

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Kamila Opletalová

Evolve vnitřní postzygotické reprodukční izolace u ptáků
Evolution of intrinsic postzygotic reproductive isolation in birds

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Radka Reifová, Ph.D.

Konzultant: doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 15. 5. 2015

.....

Kamila Opletalová

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce, Radce Reifové, za cenné rady, pomoc s analýzou výsledků, a velkou trpělivost s vedením mé práce. Děkuji Tomášovi Albrechtovi za pomoc se získáváním vzorků pro praktickou část mé práce, poskytnutí zázemí a prostředků v detašovaném pracovišti Ústavu pro biologii obratlovců AV ČR ve Studenci, a zkušenosti, které jsem pod jeho dozorem získala. Děkuji Jiřímu Reifovi za to, že mohu spolupracovat na tak zajímavém projektu, jako je výzkum slavíků. Velké díky patří také Becky Cramer za pomoc při získávání vzorků a Pavlíně Opatové a Heleně Hejlové za jejich vstřícnost a pomoc s prací v laboratoři. Dále děkuji mé rodině a přítelovi za jejich podporu.

Abstrakt

Hybridní sterilita hraje klíčovou roli v reprodukční izolaci v průběhu evoluce druhů. Její role a mechanismy, které jsou za ní zodpovědné, jsou relativně dobře prozkoumány u savců a drozofily (organismů s heterogametickými samci), ale u organismů s heterogametickými samicemi (například u ptáků) se o nich ví velmi málo. Studium reprodukční izolace u ptáků neprobíhá obvykle v zajetí, ale v přírodních hybridních zónách. Hybridní sterilita přednostně postihuje heterogametické pohlaví, u savců tedy samce (XY) a u ptáků samice (ZW), v souladu s Haldaneovým pravidlem. V důsledku toho pozorujeme u ptáků sníženou introgresi na pohlavních chromozomech a v mitochondriální DNA oproti autozomální DNA. Práce shrnuje známé informace o příčinách a projevech hybridní sterility u dvou lépe prostudovaných modelů mezidruhé hybridizace, lejsků a slavíků. Součástí práce je navíc i praktická část, která porovnává morfologii spermií dvou druhů slavíků.

Klíčová slova

Haldaneovo pravidlo, hybridní sterilita, hybridní zóna, introgrese, slavík

Abstract

Hybrid sterility plays a key role in reproductive isolation during evolution of species. The mechanisms responsible for hybrid sterility are relatively well understood in organisms with heterogametic males, such as drosophila or mouse but are largely unknown in organisms with heterogametic females (e.g. birds). Studies on reproductive isolation in birds takes place in natural hybrid zones, instead of captivity. Hybrid sterility preferentially affects the heterogametic sex, males in mammals (XY) and females in birds (ZW), according to Haldane's rule. This leads to reduced introgression in sex chromosomes and mitochondrial DNA compared to autosomal DNA. The purpose of this thesis is to summarize known information on hybrid sterility and its expression in two models of interspecies hybridization: flycatchers and nightingales. Additionally, this thesis contains also a practical part, which compares morphology of sperms of two species of nightingales.

Keywords

Haldane's rule, hybrid sterility, hybrid zone, introgression, nightingale

Seznam zkratek

F₁ – první filiální (dceřiná) generace

F₂ – druhá filiální generace

BC – back-cross, zpětné křížení

HPD – hybrid placental dysplasia

HS – hybridní sterilita

mtDNA – mitochondriální DNA

nDNA – nukleární (jaderná) DNA

RIM – reprodukčně izolační mechanismy

sm. od. – směrodatná odchylka

SO – slavík obecný (*Luscinia megarhynchos*)

ST – slavík tmavý (*Luscinia luscinia*)

Obsah

1. Úvod	1
1.1. Speciace	1
1.2. Reprodukčně izolační mechanismy	1
2. Hybridní sterilita a neživotoschopnost.....	4
2.1. Haldaneovo pravidlo.....	5
2.2. Molekulární mechanismy hybridní sterility samců	6
3. Hybridní sterilita a neživotoschopnost u organismů s heterogametickými samicemi.....	8
3.1. Evoluce hybridní sterility a neživotoschopnosti u ptáků	8
3.2. Příklady Haldaneova pravidla pro hybridní sterilitu u ptáků a mechanismy vzniku samičí hybridní sterility	9
3.2.1. Lejsek bělohlavý a lejsek černokrký	11
3.2.2. Slavík obecný a slavík tmavý.....	12
3.3. Snížená introgrese chromozomu Z a mtDNA mezi blízce příbuznými druhy ptáků.....	12
3.4. Hybridní sterilita samců u ptáků	14
4. Závěr	15
5. Vlastní výsledky	16
5.1. Modelový systém dvou druhů slavíků	16
5.2. Příprava preparátů a měření spermií	16
5.3. Výsledky	17
5.4. Návaznost na diplomovou práci	19
6. Použitá literatura.....	20

1. Úvod

1.1. Speciace

Nové živočišné druhy vznikají evolučním procesem, který nazýváme speciace. Speciaci rozlišujeme z geografického hlediska na sympatrickou, parapatrickou a alopatickou (Mayr, 1942). V případě alopatické speciace dochází k úplnému oddělení populací, např. geografickou bariérou, a v oddělených populacích pak probíhá samostatný vývoj. Ten vede k vytvoření reprodukčních bariér mezi populacemi (Coyne and Orr, 2004). Reprodukční bariéry s různou úspěšností zabraňují genovému toku mezi populacemi. Pokud se populace dostanou po nějaké době do sekundárního kontaktu, jedinci z různých populací se vzájemně spolu už nemusí křížit, anebo vzniká v tzv. sekundárních hybridních zónách sterilní či neživotaschopné potomstvo (Barton and Hewitt, 1985). Při speciaci parapatické a sympatické nedochází ke geografickému oddělení populací a reprodukční bariéry vznikají za přítomnosti genového toku. Během sympatické speciace se nově vznikající druhy vyvíjejí v těsné blízkosti na stejném území. Při parapatické speciaci mají vznikající druhy odlišné areály rozšíření, ale ty jsou ve vzájemném kontaktu a může mezi druhy docházet ke genovému toku (Butlin et al., 2008).

Toto rozdělení speciace však není striktní. V přírodě často dochází k tomu, že po sekundárním kontaktu populací je mezi nimi vytvořena jen částečná reprodukční bariéra a jedinci z odlišných populací se vzájemně mohou alespoň částečně plodně křížit (Presgraves, 2010). Další evolucí může dojít buď k posílení reprodukční izolace a dokončení speciace, anebo ke splynutí populací do jednoho druhu (Coyne and Orr, 2004). I alopatická speciace tedy často probíhá za přítomnosti určitého genového toku. Někteří autoři proto navrhují členění speciace spíše podle evolučních sil, které jsou odpovědné za vznik reprodukční izolace (Smadja and Butlin, 2011).

1.2. Reprodukčně izolační mechanismy

Klíčovou roli ve speciaci hrají reprodukčně izolační mechanismy (RIM). RIM jsou prostředkem, jak zabránit křížení a genovému toku mezi vznikajícími druhy, a tím jejich opětovnému splynutí v jeden druh. K tomu může přispět zpočátku jeden, nebo více těchto mechanismů. RIM dělíme na prezygotické a postzygotické (Coyne and Orr, 1998).

Prezygotické jsou jakékoliv mechanismy, které zabraňují oplodnění samičí pohlavní buňky samčími, a následnému vzniku zárodku neboli zygoty. Prezygotické mechanismy se mohou dále dělit na prekopulační a postkopulační. Prekopulační jsou takové mechanismy, které zabraňují samotnému páření mezi jedinci odlišných druhů. Mezi nejjednodušší prekopulační mechanismy patří například geografická či časová izolace (Coyne and Orr, 1998). Jestliže se každý druh vyskytuje v jiném údolí, na opačném břehu řeky nebo na jiném hostitelském druhu rostliny, nebo jeden druh je aktivní ve dne, a druhý v noci, z praktického hlediska je tak situace, kdy se dva druhy potkají za účelem páření, velice nepravděpodobná. Mezi prekopulační RIM patří i různé etologické bariéry – v takovém případě, že se dva příbuzné druhy potkají, mají natolik odlišný vzhled, chování nebo pářicí rituály, že jsou jeden druh vůči druhému neatraktivní. Prekopulační prezygotické izolační bariéry v podobě zasnubních tanců a dalších etologických rituálů jsou u ptáků mimořádně různorodé a úzce druhově specifické. Postkopulační RIM jsou nejrůznější fyziologické či biochemické faktory, které zabraňují splynutí pohlavních buněk a vzniku zygoty. Mezi postkopulační prezygotické RIM patří například nekompatibilita gamet, která zabrání jejich splynutí v zygotu, případně dalšímu vývoji zárodku (Coyne and Orr, 1998).

