodobé a postupné změny ve velikosti populace a bottleneck efekt, ke kterému došlo v historii (Beaumont 1999).

Tajima's D

Všechny výše uvedené metody jsou určeny zejména pro studium mikrosatelitů (Williamson-Nateson 2005). Pro zjištění, zda v populaci došlo ke snížení či zvýšení

početnosti populace, pomocí mitochondriální DNA se využívá odhad odchylky od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, tzv. Tajima's D (Tajima 1989).

5.2 Porovnání a zhodnocení jednotlivých metod

Pro porovnání a zhodnocení jednotlivých metod, zjištění míry jejich využití a četnosti signifikantních výsledků jsem vytvořila přehlednou tabulku (viz Příloha č.1), ve které jsem shrnula poznatky různých studií. Články pro toto srovnání jsem získala prohledáním databáze ISI Web of KnowledgeSM (WOS, www.isiknowledge.com), která velice citlivě vyhledává dle zadaných parametrů. Jako klíčová slova jsem zvolila: „Bottleneck (in Topic) AND genetic diversity (in Topic)“ a dle těchto kritérií k 30.3.2011 WOS vyhledal 1153 článků. Z výsledků jsem vytrídila pouze články, v nichž se autoři zabývají detekcí bottleneck efektu u volně žijících obratlovců. V těchto článcích potom byly odkazy na další literaturu vhodnou pro moji analýzu.

Do tabulky jsem z jednotlivých článků poté zaznamenala tyto údaje: 1. autor článku, 2. rok vydání článku, 3. studovaný živočich, 4. jeho systematické zařazení do třídy, 5. generační doba, 6. zdroj DNA, 7. použitý marker, 8. počet lokusů, 9. užití muzejních vzorků, 10. analýza pro detekci bottlenecku, 11. mutační model, 12. výsledek testu.

Vyhodnocení tabulky

Z vypracované tabulky jasně vyplývá, že nejužívanějším markerem pro detekci bottlenecku jsou mikrosatelity. Nejčastěji užívanou analýzou je potom test pro nadbytek heterozygotnosti, který je implementován do počítačového softwaru BOTTLENECK. V tom je nejčastěji pracováno dle TPM modelu vyvinutém speciálně pro mikrosatelity. V celkového počtu 80 studií bylo pro detekci redukce početnosti použito 230 analytických metod (v průměru použito 2,85 metod na 1 živočicha) a bottleneck byl úspěšně odhalen ve 120 případech (53%).

Nejvíce studií je zaměřeno na ohrožené druhy savců (48,9% studií) a ptáků (23,7%), méně potom na ryby (11,2%), obojživelníky (8,7%) a plazi (7,5%). V rámci jednotlivých tříd pak byla detekce bottlenecku signifikantní u savců z 57,1%, u ptáků

z 44,7%. V případě ryb byl bottleneck detekován v 56,25% případů, u plazů pouze v 35,3%. Nejčastěji pak signifikantní redukci ve velikosti vykazovali obojživelníci (58,8%).

Použití DNA z různého zdroje podává různé výsledky. Signifikantní bottleneck byl zaznamenán v 53,9% použití DNA z tkáně zkoumaného živočicha, 37,7% z krve a v 42,8% z peří či srsti. Při kombinaci více než dvou zdrojů DNA byl bottleneck úspěšně detekován v 55,5%.

Historické vzorky byly pro analýzy použity jen ve velmi malém množství případů (1,3%). Signifikantní bottleneck byl při jejich použití odhalen v 60%.

Dalším z parametrů zadaných do tabulky, a tedy ovlivňujících detekci redukce velikosti populace, byla generační doba. Signifikantní bottleneck byl odhalen u 46,6% živočichů s generační dobou kratší než 3 roky, 52% u živočichů s generační dobou 3-8 let, 53,8% pro generační dobu 8-20 let a 40% s delší generační dobou.

Výsledek testu je ovlivněn použitím různých molekulárních markerů. Nejžádanějším markerem jsou mikrosatelity (ty byly použity v 92,3% studií). Ty jsou pro studium bottlenecku využívány obvykle i ve studiích, které pracovaly s více markery (Estoup et al. 2001, Alter et al. 2009), což je zřejmě spojeno s určením většiny používaných testů především pro studium mikrosatelitů (Williamson-Nateson 2005). Dalším používaným markerem je mitochondriální DNA (7,7% studií). Zatímco u mikrosatelitů byl bottleneck detekován v 53% případů, u mtDNA byla úspěšnost o 5,4% nižší.

Také počet použitých lokusů může být důsledkem neprůkaznosti testu. 53,3% testů odhalilo bottleneck při méně než 10 lokusech, pro 10-20 lokusů byla úspěšnost testu 52,7% a 39,1%, bylo-li použito více než 20 lokusů.

Z konkrétních studií pak vyplývá, že výsledek testu závisí na různých parametrech. Např. Cristescu et al. (2010) ve své práci uvádí závislost detekce bottlenecku na typu mikrosatelitu. Pro studium populace koaly medvídkovité (*Phascolarctos cinereus*) bylo v jejich práci použito 11 lokusů dokonalých mikrosatelitů a 4 lokusy mikrosatelitů nedokonalých. Při testování odchylky heterozygotnosti od mutation-

drift equilibrium byl bottleneck zjištěn pouze pro nedokonalé mikrosatelity.

