Masarykova univerzita v Brně
Přírodovědecká fakulta
Ústav botaniky a zoologie

Příbuzenská struktura a paternita v přírodní populaci solitérního rypoše *Heliophobius argenteocinereus*

Diplomová práce

2007 Bc. Hana Patzenhauerová

Vedoucí DP: Mgr. et. Mgr. Josef Bryja, PhD.

Poděkování:

Na prvním místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Josefu Bryjovi nejen za nesmírnou pomoc při psaní této práce, ale i za její zajímavé téma. Děkuji také Radimu Šumberovi za sběr materiálu v Malawi a za nekonečnou ochotu odpovídat na všetečné otázky týkající se rypošího života. Dále bych ráda poděkovala všem lidem, kteří patří k laboratořím Oddělení populační biologie ÚBO ve Studenci, kde byla tato práce zpracována, za vytvoření úžasného kolektivu.

OBSAH

1 Abstrakt....4

Abstract....5

2 Úvod....6

2.1 Rypošovití a jejich sociální systémy....6

2.2 Dosavadní poznatky o biologii rypoše stříbřitého....10

2.3 Genetické markery používané k analýzám příbuzenské struktury a párovacích systémů....15

2.4 Genetické párovací systémy a příbuzenská struktura populací podzemních savců....17

3 Cíle práce....19

4 Materiál a metodika....20

5 Výsledky....31

6 Diskuze....43

7 Literatura....51

1 Abstrakt

Rypoš stříbřitý (*Heliophobius argenteocinereus*) je solitérní podzemní hlodavec, patřící do čeledi rypošovití (Bathyergidae), která zahrnuje jak druhy solitérní, tak druhy sociální a také druhy, u nichž se vyvinula pro savce ojedinělá eusocialita. Cílem této práce bylo sledovat genetickou diferenciaci mezi populacemi rypoše stříbřitého, stanovit paternitu a maternitu mláďat na intenzivně sledované lokalitě Mpalanganga, charakterizovat párovací systém druhu a analýzou vícečetných vrhů z různých lokalit sledovat přítomnost vícenásobné paternity. Celkem byl analyzován genotyp 110 jedinců rypoše stříbřitého na osmi polymorfních mikrosatelitových lokusech. Vzorky zvířat pocházely ze šesti lokalit v jižním Malawi, polovina jich pocházela z populace Mpalanganga. Mezi populacemi vzdálenými 18 až 84 km byly zjištěny významné genetické rozdíly (F_{ST} = 0,1528) a nebyly nalezeny doklady recentního toku genů mezi nimi, což potvrzuje prostorově značně omezený tok genů mezi populacemi a velký význam genetického driftu v poměrně izolovaných populacích. Na lokalitě Mpalanganga byl stanoven otec tří z osmi vrhů, zplozených v roce 2005 a rodičovský pár čtyř z deseti subadultních jedinců, jejichž narození spadá do roku 2004. V každém roce se na lokalitě vyskytoval jeden samec, který byl otcem tří (rok 2005), resp. čtyř vrhů (rok 2004). Toto zjištění poukazuje na polygynní párovací systém rypoše stříbřitého, ačkoliv byl dříve považován za monogamního. Ani u jednoho z 10 analyzovaných vícečetných vrhů nebyla prokázána vícenásobná paternita. Dále bylo zjištěno, že vzdálenost norových systémů nekoreluje se vzájemnou příbuzností jedinců, což naznačuje poměrně velký význam disperze při formování genetické struktury populací.

Abstract

The silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*) is a solitary subterranean rodent from the family Bathyergidae. This family includes besides solitary and social species also species with eusocial life style, which is exceptional in mammals. The aim of this study was to compare genetic differentiation of populations of the silvery mole-rat, to assess paternity and maternity at the intensively studied locality Mpalanganga, to estimate the mating system of this species and through the analysis of 10 multiple litters assess the occurence of multiple paternity. Altogether the genotypes on eight polymorphic microsatellite markers were obtained for 110 individuals. The samples were collected at six localities in southern Malawi (half of them from the Mpalanganga population). The populations (distant from 18 to 84 km) were genetically significantly different (F_{ST} = 0,1528) and no evidence of recent gene flow was found indicating spatialy restricted gene flow and important effect of genetic drift in isolated populations. At the Mpalanganga locality, the father that sired three of eight litters born in 2005 was assessed and also the parental pair of four out of ten subadults born in 2004. In 2005, a single male sired three litters, another male fathered four youngs in 2004. This findings suggest the polygynous mating system in the silvery mole-rat, although it has been thought to be monogamous. Multiple paternity was not found in any of the 10 multiple litters included in the analysis. The distance between burrows does not correlate with genetic relatedness which suggests relatively high importance of dispersal in forming genetic structure of populations.

2 Úvod

2.1 Rypošovití a jejich sociální systémy

Rypošovití (Bathyergidae) jsou endemickou čeledí afrických podzemních hlodavců. Patří do skupiny hystrikognátních hlodavců, čímž jsou nepříbuzní většině hlodavců Starého světa. Vznikly časnou radiací hystrikognátních hlodavců a řadí se do skupiny Phiomorpha. V současné době se do této čeledi řadí 22 druhů v 6 rodech (Ingram et al. 2004; Kock et al. 2006; Tab. 1), ale počet druhů i systematické vztahy uvnitř čeledi se neustále mění v důsledku genetických analýz mitochodriálních genů (Allard & Honeycutt 1992), jaderných genů (Walton et al. 2000) a karyotypu (Burda et al. 1999). Všichni zástupci čeledi se vyskytují jižně od Sahary, velikost areálu se mezi jednotlivými druhy liší. Největší areály rozšíření (podle Faulkes et al. 2004) mají rypoš lysý (*Heterocephalus glaber*; Somálsko, východní část Etiopie) a rypoš stříbřitý (*Heliophobius aregenteocinereus*; jih Keni, Tanzánie, Malawi, sever Mosambiku, jihovýchod Zairu, východ Zambie), na rozsáhlém území se vyskytují také rypoš obří (*Fukomys mechowi*; jih Zairu, východ Angoly, Zambie), rypoš damarský (*Fukomys damarensis*; Botswana, východ Namibie) a rypoš hotentotský (*Cryptomys hottentotus*; Jihoafrická republika). Oproti tomu rypoš písečný (*Bathyergus janetta*), rypoš prasečí (*Bathyergus suillus*) a rypoš kapský (*Georychus capensis*) žijí pouze na malém území na západě Jihoafrické republiky, rypoš kapský navíc v několika dalších nevelkých oblastech této země. Zbývající druhy rodů *Cryptomys* a *Fukomys* obývají menší areály v různých částech subsaharské Afriky.

Výhodou podzemního způsobu života je zejména úkryt před denními výkyvy teplot, ročními změnami klimatu a ochrana před predátory. Na druhou stranu je život pod zemí z lidského hlediska náročný v důsledku nízké produktivity prostředí, vysokých energetických nároků kvůli hrabání nor, vysoké vlhkosti, tmy, nízké výměny plynu, nedostatku kyslíku a nadbytku oxidu uhličitého (Nevo 1999). Aby se s těmito podmínkami vyrovnali, mají rypoši, stejně jako jiné druhy podzemních savců, různé morfologické, fyziologické a behaviorální adaptace. Např. pro hrabání nor využívají velké řezáky, přičemž čelisti jsou upraveny tak, aby zemina nevnikala do jícnu (Bennett & Jarvis 2004). V porovnání k velikosti těla mají nízký bazální metabolismus (Bennett et al. 1992). Vodu nepřijímají v tekuté formě, ale získávají ji z konzumovaných geofytů. Tyto a další adaptace napomáhají rypošům přežít v bezpečném, ale náročném prostředí podzemních nor.

Tab. 1 Přehled v současnosti uznávaných druhů čeledi rypošovitých (Bathyergidae). Pro úplnost jsou uvedeny i anglické názvy druhů. Rod *Fukomys* byl vyčleněn z rodu *Cryptomys* jako rod *Coetomys* (Ingram et al. 2004), ale později byl přejmenován na *Fukomys* (Kock et al. 2006).

- Podčeleď Bathyerginae
  - *Georychus* - Cape Blesmol
    - *Georychus capensis* – **rypoš kapský** - Cape Blesmol
  - *Fukomys*
    - *Fukomys amatus* - Zambian Blesmol
    - *Fukomys anselli* - Ansell's Blesmol
    - *Fukomys bocagei* – **rypoš hrabavý** - Bocage's Blesmol
    - *Fukomys damarensis* – **rypoš damarský** - Damaraland Blesmol
    - *Fukomys darlingi* - Mashona Blesmol
    - *Fukomys foxi* – **rypoš Foxův** - Nigerian Blesmol
    - *Fukomys kafuensis* - Kafue Blesmol
    - *Fukomys mechowi* – **rypoš obří** - Mechow's Blesmol
    - *Fukomys micklemi* - Kataba Blesmol
    - *Fukomys ochraceocinereus* – **rypoš okrový** - Ochre Blesmol
    - *Fukomys whytei* - Malawian Blesmol
    - *Fukomys zechi* – **rypoš Zechův** - Ghana Blesmol
  - *Cryptomys*
    - *Cryptomys anomalus*
    - *Cryptomys holosericeus*
    - *Cryptomys hottentotus* – **rypoš hotentotský -** Hottentot Mole Rat
    - *Cryptomys natalensis* - Natal Mole Rat
    - *Cryptomys nimrodi* - Matabeleland Mole Rat
  - *Heliophobius* - Silvery Blesmol
    - *Heliophobius argenteocinereus* – **rypoš stříbřitý** - Silvery Blesmol
  - *Bathyergus* - Dune blesmols
    - *Bathyergus janetta* – **rypoš písečný** - Namaqua Dune Mole Rat
    - *Bathyergus suillus* – **rypoš prasečí** - Cape Dune Mole Rat
- Podčeleď Heterocephalinae
  - *Heterocephalus*
    - *Heterocephalus glaber* – **rypoš lysý** - Naked Mole Rat

U rypošů se vyvinulo několik typů sociálního uspořádání (Jarvis & Bennett 1990, Jarvis et al. 1994). Druhy rodů *Heliophobius*, *Bathyergus* a *Georychus* jsou striktně solitérní, každý jedinec obývá vlastní systém podzemních nor a mezi sebou se setkávají pouze za účelem páření. Zástupci rodů *Fukomys*, *Cryptomys* a *Heterocephalus* vytvářejí sociální kolonie s širokou škálou strategií kooperativního páření, jež zamezuje příbuzenskému páření. Kupříkladu rypoš hotentotský (*C. h. hottentotus*) vytváří kolonie, kde se rozmnožuje nejstarší pár a zbytek tvoří jeho potomci (Bennett 1989). Navíc v kolonii žijí nepříbuzní jedinci, jež do kolonie imigrovali (Bishop et al. 2004). Ačkoliv se podřízení jedinci jeví jako reprodukčně

neaktivní, jejich pohlavní orgány si zachovávají funkčnost. Členové kolonie se striktně vyhýbají příbuzenskému páření (Spinks et al. 1997) a poměrně často dochází k páření mezi jedinci ze sousedních kolonií (Bishop et al. 2004).

Nejvíce sociální uspořádání mají rypoš lysý (*H. glaber*) a rypoš damarský (*F. damarensis*), podle některých autorů (Burda et al. 2000) i některé a možná dokonce i všechny druhy rodu *Fukomys*. Společenská struktura v jejich koloniích je obdobou eusociálního uspořádání některých druhů hmyzu, jako jsou mravenci a včely. U savců lze eusocialitu chápat jako systém, kdy dochází k celoživotní filopatrii a kdy se většina potomků nedočká vlastní reprodukce. Eusociální systém není znám pro žádného jiného savce. Zmíněné dva druhy vytváří dlouhotrvající stabilní kolonie, kde se páří pouze jedna samice a jeden nebo několik samců. Zbylí příslušníci kolonie se nepáří, ale obstarávají potravu, vyhrabávají nory, brání kolonii a starají se o své sourozence. U rypoše lysého se vlastního reprodukčního úspěchu dočká méně než jedno procento zvířat, u rypoše damarského je to méně než osm procent (Jarvis et al. 1994). Ostatní zvířata se nemnoží buď pro nedostatek reprodukčních příležitostí nebo následkem suprese rozmnožující se samicí (Faulkes & Bennett 2001, Burland et al. 2004). U rypoše lysého se také předpokládá, že má opožděný nástup puberty, takže v přirozených podmínkách zvíře často zemře dříve, než pohlavně dospěje a začne dispergovat. U rypoše damarského může být disperze indukována pouze při setkání s vhodným nepříbuzným sexuálním partnerem (Burda et al. 2000).

Bylo by možné předpokládat, že fylogeneze rypošů bude korelovat se sociálním systémem jednotlivých druhů. Proto je celkem překvapivé, že podle genetických studií mitochondriální (Allard & Honeycutt 1992) a jaderné (Walton et al. 2000) DNA nejsou oba eusociální druhy sesterskými skupinami. To znamená, že eusocialita, už tak pro savce netypická, se u rypošů v minulosti vyvinula dvakrát nezávisle na sobě. Pochopení této konvergence povede k pochopení vývoje (eu)sociality jako takové. Vyvstává tak otázka, jaké jsou příčiny vzniku eusociality u těchto dvou druhů.

Jedním z důležitých faktorů, o kterém se předpokládá, že ovlivňuje typ sociálního uspořádání pro daný druh, je množství srážek a s tím související fyzikální a chemické parametry půdního prostředí a potravní nabídka (Faulkes et al. 1997). Oba eusociální druhy žijí v aridních oblastech, kde nelze předvídat déšť a kde je relativní nedostatek potravy. Vzhledem k tomu, že hrabání v tvrdé zemi je energeticky náročné, jsou zvířata nucena ke sdružování a kooperaci (Lovegrove 1991). Omezená dostupnost potravy však omezuje i počet zvířat na lokalitě a na řadu přichází problém páření. Jestliže spolu několik jedinců spolupracuje, bude jejich příbuznost pravděpodobně značně vysoká a nepříbuzných jedinců

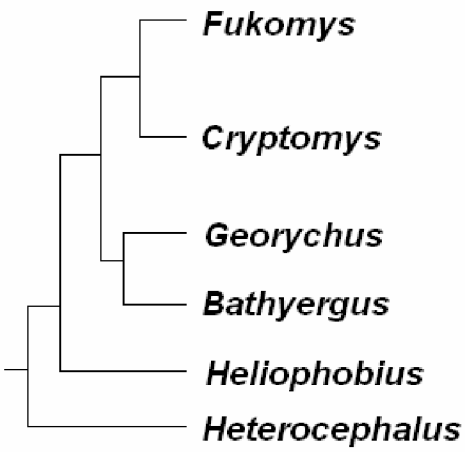
bude v okolí nedostatek. Eusocialitu by tak bylo možno považovat za adaptivní odpověď k limitovaným možnostem páření s nepříbuznými jedinci (tj. vyhýbání se inbreedingu). Genetické analýzy prokázaly, že v rámci kolonií rypoše lysého je průměrná příbuznost jedinců poměrně vysoká (Reeve et al. 1990) a při laboratorních experimentech se ukázalo, že zvířata obecně preferují možnost pářit se s nepříbuzným jedincem (Ciszek 2000; Braude 2000). U rypoše damarského je dokonce známo, že se páření s příbuznými aktivně vyhýbá (Cooney & Bennett 2000).

Teorii o vlivu množství srážek na typ sociálního systému - „Aridity food distribution hypothesis (AFDH)“ (Jarvis et al. 1994) - podporuje i již zmíněný rypoš hotentotský, který obývá poměrně velký areál a žije v biotopech s odlišnými ekologickými podmínkami, zejména srážkami a produktivitou biomasy. V souladu s touto hypotézou byly skutečně zaznamenány jisté rozdíly v sociálním uspořádání mezi koloniemi žijícími v aridních a humidních oblastech (Bishop 2004). Nicméně existuje několik výjimek, které tuto hypotézu nepotvrzují. Například solitérní rypoš písečný (*Bathyergus janetta*) by měl hypoteticky žít na humidních územích s vysokou nabídkou potravy, ve skutečnosti však žije v nejsušších oblastech Jihoafrické republiky a Namibie (Skinner & Smithers 1990).

Proti AFDH stojí hypotéza, že život ve skupině je pro čeleď rypošovití ancestrálním znakem a odvozeným je naopak solitérní způsob života (Burda et al. 2000; „The hypothesis of phylogenetic constraints“). Tuto teorii podporuje fakt, že 80 % druhů rypošů je sociálních. AFDH navíc nedostatečně vysvětluje vznik eusociality. Hypotézy se zásadně liší pouze v tvrzení, které sociální uspořádání je ancestrálním znakem. V obou případech však muselo dojít ke konvergentnímu vývoji, buďto byl dvakrát ztracen sociální způsob života nebo se dvakrát rozvinul eusociální. Abychom evoluci a adaptivnímu významu sociality u rypošů porozuměli co nejlépe, je potřeba získat co nejvíce detailních informací o jednotlivých druzích, a to nejen o sociálních druzích, ale i solitérních.

2.2 Dosavadní poznatky o biologii rypoše stříbřitého

Rypoš stříbřitý (*Heliophobius argenteocinereus*) je africký podzemní hlodavec z čeledi rypošovití (Bathyergidae). Je zástupcem monotypického rodu *Heliophobius*, který tvoří jednu z bazálních větví čeledi Bathyergidae (Obr. 1). Má jeden z největších areálů výskytu v rámci čeledě. Až donedávna neexistovaly téměř žádné informace o jeho biologii. V poslední době dochází k intenzivnímu studiu tohoto behaviorálně zajímavého druhu a postupně jsou odhalovány jednotlivé aspekty jeho života (review Šumbera et al. 2007). Stále však není známo nic o jeho párovacím systému a o příbuzenské struktuře v rámci jednotlivých populací. Získání těchto údajů je důležité pro ucelení našich znalostí o čeledi rypošovitých, která se jeví jako velmi vhodný model pro studium evoluce sociálního života savců (Jarvis et al. 1994; Burda et al. 2000).