Postzygotické bariéry lze rozčlenit na vnitřní a vnější (Coyne and Orr, 2004). Příkladem vnitřních je hybridní neživotoschopnost nebo sterilita. Hybridní sterilita a neživotoschopnost vzniká v důsledku chromozomální či genové inkompatibility, která způsobuje problémy v meióze, anebo vede dříve nebo později k zastavení vývoje embrya či mláděte a následně k jeho smrti. Snížená fitness hybridů je způsobena odlišností hybridního fenotypu od rodičovských druhů, což může znamenat nedostatečné ekologické přizpůsobení hybridů, kteří tak nejsou schopni efektivně využívat dostupné zdroje z prostředí, v němž se vyskytují. Nebo je jejich intermediální fenotyp činí méně atraktivními pro oba druhy a tedy potenciální partnery. Tyto nevýhody se označují termínem vnější postzygotická bariéra.

Rychlosti, s jakou vznikají různé reprodukční bariéry, se mohou podstatně lišit u různých taxonomických skupin. Například u savců se zdá, že poměrně rychle vznikají vnitřní postzygotické reprodukční bariéry, tj. již výše zmíněná hybridní sterilita a neživotoschopnost (Fitzpatrick, 2004). Naopak u ptáků vznikají tyto bariéry pomalu

a očekává se, že při speciaci hrají důležitější roli prezygotické a vnější postzygotické reprodukční bariéry (Grant and Grant, 1992) – viz Kapitola 3.1.

Rychlost s jakou vznikají různé RIM, do velké míry závisí na mechanismech, které pohánějí speciaci. Pokud je speciace poháněná disruptivní ekologickou selekcí (tzv. ekologická speciace) či pohlavním výběrem (tzv. speciace pomocí pohlavního výběru), vznikají nejdříve prezygotické a vnější postzygotické RIM a teprve posléze vnitřní postzygotické RIM. Naopak pokud je speciace způsobená především akumulací mutací v dceřiných populacích (ať už vlivem genetického driftu nebo selekcí), vzniká nejdříve vnitřní postzygotická reprodukční izolace a teprve později se druhy odliší ekologicky (Seehausen et al., 2014).

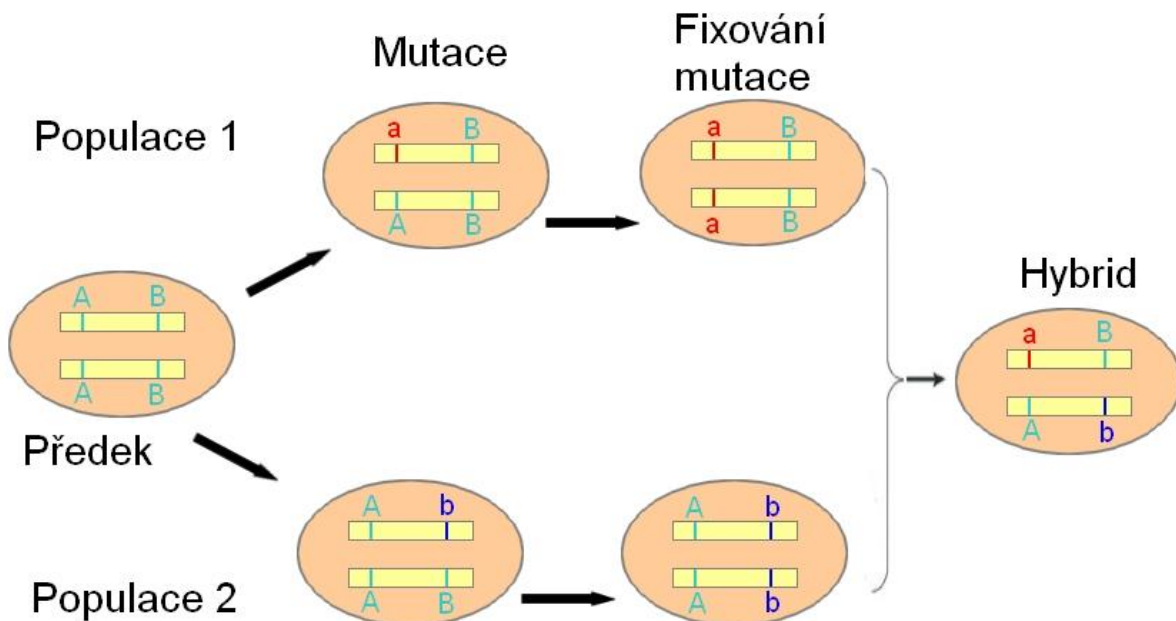
Většina výzkumů týkajících se vnitřní postzygotické reprodukční izolace je prováděna v laboratořích na tradičních modelových organismech, jako je myš domácí (*Mus musculus*) nebo octomilka (*Drosophila melanogaster*), které se vyznačují vlastnostmi, jako je snadná křížitelnost v chovech a krátká generační doba (Fields and Johnston, 2005). Tyto druhy patří mezi organismy s pohlavními chromozomy XY, u kterých se hybridní sterilita a neživotoschopnost vytváří rychleji u samců (viz Kapitola 2.2.). Ve srovnání s tím jsou znalosti o vnitřních RIM u organismů s pohlavními chromozomy ZW, kde naopak hybridní sterilita a neživotoschopnost postihuje přednostně samice, velmi omezené.

Ve své práci bych ráda shrnula známé poznatky o hybridní sterilitě a neživotoschopnosti u ptáků, kteří patří mezi organismy s pohlavními chromozomy ZW. Ptáci jsou tradiční modelovou skupinou pro výzkum geografických, ekologických a behaviorálních aspektů speciace (Price, 2008). Většina druhů ptáků, a to i blízké příbuzných, se snadno rozezná pomocí druhově specifického zpěvu. Patrně z tohoto důvodu se předpokládá, že u ptáků jsou při speciaci zásadní zejména prezygotické a vnější postzygotické RIM.

Protože ptáci mají delší generační dobu a obtížněji se kříží v laboratorních podmínkách, existuje u nich relativně málo poznatků o mechanismech vnitřní postzygotické izolace. Nedávné studie na přírodních hybridních populacích přitom naznačují, že by tento druh reprodukční izolace mohl být ve speciaci ptáků důležitější, než se předpokládalo (Gowen et al., 2014; Qvarnström et al., 2010; Storchová et al., 2010).

2. Hybridní sterilita a neživotaschopnost

Vysvětlení vzniku hybridní sterility a neživotaschopnosti nabízí model Dobzhansky-Muller, který byl formulován dokonce třikrát nezávisle na sobě (Bateson, 1909, citováno dle Orr, 1997; Dobzhansky, 1936; Muller, 1942). Jejich model předpokládá předka s genotypem AA v jednom lokusu a s genotypem BB v lokusu jiném (Obrázek 1), pro zjednodušení leží oba lokusy na stejném chromozomu. Tento mateřský druh se rozdělí na dvě alopatrické populace, přičemž u každé v evoluci nastane mutace v jednom lokusu. Tyto mutace neovlivňují fertilitu ani životaschopnost a jsou v populacích fixovány (mutace snižující fitness by byly přírodním výběrem z populace eliminovány). Vzniknou dvě dceřiné populace s genotypem aaBB a AAbb. Pokud dojde k hybridizaci mezi těmito populacemi, vzniknou F₁ hybridy s genotypem AaBb. Protože kombinace alel a a b nebyla v průběhu evoluce podrobena přírodnímu výběru, mohou spolu alely negativně interagovat, a způsobovat sterilitu či neživotaschopnost F₁ hybridů.



Obrázek 1. Schéma modelu Dobzhanského a Mullera

Teoreticky mohou mutace ve dvou různých genech stačit ke vzniku reprodukční bariéry a ke speciaci druhů. Obvykle ale hybridní sterilitu nebo neživotaschopnost způsobuje více

genů. Bylo prokázáno, že počet lokusů způsobujících Dobzhansky-Muller nekompatibility vzrůstá rychleji než lineárně s časem divergence (Orr and Turelli, 2001).

Hybridní sterilita se objevuje během divergence druhů dříve, než neživotaschopnost hybridů, což může být způsobeno genovou nebo chromozomovou inkompatibilitou, která může způsobovat problémy při segregaci chromozomů během meiózy, která je citlivější na mutace než mitóza (Johnson and Kliman, 2002). Podrobněji viz Kapitola 2.2. Další teorií vysvětlující rychlejší vývoj HS je vliv pohlavního výběru na geny účastnící se reprodukce, které se tak v evoluci vyvíjejí mnohem rychleji (Wu et al., 1996).

2.1. Haldaneovo pravidlo

Haldaneovo pravidlo (Haldane, 1922) říká, že pokud je rozdíl ve fitness hybridů v F_1 generaci, je to zpravidla heterogametické pohlaví, které vykazuje nižší životaschopnost nebo plodnost. Tedy téměř vždy se hybridní sterilita a neživotaschopnost objevuje zpravidla dříve u heterogametického pohlaví. Podle typu chromozomálního určení pohlaví u daného druhu je to tedy u savců samec (model *Drosophila* s pohlavními chromozomy XY), zatímco u ptáků samice (model *Abraxas* s pohlavními chromozomy ZW). Toto pravidlo však neplatí jen pro savce a ptáky, ale ve větší či menší míře pro všechny organismy s pohlavními chromozomy (Laurie, 1997).