6. Návrh řešení diplomové práce

Ve své diplomové práci se budu zabývat genetickou variabilitou české populace koroptve polní (*Perdix perdix*). Ta patří v ČR mezi ohrožené ptačí druhy. Je to nejznámější zástupce našich polních ptáků, který původně obýval krátkostébelnou step, ale plně se adaptoval na kulturní zemědělskou krajinu. Nyní upřednostňuje prostředí s políčky, travnatými porosty, křovinami a malými remízky. Kromě Islandu a nejsevernějších částí Skandinávie a Ruska se vyskytuje v celé Evropě a Asii (BirdLife International 2004). Nicméně rychlý a rozsáhlý úbytek vhodných stanovišť tohoto druhu způsobený intenzifikací zemědělství měl za následek dramatický pokles stavu koroptví v Evropě (Tucker et Heath 1994, Šálek et al. 2004). V ČR dochází k dramatickému poklesu početnosti koroptví již od poloviny 20. století. Ještě v r. 1935 činil odhad jarních kmenových stavů pro celé Československo 6 mil. jedinců. Současná populace je v ČR odhadována na pouhých 12000 - 24000 hnízdících párů (Šťastný et al. 2006). Navíc díky výrazné fragmentaci populací dochází jen velmi zřídka k migracím jedinců mezi populacemi (Šálek et Marhoul 1999). S ohledem na nízkou početnost a vysokou izolovanost současných populací koroptví lze předpokládat, že jejich genetická diverzita a s ní také jejich adaptabilita na změny prostředí bude nízká a riziko vyhynutí vysoké.

Cílem diplomové práce tedy bude určit, zda se snížení početnosti koroptví v ČR projevilo také na jejich genetické struktuře a zda populace vykazuje signifikantní bottleneck. Pro zajištění vysoké průkaznosti testování k tomu bude použito nejméně 20 vzorků z každé sledované populace a to jak ze současné populace, tak z historických vzorků nashromážděných z muzejních expozic v ČR. Jako zdroj genomové DNA bude použita především krev, u muzejních vzorků pak peří. Samotný test bude proveden na nejméně 10 mikrosatelitech a testována bude také mitochondriální DNA. Budou použity všechny standartně používané metody pro detekci bottlenecku.

7. Diskuze a závěr

Genetická diverzita

Genetická diverzita je nepostradatelnou součástí biologické diverzity a jako takovou jí je nutné chránit (Primack 2001). Pokud ovšem bude i nadále docházet k ničení krajiny a přirozeného prostředí výskytu ohrožených druhů, pak jsou veškeré ochranné snahy založené na průzkumu genetické struktury populací a na složitých managementových opatřeních téměř zbytečné. Ochrana přírody musí být komplexní, protože jenom tak může skutečně zachránit jak biotopy, tak druhy, které se v nich vyskytují, včetně jejich genetické různorodosti (Bowen 1999).

Genetická variabilita v rámci populací je nezbytná pro přežívání druhů. Pokud populace nemá vhodné životní podmínky, dochází k působení mechanismů ovlivňujících genetickou strukturu a životaschopnost populace (Evans et Sheldon 2008). Pro záchranu druhů je pak nutné stanovit vhodný management, který minimalizuje pokles heterozygotnosti a ztrátu alel z populace (Meuwissen 2009). Na základě pozorování a kontroly genetické struktury ohrožených druhů pak následně dochází činnosti vedoucí k posílení či obnovení populací – reintrodukce, introdukce, simulace toku genů.

V minulosti docházelo, ať již z důvodu nedostatku znalostí či z nedbalosti zúčastněných k ochranným aktivitám, které naprosto opomíjeli genetickou charakteristiku zasažené populace (Princeé 1998). Takovým případem je např. již zmiňovaná reintrodukce rysa ostrovida v oblasti Šumavy. Tyto populace se v současné době jeví stabilně, nicméně, pokud zůstanou izolovány a nedojde k vybudování migračních cest s populacemi sousedními, pak jsou z důvodu malé početnosti ohroženy ztrátou genetické variability a také poklesem zdatnosti a reprodukční schopnosti vlivem příbuzenského křížení.

Detekce bottleneck efektu

I přes snahu zahrnout do studie co nejvyšší množství článků zabývajících se danou tematikou, je pravděpodobné, že provedená analýza není zcela vyčerpávající. Navíc je zřejmé, že souhrnné zhodnocení má spíše hrubý informativní charakter o míře

využívání jednotlivých analýz a jejich procentuální úspěšnosti, na jejichž základě si lze udělat představu o funkčnosti jednotlivých analýz. Nicméně, z těchto výsledků nelze plošně usuzovat o kvalitě jednotlivých testů a vhodnosti jejich použití, což dokazují individuální výsledky některých studií.

Ačkoli Larsson et al. (2008) tvrdí, že bez použití historických vzorků nelze průkazně určit, zda populace prošla bottleneckem, v současných studiích je historická DNA užívána jen velmi zřídka. Ve své práci ovšem Larsson et al. (2008) pracoval pouze s testováním nadbytku heterozygotnosti v softwaru BOTTLENECK, který vykazoval signifikantní redukci velikosti populace při testování historických dat a u současných vzorků nikoli. Program MSVAR, který je citlivější pro detekci bottlenecku, ke kterému došlo v minulosti (Beaumont 1999), v této práci ale nebyl vůbec použit a ani studie jiných autorů, které by zahrnovaly jak analýzu historických dat, tak demografickou simulaci programem MSVAR, nebyly publikovány. Otázkou tedy zůstává, zda by program MSVAR historický bottleneck dokázal odhalit i bez použití muzejních vzorků či nikoli.