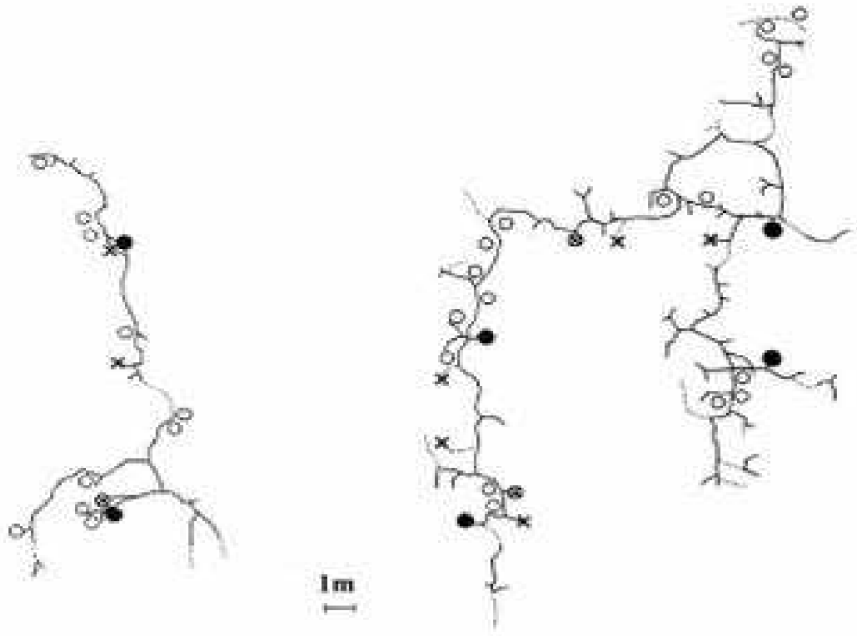


Obr. 1 Fylogenetické vztahy čeledi rypošovití. Strom vznikl spojením poznatků získaných na základě různých molekulárně genetických metod. Převzato z Van Daele et al. 2007.

Biotopy a podzemní systémy

Pro rypoše stříbřitého jsou nejtypičtějším biotopem travinné porosty ve vyšších nadmořských výškách (např. alpinské louky) a řídké lesy tvořené stromy rodu *Brachystegia* („miombo“) s ročními srážkami nad 900 mm (Burda 2001). V podstatě jediné doposud blíže studované populace se nacházejí v Keni a jižním Malawi, kde jsou typická tři klimatická období (Šumbera et al. 2007) - období dešťů (říjen – duben), chladné období sucha (duben – červenec) a horké období sucha (srpen – říjen). Díky vegetačnímu pokryvu a vrstvě zeminy nad norami se v podzemních systémech v průběhu dne drží stálé mikroklima (Šumbera et al. 2004), což je typické i pro systémy ostatních podzemních savců (Bennett et al. 1988).

Podzemní systém rypoše stříbřitého zpravidla sestává z dlouhého hlavního tunelu s různým počtem bočních větví, spojek mezi chodbami, hnízdních dutin a komor na skladování potravy. Někdy ale mohou být systémy velmi složité a hlavní tunel není snadné identifikovat (Šumbera et al. 2007). V souvislosti se sezónními změnami se mění i tvrdost půdy, následkem čehož se mění i architektura podzemních systémů (Šumbera et al. 2003a, Obr. 2) Hrabání nor je nejsnadnější po skončení období dešťů, kdy je půda nejměkčí. V této době rypoš stříbřitý hrabe dlouhé málo větvené chodby hlavně za účelem prozkoumání okolí a pravděpodobně zejména potencionálních zdrojů potravy. S postupem období sucha je hrabání stále energeticky náročnější. Rypoši hrabou s nezmenšenou intenzitou, věnují se však více hrabání krátkých bočních a spojovacích tunelů, aby maximalizovali efektivitu při hledání potravy. Mění se i množství nadzemních krtin, neboť v období sucha je jich vytlačováno méně a vyhrabaná hlína je spíše místo na povrch deponována do již nepotřebných starých tunelů. Způsob hrabání tunelů souvisí i s množstvím dostupné potravy, na místech s větším množstvím geofytů jsou nory více zesíťované. V prostředí lesa miombo vyhloubí denně jeden rypoš v průměru chodbu o délce 0,7 m (Šklíba et al., submitted).



Obr. 2 Nákresy podzemních systémů rypoše stříbřitého. Vlevo systém v chladném období sucha, vpravo v horkém období. Prázdný kruh – krtina, plný kruh – hnízdní dutina, překřížený kruh – zásobárna potravy, křížek – sanitární prostor (místo pro vylučování), přerušovaná čára symbolizuje znovuucpané tunely. Převzato ze Šumbera et al. 2003a.

Potrava a škody způsobené v zemědělství

Co se týče vyhledávané potravy, rypoš stříbřitý je generalista, jehož základní složkou potravy jsou podzemní orgány různých rostlin, např. *Vigna vexillata*, *Dolichos kilimandscharicus*, *Gladiolus dallenii*, *Hypoxis sp.* a další (Šumbera et al. 2007). Rypoš stříbřitý preferuje místa, kde se vyskytují co největší hlízy těchto rostlin, zejména vigny. V kulturní krajině se rypoš stříbřitý vyskytuje i na polích, kde jsou jeho nory delší a hlubší, neboť v půdě rozrušené zemědělskou aktivitou je větší riziko propadnutí stropu nory, ale zato je zde snazší hrabání (Šumbera et al. 2004). Zároveň se stává celkem vážným škůdcem, neboť ožírá hlízy a kořeny kulturních rostlin jako je maniok, batáty, jam, kokosová palma, podzemnice olejná, kukuřice a další. Navíc často podzemní orgány rostliny pouze částečně poškodí a přechází na další rostlinu. Za den je jeden rypoš schopen takto znehodnotit několik rostlin, neboť v lehké orné půdě je během dne schopen vytvořit několik metrů nových tunelů.

Pohlavní dimorfismus a rozmnožování

Velikostí se rypoš stříbřitý řadí mezi středně velké druhy rypošů. Dospělí samci jsou těžší (průměrná váha 190 ± 58 g) než samice (162 ± 47 g; Šumbera et al. 2003b), avšak tento pohlavní dimorfismus není oproti jiným druhům příliš výrazný. Například samice rypoše písečného (*B. janetta*) jsou v průměru o čtvrtinu lehčí než samci (Herbst & Bennett 2006). Tyto výraznější rozdíly jsou však u obou druhů jen v hmotnosti, délka těla je u obou pohlaví obdobná.

Rypoš stříbřitý se páří pouze jednou ročně (Šumbera et al. 2003b; 2007). Podle všech dostupných informací se zdá, že období páření souvisí s koncem dešťů. Není známo, které faktory páření navozují, ale pravděpodobně se bude jednat o změny v prostředí (např. výskyt některých látek v potravě), neboť k páření dochází synchronně asi dva měsíce po začátku teplého období sucha. To ostatně potvrzují i události roku 2005, kdy deště skončily o dva měsíce dříve než je obvyklé a stejně tak období páření začalo také o dva měsíce dříve (Šumbera et al. 2007). V oblasti výskytu rypoše stříbřitého dochází k minimálním rozdílům v délce dne a noci v průběhu roku, proto nelze předpokládat, že by tyto změny mohly hrát významnou roli jako spouštěče reprodukční aktivity. Není také známo, jakým způsobem se potencionální partneři hledají, neexistují žádné doklady o vzájemné komunikaci na větší vzdálenosti, např. prostřednictvím tzv. „foot-drumming“ (vibrace, vzniklé dupáním), který byly popsán u pískomila velkého (*Rhombomys opinus*) (Randall et al. 2005). U rypoše stříbřitého se předpokládá, že samci v období páření vylézají na povrch a hledají nory samic, neboť nebyla nalezena žádná propojení nor samce a samice, jako tomu je např. u pytlonoše

horského (*Thomomys bottae*), kde je mezi samčí a samičí norou hlouběji v zemi společné hnízdo (Reichman et al. 1982).

K páření dochází zpravidla v květnu až červnu. Námluvy mají známky ritualizovaného chování, iniciátorem bývá zpravidla samec. Zvířata se nejprve jemně okousávají a zaklesnou se do sebe řezáky. Poté si samec nebo samice lehne na záda. Námluvy trvají přibližně dvě minuty, pak samec vyleze na hřbet samice a dochází k vlastní kopulaci (Šumbera 2001). Samice je březí přibližně 3 měsíce a průměrná velikost vrhu je podle placentálních skvrn 3,2 ± 0,9 mláďat, je však možné, že existuje prenatální regulace počtu mláďat (prenatální mortalita) (Šumbera et al. 2003b). Porod v průměrném roce připadá na srpen až září. Existuje předpoklad, že solitérní rypoši by měli mít krátkou dobu březosti, narozdíl od sociálních druhů, kterým život ve skupině umožňuje prenatální a postnatální vývoj prodloužit (Bennett et al. 2000). Tříměsíční březost rypoše stříbřitého však těmto tvrzením odporuje.

Novorozený rypoš stříbřitý váží 12,8 ± 2,3 g (Šumbera et al. 2003b). Mláďata se rodí téměř holá a slepá, oči se otvírají dva týdny po narození. Postnatální vývoj je pomalý, mladí jedinci dosáhnou průměrné váhy až po prvním roce věku. U rypošů chovaných v zajetí bylo pozorováno, že samice kojí mláďata do dvou měsíců od narození. Po odstavení mláďata ještě nějakou dobu zůstávají u matky, vážnější negativní interakce byly v zajetí pozorovány až po několika dalších týdnech až měsících (Šumbera et al. 2003b). Disperze mláďat se zdá být indukována právě agresivitou mezi matkou a mláďaty, možný je i vliv kompetice o místo v noře, neboť k agresivním projevům začíná docházet, když mládě dosáhne určité velikosti. Mladá zvířata pravděpodobně z mateřské nory odcházejí po povrchu země, neboť vzdálenosti mezi norami jsou celkem velké (8,4 ± 4,4 m; Šumbera et al. 2003a) na to, aby byly překonány pod zemí. Dalším důkazem jsou i četné nálezy lebek mladých jedinců v sovích vývržcích. Další možností získání vlastního systému může být zahrazení části podzemního systému matky. Jedná se o dlouhověké zvíře, někteří jedinci chovaní v zajetí, kteří byli odchyceni v přírodě, žijí v zajetí již sedm let (Šumbera et al. 2007).

Význam

Kromě škodlivého působení tohoto druhu na zemědělskou úrodu má rypoš stříbřitý pro člověka praktický význam i jako zdroj bílkovin. Vzhledem k tomu, že je tento druh dlouhověký a živí se trvalými rostlinami, mohly by se v jeho tkáních kumulovat těžké kovy, což by mělo negativní vliv na konzumenty. Studie, zaměřená na obsah olova, kadmia, mědi a zinku ve tkáních rypoše stříbřitého z oblasti kolem města Mulanje v Malawi ukázala, že se těžké kovy se v rypoších akumulují ve velmi nízkých koncentracích a že konzumace těchto

zvířat je bez zdravotního rizika. Stejně jako u jiných druhů savců, i u rypoše stříbřitého je koncentrace těžkých kovů vyšší v játrech než ve svalovině (Šumbera et al 2003c).

Parazité

Jednou z výhod solitérního způsobu života by mělo být nižší riziko přenosu parazitárních infekcí. Práce Scharff et al. (2001) tuto teorii potvrzuje, neboť u jedenácti zkoumaných rypošů stříbřitých ze Zambie nebyli nalezeni žádní ektoparazité nebo parazitičtí helminti. Při dalších výzkumech však byl prokázán opak, např. v hnízdech rypošů stříbřitých byli nalezeni roztoči (Šumbera et al. 2004), v jejich trávicí soustavě dva druhy helmintů (Tenora et al. 2003) a z výkalů rypoše stříbřitého byly popsány čtyři nové druhy kokcidií rodu *Eimeria* (Koudela et al. 2000; Modrý et al. 2005).

Je zřejmé, že v posledních letech je biologie a ekologie rypoše stříbřitého podrobována intenzivnímu výzkumu. Dosud však neexistují informace o genetické struktuře populací a reprodukčních strategiích tohoto solitérního druhu. Tyto informace je možno získat pouze použitím genetických markerů aplikovatelných na vnitrodruhové úrovni (např. mikrosatelitů).

2.3 Genetické markery používané k analýzám příbuzenské struktury a párovacích systémů

Jako genetický marker označujeme úsek DNA, nesoucí určitý znak, vyskytující se ve více formách (ty se obecně nazývají alely). Variabilita daného znaku umožňuje provádět genetické analýzy různých druhů rostlin a živočichů. Jednotlivé alely je třeba spolehlivě odlišovat, k čemuž jsou využívány různé typy markerů, z nichž každý má své výhody i nevýhody. Mezi používané markery patří SNPs, RAPDs, RFLPs, AFLPs, DNA fingerprinting nebo alozymy (založené na variabilitě enzymů) (Zima et al. 2004). V posledním desetiletí jsou pro nejrůznější molekulárně-ekologické aplikace velmi často používány tzv. mikrosatelity, což jsou úseky DNA tvořené mnohonásobnými tandemovými repeticemi dvou až šesti bází. Jednotlivé alely se liší počtem repeticí a následně tedy i celkovým počtem bazí, tj. délkou lokusu. Všechny alely jsou na svých okrajích vymezeny přesně definovaným sledem bazí (tzv. „flanking regions“). Tato sekvence se používá pro nasedání primeru při PCR amplifikaci daného úseku DNA.

Výhoda mikrosatelitů spočívá mimo jiné ve vysoké vnitropopulační variabilitě (např. v porovnání s alozymy) a v opakovatelnosti genotypizace (v porovnání s RAPDs markery). Používají se především při analýzách genetické struktury populací, paternity a příbuzenských vztahů na různých úrovních. K vytváření alelické variability přispívají minimálně tři molekulární mechanismy (Goldstein & Schlotterer 1999):

1) *delece (ztráta) či adice (získání) jedné nebo více repeticí* – vzniká buď jako důsledek chyby polymerázy při replikaci DNA (tzv. „sklouznutí polymerázy) nebo při nerovnoměrném crossing-overu. Alely se liší délkou a to vždy o délku repetice nebo její násobek;
2) *substituce, inzerce nebo delece v oblastech ohraničujících vlastní repetice („flanking regions“)* - tyto sekvence jsou spolu s vlastní repeticí amplifikovány PCR reakcí během genotypizace mikrosatelitů a proto rovněž přispívají k alelické variabilitě. Pokud dojde k substituci, tak nově vzniklá alela není běžnou elektroforézou rozeznatelná od původní alely, protože se neliší délkou. U adice nebo delece může dojít k nenasednutí primeru a v takovém případě se pak alela neamplifikuje (nulová alela);
3) *mutace, přerušující vlastní repetici* - opět se může jednat o inzerci, deleci nebo substituci. Při substituci dojde sice k přerušení pravidelné repetice, nicméně nová alela se délkou od původní alely neliší a elektroforézou je nerozeznatelná. Takováto alela má následně většinou sníženou mutační rychlost.

Analýzy vícenásobné paternity

Zjištění počtu otců mláďat ve vrhu či snůšce se provádí nejčastěji prostřednictvím analýzy mikrosatelitové DNA matky a jejích potomků. Podle počtu alel, které se vyskytují u mláďat, ale ne u matky, se dá odhadnout minimální počet samců, kteří se na zplození daného vrhu či snůšky podíleli. Většinou se analyzuje několik úseků DNA (lokusů), aby se předešlo omylům, jež by mohly vzniknout např. za situace, kdy dva samci mají některou z alel shodnou. Zvyšováním počtu použitých lokusů nebo zvyšováním jejich variability v rámci populace se pravděpodobnost chybného určení paternity snižuje.

Nalezení rodičů v populaci

V současné době se pro určování rodičovství (nejčastěji paternity) používají tři statistické postupy, lišící se zejména množstvím dostupných informací o sledovaných jedincích:

1) „simple exclusion“ (prosté vyloučení)

- jsou známy genotypy matky i předpokládaných otců, srovnáním genotypů rodičů a potomků jsou jednotliví otcové postupně vyloučeni, až zůstane jeden, jehož genotyp je kompatibilní s alelami mláďat. Nelze však definitivně tvrdit, že je otcem skutečně on, neboť pravý otec nemusí být vůbec navzorkován;

2) „categorical likelihood“

- s potomkem je kompatibilních více otců, které nelze vyloučit, je tedy přiřazen jednomu otci, který je nejpravděpodobnější na základě frekvence alel v populaci;

3) „fractional likelihood“

- s potomkem je opět kompatibilních více otců, potomek je však přiřazen ke všem naráz (ke každému s jinou pravděpodobností závislou na frekvenci alel v populaci), což je statisticky přesnější, není to však biologicky validní, neboť jedinec nemůže mít více otců.

2.4 Genetické párovací systémy a příbuzenská struktura populací podzemních savců

Mezi podzemní savce patří někteří hlodavci, hmyzožravci a vačnatci. Jedná se přibližně o 50 rodů z 11 čeledí, celkem několik set druhů. Dosavadní studie, týkající se populačně genetické struktury, párovacích systému a paternity podzemních hlodavců, využívající jako genetické markery mikrosatelity, se zabývaly pouze některými sociálními druhy rypošů (Burland et al. 2002; 2004; Bishop et al. 2004), jihoamerickými tukotuko z čeledi Ctenomyidae (Cutrera et al. 2005; Wlasiuk et al. 2003; El Jundi & De Freitas 2004) a slepci z rodu *Spalax* (Karanth et al. 2004).

Nejvýznamnější výsledky získané genetickou analýzou podzemních savců se týkají stanovení příbuznosti sociálních druhů rypošů. Nejznámějším rypošem je eusociální rypoš lysý (*H. glaber*). První genetické analýzy tohoto druhu pomocí DNA fingerprintigu ukazovaly na vysokou vnitrokoloniální příbuznost (∅ r = 0,81), v důsledku čehož se usuzovalo na inbrední párovací systém (Reeve et al. 1990). Později se při laboratorních pokusech a sledováním v přírodě zjistilo, že tento druh preferuje páření s nepříbuznými jedinci (Ciszek 2000, Braude 2000). Vysoký stupeň příbuznosti v rámci kolonie je tak pravděpodobně dán nedostatkem nepříbuzných sexuálních partnerů. Za eusociální druh je považován i rypoš damarský (*F. damarensis*). V jeho koloniích se rozmnožuje jedna samice a jeden, případně dva samci, kteří jsou se samicí nepříbuzní. Jejich potomci se nerozmnožují, ačkoliv jejich gonády zůstávají funkční, ale u samic nedochází k ovulaci a samčí varlata obsahují minimum spermií. Příbuznost rypošů damarských v kolonii je nižší (∅ r = 0,46) než u rypošů lysých a vzájemná příbuznost reprodukčního páru se blíží nule (∅ r = 0,02; Burland et al. 2002). Při odstranění reprodukčně aktivní samice z kolonie se reaktivují gonády ostatních samic, k páření však dochází pouze v případě jejich setkání s nepříbuzným samcem (Bennett & Jarvis 2004). Analýzou mikrosatelitů bylo zjištěno, že v koloniích rypošů damarských se vyskytují i nepříbuzní jedinci obou pohlaví, ale i přesto se reprodukčně neaktivní samice nerozmnožují. Musí tedy existovat nějaký další faktor, kterým „královna“ potlačuje jejich reprodukční aktivitu (Burland et al. 2004).

