

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Bc. Barbora Křístková

Kandidátní geny pro behaviorální adaptace u tropických a temperátních ptáků

Candidate genes for behavioural adaptations in tropical and temperate birds

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Pavel Munclinger, Ph.D.

Praha, 2019

Abstrakt

Využití kandidátních genů se stalo velmi rozšířeným přístupem při studiu behaviorálních adaptací. Funkce genu bývá často zachována i u velmi vzdálených evolučních linií. Díky tomu nám tento přístup umožňuje rozšíření znalostí i o druzích, které nejsou využívány jako modelové a tedy u nich není zmapován celý genom. Ve své práci jsem se zabývala vlivem selekce na kandidátní geny behaviorálních adaptací spojených především s biorytmy. Zajímalo mě porovnání genetické variability mezi blízce příbuznými druhy pěvců z tropické a temperátní zóny. Tato prostředí se liší především ve stabilitě podmínek. Tropické druhy žijí ve velmi stabilních podmínkách s celkově nízkou sezónností, na rozdíl od druhů temperátních. Právě kvůli střídání krátkých období s příznivými podmínkami a obdobími nepříznivými, dochází u temperátních druhů k migraci a její načasování je pro tyto druhy životně důležité. Předpokládala jsem tedy snížení genetické variability u migrujících druhů temperátní zóny, oproti druhům tropickým, v důsledku stabilizující selekce. Studie je založena na analýzách mikrosatelitových lokusů v oblasti exonů. Z důvodu možného snížení genetické variability z jiných příčin je do studie zapojena i kontrolní analýza neutrálních mikrosatelitů, u kterých nepředpokládáme vliv selekce. U tropických druhů jsem našla sníženou genetickou variabilitu neutrálních mikrosatelitů. A možná i z toho důvodu, jsem nenašla hledaný vztah genetické variability kandidátních genů u temperátních druhů. V druhé části práce jsem se zabývala dvěma poddruhy hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*) a vztahem jeho genotypu a různými migračními trasami. Předpokládala jsem genetickou diferenciaci v genech spojených s migračním chováním. Tento předpoklad se nepotvrdil a v mé studii se ukázalo, že tyto dva poddruhy (*C. e. erythrinus* a *C. e. kubanensis*) nejsou významně geneticky diferencované v kandidátních genech.

Klíčová slova: biorytmy, migrace, kandidátní geny, mikrosatelity, neutrální mikrosatelity, *Linurgus olivaceus*, *Crithagra burtoni*, *Oreocossypha isabellae*, *Muscicapa adusta*, *Passer griseus*, *Turdus pelios*, *Sylvia abyssinica*, *Bradypterus lopezi*, *Chloris chloris*, *Serinus serinus*, *Erithacus rubecula*, *Ficedula albicollis*, *Passer domesticus*, *Turdus merula*, *Sylvia atricapilla*, *Locustella luscinioides*

Abstract

The use of candidate genes has become a widespread approach in the study of behavioral adaptations. Gene function is often maintained in very distant evolutionary lines. This approach allows us to extend knowledge about non-model species. I studied the influence of selection on candidate behavioral adaptation genes associated mainly with biorhythms. I was interested in comparing genetic variability between closely related species of songbirds from tropical and temperate zones. These environments differ mainly in the conditions stability. Tropical species live in very stable conditions with generally low seasonality, unlike temperate species. Timing of events of circannual cycle of temperate birds is essential because of the alternating of conditions of the environment. I therefore assumed a reduction in genetic variability in migrating temperate zone species compared to tropical species due to stabilizing selection. The study is based on analyzes of microsatellite loci in the exon region. I involved analysis of neutral microsatellites as a control for possible genetic variability reduction coming from different reasons than selection. Neutral microsatellites are expected to not be influenced by selection. In tropical species I found reduced genetic variability of neutral microsatellites. That might be the reason I did not find the desired relationship of genetic variability of candidate genes in temperate species. In the second part of the thesis I dealt with two subspecies of the Red Bullfinch (*Carpodacus erythrinus*) and the relationship of its genotype and different migration routes. I assumed genetic differentiation in genes associated with migration behavior. This assumption has not been confirmed and my study has shown that these two subspecies (*C. e. Erythrinus* and *C. e. Kubanensis*) are not significantly genetically differentiated in candidate genes.

Key words: biorhythms, migration, candidate genes, microsatellites, neutral microsatellites, *Linurgus olivaceus*, *Crithagra burtoni*, *Oreocossypha isabellae*, *Muscicapa adusta*, *Passer griseus*, *Turdus pelios*, *Sylvia abyssinica*, *Bradypterus lopezi*, *Chloris chloris*, *Serinus serinus*, *Erithacus rubecula*, *Ficedula albicollis*, *Passer domesticus*, *Turdus merula*, *Sylvia atricapilla*, *Locustella luscinioides*.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto 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.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, uvedených v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu univerzity.

V Praze dne: 12. 8. 2019

Barbora Křístková

Poděkování

Ráda bych poděkovala především Pavlu Munclingerovi. Za jeho neocenitelné rady, skvělé vedení a hlavně za nekonečnou trpělivost. Dále bych ráda poděkovala Tomáši Albrechtovi, Tereze Králové a Ondrovi Kauzálovi za poskytnutí vzorků. Děkuji také své rodině, která mě celou dobu velmi podporovala.

Tato práce vznikla za podpory grantů GAČR GB14-36098G a GAČR 17-24782S.

Obsah

Biologické rytmy	7
Vnitřní cirkadiánní systém	9
Sledování genů pro behaviorální adaptace u volně žijících druhů	13
Migrační trasy hýla rudého <i>Carpodacus erythrinus</i>	17
Cíle práce	20
Materiál a metodika	21
Studované druhy ptáků	21
Izolace DNA	32
Analýza mikrosatelitových lokusů	32
Analýza mikrosatelitových lokusů	36
Analýza molekulárních dat	36
Bayesiánská „admixture“ analýza	37
Fst a AMOVA.....	37
Výsledky.....	38
Kontrolní analýza neutrálních mikrosatelitů	38
CLOCK	39
NPAS2	41
CREB1	43
SERT	45
ADCYAP1.....	47
Randomizační testy	49
<i>Carpodacus erythrinus</i>	52
Shrnutí výsledků	56
Diskuze	58
Diverzita tropických a temperátních druhů	58
Frekvence alel.....	58
Snížená variabilita tropických druhů	60
<i>Carpodacus erythrinus</i>	61

Biologické rytmy

Biologické rytmy nacházíme téměř u všech žijících organismů (Dunlap, 1999). Dvěma základními cykly, které rozlišujeme, jsou cykly cirkadiánní a cirkanuální. Cirkadiánní cyklus má přibližně 24 hodin, je to tedy cyklus denní. Termín „cirkadiánní“ zavedl Američan F. Halberg přibližně v polovině minulého století. Zdá se, že na základě zkušenosti s vnější periodicitou, vzniká periodicitu vnitřní (označuje se jako „ τ “), vznikají tedy jakési vnitřní biologické hodiny, které predikují denní změny prostředí a umožňují organismům předvídatavě reagovat na změny ve svém okolí (C. Pittendrigh, 1993). Díky vnitřní periodicitě se u organismů například střídají doby klidu a aktivity (Shaw et al., 2000) a živočichové tak mohou získat výhodu při rozmnožování, obraně nebo hledání potravy.

K synchronizaci s vnějším prostředím slouží časovač, který je často v literatuře označován jako „Zeitgeber“. V temperátní zóně, kde dochází ke střídání ročních období, může sloužit jako Zeitgeber délka dne, která se během roku výrazně mění. U druhů žijících v oblasti rovníku, kde nejsou rozdíly v délce dne během roku významné, slouží k synchronizaci nejspíše čas východu a západu slunce (Goymann et al., 2012). Dalším možným vnějším faktorem, který mohou druhy na rovníku využívat k synchronizaci vnitřních hodin je intenzita světla, která se liší v dobách sucha a dešťů (Gwinner & Scheuerlein, 1998). Reakce na délku dne může probíhat díky systému, který je citlivý na světlo. Reakce na světelný signál se liší v různých částech dne. Během dne nedochází k žádné reakci. Při světelném signálu během časné fáze noci dochází k opoždění rytmů, zatímco pokud se takový signál objeví k ránu, dochází k předbívání cyklu. Tento systém slouží k synchronizaci s měnícími se vnějšími podmínkami (Panda et al., 2002).