Přesto je ale zřejmé, že použití muzejních exponátů může vést ke spolehlivějšímu určení historického bottlenecku. Nicméně s sebou nese jisté nevýhody. Vzorky jsou obvykle velice různorodého a často dokonce zcela neznámého původu a historická populace je tak představována velice fragmentovanými daty (a to jak místně, tak časově). DNA je navíc v takovém případě obvykle nutné izolovat z peří či srsti a to může negativně ovlivnit výsledek testu (viz Příloha č. 1).

Z tabulky vyplývá, že v současné době jsou k detekci bottlenecku v populacích využívány téměř výhradně mikrosatelity. Vzhledem k tomu, že znalosti o mutační rychlosti mikrosatelitů jsou velice omezené a interpretace výsledků je tedy značně komplikovaná (Hedrick 2005), by do budoucna mohlo být vhodnější použití SNP, jelikož procesy podílející se na jejich tvorbě jsou jednoduché a srozumitelné a interpretace výsledků tudíž přesnější (Höglund 2009).

Nejúspěšnější analýzou je test nadbytku heterozygotnosti v softwaru BOTTLENECK při použití TPM. Přesto se ale odchylka od rovnováhy mezi mírou mutace a driftu může jevit jako nesignifikantní, protože je tento software určen především pro detekci bottlenecku, ke kterému došlo v nedávné době. Pokud v populaci došlo k úbytku

početnosti v historii je vhodné použití demografické analýzy v programu MSVAR. To dokazuje např. studie populace sifaky malého (*Propithecus verreauxi verreauxi*), ve které užitím softwaru BOTTLENECK nebyl zjištěn pokles početnosti (detekováno pod SMM i TPM, Lawler 2008). Stejného výsledku bylo dosaženo po výpočtu M Ratio, ale při použití MSVAR bottleneck detekován byl (Lawler 2011). Podobné výsledky byly pozorovány také v populaci pandy velké (*Ailuropoda melanoleuca*, Zhang et al. 2007) či u evropské populace vydry říční (*Lutra lutra*, Pertoldi et al. 2011).

Je patrné, že účinnost a vhodnost použití jednotlivých metod pro detekování bottlenecku je závislá na mnoha faktorech, které vývoj populace ovlivnily. Při volbě vhodné metody pro detekci bottlenecku je tak vždy třeba zohlednit individuální charakter studované populace.

Přehled literatury a použitých zdrojů

- ACEVEDO P. et CASSINELLO J., 2009: Biology, ecology and status of Iberian ibex *Capra pyrenaica*: a critical review and research prospectus. - *Mammal Review* 39: 17-32.
- BEAUMONT M. A., 1999: Detecting Population Expansion and Decline Using Microsatellites. - *Genetics* 153: 2013-2029.
- BIEBACH I. et KELLER L. F., 2009: A strong genetic footprint of re-introduction history of Alpine ibex (*Capra ibex ibex*). - *Molecular Ecology* 18: 5046-5058.
- BIRDLIFE INTERNATIONAL, 2004: Birds in Europe: population estimates, trends and conservation status. - BirdLife International (BirdLife Conservation Series n°12). U.K. p. 374.
- BOWEN B. W., 1999: Preserving genes, species, or ecosystems? Healing the fractured foundations of conservation policy. - *Molecular Ecology* 9: S5-S10.
- BREKKE P., BENNETT P. M. SANTURE A. W. et EWEN J. G., 2011: High genetic diversity in the remnant island population of hihi and the genetic consequences of re-introduction. - *Molecular Ecology* 20: 29-45.
- BROOK B. W., TONKYN D. W., O'GRADY J. J. et FRANKHAM R., 2002: Contribution of inbreeding to extinction risk in threatened species. - *Conservation Ecology* 6: 16. Online: <http://www.consecol.org/vol6/iss1/art16>, cit.: 13.4.2011.
- BROWN W. M., GEORGE M. Jr. et WILSON A. C., 1979: Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 76: 1967-1971.
- BRYJA J. et HÁJKOVÁ P., 2005: Ochranařská genetika a její využití při studiu a ochraně savců. Výskum a ochrana cicavcov na Slovensku VII: 109-113.
- CEPÁKOVÁ E. et HŮLOVÁ Š., 2002: Current distribution of the European souslik (*Spermophilus citellus*) in the Czech republic. - *Lynx* 33: 89-103.
- CORNUET J.-M. et LUIKART G. L., 1996: Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. - *Genetics* 144: 2001-2014.
- CRISTESCU R, SHERWIN W. B., HANDASYDE K., CAHILL V. et COOPER D. W., 2010: Detecting bottlenecks using BOTTLENECK 1.2.02 in wild populations: The importance of the microsatellite structure. - *Conservation Genetics* 11: 1043-1049.
- ČERVENÝ J., KOUBEK P., BUFKA L., 2006: Velké šelmy v České Republice. IV. Rys ostrovid. *Vesmír* 85 (2): 86 - 94.
- DEMONTIS D., Czarnomskab S. D., Hájková P., Zemanová B., Bryja J., Loeschcked V. et Pertoldi C., 2010: Characterization of 151 SNPs for population structure