U sociálních druhů rypošů se předpokládala monogamie, kdy se v kolonii množí pouze nejstarší pár. Molekulárně genetické analýzy paternity a příbuznosti ve třinácti koloniích rypoše hotentotského (*C. h. hottentotus*) z Jižní Afriky tvrzení o těsné monogamii jasně vyvrací. Ne všechna mláďata byla zplozena největším samcem v kolonii, tedy samcem,

u kterého je předpoklad, že je dominantním samcem v kolonii, některá byla zplozena mnohem menšími samci. Na druhou stranu, dominantní samci byli prokazatelně otci některých mláďat ze sousedních kolonií (Bishop et al. 2004).

U solitérních podzemních savců existují předpoklady pro monogamii a polygynii. Jihoamerický tukotuko talaský (*Ctenomys talarum*) je považován za polygynní druh. Genetickými analýzami 12 vrhů ze dvou lokalit bylo metodou DNA fingerprinting zjištěno, že jeden adultní samec je otcem vždy více vrhů na dané lokalitě (Zenuto et al. 1999). Analýzou mikrosatelitů u stejného druhu byla sledována populačně genetická struktura ve dvou oblastech, vzdálených 140 km. V obou oblastech byly vymezeny tři odchytové lokality, jejichž vzdálenost byla 3 km. Oblasti se mezi sebou lišily stupněm genetické diferenciace populací z odchytových lokalit a u jedné z nich byl zjištěn rozdíl v disperzi samců a samic (Cutrera et al. 2005). U rypoše stříbřitého se předpokládá monogamní párovací systém, neboť žije v nízkých populačních hustotách, nemá výrazný pohlavní dimorfismus a velmi vzácně se pohybuje po zemském povrchu (Šumbera, in verb.).

3 Cíle práce

1.) **stanovit genetickou variabilitu a diferenciaci různých populací tohoto druhu**

- v přírodních populacích všech druhů živočichů dochází k určité izolaci jednotlivých populací (např. v závislosti na jejich vzdálenosti). Míra izolace souvisí s pohyblivostí daného druhu živočicha. Rypoš stříbřitý je podzemní hlodavec a nepředpokládá se u něho výrazný tok genů mezi populacemi. Genetickými metodami je v této práci testován stupeň izolovanosti jednotlivých různě vzdálených populací;

2.) **stanovit míru přítomnosti vícenásobné paternity u solitérního rypoše *Heliophobius argenteocinereus***

- vzhledem k solitérnímu způsobu života, minimálnímu pohlavnímu dimorfismu, předpokládanému omezenému pohybu po zemi a nízkým populačním hustotám je rypoš stříbřitý považován za monogamní druh a vícenásobná paternita by se u něho tedy neměla vyskytovat. Analýzou mikrosatelitů u vrhů s třemi a více mláďaty je možno odhalit případný výskyt vícenásobné paternity a vyvrátit tak předpoklad monogamie pro tento druh;

3.) **stanovit příbuzenské vztahy v populaci rypoše stříbřitého v původním typu biotopu**

- analýza příbuzenské prostorové struktury u jedinců z jedné populace může být přínosná pro charakteristiku disperze daného druhu, např. zda u mláďat existuje rozdíl v disperzi samců a samic. Porovnáním genotypů mláďat a dospělců z populace lze určovat paternitu a maternitu a následně je možno stanovit variabilitu v reprodukčním úspěchu jednotlivých pohlaví.

4 Materiál a metodika

Sledované lokality a vzorky zvířat

Vzorky tkání jednotlivých zvířat byly získány v období květen až září roku 2005. Sběr vzorků proběhl na šesti lokalitách v Malawi (Obr. 3) – Mpalanganga (15°27'S, 35°16'E), Domasi (15°19'S, 35°26'E), Zomba Plateau (15°21'S, 35°19'E), Mulanje (16°02'S, 35°31'E), Five miles (15°26'S, 35°17'E) a Nine miles (15°29'S, 35°14'E; souřadnice označují středy odchytových oblastí). Od odchycených zvířat byl odebrán vzorek tkáně (zpravidla srdce, ledvina a svalová tkáň). Lokalita Mpalanganga v té době zároveň sloužila pro telemetrický výzkum druhu, zvířatům vypouštěným zpět na lokalitu byl jako vzorek tkáně odebrána pouze část prstu. Studovaná plocha byla přirozeně vymezena poli a skalnatým svahem a byla pokryta řídkým lesem miombo (les s převahou stromů rodu *Brachystegia*). Její rozloha byla 8 ha, populační hustota rypošů stříbřitých byla 4,6 zvířat na hektar. Počet zvířat byl odhadnut podle počtu výhrabků. Na lokalitě bylo nalezeno 37 aktivních obydlených nor, v 34 případech se podařilo odchytit jejich obyvatele (90 %) a to buď do Hickmanových živolovných pastí (Hickman 1979) nebo tradičním způsobem odchytu - narušení chodby a zablokování únikové cesty zvířeti, které přišlo narušenou část prozkoumat (Šumbera et al., submitted) V souboru vzorků je i pět jedinců, jejichž nory byly za hranicemi vymezené plochy. Z této lokality pochází celkem 55 vzorků, z toho 39 byli dospělí a subadultní jedinci, 13 vzorků pochází od mláďat, žijících v době odchytu v matčině noře a tři vzorky byla embrya, získaná z dělohy samice. Pro každé zvíře byly zaznamenány údaje o pohlaví, váze, délce těla, ocasu a zadního chodidla, GPS souřadnice norového systému a datum odchytu. Souřadnice systému byly určeny buď v místě odchytu zvířete nebo na místě nových krtin (aktuální pozice zvířete). Z ostatních lokalit byly získány vzorky tkání 55 jedinců (Tab. 2), z nichž některé byly získány odchytem a některé od místních lovců. Pro analýzu přítomnosti vícenásobné paternity bylo získáno celkem devět vrhů, obsahujících aspoň tři mláďata (Tab. 3). V deseti dalších vrzích bylo pouze jedno či dvě mláďata, pro určování vícenásobné paternity byly tedy nevhodné.

Obr. 3 Mapa s vyznačením polohy jednotlivých lokalit (oranžové trojúhelníky). Mapa je vytvořená v programu Google Earth (volně stažitelné z http:///earth.google.com, 15.3.07)

Tab. 2 Přehled počtů zvířat na jednotlivých lokalitách. Pro každou lokalitu je vyznačen počet samic, u kterých byla v době odchytu přítomna mláďata (v jednom případě se jednalo o embrya), počet ostatních dospělců a celkový počet jedinců na lokalitě.

Lokalita	Počet samic s mláďaty	Počet mláďat	Počet ostatních dospělců	Celkový počet jedinců na lokalitě
Mulanje	4	9	5	18
Domasi	1	5	0	6
Zomba Plateau	3	10	5	18
Five miles	0	0	1	1
Mpalanganga	8	16	31	55
Nine miles	3	9	0	12
			Zvířat celkem	110

Tab. 3 Přehled vrhů vhodných pro analýzu vícenásobné paternity. Samice 25 byla v době odchytu březí a její potomci byli získáni jako embrya. U ostatních samic se jednalo o již narozená mláďata.

ID matky	Počet mláďat	Lokalita
25	3	Mpalanganga
26	5	Domasi
35	3	Mulanje
55	5	Zomba Plateau
119	3	Zomba Plateau
143	3	Nine miles
152	4	Nine miles
163	3	Mpalanganga
188	3	Mpalanganga

Genotypizace vzorků

Ze vzorků tkání jednotlivých zvířat byla extrahována DNA komerčními kity NucleoSpin (Macherey-Nagel) a DNeasy Tissue Extraction Kit (QIAGEN, Inc.). Polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) byla testována amplifikace celkem 12 mikrosatelitů. V sedmi případech se jednalo o lokusy, původně navržené pro rypoše damarského (*F. damarensis*) - lokusy DMR2, DMR5, DMR7 - a rypoše hotentotského (*C. h. hottentotus*) - lokusy CH1, CH2, CH3 a CH4. Názvy i sekvence primerů pro tyto lokusy jsou převzaty z Burland et al. (2001). Dále byly použity lokusy Harg01, Harg02, Harg03, Harg07 a Harg08, specifické pro rypoše stříbřitého (Ingram et al., submitted). Amplifikace lokusů s označením DMR a CH probíhala nejdříve samostatně pro každý lokus, podle podmínek uvedených v Burland et al. (2001). Pro lokus CH4 se nepodařilo nalézt vhodné reakční

podmínky. Pro zbylé lokusy DMR a CH se podařilo najít vhodné společné podmínky, aby bylo možné je amplifikovat v multiplex PCR reakci (zvlášť tři DMR lokusy a zvlášť tři CH lokusy). Jako nejvhodnější teplota annealingu (T_a) pro multiplex DMR se ukázala 57°C (pro prvních pět cyklů) a 55°C (pro následujících 25 cyklů), pro multiplex CH 59°C (30 cyklů). V testovacím vzorku 28 zvířat se však ukázalo, že lokusy DMR5 a CH3 jsou monomorfní, a proto byly z dalších analýz vyřazeny.

U lokusů s označením Harg se nepodařilo nalézt vhodné podmínky amplifikující lokus Harg 01. Vzhledem k problémům s jejich amplifikací v multiplex reakci byl použit kit Multiplex PCR Master Mix (QIAGEN, Inc.), který zvyšuje úspěšnost amplifikací. Finálně byl zoptimalizován jeden multiplex set, ve kterém se úspěšně amplifikovaly lokusy DMR2, DMR7, CH1, CH2, Harg02, Harg03, Harg07 a Harg08. Na začátku reakce proběhla úvodní denaturace po dobu 15 min při 95°C, poté proběhlo 35 cyklů, skládajících se z denaturace při 94°C po dobu 30 s, annealingu při 57°C po dobu 1,5 min a elongace při 72°C po dobu 1 min, na závěr přoběhla závěrečná elongace při 72°C v délce 10 min. Koncentrace roztoku pro multiplex PCR byla 5 mM a koncentrace primerů 0,2 mM.

Pro vlastní průběh reakce byl použit termocykler Mastercycler ep gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany). Jeden z primerů každého páru byl značen fluorescenční barvou NED, FAM, PET nebo VIC (Tab. 4).

Fragmentační analýza získaných produktů PCR byla provedena v automatickém sekvenátoru ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.). Genotypy jednotlivých zvířat byly z výstupu fragmentační analýzy odečteny v programu GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems, Inc.).

Tab. 4 Seznam fluorescenčního značení použitých lokusů. Nejsou uvedeny lokusy, jež byly vyřazeny z důvodu neúspěšné amplifikace nebo absence variability (tj. monomorfní lokusy).

Název lokusu	Fluorescenční označení
DMR2	NED
DMR7	FAM
CH1	PET
CH2	VIC
Harg02	FAM
Harg03	VIC
Harg07	PET
Harg08	PET

Genetická variabilita populací a populačně genetická struktura

Počet a frekvence alel jednotlivých lokusů byla stanovena pouze pro tři populace - Mpalanganga, Mulanje a Zomba Plateau. Z ostatních populací bylo k dispozici příliš malé množství vzorků (Domasi, n = 6; Nine miles, n = 12; Five miles, n = 1). Výpočty frekvencí alel a očekávaných (H_e) a pozorovaných (H_o) (Nei 1978) heterozygotností pro dané lokusy na zmiňovaných třech lokalitách byly provedeny v programu Genetix 4.05.2 (Belkhir et al. 1996-2004).

Pro stanovení frekvence nulových alel byly pro porovnání dvou různých algoritmů použity dva programy - FreeNA (Chapuis & Estoup 2006) a Cervus 3.0 (Kalinowski et al. 2007; Marshall et al. 1998). Stanovení alelické diverzity (allelic richness, AR) bylo provedeno v programu FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001). AR představuje počet alel pro daný lokus v případě teoretického nižšího počtu vzorků stanovený na základě frekvence alel metodou "rarefaction". Umožňuje tak srovnání genetické variability u různě velkých vzorků. Ve stejném programu byly vypočítány i fixační indexy F_{ST} (mezi dvojicemi populací) a F_{IS} (podle Weir & Cockerham 1984; autoři označují odhad F_{ST} jako θ (theta) a odhad F_{IS} jako f, v této práci jsou však použity běžnější označení F_{ST} a F_{IS}). Významnost těchto indexů (tj. odlišnost od nuly) byla testována na základě 10000 permutací v programu Genetix. F_{ST} pro všechny populace dohromady bylo zjištěno opět pomocí programu Genetix a jeho signifikantní odlišnost od nuly byla stanovena také na základě 10000 permutací.

Odchýlení od Hardy-Weibergovy rovnováhy (HWE) (Haldane 1954), jež může signalizovat přítomnost nulových alel nebo asortativní páření (např. mezi příbuznými jedinci), bylo testováno v programu Genepop 3.4 (Raymond & Rousset 1995). V tomto programu byla provedena i analýza alelické a genotypové diferenciace mezi populacemi Mpalanganga, Mulanje a Zomba Plateau. Jedná se o exaktní testy, využívající Markovovy řetězce. V případě alelické diferenciace mezi populacemi je testována nulová hypotéza, že distribuce jednotlivých alel je ve všech sledovaných populacích shodná. Nulová hypotéza pro genotypovou diferenciaci říká, že sledované populace mají stejné rozložení genotypů (Raymond & Rousset 1995).

Ačkoliv jsou jednotlivé lokality (Mpalanganga, Mulanje a Zomba Plateau) od sebe celkem hodně vzdáleny (18 – 84 km), byla pomocí programu Genepop 3.4 testována i míra toku genů a to tzv. analýzou izolace vzdáleností (isolation by distance). Izolace vzdáleností se počítá Mantelovým testem (Mantel 1967), který využívá permutace pro determinaci rozložení testovaných dat, k otestování daných dat a ke stanovení intervalu, kdy dochází k zamítnutí

nulové hypotézy. Vstupním souborem pro test jsou dvě matice, z nichž jedna představuje hodnoty genetické diferenciace populací a druhá přirozené logaritmy geografických vzdáleností (distance) mezi dvojicemi populací. Genetická diferenciace dvou populací je popsána hodnotou $F_{ST}/(1-F_{ST})$, která popisuje populace rozmístěné ve 2D prostoru lépe než standardní F_{ST} index (Rousset 1997).

Dalším způsobem porovnání populací je faktoriální korespondenční analýza (FCA), jejíž grafické znázornění lze získat v programu Genetix 4.05.2. Výsledek může být zobrazen jako trojrozměrný graf, ve kterém je znázorněna prostorová pozice všech jedinců ze sledovaných populací na základě jejich genotypu. Na rozdíl od předchozích výpočtů, FCA byla provedena pro všech šest populací, aby bylo možno podle grafické polohy jedinců z populací Domasi, Five miles a Nine miles (ze kterých pochází pouze malé množství vzorků) určit, ke které z populací s větším množstvím nasbíraného materiálu (Mulanje, Zomba Plateau a Mpalanganga) mají geneticky blízko.

Jako alternativní způsob porovnání genetické podobnosti jednotlivých populací byl proveden výpočet v programu Structure 2.1 (Pritchard et al. 2000). Tento program zahrnuje Bayesiánskou „admixture“ analýzu, kdy je soubor jedinců rozdělen na základě genotypu do K skupin. Pro každé K je vypočítávána věrohodnost („likelihood“) modelu. Výpočet byl prováděn pro parametry K = 1 – 6, burn-in period = 20000, počet iterací 100000, hodnota ALPHA je náhodná, pro každou populaci jiná, počáteční ALPHA = 1,0, ALPHAMAX = 10, APLPHAPROPSD = 0,25, ALPHAPRIORA = 0,05, ALPHAPRIORB = 0,001. Pro každé K byla simulace třikrát opakována. Zároveň je stanovena věrohodnost každého modelu pro daný počet populací (K). Na základě nejvěrohodnějšího modelu je možno pro každého jedince určit jeho relativní příslušnost k dané skupině (vyjádřenou jako proporci jeho genomu), čehož je využíváno např. při identifikaci hybridů.

Příbuzenská struktura na lokalitě Mpalanganga

Na lokalitě Mpalanganga bylo odchyceno celkem 32 dospělých samic, sedm dospělých samců a 16 mláďat. Zároveň byla poloha každého obydleného podzemního systému zaměřena pomocí GPS souřadnic. Schéma lokality s vyznačenou polohou zaměření jednotlivých zvířat je na Obr. 4. Cílem podrobnějšího studia populace na lokalitě Mpalanganga byla jednak identifikace rodičů mláďat a jednak stanovení závislosti mezi distribucí jedinců na lokalitě a jejich vzájemnou příbuzností.

Paternita a maternita

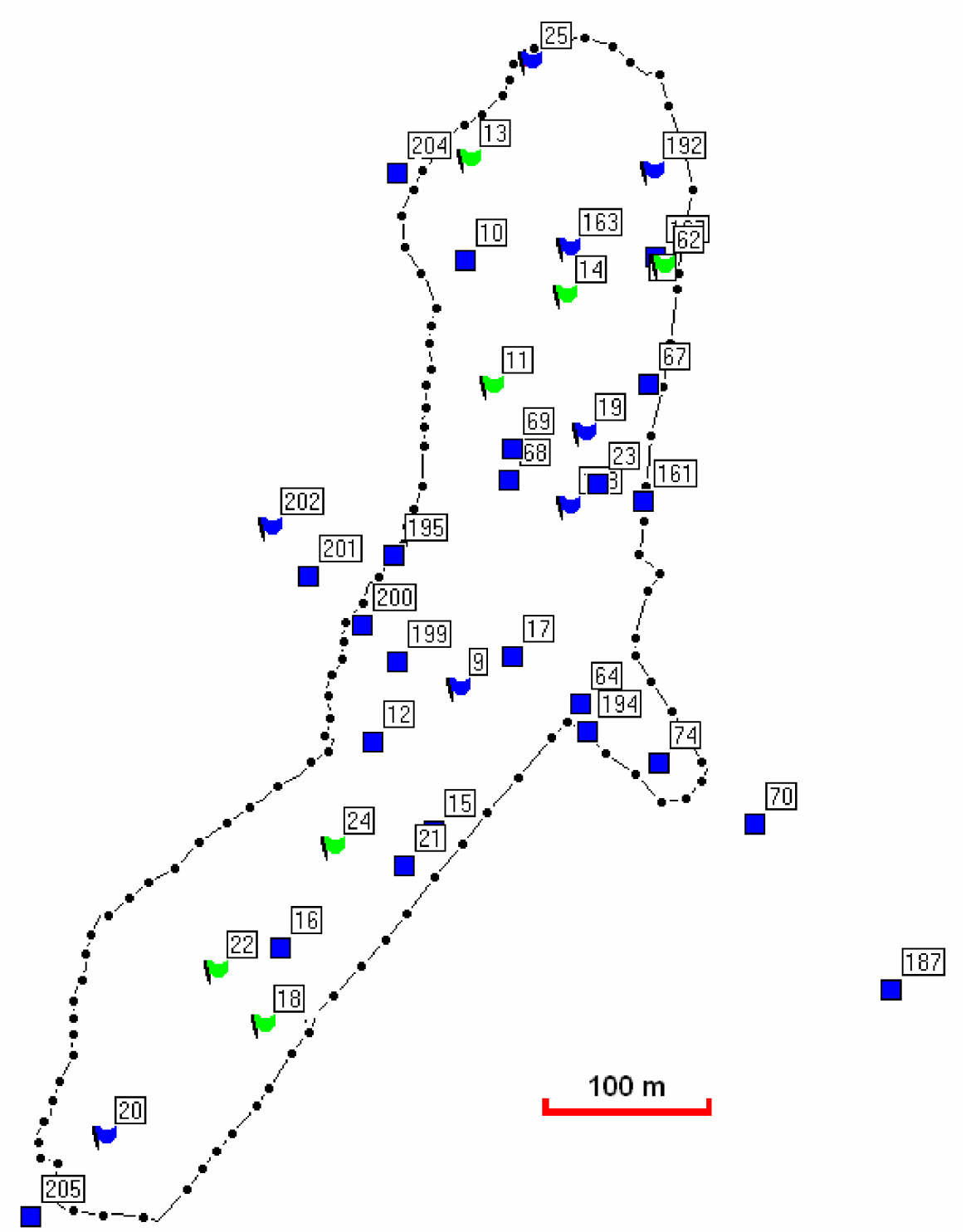
Pro stanovení nejpravděpodobnějšího rodiče pro každé embryo, mládě a juvenilního jedince byl použit program Cervus 3.0. Tento program stanoví pravděpodobnost, s jakou je schopen určit prvního (total exclusionary power (first parent)) a druhého (total exclusionary power (second parent)) rodiče.