O vysvětlení Haldaneova pravidla se snaží více teorií. Jednou z nich je teorie dominance, kterou formuloval H. J. Muller v roce 1940. Podle této teorie se recesivní alely genů snižujících fertilitu nebo životaschopnost na pohlavních chromozomech projeví u heterozygotního pohlaví, protože jsou přítomny jen v jedné kopii (Muller, 1940). Tato teorie byla prokázána, když při křížení drozofil byly samice, které byly homozygotní v chromozomu X, rovněž neživotaschopné jako hemizygotní samci (Coyne and Orr, 2004). Tato teorie je možným (ale pravděpodobně ne jediným) vysvětlením Haldaneova pravidla.

Dále vliv Haldaneova pravidla na hybridní sterilitu vysvětluje teorie rychlé evoluce pohlavních chromozomů X a Z. Pomocí křížení drozofil a později i myši bylo zjištěno, že na chromozomu X je hustota genů způsobujících hybridní sterilitu mnohem větší, než na autozomech (Masly and Presgraves, 2007; Storchová et al., 2004). Zároveň je chromozom

X (stejně jako u ptáků chromozom Z) jen velmi málo dotčen genovou introgrésí, ve srovnání s autozomy (Borge et al., 2005; Manthey and Spellman, 2014). Novější výzkumy naznačují, že velký vliv chromozomu Z ve speciaci je ještě výraznější, než v případě chromozomu X, protože je spojován s postzygotickými i prezygotickými reprodukčně izolačními mechanismy (Storchová et al., 2010).

Další teorie, která se snaží o objasnění Haldaneova pravidla, je teorie rychlejších samců, která se zaměřuje na vysvětlení snížené fertility a životaschopnosti u druhů s heterogametickými samci. Tato teorie předpokládá, že sterilita nebo neživotaschopnost se bude častěji vyskytovat u samců, a to z důvodu rychlejší evoluce genů exprimovaných v samcích způsobené pohlavním výběrem (Wu and Davis, 1993; Wu et al., 1996). Tato hypotéza může vysvětlit, proč se hybridní sterilita samců u organismů s heterogametickými samci objevuje v evoluci dříve než hybridní sterilita samic u organismů s heterogametickými samicemi.

2.2. Molekulární mechanismy hybridní sterility samců

Hybridní sterilita samců je u organismů s heterogametickými samci často prvním reprodukčně izolačním mechanismem, který se v evoluci objeví, a proto byla jejímu objasnění věnována velká pozornost. Většina poznatků o HS, které máme, byla získána výzkumy na myších a drozofilách, čili organismech s heterogametickými samci.

Hybridní sterilita i neživotaschopnost mohou být způsobeny genovými konflikty, které mají několik podob. Jedním z nich je meiotický tah, při kterém dochází k přednostnímu vzniku gamet se sobeckými geny (Seehausen et al., 2014), což může ovlivňovat poměr pohlaví u potomků (např. gen *Overdrive* u drozofily).

Při křížení poddruhů octomilek *Drosophila pseudoobscura bogotana* x *Drosophila pseudoobscura pseudoobscura* bylo zjištěno, že sobecký gen *Overdrive* na X chromozomu způsobuje samčí hybridní sterilitu v F₁ generaci a zároveň změnu poměru pohlaví potomků. Sterilita není úplná, ale je vystřídána krátkým obdobím nízké plodnosti, během které ale bylo více než 90% potomků samičího pohlaví, což je způsobeno meiotickým tahem. Tento gen, který se vyvinul po oddělení poddruhů u poddruhu *Drosophila pseudoobscura*

bogotana, byl později potlačen geny (tzv. supresory) vázanými na autozomy. Tato kompenzace však u hybridů nefunguje (Presgraves, 2010).

Další gen způsobující sterilitu samců u hybridů *Drosophila mauritiana* a *Drosophila simulans* je X-vázaný gen *Odysseus*, který je předmětem pozitivní selekce a je také pravděpodobně příkladem genového konfliktu (Presgraves, 2010).

Výzkumy na myších, konkrétně křížení inbredních kmenů dvou poddruhů myši domácí (*Mus musculus musculus* a *Mus musculus domesticus*), identifikovaly první gen hybridní sterility u myši – *Prdm9* (Mihola et al., 2009). Tento gen hraje důležitou roli v regulaci rekombinace. Bhattacharyya et al. (2013) dále ukázal, že hybridní sterilita samců je způsobena poruchou párování chromozomů v průběhu meiózy ve spermatogenezi. Nespárování homologních chromozomů v profázi I meiotického vedení vede k zastavení meiózy v pachytenní fázi. Primární spermatocyty, které zůstanou v pachytenní fázi příliš dlouho, jsou nakonec odstraněny apoptózou. To se projevilo výrazným snížením plodnosti samců, zmenšení varlat o více než polovinu a dokonce k úplné absenci zralých spermatozoí.

Stejný problém byl pozorován i u hybridních samic v oogenezi, ale s menší (poloviční) pravděpodobností výskytu, a navíc byla většina vadných oocytů eliminována ještě před narozením, takže hybridní samice byly plodné (Bhattacharyya et al., 2013).

Dále bylo přibližně u třetiny hybridů pozorováno selhání párování homologní sekvence chromozomů X a Y a/nebo introgrese autozomálního chromatinu do pohlavního tělíska (sex body). To může mít za následek poruchu inaktivace pohlavních chromozomů X a Y v meióze (Good et al., 2010). Zastavení meiózy z důvodu nesprávného párování bylo rozpoznáno i u dalších živočišných druhů a autoři výzkumu se domnívají, že by tento mechanismus jako příčina hybridní sterility mohl platit univerzálně.

3. Hybridní sterilita a neživotoschopnost u organismů s heterogametickými samicemi

Organismy s heterogametickými samicemi mají chromozomální určení pohlaví podle modelu XX/ZW . Mezi ně patří kromě ptáků také motýli (*Lepidoptera*), plazi a některé ryby. Postzygotické RIM u motýlů jsou také předmětem výzkumů (Presgraves, 2002), během kterých bylo zjištěno, že heterogametické pohlaví je postihováno dříve, než homogametické a dokonce často dochází k vývoji úplné neživotoschopnosti samic dříve, než k HS u samců (obdobně jako u drozofily).

3.1. Evoluce hybridní sterility a neživotoschopnosti u ptáků

Hybridizace je u ptáků poměrně častým jevem (podle Grant and Grant (1992) v přírodě hybridizuje přibližně 10% druhů ptáků). Přestože se prezygotické RIM u nich vyvíjejí relativně rychle, netvoří bariéru natolik nepřekonatelnou, aby hybridizaci zcela zabránily. Dále se vyvíjejí vnitřní postzygotické RIM, od snižování fertility a teprve později ke snižování životoschopnosti hybridů, a to dříve u heterogametického, tedy samčího pohlaví. Přičemž bylo pozorováno, že dochází ke snižování fertility u samčího pohlaví dříve, než ke snížení životoschopnosti u F_1 samic. Na rozdíl od drozofil, u kterých se projevuje jak sterilita, tak snížená životoschopnost u samců (XY) dříve, než u samic (Presgraves, 2008).

Ve srovnání se savci se u ptáků hybridní sterilita a neživotoschopnost vyvíjí pomaleji. Odhadovaná doba pro vývoj hybridní sterility u drozofil byla pomocí molekulárních hodin odhadnuta na 1,5 – 3,5 milionu let, zatímco u ptáků vznik HS trvá přibližně 2,5 milionu let (pěvci a malí nezpěvní) až 4,7 milionů let pro velké nezpěvné ptáky (Price and Bouvier, 2002). Zjistilo se, že reprodukční bariéry vznikají rychleji, pokud se oba nově vznikající druhy vyskytují v sympatrii, než je tomu u druhů alopatrických (Coyne and Orr, 1989).

