

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**KATEDRA ZOOLOGIE**

Oddělení Genetika volně žijících živočichů



**Diplomová práce**

**Mezidruhová hybridizace u rákosníků  
rodu *Acrocephalus***

Bc. Veronika Majerová

Školitel: RNDr. Radka Reifová, Ph.D.

Praha 2012

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem diplomovou 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 dne 27.8.2012

## Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat především své školitelce Radce Reifové za odborné vedení, cenné rady a pomoc při zpracování této práce. Dále Jiřímu Reifovi, Petrovi Procházkovi, Markusu Aholovi, Antero Lindholmovi, Milici Požgayové za sběr vzorků v terénu, Jitce Fischerové za pomoc v laboratoři a Jakobovi Kreisingerovi a Pavlovi Munclingerovi za pomoc při určení pohlaví. Petrovi Procházkovi také děkuji za cenné rady a poznámky k diplomové práci. Dále děkuji svým rodičům za podporu během celé doby studia, bratrovi za pomoc s formální úpravou práce, Lucii Kropáčkové a Lucii Farníkové za užitečné připomínky.

# Abstrakt

Rákosníci rodu *Acrocephalus* prodělali během posledních několika milionů let adaptivní radiaci, která dala vzniknout třiceti jedna druhům obývajících především Eurasii, Afriku a Austrálii. Většina druhů je morfologicky velmi podobná, liší se však ekologickými nároky, migrační strategií a zpěvem. Mezi jednotlivými druhy dochází v přírodě k hybridizaci a to nejen mezi sesterskými druhy, ale i mezi fylogeneticky relativně vzdálenými. Hlavním cílem této studie bylo zjistit, jestli tato hybridizace vede ke genovému toku mezi druhy a jaké faktory míru genového toku ovlivňují. Za tímto účelem jsme provedli detailní populačně genetickou analýzu u tří evropských druhů rákosníků rodu *Acrocephalus*, podrodu *Notiocyclus*: rákosníka obecného (*A. scirpaceus*), rákosníka zpěvného (*A. palustris*) a rákosníka pokřovního (*A. dumetorum*). Naše výsledky založené na analýze sekvenčních dat z osmi jaderných lokusů ukazují, že ke genovému toku mezi studovanými druhy dochází, ale vždy jen v jednom směru. Genový tok je vyšší mezi geneticky příbuznějšími druhy než mezi ekologicky podobnějšími druhy, kteří mají více příležitostí k hybridizaci. Odhadli jsem také, že rákosník obecný a rákosník zpěvný divergovali zhruba před 1,1 milionem let a rákosník pokřovní a předek rákosníka obecného a rákosníka zpěvného zhruba před 2,5 miliony let. U dvou lokusů na chromosomu Z jsme detekovali pozitivní selekci, která na tyto lokusy působila nezávisle u dvou či dokonce všech tří druhů. Naše výsledky ukazují, že mezidruhový genový tok může hrát důležitou roli v evoluci rákosníků.

## Klíčová slova

Speciace, genový tok, mezidruhová hybridizace, *Acrocephalus*, rákosník obecný, rákosník zpěvný, rákosník pokřovní

## Abstract

*Acrocephalus* warblers have gone through the adaptive radiation during last several million years, which gave rise to thirty one species occupying mainly Eurasia, Africa and Australia. The majority of species are morphologically very similar, however, they differ in ecological requirements, migration strategy, and song. Interspecific hybridization seems to be quite common among *Acrocephalus* warblers, not only between sister species, but also between more distantly related taxa. The main goal of this study was to determine whether this hybridization leads to gene flow between species and which factors affect the rate of interspecific gene flow. For this purpose we conducted population-genetic analysis in three European species of the *Acrocephalus* warblers of the subgenus *Notiocichla*: reed warbler (*A. scirpaceus*), marsh warbler (*A. palustris*), and blyth's reed warbler (*A. dumetorum*). Our results based on the analysis of sequence data from eight nuclear loci indicate, that gene flow between the studied species occurs, but only in one direction. The gene flow is higher between genetically more related species than between ecologically more similar species. We also estimated that the reed warbler and the marsh warbler diverged approximately 1,1 million years ago. The blyth's warbler and ancestor of the reed and marsh warbler diverged approximately 2,5 million years ago. Furthermore, we detected positive selection that acted independently in two or even all three species in two Z-linked loci. Our results suggest that interspecific gene flow can play an important role in evolution of *Acrocephalus* warblers.

## Keywords

Speciation, gene flow, interspecific hybridization, *Acrocephalus*, reed warbler, marsh warbler, blyth's reed warbler

# Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>7</b>
1.1 Rákosníci rodu <i>Acrocephalus</i> .....	8
1.2 Mezidruhová hybridizace rákosníků rodu <i>Acrocephalus</i> .....	10
1.3 Mezidruhová hybridizace u rákosníka obecného, rákosníka zpěvného a rákosníka pokřovního .....	13
<b>2. Cíle</b> .....	<b>19</b>
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	<b>20</b>
3.1 Sběr vzorků v terénu .....	20
3.2 Izolace DNA, PCR a sekvenování .....	20
3.3 Genetické určení pohlaví .....	21
3.4 Editace sekvenčních dat a populačně genetické analýzy .....	22
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>26</b>
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>36</b>
<b>6. Závěr</b> .....	<b>41</b>
<b>7. Literární přehled</b> .....	<b>42</b>
<b>8. Appendix</b> .....	<b>50</b>

# 1. Úvod

Druh je základní taxonomickou jednotkou. Podle biologické koncepce druhu (Mayr 1942) tvoří druh skupina jedinců, kteří se vzájemně plodně kříží a od jedinců ostatních druhů jsou odděleny reprodukčně izolačními mechanismy. Tyto mechanismy mohou být prezygotické (např. nekompatibilita gamet, rozdílné behaviorální či ekologické nároky druhů) a nebo postzygotické (např. mortalita hybridních zygot, snížená nebo úplná sterilita hybridů či jejich neživotoschopnost) (Coyne & Orr 2004). V přírodě nejsou vždy prezygotické reprodukčně izolační bariéry úplné a někdy tak dochází k mezidruhovému křížení (hybridizaci) a vzniku hybridů. Tento jev je v přírodě celkem rozšířený. Odhaduje se, že k mezidruhové hybridizaci dochází u 25 % druhů cévnatých rostlin, 12 % evropských druhů motýlů, 10 % druhů ptáků, 25 % druhů britských kachen nebo 6 % evropských savců (Schwenk *et al.* 2008). K mezidruhové hybridizaci obvykle dochází mezi blízkce příbuznými druhy, které se oddělily v relativně nedávné době a nejsou mezi nimi dostatečně vyvinuty prezygotické reprodukčně izolační bariéry. Nemusí to však vždy být sesterské druhy (Price 2008). Nejčastěji dochází k mezidruhové hybridizaci v oblastech kontaktu areálů dvou druhů. Taková místa se nazývají hybridní zóny (Hewitt 2001). Mezidruhoví hybridi bývají často méně životoschopní, sterilní nebo špatně adaptovaní svému okolí. Tyto postzygotické reprodukčně izolační mechanismy však také nemusí být úplné (mohou se například týkat jen jednoho pohlaví) a mezidruhoví hybridi se tak u některých druhů mohou dále zpětně křížit s rodičovskými druhy. Důsledkem toho může docházet ke genové introgresi (tj. genovému toku) mezi druhy (Zheng & Ge 2010; Martínez-Cruz & Godoy 2007; Faure *et al.* 2009; Koblmüller *et al.* 2009). Mezidruhový genový tok může hrát významnou roli v evoluci. Může například ovlivňovat míru genetické variability jednotlivých druhů, vést ke vzniku nových fenotypů či nových evolučních linií (Arnold 1997). Jak často dochází mezi hybridizujícími druhy ke genovému toku (to znamená, jak silné jsou obvykle postzygotické reprodukční mechanismy mezi druhy) není zatím dostatečně prozkoumáno. Výsledky nových populačně genetických studií však ukazují, že by genový tok mezi druhy mohl být

v přírodě poměrně častý, a to zejména mezi blízce příbuznými sesterskými druhy (Hey & Pinho 2012). V rámci své diplomové práce jsem se zaměřila na studium genové introgrese u rákosníků rodu *Acrocephalus*, kde na rozdíl od většiny jiných skupin organismů dochází k hybridizaci i mezi fylogeneticky vzdálenějšími druhy.

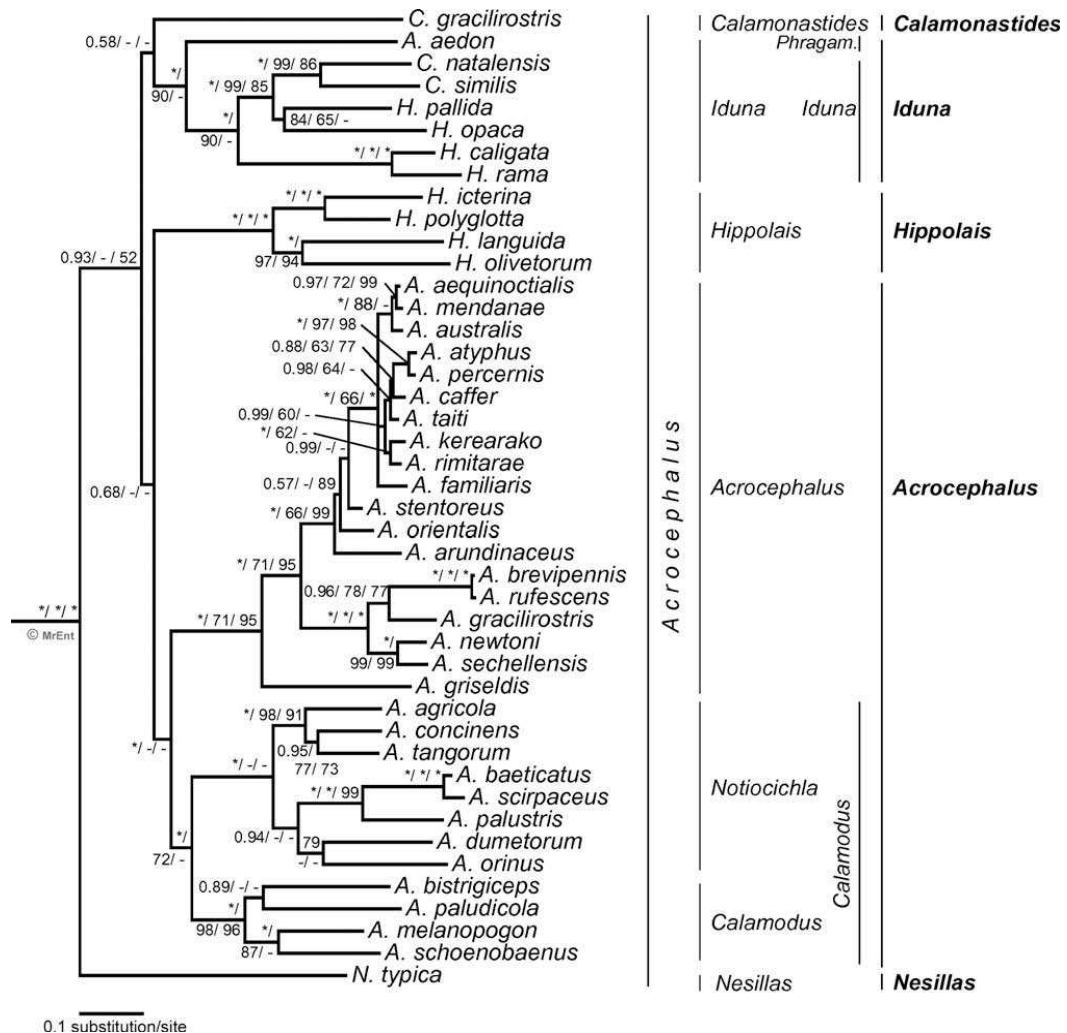
## 1.1 Rákosníci rodu *Acrocephalus*

Tato skupina malých, hmyzožravých pěvců, kteří jsou na první pohled jen stěží rozlišitelní, prošla v relativně nedávné době adaptivní radiací. Vzhledem k nedostatku rozlišujících znaků bylo dlouhou dobu obtížné odhalit vztahy uvnitř skupiny. Úspěch se dostavil až se zdokonalující se technikou na molekulární úrovni a rozvojem fylogenetických metod. Díky tomu mohly být odhaleny například některé kryptické ostrovní druhy, které jsou morfologicky téměř nerozlišitelné (Cibois *et al.* 2007). Rákosníci rodu *Acrocephalus* dnes zahrnují 31 druhů (Obrázek 1) a v současném taxonomickém pojetí tvoří spolu se sedmihlásky rodu *Hippolais* a *Iduna* a několika příbuznými rody monofyletickou čeleď Acrocephalidae dobře podpořenou v nadčeledi Sylvioidea (Alström *et al.* 2006; Fregin *et al.* 2009). Areálem rozšíření těchto pěvců je Starý svět. Osm druhů se vyskytuje v Africe a na přilehlých ostrovech, dvanáct druhů obývá Eurasii a ostatní Austrálii a Oceánii. V České republice je běžný rákosník obecný (*A. scirpaceus*), rákosník proužkovaný (*A. schoenobaenus*) a rákosník zpěvný (*A. palustris*). Největší druh, rákosník velký (*A. arundinaceus*), je vzácnější. Rákosník tamaryškový (*A. melanopogon*) na naše území nepravidelně zaletuje (hlavně v pohnízdni době) a rákosník ostřicový (*A. paludicola*) se u nás objevuje jen ojediněle.

Většina druhů je morfologicky velmi podobná, liší se však ekologickými nároky, migrační strategií a zpěvem. Co se týče zbarvení, patří rákosníci rodu *Acrocephalus* mezi velmi monomorfní skupinu ptáků. Jsou to nenápadně zbarvení pěvci. Všechny druhy mají matnou hnědavě nebo šedavě, někdy zelenavě zbarvenou svrchní část těla a bělavě nebo světle až sytě žlutou břišní část. Tento jednotný šat je u některých druhů oživen bočními pruhy, pruhy na zádech nebo prsou. Dalšími společnými znaky jsou dlouhé silné nohy, šídlovitý, ze stran mírně zploštělý zobák a hluboké hnízdo budované do typického miskovitěho tvaru,



**Obrázek 1.** Fylogenetický strom rákosníků rodu *Acrocephalus*. Převzato z Fregin et al. (2009).



vpleteno zpravidla mezi několik svislých stébel (Leisler & Schulze-Hagen 2011). Kladou nazelenalá nebo nahnědlá skvrnitá vejce. Zpěv rákosníků je výrazný s častým opakováním jednotlivých motivů. Živí se hmyzem, na podzim i bobulemi. Většina druhů je monogamní. Najdeme u nich ale i celou škálu párovacích systémů od monogamie a kooperativního hnízdění, přes polygynii až po promiskuitu.