- analysis of the endangered Tatra chamois (*Rupicapra rupicapra tatrica*) and its relative, the Alpine chamois (*R. r. rupicapra*). - *Mammalian Biology* 11: 351-353.
- DI RIENZO A., PETERSON A. C., GARZA J. C., VALDES A. M., SLATIN M. and FREIMER N. B., 1994: Mutational processes of simple sequence repeat loci in human populations. *Proceeding of National Academy of Sciences* 91: 3166-3170.
- DINERSTEIN E., 1990: Endangered Greater one-horned rhinoceros carry high levels of genetic variation. - *Conservation Biology* 4: 417-422.
- EHRlich P. R., et EHRlich A. H., 1981: Extinction: The causes and consequences of the disappearance of species. - Ballantine Books, New York. *in* FRANKHAM R., BALLOU J. D. et BRISCOE D. A., 2002: Introduction to Conservation Genetics. - Cambridge University Press, Cambridge, 543 s.
- EVANS S. R. et SHELDON B. C., 2008: Interspecific patterns of Genetic diversity and its loss: Correlations with extinction risk. - *Conservation Biology* 22: 1016-1026.
- FLEGR J., 2005: Evoluční biologie. - Nacladatelství Academia, Praha, 560 s.
- FRANKHAM R., BALLOU J. D. et BRISCOE D. A., 2002: Introduction to Conservation Genetics. - Cambridge University Press, Cambridge, 543 s.
- GARZA J. C. et WILLIAMSON E. G., 2001: Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. - *Molecular Ecology* 10: 305-318.
- GARZA J. C., 2006: Population genetic software. Online: <http://swfsc.noaa.gov/textblock.aspx?Division=FED&id=3298>, cit.: 12.3.2011.
- GROOMBRIDGE J.J., Jones, C.G., BRUFORD M.W. et NICHOLS R.A., 2000: 'Ghost' alleles of the Mauritius kestrel. - *Nature* 403: 616.
- HÁJKOVÁ P., PERTOLDI C., ZEMENOVÁ B., ROCHE B., HÁJEK B., BRYJA J. et ZIMA J., 2007: Genetic structure and evidence for recent population decline in Euroasian otter populations in the Czech and Slovak Republics: implications for conservation. - *Journal of Zoology* 272:1-9.
- HARE M. P., 2001: Prospects for nuclear gene phylogeography. - *Trends in Ecology & Evolution* 16: 700-706.
- HAYANO A., YOSHIOKA M., TANAKA M. et AMANO M., 2004: Population differentiation in the Pacific White-sided Dolphin *Lagenorhynchus obliquidens* inferred from mitochondrial DNA and microsatellite analyses. - *Zoological science* 21: 989-999.
- HAYASHI J., KANEDA H., TAKAHAMA S., TAYA T., LINDAHL K. F. et YONEKAWA H., 1995: Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis. - *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 92: 4542-4546.

- HEDRICK P. W., 2005: Genetics of Populations. - Jones and Barlett Publishers, Sudbury, 737 s.
- HÖGLUND J., 2009: Evolutionary Conservation Genetics. - Oxford University Press Inc., New York, 189 s.
- HUDSON Q. J., WILKINS R. J., WAAS J. R., HOGG I. D., 2000: Low genetic variability in small populations of New Zealand kokako *Callaeas cinerea wilsoni*. - Biological Conservation 96: 105-112.
- HŮLOVÁ Š. et SEDLÁČEK F., 2008: Population genetic structure of the European ground squirrel in the Czech Republic. - Conservation Genetics 9:615-625.
- CHAKRABORTY R. et JIN L., 1992: Heterozygote deficiency, population substructure and their implications in DNA fingerprinting. - Human Genetics 88:267-272.
- CHAMBERS G. K. et MacAVOY E. S., 2000: Microsatellites: Consensus and controversy. - Comparative Biochemistry and Physiology, part B, Biochemistry & Molecular Biology 126: 455-476.
- KALINOWSKI S. T., TAPER M. L. et CREEL S., 2005: Using DNA from non-invasive samples to identify individuals and census populations: an evidential approach tolerant of genotyping errors. - Conservation Genetics 7: 319-329.
- KIMURA M. et CROW J. F., 1964: The number of alleles that can be maintained in a finite population. - Genetics 49: 725-738.
- KIMURA M. et OHTA T., 1978: A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. - Genetic Resources 22: 201-204.
- KING R. C., STANSFIELD W. D. et MULLIGAN P. K., 1996: A dictionary of genetics, 7th ed. - Oxford University Press Inc., New York, 480s.
- LAMBERT D. M., KING T., SHEPHERD L. D., LIVINGSTON A. ANDERSON S. et CRAIG J. L., 2005: Serial population bottlenecks and genetic variation: Translocated populations of the New Zealand Saddleback (*Philesturnus carunculatus rufusater*). - Conservation Genetics 6: 1-14.
- LARSSON J. K., JANSMAN H. A. H., SEGELBACHER G., HÖGLUND J. et KOELEWIJN H. P., 2008: Genetic impoverishment of the last black grouse (*Tetrao tetrix*) population in the Netherlands: detectable only with a reference from the past. - Molecular Ecology 17: 1897-1904.
- LAWLER R. R., 2008: Testing for a historical population bottleneck in wild Verreaux's Sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) using microsatellite data. -

American journal of Primatology 70: 1-5.