Podle studie Allana C. Wilsona, se úplná neživotoschopnost vyvíjí u savců až desetkrát rychleji (uvádí 2 – 3 milionu let) než u ptáků nebo žab (21 milionu let) (Prager and Wilson, 1975). Tento dramatický rozdíl vysvětluje rychlejší evoluci regulačních drah u savců. Wilson zdůrazňuje rychlost evoluce anatomie savců oproti ptákům. Vzhledem ke spektru tělních plánů u savců, od netopýrů až po kytovce, předpokládá zároveň i rychlejší evoluci

regulačních drah a reprodukčních bariér (Wilson et al., 1974). Zmiňuje ale zároveň alternativní hypotézu. Imunologická interakce mezi matkou a plodem, která je přítomna u savců, ale z pochopitelných důvodů se nemůže uplatňovat u ptáků, může v případě velké genetické odlišnosti vést k rozpoznání plodu imunitním systémem matky, vytvořením protilátek a následně k potratu. Tento mechanismus by mohl přispívat k rychlejšímu vývoji RIM u savců, ale nebyl potvrzen, a ve výzkumech nebyl prokázán vliv imunosuprese na životaschopnost hybridů. K velice podobným závěrům došel ve své publikaci i Fitzpatrick (2004), který se rovněž přiklání k regulační hypotéze. Ten stanovil dobu divergence druhů pomocí divergence mitochondriálního genu cytochromu b u savců na průměrné 4 miliony let, zatímco u ptáků 21 milionu let (Fitzpatrick, 2004).

Dalším vysvětlením, proč u savců vzniká hybridní neživotaschopnost rychleji než u ptáků, může být maternální-fetální genomický konflikt (Kropáčková et al., 2015). Tento konflikt mezi velikostí placenty a velikostí plodu je ovlivněn velkým zastoupením otcovských genů exprimovaných v placentě, což může u savců vést k abnormálnímu růstu placenty či plodu (hybrid placental dysplasia – HPD). Následkem toho může docházet k častým potratům nebo úmrtí matek během porodu a tím k selekčnímu tlaku na vznik prezygotických bariér (Kropáčková et al., 2015).

3.2. Příklady Haldaneova pravidla pro hybridní sterilitu u ptáků a mechanismy vzniku samičí hybridní sterility

Podle Wu a Davise (1993) je mezi ptáky 21 příkladů Haldaneova pravidla pro hybridní neživotaschopnost a 30 pro hybridní sterilitu. Bohužel konkrétní seznam těchto druhů nebyl v této, ani jiné práci uveden. Z komplexního přehledu Handbook of Avian Hybrids of the World (McCarthy, 2006) jsem vybrala 19 druhů splňujících dvě základní kritéria: hybridizují v přírodě a hybridní samice jsou sterilní, zatímco samci plodní (možná výjimka u lejsků, viz Kapitola 3.2.1), jakožto příklady Haldaneova pravidla pro hybridní sterilitu u ptáků (Tabulka 1). O mechanismech hybridní sterility samic se bohužel většinou nic neví. Dále blíže popíši dva případy, které jsou předmětem recentních výzkumů, a pokusím se shrnout, co se u nich ví o mechanismech hybridní sterility samic.

Tabulka 1. Druhy ptáků hybridizující v přírodě vykazující hybridní sterilitu samic

Druh 1	Druh 2	Místo hybridizace	Publikace
Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Kopřivka obecná (<i>Anas strepera</i>)	S Evropa, S Amerika	Merrifield, 1998; Randler, 2008
Kachna divoká (<i>Anas platyrhynchos</i>)	Zrzohlávka rudozobá (<i>Netta rufina</i>)	Eurasie	Randler, 2008
Husa velká (<i>Anser anser</i>)	Berneška bělolící (<i>Branta leucopsis</i>)	SZ Rusko	McCarthy, 2006
Polák velký (<i>Aythya ferina</i>)	Polák chocholačka (<i>Aythya fuligula</i>)	Evropa, Z Rusko	Randler, 2008
Husice rezavá (<i>Tadorna ferruginea</i>)	Husice liščí (<i>Tadorna tadorna</i>)	Eurasie	Gray, 1958; McCarthy, 2006
Strakapoud kalifornský (<i>Picoides nuttallii</i>)	Strakapoud osikový (<i>Picoides pubescens</i>)	S Kalifornie	Miller, 1955 citováno dle McCarthy, 2006
Holub skvrnitý (<i>Columba guinea</i>)	Holub skalní (<i>Columba livia</i>)	Subsaharská Afrika	McCarthy, 2006
Hrdlička zahradní (<i>Streptopelia decaocto</i>)	Hrdlička divoká (<i>Streptopelia turtur</i>)	Evropa, Střední východ	McCarthy, 2006
Hrdlička chechtavá (<i>Streptopelia risoria</i>)	Hrdlička divoká (<i>Streptopelia turtur</i>)	Kalifornie	Gray, 1958; McCarthy, 2006
Raroh jižní (<i>Falco biarmicus</i>)	Sokol stěhovavý (<i>Falco peregrinus</i>)	Eurasie, Afrika	McCarthy, 2006
Volavka popelavá (<i>Ardea cinerea</i>) ♂	Volavka červená (<i>Ardea purpurea</i>) ♀	S Eurasie	McCarthy, 2006
Slavík tmavý (<i>Luscinia luscinia</i>)	Slavík obecný (<i>Luscinia megarhynchos</i>)	V Evropa, Kazachstán	Kverek, 2002; Reifova et al., 2011; Stadie, 1991
Lejsek bělokrký (<i>Ficedula albicollis</i>)	Lejsek černohlavý (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	Evropa	Alatalo et al., 1982; Gelter et al., 1992; Sætre and Sæther, 2010
Jiříčka obecná (<i>Delichon urbica</i>)	Vlaštovka obecná (<i>Hirundo rustica</i>)	Eurasie	Mayr, 1942; McCarthy, 2006
Budníček iberský (<i>Phylloscopus brehmii</i>)	Budníček menší (<i>Phylloscopus collybita</i>)	Z Pyreneje	Bensch et al., 2002; Helbig et al., 2001
Konopka obecná (<i>Carduelis cannabina</i>)	Stehlík obecný (<i>Carduelis carduelis</i>)	Evropa	Gray, 1958; McCarthy, 2006
Konopka obecná (<i>Carduelis cannabina</i>)	Zvonek zelený (<i>Carduelis chloris</i>)	Evropa, Z Rusko	Gray, 1958; McCarthy, 2006
Stehlík obecný (<i>Carduelis carduelis</i>)	Zvonek zelený (<i>Carduelis chloris</i>)	Eurasie	Gray, 1958; Mayr, 1942
Křivka obecná (<i>Loxia curvirostra</i>)	Křivka bělokřídlá (<i>Loxia leucoptera</i>)	S Eurasie, S Amerika	Knox, 1992 citováno dle McCarthy, 2006

3.2.1. Lejsek bělohlavý a lejsek černokrký

Za jeden z příkladů Haldaneova pravidla pro hybridní sterilitu u ptáků byli považováni lejsci. Přírodní hybridní zóna lejska bělohlavého (*Ficedula albicolis*) a lejska černokrkého (*Ficedula hypoleuca*) je zkoumána v České republice a ve Švédsku. Tyto dva druhy se spolu poměrně ochotně kříží a bylo zjištěno, že navzdory nedávné divergenci, před méně než 1 milionem let (Backström et al., 2013; Nadachowska-Brzyska et al., 2013), jsou F₁ hybridi samičího pohlaví sterilní (Alatalo et al., 1990; Gelter et al., 1992), zatímco samci plodní (Qvarnström et al., 2010).

Výzkum zaměřený na zjištění hnízdních úspěchů hybridů těchto dvou druhů byl prováděn na ostrově Gotland ve Švédsku (Gelter et al., 1992). Zde byly pozorovány heterospecifické páry a jejich hnízdní úspěchy. 25 hybridních samic bylo zkříženo se samci lejska bělokrkého, snesly snůšky normální velikosti, ale pouze čtyřem se vylíhla mláďata. Ovšem tři z těchto samic byly identifikovány jako hybridní pouze na základě jejich peří, což není spolehlivý způsob určení, vzhledem k malým mezidruhovým rozdílům u samic. Čtvrtá samice byla okroužkována jako hybrid v hnízdě heterospecifických rodičů, což může ovšem také znamenat, že byla výsledkem extrapárové kopulace, která je u samic lejsků relativně často pozorována, zejména pak, pokud se jedná o smíšený pár. Žádnou z těchto čtyř samic tedy nelze s jistotou označit za hybridní. Závěrem výzkumu tedy bylo, že všechny hybridní samice (celkem 21) byly sterilní. Nevylíhnutá vejce nebyla dále testována na oplodnění případně míru vývoje zárodku, ani mechanismy HS samic nebyly zkoumány (Gelter et al., 1992).

Sterilita hybridních samic lejsků byla potvrzena genetickou analýzou v novějším výzkumu (Svedin et al., 2008) rovněž zaměřeném na HS samců lejsků, který je blíže popsán v podkapitole 3.4. Novější studie ukázala, že u lejsků jsou pravděpodobně sterilní i samci, což je vzhledem k jejich nedávné divergenci, před méně než 1 milionem let (Backström et al., 2013; Nadachowska-Brzyska et al., 2013), překvapivé zjištění (Ålund et al., 2013). Předpokládalo se, že sterilita samců se u ptáků vyvíjí mnohem pomaleji – přibližně 4,7 milionů let (Price and Bouvier, 2002).