Díky fungování vnitřních hodin a jejich synchronizací může u organismů vznikat i cyklus cirkanuální. Cirkanuální cyklus trvá přibližně jeden rok a faktory, které ho kontrolují, můžeme rozdělit na proximátní a ultimátní. Ultimátním faktorem ovlivňujícím roční cyklus ptáků je sezónnost prostředí. Proximátním faktorem, kontrolujícím roční cykly nejen u ptáků, se zdá být endogenní kontrolní systém. Jeho existence byla dokázána díky studiím na ptácích držných v zajetí, kteří i v pozmeněných světelných podmínkách vykazovali přirozený rytmus (Newton, 2007). Tento endogenní rytmus ovlivňuje morfologii, fyziologii i chování daného jedince (Wikelski et al., 2008). K hlavním projevům cirkanuálního cyklu u ptáků patří migrace, rozmnožování a pelichání, které jsou navíc spolu pevně časově provázány. Tyto projevy jsou navíc druhově specifické, byť mezi druhy často dochází k překryvům.

V mé práci se zabývám tropickými a temperátními ptačími druhy u kterých se cirkanuální rytmus a životní strategie velmi liší. Tropické druhy žijí v prostředí se stabilnějšími podmínkami. Potrava je dostupná, ale ne příliš hojná po celý rok. Klimatické podmínky jsou často stálé bez výrazných výkyvů. Díky stálosti prostředí mohou ptáci zůstat celý rok na jednom místě a nejsou nuceni podnikat dlouhé cesty. Se stálostí prostředí souvisí i životní strategie. Tropičtí ptáci jsou dlouhověcí, s pomalejším životním tempem. Mají menší snůšky a často hnízdí vícekrát do roka. V temperátní oblasti se střídají příznivá období hojnosti potravy s obdobími nedostatku a nepříznivých klimatických podmínek. Temperátní druhy během těchto krátkých příznivých období hnízdí a zbytek roku tráví v oblastech s mírnějším podnebím. Kvůli této životní strategii jsou temperátní druhy spíše krátkověcí, mají větší snůšky a rychlejší životní tempo (Hořák et al., 2015; Stutchbury et al., 2001).

Období nadbytku potravy je většinou velice krátké a rozmnožování i migrace jsou energeticky velice náročné. Z tohoto důvodu je načasování migrace zásadní a závisím na něm úspěšnost celého hnízdění. Proto je přesné načasování cirkanuálního rytmu u temperátních druhů ptáků životně důležité.

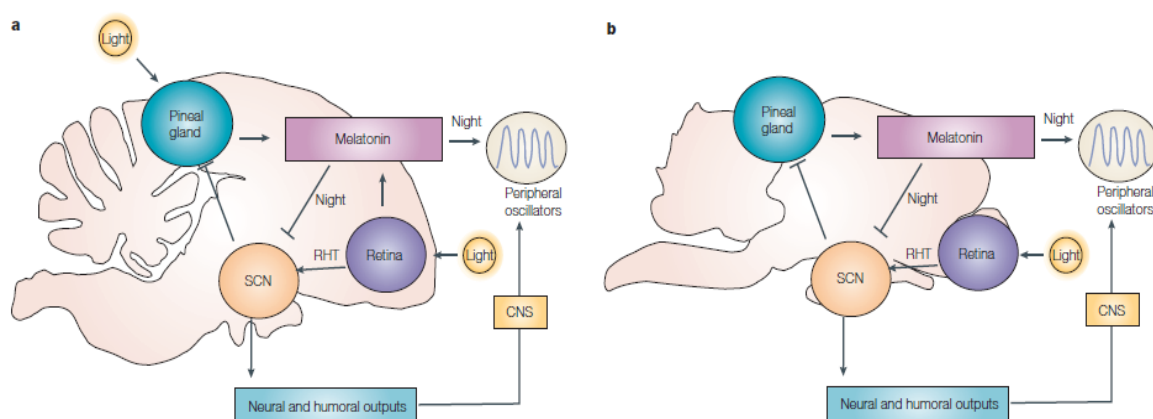
Každoroční cykly se mohou lišit i vnitrodruhově. Například u vlaštovky obecné (*Hirundo rustica*) bylo prokázáno přepeřování u jižních populací, tedy migrantů na krátkou vzdálenost nebo rezidentních jedinců, od června až do srpna po dokončení hnízdění. Naopak u severních populací, které migrují na dlouhé vzdálenosti, dochází k přepeřování až po přiletu na zimoviště, tedy od září do října. Rozdíly v načasování pelichání můžeme najít i uvnitř jedné populace, například mezi pohlavími. Taková situace může vzniknout například u druhů, kde se o mláďata stará jen jeden rodič nebo jeden z rodičů opouští mladé dříve (Newton, 2007).

Vnitřní cirkadiánní systém

Vnitřní cirkadiánní systém je komplex spolupracujících fotoreceptorů a oscilátorů. Oscilátorem může být buňka nebo nějaká tkáň, která je schopná tvořit inhibiční zpětnovazebnou smyčku, díky které udává rytmus a je schopná tento rytmus přizpůsobit (urychlením nebo opožděním cyklu) změnám podmínek (Friesen & Block, 1984). Inhibiční zpětná smyčka je proces, kdy limitní množství nějakého produktu v organismu inhibuje vlastní produkci. Fotoreceptory jsou buňky citlivé na světlo, které umožňují oscilátorům optimalizovat rytmus vnitřních hodin s oscilacemi vnějšího prostředí. Hlavními oscilátory jsou pineální žláza (epifýza, šišinka), suprachiasmatické jádro (SCN) a sítnice.

Suprachiasmatické jádro je párový orgán, nacházející se v hypotalamu nad oblastí, kde dochází ke křížení očních nervů (optické chiasma) (Bell-pedersen et al., 2005). Důležité fotoreceptory se nachází v oku, pineální žláze a v některých částech mozku (McMillan et al., 1975; Cassone & Menaker, 1984; Hirunagi, 1998;). Kromě mozku se oscilátory nacházejí asi také ve všech orgánech a buňkách a jejich systém je hierarchický. Oscilátory v periferních tkáních jsou řízeny pacemakerem (udává rytmus) nacházejícím se v suprachiasmatickém jádru (Honma, 2018). Pacemaker je schopen udávat rytmus, ke kterému byl synchronizován světelným signálem, i když je organismus poté dlouhodobě vystaven konstantní tmě (C. S. Pittendrigh, 1967).

Zatímco u savců je hlavním komponentem řídícím synchronizaci vnitřních hodin suprachiasmatické jádro (Buhr & Takahashi, 2013), u ptáků je hlavním orgánem zodpovědným za synchronizaci vnitřních hodin pineální žláza (Zimmerman & Menaker, 1979). Systém pacemakerů je u ptáků mnohem komplexnější než u savců díky ptačím extraokulárním fotoreceptorům. U savců došlo ke ztrátě extraokulárních fotoreceptorů zřejmě kvůli předkům, kteří byli soumráční a intenzita světla při východu a západu slunce nebyla dostatečná pro tento typ fotoreceptorů. U ptáků je suprachiasmatické jádro tvořeno dvěma částmi, vizuální a mediální částí. Na obrázku č. 1 můžeme vidět znázornění ptačího mozku a důležitých částí řídících cirkadiánní rytmus (pineální žláza, sítnice a SCN – pro zjednodušení jako jedna část). Tyto části jsou pacemakery, které spolupracují a vytvářejí stabilní rytmus. Význam pineální žlázy a sítnice se liší mezi druhy. U pěvců SCN aktivuje během dne a inhibuje produkci melatoninu v pineální žláze, takže k jeho produkci dochází pouze v noci. Melatonin skrze speciální receptory tlumí aktivitu v SCN a ovlivňuje i ostatní oscilátory v periferních tkáních, které jsou na melatonin citlivé. U savců se organizace od ptačí liší počtem komponent, které řídí tento systém. U savců slouží jako pacemaker pouze SCN, které je řízeno signálem ze sítnice, který je předáván do SCN retinohypotalamickým traktem. SCN přímo řídí sekreci melatoninu. (Bell-pedersen et al., 2005).