Pro každého potencionálního rodiče je vypočteno tzv. likelihood ratio - pravděpodobnost, že je pravým rodičem mláděte. Tato hodnota je vyjádřena svým přirozeným logaritmem, označeným jako LOD skóre:

$$LOD = \ln\left(\frac{L(H_1)}{L(H_2)}\right)$$

kde $L(H_1)$ představuje pravděpodobnost hypotézy, že daný jedinec je rodičem mláděte, zatímco $L(H_2)$ představuje pravděpodobnost hypotézy, že tento jedinec je mláděti nepříbuzný. Rozdíl mezi LOD skóre dvou nejpravděpodobnějších jedinců je označován jako Delta. Na základě simulací Monte-Carlo byla vypočtena kritická hodnota Delta pro stanovení paternity v intervalu spolehlivosti 95 % a 80 %. Při těchto simulacích byla také určena pravděpodobnost úspěchu při hledání rodičů v souboru vstupních dat. Následně bylo provedeno vlastní odhadnutí pravděpodobných rodičů a bylo určeno, zda hodnota Delta splňuje kritéria intervalů spolehlivosti 80 %, 95 % nebo žádného.

Ze vstupního souboru pro výpočet frekvencí alel jednotlivých lokusů byla vyloučena všechna mláďata, žijící v době odchytu s matkou. Pro simulace byla stanovena míra genotypizační chyby (ε = 0,01), odhad proporce navzorkovaných zvířat (90 %) a proporce stanovených genotypů (95 %).



Obr. 4 Mapa lokality Mpalanganga s vyznačenou polohou nor jednotlivých zvířat. Zelená vlaječka označuje samce, modrá vlaječka samici s mláďaty, příp. březí samici, modrý čtverec samici bez mláďat, u každé značky je ID zvířete. Ohraničení vyznačuje vymezení plochy pro výpočet populační hustoty. Mapa je vytvořena v programu MapSource 6.0 (Garmin Ltd.)

Hledání rodičů bylo provedeno na dvou úrovních. Za prvé byli hledáni samci, kteří zplodili mláďata v roce 2005. V tomto roce byly známy matky mláďat, neboť v době odchytu nebyla ještě odstavena. Za potencionální otce byli považováni pouze ti samci, jejichž hmotnost přesahovala 130 g. U samců s nižší hmotností se nepředpokládá, že by byli sexuálně aktivní (Šumbera et al 2003b). Kritéria pro stanovení otce byla v tomto případě značně striktní. Za otce vrhu přijat pouze takový samec, který byl označen jako otec všech mláďat ve vrhu s pravděpodobností 95 %, případně pokud byl stanoven jako otec většiny mláďat ve vrhu s 95 % nebo 80 % pravděpodobností a pokud nebyly přítomny neshody ("mismatches") mezi genotypy mláďat, matky a kandidátního otce.

Zvířata s hmotností pod 130 g jsou mladá zvířata, narozená v předchozí rozmnožovací sezóně (rok 2004; Šumbera, in verb.). Pro tato zvířata byli hledáni oba rodiče. Při hledání rodičů u jedinců, pro které není znám ani jeden rodič, nabízí Cervus 3.0 několik možností. Je možno určovat maternitu a paternitu zvlášť nebo obojí dohromady. Soubor jedinců z lokality Mpalanganga byl tedy rozdělen na samce a samice. Z důvodu konzistentnějších výsledků, bylo hledání nejpravděpodobnějších rodičů provedeno třemi postupy: (1) nejdříve byli určeni nejpravděpodobnější otcové mláďat a poté jejich matky; (2) nejdříve byly hledány nejvíce pravděpodobné matky a až poté otcové; (3) byla využita možnost výpočtu nejpravděpodobnější rodičovské dvojice na základě souboru kandidátních otců a matek.

Jako skuteční rodiče byli přijati ti jedinci, kteří byli při výpočtu maternity a paternity označeni na hladině průkaznosti 95 %. Jako rodičovská dvojice byly přijaty takové páry zvířat, kdy alespoň jeden z rodičů byl samostatně identifikován s 95 % pravděpodobností a celý pár dohromady alespoň na hladině průkaznosti 80 %.

Závislost distribuce jedinců na příbuznosti

Jako první krok ke zjištění, zda-li existuje závislost mezi příbuzností jednotlivých jedinců v populaci a vzájemnou polohou jejich nor, bylo potřeba stanovit příbuznost zvířat na lokalitě. Porovnáním frekvence jednotlivých alel v populaci a genotypem jakýchkoliv dvou jedinců je možné vypočíst tzv. "relatedness likelihood ratio" (r, pravděpodobnost příbuznosti). Tyto výpočty jsou standardně prováděny pomocí programů Relatedness nebo Kinship (Goodnight & Queller 1999). Kinship i Relatedness jsou však programy pro operační systém počítačů Apple Macintosh. Pro rozšíření využití algoritmu, který tyto programy používají (Queller & Goodnight 1989), byl tento algoritmus zahrnut i do programu KinGroup (Konovalov et al. 2004), pracujícím pod platformou Windows. Program vypočítává „relatedness likelihood ratio“ pro všechny dvojice jedinců ze vstupního souboru a díky tomu

lze následně identifikovat dvojice jedinců, jejichž genotypová podobnost poukazuje na blízkou příbuznost prvního a druhého řádu ($r \geq 0{,}25$). Příbuznost byla vypočítána pouze pro jedince, obývající vlastní noru.

Nejprve bylo testováno, zda vzdálenost mezi zvířaty na lokalitě je ovlivněna jejich pohlavím či příbuzností. Pro každou samici byla určena její nejbližší sousední samice a nejbližší blízce příbuzná sousední samice ($r \geq 0{,}25$). Poté bylo v programu Statistica 6.0 (Statsoft Inc.) testováno (Mann-Whitney U-test), zda existuje signifikantní rozdíl mezi vzdáleností nor sousedících samic a samic vykazujících první či druhý stupeň příbuznosti. Obdobně byla testována vzdálenost mezi samci a mezi jedinci opačného pohlaví. Signifikantní výsledky by mohly poukázat např. na rozdíl v disperzi mláďat různého pohlaví.

Vztah mezi příbuzností dvojic všech jedinců (r) a geografickou vzdáleností jejich nor byl testován ve Statistica 6.0 pomocí Spearmanova korelačního koeficientu. Tento vztah byl na základě stejných dat testován i v programu Genetix 4.05.2, kdy na základě 10000 permutací byla testována významnost Pearsonova korelačního koeficientu.

Alternativím způsobem testování vztahu mezi genetickou a geografickou vzdáleností jedinců je výpočet korelace mezi přirozeným logaritmem geografické vzdálenosti a parametrem a_r (Rousset 2000), pro který platí vztah:

$$a_r = \frac{Q_w - Q_r}{1 - Q_w}$$

kdy Q_r určuje pravděpodobnost identity genů při geografické vzdálenosti r a Q_w pravděpodobnost identity dvou genů u jednoho jedince. Parametr a_r poté podává obdobnou informaci o jedincích jako parametr $F_{ST}/(1-F_{ST})$ o populacích (tj. obdoba testování "isolation-by-distance" na individuální úrovni). Pro výpočet parametru a_r a přirozeného logaritmu vzdálenosti nor (ln(distance)) byl použit program Genepop 3.4, který zároveň pomocí ABC bootstrapu vypočítá interval spolehlivosti. Pokud se v intervalu spolehlivosti vyskytuje nula, tak na dané hladině významnosti není testovaný vztah signifikantní (DiCiccio & Efron 1996).

Analýza přítomnosti vícenásobné paternity

Vhodnost lokusů, použitých v této práci k analýze vícenásobné paternity, byla stanovena pomocí programu Cervus 3.0, kde lze vypočítat tzv. "Total exclusionary power". Tato hodnota udává, zda-li je sada použitých lokusů dostatečná z hlediska polymorfismu a počtu lokusů a umožňuje tak odhadnout pravděpodobnost, že se vícenásobná paternita ve vrhu vyskytla, ale nebyla odhalena v důsledku nedostatečného polymorfismu. „Total exclusionary power“ byla vypočítána pouze pro lokality Mpalanganga, Mulanje a Zomba Plateau, u ostatních lokalit by pro malý počet zvířat neměla dostatečnou výpovědní hodnotu.

5 Výsledky

Genotypizace vzorků

Pro veškeré genetické analýzy byla nakonec použita sada osmi lokusů, amplifikovatených v jedné multiplex PCR. Přehled počtu alel pro všechny sledované lokality je v Tab. 4. Lokusy DMR2 a Harg08 se délkou neliší vždy o délku repetice, ale i o 1 bp, v minulosti pravděpodobně došlo k mutaci typu indels.

Tab. 4 Přehled počtu alel jednotlivých lokusů pro všechny sledované lokality. Velmi nízké počty alel u lokalit Five miles a Domasi jsou způsobeny malým počtem vzorků. Lokusy Harg02 a Harg07 vykazují velmi nízký stupeň polymorfismu.

	Lokus							
Lokalita	DMR2	DMR7	CH1	CH2	Harg02	Harg03	Harg07	Harg08
Domasi	3	2	2	2	2	2	2	3
Zomba Plateau	7	7	5	6	1	4	1	8
Mpalanganga	9	7	9	6	1	6	1	9
Five miles	2	2	2	2	1	2	1	2
Nine miles	5	4	7	6	1	5	1	8
Mulanje	11	7	9	6	2	9	3	9

Genetická variabilita populací

Počet alel, jejich frekvence, očekávaná (H_e) a pozorovaná (H_o) heterozygotnost a frekvence nulových alel (podle programů FreeNA a Cervus 2.0) na lokalitách Zomba Plateau, Mulanje a Mpalanganga jsou shrnuty v Tab. 5. Výsledky obou výpočtů frekvence nulových alel jsou si podobné, program FreeNA je méně přísný (podíl nulových alel vyšší než 0,05 se vyskytuje ve čtyřech případech, u Cervus 3.0 v šesti). Oba programy se shodují, že výskyt nulových alel je pravděpodobný u lokusů DMR7 (v populacích z Mulanje a Zomba Plateau), Harg03 (Zomba Plateau) a Harg07 (Mulanje).

Hodnoty AR se pohybovaly v rozmezí 1,00 - 10,44 (pro teoretické populace o 16 jedincích; Obr. 5). Průměrné hodnoty se mezi populacemi lišily. F_{IS} není ani pro jednu populaci signifikantně odlišné od nuly. Souhrnné F_{ST} činí 0,1528, tato hodnota se signifikantně liší od nuly (viz Obr. 6). Hodnoty pro F_{ST} mezi dvojicemi populací vycházejí v rozmezí 0,1366 - 0,1586 (Tab. 6). Tyto hodnoty jsou poměrně vysoké a naznačují významnou genetickou diferenciaci mezi populacemi

Tab. 5 Přehled všech použitých lokusů. V tabulce jsou uvedeny i počty vzorků z jednotlivých lokalit (N), počet alel pro každou lokalitu, hodnoty očekávané (H_e)a pozorované (H_o) heterozygotnosti a podíl nulových alel spočítaný dvěma algoritmy (tučně vyznačeny hodnoty vyšší než 0,05).

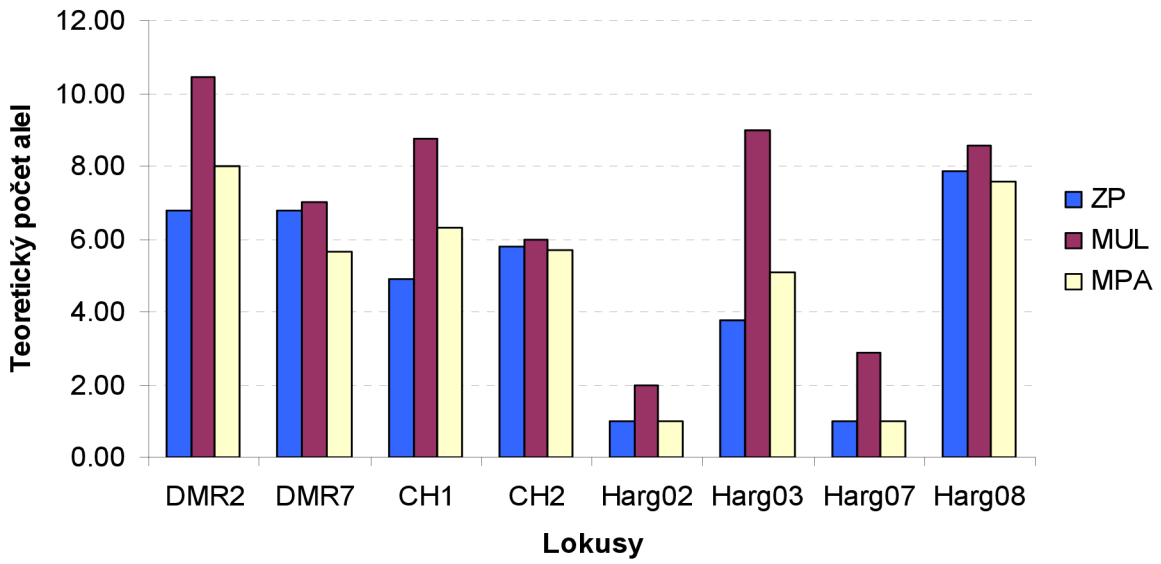
Lokus	Délka lokusu (bp)	Populace	N	Počet alel	H_e	H_o	Podíl nulových alel	
							Cervus	FreeNA
DMR2	146-179	Mpalanganga	55	9	0.8479	0.8557	-0.004	0
		Mulanje	18	11	0.8565	0.881	-0.0257	0.0001
		Zomba Plateau	18	7	0.7948	0.8175	0.0119	0
DMR7	114-135	Mpalanganga	55	7	0.5131	0.5178	-0.0462	0
		Mulanje	18	7	0.838	0.8619	**0.1454**	**0.14175**
		Zomba Plateau	18	7	0.5926	0.6095	**0.1844**	**0.07721**
CH1	107-135	Mpalanganga	55	9	0.7896	0.7968	-0.0219	0.00001
		Mulanje	18	9	0.7731	0.7952	-0.0344	0
		Zomba Plateau	18	5	0.7145	0.7349	**0.0832**	0.0356
CH2	115-144	Mpalanganga	55	6	0.7793	0.7866	-0.0011	0.00938
		Mulanje	18	6	0.7855	0.8079	-0.0326	0
		Zomba Plateau	18	6	0.7407	0.7619	0.0198	0.00001
Harg02	315-324	Mpalanganga	55	1	0	0	0	0.001
		Mulanje	18	2	0.2778	0.2857	-0.0884	0
		Zomba Plateau	18	1	0	0	0	0.001
Harg03	270-296	Mpalanganga	55	6	0.7125	0.7193	**0.091**	0.03889
		Mulanje	16	9	0.8457	0.873	-0.0514	0
		Zomba Plateau	18	4	0.4969	0.5111	**0.212**	**0.10011**
Harg07	144-162	Mpalanganga	55	1	0	0	0	0.001
		Mulanje	18	3	0.2454	0.2524	**0.1856**	**0.0926**
		Zomba Plateau	18	1	0	0	0	0.001
Harg08	298-324	Mpalanganga	55	9	0.7896	0.7968	-0.0286	0
		Mulanje	18	9	0.7855	0.8079	-0.0614	0
		Zomba Plateau	18	8	0.8333	0.8571	0.0334	0.03546

Žádná z populací se signifikantně neodchyluje od Hardy-Weinbergovy rovnováhy (HWE; Tab. 6). Testy alelické a genotypové diferenciace mezi populacemi signifikantně (χ^2 test, $p < 0{,}001$, 16 df) popírají nulové hypotézy, že rozložení alel a genotypů je ve všech populacích shodné.