3.2.2. *Slavík obecný a slavík tmavý*

K divergenci těchto druhů došlo přibližně před 1,8 miliony let (Storchová et al., 2010). Modelová hybridní zóna se nachází v centrálním Polsku, kde se oba druhy vyskytují v sympatrii a příležitostně hybridizují. Sterilita u samic hybridů slavíka tmavého (*Luscinia luscinia*) a slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) byla prokázána při křížení v zajetí ve voliérách (Stadie, 1991). Při křížení heterospecifických párů pozoroval nižší hnízdní úspěšnost, některé samice snášely menší snůšky nebo se nevylíhla všechna vejce ve snůšce.

Nicméně hybridizací vzniká životaschopné potomstvo s intermediálními fenotypovými prvky rodičovských druhů. Při zpětném křížení hybridního samce a samice slavíka tmavého ve voliérách byla mláďata fenotypově nerozeznatelná od "čistých" slavíků tmavých a nebyla pozorována snížená fitness back-cross hybridů (Stadie, 1991). Po dosažení dospělosti F₁ hybridní samice, na rozdíl od hybridních samců, nevykazovaly žádné známky hnízdního chování. Jak bylo pozorováno nejprve v zajetí (Stadie, 1991), tak později při odchytu v přírodě (Reifova et al., 2011), nevytváří se jim hnízdní nažina, nereagují na zpěv samců a nejeví zájem o hnízdní materiál, což může být důkazem jejich sterility.

3.3. Snížená introgrese chromozomu Z a mtDNA mezi blízce příbuznými druhy ptáků

U ptáků je v rámci výzkumu postzygotických reprodukčně izolačních mechanismů velmi důležitá míra mezidruhově genové introgrese, podle které můžeme zjišťovat pokročilost postzygotických RIM. Introgrese, neboli vnášení genů jednoho druhu do genomu jiného druhu, vzniká následkem jejich vzájemného křížení neboli hybridizace, za předpokladu, že tvoří plodné potomstvo v F₁ generaci (Anderson, 1949, citováno dle Rheindt and Edwards, 2011). Význam genové introgrese byl donedávna podceňovaný, nicméně se jedná o evolučně velmi důležitý mechanismus, neboť vnáší do genomu evoluční novinky.

Introgrese mezi jednotlivými druhy DNA se velmi liší. Například mitochondriální DNA, která je přenášena po mateřské linii, podléhá u ptáků velmi nízké míře introgrese (na rozdíl od savců, kde může být introgrese v mtDNA intenzivnější než v nDNA). To je způsobeno

sníženou fertilitou a životaschopností hybridů heterogametického (samičího) pohlaví, které má tak menší pravděpodobnost přenášení mtDNA na potomky. Ze stejného důvodu pozorujeme sníženou míru introgrese na chromozomu W (Rheindt and Edwards, 2011). Pohlavní chromozomy X a Z, které jsou v homogametickém pohlaví ve dvou kopiích, mohou při meióze rekombinovat, stejně jako autozomy, a introgresi by tak měli podléhat častěji.

Míru introgrese je možné určit dvěma metodami. Buď pomocí zastoupení BC a F₂ hybridů v sympatrické populaci nebo stále častěji používanými koalescenčními modely isolation-with-migration, které dokáží odhadnout míru introgrese nejen v současné době, ale i v minulosti (Pinho and Hey, 2010).

Protože chov a křížení je u většiny ptáků v laboratorních podmínkách velmi obtížné, tento výzkum probíhá v hybridních zónách, kde se dané druhy kříží (viz Kapitola 3.2). V několika výzkumech bylo potvrzeno, že introgrese bývá asymetrická, tedy že jeden z druhů vykazuje větší míru introgrese, než ten druhý (Carling and Brumfield, 2008; Storchová et al., 2010).

Jeden z prvních výzkumů introgrese u ptáků se prováděl na hybridní zóně lejsků a již v roce 1990 u nich byla prokázána introgrese nDNA (Tegelstrom and Gelter, 1990). Další výzkumy tyto závěry potvrdily a navíc srovnáním četnosti výskytu introgrese mezi autozomálními a gonozomálními markery bylo zjištěno, že chromozom Z je vůči introgresi poměrně odolný a pozorujeme na něm tedy menší míru introgrese (Borge et al., 2005; Ellegren et al., 2012; Sætre and Sæther, 2010). Snížená míra genové introgrese na pohlavních chromozomech a mtDNA je v souladu s předpokladem, že Haldaneovo pravidlo a hybridní sterilita samic hrají důležitou roli ve speciaci ptáků. Toto bylo potvrzeno na výzkumech hybridních zón i u dalších druhů, např. u slavíků (Storchová et al., 2010), papežů (Carling and Brumfield, 2008; Carling et al., 2010), budníčků (Bensch et al., 2002) a poddruhů sojky západní (Gowen et al., 2014).

3.4. Hybridní sterilita samců u ptáků

Hybridní sterilita samců se u ptáků vyvíjí v evoluci později než sterilita samčího pohlaví, ale dříve než neživotaschopnost samic. Na rozdíl od organismů systému XY je poměrně málo prozkoumaná a je jen málo výzkumů na toto téma.

Ålund et al. (2013) na univerzitě v Uppsale ve Švédsku zkoumali důvody snížených reprodukčních úspěchů hybridů samčího pohlaví, vznikajících hybridizací mezi lejskem černohlavým (*Ficedula hypoleuca*) a lejskem bělokrkým (*Ficedula albicollis*) v hybridní zóně na ostrově Öland ve Švédsku. Navzdory relativně nedávné divergenci těchto sesterských druhů (před méně než 1 milionem let) (Backström et al., 2013), vykazují všechny hybridní samice úplnou sterilitu a u samců byla pozorována snížená fitness. Navzdory předchozím studiím, které naznačovaly, že hybridní samci jsou fertilní a v hybridní zóně existují BC hybridi, novější studie prokázala, že v sympatrii žádní BC hybridi neexistují (Kawakami et al., 2014).

Jako snadné vysvětlení by se zde nabízela snížená fitness hybridů z důvodu selekce proti intermediálnímu fenotypu, nicméně bylo zjištěno, že ejakulát 85% hybridních samců neobsahoval žádné spermie a zbylých 15% mělo pouze abnormální spermie. Přestože osm samic, které byly spárovány s hybridními samci, nakladlo vejce, žádné z nich se nevylíhlo a při bližším zkoumání nebyly nalezeny žádné spermie, vejce tedy vůbec nebyla oplodněna.

Průměrná doba vývoje kompletní hybridní sterility je u ptáků odhadována na 4,7 milionů let (Price and Bouvier, 2002), proto byly závěry tohoto výzkumu u lejsků poměrně překvapivé. Doba vzniku hybridní sterility samců může být u ptáků tedy podstatně kratší, než se předpokládalo (Ålund et al., 2013).

4. Závěr

Vnitřní postzygotické RIM (zejména pak hybridní sterilita) hrají u ptáků ve speciaci důležitější roli, než jsme donedávna předpokládali. Vyplývá to z výzkumů genové introgrese, které ukazují, že u ptáků je snížená introgrese, v souladu s Haldaneovým pravidlem, zejména na pohlavních chromozomech a na mtDNA (Rheindt and Edwards, 2011). V rozporu se závěry dřívějších studií (Price and Bouvier, 2002), které uvádějí, že hybridní sterilita se vyvíjí u ptáků relativně pomalu (4,7 milionů let) ve srovnání s organismy s heterogametickými samci (1,5 – 2,5 milionu let u drozofily), novější výzkumy ukazují, že může vznikat podstatně rychleji, než jsme se domnívali. Tuto skutečnost dokazuje výzkum u lejsků, u kterých je vyvinutá kompletní hybridní sterilita méně než 1 milion let od divergence (Backström et al., 2013; Nadachowska-Brzyska et al., 2013), a rákosníků přibližně 2 miliony let (Hansson et al., 2012).

Přestože u mnoha hybridizujících druhů byla prokázána sterilita samic, mechanismy, které za ní stojí, nejsou ve srovnání s výzkumem hybridní sterility samců u organismů s heterogametickými samci téměř vůbec prozkoumané. Z dostupných pozorování vyplývá, že se tyto mechanismy mezi druhy mohou výrazně lišit – hybridní sterilita u samic lejsků a slavíků měla překvapivě úplně jiný projev. Zatímco samice slavíků vůbec nejevily zájem o páření (Stadie, 1991), samice lejsků se se samci pářily, a snášely vejce, která se ale nevylíhla (Gelter et al., 1992). To je vzhledem k velké investici samic do rozmnožování pozoruhodné.

Přestože hybridizujících ptačích druhů je poměrně hodně – 10% (Grant and Grant, 1992), těch, které jsou intenzivněji studovány, je velmi málo, a konkrétní mechanismy, které za vznikem reprodukční izolace stojí, u nich zatím nejsou objasněny. Této problematice by mělo být v budoucnu věnováno více pozornosti.