Přestože jsou si vzhledově značně podobní a mají téměř stejnou hnízdní i potravní biologii, každý z nich obývá jinou část ekologického gradientu, od vysokého rákosí až po bylinnou vegetaci (Storch & Mihulka 2000). Rákosníci jsou ukázkovým příkladem toho, jak se adaptovat na obývané prostředí (Leisler 1981). Například rákosník velký je větší než ostatní druhy a na rozdíl od nich není schopen

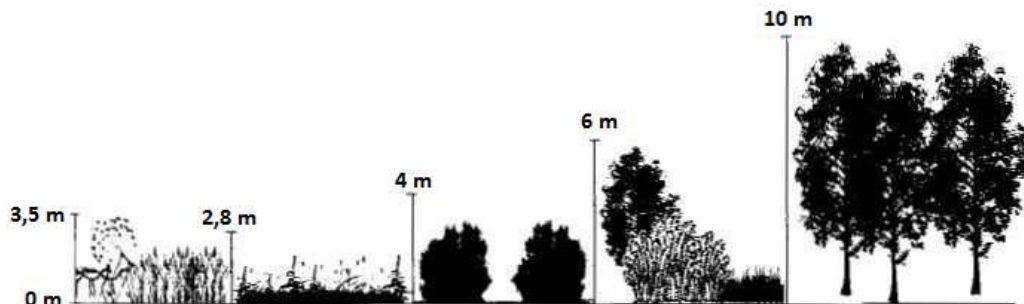
se tak snadno a rychle pohybovat v nízkém a hustém rákosí. Nároky na stanoviště se tedy odráží v tělesné stavbě ptáka. Nejnovější výzkumy ukazují, že druhy žijící ve vysokém porostu (rákosník velký a rákosník obecný) mají především dlouhé nohy pro efektivnější uchopení, delší zobák a širší křídla. Naopak druhy obývající nízkou vegetaci mají kratší zobák a užší křídla. Rákosníci se stali ukázkovou skupinou v ekomorfologii (Leisler 1981). Na základě těchto přizpůsobení obývají rákosníci pět typů vegetace: bažiny a močály, suché bažiny, křoviny, keřovité vegetace a lesy (Leisler & Schulze-Hagen 2011) (Obrázek 2). Význam však má i potravní a hnízdní konkurence mezi těmito druhy. Téměř všichni jsou stěhovaví. Rákosníci rodu *Acrocephalus* se od ostatních rodů čeledi Acrocephalidae liší užším a prodlouženým tarzem a delšími prsty a drápy. Tato anatomická struktura nohy jim umožňuje obratně a rychle šplhat na svislých stéblech a stoncích rákosu (Leisler & Schulze-Hagen 2011).

## **1.2 Mezidruhová hybridizace u rákosníků rodu *Acrocephalus***

K mezidruhové hybridizaci mezi různými druhy rákosníků rodu *Acrocephalus* dochází poměrně často a to nejen mezi sesterskými druhy (například rákosník obecný x rákosník zpěvný (Lemaire 1977), rákosník velký x rákosník hlučnohlasy (*A. stentoreus*) (Hansson *et al.* 2003)), ale i mezi vzdálenějšími druhy (rákosník zpěvný x rákosník pokřovný (*A. dumetorum*) (Koskimies 1980), rákosník obecný x rákosník proužkovaný (Van Eerde 1999), rákosník obecný x rákosník velký (Hansson *et al.* 2004)).

Hansson *et al.* (2003) zaznamenal výskyt hybridních jedinců mezi rákosníkem velkým a rákosníkem hlučnohlasy v jihovýchodním Kazachstánu, kde se areál těchto druhů překrývá a mohou se tak křížit. Oba druhy jsou si blízce příbuzné, podobné v morfologii i chování. Rákosník velký má variabilní a pronikavý zpěv, zatímco rákosník hlučnohlasy monotónní s nízkou frekvencí (Cramp 1992). Na základě molekulárních analýz mikrosatelitových lokusů a mitochondriální DNA bylo u tří samců a jedné samice z více než dvou set zkoumaných jedinců potvrzeno, že jsou to kříženci a jejich genetický materiál

**Obrázek 2.** Pět typů vegetace obývané rákosníky, zleva doprava: bažiny a močály, suché bažiny, křoviny, keřovité vegetace a lesy. Převzato a upraveno z Leisler & Schulze-Hagen (2011).



pochází z obou rodičů (Hansson *et al.* 2003). Zdá se, že křížení mezi těmito dvěma druhy je v přírodě poměrně časté. Předchozí výzkum na stejné lokalitě pomocí morfologie odhalil dalších osm hybridů mezi stovkou odchycených jedinců (Panov 1989 ex Haffer 1991). Hybridizace u těchto dvou druhů rákosníků může být důsledkem variabilního zpěvu samců rákosníka velkého, který je zřejmě atraktivní pro samice rákosníka hlučnohlaseho. Ačkoli jsou u těchto dvou druhů známí F1 hybridi, zatím nebylo prokázáno zpětné křížení ani introgrese, což naznačuje, že hybridi jsou buď neplodní, nebo nejsou atraktivní ani pro jeden z rodičovských druhů, nebo jsou jejich potomci neživotaschopní (Hansson *et al.* 2012).

Další případy mezidruhové hybridizace u rákosníků byly zjištěny mezi rákosníkem velkým a rákosníkem obecným, tedy druhy, které patří do různých podrodů a výrazně se liší svojí velikostí. Kříženci mezi těmito dvěma druhy byli odchyceni v Německu, Belgii a Rumunsku (Beier *et al.* 1997; Hansson *et al.* 2004; Ion *et al.* 2012). Celkem byly tedy zaznamenány tři prokázané případy křížení mezi rákosníkem velkým a rákosníkem obecným na různých lokalitách v Evropě, přičemž ve všech třech případech bylo molekulárně zjištěno, že matkou byl rákosník velký. Výskyt kříženců mezi těmito dvěma druhy zřejmě není příliš vysoký, protože svojí nezvyklou intermediární velikostí (Obrázek 3) by měli takoví jedinci kroužkovatele zaujmout (rákosník velký je zhruba 3x větší než rákosník obecný). Další tři blíže nepotvrzené možné případy výskytu kříženců mezi těmito dvěma druhy ze Španělska, Německa a Rakouska zmiňují Beier *et al.* (1997).

Otázkou zůstává, proč a za jakých okolností (smíšený pár nebo jen mimopárová kopulace?) dochází k mezidruhovému křížení mezi tak velikostně odlišnými druhy.

K mezidruhové hybridizaci dochází také mezi druhy patřícími do dvou různých podrodů *Notiocichla* a *Calamodus*, rákosníkem zpěvným a rákosníkem proužkovaným. Takový případ byl zaznamenán v blízkosti města Trondheim ve středním Norsku. Zde byl nalezen hybrid, který byl vzhledově i podle zpěvu více podobný rákosníkovi zpěvnému, ale s typickým opeřením rákosníka proužkovaného. Na základě mitochondriální DNA byla určena jako matka rákosník zpěvný a pomocí mikrosatelitových markerů byl jako otec identifikován rákosník proužkovaný (Lifjeld *et al.* 2010).

V severonizozemském Frísku byl zaznamenán další případ hybridního jedince (Obrázek 4). Tentokrát se jednalo o křížence rákosníka obecného a rákosníka proužkovaného (Van Eerde 1999). Tento fakt byl potvrzen intermediálními morfologickými znaky. Další případy pocházejí z Finska, kde byli dochyceni nebo pozorováni čtyři tohoroční ptáci (Koskimies 1991; Van Eerde 1999), a z Velké Británie (Sharrock 1985). U těchto jedinců ale nebylo geneticky potvrzeno, zda jedním z rodičů byl rákosník obecný nebo rákosník zpěvný.

Jen málo informací se ví o křížení dalších druhů v rámci podrodu *Notiocichla*. Panov (1989) ex McCarthy (2006) zaznamenal jednoho křížence mezi rákosníkem obecným a rákosníkem plavým (*A. agricola*). U této dvojice druhů byl zaznamenán i jeden případ smíšeného hnízdění (Panov 1989 ex McCarthy 2006). Jednoho hybridního jedince mezi rodičovskými druhy rákosníkem obecným a rákosníkem africkým (*A. baeticatus*) zřejmě zaznamenal Morel (1987). Zde je třeba upozornit, že rákosník africký je podle některých taxonomů jen afrotropickým poddruhem rákosníka obecného, respektive že taxony *scirpaceus*, *baeticatus*, *fuscus* a *avicenniae* lze řadit do jednoho komplexu velmi blízké příbuzných druhů. Skutečný důkaz hybridizace by v tomto případě přinesla jen důkladná genetická studie.

Poměrně častá je hybridizace mezi rákosníkem zpěvným a rákosníkem obecným a dále pak hybridizace mezi rákosníkem zpěvným a rákosníkem pokřovním. Tomuto křížení se detailněji věnuje následující kapitola.

**Obrázek 3.** Hybridní jedinec mezi rákosníkem velkým a rákosníkem obecným pocházející ze severovýchodního Rumunska. Převzato a upraveno z Ion *et al.* (2012).



Z dosavadních záznamů lze usoudit, že k hybridizaci opravdu dochází u některých druhů velmi často (Tabulka 1). Jedna z obecných příčin by mohla být atraktivita zpěvu samců u jednoho druhu a preference tohoto zpěvu samičkou jiného druhu. Někteří jedinci se totiž mohou naučit zpěvu jiného druhu nebo zpívat smíšeným zpěvem (Lemaire 1977) a to pak usnadňuje mezidruhovou hybridizaci, protože se nabourá jeden z prezygotických reprodukčně izolačních mechanismů.

### **1.3 Mezidruhová hybridizace u rákosníka obecného, rákosníka zpěvného a rákosníka pokřovního**

Ve své práci se detailněji zaměřím na studium tří hybridizujících druhů rákosníků podrodu *Notiocyhla*, jejichž hnízdní areály se překrývají v Evropě: rákosníka obecného, rákosníka zpěvného a rákosníka pokřovního (Obrázek 5). Přestože jsou si všechny tři druhy morfologicky velmi podobné, je možné je rozeznat podle znaků na opeření (Obrázek 6) a především podle morfometrických znaků na křídle (Svensson 1992; Walinder *et al.* 1988) (Obrázek 7). Kromě toho se druhy liší svými ekologickými nároky a migrační strategií (Cramp 1992).

Rákosník obecný je typickým obyvatelem hustých vysokých rákosin, rostoucích zčásti ve vodě, přeletuje do křovin, vrbin nebo řepkových polí. Je to

**Obrázek 4.** Mezi druhový hybrid rákosníka obecného a rákosníka proužkovaného. Převzato a upraveno z Van Eerde (1999).



štíhlý pták o velikosti 12,5-14 cm. Typického rákosníka obecného poznáme podle špičaté hlavy s plochým čelem, dlouhého štíhlého zobáku a křídelní formule, která je jednou z nejzásadnějších rozpoznávacích znaků všech tří druhů (Obrázek 6, 7, Appendix 1). Rákosník obecný je rozšířený v západní části Palearktické oblasti (západní Eurasie včetně severní Afriky a Přední Asie) (Obrázek 5). Zimuje v západní a východní Africe.

Rákosník zpěvný je 13-15 cm velký pták vyskytující se v různých bylinných porostech, často na vlhkých místech v tavolnicích, kopřivách, také vedle nádrží nebo podmáčených polí, občas na okraji rákosí, pokud je smíchané s bylinným porostem. Na první pohled je velmi podobný rákosníku obecnému i pokřovnímu, liší se ale jak v metrických znacích, tak v barvě (Appendix 1). Areál rozšíření rákosníka zpěvného sahá od jižní Británie a Francie až po západní Kazachstán a severně po jižní a jihovýchodní Finsko, jižní hranice pak prochází severní Itálií, Řeckem, Bulharskem a podél jižního pobřeží Černého moře (Bauer *et al.* 2005) (Obrázek 5). V posledních desetiletích se šíří dále na sever, o čemž svědčí rostoucí počet hnízdících ptáků ve Skandinávii a severozápadním Rusku. Zimuje v jihovýchodní Africe.

Rákosník pokřovní hnízdí v křovinách, na přerostlých pasekách v opadavých lesích, v keřích podél řek a v zahradách s hustým podrostem (Harvey &

**Tabulka 1.** Souhrnná tabulka zaznamenávající počty a lokality výskytu hybridů mezi různými druhy rákosníků rodu *Acrocephalus*.

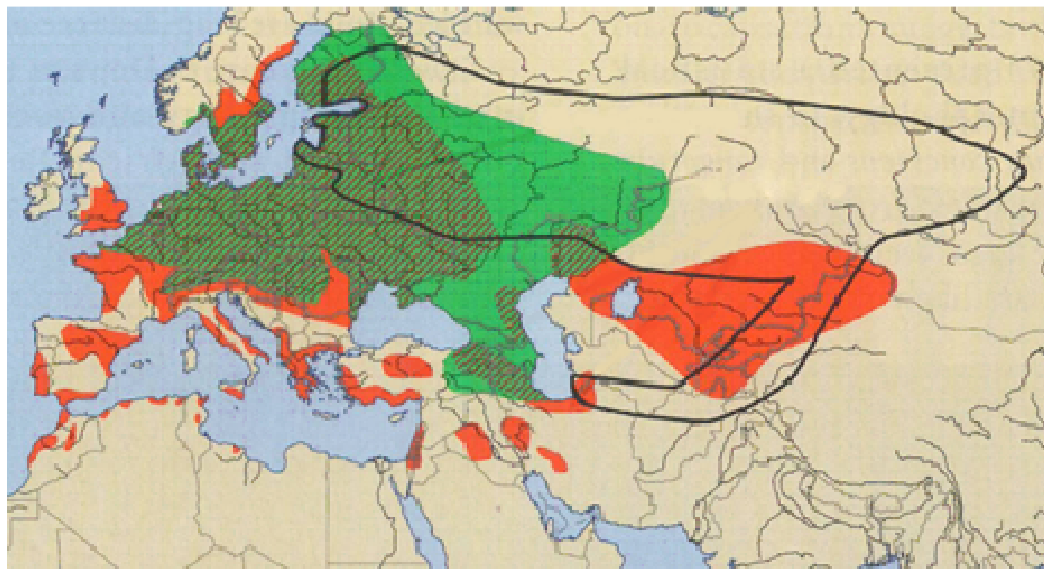
Křížení	Počet <sup>1</sup>	Stát	Reference
RP x RZ	5	Finsko	Lindholm <i>et al.</i> 2007; Koskimies 1980; 1984; 1991; Kosonen 1983
RO x RZ	15	Finsko, Litva, Francie, Belgie, Švédsko	Lemaire 1977; Panov 1989 ex Haffer 1991; Haataja & Kaarto 1984; Persson 1987; Cramp 1992
RV x RH	12	Kazachstán	Hansson <i>et al.</i> 2003; Panov 1989 ex Haffer 1991
RO x RV	6	Německo, Belgie, Rumunsko, Rakousko	Beier <i>et al.</i> 1997; Hansson <i>et al.</i> 2004; Ion <i>et al.</i> 2012
RO x RL	1	Kazachstán	Panov 1989 ex McCarthy 2006
RO x RR	3	Nizozemí, Velká Británie	Van Eerde 1999; Sharrock 1985
RZ x RR	1	Norsko	Lifjeld <i>et al.</i> 2010
RO x RA	1	/	Morel 1987
RO x RP	1	/	Hagström 1984

<sup>1</sup>Počet hybridů

*Rákosník pokřovní (RP); rákosník zpěvný (RZ); rákosník velký (RV); rákosník hlučňohlasý (RH); rákosník obecný (RO); rákosník plavý (RL); rákosník proužkovaný (RR); rákosník africký (RA)*

Porter 1984). Neláká ho rákosí ani podmáčená půda. Vyskytuje se v Asii a nejvýchodnější Evropě (Obrázek 5). U nás dosud nebyl zastižen. Je to středně velký pták dorůstající velikosti 12,5-14 cm. Od rákosníka zpěvného a rákosníka obecného se mimo jiné liší zpěvem, zpívá z vrcholku keře nebo nižšího stromu. S rákosníkem obecným sdílí dlouhý zobák a ploché čelo. Ekologicky je rákosník pokřovní podobnější rákosníku zpěvnému. V oblasti, kde se areály obou druhů střetávají, se často vyskytují na stejných lokalitách. Na rozdíl od předchozích dvou druhů zimuje v Indii (Harvey & Porter 1981).

**Obrázek 5.** Hnízdní rozšíření třech studovaných druhů rákosníků rodu *Acrocephalus*, podrodu *Notiocyclus*. Rákosník obecný, červeně; rákosník zpěvný, zeleně; rákosník pokřovní, černě. Převzato z Parkina *et al.* (2004).