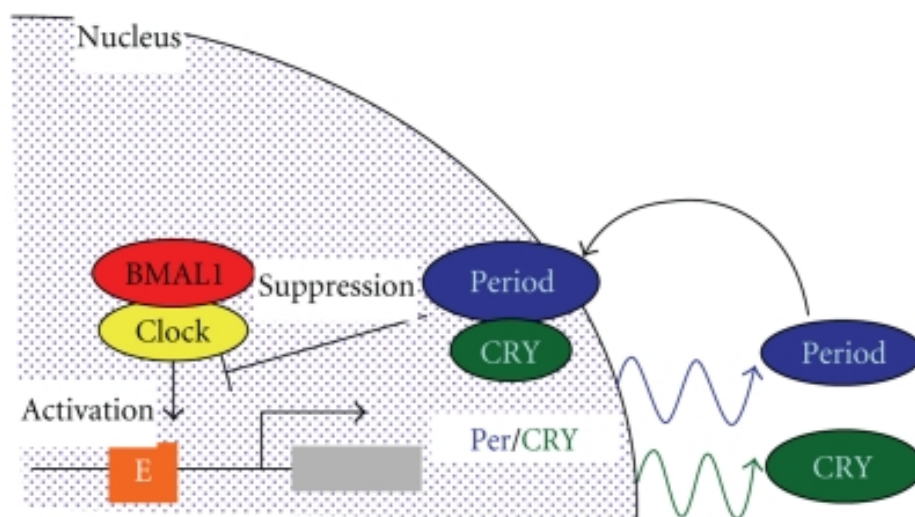
Obr. 1: Srovnání organizace cirkadiálních hodin u ptáků a savců. Na obrázku vidíme zjednodušený model mozku a důležitých částí, které se účastní řízení tohoto systému. sítnice = retina; pineal gland = pineální žláza; light = světelný signál; RHT = retinohypotalamický trakt; neuronal and humoral outputs = neurální a chemický signál; night = noc. Obrázek byl převzat z práce Bell-pedersen et al., (2005)

Při studiu biologických rytmů u volně žijících živočichů se často využívá kandidátních genů. Kandidátní geny jsou takové geny, jejichž funkce byla objevena u modelových druhů, a díky tomu, že funkce genu bývá často zachována i u evolučně vzdálených linií, můžeme předpokládat totožnou či podobnou funkci u méně prozkoumaných druhů (Fitzpatrick et al., 2005).

Cirkadiální rytmy jsou řízeny celou řadou genů a jsou udržovány pomocí negativní zpětnovazebné smyčky (Obr. 2) (Reppert & Weaver, 2002). Mezi takové geny patří například Clock, Bmal1 a další (např.: Bell-pedersen et al., 2005; Gekakis et al., 2012). Clock geny ptáků jsou ortology savčích clock genů (Bailey et al., 2003), tedy pocházejí od společného předka. V mé studii jsem se věnovala čtyřem kandidátním genům, o kterých se předpokládá, že souvisejí s biorytmy, CLOCK, NPAS2, ADCYAP1 a CREB. Tyto geny byly vybrány, protože sekvence jejich exonů obsahují mikrosatelitový lokus. Mikrosatelit (=short tandem repeats – STRs; simple sequence repeats - SSRs) je krátký úsek repetitivní DNA sekvence, ve které se pravidelně opakuje motiv 1-6 párů bází (Toth et al., 2000). Takový úsek DNA je náchylný k častým mutacím z důvodu sklouzávání DNA při replikaci (Tachida & Iizuka, 1992). Kvůli výskytu v protein kódující části sledovaných genů se jednoduchým prodloužením nebo zkrácením sekvence může výrazně ovlivnit výsledný produkt (Li et al., 2004).

CLOCK gen kóduje protein ze skupiny bHLH-PAS (basic helix-loop-helix s PAS doménou), který funguje jako transkripční faktor (Kewley et al., 2004). Spolu s proteinem BMAL1 tvoří heterodimer, který je vysoce selektivní na CACGTG sekence. Tyto heterodimery po navázání na e-box spouští transkripci tří *period* genů (mPer1-mPer3) a dvou genů pro kryprochromy (mCry1 a mCry2). E-box (=

enhancer box) je řídicí sekvence DNA s vazebným místem pro aktivační protein. V mnoha tkáních usnadňuje transkripci (Alberts et al., 1998). Výsledné mPer a mCry proteiny se po navrácení do jádra chovají jako negativní regulátory. Navázáním na Clock nebo BMAL1 inhibují transkripci (Gekakis et al., 2012). Rytmiická exprese clock genů, která je řízena světlem, tak tvoří komplexní regulační kaskády (Shigeyoshi et al., 1997; Thresher et al., 1998; Miyamoto & Sancar, 1999).



Obr. 2:

Schéma

znázorňující negativní zpětnou smyčku Clock genů. Převzato z
<https://www.hindawi.com/journals/ppar/2009/412949.fig.001.jpg>

Pokusy na CLOCK-deficientních myších odhalily, že přítomnost CLOCK proteinu není zásadní pro fungování cirkadiálních rytmů v suprachiasmatickém jádru. Díky tomu byl odhalen vliv genu NPAS2. Tento gen může zastoupit funkci CLOCK genu jak v suprachiasmatickém jádru, tak i v periferních tkáních (DeBruyne et al., 2007; Bertolucci et al., 2008;).

Dalším kandidátním genem zkoumaným v souvislosti s biologickými rytmy je CREB. Tento gen má vliv na dlouhodobou paměť a schopnost učit se (Carlezon Jr. et al., 2005). CREB hraje roli při předávání informace o světelných podmínkách do CSN, čímž napomáhá načasování cirkadiálních hodin a sladění vnitřních hodin s oscilací světla. Neví se však, jakým přesně způsobem CREB ovlivňuje cirkadiální rytmus (Lee et al., 2010). Fosforylace na Ser142 místě tohoto genu je spojována s posunem fáze denního cyklu na základě světelného impulzu během noci (Gau et al., 2002).

ADCYAP1 gen kóduje Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ADCYAP1>), který je lokalizovaný v sítnici a ve spojení se světelným signálem napomáhá synchronizovat cirkadiální rytmus (Nagy & Csernus, 2007).

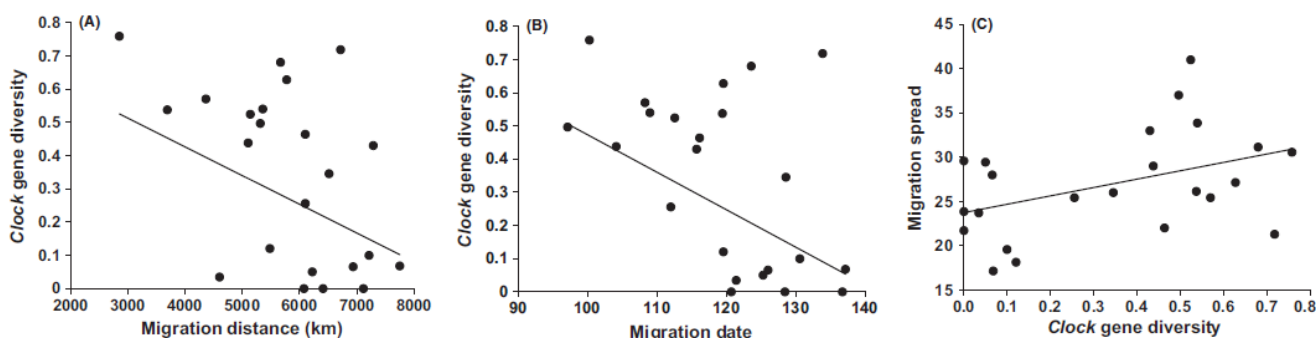
PACAP slouží jako komunikace mezi retinohypotalamickým traktem (RHT) a SCN. Správnou stimulací RHT dokáže PACAP zvýšit v suprachiasmatickém jádru produkci cAMP. (Hannibal et al., 1998) Zvýšená koncentrace PACAP ovlivňuje zrychlení metabolismu, zvýšení tělesné teploty, metabolismus tuků a dokonce inhibuje příjem potravy (Tachibana et al., 2003; Tachibana et al., 2007). Tyto jevy bývají spojovány s migrací na dlouhou vzdálenost (Berthold, 1996). V přítomnosti PACAP dochází k redukcí genové exprese Clock a Cry1 genů (Nagy & Csernus, 2007) čímž může být výrazně ovlivněn cirkadiánní rytmus.