- LAWLER R. R., 2011: Historical demography of a wild lemur population (*Propithecus verreauxi*) in southwest Madagascar. - Population Ecology 53: 229-240.
- LINDSAY D. L., BARR K. R., LANCE R. F., TWEDDALE S. A., HAYDEN T. J. et LEBERG P. L., 2008: Habitat fragmentation and genetic diversity of an endangered, migratory songbird, the golden-cheeked warbler (*Dendroica chrysoparia*). - Molecular Ecology 17: 2122-2133.
- LUIKART G. L. et CORNUET J.-M., 1998: Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. - Conservation Biology 12: 228-237 in PIRY S., LUIKART G. et CORNUET J.-M., 1999: BOTTLENECK: A computer program for detecting recent destruktions in the effective population size using allele frequency data. - The Journal of Heredity 90: 502-503.
- LUIKART G. L., ALLENDORF F. W., CORNUET J.M., SHERWIN W.B., 1998: Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. - Journal of Heredity 89, 238-247.
- LUO S.-J., JOHNSON W. E., MARTENSON J., ANTUNES A., MARTELLI P., UPHYRKINA O., TRAYLOR-HOLZER K., SMITH J. L. D. et O'BRIEN S. J., 2008: Subspecies Genetic Assignments of Worldwide Captive Tigers Increase Conservation Value of Captive Populations. - Current Biology 18: 592-596.
- MEUWISSEN T., 2009: Genetic management of small populations: A review. - Acta Agriculturae Scandinavica, Section A - Animal Science 59: 71-79.
- MORIN P. A., LUIKART G., WAYNE R. K. et THE SNP WORKSHOP GROUP, 2004: SNPs in ecology, evolution and conservation. - Trends in Ecology & Evolution 19: 208-216.
- MAYR E., 2001: Co je evoluce: Aktuální pohled na evoluční biologii. - Nakladatelství Academia, Praha, 354 s.
- NYSTRÖM V., ANGEBJÖRN A. et DALÉN L., 2006: Genetic consequences of a demographic bottleneck in the Scandinavian arctic fox. - OIKOS 114: 84 -94
- OLIVEIRA E. J., PÁDUA J. G., ZUCCHI M. I., VENCOVSKÝ R. et CARNEIRO VIEIRA M. L., 2006: Origin, evolution and geonome distribution of microsatellites. - Genetics and Molecular Biology 29: 294-307.
- PERTOLDI C., HANSEN M. M., LOESCHCKE V., MADSEN A. B., JACOBSEN L. et BAAGOE H., 2011: Genetic consequences of population decline in the European otter (*Lutra lutra*): an assessment of microsatellite DNA variation in Danish otters from 1883 to 1993. - Proceedings of the Royal Society, London 268: 1775-1781.
- PIRY S., LUIKART G. et CORNUET J.-M., 1999: BOTTLENECK: A computer program for detecting recent destruktions in the effective population size using allele

- frequency data. - The Journal of Heredity 90: 502-503.
- PRIMACK R. B., 2001: Biologické principy ochrany přírody. - Portál, s.r.o., Praha, 349 s.
- PROCHÁZKA P., BELLINIA E., FAINOVÁ D., HÁJKOVÁ P., ELHALAH A. et ALOMARI K., 2008: Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan. - Journal of Arid Environments: doi10.1016/j.jaridenv.2008.02.005.
- PUCEK Z., SEAL U. S. et MILLER P. M., 1996: Population and habitat viability assessment for the European bison (*Bison bonasus*). - Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, Minnesota, USA.
- PRINCEÉ F. P.G.: Genetic management of small populations. - EAZA/EEP, Amsterdam.
- REED D. H. et FRANKHAM R., 2002: Population fitness is correlated with genetic diversity. - Conservation biology 17: 230-237.
- RELICHOVÁ J., 2001: Genetika populací. - Masarykova univerzita, Brno, 188 s.
- SCHADT S., REVILLA E., WIEGAND T., KNAUER F., KACZENSKY P., BREITENMOSER U., BUFKA L., ČERVENÝ J., KOUBEK P., HUBER T., STANISA C. et TREPL L., 2002: Assessing the suitability of central European landscapes for the reintroduction of Eurasian lynx: Applied issues with predators and predation. - Journal of applied ecology 39: 189-203.
- SPIELMAN D., BROOK B. W. et FRANKHAM R., 2004: Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. - Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 15261-15264.
- STORZ J. F. et BEAUMONT M. A., 2002: Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. - Evolution 56: 154-196.
- ŠÁLEK M. et MARHOUL P., 1999: Sezónní dynamika a příčiny ztrát koroptve polní (*Perdix perdix*): výsledky sčítání a telemetrického sledování v letech 1997-1999. Sylvia, 35: 55-67.
- ŠÁLEK M., MARHOUL P., PINTÍŘ J., KOPECKÝ T. et SLABÝ L., 2004: Importance of unmanaged wasteland patches for the grey partridge *Perdix perdix* in suburban habitats. - Acta Oecologica, 25: 23-33.
- ŠMARDA J., DOŠKAŘ J., PANTUČEK R., RŮŽIČKOVÁ V. et KOPTÍKOVÁ J., 2005: Metody molekulární biologie. - Masarykova univerzita, Brno, 186s.
- ŠTASTNÝ K., BEJČEK V., HUDEC K., 2006: Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice. - Aventinum s.r.o., Praha.
- TAJIMA F., 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics. 123:585-595.