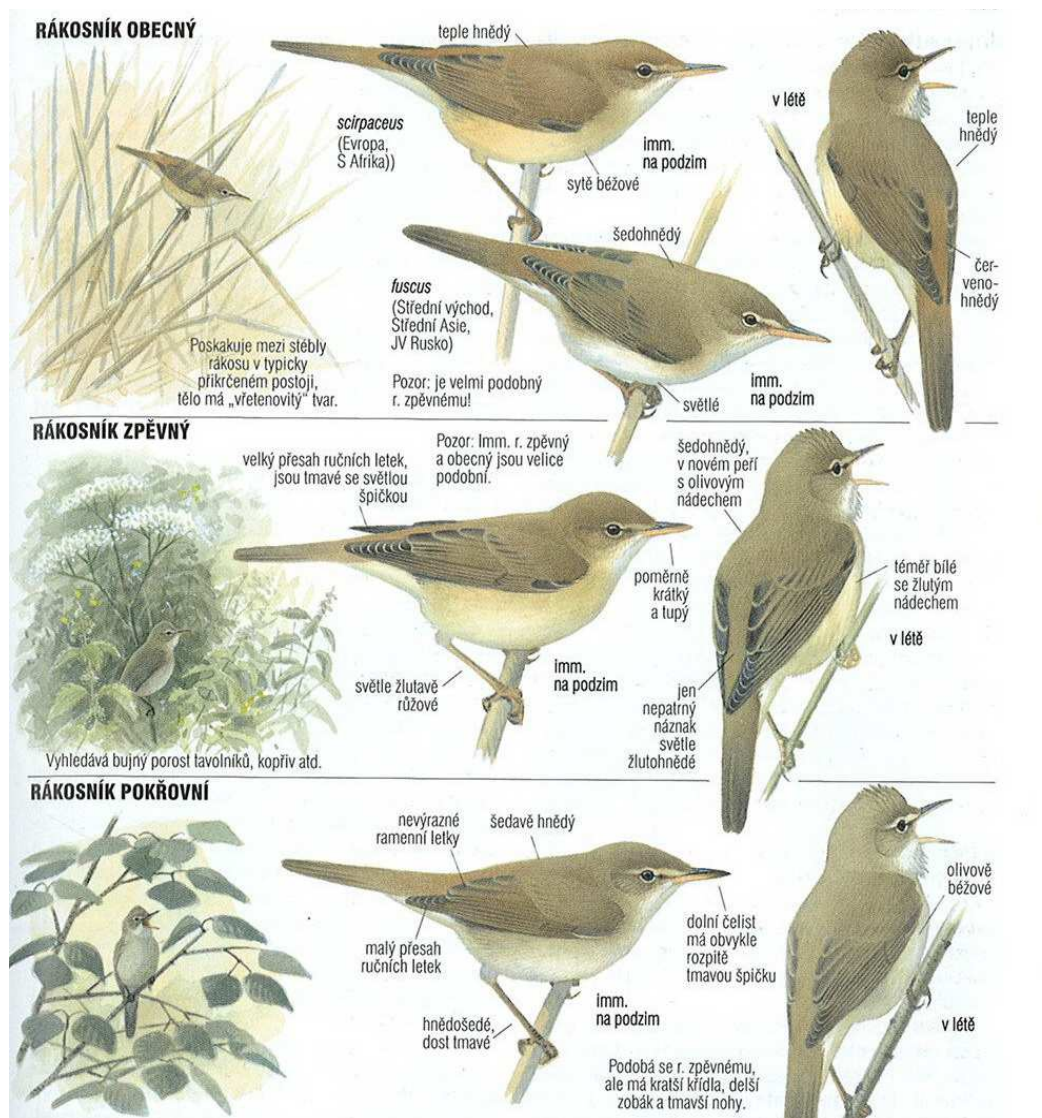


V rámci podrodu *Notiocyclus* je dosud nejvíce zaznamenaných hybridů mezi rákosníkem obecným a rákosníkem zpěvným. Jeden případ byl nalezen v Belgii (Lemaire 1977), další ve Finsku (Haataja & Kaarto 1984), Švédsku (Cramp 1992), další tři v Litvě (Panov 1989 ex Haffer 1991) a osm případů ve Francii (Lemaire 1977). Všichni hybridní jedinci byli identifikováni na základě morfologických znaků. V Litvě, Belgii, ve Velké Británii a v Německu pak bylo navíc pozorováno smíšené hnízdění mezi těmito dvěma druhy (Lemaire 1977; Glutz 1991; Cramp 1992). V pěti případech byla samice rákosník zpěvný, ve dvou tomu bylo naopak. Zdá se, že toto křížení může být v přírodě časté, i když stanovit frekvenci výskytu kříženců mezi těmito morfologicky velmi podobnými druhy je poměrně obtížné. Zvláště u mladých (tohoročních) jedinců se vyskytuje řada ptáků, jejichž spolehlivé určení do druhu podle morfometrických znaků je přinejmenším obtížné (Hromádka *et al.* 1993) a pouze genetické analýzy by nám pomohly tuto frekvenci stanovit.

Poměrně častá se zdá být i hybridizace mezi rákosníkem zpěvným a rákosníkem pokřovním. Ve Finsku, v okolí města Tampere, byl na základě své morfologické odlišnosti identifikován případ hybridního jedince (Kosonen 1983). Lindholm *et al.* (2007) potom objevil další tři případy hybridních jedinců se

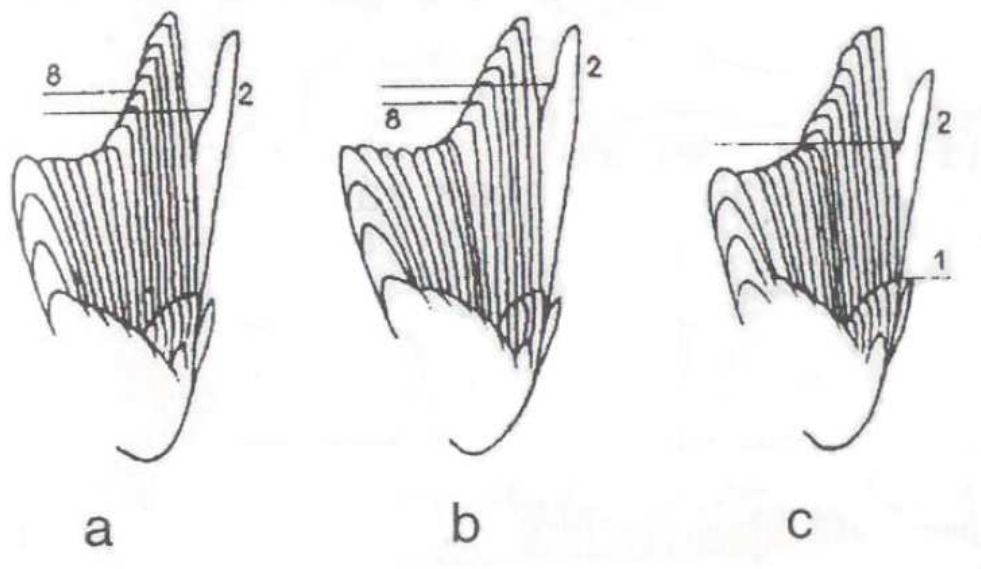


**Obrázek 6.** Morfologická diverzita u rákosníka obecného, rákosníka zpěvného a rákosníka pokřovního. Převzato z Svensson *et al.* (2004).



smíšeným zpěvem a přechodnou morfologií. Záznam pochází z jižního pobřeží Finska z města Espoo. Kromě hybridních jedinců bylo v jihovýchodním Finsku (a po jednom případě v Norsku a Nizozemsku) celkem pozorováno minimálně osm případů smíšeného hnízdění rákosníka zpěvného a rákosníka pokřovního (Koskimies 1980, 1991; Poot *et al.* 1999; Trnka 2004). V sedmi z nich byla samice rákosník zpěvný a v jednom případě tomu bylo naopak. Dokonce byl zaznamenán i jeden případ hnízdění hybridní samice F1 se samcem rákosníka pokřovního (Koskimies 1984). Frekvence výskytu mezidruhových hybridů mezi rákosníkem

**Obrázek 7.** Křídelní formule tří studovaných druhů: a - rákosník obecný, b - rákosník zpěvný c - rákosník pokřovní. Převzato z Hudec & Havlín (1995).



zpěvným a rákosníkem pokřovním opět není známá. Je však možné, že je vyšší než frekvence výskytu hybridů mezi rákosníkem zpěvným a rákosníkem obecným, neboť se oba druhy častěji vyskytují na stejných lokalitách.

Hybridizace mezi rákosníkem obecným a rákosníkem pokřovním dosud není známa, i když jeden nepotvrzený případ byl zaznamenán v roce 1984 (Hagström 1984).

## 2. CÍLE

Hlavním cílem mé diplomové práce je zjistit, jestli mezidruhová hybridizace mezi rákosníkem obecným, rákosníkem zpěvným a rákosníkem pokřovním vede ke genovému toku mezi druhy. Pokud ano, zajímá nás, zda je míra mezidruhového genového toku vyšší mezi geneticky příbuznějšími druhy, tj. rákosníkem obecným a rákosníkem zpěvným, a nebo mezi ekologicky příbuznějšími druhy, tj. mezi rákosníkem zpěvným a rákosníkem pokřovním. Za tímto účelem jsme analyzovali sekvence z několika jaderných lokusů ze sympatrické populace (jižní Finsko) všech tří studovaných druhů. Získaná data nám umožnila odhadnout míru genového toku mezi všemi třemi studovanými druhy, jejich dobu divergence a efektivní velikosti populací jednotlivých druhů. Zjišťovali jsme také, jaký je vliv genetického driftu a pozitivní selekce na evoluci sekvencí u jednotlivých druhů.

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Sběr vzorků v terénu

V červenci roku 2010 proběhl sběr vzorků krve pro následnou genetickou analýzu ze tří druhů rákosníků: rákosníka obecného, rákosníka zpěvného a rákosníka pokřovního. Vzorky pocházejí z jižního Finska (Obrázek 8), kde se překrývají areály všech tří druhů. Druhy se tak na různých lokalitách setkávají a mohou se vzájemně křížit. Celkem se podařilo na několika desítkách lokalit v oblasti sahající od západního pobřeží k ruským hranicím nasbírat vzorky z 22 jedinců rákosníka obecného, 26 jedinců rákosníka zpěvného a 25 jedinců rákosníka pokřovního (Appendix 2). Všichni jedinci byli chyceni do nárazové sítě, většinou za pomoci přehrávky zpěvu svého druhu. Po odchytu, okroužkování a odběru kapky krve z brachiální žíly byly u každého ptáka standardním způsobem zaznamenány následující morfologické znaky: hmotnost, délka tarsometatarsu, křídla a ocasu, křídelní formule a vnitřní stopa. Pomocí těchto znaků byla také ověřena jeho druhová identita. Vzorky byly sesbírány Jiřím Reifem (Ústav pro životní prostředí, PřF UK) za přispění Petra Procházky a Milici Požgayové (oba Ústav biologie obratlovců AV ČR) ve spolupráci s Prof. Esou Lehikoinenem, Markusem Aholou (oba Univerzita Turku, Finsko) a Antero Lindholmem (finský kroužkovatel zaměřený na odchyt rákosníků). Sběr vzorků proběhl v souladu s finskými zákony na ochranu přírody a na odběry krve bylo získáno povolení od místních úřadů. Jako „outgroup“ pro populačně genetické analýzy byl použit vzorek z rákosníka proužkovaného, který jsme získali od Petra Procházky.

### 3.2 Izolace DNA, PCR a sekvenování

Ze vzorku krve uchovaném v 96% ethanolu byla vyizolována DNA pomocí kitu DNeasy Blood&Tissue Kit (Qiagen) dle instrukcí uvedených v manuálu. Vyizolovaná DNA byla následně 10x naředěna a použita pro PCR amplifikaci několika jaderných lokusů. PCR amplifikace jaderných lokusů byla provedena pomocí primerů, které byly navrženy na základě sekvence zebřičky (*Taeniopygia*

*guttata*) do oblastí velmi konzervovaných exonů tak, aby amplifikovaly variabilní intronové sekvence příslušné délky. Tyto primery byly částečně navrženy v naší laboratoři a částečně pocházejí z jiných studií (Backström *et al.* 2006; Borge *et al.* 2005). Stejně primery byly použity i pro následnou sekvenační reakci. Celkem se nám podařilo úspěšně optimalizovat PCR pro osm párů primerů. Sekvence primerů jsou uvedeny v Tabulce 2. PCR reakce o celkovém objemu 30 $\mu$ l obsahovala tyto složky: 9,45 $\mu$ l H<sub>2</sub>O (Nuclease Free Water), 3,0 $\mu$ l pufru (10x buffer), 2,4 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (2mM), 3,0 $\mu$ l dNTP (0,2mM), 2,0 $\mu$ l primer forward+reverse (0,33 $\mu$ M), 0,15 $\mu$ l aTaq polymerázy a 10,0 $\mu$ l 10x ředěné DNA. Všechny chemikálie byly rozmrazovány na ledu a před použitím krátce centrifugovány. Amplifikace jednotlivých lokusů byla provedena v devadesáti šesti jamkových destičkách v termálním cykleru (BIO-RAD) za následujících podmínek: 95°C 2 min, (94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 1 min) 6krát, (94°C 30 s, 55°C 30 s, 72°C 1 min) 33krát, 72°C 5 min. Separace namnožených fragmentů DNA byla provedena pomocí elektroforézy na 1,5% agarózovém gelu s přidaným ethidium bromidem (10 $\mu$ g na 10ml gelu) v 0,5 x TBE pufru při 220V po dobu 45min. Výsledky elektroforézy byly analyzovány pod UV-transiluminátorem pomocí prohlížeče gelů AlphaDigiDoc. Purifikace PCR produktů byla provedena za pomoci kitu QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). U přečištěných vzorků byla na nanodropu (Spektrofotometr ND-1000) změřena koncentrace a čistota PCR produktů. Část vzorků byla přečištěna firmou Macrogen (Korea). Sekvenování (v obou směrech, z forward i reverse primeru) bylo provedeno v Sekvenační laboratoři Přf UK v Praze a částečně ve firmě Macrogen.

### 3.3 Genetické určení pohlaví

Pohlaví odchycených jedinců, které bylo určeno v terénu, bylo dále ověřeno geneticky na základě metody Griffiths *et al.* (1998). Tato metoda využívá primerů P2 a P8, které amplifikují lokusy na chromozomu Z a W, lišící se délkou. PCR reakce o celkovém objemu 15 $\mu$ l obsahovala tyto složky: 3,7 $\mu$ l H<sub>2</sub>O (Nuclease Free Water), 1,5 $\mu$ l pufru (10x buffer), 1,2 $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (2mM), 1,5 $\mu$ l dNTP (0,2mM), 1,0 $\mu$ l primer P2 (0,33 $\mu$ M), 1,0 $\mu$ l primer P8 (0,33 $\mu$ M), 0,1 $\mu$ l aTaq polymerázy a 5,0 $\mu$ l neředěné DNA. PCR amplifikace byla provedena v devadesáti šesti jamkové

destičce v termálním cyklu (BIO-RAD) za následujících podmínek: 94°C 1 min 30 s, (48°C 45 s, 72°C 45 s, 94°C 30 s) 38krát, 48°C 1 min, 72°C 5 min. PCR produkty se rozdělily pomocí elektroforézy na 3% agarózovém gelu s přidaným ethidium bromidem (10µg na 10ml gelu) v 0,5 x TBE pufru při 100V po dobu 1,5hod. Výsledky elektroforézy byly analyzovány pod UV-transiluminátorem pomocí prohlížeče gelů AlphaDigiDoc. Samice s pohlavními chromozomy ZW jsou charakterizovány dvěma proužky na gelu, samci s pohlavními chromozomy ZZ jen jedním (Obrázek 9).