Dalším genem, který jsem zahrnula do své studie je SERT, který sice zřejmě přímo nesouvisí s cirkadiánními rytmy, ale souvisí také s chováním jedinců. Jeho sekvence navíc také obsahuje mikrosatelit, což umožňuje snadno sledovat tento gen spolu s výše uvedenými geny. SERT kóduje serotoninový transportér, který je součástí signální kaskády v centrální nervové soustavě (Canli & Lesch, 2007). Tento gen je hodně studován u lidí ve vztahu k depresím a úzkostnému chování (Lesch et al., 1996; Homberg & Lesch, 2011). Polymorfismus v tomto genu byl spojen i s agresivním chováním (Quadros et al., 2010).

Sledování genů pro behaviorální adaptace u volně žijících druhů

U volně žijících druhů ptáků se z celkem pochopitelných důvodů (například nemožnost laboratorních experimentů v kontrolovaných podmínkách) výzkum kandidátních genů spojených s chováním včetně projevů ovlivněných cirkarduálními cykly většinou omezuje na asociační studie, tedy na zjištění, zda je výskyt určitých alel spojen s konkrétním fenotypickým projevem, například specifickým chováním. K takovým projevům patří například načasování migrace... Je třeba zdůraznit, že pro identifikaci alel se většinou využívají markery založené na výskytu mikrosatelitů v kódující sekvenci genů. Pod alelou si tedy musíme představit pouze různou délku amplifikovaných PCR produktů. Přestože může mít vliv i samotný mikrosatelitový lokus, funkční význam může mít samozřejmě i část alely mimo mikrosatelitový lokus, nicméně mimo mikrosatelitový lokus zůstává sekvence alely většinou neznámá. Můžeme pouze předpokládat, že varianty jsou ve vazbě s mikrosatelitovými alelami konkrétních délek.

Variabilita zkoumaných lokusů se výrazně lišila. ADCYAP1 lokus byl u většiny druhů výrazně polymorfní (počet alel vyšší než 10) a s vysokou mírou heterozygotnosti. Výjimkou byly dva druhy. Slavík obecný (Saino et al., 2015) a káně lesní (*Buteo buteo*), u které byly objeveny pouze 3 alely (Chakarov et al., 2013). CLOCK lokus byl oproti ADCYAP1 lokusu výrazně méně variabilní (Bazzi et al., 2016a) a u káně lesní byl tento lokus dokonce monomorfní, tedy byl zastoupen pouze jednou alelou (Chakarov et al., 2013). Diverzita ADCYAP1 lokusu se nezdála být ovlivněná příbuzností druhů. Zatímco CLOCK lokus vykazoval podobnější diverzitu u příbuzných druhů ptáků (Bazzi et al., 2016a) u ryb tento vztah neplatil (O'Malley et al., 2010). Snížená diverzita v CLOCK lokusu byla spojena s delšími migračními trasami, opožděnou jarní migrací přes Středozemní moře a sníženým migračním rozptylem (graf č. 1). Zdá se tedy, že u druhů táhnoucích na dlouhé vzdálenosti je načasování událostí ročního cyklu pevněji naprogramované. CLOCK lokus by tedy mohl být pod vlivem stabilizující selekce, která by měla zajistit včasný přilet na hnízdiště vzdálené tisíce kilometrů (Bazzi et al., 2016a).



Graf 1: Diverzita CLOCK genu v závislosti na (A) migrační vzdálenosti, (B) datu migrace (1- 1.ledna) a (C) migračnímu rozptylu. Převzato z Bazzi et al., (2016a).

U slavíka modráčka (*Luscinia svecica*) byla nalezena výrazně nižší variabilita CLOCK lokusu oproti sýkoře modřince (*Cyanistes caeruleus*) (Johnsen et al., 2007). Modřinka je druh částečně migrující na krátké vzdálenosti (Nilsson et al., 2008), kdežto slavík modráček je druh zimující od Španělska až do Indie (Lislevand et al., 2015; Arizaga et al., 2016;). Tedy by se dalo předpokládat na základě předešlé studie, že selekce bude působit na tento lokus u jedinců migrujících na dlouhou vzdálenost. V porovnání s diverzitou neutrálních mikrosatelitů ovšem nebyl takový vliv patrný (Johnsen et al., 2007). Neznáme areál zimoviště zkoumaných jedinců slavíka modráčka. Nesnížená diverzita v tomto lokusu tedy může být způsobená tím, že zkoumaní jedinci mohli patřit k populacím zimujícím v Evropě, nebo na severu Afriky.

Často pozorovanou patrností v distribuci alel zkoumaných genů byl latitudinální gradient. Nejčastěji spojovaným genem s latitudinálním gradientem byl CLOCK. (Johnsen et al., 2007; O'Malley & Banks, 2008; O'Malley, Ford, & Hard, 2010; Bazzi et al., 2016a). Latitudinální gradient by mohl vznikat přirozenou selekcí a reagovat na rozdílné fotoperiodické podmínky daných oblastí. Rozdíly v délkách dne se budou lišit u severnějších areálů s vyšší mírou sezónnosti oproti areálům jižnějším (O'Malley & Banks, 2008; Lemay & Russello, 2014; Bazzi et al., 2016a). U lososů došlo dokonce k fixaci jedné CLOCK alely u populace žijící na Aljašce (Lemay & Russello, 2014). Latitudinální gradient délek CLOCK alel nebyl nalezen u slavíka modráčka, lososa kety, vlaštovky obecné a pěti druhů vlaštovek rodu *Tachycinetta* (Johnsen et al., 2007; O'Malley et al., 2010; Dor et al., 2011; Bourret & Garant, 2015). Latitudinální gradient byl nalezen i u ADCYAP1 lokusu. U lesňáčka mnišího (*Cardellina pusilla*) stoupala délka alely ADCYAP1 lokusu s latitudou hnízdního areálu, ale pouze u severních populací migrujících na dlouhé vzdálenosti (Bazzi et al., 2016).

Vliv zkoumaných genů na načasování různých událostí ročního cyklu byl velice nekonzistentní a často byl spojován s dalšími proměnnými faktory. Nejčastěji a shodně popisovaný vztah mezi načasováním a genotypem byl nalezen u několika druhů vlaštovek. Vzácná, delší alela (Q8) byla nalezena u jedinců, kteří vykazovali zpoždění migrace a tedy i hnízdění. Tato alela znamenala v letech s normálním průběhem sezóny značnou nevýhodu. Docházelo ke snížení hnízdní úspěšnosti kvůli pozdnímu hnízdění. Důvodem přetrvávání této nevýhodné alely v populaci může být její adaptivní výhoda v letech, kdy se kvůli vnějším vlivům opozdí hnízdní sezóna (Dor, Cooper, et al., 2011; Dor, Lovette, et al., 2011; Caprioli et al., 2012; Saino et al., 2013; Bazzi et al., 2015; Bourret & Garant, 2015). Samice sýkor modřinek s kratší alelou hnízdili dříve a vykazovali vyšší hnízdní úspěšnost.