- TAUTZ D., 1989: Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. - *Nucleic Acid Research* 17: 6463-6471.
- THORNHILL N. W. (ed.), 1993: *The Natural History of Inbreeding and Outbreeding*. University of Chicago Press, Chicago *in* PRIMACK R. B., 2001: *Biologické principy ochrany přírody*. - Portál, s.r.o., Praha, 349 s.
- TOKARSKA M., PERTOLDI C., KOWALCZIK R. et PERZANOWSKI K., 2011: Genetic status of the European bison *Bison bonasus* after extinction in the wild and subsequent recovery. - *Mammal review* 41: 151-162.
- TUCKER G. M. et HEATH M. F. (Eds.), 1994: *Birds in Europe: their conservation status*. Birdlife International (Birdlife Conservation Series, No. 3.), University Press Publisher, Cambridge.
- VOLF J., 2004: *Pedigree book of the Przewalski's horse (Equus przewalskii)*. - Prague Zoo, Prague, Czech republic.
- WAYNE R.K, LEHMANN N., GIRMAN D., GOGAN P. J. P., GILBERT D. A., HANSEN K., PETERSON R. O., SEAL U. S., EISENHAWKER A., MECH L. D. et KRUMENAKER R. J., 1991: Conservation genetics of the endangered Isle Royale gray wolf. - *Conservation Biology* 5: 41-51.
- WILLIAMSON-NATESON E.G., 2005: Comparison methods for detecting bottlenecks from microsatellite loci. - *Conservation Genetics* 6: 551-562.
- ZHANG B., LI M., ZHANG Z., GOOSSENS B., ZHU L., ZHANG S., HU J., BRUFORD M. W. et WEI F., 2007: Genetic Viability and Population History of the Giant Panda, Putting an End to the "Evolutionary Dead End"? - *Molecular Biology Evolution* 24: 1801–1810.

Příloha č. 1

| Autor | Rok | Druh | Třída | gen.doba | Zdroj DNA | Marker | Počet lokusů | Muzeum | Analýza | Model | Výsledek |
|-------------------|------|----------------------------------|----------|----------|----------------------|---------------|--------------|--------|---|-------------------|-----------------------|
| Rooney et al. | 1999 | <i>Balaena mysticetus</i> | Mammalia | 52 | tkáň | mikrosatelity | 20 | ne | Bottleneck: H Bottleneck: H Bottleneck: mode-shift | IAM SMM | ano ano ne |
| Zhang et al. | 2000 | <i>Pongo pygmaeus</i> | Mammalia | 20 | krev, tkáň | mikrosatelity | 20 | ne | Bottleneck: H Bottleneck: H Bottleneck: mode-shift | IAM SMM | ne ne ne |
| Lee et al. | 2001 | <i>Emberiza citrinella</i> | Aves | 3 | peří | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H Bottleneck: H Bottleneck: H | IAM SMM TPM | ano ne ano |
| Estoup et al. | 2001 | <i>Bufo marinus</i> | Amphibia | 1 | tkáň | mikrosatelity | 10 | ne | Bottleneck: H MSVAR | SMM | ano ano |
| Bowyer et al. | 2001 | <i>Dendrolagus lumholtzi</i> | Mammalia | 7 | tkáň | mikrosatelity | 20 | ne | Bottleneck: H Bottleneck: H Bottleneck: mode-shift | SMM TPM | ne ne ne |
| Dallas et al. | 2002 | <i>Lutra lutra</i> | Mammalia | 3 | tkáň, peří, skořápky | mikrosatelity | 12 | ne | M Ratio | | ano |
| Sinclair et al. | 2002 | <i>Potorous Gilbertii</i> | Mammalia | 2 | tkáň | mikrosatelity | 5 | ne | Bottleneck: H Bottleneck: H Bottleneck: H | IAM SMM TPM | ano ano ano |
| Kuo et Janzen | 2003 | <i>Terrapene ornata</i> | Reptilia | 18 | krev | mikrosatelity | 16 | ne | Bottleneck: H M Ratio | TPM | ne ne |
| Majora et al. | 2003 | <i>Nectomys squamipes</i> | Mammalia | 2 | krev, tkáň | mikrosatelity | 5 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Hutchinson et al. | 2003 | <i>Gadus morhua</i> | Pisces | 1 – 2 | krev, tkáň | mikrosatelity | 3 | ne | M Ratio | | ano |
| Kim et al. | 2003 | <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> | Pisces | 1 – 2 | tkáň | mikrosatelity | 13 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Lucchini et al. | 2004 | <i>Canis lupus</i> | Mammalia | 3 | tkáň, krev | mikrosatelity | 17 | ne | Bottleneck: H M Ratio MSVAR | TPM TPM SMM | ne ne ano |
| Thévenon et al. | 2004 | <i>Cervus nippon pseudaxis</i> | Mammalia | 4 | tkáň | mikrosatelity | 9 | ne | Bottleneck: H Bottleneck: H Bottleneck: H Bottleneck: mode-shift | IAM SMM TPM | ano ne ne ne |
| Pastor et al. | 2004 | <i>Monachus monachus</i> | Mammalia | 9 | tkáň | mikrosatelity | 15 | ne | Bottleneck: H Bottleneck: mode-shift M Ratio | TPM | ano ano ne |
| Andersen et al. | 2004 | <i>Hyla arborea</i> | Amphibia | 2 – 5 | tkáň | mikrosatelity | 12 | ne | M Ratio | | ano |
| Lambert et al. | 2005 | <i>Philesturnus carunculatus</i> | Aves | 3 | krev | mikrosatelity | 15 | ne | Bottleneck: H Bottleneck: H Bottleneck: H | IAM SMM TPM | ano ano ano |
| Aspi et al. | 2005 | <i>Canis lupus</i> | Mammalia | 3 | tkáň, krev | mikrosatelity | 10 | ne | Bottleneck: H M Ratio MSVAR | TPM | ano ano? ano |
| Veit et al. | 2005 | <i>Dendroica celurela</i> | Aves | 2 | krev | mikrosatelity | 5 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |