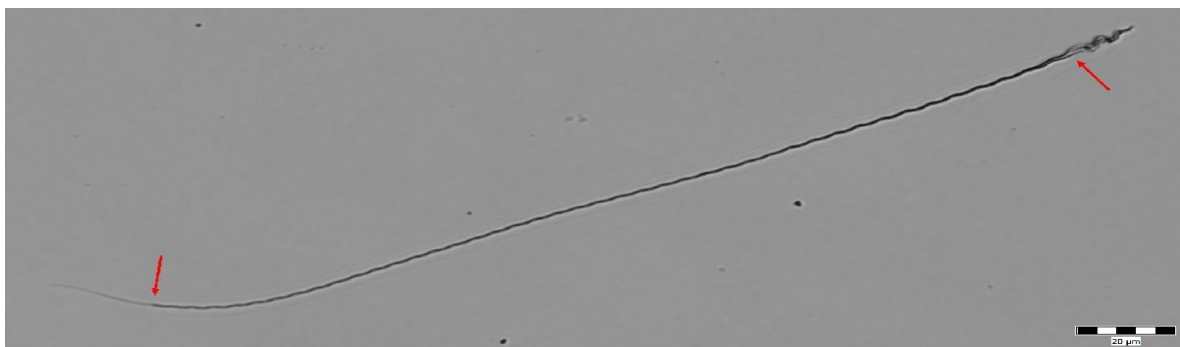
5. Vlastní výsledky

5.1. Modelový systém dvou druhů slavíků

Slavík obecný (*Luscinia megarhynchos*) je rozšířen po celé Evropě a ve středním Polsku se setkává a příležitostně kříží v hybridní zóně se slavíkem tmavým (*Luscinia luscinia*), který má areál rozšíření dále na východ. Jak bylo již popsáno v kapitole 3.2.2, hybridní samice jsou sterilní a samci plodní, což bylo dokázáno v chovech v zajetí a zjištění z přírodní hybridní zóny tato tvrzení nevyvrací. Cílem pilotního experimentu bylo srovnat morfologii spermií mezi oběma druhy slavíků.

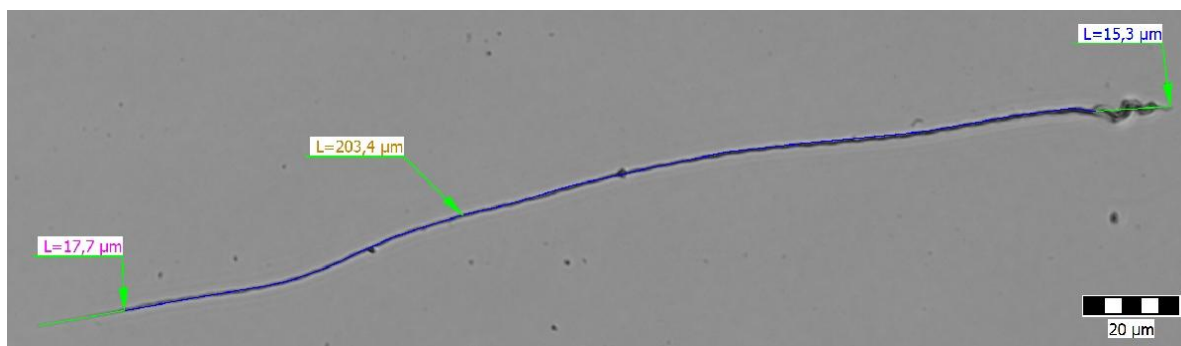
5.2. Příprava preparátů a měření spermií

Odchyt slavíků byl prováděn v hybridní zóně v centrálním Polsku na několika lokalitách v okolí města Chocz na počátku hnízdní sezóny (první polovina května) 2013. Ptáci byli chytáni do nárazových sítí za použití nahrávky zpěvu nebo do sklopných pastí. Samcům byl po provedení kloakální masáže (viz např. Albrecht et al., 2013) odebrán vzorek ejakulátu pomocí automatické pipety. Část tohoto vzorku byla přemístěna do pětiprocentního roztoku formalínu k pozdějšímu zpracování. V laboratoři bylo po promíchání nanášeno 7 μ l z každého vzorku na podložní sklíčko, které bylo po zaschnutí (1,5 hodiny) opláchnuto destilovanou vodou za účelem odstranění zbytků formalínu, a opět usušeno. Dále bylo z každého sklíčka (od každého samce) vyfotografováno 20 náhodně vybraných spermií (Obrázek 2) za pomoci mikroskopu Olympus BX51 (objektiv s dvacetinásobným zvětšením) a kamery Olympus DP71.



Obrázek 2. Fotografie spermií slavíka tmavého (zvětšení 200x). Šipky naznačují přechody mezi hlavičkou, krčkem a bičíkem

Focení a měření nafocených spermií bylo prováděno v programu QuickPhoto Industrial 2.3 (Olympus). Během pořizování fotografií a měření spermií jsem pozorovala různé morfologické abnormality, nejčastěji hlavičky, ale i krčku nebo bičíku. Tyto spermie nebyly do měření zahrnuty. U každé spermie byla měřena délka hlavičky, krčku a bičíku (Obrázek 3). Celková délka byla dopočítána součtem těchto veličin.



Obrázek 3. Spermie slavíka tmavého s naměřenými hodnotami pro jednotlivé části (zvětšení 200x)

Ke statistickému zpracování byl použit program Statistica. K výpočtům byly použity průměry z 20 naměřených hodnot u každé proměnné (hlavička, krček, bičík, celková délka spermie).

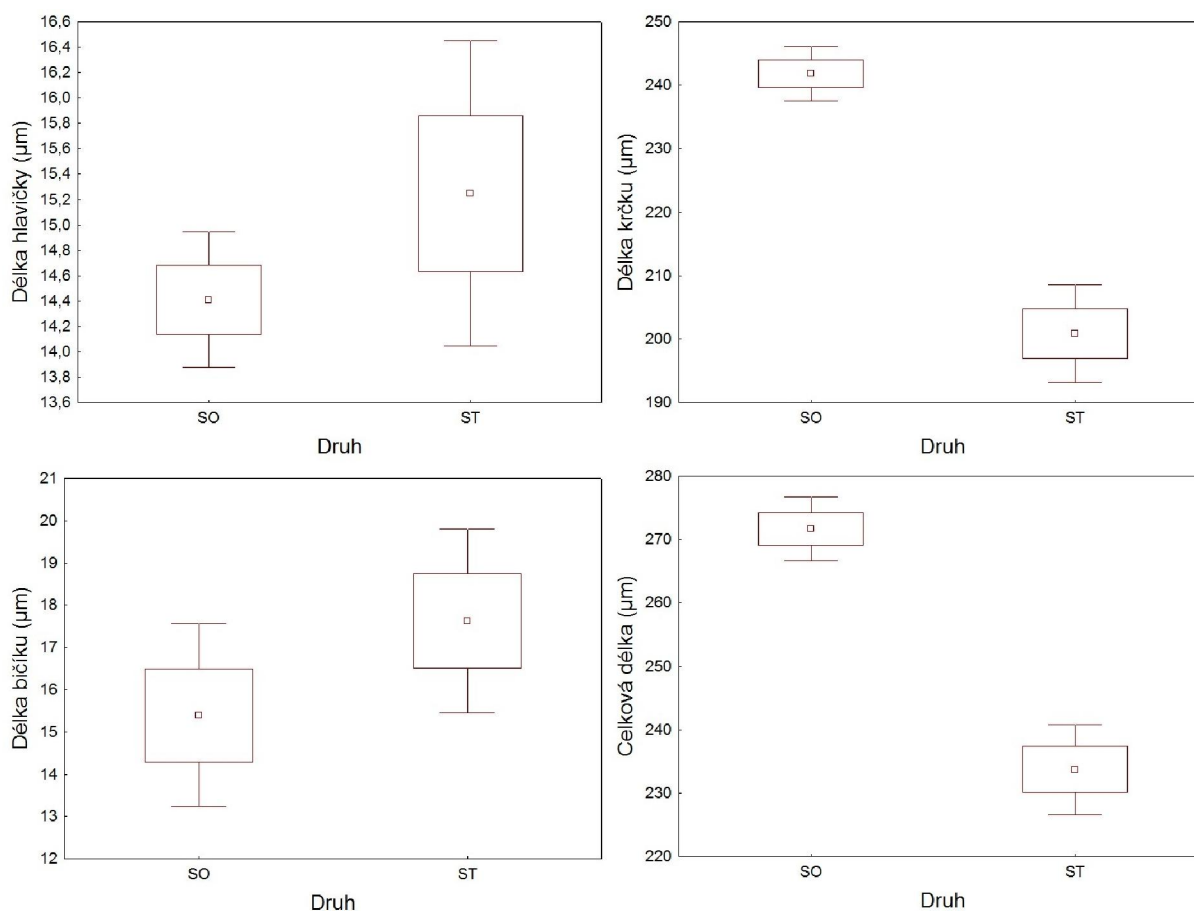
5.3. Výsledky

Spermie obou druhů vypadají velmi podobně a na první pohled se odlišují pouze celkovou délkou. Mají hlavičku vřetenovitého tvaru s patrným akrozomem, velmi dlouhý krček a relativně krátký bičík. Krček a bičík se souhrnně nazývají flagelum. Délka hlavičky není u obou druhů příliš rozdílná, ale u slavíka tmavého je v průměru nepatrně delší. Větší odlišnost je v délce krčku, který je výrazně delší u slavíka obecného. Bičík je mírně delší u slavíka tmavého (viz Tabulka 2).