### **3.4 Editace sekvenčních dat a populačně genetické analýzy**

Získané sekvence byly editovány pomocí programu CodonCode Aligner, kde byly manuálně určeny heterozygoty. Dalším krokem bylo vytvoření alignmentu pomocí programu Clustal W (Thompson *et al.* 1994) implementovaném v programu BioEdit (Hall 1999). Sekvence v alignmentu jsme zbavili exonů a vymazali indel polymorfismy. Kromě toho jsme vymazali nekompletní sekvence, a/nebo pozice s chybějícími sekvencemi u více jedinců. Pomocí programu PHASE (verze 2.1.1; Stephens *et al.* 2001; Stephens & Donnelly 2003) byly diploidní sekvence (tj. všechny autosomální sekvence a Z-vázané sekvence u samců) rozděleny v každém lokusu do dvou haplotypů. Program jsme pustili s následujícími parametry (number of iterations = 10 000, thinning interval = 1, burnin = 1000). Pro každý lokus jsme program pustili 5x s odlišným „random seed“. U všech lokusů jsme dostali ve všech pěti analýzách totožné haplotypy.

Základní populačně genetické statistiky (Tabulka 3) byly počítány v programu DNaSP (verze 5; Rozas *et al.* 2003). Ve stejném programu byly provedeny testy pozitivní selekce, Tajima's D test (Tajima 1989) a Fu-Li's D test (Fu & Li 1993). Hudson-Kreitman-Aguadé (HKA) test (Hudson *et al.* 1987) byl proveden pomocí HKA programu (<http://genfaculty.rutgers.edu/hey/software#HKA>). Genealogické vztahy mezi jednotlivými haplotypy byly rekonstruovány pomocí programu Network (Bandelt *et al.* 1999) za použití algoritmu Median joining.



Sekvenční data byla dále analyzována pomocí programu IMA2 (Hey 2010). Tento program využívá koalescenční model „isolation with migration“ (IM) pro více než dvě populace (Hey 2010) a umožňuje ze sekvenčních dat odhadnout následující populačně genetické parametry: dobu divergence jednotlivých populací ( $t$ ), efektivní velikost jednotlivých populací ( $N$ ) a míru genového toku mezi jednotlivými populacemi ( $m$ ) (Orázek 10). Odhady parametrů jsou založené na Markov chain Monte Carlo simulacích genealogií. Protože program IMA2 nepředpokládá rekombinaci uvnitř lokusu, určili jsme pro každý lokus nejdelší sekvenci bez pozorované rekombinace pomocí programu IMgc (Woerner *et al.* 2007). Tento program odstraňuje buď rekombinantní haplotypy, a/nebo části sekvencí u všech haplotypů tak, aby zůstal informačně co nejvíc bohatý soubor sekvencí bez rekombinace. K odhadu parametrů IM modelu v biologicky smysluplných jednotkách (tj. efektivní velikost populace v počtu jedinců ( $N_e$ ), doba divergence populací v letech ( $t$ ), migrační rychlost za rok ( $m$ ) a populační migrační rychlost ( $2Nm$ )) je třeba znát mutační rychlost jednotlivých lokusů ( $\mu$ ). Mutační rychlost jsme odhadli na základě divergence k outgroupu. Neutrální mutační rychlost pro každý lokus byla odhadnuta ze vzorce  $D = 2\mu t$ , kde  $D$  je průměrný odhad  $D_{xy}$  (Nei 1987) mezi třemi studovanými druhy rákosníků a rákosníkem

**Obrázek 8.** Mapa znázorňující lokality odchyty tří zkoumaných druhů rákosníků v jižním Finsku.



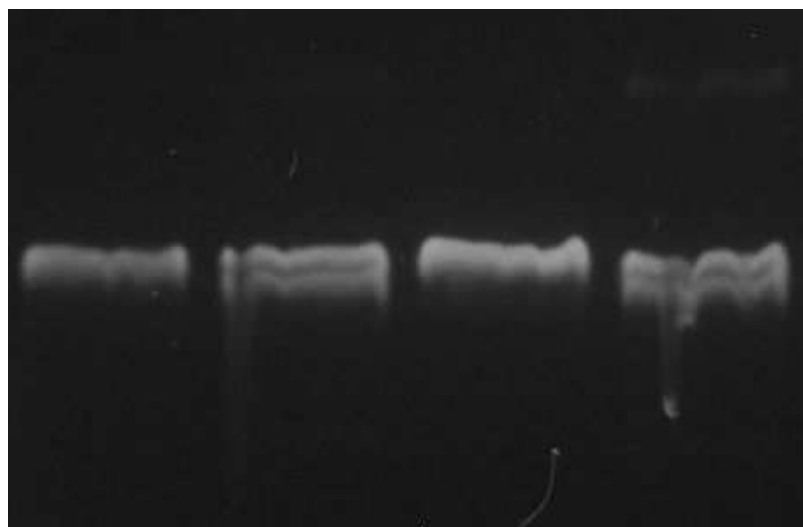
**Tabulka 2.** Použité primery pro PCR reakci a sekvenování.

Název lokusu	Směr <sup>1</sup>	Sekvence primeru	Délka <sup>2</sup>	Reference
PPWD1	F	AACTGTGGAAAATTCTGTG	850	Backström <i>et al.</i> 2006
	R	TCATCTTCAAATTCTCCTCC		
ADAMTS6	F	GGAGAGAATGGATTTCTGCC	700	Backström <i>et al.</i> 2006
	R	TGATTCCAGTCTAGGAAACG		
17483	F	GAAATGTGGTCTGAACAGTC	650	Backström <i>et al.</i> 2008
	R	TTGCTCTTGGCACGATATGC		
21281	F	GACCAAGACAATTCTCCTGCC	950	Backström <i>et al.</i> 2008
	R	GTAGATTTTCGACACCTCCAG		
24972	F	CGTTCCACTAATATTTTCCG	1000	Backström <i>et al.</i> 2008
	R	GCTTCATCAGTGACTATGAC		
RPL5-4	F	GTTGGCCTGACCAATTACGC	750	Borge <i>et al.</i> 2005
	R	CTTCAACTTGGCCTTCATAGATCTT		
TG401	F	TTTTCTCCAGCATTGCACTT	1150	Reifová <i>et al.</i> <i>in prep.</i>
	R	TTTTCTTCTTTCTCCAGATAGCG		
TG1505	F	CCCAACACCCGTGCTAACTA	750	Reifová <i>et al.</i> <i>in prep.</i>
	R	AGACCTCCTTGAACATCCCA		

<sup>1</sup>Směr primeru

<sup>2</sup>Délka PCR produktu v bp

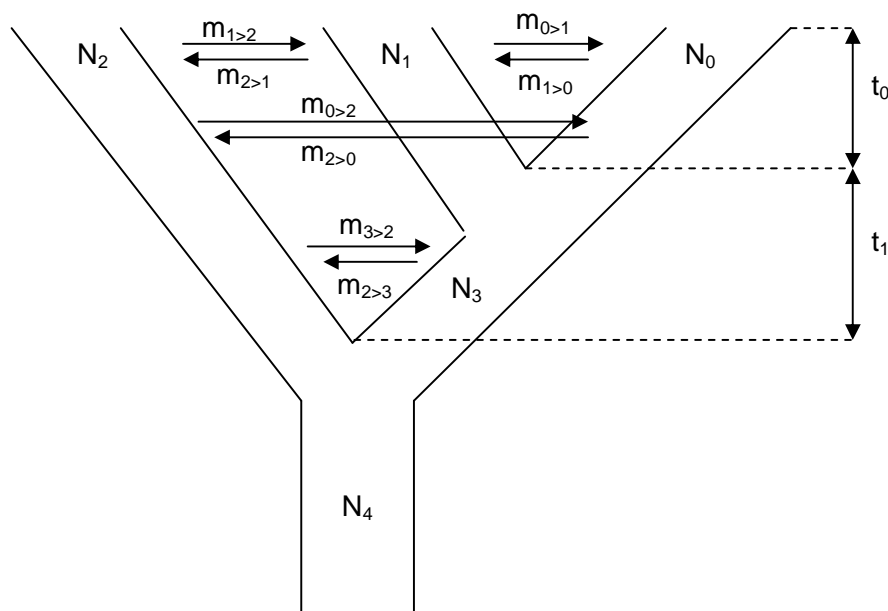
**Obrázek 9.** Genetické určení pohlaví dle metody Griffiths *et al.* (1998). Dva proužky znázorňují samičí pohlaví, jeden proužek samčí pohlaví.





proužkováním (Tabulka 3) a  $t_1$  je doba divergence. Dobu divergence mezi třemi studovanými druhy rákosníků a rákosníkem proužkováním, 5,9 milionů let, jsme odhadli na základě známé divergence sekvence cytochromu b mezi jednotlivými druhy (Fregin *et al.* 2009) a stanovené substituční rychlosti pro tuto sekvenci u ptáků, 2,1% (Weir & Schluter 2008). Délku generační doby jsme předpokládali jeden rok. Program IMA2 jsme pustili pro všechny lokusy dohromady nezávisle 3x se stejnými parametry (-q10 -m3 -t5 -b 100000 -l 1.0 -hfg -hn30 -ha0.96 -hb0.9), ale s odlišnými „random seed“. Všechny runy jsme nechali běžet 7-8 milionů kroků (steps). Mixování Markov Chain Monte Carlo simulací bylo ve všech třech bězích dobré, jak se dalo usoudit z „trend line“ grafů a hodnot ESS (effective sample size), které byly většinou vyšší než 20 000 a nikdy nižší než 50. Odhady parametrů byly ve všech třech bězích v podstatě stejné, což ukazuje, že výsledky jsou věrohodné. Ve výsledcích jsou prezentovány odhady z nejdějšího běhu.

**Obrázek 10.** Model „isolation with migration“ pro tři populace. Model má patnáct parametrů zahrnujících efektivní velikost jednotlivých populací ( $N$ ), dobu divergence ( $t$ ), a míru genového toku mezi populacemi ( $m$ ).



## 4. Výsledky

Osekvenovali jsme 4 autozomální a 4 Z-vázané lokusy u sympatrické populace všech tří studovaných druhů rákosníků. Pro každý lokus jsme získali 24 - 44 haploidních sekvencí u rákosníka obecného, 20 - 50 sekvencí u rákosníka zpěvného a 13 - 48 sekvencí u rákosníka pokřovního (Tabulka 3). Délka získaných sekvencí se pohybovala mezi 355 bp a 829 bp (Tabulka 3). Celkem jsme získali a analyzovali 490 kb sekvenčních dat.

Na Obrázku 11 jsou vyobrazeny genealogické sítě jednotlivých lokusů. Pro lokusy 21281 a 24972 byly genealogické sítě příliš složité kvůli přítomnosti mnohočetných rekombinací v rámci lokusu (Tabulka 3). U těchto lokusů jsou proto znázorněny genealogické sítě jen pro část sekvence bez rekombinace, kterou jsme získali pomocí programu IMge (viz Materiál a metodika). Z obrázku je vidět, že u některých lokusů jsou sekvence jednotlivých druhů vzájemně dobře oddělené (RPL5-4, TG401, TG1505). V souladu se známou fylogenezí je u těchto lokusů vidět, že sekvence rákosníka obecného a rákosníka zpěvného jsou si vzájemně podobnější ve srovnání se sekvencemi rákosníka pokřovního. U ostatních lokusů sekvence jednotlivých druhů už nejsou tak dobře oddělené, různé druhy často sdílejí stejné haplotypy a fylogenetické vztahy nejsou dobře patrné. To by mohlo být způsobeno buď přítomností ancestrálního polymorfismu u jednotlivých druhů a/nebo genovým tokem mezi druhy.

Zajímavým faktem patrným z genealogických sítí je také to, že tři ze čtyř lokusů na chromozomu Z (ADAMTS6, TG401, TG1505) vykazují velmi nízkou haplotypovou diverzitu. U lokusu ADAMTS6 a TG401 měli všichni jedinci rákosníka obecného stejný haplotyp, který byl ovšem odlišný od haplotypů dalších dvou druhů. Počet různých haplotypů u lokusů ADAMTS6 a TG401 byl snížený i u rákosníka zpěvného a pokřovního. Zajímavé je, že u lokusu TG1505 nesli jedinci všech tří druhů svůj druhově specifický haplotyp. Snížená genetická diverzita u všech tří lokusů na chromozomu Z je patrná i ze dvou populačně genetických parametrů, nukleotidová diverzita ( $\pi$ ) a proporce polymorfních míst ( $\theta_w$ ) (Tabulka 3). Snížená genetická diverzita u většiny lokusů na chromozomu Z by mohla

znamenat, že na chromosom Z u studovaných druhů rákosníků působí silná pozitivní selekce. Alternativním vysvětlením by mohla být snížená mutační rychlost na chromosomu Z, což je ovšem nepravděpodobné vysvětlení (naopak na ptačím chromosomu Z byla prokázána v průměru vyšší mutační rychlost než na autosomech, protože chromosom Z se častěji dědí přes samce, kde probíhá více buněčných dělení v germinální linii) (Axelsson *et al.* 2004)

Abychom exaktně otestovali, jestli na některý ze studovaných lokusů působí selekce, provedli jsme Tajima's D test a Fu-Li's D test. Tajima's D test je založený na analýze distribuce frekvence alel. Porovnává hodnoty dvou empirických odhadů genetického polymorfismu, nukleotidové diverzity ( $\pi$ ) a proporce polymorfních míst ( $\theta$ ). U sekvencí, na které nepůsobí selekce (a pocházejí z populace o konstantní velikosti), jsou oba dva odhady velmi podobné a Tajima's D se blíží nule. Sekvence, na které působí selekce (nebo pocházejí z populace, která v minulosti prošla populační expanzí či bottleneckem) mají hodnoty Tajima's D signifikantně záporné (pozitivní selekce, populační expanze), a nebo kladné (balancující selekce, populační bottleneck). Fu-Li's D test je založený na podobném principu jako Tajima's D test, ale využívá jen segregující místa u kterých je vzácná alela ve vzorku přítomná jen jednou (tzv. sigletons). Hodnoty Tajima's D byly obecně u všech lokusů mírně záporné, což naznačuje, že všechny tři druhy v nedávné době pravděpodobně prodělaly populační expanzi. Žádná hodnota však nebyla statisticky signifikantní (pro všechny hodnoty  $p > 0.05$ ; Tabulka 4). Stejně tak žádná hodnota Fu-Li's D statistiky nebyla statisticky signifikantní (pro všechny hodnoty  $p > 0.05$ ; Tabulka 4). U lokusů s nulovou genetickou diverzitou v rámci druhu nemohl být Tajima's D test a Fu-Li's D test proveden.

Dále jsme provedli Hudson-Kreitman-Aguadé (HKA) test pozitivní selekce. Tento test porovnává míru genetického polymorfismu a míru divergence k outgroupu jednotlivých lokusů. Za předpokladu neutrality by měl být poměr těchto dvou veličin konstantní. Pokud však na nějaký lokus působí pozitivní selekce, dojde ke snížení genetického polymorfismu v rámci druhu, zatímco divergence mezi druhy ovlivněna není. Celkem jsme provedli čtyři HKA testy

**Tabulka 3.** Základní populačně genetické statistiky u osmi sekvenovaných lokusů. (Legenda k tabulce na následující straně).