Příloha č. 1

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|----------------------------------|----------|----|-------------------------|---------------|----|-----|------------------------|-----|-----|
| Zenger et al. | 2005 | <i>Isoodon obesulus</i> | Mammalia | 2 | tkáň | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| Hansen et Jensen | 2005 | <i>Salmo trutta</i> | Pisces | 2 | krev, tkáň | mikrosatelity | 8 | ne | M Ratio | TPM | ano |
| Spear et al. | 2005 | <i>Ambystoma tigrinum</i> | Amphibia | 4 | tkáň | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Korfanta et al. | 2005 | <i>Athene cunicularia</i> | Aves | 9 | krev | mikrosatelity | 7 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ne |
| Hailer et al. | 2006 | <i>Haliaeetus albicilla</i> | Aves | 17 | krev, peří | mikrosatelity | 26 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Hájková et al. | 2006 | <i>Lutra lutra</i> | Mammalia | 3 | tkáň, trus | mikrosatelity | 10 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | MSVAR | | ano |
| Ruiz-Garcia et al. | 2006 | <i>Panthera onca</i> | Mammalia | 5 | krev, tkáň, srst, kosti | mikrosatelity | 12 | ne | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Domínguez et al. | 2006 | <i>Zoogoneticus quitzeoensis</i> | Pisces | 4 | krev | mikrosatelity | 5 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Russello et al. | 2006 | <i>Crocodylus porosus</i> | Reptilia | 14 | krev | mikrosatelity | 6 | ne | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Bried et al. | 2006 | <i>Diomedea exulans</i> | Aves | 5 | krev | mikrosatelity | 10 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Naitoh et Ohdachi | 2006 | <i>Sorex saecutiens</i> | Mammalia | 1 | tkáň | mikrosatelity | 5 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Taylor et al. | 2007 | <i>Petroica australis</i> | Aves | 2 | tkáň | mikrosatelity | 12 | ano | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ne |
| | | | | | | | | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ne |
| Taylor et al. | 2007 | <i>Philesturnus carunculatus</i> | Aves | 3 | tkáň | mikrosatelity | 27 | ano | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |

Příloha č. 1

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|--------------------------------|----------|-------|-----------------------|---------------|----|-----|------------------------|-----|-----|
| | | | | | | | | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ne |
| Bush et al. | 2007 | <i>Dipodomys spectabilis</i> | Mammalia | 2 | tkáň | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | TPM | ne |
| Zhang et al. | 2007 | <i>Ailuropoda melanoleuca</i> | Mammalia | 5 | kev, tkáň, srst, trus | mikrosatelity | 18 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | MSVAR | SMM | ano |
| Mäkinen et al. | 2007 | <i>Gasterosteus aculeatus</i> | Pisces | 4 | tkáň | mikrosatelity | 24 | ne | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Kawamura et al. | 2007 | <i>Oncorhynchus masou</i> | Pisces | 2 | tkáň | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ne |
| Brown et al. | 2007 | <i>Falco peregrinus</i> | Aves | 4 | kev, tkáň, peří | mikrosatelity | 11 | ne | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ne |
| Ruiz-Garcia et al. | 2007 | <i>Alouatta seniculus</i> | Mammalia | 6 | kev, tkáň, kosti | mikrosatelity | 9 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| Busch et al. | 2007 | <i>Dipodomys spectabilis</i> | Mammalia | 2 | tkáň | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Procházka et al. | 2008 | <i>Acrocephalus scirpaceus</i> | Aves | 2 | kev | mikrosatelity | 10 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ne |
| | | | | | | | | | MSVAR | SMM | ano |
| Lawler | 2008 | <i>Propithecus verreauxi</i> | Mammalia | 9 | tkáň | mikrosatelity | 6 | ne | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Lindsay et al. | 2008 | <i>Dendroica chrysoparia</i> | Aves | 2 | kev | mikrosatelity | 20 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | TPM | ne |
| Larsson et al. | 2008 | <i>Tetrao tetrix</i> | Aves | 2 – 5 | tkáň, peří, skořápky | mikrosatelity | 10 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | ano | Bottleneck: H | IAM | ano |