(Liedvogel et al., 2009) Tento výsledek může ukazovat přímý vliv CLOCK genu na úspěšnost jedince, který díky včasnému přiletu na hnízdiště může například stihnout obsadit a využít nejlepší potravní zdroje. Ačkoliv v mnoha studiích nebyl vliv ADCYAP1 lokusu na načasování migrace prokázán (Saino et al., 2015; Bazzi et al., 2016b; Bazzi et al., 2017; Contina et al., 2018), zdá se, že do určité míry ho ovlivňuje. V další studii se tento vztah projevil pouze ve spojení s další proměnnou. U samic pěnic černohlavých byly delší alely spojeny s dřívějším přiletem na hnízdiště, ale pouze ve vazbě s fenotypem špičatějšího křídla. Za předpokladu spolehlivosti fenotypu křídla, jakožto ukazatele migrační vzdálenosti, platilo následující pravidlo. Migranti na delší vzdálenosti byli nositeli delších alel a vyznačovali se dřívějším přiletem na hnízdiště (Mettler et al., 2015). U trvale sedentárního druhu racka středomořského (*Larus michahellis*) nebylo datum hnízdění ovlivněnou délkou žádné z alel lokusů ADCYAP1, Clock ani NPAS2. (Romano et al., 2018) U stálého druhu mohou na načasování rozmnožování mít vliv hlavně environmentální podmínky, na které je jedinec schopen okamžitě reagovat a není potřeba silnější genetická kontrola. Protichůdné výsledky se objevili i u SERT lokusu v souvislosti s fenotypem spojeným s biorytmy. Ačkoliv se nepotvrdil vliv tohoto lokusu na migrační aktivitu u pěnice černohlavé (Jakob C. Mueller et al., 2011), u koňadry byl objeven vliv SERT lokusu na načasování hnízdění a počet mláďat v jedné snůšce. (Timm et al., 2018) Vliv tohoto lokusu na počet mláďat může souviset s vlivem na odvážné a explorační chování. Takové chování může zvyšovat konkurenceschopnost jedince a tedy zvyšovat šanci dokrmení více mláďat v jedné snůšce. Zároveň dřívější načasování hnízdění může usnadnit získání lepších potravních zdrojů nebo lepšího teritoria.

SERT gen byl kromě vlivu na chod biorytmů spojen i s exploračním chováním a schopností kolonizovat nový habitat. Tento vztah se projevil u kosů černých (*Turdus merula*) a sýkor koňader (*Parus major*) (J. C. Mueller et al., 2013; Timm et al., 2018). Naopak u rákosníka seychelského (*Acrocephalus sechellensis*) se spojení tohoto lokusu a exploračního chování nepotvrdilo (Edwards et al., 2015). Rozdílný výsledek může být způsoben mezidruhovými rozdíly, nebo skrytým epigenetickým vlivem.

Významným epigenetickým vlivem by mohla být i metylace zkoumaných genů. Metylace může významně ovlivňovat expresi genů a celkový běh endogenních hodin. (Azzi et al., 2014) Významný vliv metylace na fenologii ročního cyklu byl objeven u savců (Stevenson & Prendergast, 2014). Vliv míry metylace CLOCK genu na časování migrace u vlaštovek obecných potvrdil Saino et al. (2017). U koňader byl míra metylace SERT lokusu ovlivňovala schopnost kolonizovat nové, urbánní oblasti (Riyahi et al., 2015).

Výsledky studií zabývajících se vztahem konkrétních alel kandidátních genů a chování jsou ve výsledcích velmi nekonzistentní a liší se jak mezi druhy, tak vnitrodruhově a dokonce i mezi

pohlavími. Slibnější cestou než je sledování asociací konkrétních alel a chování se zdá být sledování variability konkrétních lokusů u druhů či populací s odlišným chováním.

Načasování ročního cyklu je u ptáků životně důležité, obzvláště u druhů, které podnikají každoroční migrace na hnízdiště, která mohou být vzdálená i tisíce kilometrů. Špatné načasování může znamenat neúspěšnost hnízdění, ale i smrt daného jedince. Proto předpokládáme vliv stabilizující selekce u genů, které jednotlivé události řídí. Stabilizující selekce upřednostňuje průměrný fenotyp a z populace odstraňuje extrém. V populaci snižuje genetickou variabilitu. Tímto mechanismem by mělo docházet k optimalizaci systému u všech jedinců a minimalizovat pravděpodobnost neúspěchu.

Migrační trasy hýla rudého *Carpodacus erythrinus*

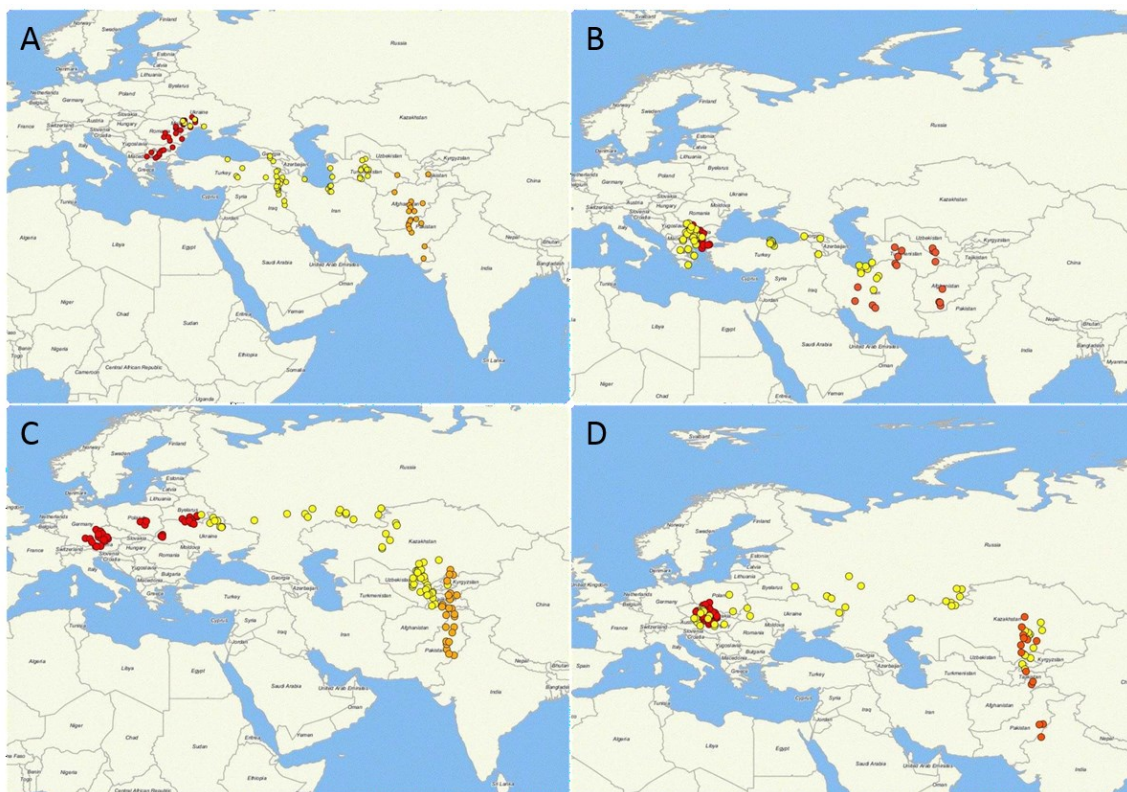
Ve své práci jsem se snažila zjistit, zda se středoevropská populace a populace z oblasti Bulharska a Turecka liší v alelách markerů pro kandidátní geny behaviorálních adaptací.