Lokus	Chr <sup>1</sup>	Délka <sup>2</sup>	Druh <sup>3</sup>	n <sup>4</sup>	S <sup>5</sup>	$\eta$ <sup>6</sup>	$\pi$ <sup>7</sup>	$\theta_w$ <sup>8</sup>	K <sup>9</sup>	Dxy <sup>10</sup>	Rm <sup>11</sup>	R <sup>12</sup>
17483	A	484	RO	44	9	9	0,00323	0,00427	15,841	0,03273	0	0,0758
			RZ	32	13	13	0,00805	0,00667	17,656	0,03648	3	0,0487
			RP	48	10	10	0,00268	0,00466	17,396	0,03594	0	/
			RO+RZ+RP	124	32	32	0,00731	0,01226	16,911	0,03494	3	0,0727
21281	A	355	RO	28	29	31	0,01868	0,02099	10,643	0,02998	4	0,1226
			RZ	20	24	24	0,01893	0,01906	9,350	0,02634	6	0,1438
			RP	38	22	22	0,01071	0,01475	11,132	0,03136	4	1,2825
			RO+RZ+RP	86	50	54	0,01905	0,02802	10,558	0,02974	7	0,1254
24972	A	636	RO	24	29	30	0,00999	0,01221	17,375	0,02732	5	0,0865
			RZ	38	35	35	0,00819	0,01310	16,263	0,02557	5	0,0924
			RP	38	30	30	0,00861	0,01123	16,395	0,02578	4	0,4283
			RO+RZ+RP	100	71	73	0,01031	0,02156	16,580	0,02607	7	0,2220
RPL5-4	A	390	RO	38	4	4	0,00101	0,00244	15,184	0,03893	0	/
			RZ	50	15	15	0,00994	0,00859	17,000	0,04359	3	0,1388
			RP	48	12	12	0,00591	0,00693	15,792	0,04049	3	3,1928
			RO+RZ+RP	136	35	36	0,01383	0,01636	16,066	0,04120	5	0,0653
ADAMTS6	Z	488	RO	35	0	0	0,00000	0,00000	5,000	0,01025	/	/
			RZ	43	2	2	0,00019	0,00095	4,047	0,00829	0	/
			RP	42	7	7	0,00206	0,00333	4,571	0,00937	0	0,0226
			RO+RZ+RP	120	10	10	0,00171	0,00382	4,508	0,00924	0	0,0680
PPWD1	Z	566	RO	34	14	15	0,00550	0,00605	14,265	0,02520	0	0,0520
			RZ	45	9	9	0,00318	0,00364	14,111	0,02493	0	0,2142
			RP	13	15	15	0,00716	0,00854	12,462	0,02202	3	0,0382
			RO+RZ+RP	92	39	40	0,00663	0,01353	13,935	0,02462	3	0,0191
TG401	Z	829	RO	39	0	0	0,00000	0,00000	17,000	0,02051	/	/
			RZ	45	4	4	0,00027	0,00110	14,067	0,01697	0	/
			RP	44	1	1	0,00005	0,00028	21,023	0,02536	0	/
			RO+RZ+RP	128	18	18	0,00712	0,00400	17,352	0,02093	0	0,0031
TG1505	Z	532	RO	39	0	0	0,00000	0,00000	10,000	0,01880	/	/
			RZ	43	0	0	0,00000	0,00000	13,000	0,02444	/	/
			RP	42	0	0	0,00000	0,00000	14,000	0,02632	/	/
			RO+RZ+RP	124	6	6	0,00508	0,00209	12,395	0,02330	0	0,0151

*Legenda k Tabulce 3.*

<sup>1</sup> Autosom (A), chromosom Z (Z)

<sup>2</sup> Délka sekvence v bp

<sup>3</sup> Rákosník obecný (RO); rákosník zpěvný (RZ); rákosník pokřovní (RP)

<sup>4</sup> Počet haploidních sekvencí

<sup>5</sup> Počet segregujících míst (S)

<sup>6</sup> Počet mutací ( $\eta$ )

<sup>7</sup> Nukleotidová diverzita ( $\pi$ )

<sup>8</sup> Proporce polymorfních míst ( $\theta$ )

<sup>9</sup> Divergence k outgroupu; průměrný počet nukleotidových substitucí

<sup>10</sup> Divergence k outgroupu; průměrný počet nukleotidových substitucí na bázi

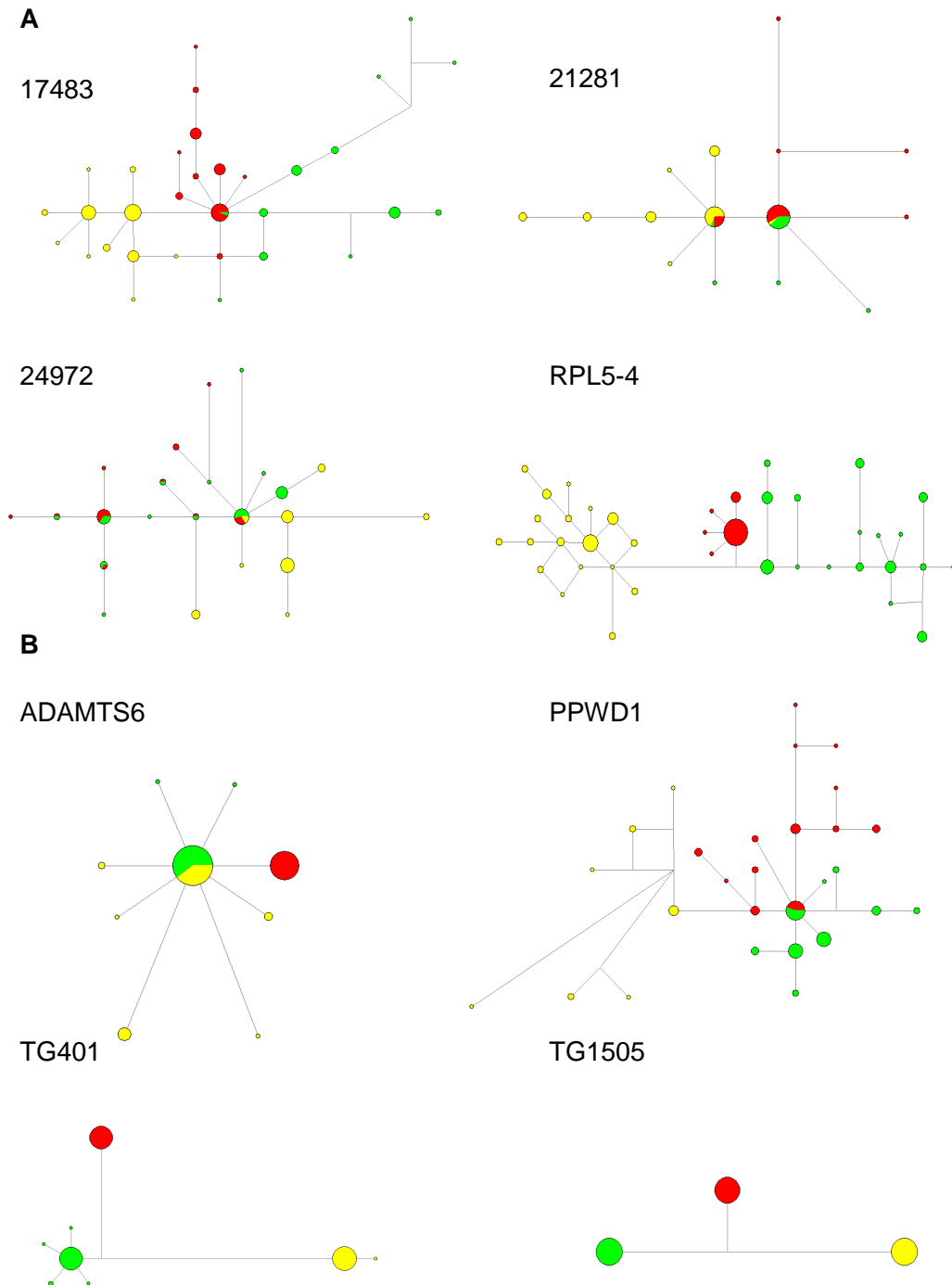
<sup>11</sup> Minimální počet rekombinačních událostí

<sup>12</sup> Odhad rekombinačního parametru R

(jeden test pro každý ze tří studovaných druhů a jeden test pro všechny tři druhy dohromady). Mezidruhová divergence byla vždy stanovena k outgroupu (tj. rákosníku proužkovanému). Test byl signifikantní pro všechny tři studované druhy testované separátně, ne však, když byly druhy sloučeny dohromady (Tabulka 5). Tento výsledek naznačuje, že na jeden či více ze studovaných lokusů u každého druhu působí pozitivní selekce. Při podrobnějším prostudování zjištěných a očekávaných hodnot genetického polymorfismu uvnitř druhu a divergence k outgroupu se ukázalo, že největší odchylky zjištěných hodnot od pozorovaných vykazovaly lokusy TG401 (u rákosníka obecného a rákosníka pokřovního) a TG1505 (u rákosníka obecného, rákosníka zpěvného i rákosníka pokřovního) (Tabulka 6). Je tedy pravděpodobné, že právě u těchto dvou lokusů je snížena genetická diverzita působením pozitivní selekce. Po odstranění těchto dvou genů z analýzy byl HKA test u rákosníka zpěvného a rákosníka pokřovního nesignifikantní, ale zůstal signifikantní u rákosníka obecného, kde tedy může pozitivní selekce působit ještě na nějaký další lokus.

Abychom zjistili, jestli mezi studovanými druhy dochází ke genovému toku, provedli jsme analýzu sekvencí pomocí programu IMA2. V Tabulce 7 jsou uvedeny odhady jednotlivých parametrů IM modelu, které jsme získali. Posterior probability distribuce pro odhady jednotlivých parametrů jsou znázorněny na Obrázku 12. Výsledky ukazují, že všechny tři druhy rákosníků mají podobnou efektivní velikost populace (rákosník obecný,  $N = 429\ 802$ ; rákosník zpěvný,  $N = 541\ 781$ ; rákosník pokřovní,  $N = 535\ 194$ ). Odhad efektivní velikosti populace

**Obrázek 11.** Genealogické sítě 4 autosomálních (A) a 4 Z-vázaných lokusů (B). Velikosti kruhů jsou proporcionální k počtu jednotlivých haplotypů. Sekvence z rákosníka obecného jsou znázorněny červeně, rákosníka zpěvného zeleně a rákosníka pokřovního žlutě.



**Tabulka 4.** Výsledky Tajima's D a Fu-Li's D testu.

Lokus	Druh <sup>1</sup>	Tajima's D	Fu-Li's D
17483	RO	-0,70073	-0,56574
	RZ	0,67549	0,14941
	RP	-1,22487	-1,64084
21281	RO	-0,40291	-1,19746
	RZ	-0,02499	-0,19974
	RP	-0,92237	-0,82269
24972	RO	-0,68333	-1,22350
	RZ	-1,31446	<b>-2,43066</b>
	RP	-0,80926	-0,40400
RPL5-4	RO	-1,42030	-2,13505
	RZ	0,48423	1,11164
	RP	-0,43760	0,40730
ADAMTS6	RO	/	/
	RZ	-1,47990	<b>-2,46221</b>
	RP	-1,05007	-1,00249
PPWD1	RO	-0,29454	0,22846
	RZ	-0,35822	0,71170
	RP	-0,67610	-0,79512
TG401	RO	/	/
	RZ	<b>-1,76368</b>	<b>-2,23957</b>
	RP	-1,11530	-1,80309
TG1505	RO	/	/
	RZ	/	/
	RP	/	/

<sup>1</sup>Rákosník obecný (RO); rákosník zpěvný (RZ); rákosník pokřovní (RP)

Žádná hodnota Tajima's D ani Fu-Li's D statistiky nebyla statisticky signifikantní ( $p > 0.05$ )

**Tabulka 5.** HKA test pozitivní selekce.

Druh <sup>1</sup>	Suma odchylek <sup>2</sup>	Df <sup>3</sup>	P-value <sup>4</sup>	P-value <sup>5</sup>
RO	28,8754	7	<b>0,00015</b>	<b>0,00000</b>
RZ	17,4805	7	<b>0,01455</b>	<b>0,00310</b>
RP	24,4626	7	<b>0,00094</b>	<b>0,00000</b>
RO+RZ+RP	10,2586	7	0,17438	0,07590

<sup>1</sup> Rákosník obecný (RO); rákosník zpěvný (RZ); rákosník pokřovní (RP)

<sup>2</sup> Počítáno dle vzorce  $\sum ((\text{pozorované} - \text{očekávané hodnoty})^2 / \text{variance})$

<sup>3</sup> Počet stupňů volnosti

<sup>5</sup> P-value z chi kvadrát testu; signifikantní hodnoty znázorněny tučně

<sup>4</sup> P-value ze simulací; počet simulací 10000; signifikantní hodnoty znázorněny tučně

**Tabulka 6.** Pozorované a očekávané hodnoty genetického polymorfismu a divergence v HKA testu pozitivní selekce. (Legenda k tabulce na následující straně).

Lokus	Druh <sup>1</sup>	Polymorfnní místa uvnitř druhu				Divergence vzhledem k outgroupu <sup>2</sup>			
		Pozorované	Očekávané	Variance	Odchylka <sup>2</sup>	Pozorované	Očekávané	Variance	Odchylka <sup>3</sup>
17483	RO	9	12,03	24,44	0,376	15,84	12,81	20,46	0,449
	RZ	13	15,34	38,75	0,141	17,66	15,32	29,83	0,184
	RP	10	13,72	29,23	0,473	17,40	13,68	23,23	0,595
	RO+RZ+RP	32	35,37	105,74	0,107	16,91	13,55	56,54	0,200
21281	RO	29	18,10	52,90	2,245	10,64	21,54	43,18	2,751
	RZ	24	15,63	46,58	1,503	9,35	17,72	37,13	1,885
	RP	22	16,14	40,00	0,860	11,13	17,00	31,75	1,083
	RO+RZ+RP	50	42,92	162,02	0,310	10,56	17,64	90,57	0,554
24972	RO	29	20,70	69,94	0,985	17,38	25,67	56,40	1,221
	RZ	35	26,20	89,10	0,870	16,26	25,07	63,94	1,212
	RP	30	22,60	69,40	0,790	16,40	23,80	52,72	1,040
	RO+RZ+RP	71	62,60	301,63	0,234	16,58	24,98	171,18	0,412
RPL5-4	RO	4	9,13	16,76	1,567	15,18	10,06	14,78	1,778
	RZ	15	16,86	39,89	0,087	17,00	15,14	29,31	0,118
	RP	12	13,92	29,88	0,123	15,79	13,88	23,71	0,155
	RO+RZ+RP	35	37,10	111,97	0,039	16,07	13,97	59,69	0,074
ADAMTS6	RO	0	2,07	2,47	1,727	5,00	2,93	3,18	1,342
	RZ	2	2,80	3,47	0,183	4,05	3,25	3,67	0,173
	RP	7	5,04	7,27	0,526	4,57	6,53	7,90	0,484
	RO+RZ+RP	10	9,99	15,68	0,000	4,51	4,51	7,99	0,000
PPWD1	RO	14	11,64	24,72	0,226	14,27	16,63	24,73	0,226
	RZ	9	10,75	20,56	0,149	14,11	12,36	18,40	0,167
	RP	15	9,83	25,53	1,048	12,46	17,63	27,66	0,967
	RO+RZ+RP	39	35,88	116,97	0,083	13,94	17,05	66,68	0,146
TG401	RO	0	7,14	11,75	<b>4,335</b>	17,00	9,86	12,71	<b>4,008</b>
	RZ	4	8,40	14,40	1,347	14,07	9,66	13,36	1,452
	RP	1	9,66	17,66	<b>4,247</b>	21,02	12,36	17,29	<b>4,336</b>
	RO+RZ+RP	18	24,44	57,68	0,720	17,35	10,91	31,21	1,331
TG1505	RO	0	4,20	5,80	<b>3,042</b>	10,00	5,80	6,79	2,597
	RZ	0	6,01	9,14	<b>3,954</b>	13,00	6,99	8,92	<b>4,054</b>
	RP	0	6,10	9,36	<b>3,978</b>	14,00	7,90	9,91	<b>3,759</b>
	RO+RZ+RP	6	12,70	21,77	2,060	12,40	5,70	11,24	<b>3,989</b>



Legenda k Tabulce 6.