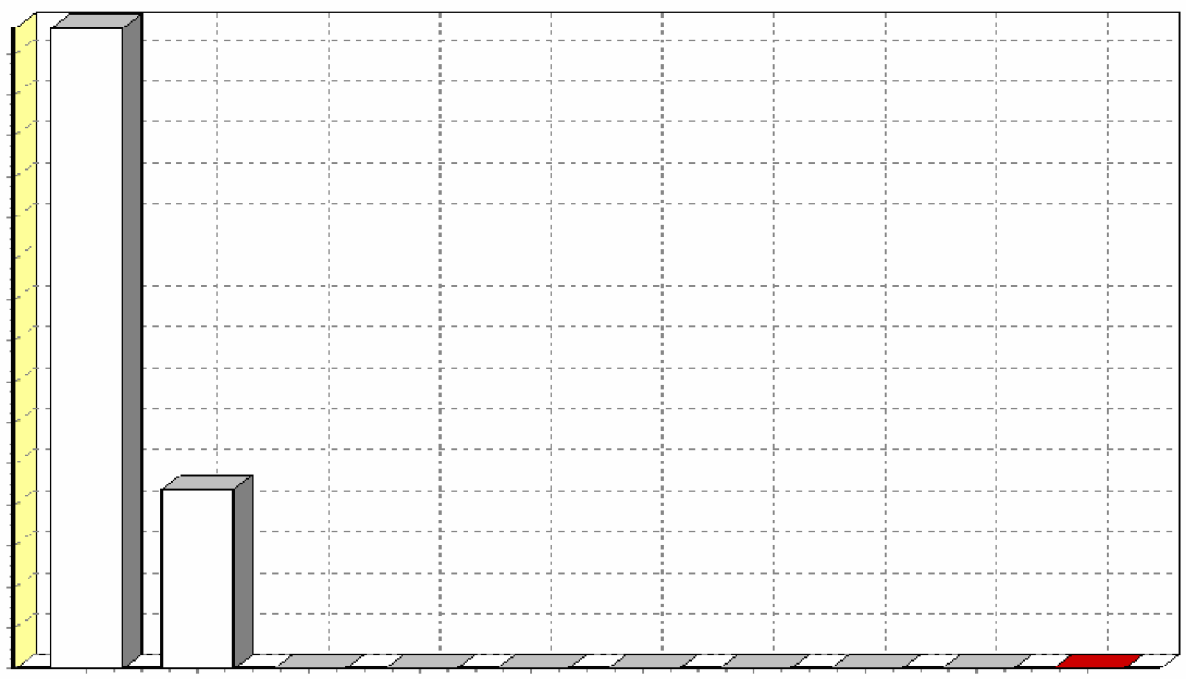
Tab. 6 Výsledné hodnoty fixačních indexů F_{IS} a F_{ST}, AR, průměrné pozorované heterozygotnosti a výsledky testu vychýlení z Hardy-Weinbergovy rovnováhy pro vybrané populace. F_{ST} je vypočítáno pro dvojice populací. Tučně jsou vyznačeny signifikantní hodnoty ($p < 0{,}05$). N - počet jedinců z dané lokality.

	N	F_{IS}	p (HWE)	AR (16)	H_o
Mpalanganga	55	0,009	0,358	5,04	0,75
Mulanje	18	0,046	0,349	6,83	0,70
Zomba Plateau	18	0,028	0,609	4,73	0,72

F_{ST}	Mulanje - Zomba Plateau	**0.1366**
	Zomba Plateau - Mpalanganga	**0.1586**
	Mpalanganga - Mulanje	**0.1537**



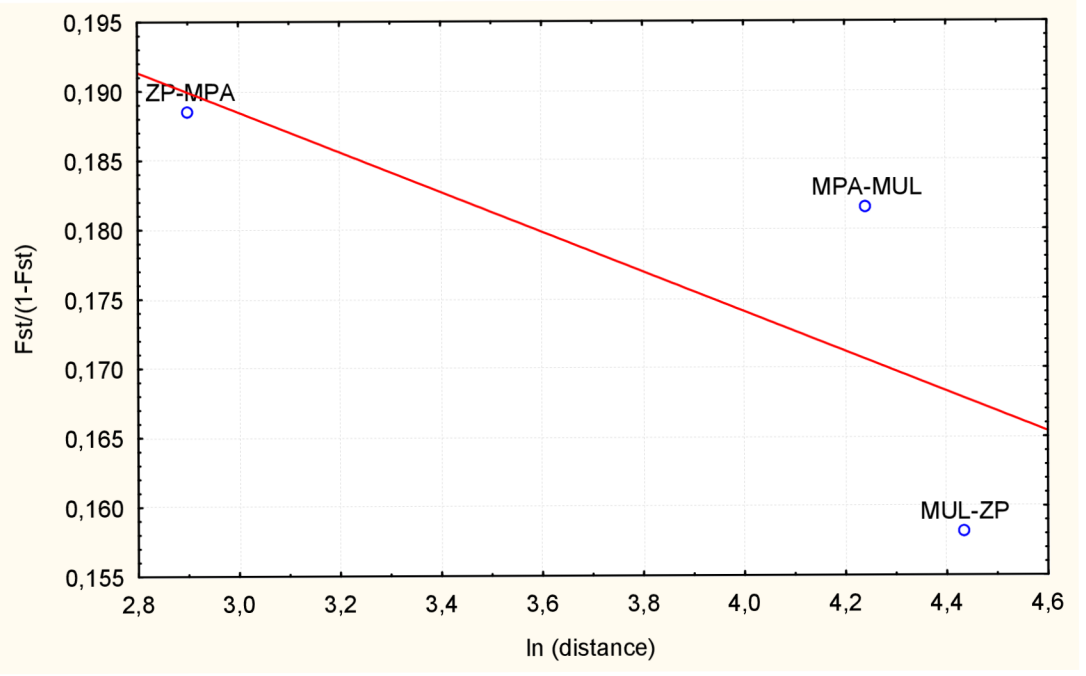
Obr. 5 Alelická diverzita (AR) pro jednotlivé lokusy na třech lokalitách. Sloupce grafu znázorňují počet alel v populacích v případě stejného počtu vzorků (n = 16). ZP - Zomba Plateau, MUL - Mulanje, MPA - Mpalanganga.



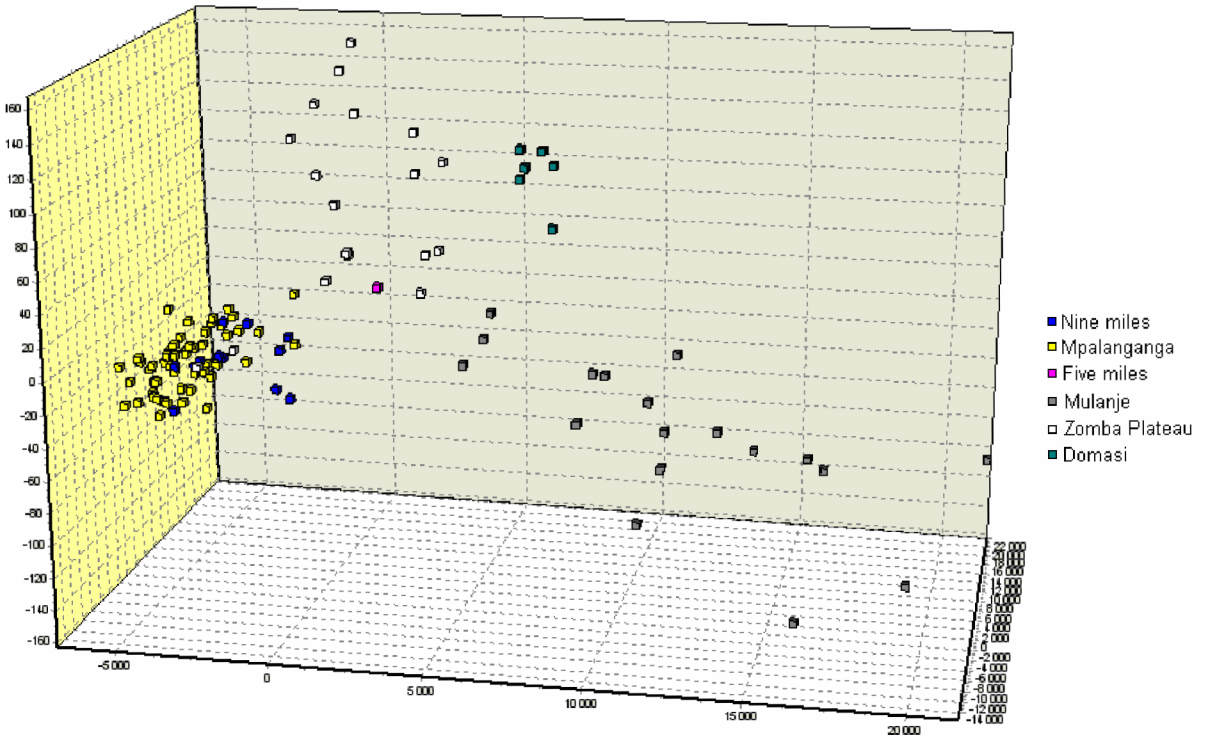
Obr. 6 Souhrné F_{ST} mezi populacemi Mulanje, Zomba Plateau a Mpalanganga. Reálná hodnota F_{ST} (F_{ST} = 0,1528) je vyznačena červeně, ostatní sloupce představují distribuci simulovaných hodnot (10000 permutací). Graf jasně ukazuje, že reálná hodnota F_{ST} je podstatně vzdálena od simulovaných hodnot a signifikantně ($p < 0.001$) se liší od nuly, což znamená, že sledované populace jsou geneticky rozdílné.

Výsledky Mantelova testu pro izolaci vzdáleností jsou znázorněny v Obr. 7. Již z grafu a záporné hodnoty sklonu lineární regrese je zřejmé, že pro dané tři populace model izolace vzdáleností neplatí (Spearmanův korelační koeficient, p = 0,169).

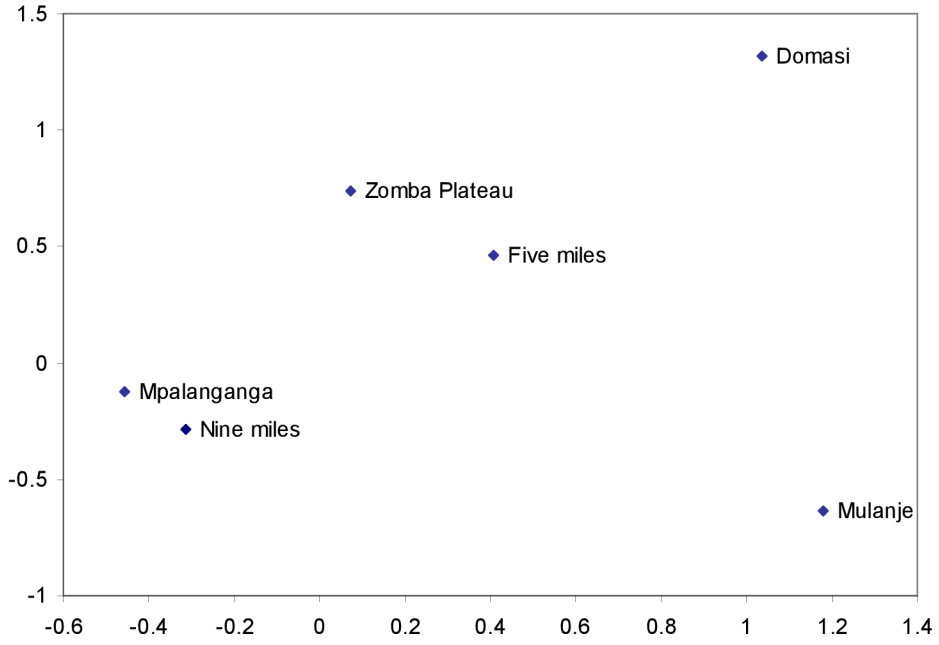
Poloha jednotlivých zvířat ve 3D prostoru na základě faktoriální korespondenční analýzy (AFC) je znázorněna na Obr. 8a. Je zde dobře vidět, že populace vzdálené pouhé 3 km (Mpalanganga a Nine miles) jsou si geneticky velmi podobné a poloha jedinců z těchto populací se v grafu prolíná. Ačkoliv populace ze Zomba Plateau a Mulanje netvoří těsné shluky jedinců, zaujímají každá v grafu jiný prostor, čímž vykazují genetickou odlišnost. Rozložení populací v grafu relativně odpovídá jejich geografické poloze a vzdálenosti (viz Obr. 3), např. jedinci z Domasi jsou blíže zvířatům ze Zomba Plateau než z Mpalangangy po genetické i geografické stránce. AFC pro průměrné hodnoty jednotlivých populací je na Obr. 8b.



Obr. 7 Mantelův test izolace vzdáleností. Data pro tři populace jsou proložena lineární regresí: $F_{ST}/(1-F_{ST}) = 0{,}2317 - 0{,}0144 \ln(\text{distance})$.

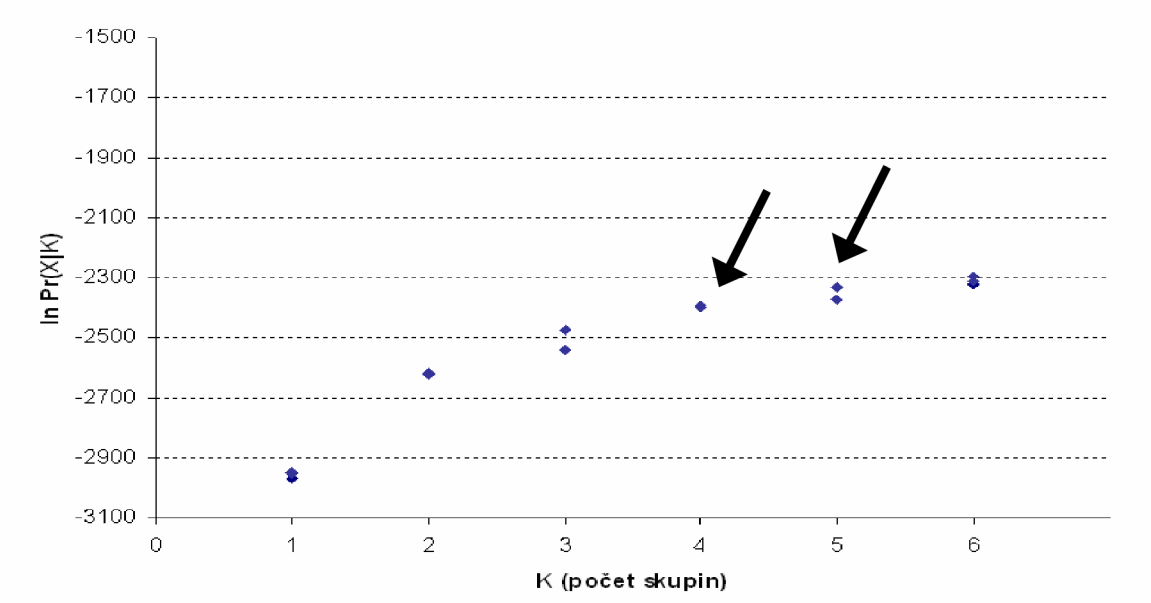


Obr. 8a Faktoriální korespondenční analýza (AFC) vypočítaná v programu Genetix 4.05.2 (Belkhir et al. 1996-2004) pro šest populací rypoše stříbřitého v Malawi. Každý bod v grafu představuje jednoho jedince, barevně jsou odlišeny jednotlivé populace (viz legenda).

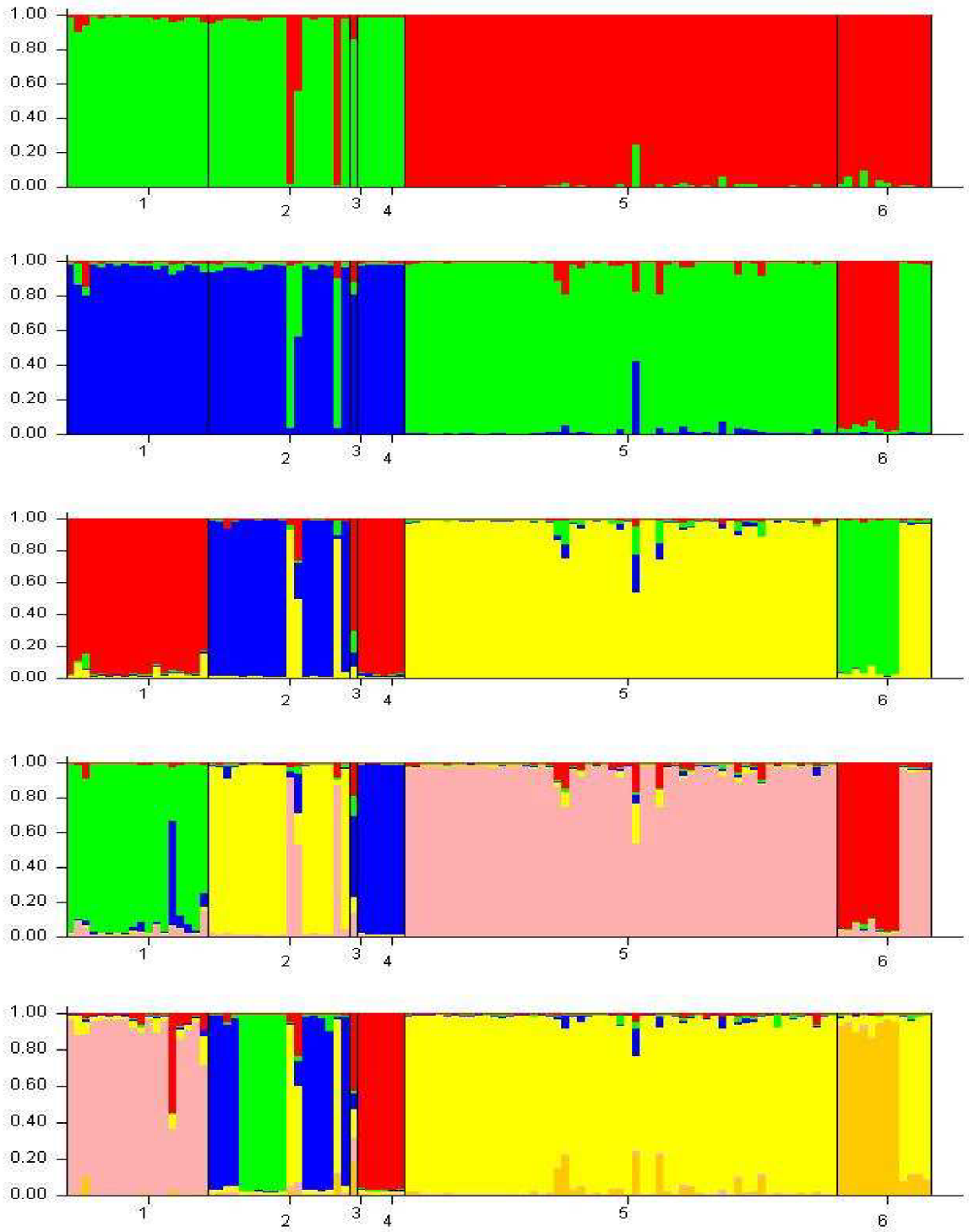


Obr. 8b Faktoriální korespondenční analýza (AFC) pro jednotlivé populace. Graf je obdobný jako obr. 8a, nezobrazuje ale jedince, nýbrž populace a jsou zobrazeny pouze první dvě osy.

Hodnoty věrohodnosti pro jednotlivá K, získané Bayesiánskou analýzou v programu Structure 2.1, jsou zobrazeny v Obr. 9. Pokud mají hodnoty věrohodnosti se zvětšující se hodnotou K neustále vzrůstající tendenci a nelze tak jednoznačně označit K s nejvyšší věrohodností, potom je nejvěrohodnější K to, které se nachází na začátku plató (úsek pomyslné křivky, spojující body, kde dochází k minimálnímu růstu křivky; Pritchard 2000). Z Obr. 9 lze tedy odhadnout, že nejvhodnějšími modely je rozdělení všech vzorků do čtyř nebo pěti skupin, což opět potvrzuje vysokou diferenciaci mezi jednotlivými populacemi. Výsledky analýz pro K = 2 ukazují, že lokality Mpalanganga a Nine miles se odlišují od zbylých 4 lokalit. Zajímavé také je, že při K = 3 se od těchto dvou lokalit oddělí dvě matky a jejich vrhy, získané od místních lovců na lokalitě Nine miles, jako samostatná skupina. Při K = 4 dochází k oddělení lokality Zomba Plateau od lokalit Domasi a Mulanje, které spolu zůstávají v jedné skupině, což je překvapivé vzhledem k jejich geografické vzdálenosti, k jejich oddělení dochází až při K = 5 (Obr. 10).