Příloha č. 1

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|----------------------------------|----------|-------|------------------|---------------|----|----|------------------------|-----|-----|
| Bergl et al. | 2008 | <i>Gorilla gorilla diehli</i> | Mammalia | 22 | tkáň, srst | mikrosatelity | 11 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Hansen et Taylor | 2008 | <i>Gymnobelideus leadbeateri</i> | Aves | 5 | krev, tkáň | mikrosatelity | 15 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Astorga et al. | 2008 | <i>Oncorhynchus tshawytscha</i> | Pisces | 1 | tkáň | mikrosatelity | 3 | ne | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Bos et al. | 2008 | <i>Ambystoma tigrinum</i> | Amphibia | 4 | tkáň | mikrosatelity | 6 | ne | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ne |
| Charlier et al. | 2008 | <i>Alces alces</i> | Mammalia | 9 | tkáň | mikrosatelity | 6 | ne | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| Zhang et al. | 2008 | <i>Cervus eldi hainanus</i> | Mammalia | 12 | krev, tkáň | mikrosatelity | 14 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Luca et al. | 2008 | <i>Delphinus delphis</i> | Mammalia | 20 | tkáň | mikrosatelity | 14 | ne | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Jackson et al. | 2008 | <i>Ursus arctos</i> | Mammalia | 13 | krev | mikrosatelity | 20 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Wisely et al. | 2008 | <i>Mustela nigripes</i> | Mammalia | 3 | krev | mikrosatelity | 7 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| Fleischer et al. | 2008 | <i>Corvus corax</i> | Aves | 3 | krev, tkáň, peří | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Scandura et al. | 2009 | <i>Alectoris barbara</i> | Aves | 5 | tkáň, krev, peří | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Hundertmark et al. | 2009 | <i>Cervus elaphus roosevelti</i> | Mammalia | 8 | tkáň, srst | mikrosatelity | 15 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | TPM |
| Corti et al. | 2009 | <i>Hippocamelus bisulcus</i> | Mammalia | 3 | tkáň | mikrosatelity | 14 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Schultz et al. | 2009 | <i>Monachus schauinslandi</i> | Mammalia | 15 | tkáň | mikrosatelity | 7 | ne | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Alter et al. | 2009 | <i>Eschrichtius robustus</i> | Mammalia | 20 | tkáň | mikrosatelity | 9 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Matsumoto et al. | 2009 | <i>Brycon insignis</i> | Pisces | 1 – 2 | tkáň | mikrosatelity | 5 | ne | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Ruiz-Garcia et al. | 2009 | <i>Cervus elaphus</i> | Mammalia | 5 | krev | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Wang | 2009 | <i>Bufo exsul</i> | Amphibia | 1 – 2 | tkáň | mikrosatelity | 16 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |

Příloha č. 1

| | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|---------------------------------------|----------|-------|------------|------------------|----|----|------------------------|-----|-----|
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ne |
| Wu et Hu | 2009 | <i>Bufo gargarizans</i> | Amphibia | 2 | tkáň | mikrosatelity | 7 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| Marshall et al. | 2009 | <i>Nerodia erythrogaster neglecta</i> | Reptilia | 2 | tkáň | mikrosatelity | 7 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Givens et al. | 2009 | <i>Balaena mysticetus</i> | Mammalia | 52 | tkáň | mikrosatelity | 22 | ne | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Durrant et al. | 2009 | <i>Myotis bechsteinii</i> | Mammalia | 2 – 3 | tkáň | mikrosatelity | 8 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Cristescu et al. | 2010 | <i>Phascolarctos cinereus</i> | Mammalia | 5 | tkáň | mikrosatelity | 15 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | mikrosatelity p | 11 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | mikrosatelity in | 4 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| Lawler | 2010 | <i>Propithecus verreauxi</i> | Mammalia | 9 | krev, srst | mikrosatelity | 6 | ne | M Ratio | TPM | ne |
| | | | | | | | | | MSVAR | SMM | ano |
| Han et al. | 2010 | <i>Phoca largha</i> | Mammalia | 3 – 5 | tkáň, srst | mikrosatelity | 15 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Ferchaud et al. | 2010 | <i>Vipera ursinii ursinii</i> | Reptilia | 5 | tkáň | mikrosatelity | 11 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | MSVAR | | ano |
| Gaur et al. | 2010 | <i>Anas platyrhynchos</i> | Aves | 3 | krev, tkáň | mikrosatelity | 24 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Durrant et al. | 2010 | <i>Pyrrhula pyrrhula</i> | Aves | 3 | krev | mikrosatelity | 22 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ne |
| Gonz-Suárez et al. | 2010 | <i>Zalophus californianus</i> | Mammalia | 12 | tkáň | mikrosatelity | 10 | ne | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Echelle et al. | 2010 | <i>Macrochelys temminckii</i> | Reptilia | 50 | tkáň | mikrosatelity | 11 | ne | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |

Příloha č. 1

| | | | | | | | | | | | |
|------------------|------|-------------------------------|----------|-------|-------------------------|---------------|----|-----|------------------------|-----|-----|
| Charruau et al. | 2011 | <i>Acinonyx jubatus</i> | Mammalia | 6 | krev, tkáň, srst, kosti | mikrosatelity | 18 | ano | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ano |
| Pertoldi et al. | 2011 | <i>Lutra lutra</i> | Mammalia | 3 | tkáň | mikrosatelity | 12 | ano | Bottleneck: H | IAM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | MSVAR | SMM | ano |
| Brekke et al. | 2011 | <i>Notiomystis cincta</i> | Aves | 4 | krev | mikrosatelity | 19 | ne | Bottleneck: H | IAM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | SMM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Miller et al. | 2011 | <i>Oligosoma suteri</i> | Amphibia | 2 | tkáň | mikrosatelity | 10 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ne |
| Rodriguez et al. | 2011 | <i>Crocodylus acutus</i> | Reptilia | 12 | krev, tkáň | mikrosatelity | 10 | ne | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| Miyake et al. | 2011 | <i>Rhodeus atremius</i> | Pisces | 3 – 5 | tkáň | mikrosatelity | 7 | ne | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: mode-shift | | ano |
| Andersen et al. | 2011 | <i>Phoca vitulina</i> | Mammalia | 9 | tkáň | mikrosatelity | 15 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |
| McEqchern et al. | 2011 | <i>Spermophilus lateralis</i> | Mammalia | 2,5 | srst | mikrosatelity | 6 | ne | Bottleneck: H | SMM | ne |
| | | | | | | | | | Bottleneck: H | TPM | ne |
| | | | | | | | | | M Ratio | | ano |
| Agudo et al. | 2011 | <i>Neophron percnopterus</i> | Aves | 13 | krev | mikrosatelity | 22 | ne | Bottleneck: H | TPM | ano |