<sup>1</sup> Rákosník obecný (RO), rákosník zpěvný (RZ), rákosník pokřovní (RP)

<sup>2</sup> Rákosník proužkovaný byl použit jako outgroup

<sup>3</sup> Odhylka počítána dle vzorce  $((\text{pozorované} - \text{očekávané hodnoty})^2 / \text{variance})$   
Hodnoty odchylek větší než 3.000 jsou znázorněny tučně

společného předka rákosníka obecného a zpěvného je podstatně nižší (N = 80 691). Efektivní velikost populace společného předka všech tří druhů nebyla odhadnuta spolehlivě (viz posterior probability distribuce tohoto parametru, Obrázek 11), pravděpodobně kvůli nízkému počtu analyzovaných sekvencí a nedostatku evolučně starých segregujících polymorfismů. Rákosník obecný a rákosník zpěvný podle našeho odhadu divergovali zhruba před 1,1 milionem let.

**Tabulka 7.** Odhady parametrů "isolation with migration" modelu pomocí programu IMa2.

Parametr	MLE <sup>1</sup>	HPD95Lo <sup>2</sup>	HPD95Hi <sup>2</sup>
N0	429802	258540	663640
N1	541781	344171	825022
N2	535194	360638	772326
N3	80691	0	627412
N4	/	/	/
m0>1	1,14E-09	0	5,09E-07
m1>0	1,92E-07	7,97E-09	5,43E-07
m0>2	1,14E-09	0	1,22E-07
m2>0	1,14E-09	0	1,17E-07
m1>2	1,14E-09	0	1,24E-07
m2>1	5,35E-08	0	2,17E-07
m2>3	8,84E-07	1,81E-07	2,28E-06
m3>2	1,14E-09	0	2,10E-06
2N0m0>1	0,00081	0,00000	0,37330
2N0m0>2	0,00039	0,00000	0,10590
2N1m1>0	0,23800	0,01845	0,55070
2N1m1>2	0,00054	0,00000	0,13570
2N2m2>0	0,00044	0,00000	0,12680
2N2m2>1	0,06182	0,00000	0,22780
2N2m2>3	0,94860	0,00000	2,54300
2N3m3>2	0,00750	0,00000	1,29700
t0	1116496	668580	2217184
t1	2546534	1657289	6583046

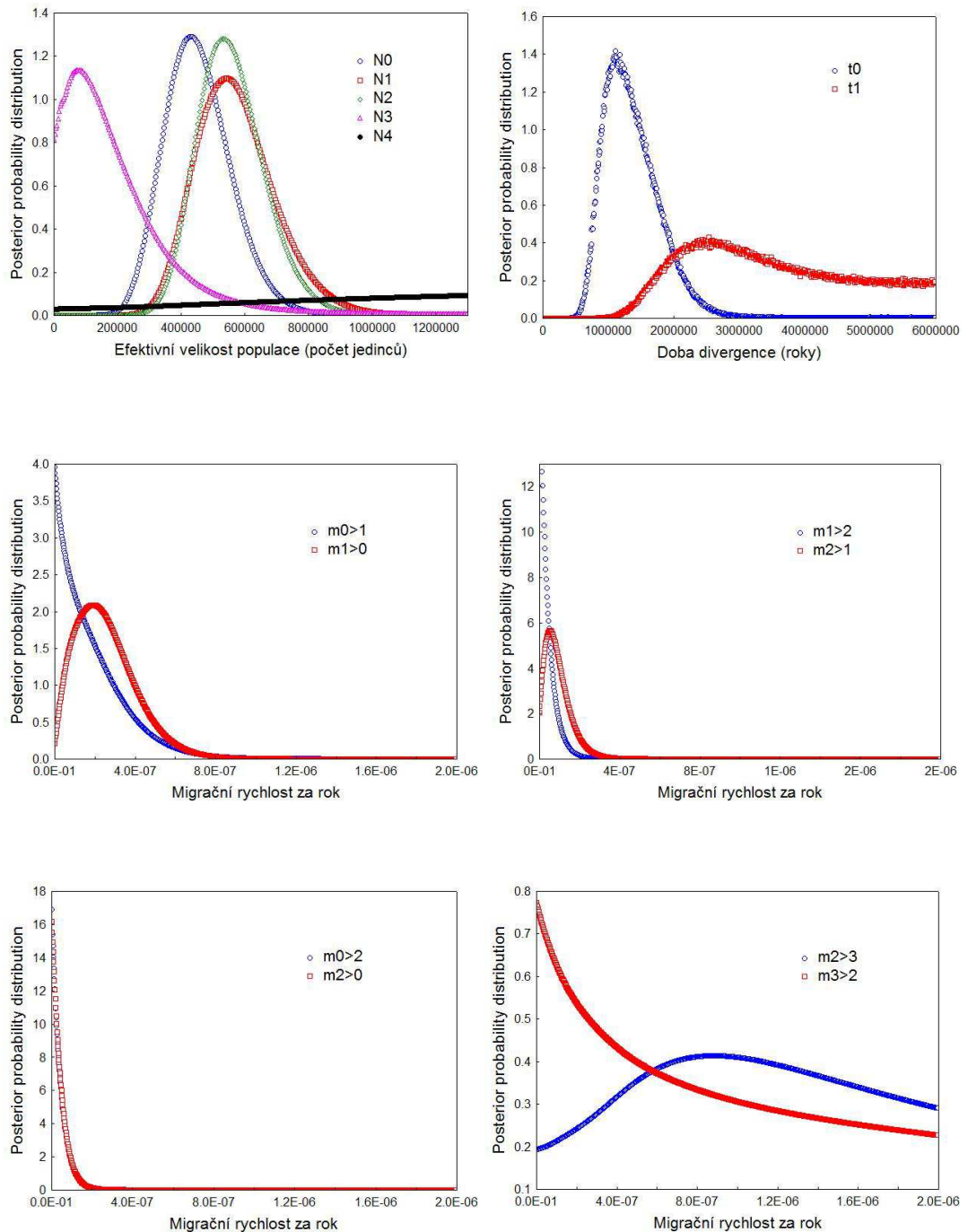
<sup>1</sup>Maximum likelihood odhad parametru

<sup>2</sup>Spodní a horní 95% posterior density intervaly

N, efektivní velikost populace v počtech jedinců pro rákosníka obecného (N0); rákosníka zpěvného (N1); rákosníka pokřovního (N2); předka rákosníka obecného a rákosníka zpěvného (N3) a předka všech tří druhů (N4)

2Nm, populační migrační rychlost (population migration rate) mezi jednotlivými druhy (značené stejnými čísly jako efektivní velikosti populací), například 2N0m0>1 značí populační migrační rychlost z rákosníka zpěvného do rákosníka obecného

**Obrázek 12.** Posterior probability distribuce odhadovaných parametrů "isolation with migration" modelu:  $N$ , efektivní velikosti populace pro rákosníka obecného ( $N_0$ ); rákosníka zpěvného ( $N_1$ ); rákosníka pokřovního ( $N_2$ ); předka rákosníka obecného a rákosníka zpěvného ( $N_3$ ) a předka všech tří druhů ( $N_4$ );  $t$ , doba divergence druhů mezi rákosníkem obecným a rákosníkem zpěvným ( $t_0$ ) a rákosníkem pokřovním a předkem rákosníka obecného a rákosníka zpěvného ( $t_1$ );  $m$ , migrační rychlost za rok, mezi jednotlivými druhy (značené stejnými čísly jako efektivní velikosti populací). Například  $m_0 > 1$  značí migrační rychlost z rákosníka zpěvného do rákosníka obecného.



Rákosník pokřovní a předek rákosníka obecného a zpěvného divergovali zhruba před 2,5 miliony let. Zaznamenali jsme nenulový genový tok z rákosníka obecného do rákosníka zpěvného ( $2Nm = 0,238$ ), v opačném směru byl genový tok nulový ( $2Nm < 0,001$ ) (Tabulka 7, Obrázek 12). O trochu nižší genový tok jsme zaznamenali z rákosníka zpěvného do rákosníka pokřovního ( $2Nm = 0,062$ ), opět v opačném směru byl genový tok nulový ( $2Nm < 0,001$ ) (Tabulka 7, Obrázek 12). Mezi rákosníkem obecným a rákosníkem pokřovním byl genový tok nulový v obou směrech ( $2Nm < 0,001$ ) (Tabulka 7, Obrázek 12). Významný genový tok pravděpodobně existoval také mezi rákosníkem pokřovním a předkem rákosníka obecného a zpěvného a podle našich odhadů byl opět asymetrický, pouze z předka rákosníka obecného a zpěvného do rákosníka pokřovního ( $2Nm = 0,95$ ), ale ne naopak ( $2Nm < 0,01$ ) (Tabulka 7). Tento odhad ovšem nemusí být přesný, jak je vidět z posterior probability distribucí tohoto parametru (Obrázek12).

## 5. Diskuze

Genový tok mezi druhy může hrát v evoluci důležitou roli. Ve své diplomové práci jsem zjišťovala, jestli dochází ke genovému toku mezi třemi druhy rákosníků rodu *Acrocephalus*: rákosníkem obecným, rákosníkem zpěvným a rákosníkem pokřovním, kteří se v přírodě vzájemně kříží, i když jen v nízké frekvenci. Analýza sekvenčních dat z osmi jaderných lokusů přinesla následující výsledky. Odhadli jsme, že rákosník obecný a rákosník zpěvný divergovali zhruba před 1,1 milionem let a rákosník pokřovní a předek rákosníka obecného a zpěvného před 2,5 miliony let. Tento odhad ukazuje, že k divergenci u těchto druhů došlo relativně nedávno v průběhu čtvrtohorních klimatických oscilací, které začaly zhruba před 2,4 - 2,6 miliony let (Hewitt 2000; Provan & Bennett 2008). Zdá se tedy, že střídání dob ledových a meziledových a s tím související změny ve velikosti areálů druhů hráli důležitou roli v adaptivní radiaci rákosníků rodu *Acrocephalus*.

Naše výsledky ukazují, že všechny tři studované druhy rákosníků mají podobnou relativně vysokou efektivní velikost populace (rákosník obecný,  $N = 429\ 802$ ; rákosník zpěvný,  $N = 541\ 781$ ; rákosník pokřovní,  $N = 535\ 194$ ). Při takovéto efektivní velikosti populace a relativně nedávné době divergence se dá očekávat, že mezi druhy bude stále existovat vysoké množství ancestrálního polymorfismu. Ten může částečně vysvětlit přítomnost sdílených haplotypů mezi druhy a nejasné fylogenetické vztahy u mnoha lokusů (Obrázek 11).

Kromě toho naše výsledky ukazují, že mezi druhy dochází ke genové introgresi, i když ne mezi všemi třemi druhy. Mezi rákosníkem obecným a rákosníkem pokřovním nedochází ke genovému toku vůbec, což se také dalo čekat, protože tyto dva druhy obývají rozdílné niky a prokázání hybridů mezi nimi dosud nejsou známi. Mezi rákosníkem obecným a rákosníkem zpěvným, kteří v přírodě hybridizují, dochází ke genovému toku, ale jen v jednom směru a to z rákosníka obecného do rákosníka zpěvného, naopak nikoliv. I mezi rákosníkem zpěvným a rákosníkem pokřovním, kteří také v přírodě hybridizují, je prokazatelný genový tok, ale opět jen v jednom směru a to z rákosníka zpěvného do rákosníka pokřovního, naopak ke genovému toku nedochází. Genový tok mezi rákosníkem obecným a rákosníkem zpěvným ( $2Nm = 0,238$ ) je o něco vyšší než

mezi rákosníkem zpěvným a rákosníkem pokřovným ( $2Nm = 0,062$ ). Zdá se tedy, že genový tok mezi geneticky příbuznějšími taxony je vyšší než mezi ekologicky bližšími taxony, což je zvláštní, protože v přírodě by se pravděpodobně měly více křížit ekologicky bližší druhy, neboť se častěji vyskytují na stejných lokalitách. K vyšší introgresi mezi geneticky příbuznějšími druhy zřejmě dochází díky tomu, že ještě nejsou vytvořené tak silné postzygotické reprodukčně izolační mechanismy, jako třeba u vzdálenějších druhů.

Otázkou zůstává, proč je genová introgrese asymetrická. Jedním z vysvětlení může být, že k mezidruhové hybridizaci dochází jen v jednom směru. Je také možné, že postzygotická reprodukční izolace u rákosníků (může to být například snížená plodnost hybridů) je asymetrická. To znamená, že sníženou fitness mají jen hybridy v jednom směru křížení, ale ne v opačném směru křížení. Takováto asymetrie v reprodukční izolaci bývá u blízce příbuzných druhů častá (Turelli & Moyle 2007). Dalším možným vysvětlením je, že ke genové introgresi v průběhu evoluce druhů docházelo především v oblastech, kde je jeden druh vzácný. V takových případech dochází přednostně k introgresi z hojného do vzácného druhu, který se více kříží (Currat *et al.* 2008).

Srovnání našeho odhadu genového toku mezi druhy rákosníků s odhady genového toku mezi jinými druhy (Tabulka 8) ukazuje, že genový tok mezi rákosníky je spíše nízký. Míra introgrese mezi rákosníkem obecným a rákosníkem zpěvným je už ale srovnatelná s mírou genového toku mezi některými relativně často hybridizujícími druhy, které v přírodě tvoří hybridní zóny, jako jsou slavík obecný (*Luscinia megarhynchos*) a slavík tmavý (*L. luscinia*) (Storchová *et al.* 2010) nebo papežík lazurový (*Passerina amoeba*) a papežík indigový (*P. cyanea*) (Carling *et al.* 2010). To ukazuje, že postzygotická reprodukční izolace mezi druhy rákosníků je stále slabá.

Populačně genetická teorie ukazuje, že pokud jsou hodnoty populační migrační rychlosti  $2Nm > 1$ , je efekt genového toku silnější než efekt genetického driftu a mezi populacemi dojde k vyrovnání frekvencí alel, tj. ke genetickému splynutí populací. Pokud je  $2Nm < 1$ , efekt genového toku je slabší než efekt genetického driftu. V takovém případě genový tok může obohacovat populace o nové alely, ale jejich frekvence v obou populacích zůstávají odlišné (Felsenstein 1976; Slatkin 1985). U našeho modelového systému jsou hodnoty populační migrační rychlosti vždy menší než jedna, a proto genový tok sice může

**Tabulka 8.** Odhady populační migrační rychlosti u blízce příbuzných druhů ptáků. Převzato z Hey & Pinho (2012).

Druh	Taxon 1	Taxon 2	2N1m1	2N2m2	Reference
<i>Passerina</i>	<i>P. amoeba</i>	<i>P. cyanea</i>	0,4278	0,3441	Carling <i>et al.</i> 2010
<i>Icterus</i>	<i>I. abeillei</i>	<i>I. galbula</i>	0	0	Kondo <i>et al.</i> 2008
<i>Leucodioptron</i>	<i>L. taewanus</i>	<i>L. canorum</i>	170,5	65,5	Li <i>et al.</i> 2010
<i>Plectrophenax</i>	<i>P. nivalis</i>	<i>P. hyperboreus</i>	753,3219	0,049481	Maley & Winker 2010
<i>Aquila</i>	<i>A. adalberti</i>	<i>A. heliaca</i>	0,94545	0	Martínez-Cruz & Godoy 2007
<i>Anas</i>	<i>A. falcata</i>	<i>A. strepera</i>	0,00098	0,0546	Peters <i>et al.</i> 2007
<i>Luscinia</i>	<i>L. megarhynchos</i>	<i>L. luscinia</i>	0,118426	0,325948	Storchová <i>et al.</i> 2010
<i>Phaenicophilus</i>	<i>P. palmarum</i>	<i>P. poliocephalus</i>	0,1953	0,0245	Sly <i>et al.</i> 2010

2Nm, populační migrační rychlost (population migration rate), mezi taxony 1 a 2

obohacovat jednotlivé druhy o nové alely, ale nehrozí, že by druhy geneticky splynuly.