Obr. 9 Bayesiánská analýza genetické podobnosti mezi populacemi. Graf znázorňuje hodnoty věrohodnosti pro jednotlivá K. Věrohodnost je vyjádřena jako její přirozený logaritmus, jehož výpočet byl pro každé K třikrát zopakován. Vzhledem k tomu, že ln Pr(X|K) má neustále vzrůstající tendenci, je třeba stanovit počátek plató (označen šipkami). Nejlepší je pravděpodobně rozdělení do čtyř skupin kdy je model ještě poměrně jednoduchý, a zároveň vyčerpává maximum rozptylu.



Obr. 10 Bayesiánská analýza genetické podobnosti mezi populacemi v programu Structure. Postupně zobrazena rozdělení pro K = 2 – 6. K označuje počet skupin daného modelového rozložení, z nichž každá je značena vlastní barvou. Jednotlivé populace mají vymezen vlastní sektor grafu, který je označen číslem populace (1 - Mulanje, 2 - Zomba Plateau, 3 - Five miles, 4 - Domasi, 5 - Mpalanganga, 6 - Nine miles). Barevně je znázorněno, jaká proporce genotypu daného jedince (znázorněn jako úzký sloupec v dané populaci) náleží ke které skupině.

Příbuzenská struktura na lokalitě Mpalanganga

Paternita a maternita

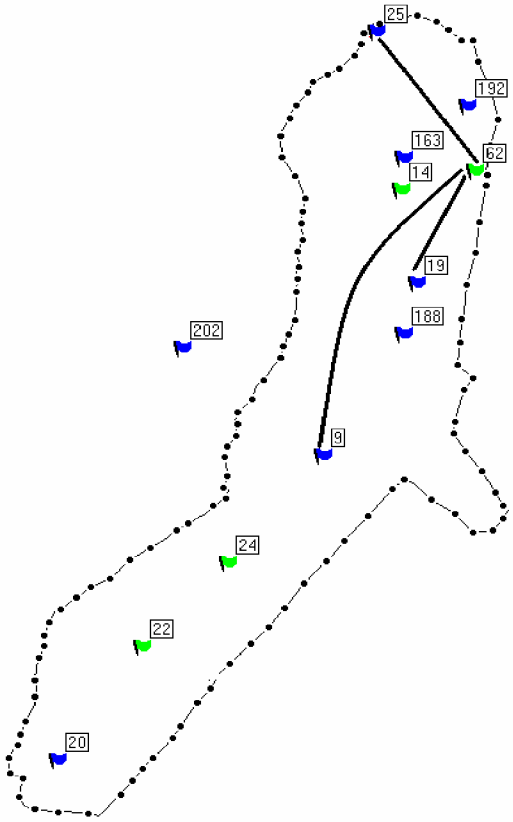
Na lokalitě Mpalanganga bylo odchyceno sedm samců, z nichž tři vážili méně než 130 g a 31 samic, z nichž méně než 130 g vážilo sedm. Z osmi vrhů z roku 2005, se v programu Cervus 3.0 podařilo na základě striktních kritérií určit otce pro tři vrhy. Všechny tyto tři vrhy byly zplozeny stejným samcem (ID 62, Obr. 11a, Tab. 7). Pro zbylých pět vrhů nevyhovoval žádný samec stanoveným kritériím. Ani tímto způsobem nebyl nalezen žádný doklad přítomnosti vícenásobné paternity.

V populaci se vyskytovalo 10 zvířat s váhou nižší než 130 g, jež byly pravděpodobně narozeny v roce 2004 (Šumbera, in verb.). Pro tři z nich nebyl určen ani jeden z rodičů. Pro čtyři zvířata byli určeni oba rodiče, pro další tři pouze matka (Obr. 11b, Tab. 7). Jako otec opět figuroval pouze jeden samec (ID 14). U dvou samic bylo prokázáno, že se rozmnožovaly v roce 2004 (se samcem 14) i 2005 (se samcem 62).

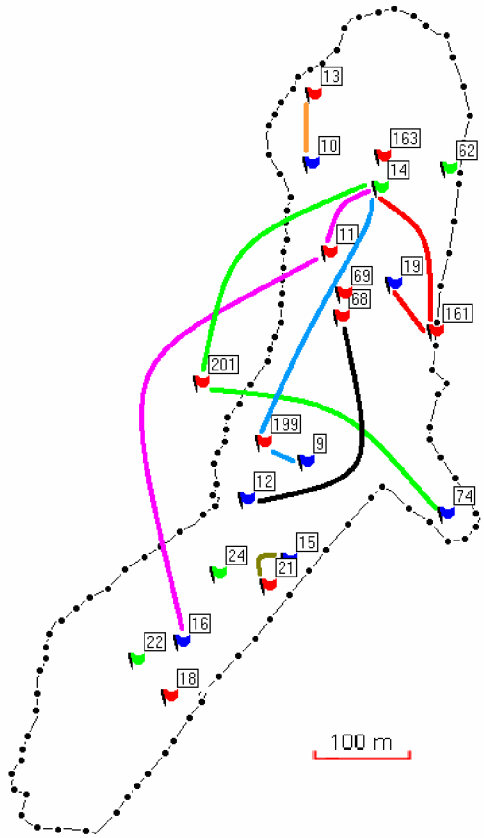
Průměrná vzdálenost mezi rodičovským párem z roku 2005 byla 157 m (rozsah 96-246 m). V roce 2004 to bylo přibližně 227 m (rozsah 73-372 m). Průměrná vzdálenost mezi norami matek a jejich mláďat z roku 2004 byla 120 m (rozsah 35-314 m).

Tab. 7 Přehled otců vrhů z roku 2005 a rodičů juvenilních jedinců z roku 2004. Tučně jsou zvýrazněny samice, které se množily oba roky po sobě.

Rok 2005			**Rok 2004**		
Matka (ID)	Počet mláďat ve vrhu	Nejpravděpodobnější otec (ID)	Mládě (ID)	Matka (ID)	Otec (ID)
9	2	62	11	16	14
188	3	neurčeno	18	neurčeno	neurčeno
19	1	62	69	neurčeno	neurčeno
163	3	neurčeno	13	10	neurčeno
20	1	neurčeno	163	neurčeno	neurčeno
192	2	neurčeno	199	**9**	14
202	1	neurčeno	201	74	14
25	3	62	161	**19**	14
			21	15	neurčeno
			68	12	neurčeno



Obr. 11a Páření v roce 2005. Modrou vlaječkou jsou označeny samice, jež v roce 2005 porodily mláďata, zelená vlaječka označuje sexuálně aktivní samce, černou linkou jsou naznačeny rodičovské páry.

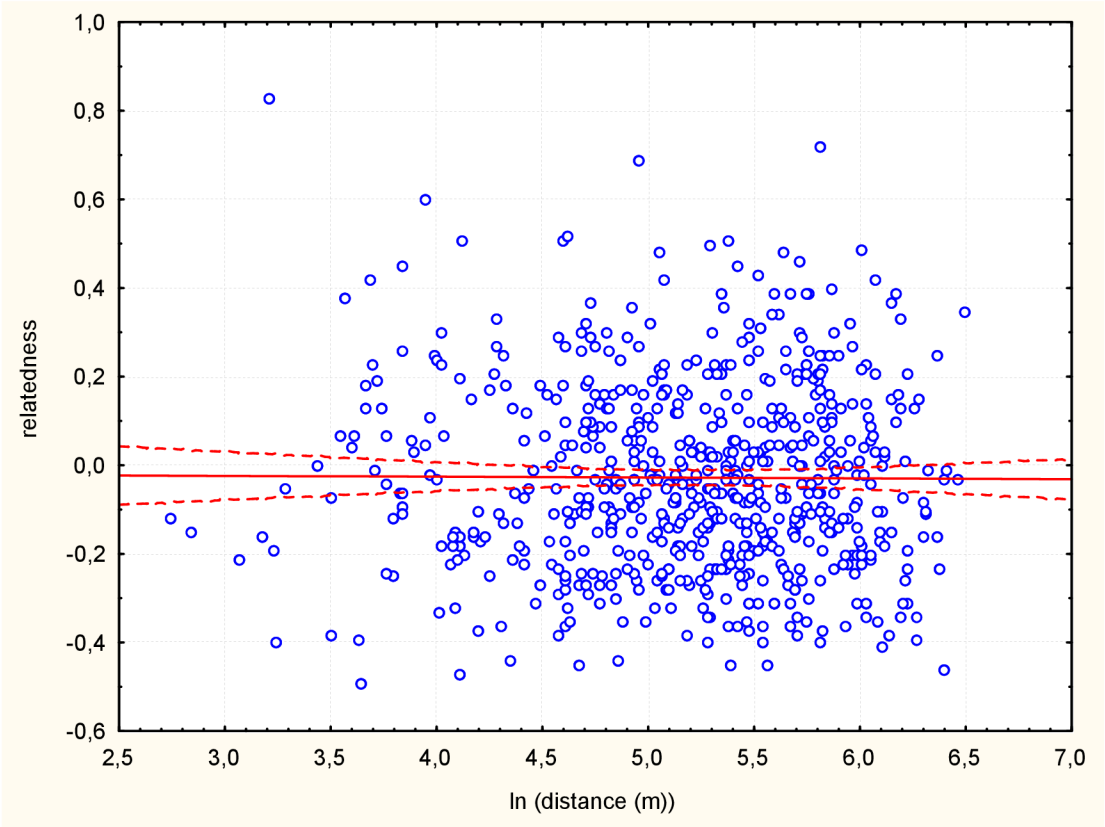


Obr. 11b Páření v roce 2004. Červená vlaječka označuje mláďata, narozená v roce 2004, zelená vlaječka sexuálně aktivní samce, modrá vlaječka matky mláďat. Různobarevné linky spojují mláďata s rodiči.

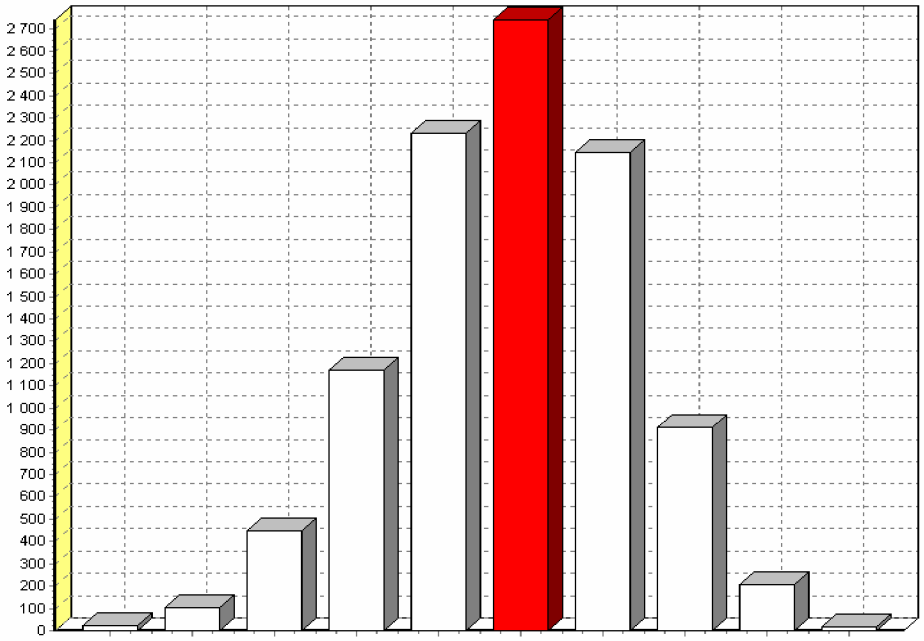
Závislost distribuce jedinců na příbuznosti

Podle analýzy vzdáleností nor mezi blízce příbuznými ($r \geq 0{,}25$) jedinci nebyly tyto vzdálenosti normálně rozloženy (Shapiro-Wilk test $n = 70$, $W = 0{,}938$, $P < 0{,}005$) a neodpovídaly ani Poissonovu rozložení (Kolmogorov-Smirnov test $n = 70$, $D = 3{,}0 \times 10^{30}$, $P < 0.01$). Vzdálenosti mezi nejbližšími sousedícími samicemi se signifikantně nelišily od vzdáleností mezi nejbližšími sousedícími blízce příbuznými samicemi (Mann-Whitney U-test $P = 1{,}0$). Nelišily se ani obdobné vzdálenosti mezi samci (Mann-Whitney U-test $P = 1{,}0$) a mezi jedinci opačného pohlaví (Mann-Whitney U-test $P = 1{,}0$). Nebylo tedy prokázáno, že by disperze mláďat byla ovlivněna jejich pohlavím.

Nebyla zjištěna korelace mezi geografickou vzdáleností nor a příbuzností jedinců (Spearman rank order correlation, R = 0,008, p = 0,831; Obr. 12). Také výsledky simulací v programu Genetix 4.05.2 ukázaly, že se hodnota Pearsonova korelačního koeficientu (R = 0,013, interval spolehlivosti [-0,1812, 0,1380]) neliší signifikantně od nuly (Obr. 13) a že neexistuje žádný vztah mezi vzdáleností nor a příbuzností jejich obyvatel. To potvrdil i výsledek ABC bootstrapu (b = 0,0032, interval spolehlivosti [0,03; -0,009]), vypočítaný na základě parametru a_r a přirozeného logaritmu vzdálenosti nor.



Obr. 12 Spearmanova korelace mezi geografickou vzdáleností nor (distance) a příbuzností (relatedness) jejich obyvatel na lokalitě Mpalanganga. Rovnice přímky lineární regrese je r = -0,0185-0,0018*ln(distance(m)). Spearmanova korelace – R = 0,008, p = 0,831. Příbuznost jedinců není závislá na vzdálenosti jejich nor.



Obr. 13 Simulace (10000 permutací) vztahů, popisujících korelaci mezi příbuzností zvířat na lokalitě Mpalanganga a geografickou vzdáleností jejich nor. Jednotlivé sloupce označují skupiny simulovaných hodnot, reálná hodnota Pearsonova korelačního koeficientu (*R* = 0,013) se signifikantně neliší od většiny simulovaných hodnot, neexistuje tedy korelace mezi vzdáleností nor a příbuzností zvířat.

Analýza přítomnosti vícenásobné paternity

Vícenásobná paternita nebyla potvrzena u žádného z deseti vrhů s třemi a více mláďaty, neboť ani v jednom případě se pro žádný lokus nevyskytly více než dvě otcovské alely. Hodnota „Total exclusionary power“ byla 91 % pro populaci ze Zomba Plateau, 98 % pro populaci z Mulanje a 94 % pro populaci z Mpalanganga, což významně vylučuje možnost, že by se vícenásobná paternita vyskytla a nebyla identifikována.

6 Diskuze

V čeledi rypošovití jsou celkem čtyři druhy solitérních rypošů (Burda et al. 2000), ale ani u jednoho z nich nebyla doposud publikována studie, zabývající se populačně genetickou strukturou a párovacím systémem. Přitom však studium párovacího systému a disperze solitérních druhů může napomoci k objasnění, jakým způsobem se v minulosti vyvíjely sociální systémy rypošů a zda je život ve skupině (eu)sociálních druhů ancestrálním nebo odvozeným znakem (Burda et al. 2000; Jarvis et al. 1994). Zároveň by tak byly rozšířeny poznatky o životě podzemních solitérních hlodavců. Ti byli z populačně genetického hlediska studováni obecně velmi málo a v podstatě existuje pouze jediná práce, která se zabývá příbuzenskou strukturou a charakteristikou disperze solitérního podzemního hlodavce a to jihoamerického tukotuko talaského (*Ctenomys talarum*) (Cutrera et al. 2005). Předložená práce, která je zaměřena na populačně genetickou strukturu a paternitu rypoše stříbřitého (*H. argenteocinereus*), se tedy snaží doplnit mezery ve znalostech týkajících se solitérních druhů rypošů. Byly analyzovány genetické rozdíly mezi několika populacemi tohoto druhu, příčiny výrazné genetické strukturovanosti, míra toku genů mezi populacemi a význam genetického driftu. Jedna z populací byla analyzována podrobněji za účelem stanovení příbuzenských vztahů mezi jedinci, paternity a maternity mláďat a subadultních jedinců, stanovení párovacího systému a sledování rozdílů v disperzi mladých samců a samic.

Genetická variabilita populací

Žádná z populací z Mulanje, Mpalanganga a Zomba Plateau se neodchylovala od Hardy-Weinbergovy rovnováhy, a stejně tak nebyly signifikantní ani tzv. koeficienty inbreedingu (F_{IS}). Páření v rámci jednotlivých populací je tedy podle všech dostupných výsledků náhodné a pravděpodobně nedochází k inbreedingu, např. vlivem filopatrie mláďat nebo výraznou izolací některé z populací. Náhodné páření je doloženo i u rypoše hotentotského (*C. h. hottentotus*), jehož populace se také od Hardy-Weinbergovy rovnováhy neodchylují (Bishop et al. 2004). Nejvyšší hodnoty AR (allelic richness) byly pro každý použitý lokus zjištěny u populace z Mulanje, což naznačuje její největší vnitropopulační variabilitu v rámci sledovaných populací, což potvrzují i výsledky faktoriální korespondenční analýzy. Tento jev lze celkem snadno vysvětlit, neboť zatímco na lokalitě Mpalanganga byl odchyt prováděn na ploše osmi hektarů (několik zvířat bylo odchyceno i mimo tuto plochu, ale jednalo se o vzdálenosti pouhých několika desítek metrů) a byla odchycena vesměs

všechna zvířata, v Mulanje byla odchytová plocha přibližně 1 km^2 a celkový vzorek byl představován pouze 18 jedinci.