Obr. 3: Samec hýla rudého s připevněným geolokátorem ze studie Klvaňa et al., (2014)

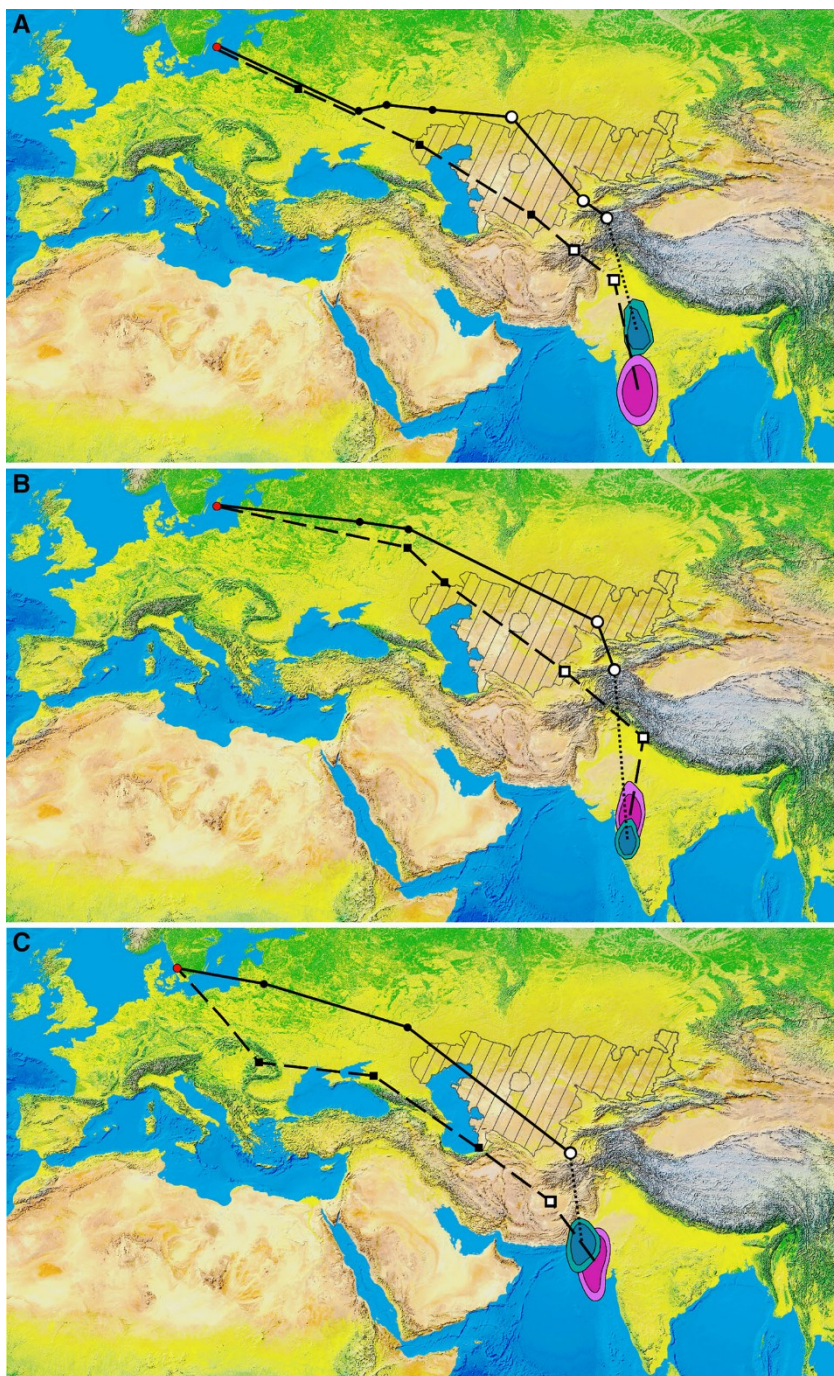
Pomocí kroužkovacích dat nebyly dlouho potvrzeny předpokládaná zimoviště hýla rudého v Indii, Nepálu a Pakistánu (Cepák et al., 2013). Až díky geolokátorovým studiím byl zjištěn průběh podzimního tahu u tohoto druhu a cílové zimoviště, které do té doby nebylo přesně známé. Zkoumaní jedinci patřili ke dvěma poddruhům hýla rudého a to *Carpodacus erythrinus erythrinus* a *Carpodacus erythrinus kubanensis*. Tyto dva poddruhy se liší nejenom morfologicky (*Cramp & Perrins, 1994; Pavlova et al., 2005) ale i geneticky. Genetická odlišnost byla zkoumána na základě mitochondriální DNA (Pavlova et al., 2005). Odchyt poddruhu *C. e. erythrinus* probíhal na Vltavském luhu na Šumavě a v meandrech Svratky na Českomoravské vysočině (Obr. 3) Odchyt poddruhu *Carpodacus e. kubanensis* probíhal v pohoří Pirin v jihozápadním Bulharsku. Získaná data z geolokátorů odhalila polohu zimoviště, které se překvapivě nelišilo u těchto dvou geograficky oddělených populací. Co se ale lišilo, byla trasa migrace. Jedinci z české populace táhli severněji, přes

Ukrajinu, Rusko a Kazachstán, zatímco bulharští jedinci táhli přes Turecko, Azerbajdžán a Írán (Klvaňa et al., 2014). (Obr. 4)



Obr. 4: Mapky znázorňující podzimní migrační cestu 4 jedinců *Carpodacus erythrinus*. Jedinci A a B patří k bulharské populaci poddruhu *C. e. kubanensis*. Jedinci C a D patří k české populaci poddruhu *C. e. erythrinus* (C – Vltavský luh, Šumava; D – Českomoravská vysočina).

Migrační trasa hýla rudého byla studována také u severních populací hnízdících ve Švédsku a na ostrově Gotland v Baltském moři. Geolokátory byly umístovány pouze na samce, protože se předpokládala vyšší pravděpodobnost jejich zpětného odchyty. Důvodem je větší míra věrnosti hnízdištím než u samic. Zpětný odchyt byl nutný pro získání dat, protože u malého druhu pěvce, je potřeba využít co nejmenších geolokátorů, které tedy nemají GPS vysílače. Díky úspěšnému odchytu tří jedinců se zjistilo, že se lišila trasa jarní a podzimní migrace. U všech jedinců se potvrdila tato patrnost. Tyto jedinci se během zimního období pohybovali mezi dvěma areály (Stach et al., 2016). (Obr. 5)



Obr. 5: Mapky znázorňující migraci tří jedinců *Carpodacus erythrinus*. Plnou čarou je znázorněna jarní migrace a přerušovanou čarou podzimní migrace. Prázdná kolečka a čtverce znamenají zastávky delší než 5 dní, plná kolečka a čtverce naopak zastávky kratší než 5 dní. Vyšrafované území označuje poušť a step v centrální Asii (Stach et al., 2016).

Cíle práce

- 1) Jaká je variabilita mikrosatelitových lokusů kandidátních genů behaviorálních adaptací u tropických a temperátních druhů pěvců?
- 2) Působí na geny spojené s behaviorálními adaptacemi stabilizující selekce u temperátních druhů ptáků?
- 3) Liší se i geneticky populace hýla rudého, které podnikají migraci různými tahovými cestami a které jsou geograficky oddělené?

Materiál a metodika

Ve své práci jsem analyzovala krevní vzorky osmi druhů tropických a devíti druhů temperátních pěvců. Krevní vzorky tropických druhů pocházely z Kamerunu, z pohoří Mt. Cameroon a Bamenda. Vzorky temperátních druhů pocházely z České republiky, Bulharska, Turecka a Německa.

Studované druhy ptáků

Studovanými druhy byly dvojice příbuzných druhů pěvců z tropické a temperátní oblasti (Tab. 1) u kterých jsem se zaměřila na rozdíl diverzity kandidátních genů. Dalším studovaným druhem byl *Carpodacus erythrinus*. U druhu *Carpodacus erythrinus* jsem zkoumala diverzitu kandidátních genů dvou poddruhů, *C. e. erythrinus* a *C. e. kubanensis*, které se vyznačují různými tahovými trasami.

Čeď	Temperátní druh	Tropický druh
Fringilidae	Chloris chloris	Linurgus olivaceus
Fringilidae	Serinus serinus	Crithagra burtoni
Muscicapidae	Erithacus rubecula	Oreocossypha isabellae
Muscicapidae	Ficedula albicollis	Muscicapa adusta
Turdidae	Turdus merula	Turdus pelios
Passeridae	Passer domesticus	Passer griseus
Sylviidae	Sylvia atricapilla	Sylvia abyssinica
Locustellidae	Locustella luscinioides	Bradypterus lopezi

Tab. 1: Dvojice srovnávaných blízce příbuzných druhů z temperátní a tropické oblasti.