Zajímavé je také srovnání našich výsledků s výsledky práce zabývající se hybridizací a genovým tokem mezi rákosníkem velkým a rákosníkem hlučnoglasým (Hansson *et al.* 2012). Areály těchto dvou druhů se překrývají v jižním Kazachstánu, kde také často hybridizují (Hansson *et al.* 2003). Genetická analýza rozsáhlého vzorku jedinců obou druhů ze sympatrické populace odhalila několik F1 hybridů, ale žádné zpětné křížence. Závěrem práce tedy bylo, že mezi rákosníkem velkým a rákosníkem hlučnoglasým dochází k hybridizaci, ale nedochází ke genovému toku, protože F1 hybridy jsou buď neplodní, anebo jejich potomci neživotaschopní (Hansson *et al.* 2012). Ačkoli tyto výsledky ukazují, že genový tok mezi rákosníkem velkým a rákosníkem hlučnoglasým je v současné době pravděpodobně velmi nízký či nulový, nelze na jejich základě usoudit, zda k němu nedocházelo v minulosti. Námí zvolená metoda detekce genového toku pomocí modelu „isolation with migration“ oproti tomu umožňuje detekci i genového toku, ke kterému docházelo v minulosti, konkrétně kdykoli po oddělení dvou druhů. Nemůžeme však říct, zda se intenzita genového toku mezi druhy nějak výrazně měnila v průběhu evoluce a jestli k němu dochází ještě v současnosti.

Zajímavým zjištěním naší studie je také to, že na chromozomu

Z vykazují dva ze čtyř lokusů (TG401 a TG1505) známky pozitivní selekce. Oba lokusy mají velmi nízkou vnitrodruhovou genetickou variabilitu, ale mezidruhová divergence u nich snižená není. To je známkou toho, že v jejich blízkosti na chromosomu Z došlo k „selective sweep“ (selekčnímu vymetení). „Selective sweep“ u těchto lokusů vznikl nezávisle u více než jednoho druhu; v případě lokusu TG401 u rákosníka obecného a rákosníka pokřovního, v případě lokusu TG1505 u všech tří druhů rákosníků (viz Tabulka 6). K „selective sweep“ dochází, když se v populaci objeví nová výhodná mutace, která se rychle zafixuje a s ní i mutace v jejím okolí, což vede ke snížení genetické variability v této oblasti. Protože mezi studovanými druhy rákosníků dochází ke genovému toku, je teoreticky možné, že se výhodná mutace rozšíří z jednoho druhu do druhého. V takovém případě by ale druhy vykazovaly stejné haplotypy. V našem případě vykazují jednotlivé druhy haplotypy rozdílné. To naznačuje, že pozitivní selekce působila ve stejných lokusech nezávisle u více druhů.

Pozitivní selekce detekovaná ve stejných lokusech u více druhů by mohla být důsledkem paralelní evoluce či diverzifikující selekce. Jestliže dva různé druhy začnou žít ve stejném prostředí a budou například využívat stejnou životní strategii, začnou na ně působit obdobné selekční tlaky. Evolučním důsledkem takových selekčních tlaků může být vznik podobných nebo stejných morfologických znaků. Tento jev se nazývá paralelní evoluce (Ralph & Coop 2010). V případě paralelní evoluce vzniká „selective sweep“ u různých druhů ve stejném časovém období, kdy došlo ke změně selekčních tlaků. Naopak k diverzifikující selekci dochází v různorodém prostředí, které zvýhodňuje extrémní varianty a potlačuje vlastnosti průměrné. Při dlouhodobém působení dochází ke stabilizování genetického polymorfismu, tedy k tomu, že v populaci trvale existují dva nebo více značně odlišné genotypy (Santiago & Caballero 2005). Na rozdíl od paralelní evoluce, „selective sweep“ vzniklý působením diverzifikující selekce nemusí být datovaný do stejného časového okna u různých druhů. Datování „selective sweep“ je v našem případě obtížné, neboť u dotyčných Z-vázaných lokusů často není v rámci druhu vůbec žádný polymorfismus. Je proto těžké rozhodnout, zda „selective sweep“ vzniklý nezávisle u více druhů je důsledkem paralelní evoluce nebo diverzifikující selekce. Podle genomové sekvence zebřičky, nejbližšího příbuzného ptáka se známým genomem, leží oba lokusy v různých částech chromosomu Z (TG401: 6Mb, TG1505: 32Mb). U rákosníků

jejich pozici v genomu neznáme, a nemůžeme tak vyloučit, že leží ve stejném „selective sweep“.

Detekovaná pozitivní selekce u Z-vázaných lokusů by také mohla být důsledkem evolučních závodů na chromosomu Z. Bylo zjištěno, že sekvence na chromosomu Z divergují mezi druhy rychleji, než sekvence na autosomech (tzv. „faster Z evolution“) (Mank *et al.* 2007; Mank *et al.* 2010; Ellegren 2009). Jedním z vysvětlení je, že na pohlavních chromosomech dochází k častějším vnitrogenomovým evolučním konfliktům (Burt & Trivers 2006). Proto také chromosom Z může hrát důležitější roli v reprodukční izolaci než autosomy (Storchová *et al.* 2010). V případě evolučních závodů na chromosomu Z jde vlastně o diverzifikující selekci, ke které dochází v důsledku působení vnitřních genomových konfliktů, ale ne působením vnějších ekologických faktorů.

Působení pozitivní selekce nezávisle ve stejných lokusech u více druhů může být v přírodě častým jevem. V nedávné studii (Muir *et al.* 2012) zabývající se evolucí tří blízce příbuzných druhů silenek (*Silene latifolia*, *Silene dioica* a *Silene diclinis*), detekovali pozitivní selekci ve stejném lokusu u dvou druhů. Stejně jako v našem případě i zde pozitivní selekce působila u dvou druhů nezávisle, i když mezi druhy dochází ke genovému toku. V této studii se přiklání spíše k diverzifikující selekci než k paralelní evoluci. Podobný jev byl zaznamenán i u jednoho lokusu, který vykazuje pozitivní selekci u více druhů jalovců (Li *et al.* 2012).



## 6. Závěr

Provedli jsme populačně genetickou analýzu sekvenčních dat z osmi jaderných lokusů (4 autosomální a 4 Z-vázané) u třech druhů rákosníků: rákosníka obecného, rákosníka zpěvného a rákosníka pokřovního, které vzájemně vzácně hybridizují. Naše analýza ukázala, že hybridizace mezi těmito druhy vede ke genovému toku, i když tak nízkému, že nemůže ohrozit genetickou integritu druhů. Zajímavé je, že ke genovému toku dochází vždy jen v jednom směru. Genový tok mezi geneticky příbuznějšími taxony (rákosníkem obecným a rákosníkem zpěvným) je o něco vyšší než mezi ekologicky příbuznějšími druhy (rákosníkem zpěvným a rákosníkem pokřovním), které se v přírodě setkávají na stejných lokalitách a mohou se tak častěji křížit. K vyšší introgresi mezi geneticky příbuznějšími druhy zřejmě dochází díky tomu, že ještě nejsou vytvořené tak silné postzygotické reprodukčně izolační mechanismy, jako u vzdálenějších druhů. U dvou lokusů jsme také detekovali pozitivní selekci. Zajímavé je, že oba leží na chromosomu Z a zdá se, že pozitivní selekce v těchto lokusech působila nezávisle u dvou či dokonce tří druhů. To může být důsledkem paralelní evoluce či diverzifikující selekce působící v těchto lokusech.

## 7. Literární přehled

- Alström, P., Ericson, P. G. P., Olsson, U. and Sundberg, P. 2006. Phylogeny and classification of the avian superfamily Sylvioidea. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 381-397.
- Arnold, M. L. 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford University Press, New York, USA.
- Axelsson, E., Smith, N. G. C., Sundstrom, H., Berlin, S. and Ellegren, H. 2004. Male-biased mutation rate and divergence in autosomal, Z-linked and W-linked introns of chicken and turkey. *Molecular Biology and Evolution* 21: 1538-1547.
- Backström, N., Brandström, M., Gustafsson, L., Qvarnström, A., Cheng, H. and Ellegren, H. 2006. Genetic mapping in a natural population of collared flycatchers (*Ficedula albicollis*): conserved synteny but gene order rearrangements on the avian Z chromosome. *Genetics* 174: 377-386.
- Backström, N., Fagerberg, S. and Ellegren, H. 2008. Genomics of natural bird populations: a gene-based set of reference markers evenly spread across the avian genome. *Molecular Ecology* 17: 964-980.
- Bandelt, H. J., Forster, P. and Rohlf, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Bauer, H. G., Bezzel, E. and Fiedler, W. 2005. *Das Kompendium der Vögel Mitteleuropas: Alles über Biologie, Gefährdung und Schutz. Band 2: Passeriformes – Sperlingsvögel*. Wiesbaden: Aula Verlag, Wiebelsheim.
- Beier, J., Leisler, B. and Wink, M. 1997. Ein Drossel- x Teichrohrsanger-Hybride *Acrocephalus arundinaceus* x *A. scirpaceus* und der Nachweis seiner Elternschaft. *Journal für Ornithologie* 138.
- 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: 1861-73.
- Burt, A. and Trivers, R. L. 2006. *Genes in Conflict*. Belknap Press of Harvard University Press, Boston, MA.

- 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.
- Cibois, A., Thibault, J. C. and Pasquet, E. 2007. Uniform phenotype conceals double colonization by reed-warblers of a remote Pacific archipelago. *Journal of Biogeography* 34: 1150-1166.
- Coyne, J. A. and Orr, H. A. 2004. *Speciation*. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Cramp, S. 1992. *Handbook of the birds of Europe, the Middle East and North Africa*. Vol 6. Oxford University Press, New York.
- Currat, M., Ruedi, M., Petit, R. J. and Excoffier, L. 2008. The hidden side of invasions: massive introgression by local genes. *Evolution* 62: 1908-1920.
- Ellegren, H. 2009. Genomic evidence for a large-Z effect. *Proceedings of the Royal Society of London B* 276: 361-366.
- Faure, B., Jollivet, D., Tanguy, A., Bonhomme, F. and Bierne, N. 2009. Speciation in the Deep Sea: Multi-Locus Analysis of Divergence and Gene Flow between Two Hybridizing Species of Hydrothermal Vent Mussels. *Plos One* 4.
- Felsenstein, J. 1976. The theoretical population genetics of variable selection and migration. *Annual Review of Genetics* 10: 253-280.
- Fregin, S., Haase, M., Olsson, U. and Alström, P. 2009. Multi-locus phylogeny of the family Acrocephalidae (Aves: Passeriformes): the traditional taxonomy overthrown. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 866-878.
- Fu, Y. X. and Li, W. H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
- Glutz von Blotzheim (1991): *Handbuch der Vögel Mitteleuropas*, Band 12/1 Passeriformes (3. Teil). AULA Verlag, Wiesbaden.
- Griffiths, R., Double, M. C., Orr, K. and Dawson, R. J. G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology* 7: 1071-1075.
- Haataja, K. and Kaarto, I. 1984. A presumed hybrid *Acrocephalus scirpaceus* x *Acrocephalus palustris* in Oulu. *Aureola* 9: 46-49.
- Haffer, J. 1991. Avian species richness in tropical South America. *Stud. Studies on Neotropical. Fauna & Environment* 25: 157-183.

- Hagström, B. 1984. Om en hybrid mellan rör - och busksångare. Vingspegeln 3: 167.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series 41: 95-98.
- Hansson, B., Gavrilov, E. and Gavrilov, A. 2003. Hybridization between great reed warblers and clamorous reed warblers, *Acrocephalus arundinaceus* and *A. stentoreus*: morphological and molecular evidences. Avian Avian Science 1: 3-14.
- Hansson, B., Roggeman, W. and De Smet, G. 2004. Molecular evidence of a reed warbler x great reed warbler hybrid (*Acrocephalus scirpaceus* x *A. arundinaceus*) in Belgium. Journal of Ornithology 145: 159-160.
- 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.
- Harvey, W. G. and Porter, R. F. 1984. Field identification of Blyth's Reed Warbler. British Birds 77: 393-411.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. Nature 405: 907-913.
- Hewitt, G. M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography - or seeing genes in space and time. Molecular Ecology 10: 537-549.
- Hey, J. 2010. Isolation with migration models for more than two populations. Molecular Biology and Evolution 27: 905-920.
- Hey, J. and Pinho, C. 2012. Population genetics and objectivity in species diagnosis. Evolution 66-5: 1413-1429
- Hromádka, M., Horáček, J., Chytil, J., Pithart, K. and Škopek, J. 1993. Příručka k určování našich pěvců. Část 2, pěnicovití, ťuhýkovití. Hradec Králové.
- Hudec, K. and Havlín, J. 1995. Klíč k určování našich pěvců. EkoCentrum Brno.
- Hudson, R. R., Kreitman, M. and Aguadé, M. 1987. A test of neutral molecular evolution based on nucleotide data. Genetics 116: 153-159.
- Ion, C., Bolboaca, L., Ciorpac, M., Stefan, A. and Gorgan, D. L. 2012. A Great Reed Warbler x Reed Warbler hybrid (*Acrocephalus arundinaceus* x

- Acrocephalus scirpaceus*) in northeastern Romania. Journal of Ornithology 3: 975-978.
- Koblmüller, S., Duftner, N., Sefc, K., Aigner, U., Rogetzer, M. and Sturmhuber, C. 2009. Phylogeographic structure and gene flow in the scale eating cichlid *Perissodus microlepis* (Teleostei, Perciformes, Cichlidae) in southern Lake Tanganyika. Zoologica Scripta 38: 257-268.
- Kondo, B., Peters, J., Rosensteel, B. and Omland, K. 2008. Coalescent analyses of multiple loci support a new route to speciation in birds. Evolution 62: 1182-1191.
- Koskimies, P. 1980. Breeding biology of Blyth's reed warbler *Acrocephalus dumetorum* in SE Finland. Ornis Fennica 57: 26-32.
- Koskimies, P. 1984. Polygyny in Blyth's Reed Warbler *Acrocephalus dumetorum*. Annales Zoologici Fennici 21: 239-242.
- Koskimies, P. 1991. *Acrocephalus schoenobaenus* – Schilfrohrsänger. In: Glutz von Blotzheim, U. N. & Bauer, K. M. eds. Handbuch der Vögel Mitteleuropas. Wiesbaden: Aula, pp. 291-340.
- Kosonen, L. 1983. Todennäköinen vita - ja luhtakerttusen risteymä *Acrocephalus dumetorum* x *palustris* Tampereella. Lintuviesti 8: 210-213.
- Leisler, B. 1981. Die ökologische Einnischung der mitteleuropäischen Rohrsänger (*Acrocephalus*, *Sylviinae*). 1: Habitattrennung. Vogelwarte 31: 45-74.
- Leisler, B. and Schulze-Hagen, K. 2011. Reed Warblers: Diversity in a Uniform Bird Family. KNNV Publishing.
- Lemaire, F. 1977. Mixed song, interspecific competition and hybridisation in the reed and marsh warblers. Behaviour 63: 215-240.
- Li, J. W., Yeung, C. K. L., Tsai, P. W., Lin, R. C., Yeh, C. F., Yao, C. T., Han, L. X., Hung, L. M., Ding, P., Wang, Q. S. and Li, S. H. 2010. Rejecting strictly allopatric speciation on a continental island: prolonged postdivergence gene flow between Taiwan (*Leucodioptron taewanus*, Passeriformes Timaliidae) and Chinese (*L. canorum canorum*) hwameis. Molecular Ecology 19: 494-507.
- Li, Z., Zou, J., Mao, K., Lin, K., Li, H., Liu, J., Källman, T., Lascoux, M. 2012. Population genetic evidence for complex evolutionary histories of four high altitude juniper species in the Qinghai-Tibetan Plateau. Evolution 66: 831-45