Mezi populacemi z Mpalanganga, Zomba Plateau a Mulanje byly zjištěny signifikantní genetické rozdíly. Hodnoty F_{ST} jsou relativně velmi vysoké a velmi pravděpodobně jsou dány velkou vzdáleností lokalit, která se pohybovala od 18 do 84 km. Je asi problematické předpokládat, že by na tak velkou vzdálenost ještě mohlo docházet k pravidelnému toku genů, když vzdálenost maximální disperze v kontinuální populaci u rypoše stříbřitého může být maximálně několik set metrů (tato práce, Šumbera, in verb.) Při fragmentaci původních biotopů (dnes velmi často pozorované v různých oblastech Afriky) pak hraje daleko významnější úlohu náhodný drift, který může diferencovat i populace, které jsou si geograficky relativně blízké. Signifikatní hodnoty F_{ST} byly získány i mezi populacemi tukotuko talaského (*C. talarum*), kde byly zjištěny významné rozdíly mezi populacemi vzdálenými 3 km (Cutrera et al. 2005). Nízké hodnoty F_{ST} byly naopak získány při studiu tří subpopulací tukotuko *Ctenomys lami*. Na rozdíl od poměrně vzdálených populací rypoše stříbřitého, studovaných v této práci, byly tři subpopulace (A, B, C) *C. lami* vzdáleny pouze 150 m (A x B), 300 m (B x C) a 450 m (A x C). Hodnoty F_{ST} mezi všemi třemi byly menší než 0,06 (El Jundi & De Freitas 2004). Na druhou stranu, v Kalifornii byly sledovány tři populace pytlonoše horského (*Thomomys bottae*), vzdálené od sebe také jen několik set metrů. Docházelo mezi nimi k toku genů prostřednictvím přesunu jedinců z lokality na lokalitu, ale jeho význam pro snížení genetických rozdílů mezi populacemi byl velmi malý (Daly & Patton 1990). Lze tak usuzovat, že u podzemních hlodavců má tok genů význam jen při velmi malých vzdálenostech, přičemž s největší pravděpodobností mají velký vliv i různé ekologické faktory.

Podle bayesiánské analýzy v programu Structure se jako nejvhodnější modelové rozložení ukázalo rozdělení všech testovaných zvířat do čtyř nebo pěti skupin. Tento program určuje i poměrnou příslušnost každého zvířete do každé ze čtyř, resp. pěti skupin. Je až s podivem, že téměř každé zvíře bylo zařazeno do skupiny, která odpovídala populaci, do které náležel. To jen podporuje ostatní výsledky, naznačující výrazné genetické rozdíly mezi populacemi. Stejně tak křivka, popisující věrohodnosti jednotlivých modelů s různým K (Obr. 9), měla neustále stoupající tendenci, což naznačuje výraznou genetickou strukturovanost populací. Bohužel, ke stanovení, zda je tato strukturovanost dána fragmentací biotopů nebo vzdáleností jednotlivých populací, nejsou dostupná dostatečná data. V každém případě v genetické odlišnosti populací bude mít velkou roli náhodný genetický drift.

U tukotuko talaského byly testovány i rozdíly v genetické diferenciaci samostatně mezi samci a samicemi z jednotlivých lokalit. Zatímco výsledky z jedné sledované oblasti poukazovaly na rozdíl v genetické strukturovanosti mezi samci a samicemi (u samic byla výraznější genetická substruktura), genetická strukturovanost zvířat z druhé oblasti, vzdálené 140 km, se mezi pohlavími nelišila. I u rypoše stříbřitého by mohly být rozdíly mezi genetickou strukturovaností samců a samic, např. vlivem jejich rozdílné disperze a filopatrie, podobné hypotézy však nebylo možné testovat vzhledem k malému počtu vzorků. V budoucnu bude potřeba pravidelně rozmístěným vzorkováním získat dostatečný materiál z více lokalit, což umožní testovat specifické hypotézy zaměřené na směr a intenzitu toku genů u tohoto solitérního hlodavce. Pro studium vlivu jednotlivých pohlaví na rozmístění genetické variability bude rovněž potřeba kromě jaderných markerů (mikrosatelity) použít i znaky na mitochondriální DNA (viz např. Castella et al. 2001).

U podzemních herbivorů byl za obecný model distribuce jejich populací považován ostrovní model (Wright 1931), ale např. pro populace slepce egyptského (*Spalax ehrenbergi*) v Izraeli tento model příliš nevyhovoval a vzhledem ke kontinuálnímu rozšíření tohoto druhu se jako pravděpodobnější model ukázal model izolace vzdáleností (IBD) (Nevo et al. 1982). U rypoše stříbřitého výsledky testu izolace vzdáleností (IBD) ukázaly, že model izolace vzdáleností pro sledované populace rypoše stříbřitého neplatí a že genetická diferenciace nekoreluje se vzdáleností geografickou. Analyzovaná data však nejsou pro tento účel příliš vhodná (málo lokalit, nerovnoměrně rozmístěné, nerovnoměrná velikost vzorků), a proto zůstává otázka identifikace modelu toku genů u rypoše stříbřitého značně otevřená. Tok genů byl sledován i u populací tukotuko rionegerského (*Ctenomys rionegrensis*) (Wlasiuk et al. 2003). V tomto případě byla vzdálenost mezi jednotlivými populacemi přibližně 30 km a ani v tomto případě model izolace vzdáleností neplatil. Je zajímavé, že hodnota $F_{ST}/(1-F_{ST})$ mezi populacemi rypoše stříbřitého byla nejnižší pro nejvzdálenější lokality. To bude s největší pravděpodobností způsobeno náhodným genetickým driftem. Navíc v případě, kdy vlivem zemědělské aktivity možná dochází k fragmentaci vhodných biotopů, může být setkávání jedinců z jednotlivých populací omezeno a nedochází tak k výměnám genetických informací.

Všechny získané výsledky ukazují na výraznou genetickou strukturovanost mezi populacemi rypoše stříbřitého, což je v souladu s výsledky ostatních autorů pro jiné druhy podzemních hlodavců. Bohužel, vzhledem k nedostatečnému množství vzorků z většiny populací a rozdílnou rozlohou odchytových oblastí nelze odhadnout, zda v míře strukturovanosti populací existuje rozdíl mezi samci a a samicemi, stejně jako nelze zcela zamítnout platnost modelu izolace vzdáleností. Aby bylo možno získat co nejvěrohodnější

výsledky a doplnit tak tyto mezery, je třeba provést další analýzy, jejichž vstupní data by byla představována vzorky zvířat z populací, jejichž vzdálenost by byla menší než v této práci (tj. 18 km), přičemž každá populace by měla být zastoupena větším množstvím individuálních vzorků (min. 20 jedinců na populaci).

Párovací systém rypoše stříbřitého

O párovacích systémech solitérních rypošů neexistují v podstatě žádné relevantní informace. Párovací systémy sociálních druhů jsou celkově lépe prozkoumány, v poslední době však vlivem genetických analýz dochází k častému vyvracení obecně přijímaných pravd o jejich sociálním životě. Příkladem může být eusociální rypoš lysý (*H. glaber*), jehož párovací systém byl dlouho označován jako inbrední, neboť se předpokládalo, že dominantní samice kolonie se přednostně páří s příbuznými samci, aby zvýšila příbuznost svých potomků a následně tak jejich altruistické chování (Reeve et al. 1990). Později bylo zjištěno, že inbreeding rypoše lysého je spíše důsledkem nedostatečné dostupnosti nepříbuzných samců a že dominantní samice preferují outbrední páření (Clarke & Faulkes 1999; Braude 2000; Ciszek 2000). Párovací systém rypoše lysého je v současné době považován za monogynní, kdy je v kolonii přítomna pouze jedna rozmnožující se samice (Burda 2000). Stejně tak je tomu i u rypoše damarského (*F. damarensis*). Ačkoliv se v koloniích obou druhů vyskytuje více než jeden reprodukčně aktivní samec (Bennett & Jarvis 2004), u rypoše damarského byl jen v jednom případě nalezen vrh, který byl zplozen dvěma samci (Burland et al. 2004). Na druhou stranu, při stejné studii nebyl v kolonii nalezen otec pro velké množství mláďat a bylo potvrzeno, že dominantní samice se páří se samci z jiných kolonií („extra-colony males“, ECM). Obdobně je tomu u sociálního rypoše hotentotského (*C. h. hottentotus*), kde bylo aplikací mikrosatelitů zjištěno, že relativně velké množství mláďat (18,4 % a 29.2 % na dvou lokalitách) je zplozeno ECM (Bishop et al. 2004). V následující recentní práci pak bylo zjištěno, že hlavním důvodem pro páření s ECM je pravděpodobně snížení rizika inbreedingu, neboť ECM byli ve většině případů se samicí méně příbuzní než sociální samci v kolonii. Rovněž heterozygotnost mláďat zplozených ECM byla vyšší než u mláďat zplozených sociálními partnery (Bishop et al. 2007). U dalšího sociálního rypoše – rypoše Zechova (*F. zechi*) lze předpokládat monogamní párovací systém. Nebyl sice podroben genetické studii, nicméně je to možné podle výsledků terénních výzkumů, kdy v každé kolonii byla nalezena pouze jedna březí samice a vždy jen nejtěžší samec v kolonii jevil známky reprodukční aktivity (Yeboah & Dakwa 2002). Definitivní potvrzení, příp. vyvrácení monogamie však bude vyžadovat genetickou analýzu.

U rypoše stříbřitého se vzhledem k nevýraznému pohlavnímu dimorfismu, nízkým populačním hustotám a minimálnímu pohybu po zemském povrchu předpokládal monogamní párovací systém (Šumbera et al., submitted). Výsledky identifikace otců u vrhů z lokality Mpalanganga však ukazují spíše na polygynní párovací systém, neboť v každém roce byl nalezen jeden samec, který byl otcem tří (rok 2005), resp. čtyř (rok 2004) vrhů. Tyto výsledky jsou podobné jako v případě jiného solitérního podzemního hlodavce, tukotuko talaského (*C. talarum*), u kterého bylo analyzováno celkem 12 vrhů ze dvou lokalit (metodou DNA fingerprinting), přičemž bylo zjištěno, že na každé z lokalit existoval jeden samec, který zplodil dva, resp. tři vrhy v jednom roce (Zenuto et al. 1999). Tukotuko talaský má však na rozdíl od rypoše stříbřitého výrazný pohlavní dimorfismus. Ze solitérních druhů rypošů má výrazný pohlavní dimorfismus rypoš písečný (*Bathyergus janetta*), jehož samice jsou o čtvrtinu lehčí než samci (Herbst & Bennet 2006). U tohoto druhu však nebyl párovací systém dosud studován. Pro polygynní samce navíc existuje předpoklad, že jejich podzemní systémy budou delší a lineárnější, aby si zajistili přístup k samicím (Reichman et al. 1982; Rosi et al. 1996). Systémy samců rypoše stříbřitého se však ve své architektuře od systémů samic neliší (Šumbera et al., submitted).

K přesnému stanovení párovacího systému může napomoci i analýza přítomnosti vícenásobné paternity. Z devíti analyzovaných vrhů rypoše stříbřitého o minimální velikosti tří mláďat však nebyla ani u jednoho z nich prokázána. Stejně tak nebyla prokázána ani u výše zmíněných 12 vrhů tukotuko talaského (Zenuto et al. 1999). Vícenásobná paternita je přitom u hlodavců celkem běžným jevem, je známa např. pro morče lasicovité (*Galea musteloides*) (Sachser et al. 1999), myšice (rod *Apodemus*), v malé míře i pro myš západoevropskou (*Mus domesticus*) a myš domácí (*Mus musculus*) (Andrlíková et al., nepubl. data). Jsou ovšem známy i druhy, u kterých nebyla vícenásobná paternita nalezena, např. u křečka kalifornského (*Peromyscus californicus*), kde z celkem 28 analyzovaných vrhů ani jeden nevykazoval přítomnost vícenásobné paternity (Ribble 1991). Nepřítomnost vícenásobné paternity u rypoše stříbřitého může naznačovat jak polygynní, tak monogamní párovací systém. Polygynní párování na lokalitě Mpalanganga navíc může být způsobeno velmi nevyrovnaným poměrem pohlaví, kdy na 24 adultních samic připadali pouze čtyři adultní samci. Je tedy možné, že v populaci s vyrovnaným poměrem pohlaví by párovací systém byl monogamní. Takové populace se v přírodě vyskytují v antropogenně více ovlivněných biotopech, např. v okolí měst Mulanje a Blantyre (Šumbera et al. 2003b) a hypotézu vlivu poměru pohlaví adultních jedinců na párovací systém bude potřeba testovat detailní analýzou příbuzenských vztahů v dalších populacích tohoto druhu, zejména v populacích s vyšší populační hustotou,

neboť ta může mít na typ párovacího systému také velký vliv, jako je tomu kupříkladu u myšic (rod *Apodemus*), kde má populační hustota výrazný vliv na výskyt vícenásobné paternity (Bryja, Patzenhauerová, Stopka, nepubl. data). Při nízké populační hustotě v populaci Mpalanganga v kombinaci s nízkým počtem adultních samců se velká část samic se samcem pravděpodobně vůbec nesetkala (z 24 samic pouhých osm porodilo v roce 2005 mláďata) a neměly tak ani možnost výběru partnera.

Příbuzenská struktura a disperze v populaci solitérního rypoše

Na lokalitě Mpalanganga nebyla zjištěna žádná korelace mezi příbuznostmi jednotlivých dvojic zvířat a vzdálenostmi jejich nor. To bude s největší pravděpodobností způsobeno disperzí mláďat, která se pravděpodobně po opuštění mateřské nory nezdržují v její blízkosti. Podle všech dostupných údajů mláďata pravděpodobně mateřskou noru opouští po zemi. Tuto hypotézu podporují četné nálezy lebek mladých rypošů v sovích vývržcích (Šumbera & Šklíba, in verb.). Další možností je, že si mládě zahradí část matčina tunelu. Tak tomu je např. u slepce egyptského (*Spalax ehrenbergi*). Mláďata si vlastní noru hrabou jako rozšíření matčiny nory a když je jejich nora dostatečně dlouhá, je zahrazeno spojení s matčinou norou (Rado et al. 1992). U rypoše stříbřitého je dokumentován jeden případ, kdy byly blízko sebe nalezeny tři nory, obývané dospělci přibližně stejného stáří. Jarvis & Sale (1971) předpokládali, že tito tři jedinci by mohli být sourozenci a že jejich nory původně tvořily jeden podzemní systém. Vzhledem ke vzdálenostem mezi norami samic a jejich potomků, které byly zjištěny v této práci, je však mnohem pravděpodobnější disperze mladých rypošů stříbřitých nad zemí.

Bohužel v této práci nebyla k dispozici dostatečná data, aby bylo možno porovnat disperzi samců a samic. Obecně se předpokládá, že u většiny savců jsou dispergujícím pohlavím samci (Waser 1983). Disperze je pro mladé jedince nevýhodná hlavně kvůli nebezpečí predace, kdežto nevýhody filopatrie spočívají v kompetici o zdroje a v riziku vzniku inbredni deprese. Slepec egyptský (*S. ehrenbergi*) se inbreedingu vyhýbá tím, že nory samců jsou rovné a dlouhé až 300 m, čímž se dostávají z dosahu příbuzných samic (Rado et al. 1992). U rypoše stříbřitého by samčí disperze mohla být vysvětlením nevyváženého poměru pohlaví v neprospěch samců na lokalitě Mpalanganga. Samčí disperze se předpokládá i u tukotuko talaského (*C. talarum*) na základě rozdílných hodnot F_{ST} mezi samci a samicemi (Cutrera et al. 2005).

Příčinou nevyváženého poměru pohlaví v populaci rypoše stříbřitého na lokalitě Mpalanganga může být kromě disperze i pohyb samců po zemském povrchu v období páření

při hledání samic. V každém případě je velmi pravděpodobné, že hlavní vliv na poměr pohlaví má u této populace predace. Lokalita se nachází v lese miombo, který je obýván šakalem pruhovaným (*Canis adustus*) a několika druhy sov. Zvýšené riziko predace u tohoto druhu je podpořeno i poměrně dobře vyvinutým antipredačním chováním, při kterém rypoši dovedou detekovat a rozpoznat predátora a při narušení norového systému se pak velmi rychle ukrývají ve speciálních kolmých chodbách, které pravděpodobně slouží pouze jako úkryt před „hrabavými" predátory (Šklíba et al., submitted). Jiné druhy podzemních hlodavců mají spíše vyrovnaný poměr pohlaví, např. rypoš písečný (*B. janetta*) a tukotuko *Ctenomys lami* (Herbst & Bennett 2006; El Jundi & De Freitas 2004). Poměr pohlaví nevyvážený ve prospěch samic byl dokumentován u pytlonoše horského (*T. bottae*) (Daly & Patton 1990). Pro většinu mláďat rypoše stříbřitého v populaci Mpalanganga nebyl nalezen otec, což opět potvrzuje velký vliv predace na zvířata, vylézající nad zem. Pohyb nad zemí dokládá i průměrná vzdálenost mezi rodičovskými páry vrhů z roku 2005 (157 m), přičemž průměrná délka norového systému je 45 m (13 – 91 m) a jeho rozloha 507 m^2 (71 – 1700 m^2) (Šklíba et al., submitted). Při měření těchto vzdáleností je však třeba brát v potaz, že podle výsledků telemetrické studie na lokalitě Mpalanganga nejsou domovské okrsky jednotlivých zvířat prostorově stabilní. Neustále se plynule posunují v závislosti na dostupné potravě, kdy zvíře při hledání nových zdrojů potravy hloubí nové tunely a ucpává ty staré. Překryv původních chodeb nory a chodeb, používaných za jeden měsíc, je přibližně 50 % (Šklíba et al., submitted). Při stejné studii byla pozorována i jedna samice, která původní systém opustila a vybudovala si nový.

Výsledky analýz populace z lokality Mpalanganga potvrzují pohyb zvířat po zemi, a to buď samců v období páření při hledání samic nebo mladých jedinců v období disperze, přičemž pravděpodobné je obojí. Nevyvážený poměr pohlaví je nejspíše způsoben predací těchto zvířat, pohybujících se nad zemí. Vzhledem k nedostatečnému počtu zvířat nebylo možné porovnat, zda existuje rozdíl v disperzi samců a samic. Další studie budou vyžadovat např. telemetrické sledování v období páření nebo v období předpokládaného osamostatňování mláďat.

Možnosti dalšího studia rypoše stříbřitého s využitím genetických markerů

Mezi populacemi rypoše stříbřitého evidentně existují velké genetické rozdíly. Prostřednictvím dalších analýz by bylo možno identifikovat bariéry toku genů a definitivně stanovit, zda pro populace rypoše stříbřitého platí model izolace vzdáleností. Pro stanovení, zda mezi populacemi existuje tok genů, by bylo třeba odebrat vzorky z lokalit vzdálených

podle předem definovaných parametrů, např. jako tomu bylo v případě tukotuko talaského (*C. talarum*), kde byly vybrány dvě oblasti vzdálené 140 km a v každé z těchto oblastí byly vytyčeny tři lokality vzdálené 3 km, každá se dvěmi odchytovými plochami o velikosti 0,5 ha vzdálenými 150 m (Cutrera et al. 2005). Vzhledem k velkému areálu rozšíření by také bylo možno naopak porovnat rozdíly v genetické strukturovanosti populací vzdálených několik set kilometrů a žijících např. v rozdílných ekologických podmínkách.