Fringillidae (pěnkavovití)

Čeď se nachází v holoarktické, neotropické, Afrotropické a Orientální oblasti. Byla introdukována i do Austrálie. Zástupci této čeledi obývají téměř všechny habitaty. Většinu druhů najdeme ve smíšených lesích, polootevřené krajině, krajích lesa, ale i v parcích nebo městské zeleni. Čeď se dělí na dvě podčeledi Fringillinae a Carduelinae. V mojí práci se zabývám rody *Chloris*, *Carpodacus*, *Linurgus* a *Serinus* z podčeledi *Carduelinae* (Collar et al., 2010).

Carpodacus erythrinus (hýl rudý)



Obr. 6: *Carpodacus erythrinus* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22720556/111130806>)

Nacházíme je od nížin až po horské lesy (Obr. 6). V Evropě mohou v některých oblastech hnízdit až do 1850 m. n. m., ale většinou se vyskytují do 200 m. n. m. Hnízdí sezóna trvá od května do srpna. Hnízdí jednou za sezónu. Hýl rudý létá dlouhé vzdálenosti na zimoviště v Indii. Samci přilétají na hnízdiště dříve než samice. Většinou táhne v noci, při jarní migraci i přes den. Táhne v malých hejnech (Collar et al., 2010).

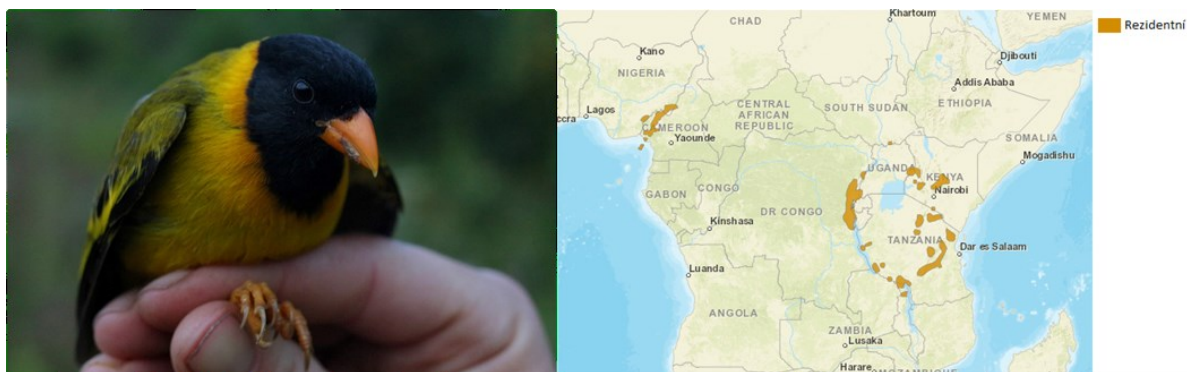
Chloris chloris (zvonek zelený)



Obr. 7: *Chloris chloris* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22720330/132000123>)

Obývá mnoho habitatů od lesní, stepní a Mediteránní zóny až po centra měst (Obr. 7). Hnízdní sezóna trvá od března do srpna. Často hnízdí dvakrát za sezónu. Zvonek zelený žije solitérně a neobhazuje teritorium. Druh je rezidentní i migrující (Collar et al., 2010; str. 541).

Linurgus olivaceus (stehlíkovec oranžovozobý)



Obr. 8: *Linurgus olivaceus* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22720319/132137365>)

Obývá spíše vyšší polohy, od 1000 m.n.m. do 3000 m.n.m. (Obr. 8). Můžeme ho najít nejčastěji v podrostu, na mýtinách a na okrajích submontánních vždy zelených lesů. Hnízdní sezóna trvá od listopadu do února. O jeho hnízdění nemáme mnoho informací. Je to rezidentní druh, který může mimo hnízdní sezónu příležitostně podnikat krátké cesty třeba do nižších poloh (Collar et al., 2010).

Serinus serinus (zvonohlík zahradní)



Obr. 9: *Serinus serinus* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22720049/132136209>)

Žije od nížin po nižší horské polohy s mozaikou jehličnatých lesů a otevřené krajiny (Obr. 9). Často se vyskytuje v sadech, na vinicích, plantážích, suburbánních parcích a zahradách od hladiny moře až do 2500 m.n.m. Hnízdí od února do začátku srpna. Mají většinou jednu snůšku, v centrální Evropě i dvě během jedné hnízdní sezóny. Druh je rezidentní i migrující. Ptáci ze střední Evropy migrují na krátkou vzdálenost - zimují na jihu Evropy (Collar et al., 2010).

Crithagra burtoni (zvonohlík tmavý)



Obr. 10: *Crithagra burtoni* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22720267/94662953>)

Žije v podrostu nižších montánních a submontánních oblastí i v otevřené krajině nebo krajině s roztroušeným stromovým porostem nad hranicí lesa (Obr. 10). V západní Africe žije v nadmořských výškách od 1370 m.n.m do 3000 m.n.m. Zvonohlík tmavý je sedentární. Hnízdí od června do prosince a od února do května (Collar et al., 2010).

Passeridae (vrabcovití)

Passer domesticus (vrabec domácí)



Obr. 11: *Passer domesticus* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/103818789/129643357>)

Passer domesticus je malým druhem pěvce, který je hodně vázaný na lidská sídla. (Obr. 11) Preferuje suburbánní lokality, kde žijí v největších denzitách. Hnízdí od února do září, délka hnízdní sezóny závisí na latitudě. Většinou je rezidentní, nebo slétá do nižších poloh mimo hnízdní sezónu (Summers-Smith, 2009).

Passer griseus (vrabec šedohlavý)



Obr. 12: *Passer griseus* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22718230/132116025>)

Vrabec šedohlavý žije v západní Africe. (Obr. 12) Vyskytuje se hlavně v kulturní krajině, ale také v savaně a řídkých lesích. Obývá nížinné polohy do 2500 m.n.m. Hnízdní sezóna je rozložena do celého roku, ale je ovlivněna obdobími dešťů. Hnízdí ve volných koloniích, výjimečně soliterně. Mimo hnízdění se pohybuje krajinou nomádním způsobem (Summers-Smith, 2009).

Muscicapidae (lejskovití)

Tato čeleď je nejvíce rozšířená v Evropě, Africe a Asii. Největší diverzitu má v Asii. Evropské druhy jsou migrující a většina létá do západní Afriky. Africké druhy jsou sedentární (Taylor & Clement, 2006).

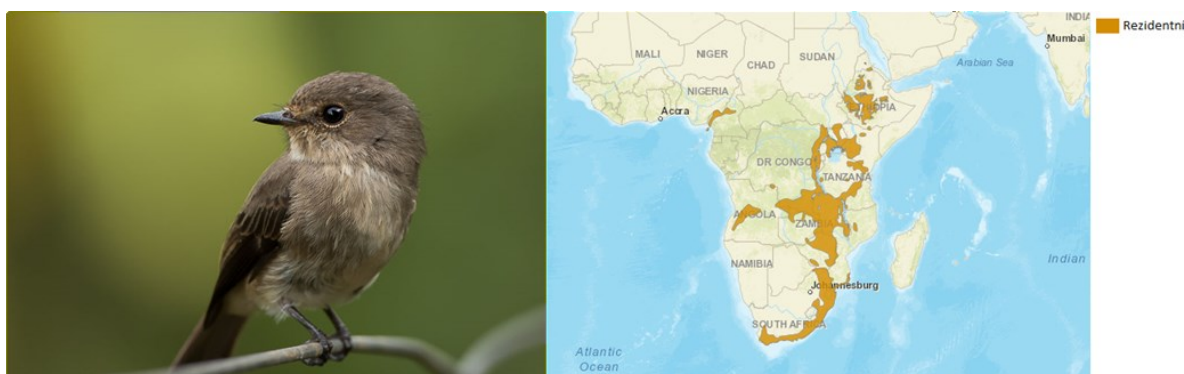
Ficedula albicollis (lejsek bělokrký)



Obr. 13: *Ficedula albicollis* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22709315/111054869>)

Žije na okrajích lesa, v otevřených, vlhkých lesích i v otevřené krajině s roztroušenými stromy, sadech a zahradách (Obr. 13). Preferuje listnaté lesy. Ve střední Evropě hnízdí od dubna do začátku července. Zimuje v Kongu, Tanzánii, Zambii, Malawi, Zimbabwe a Mozambiku (Taylor & Clement, 2006; str. 130).