- Lifjeld, J. T., Marthinsen, G., Myklebust, M., Dawson, D. A. and Johnsen, A. 2010. A wild Marsh Warbler 3 Sedge Warbler hybrid (*Acrocephalus palustris* x *A. schoenobaenus*) in Norway documented with molecular markers. *Journal of Ornithology* 151: 513-517.
- Lindholm, A., Bensch, S., Dowsett-Lemaire, F., Forsten, A. and Karkkainen, H. 2007. Hybrid Marsh x Blyth's Reed Warbler with mixed song in Finland in June 2003. *Dutch Birding* 29: 223-231.
- Maley, J. M., and Winker, K. 2010. Diversification at high latitudes: speciation of buntings in the genus *Plectrophenax* inferred from mitochondrial and nuclear markers. *Molecular Ecology* 19: 785-797.
- Mank, J. E., Axelsson, E. and Ellegren, H. 2007. Fast-X on the Z: rapid evolution of sex-linked genes in birds. *Genome Research* 17:618-624.
- Mank, J. E., Nam, K. and Ellegren, H. 2010. Faster-Z Evolution Is Predominantly Due to Genetic Drift. *Molecular Biology and Evolution* 27: 661-670.
- Martínez-Cruz, B. and Godoy, J. 2007. Genetic evidence for a recent divergence and subsequent gene flow between Spanish and Eastern imperial eagles. *BMC Evolutionary Biology* 7: 170.
- Mayr, E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
- McCarthy, E. M. 2006. *Hanbook of Avian Hybrids of the World*. Oxford University Press, New York, USA.
- Morel, M. Y. 1987. *Acrocephalus scirpaceus* et *Acrocephalus baeticatus* dans la région de Richard-Toll (Sénégal). *V9*: 47-55.
- Muir, G., Dixon, CH. J., Harper, A. L. and Filatov, D. A. 2012. Dynamics of drift, gene flow, and selection during speciation in silene. *Evolution* 66-5: 1447-1458.
- Nei, M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York.
- Parkin, D. T., Collinson, M., Helbig, A. J., Knox, A. G. and Sangster, G. 2004. Species limits in *Acrocephalus* and *Hippolais* warblers from the Western Palearctic. *British Birds* 97: 276-299.
- Persson, C. 1987. Bestämningsproblem III: *Acrocephalus*-hybrider. *Fågelstudier* 3: 2: 85-86.

- Peters, J., Zhuravlev, Y., Fefelov, I., Logie, A. and Omland, K. 2007. Nuclear loci and coalescent methods support ancient hybridization as cause of mitochondrial paraphyly between gadwall and falcated duck (*Anas* spp.). *Evolution* 61: 1992-2006.
- Poot, M., Engelen, F. and Van der Winden, J. 1999. Een gemengd broedgeval van Struikrietzanger *Acrocephalus dumetorum* en Bosrietzanger *A. palustris* bij Utrecht in voorjaar 1998. *Limosa* 72: 151-157.
- Price, T. 2008. *Speciation in Birds*. Roberts Publishers, Greenwood Village, Colorado.
- Provan, J. and Bennett, K. D. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 564-571.
- Ralph, P., and Coop, G. 2010. Parallel adaptation: one or many waves of advance of an advantageous allele? *Genetics* 186: 647-668.
- Rozas, J., Sánchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X. and Rozas, R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Santiago, E. and Caballero, A. 2005. Variation after a selective sweep in a subdivided population. *Genetics* 169: 475-483.
- Sharrock, J. T. R. 1985. Mystery Photographs 105: Sedge x Reed Warbler hybrid. *British Birds* 78: 434-437.
- Schwenk, K., Brede, N. and Streit, B. 2008. Introduction. Extent, processes and evolutionary impact of interspecific hybridization in animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 363: 2805-2811.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393-430.
- Sly, N. D., Townsend, A. K., Rimmer, C. C., Townsend, J. M., Latta, S. C. and I. J. Lovette. 2010. Phylogeography and conservation genetics of the Hispaniolan endemic Palm-Tanagers (Aves: Phaenicophilus). *Conservation Genetics* 11: 2121-2129.
- Stephens, M., Smith, N. J. and Donnelly, P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics* 68: 978-989.

- Stephens, M. and Donnelly, P. 2003. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genetic data. *American Journal of Human Genetics* 73: 1162-1169.
- Storch, D. and Mihulka, S. 2000. Úvod do současné ekologie. Nakladatelství Portál.
- 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.
- Svensson, L. 1992. Identification Guide to European Passerines. Stockholm.
- Svensson, L., Grant, P. J., Mullarney, K. and Zetterström, D. 2004. Ptáci Evropy, severní Afriky, Blízkého východu. Nakladatelství Svojtka & Co, Praha.
- Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. and Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673-4680.
- Trnka, A. 2004. Výskyt trsteniarika krovinného (*Acrocephalus dumetorum*) v Európe – posúva sa hranica jeho rozšírenia ďalej na západ? *Sylvia* 40: 119-123.
- Turelli, M. & Moyle, L. G. 2007 Asymmetric postmating isolation: Darwin's corollary to Haldane's Rule. *Genetics* 176: 1059-1088.
- Van Eerde, K. A. 1999. Hybrid sedge x European reed warbler at Makkum in August 1997. *Dutch Birding* 21: 34-37.
- Walinder, G., Karlsson, L. and Persson, K. 1988. A new method for separating Marsh Warblers *Acrocephalus palustris* from Reed Warblers *A. scirpaceus*. *Ring and Migration* 9: 55-62.
- Weir, J. T. and Schluter, D. 2008. Calibrating the avian molecular clock. *Molecular Ecology* 17: 2321-2328.
- Wirtz, P. 1999. Mother species-father species: unidirectional hybridization in animals with female choice. *Animal Behaviour* 58: 1-12.
- Woerner, A. E., Cex, M. P. and Hammer, M. F. 2007. Recombination-filtered genomic datasets by information maximization. *Bioinformatics* 23: 1851-185.



Zheng, X. M. and Ge, S. 2010. Ecological divergence in the presence of gene flow in two closely related *Oryza* species (*Oryza rufipogon* and *O. nivara*). *Molecular Ecology* 19: 2439-2454.

## 8. Appendix

*Appendix 1. Identifikace dospělých rákosníků podle zbarvení. Převzato od Petra Procházky.*

Rákosník pokřovní	Rákosník zpěvný	Rákosník obecný
<b>svrchní strana:</b>		
olivově šedohnědá	jaro: <b>zelenavě</b> olivově hnědá s olivově zeleným nádechem na temeni a pláštíku léto: šedavě hnědá (opeření otřelé)	olivově hnědá
<b>kostřec:</b>		
šedavý s jemně narezavělým nádechem	nekontrastní, s jemně žlutohnědým nádechem	narezavělý
<b>spodní strana:</b>		
špinavě bílá s šedavým nádechem	bělavá s nažloutlým nádechem	bělavá, boky světle žlutohnědé až smetanové
<b>kontrast mezi tmavším středem a narezavělými okraji per křídélka, RK, TL:</b>		
malý	střední	velký
<b>špičky 6 vnitřních RL (jaro):</b>		
nekontrastní	jemně, ale <b>kontrastně bělavé</b>	světlejší, ale nekontrastní
<b>nadoční proužek:</b>		
dobře patrný, zasahuje až kousek za oko, vpředu širší	nejméně výrazný, výraznější je už spíš <b>oční kroužek</b>	nevýrazný, nezasahuje za oko
<b>oční proužek:</b>		
tmavší	nevýrazný	nevýrazný
<b>špička spodní čelisti zobáku:</b>		
často <b>tmavší</b> než zbytek spodní čelisti	světlá jako zbytek	světlá jako zbytek
<b>profil hlavy:</b>		
plošší čelo, delší zobák	kulatější hlava, kratší zobák	plošší čelo, delší zobák
<b>nohy:</b>		
nejtmavší, tmavě šedohnědé, olověně šedé až černošedé, někdy s červenavým nádechem	nejsvětější, světle narůžověle slámové, vzácně více do šeda, u dospělých ptáků ale podobné rákosníkovi obecnému	hnědé s šedavým (případně modravě šedým) nádechem
<b>drápy:</b>		
šedé	shora <b>světle</b> šedohnědé (jako suchá tráva), pouze <b>malý kontrast</b> se žlutavou spodní stranou	shora <b>tmavě</b> šedohnědé (jako suchá tráva), <b>kontrast</b> se žlutavou spodní stranou

*Ruční krovky (RK), terciální letky (TL), ruční letky (RL)*

*Appendix 2. Lokality odchytu zkoumaných jedinců rákosníka obecného, rákosníka zpěvného a rákosníka pokřovního.*

ID	Druh	Datum	Lokalita	Pohlaví	N	E
R14	<i>r. obecný</i>	23.6.2010	Rauvola, Kaarina	M	60,40601	22,28520
R15	<i>r. obecný</i>	23.6.2010	Rauvola, Kaarina	F	60,40601	22,28520
R16	<i>r. obecný</i>	23.6.2010	Rauvola, Kaarina	M	60,40601	22,28520
R17	<i>r. obecný</i>	23.6.2010	Rauvola, Kaarina	M	60,40601	22,28520
R18	<i>r. zpěvný</i>	24.6.2010	Vintala, Jarkala	M	60,55024	22,45800
R19	<i>r. obecný</i>	24.6.2010	Aarlahti, Pyhe	M	60,63032	21,81482
R20	<i>r. obecný</i>	25.6.2010	Raisio	F	60,47411	22,12399
R21	<i>r. zpěvný</i>	25.6.2010	Raisio	M	60,47411	22,12399
R22	<i>r. zpěvný</i>	25.6.2010	Raisio	M	60,47411	22,12399
R23	<i>r. obecný</i>	25.6.2010	Raisio	M	60,47411	22,12399
R24	<i>r. zpěvný</i>	25.6.2010	Raisio	M	60,47411	22,12399
R25	<i>r. pokřovní</i>	26.6.2010	Tarvasjoki	M	60,57402	22,75211
R26	<i>r. pokřovní</i>	26.6.2010	Lieto	M	60,46845	22,35348
R27	<i>r. obecný</i>	26.6.2010	Viurila Salo	F	60,37597	23,06829
R28	<i>r. obecný</i>	26.6.2010	Viurila Salo	M	60,37597	23,06829
R29	<i>r. pokřovní</i>	27.6.2010	Iso-Hiisi, Pertteli	M	60,47118	23,33236
R30	<i>r. zpěvný</i>	27.6.2010	Salo	M	60,40581	23,16106
R31	<i>r. obecný</i>	27.6.2010	Salo	M	60,36772	23,09071
R32	<i>r. zpěvný</i>	27.6.2010	Pullola, Salo	M	60,32288	23,21950
R33	<i>r. pokřovní</i>	28.6.2010	Kisko	M	60,2637	23,44241
R34	<i>r. zpěvný</i>	28.6.2010	Svarta Mustio	M	60,14068	23,83176
R35	<i>r. zpěvný</i>	28.6.2010	Svarta Mustio	M	60,14068	23,83176
R36	<i>r. zpěvný</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,21104	24,84445
R37	<i>r. pokřovní</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,21104	24,84445
R38	<i>r. zpěvný</i>	29.6.2010	Espoo	F	60,21104	24,84445
R39	<i>r. pokřovní</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,21104	24,84445
R40	<i>r. pokřovní</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,21104	24,84445
R41	<i>r. pokřovní</i>	29.6.2010	Espoo	F	60,21104	24,84445
R42	<i>r. pokřovní</i>	29.6.2010	Espoo	F	60,21104	24,84445
R43	<i>r. zpěvný</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,21104	24,84445
R44	<i>r. zpěvný</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,21104	24,84445
R45	<i>r. obecný</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,20965	24,84865
R46	<i>r. obecný</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,20965	24,84865
R47	<i>r. obecný</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,20965	24,84865
R48	<i>r. obecný</i>	29.6.2010	Espoo	M	60,20965	24,84865
R49	<i>r. obecný</i>	30.6.2010	Laajalahti, Espoo	M	60,19753	24,81636
R50	<i>r. obecný</i>	30.6.2010	Esponlahti, Espoo	F	60,14281	24,69747
R51	<i>r. zpěvný</i>	30.6.2010	Esponlahti, Espoo	M	60,14281	24,69747
R52	<i>r. obecný</i>	30.6.2010	Esponlahti, Espoo	M	60,14281	24,69747
R53	<i>r. zpěvný</i>	1.7.2010	Bembole, Espoo	F	60,22308	24,67685
R54	<i>r. zpěvný</i>	1.7.2010	Bembole, Espoo	M	60,22308	24,67685
R55	<i>r. pokřovní</i>	1.7.2010	Bembole, Espoo	M	60,22308	24,67685
R56	<i>r. zpěvný</i>	1.7.2010	Bembole, Espoo	M	60,22308	24,67685
R57	<i>r. zpěvný</i>	1.7.2010	Bembole, Espoo	F	60,22308	24,67685
R58	<i>r. zpěvný</i>	2.7.2010	Vantaa	F	60,27727	24,94613
R59	<i>r. zpěvný</i>	2.7.2010	Vantaa	M	60,27727	24,94613
R60	<i>r. zpěvný</i>	2.7.2010	Vantaa	M	60,27727	24,94613

R61	<i>r. obecný</i>	2.7.2010	Espoo, Kurttila	M	60,1731	24,58228
R62	<i>r. obecný</i>	2.7.2010	Espoo, Kurttila	M	60,1731	24,58228
R63	<i>r. obecný</i>	2.7.2010	Espoo, Kurttila	F	60,1731	24,58228
R64	<i>r. obecný</i>	2.7.2010	Espoo, Kurttila	M	60,1731	24,58228
R65	<i>r. zpěvný</i>	3.7.2010	Toikansuo, Lappeeranta	F	61,03182	28,19500
R66	<i>r. zpěvný</i>	3.7.2010	Toikansuo, Lappeeranta	M	61,03182	28,19500
R67	<i>r. pokřovní</i>	3.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,15172	28,64170
R68	<i>r. pokřovní</i>	3.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,15172	28,64170
R69	<i>r. pokřovní</i>	3.7.2010	Onnela, Korvenkyla	F	61,15172	28,64170
R70	<i>r. pokřovní</i>	3.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,15172	28,64170
R71	<i>r. pokřovní</i>	3.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,15172	28,64170
R72	<i>r. pokřovní</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,15172	28,64170
R73	<i>r. pokřovní</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,15172	28,64170
R74	<i>r. pokřovní</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,16489	28,68316
R75	<i>r. pokřovní</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	F	61,16489	28,68316
R76	<i>r. pokřovní</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,16489	28,68316
R77	<i>r. zpěvný</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,16489	28,68316
R78	<i>r. zpěvný</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	F	61,16489	28,68316
R79	<i>r. pokřovní</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	F	61,16489	28,68316
R80	<i>r. zpěvný</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,16489	28,68316
R81	<i>r. zpěvný</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	F	61,16489	28,68316
R82	<i>r. pokřovní</i>	4.7.2010	Onnela, Korvenkyla	M	61,16489	28,68316
R83	<i>r. pokřovní</i>	5.7.2010	Toikansuo, Lappeenranta	F	61,03926	28,19017
R84	<i>r. pokřovní</i>	5.7.2010	Toikansuo, Lappeenranta	M	61,03926	28,19017
R85	<i>r. pokřovní</i>	5.7.2010	Toikansuo, Lappeenranta	M	61,03926	28,19017
R86	<i>r. obecný</i>	7.7.2010	Pernavilen, Baggnas	M	60,48076	25,92955

*Samice (F), samec (M)*

*GPS souřadnice: zeměpisná šířka (N), zeměpisná délka (E)*