Disperze rypoše stříbřitého se s největší pravděpodobností odehrává pohybem nad zemí. Vzhledem k velkému riziku, spojeného s opouštěním podzemních úkrytů, je velmi pravděpodobné, že disperguje pouze jedno pohlaví. Aby mohlo být stanoveno, zda jsou dispergujícím pohlavím samci, jak je předpokládáno pro většinu savců, je třeba provést podrobné studie dalších populací, podobně jako tomu bylo v případě populace z Mpalangangy. Vhodné by bylo uskutečnění podobné studie byla u populace, obývající rozlohou větší lokalitu, neboť na větší vzdálenost by rozdíl genetické strukturovanosti mezi samci a samicemi mohl být lépe zachycen. K tomuto cíli bude rovněž nezbytné použít genetické markery specifické pro jednotlivá pohlaví (mtDNA, markery na Y-chromozomu).

Pode výsledků analýz paternity a maternity se zdá, že rypoš stříbřitý by mohl být polygynním druhem. Je však možné, že vliv na zjištěný párovací systém mohl mít nevyrovnaný poměr pohlaví a nízká populační hustota. Z toho důvodu by opět bylo dobré provést podrobnější studii dalších populací rypoše stříbřitého.

Rypoš stříbřitý má jeden z největších areálů rozšíření ze všech druhů rypošů. Fylogeografická studie by napomohla identifikaci faktorů, které přispěly k tak velkému rozšíření. Její výsledky by zároveň mohly napomoci rozhodnout, která z teorií o vývoji sociality (Aridity food distribution hypothesis vs. The hypothesis of phylogenetic constraints) u rypošovitých je správná.

7 Literatura

ALLARD M.W. & HONEYCUTT R.L. 1992: Nucleotide sequence variation in the mitochondrial 12S rRNA gene and the phylogeny of African mole-rats (Rodentia: Bathyergidae). *Molecular Biology and Evolution* 9, 27-40.

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 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

BENNETT N.C & JARVIS J.U.M. 2004: *Cryptomys damarensis. Mammalian Species* 756, 1-5.

BENNETT N.C., FAULKES C.G., MOLTENO A.J. 2000: Reproduction in subterranean rodents. In: LACEY E., PATTON J.L. & CAMERON G.N. (eds) *Life underground: the biology of subterranean rodents*. University of Chicago Press, Chicago, pp. 145-177.

BENNETT N.C., CLARKE B.C. & JARVIS J.U.M. 1992: A comparison of metabolic acclimation in two species of social mole-rats (Rodentia: Bathyergidae) in southern Africa. *Journal of Arid Environments* 22, 189-198.

BENNETT N.C. 1989: The social structure and reproductive biology of the common mole-rat, *Cryptomys hottentotus hottentotus* and remarks on the trends in reproduction and sociality in the family Bathyergidae. *Journal of Zoology London* 219, 45-59.

BENNETT N.C., JARVIS J.U.M. & DAVIES K.C. 1988: Daily and seasonal temperatures in the burrows of African rodent moles. *South African Journal of Zoology* 23, 189-195.

BISHOP J.M., O'RYAN C. & JARVIS J.U.M. 2007: Social common mole-rats enhance outbreeding via extra-pair mating. *Biology Letters* 3, 176-179.

BISHOP J.M., JARVIS J.U.M., SPINKS A.C., BENNETT N.C. & O'RYAN C.O. 2004: Molecular insight into patterns of colony composition and paternity in the common mole-rat *Cryptomys hottentotus hottentotus*. *Molecular Ecology* 13, 1217-1229.

BRAUDE S. 2000: Dispersal and new colony formation in wild naked mole-rats: evidence against inbreeding as the system of mating. *Behavioral Ecology* 11, 7-12.

BURDA H. 2001: Determinants of the distribution and radiation of the African mole-rats (Bathyergidae, Rodentia). Ecology or geography? In: DENYS C., GRANJON L. & POULET A. (eds.) *African small mammals*. Collection colloques et séminares, Inst de Recherche pour le Developpement Editions, Paris, France, pp. 263-277.

BURDA H., HONEYCUTT R.L., BEGALL S., LOCKER-GRÜTJEN O. & SCHARFF A. 2000: Are naked and common mole-rats eusocial and if so, why? *Behavioral Ecology and Sociobiology* 47, 293-303.

BURDA H., ZIMA J., SCHARFF A., MACHOLÁN M. & KAWALIKA M. 1999: The karyotypes of *Cryptomys anselli* sp. nova and *Cryptomys kafuensis* sp. nova: new species of the common mole-rat from Zambia (Rodentia: Bathyergidae). *Z. Säugetierkunde* 64, 36-50.

BURLAND T.M., BENNETT N.C, JARVIS J.U.M. & FAULKES C.G. 2004: Colony structure and parentage in wild colonies of co-operatively breeding Damaraland molerats suggest incest avoidance alone may not maintain reproductive skew. *Molecular Ecology* 13, 2371-2379.

BURLAND T.M., BENNETT N.C., JARVIS J.U.M. & FAULKES C.G. 2002: Eusociality in African mole-rats: new insights from patterns of genetic relatedness in the Damaraland mole.rat (*Cryptomys damarensis*). *Proceedings of the Royal Society of London B* 268, 899-909.

BURLAND T.M., BISHOP J.M, O'RYAN C. & FAULKES C.G. 2001: Microsatellite primers for the African mole-rat genus *Cryptomys* and cross-species amplification within the family Bathyergidae. *Molecular Ecology Notes* 1, 311-314.

CASTELLA V., RUEDI M. & EXCOFFIER L. 2001: Contrasted patterns of mitochondrial and nuclear structure among nursery colonies of the bat *Myotis myotis*. *Journal of Evolutionary Biology* 14, 708-720.

CHAPUIS M.P. & ESTOUP A. 2006: Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution* 24 (2), 1-11.

CISZEK D. 2000: New colony formation in the "highly inbred" eusocial naked mole-rat: outbreeding is preferred. *Behavioral Ecology* 11, 1-6.

CLARKE F.M. & FAULKES C.G. 1999: Kin discrimination and female mate choice in the naked mole-rat *Heterocephalus glaber*. *Proceedings of the Royal Society of London B* 266, 1995-2002.

COONEY R. & BENNETT N.C. 2000: Inbreeding avoidance and reproductive skew in a cooperative mammal. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267, 801-806.

CUTRERA A.P., LACEY E.A. & BUSCH C. 2005: Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology* 14, 2511-2523.

DICICCIO T.J. & EFRON B. 1996: Bootstrap confidence intervals. *Statistical Science* 11, 189-212.

DALY J.C. & PATTON J.L. 1990: Dispersal, gene flow, and allelic diversity between local populations of *Thomomys bottae* pocket gophers in the coastal ranges of California. *Evolution* 44 (5), 1283-1294.

EL JUNDI T.A.R.J. & DE FREITAS T.R.O. 2004: Genetic and demographic structure in a population of *Ctenomys lami* (Rodentia-Ctenomyidae). *Hereditas* 140, 18-23.

FAULKES C.G., VERHEYEN E., VERHEYEN J., JARVIS J.U.M. & BENNETT N.C. 2004: Phylogeographical patterns of genetic divergence and speciation in African mole-rats (Family: Bathyergidae). *Molecular Ecology* 13 (3), 613-629.

FAULKES C.G. & BENNETT N.C. 2001: Family values: group dynamics and social control of reproduction in African mole-rats. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 184-190.

FAULKES C.G., BENNETT N.C., BRUFORD M.W., O'BRIEN H.P., AGUILAR G.H. & JARVIS J.U.M. 1997: Ecological constraints drive social evolution in the African mole-rats. *Proceedings of the Royal Society of London B* 264, 1619-1627.,

GOLDSTEIN D. B. & SCHLOTTERER C. 1999: Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, Oxford, 352 pp.

GOODNIGHT K.F. & QUELLER D.C. 1999: Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology* 8, 1231-1234.

GOUDET J. 2001: FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Updated from Goudet (1995). Available from http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html.

HALDANE J.B.S., 1954: An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics* 52: 631-635.

HERBST M. & BENNETT N.C. 2006: Burrow architecture and burrowing dynamics of the endangered Namaqua dune mole rat (*Bathyergus janetta*) (Rodentia: Bathyergidae). *Journal of Zoology* 270, 420-428.

HICKMAN G.C. 1979: A live-trap and trapping technique for fossorial mammals. *South African Journal of Zoology* 14, 9-12.

INGRAM C.M., DAMMANN P., ŠUMBERA R., EPPLEN J.,GILL C.A., BURDA H. & HONEYCUTT R.L.: Microsatellite primers for the silvery mole-rat, *Heliophobius argenteocinereus*, with application in other members of the family Bathyergidae. *Molecular Ecology Notes*, submitted.

INGRAM C.M., BURDA H., HONEYCUTT R.L. 2004: Molecular phylogenetics and taxonomy of the African mole-rats, genus *Cryptomys* and the new genus *Coetomys* Gray, 1864. *Molecular phylogenetics and evolution* 31 (3), 997-1014.

JARVIS J.U.M., O'RIAIN M.J., BENNETT N.C. & SHERMAN P.W. 1994: Mammalian eusociality: a family affair. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 47-51.

JARVIS J.U.M & BENNETT N.C 1990: The evolutionary history, population biology and social structure of the African mole-rats: family Bathyergidae. In NEVO E. & REIG O.A. (eds): *Evolution of subterranean mammals at the organismal and molecular levels*. Wiley Liss, New York, pp. 66-96.

JARVIS J.U.M & SALE J.B. 1971: Burrowing and burrow patterns of East African mole-rats. *Journal of Zoology London* 163, 451-479.

KALINOWSKI S.T., TAPER M.L. & MARSHALL T.C. 2007: Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology* 16, 1099-1106.

KARANTH K.P., AVIVI A., BEHARAV A & NEVO E. 2004: Microsatellite diversity in populations of blind subterranean mole rats (*Spalax ehrenbergi* superspecies) in Israel: speciation adn adaptation. *Biological Journal of the Linnean Society* 83(2), 229-241.

KONOVALOV D.A., MANNING C. & HENSHAW M.T. 2004: KINGROUP: a program for pedigree relationship reconstruction and kin group assignments using genetic markers. *Molecular Ecology Notes* 4, 779-782.

KOCK D., INGRAM C.M., FRABOTTA L.J., HONEYCUTT R.L. & BURDA H. 2006: On the nomenclature of Bathyergidae and Fukomys n. gen. (Mammalia: Rodentia). *Zootaxa* 1142, 51-55.

KOUDELA B., ŠUMBERA R. & SEDLÁČEK F. 2000: *Eimeria burdai* sp. n. (Apicomplexa: Eimeriidae), a new parasite species from subterranean African silvery mole-rat, *Heliophobius argenteocinereus*. *Folia Parasitologica* 47, 97-99.

LOVEGROVE B.G. 1991: The evolution of eusociality in molerats (Bathyergidae): a question of risks, numbers, and costs. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 28, 37-45.

MANTEL, N. 1967: The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27, 209-220.

MARSHALL T.C., SLATE J., KRUUK L.E.B. & PEMBERTON J.M. 1998: Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7, 639-655.

MODRÝ D., JIRKŮ M. & ŠUMBERA R. 2005: Three new species of *Eimeria* (Apicomplexa: Eimeriidae) from the silvery mole rat *Heliophobius argenteocinereus* Peters, 1846 (Rodentia: Bathyergidae) from Malawi. *Journal of Parasitology* 91(5), 1200-1203.

NEI M. 1978: Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89, 583-590.

NEVO E. 1999: Mosaic evolution of subterranean mammals: regressiun, progression and global convergence. Oxford University Press, Oxford, 512 pp.

NEVO E., HETH G. & BEILES A. 1982: Population structure and evolution in subterranean mole rats. *Evolution* 36 (6), 1283-1289.

PRITCHARD J.K., STEPHENS M. & DONELLY. P. 2000: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945-959.

QUELLER D.C. & GOODNIGHT K.F. 1989: Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43, 258-275.

RADO R., WOLLBERG Z. & TERKEL J. 1992: Dispersal of young mole rats (*Spalax ehrenbergi*) from the natal burrow. Journal of Mammalogy 73 (4), 885-890.

RANDALL J.A., MCCOWAN B., COLLINS K.C., HOOPER S.L. & ROGOVIN K. 2005: Alarm signals of the great gerbil: Acoustic variation by predator context, sex, age, individual, and family group. *Journal of Acoustical Society of America* 118 (4): 2706-2714.

RAYMOND M. & ROUSSET F. 1995: GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248-249.

REEVE H.K., WESTNEAT D.F., NOON W.A., SHERMAN P.W. & AQUADRO C.F. 1990: DNA ´fingerprinting` reveals high levels of inbreeding in colonies of the eusocial naked mole-rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 2496-2500.

REICHMAN O.J., WHITHAM T.G. & RUFFNER G.A. 1982: Adaptive Geometry of Burrow Spacing in Two Pocket Gopher Populations. *Ecology* 63, 687-695.

RIBBLE D.O. 1991: The monogamous mating system of *Peromyscus californicus* by DNA fingerprinting. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 29 (3), 161-166.

ROSI M.I., CONA M.I., PUIG S.VIDELA F. & ROIG V.G. 1996: Size and structure of burrow systems of the fossorial rodent *Ctenomys mendocinus* in the piedmont of of Mendoza province, Argentina. *Z. Säugetierkunde*61, 352-364.

ROUSSET F. 2000: Genetic differentiation between individuals. *Journal of Evolutionary Biology* 13, 58-62.

ROUSSET F. 1997: Genetic Differentiation and Estimation of Gene Flow from *F*-statistics Under Isolation by Distance. *Genetics* 145, 1219-1228.

SACHSER N., SCHWARZ-WEIG E., KEIL A. & EPPLEN J.T. 1999: Behavioural strategies, testis size, and reproductive success in two caviomorphic rodents with different mating systems. *Behaviour* 136, 1203-1217.

SCHARFF A., MACHOLÁN M., ZIMA J. & BURDA H. 2001: A new karyotype of *Heliophobius argenteocinereus* (Bathyergidae, Rodentia) from Zambia with field notes on the species. *Mammal Biology* 66, 376-378.

SKINNER J.D. & SMITHERS R.H.N. 1990: *The mammals of the southern African subregion.* University of Pretoria, Pretoria.

SPINKS A.C., VAN DER HORST G. & BENNETT N.C. 1997: Influence of breeding season and reproductive status on male reproductive characteristics in the common mole-rat, *Cryptomys hottentotus hottentotus*. *Journal of Reproduction and fertility* 109, 79-86.

ŠKLÍBA J. ŠUMBERA R. & CHITAUKALI W.N. Detection of danger and antipredatory behaviour in a solitary subterranean rodent. *Journal of Ethology*, submitted.

ŠKLÍBA J., ŠUMBERA R., ELICHOVÁ M. & BURDA H. How subterranean rodents explore subterranean ecotope: The case of a solitary bathyergid. *Behavioral Ecology*, submitted.

ŠUMBERA R., CHITAUKALI W.N. & BURDA H. 2007: Biology of the Silvery Mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*). Why Study a Neglected Subterranean Rodent Species? In: BEGALL S., BURDA H., SCHLEICH C.E. (eds.): *Subterranean Rodents: News from underground.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

ŠUMBERA R., CHITAUKALI W.N., ELICHOVÁ M., KUBOVÁ J. & BURDA H. 2004: Microclimatic stability in burrows of an Afrotropical solitary bathyergid rodent, the silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*). *Journal of Zoology London* 263, 409-416.

ŠUMBERA R., BURDA H., CHITAUKALI W.N. & KUBOVÁ J. 2003a: Silvery mole-rats (*Heliophobius argenteocinereus*) change their burrow architecture seasonally. *Naturwissenschaften* 90, 370-373.

ŠUMBERA R., BURDA H. & CHITAUKALI W.N. 2003b: Reproductive biology of a solitary subterranean bathyergid rodent, the Silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*). *Journal of Mammalogy* 84 (1), 278-287.

ŠUMBERA R., BARUŠ V. & TENORA F. 2003c: Heavy metals in the silvery mole-rat, *Heliophobius argenteocinereus* (Bathyergidae, Rodentia) from Malawi. *Folia Zoologica* 52(2), 149-153.

ŠUMBERA R. 2001: The mating behaviour of the silvery mole-rat. In: DENYS C., GRANJON L., POULET A. (eds.) *African small mammals*. Collection colloques et séminares, Inst de Recherche pour le Developpement Editions, Paris, France, pp. 353-364.

ŠUMBERA R, ŠKLÍBA J., ELICHOVÁ M., CHITAUKALI W.N. & BURDA H: Natural history and burrow system architecture of the silvery mole-rat (*Heliophobius argenteocinereus*) from *Brachystegia* woodland in Malawi. *Journal of Zoology*, submitted.

TENORA F., BARUŠ V., PROKEŠ M, ŠUMBERA R. & KOUBKOVÁ B. 2003: Helminths parasitizing the silvery mole-rat, *Heliophobius argenteocinereus* (Rodentia: Bathyergidae) from Malawi. *Helminthologia* 40 (3), 153-160.

VAN DAELE P.A.A.G., FAULKES C.G., VERHEYEN E. & ADRIAENS D. 2007: African Mole-rats (Bathyergidae): A complex radiation in tropical soils. In: BEGALL S., BURDA H., SCHLEICH C.E. (eds.): *Subterranean Rodents: News from underground.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

WALTON A.H., NEDBAL M.A. & HONEYCUTT R.L. 2000: Evidence from intron 1 of the nuclear transthyretin (Prealbumin) gene for the phylogeny of African mole-rats Bathyergidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 16, 467-474.

WASER P.N. & JONES W.T. 1983: Natal philopatry among solitary mammals. *The Quarterly Review of Biology* 58, 355-390.

WEIR B.S. & COCKERHAM C.C., 1984: Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38, 1358-1370.

WLASIUK G., GARZA J.C. & LESSA E.P. 2003: Genetic and geographic differentiationin the Rio Negro tuco-tuco (*Ctenomys rionegrensis*): inferring the roles of migration and drift from multiple genetic markers. *Evolution* 57(4), 913-926.

WRIGHT S. 1931: Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16, 395-420.

YEBOAH S. & DAKWA K.B. 2002: Aspects of the feeding habits and reproductive biology of the Ghana mole-rat *Cryptomys zechi* (Rodentia, Bathyergidae). *African Journal of Ecology* 40, 110-119.

ZIMA J., MACHOLÁN M., MUNCLINGER P. & PIÁLEK J. 2004: Genetické metody v zoologii. Karolinum, Praha, 239 pp.

ZENUTO R.R., LACEY E.A & BUSCH C. 1999: DNA fingerprinting reveals polygyny in the subterranean rodent *Ctenomys talarum*. *Molecular Ecology* 8, 1529-1532.