Tabulka 2. Délka hlavičky, krčku a bičíku spermie slavíka obecného (SO) a slavíka tmavého (ST)

Délka	Průměr SO	Sm. od. SO	Průměr ST	Sm. od. ST	p (t-test)
Hlavička	14,41	0,72	15,25	1,23	0,181
Krček	241,88	5,80	200,86	7,80	0,000
Bičík	15,40	2,92	17,63	2,23	0,221
Celkem	271,69	6,80	233,73	7,24	0,000

K uvedené analýze byl použit velmi malý reprezentační vzorek sedmi jedinců slavíka obecného a čtyř jedinců slavíka tmavého. Z měření spermií však vyplynuly zřetelné rozdíly v morfologii mezi oběma druhy. Přestože mezidruhové rozdíly v morfologii pozorujeme u všech proměnných (Obrázek 4), za signifikantní ($P < 0,05$) můžeme označit pouze rozdíl v délce krčku a v celkové délce spermatické buňky.



Obrázek 4. Grafy pro jednotlivé části spermií. SO – slavík obecný, ST – slavík tmavý. Průměr; průměr + střední chyba průměru, průměr \pm 1,96*střední chyba průměru (interval spolehlivosti).

Větší celková délka a menší variabilita spermií (Lifjeld et al., 2010) bývá u ptáků obecně spojována s velkou kompeticí spermií a některé studie dokazují, že délka flagela (krčku s bičíkem) má pozitivní korelaci s rychlostí spermií (Humphries et al., 2008). Nemůžeme zatím však s jistotou říci, zda tyto závěry platí i u slavíků. K tomu bude potřeba analýza dat z většího počtu jedinců, což bude náplň mé budoucí diplomové práce.

5.4. Návaznost na diplomovou práci

V rámci diplomové práce budu analyzovat vzorky přibližně 140 jedinců odchycených během výzkumů v hybridní zóně v Polsku v letech 2012 – 2015, které jsem částečně pomáhala získat a připravit. Velikost spermií jedinců ze sympatrie bude dále srovnána s velikostí jedinců z alopatrických oblastí (Česká republika pro SO, SV Polsko pro ST) pro zjištění možnosti posunu znaků. Ráda bych také zjistila, jaká je délka jednotlivých částí spermií u F₁ hybridů mezi oběma druhy slavíků. U vybraného souboru samců obou druhů bude dále sledována motilita spermií a ovlivnění motility spermií heterospecifickým a konspecifickým samičím prostředím (viz např. Cramer et al., 2014), abychom zjistili, zda rozdílná délka spermií obou druhů může hrát roli v postkopulační prezygotické reprodukční izolaci.

6. Použitá literatura

* Sekundární citace

Alatalo, R.V., Gustafsson, L., and Lundberg, A. (1982). Hybridization and Breeding Success of Collared and Pied Flycatchers on the Island of Gotland. *The Auk* 99, 285–291.

Alatalo, R.V., Eriksson, D., Gustafsson, L., and Lundberg, A. (1990). Hybridization between Pied and Collared Flycatchers—sexual selection and speciation theory. *Journal of Evolutionary Biology* 3, 375–389.

Albrecht, T., Kleven, O., Kreisinger, J., Laskemoen, T., Omotoriogun, T.C., Ottosson, U., Reif, J., Sedláček, O., Hořák, D., Robertson, R.J., et al. (2013). Sperm competition in tropical versus temperate zone birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280.

Ålund, M., Immler, S., Rice, A.M., and Qvarnström, A. (2013). Low fertility of wild hybrid male flycatchers despite recent divergence. *Biology Letters* 9, 20130169.

* **Anderson, E. (1949).** Introgressive hybridization, citováno dle **Rheindt, F.E., and Edwards, S.V. (2011).** Genetic Introgression: An Integral but Neglected Component of Speciation in Birds. *The Auk* 128, 620–632.

Backström, N., Sætre, G.-P., and Ellegren, H. (2013). Inferring the demographic history of European *Ficedula* flycatcher populations. *BMC Evolutionary Biology* 13, 2.

Barton, N.H., and Hewitt, G.M. (1985). Analysis of Hybrid Zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16, 113–148.

* **Bateson, W. (1909).** Heredity and variation in modern lights. *Darwin and Modern Science* 85–101, citováno dle **Orr, H.A. (1997).** Haldane's Rule. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 195–218.

Bensch, S., Helbig, A.J., Salomon, M., and Seibold, I. (2002). Amplified fragment length polymorphism analysis identifies hybrids between two subspecies of warblers. *Molecular Ecology* 11, 473–481.

Bhattacharyya, T., Gregorova, S., Mihola, O., Anger, M., Sebestova, J., Denny, P., Simecek, P., and Forejt, J. (2013). Mechanistic basis of infertility of mouse intersubspecific hybrids. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 110, E468–E477.

Borge, T., Webster, M.T., Andersson, G., and Saetre, G.-P. (2005). Contrasting Patterns of Polymorphism and Divergence on the Z Chromosome and Autosomes in Two *Ficedula* Flycatcher Species. *Genetics* 171, 1861–1873.

Butlin, R.K., Galindo, J., and Grahame, J.W. (2008). Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 363, 2997–3007.

- Carling, M.D., and Brumfield, R.T. (2008).** Haldane's Rule in an Avian System: Using Cline Theory and Divergence Population Genetics to Test for Differential Introgression of Mitochondrial, Autosomal, and Sex-Linked Loci across the Passerina Bunting Hybrid Zone. *Evolution* 62, 2600–2615.
- Carling, M.D., Lovette, I.J., and Brumfield, R.T. (2010).** Historical Divergence and Gene Flow: Coalescent Analyses of Mitochondrial, Autosomal and Sex-Linked Loci in Passerina Buntings. *Evolution* 64, 1762–1772.
- Coyne, J.A., and Orr, H.A. (1989).** Patterns of Speciation in *Drosophila*. *Evolution* 43, 362–381.
- Coyne, J.A., and Orr, H.A. (1998).** The Evolutionary Genetics of Speciation. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 353, 287–305.
- Coyne, J.A., and Orr, H.A. (2004).** Speciation (Sinauer Associates Sunderland, MA).
- Cramer, E.R.A., Laskemoen, T., Eroukhanoff, F., Haas, F., Hermansen, J.S., Lifjeld, J.T., Rowe, M., Saetre, G.-P., and Johnsen, A. (2014).** Testing a post-copulatory pre-zygotic reproductive barrier in a passerine species pair. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 68, 1133–1144.
- Dobzhansky, T. (1936).** Studies on Hybrid Sterility. II. Localization of Sterility Factors in *Drosophila Pseudoobscura* Hybrids. *Genetics* 21, 113–135.
- Ellegren, H., Smeds, L., Burri, R., Olason, P.I., Backström, N., Kawakami, T., Künstner, A., Mäkinen, H., Nadachowska-Brzyska, K., Qvarnström, A., et al. (2012).** The genomic landscape of species divergence in *Ficedula* flycatchers. *Nature* 491(7426), 756–760.
- Fields, S., and Johnston, M. (2005).** Whither Model Organism Research? *Science* 307, 1885–1886.
- Fitzpatrick, B.M. (2004).** Rates of evolution of hybrid inviability in birds and mammals. *Evolution* 58, 1865–1870.
- Gelter, H. p., Tegelström, H., and Gustafsson, L. (1992).** Evidence from hatching success and DNA fingerprinting for the fertility of hybrid Pied × Collared Flycatchers *Ficedula hypoleuca* × *albicollis*. *Ibis* 134, 62–68.
- Good, J.M., Giger, T., Dean, M.D., and Nachman, M.W. (2010).** Widespread Over-Expression of the X Chromosome in Sterile F1 Hybrid Mice. *PLoS Genetics* 6.
- Gowen, F.C., Maley, J.M., Cicero, C., Peterson, A.T., Faircloth, B.C., Warr, T.C., and McCormack, J.E. (2014).** Speciation in Western Scrub-Jays, Haldane's rule, and genetic clines in secondary contact. *BMC Evolutionary Biology* 14, 135.
- Grant, P.R., and Grant, B.R. (1992).** Hybridization of bird species. *Science* 256, 193–197.
- Gray, A.P. (1958).** Bird hybrids. A check-list with bibliography. Technical Communication of the Commonwealth Bureau of Animal Breeding and Genetics, Edinburgh. 13.

- Haldane, J.B.S. (1922).** Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* 12, 101–109.
- Hansson, B., Tarka, M., Dawson, D.A., and Horsburgh, G.J. (2012).** Hybridization but No Evidence for Backcrossing and Introgression in a Sympatric Population of Great Reed Warblers and Clamorous Reed Warblers. *PLoS ONE* 7, e31667.
- Helbig, A.J., Salomon, M., Bensch, S., and Seibold, I. (2001).** Male-biased gene flow across an avian hybrid zone: evidence from mitochondrial and microsatellite DNA. *Journal of Evolutionary Biology* 14, 277–287.
- Humphries, S., Evans, J.P., and Simmons, L.W. (2008).** Sperm competition: linking form to function. *BMC Evolutionary Biology* 8, 319.
- Johnson, N.A., and Kliman, R.M. (2002).** Hidden Evolution: Progress and Limitations in Detecting Multifarious Natural Selection. *Genetica* 114, 281–291.
- Kawakami, T., Backström, N., Burri, R., Husby, A., Olason, P., Rice, A.M., Ålund, M., Qvarnström, A., and Ellegren, H. (2014).** Estimation of linkage disequilibrium and interspecific gene flow in *Ficedula* flycatchers by a newly developed 50k single-nucleotide polymorphism array. *Molecular Ecology Resources* 14, 1248–1260.
- * **Knox, A.G. (1992).** Species and pseudospecies: the structure of crossbill populations. *Biological Journal of the Linnean Society* 47, 325–335, citováno dle **McCarthy, E.M. (2006).** *Handbook of Avian Hybrids of the World* (Oxford University Press).
- Kropáčková, L., Piálek, J., Gergelits, V., Forejt, J., and Reifová, R. (2015).** Maternal–foetal genomic conflict and speciation: no evidence for hybrid placental dysplasia in crosses between two house mouse subspecies. *J. Evolutionary Biology* 28, 688–698.
- Kverek, P. (2002).** Další kříženec slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) se slavíkem tmavým (*Luscinia luscinia*). *Sylvia* 38: 67–70.
- Laurie, C.C. (1997).** The weaker sex is heterogametic: 75 years of Haldane’s rule. *Genetics* 147, 937–951.
- Lifjeld, J.T., Laskemoen, T., Kleven, O., Albrecht, T., and Robertson, R.J. (2010).** Sperm Length Variation as a Predictor of Extrapair Paternity in Passerine Birds. *PLoS ONE* 5, e13456.
- Manthey, J.D., and Spellman, G.M. (2014).** Increased differentiation and reduced gene flow in sex chromosomes relative to autosomes between lineages of the brown creeper *Certhia americana*. *Journal of Avian Biology* 45, 149–156.
- Masly, J.P., and Presgraves, D.C. (2007).** High-Resolution Genome-Wide Dissection of the Two Rules of Speciation in *Drosophila*. *PLoS Biology* 5, e243.
- Mayr, E. (1942).** *Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist* (Harvard University Press).
- McCarthy, E.M. (2006).** *Handbook of Avian Hybrids of the World* (Oxford University Press).

- Merrifield, K. (1998).** Two Presumed Mallard × gadwall Hybrids (*Anas platyrhynchos* × *A. strepera*) in Lincoln County, Oregon. *Northwestern Naturalist* 79, 54–58.
- Mihola, O., Trachtulec, Z., Vlcek, C., Schimenti, J.C., and Forejt, J. (2009).** A Mouse Speciation Gene Encodes a Meiotic Histone H3 Methyltransferase. *Science* 323, 373–375.
- * **Miller, A.H. (1955).** A Hybrid Woodpecker and Its Significance in Speciation in the Genus *dendrocopos*. *Evolution* 9, 317–321, citováno dle **McCarthy, E.M. (2006).** *Handbook of Avian Hybrids of the World* (Oxford University Press).
- Muller, H.J. (1940).** Bearing of the *Drosophila* work on systematics. *The New Systematics* 185–268.
- Muller, H.J. (1942).** Isolating mechanisms, evolution and temperature. *Biol. Symp* 6, 71–125.
- Nadachowska-Brzyska, K., Burri, R., Olason, P.I., Kawakami, T., Smeds, L., and Ellegren, H. (2013).** Demographic Divergence History of Pied Flycatcher and Collared Flycatcher Inferred from Whole-Genome Re-sequencing Data. *PLoS Genetics* 9, e1003942.
- Orr, H.A. (1997).** Haldane’s Rule. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 195–218.
- Orr, H.A., and Turelli, M. (2001).** The Evolution of Postzygotic Isolation: Accumulating Dobzhansky-Muller Incompatibilities. *Evolution* 55, 1085–1094.
- Pinho, C., and Hey, J. (2010).** Divergence with Gene Flow: Models and Data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 41, 215–230.
- Prager, E.M., and Wilson, A.C. (1975).** Slow evolutionary loss of the potential for interspecific hybridization in birds: a manifestation of slow regulatory evolution. *PNAS* 72, 200–204.
- Presgraves, D.C. (2002).** Patterns of Postzygotic Isolation in Lepidoptera. *Evolution* 56, 1168–1183.
- Presgraves, D.C. (2008).** Sex chromosomes and speciation in *Drosophila*. *Trends in Genetics* 24, 336–343.
- Presgraves, D.C. (2010).** The molecular evolutionary basis of species formation. *Nature Reviews Genetics* 11, 175–180.
- Price, T. (2008).** *Speciation in birds* (Roberts and Company Greenwood Village, CO).
- Price, T.D., and Bouvier, M.M. (2002).** The evolution of F1 postzygotic incompatibilities in birds. *Evolution* 56, 2083–2089.
- Qvarnström, A., Rice, A.M., and Ellegren, H. (2010).** Speciation in *Ficedula* flycatchers. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 365, 1841–1852.
- Randler, C. (2008).** Hybrid Wildfowl in Central Europe: An Overview. *Waterbirds: The International Journal of Waterbird Biology* 31, 143–146.

- Reifova, R., Kverek, P., and Reif, J. (2011).** The first record of a female hybrid between the Common Nightingale (*Luscinia megarhynchos*) and the Thrush Nightingale (*Luscinia luscinia*) in nature. *Journal of Ornithology* *152*, 1063–1068.
- Rheindt, F.E., and Edwards, S.V. (2011).** Genetic Introgression: An Integral but Neglected Component of Speciation in Birds. *The Auk* *128*, 620–632.
- Sætre, G.-P., and Sæther, S.A. (2010).** Ecology and genetics of speciation in *Ficedula* flycatchers. *Molecular Ecology* *19*, 1091–1106.
- Seehausen, O., Butlin, R.K., Keller, I., Wagner, C.E., Boughman, J.W., Hohenlohe, P.A., Peichel, C.L., Saetre, G.-P., Bank, C., Brännström, Å., et al. (2014).** Genomics and the origin of species. *Nature Reviews Genetics* *15*, 176–192.
- Smadja, C.M., and Butlin, R.K. (2011).** A framework for comparing processes of speciation in the presence of gene flow. *Molecular Ecology* *20*, 5123–5140.
- Stadie, C. (1991).** Erdsanger I; Nachtigall und Sprosser. *Europäische Vogelwelt* *3*, 130–189.
- Storchová, R., Gregorová, S., Buckiová, D., Kyselová, V., Divina, P., and Forejt, J. (2004).** Genetic analysis of X-linked hybrid sterility in the house mouse. *Mammalian Genome* *15*, 515–524.
- Storchová, R., Reif, J., and Nachman, M.W. (2010).** Female heterogamety and speciation: Reduced introgression of the Z chromosome between two species of nightingales. *Evolution* *64*, 456–471.
- Svedin, N., Wiley, C., Veen, T., Gustafsson, L., and Qvarnström, A. (2008).** Natural and sexual selection against hybrid flycatchers. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* *275*, 735–744.
- Tegelstrom, H., and Gelter, H.P. (1990).** Haldane's Rule and Sex Biased Gene Flow between Two Hybridizing Flycatcher Species (*Ficedula albicollis* and *F. hypoleuca*, Aves: Muscicapidae). *Evolution* *44*, 2012–2021.
- Wilson, A.C., Maxson, L.R., and Sarich, V.M. (1974).** Two Types of Molecular Evolution. Evidence from Studies of Interspecific Hybridization. *PNAS* *71*, 2843–2847.
- Wu, C.-I., and Davis, A.W. (1993).** Evolution of postmating reproductive isolation: The composite nature of Haldane's rule and its... *American Naturalist* *142*, 187.
- Wu, C.-I., Johnson, N.A., and Palopoli, M.F. (1996).** Haldane's rule and its legacy: Why are there so many sterile males? *Trends in Ecology & Evolution* *11*, 281–284.
- Obrázek 1 – Vlastní tvorba, podle **Wu, C. & Ting, C. (2004).** Genes and speciation. *Nature Reviews Genetics* *5*, 118