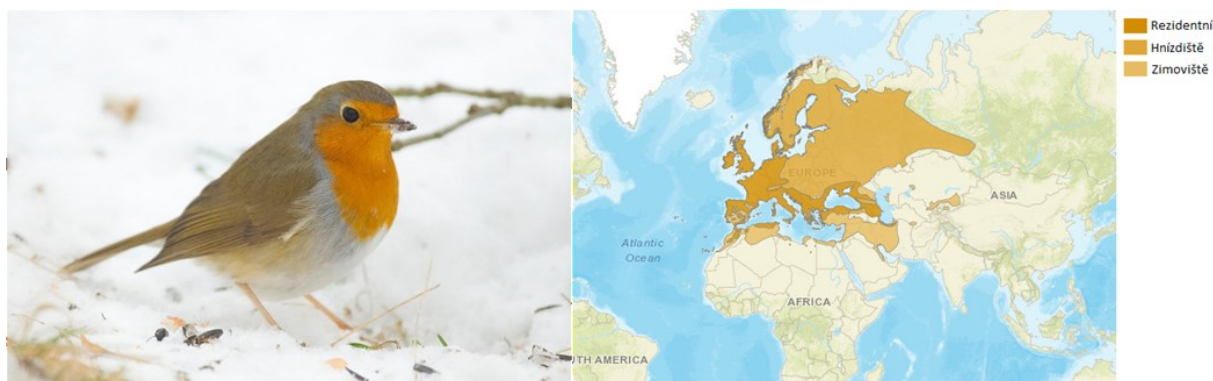
Muscicapa adusta (lejsek horský)



Obr. 14: *Muscicapa adusta* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22709255/94199622>)

Žijí na okrajích stále zelených a příbřežních lesů, v podrostu listnatých lesů, parcích, zahradách se stromy, sadech nebo plantážích (Obr. 14). Často se vyskytují v blízkosti vody. V tropech se vyskytují hlavně ve vyšších nadmořských výškách, od 900 m.n.m. do 3400 m.n.m. Mimo hnízdní sezónu migrují do nižších poloh. V Kamerunu hnízdí od ledna do dubna, ve východní Africe celoročně. Často mají dvě snůšky. Druh je rezidentní na většině areálu, na jihu je částečně migrující (Taylor & Clement, 2006).

Erithacus rubecula (červenka obecná)



Obr. 15: *Erithacus rubecula* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj :

<https://www.iucnredlist.org/species/22709675/131953953>)

Žije v lesním podrostu a na okrajích lesů, jak jehličnatých tak listnatých. Najdeme ho i v zahradách, parcích nebo sadech. (Obr. 15) Ve střední Evropě hnízdí od konce dubna do konce července. Migrující jedinci z Evropy zimují v Mediteránu, oblasti kolem Černého moře, Kaspiku a Mezopotámii (Collar, 2005).

Oreocossypha isabellae (drozdík horský)



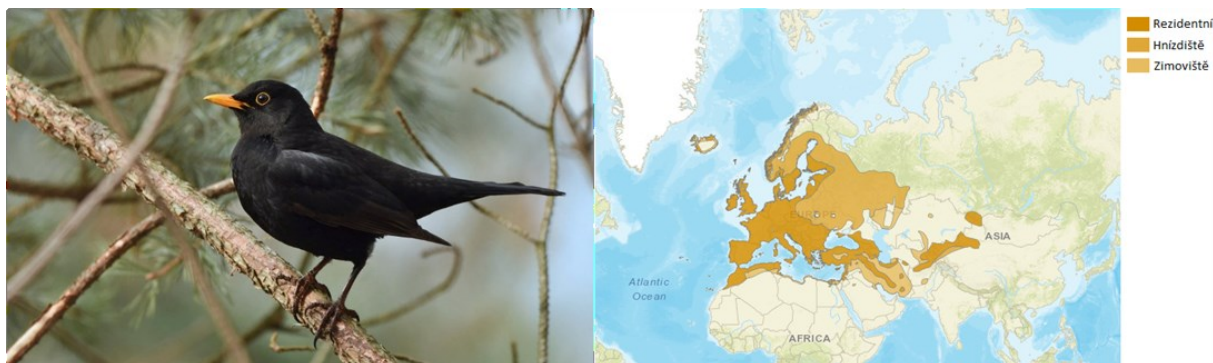
Obr. 16: *Oreocossypha isabellae* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj :

<https://www.iucnredlist.org/species/22709763/94222183>)

Žije v podrostu horských lesů od 1100 m.n.m. do 2700 m.n.m. Na Mt. Cameroon se nachází už od 800 m.n.m, ale většinou žije nad 1200 m.n.m (Obr. 16). Má rád zarostlé rokle a zakrslé stromky. Hnízdí pravděpodobně od března do září – začátek koreluje se začátkem dlouhých dešťů. Tento druh je sedentární. O tomto druhu není známo mnoho informací (Collar, 2005).

Turdidae (drozdovití)

Turdus merula (kos černý)



Obr. 17: *Turdus merula* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/103888106/87871094>)

Žije v širokém spektru habitatů. Dnes ho můžeme najít v horách i městských centrech, ale původem je kos lesním druhem (Obr. 17). Hnízdní sezóna je v Evropě od půlky března do začátku září. Jedinci mohou být sedentární, částečně migrující i plně migrující. Jedinci ze střední Evropy zimují ve Francii, Itálii a Iberském poloostrově (Collar, 2005).

Turdus pelios (drozd africký)



Obr. 18: *Turdus pelios* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22708702/94172703>)

Drozd africký žije v opadavých lesích blízko vodního zdroje v savanách, stále zelených lesích, sekundárních lesích, ale i na vinicích, v sadech a parcích. (Obr. 18) V Západní Africe hnízdí od června do října. Drozd africký je převážně sedentární. Severně od Gambie mohou být populace částečně migrující (Collar, 2005).

Locustellidae (cvrčilkovití)

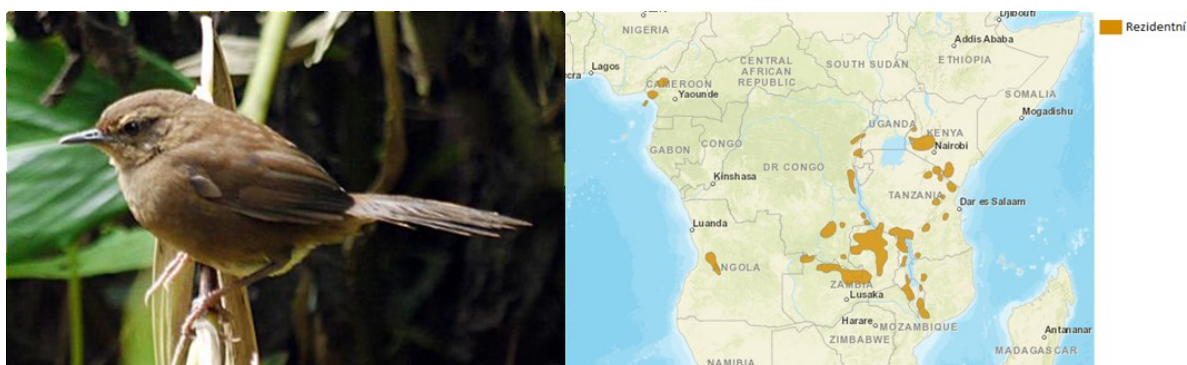
Locustella luscinioides (cvrčilka slavíková)



Obr. 19: *Locustella luscinioides* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22714684/87560838>)

Žije hlavně v bažinách, močálech a rákosinách na okrajích jezer – je silně vázána na vodu. (Obr. 19) Vyskytuje se většinou do 630 m. n. m., výjimkou je populace v Kazachstánu, která se vyskytuje až ve 1200 m.n.m. Hnízdí od půlky května do začátku července. Obvykle má dvě snůšky. Migruje dlouhé vzdálenosti. Zimuje v Africe v Senegal, Chadu, Ghaně a Sudánu (Bairlein et al., 2006).

Bradypterus lopezi (cetie podrostrní)



Obr. 20: *Bradypterus lopezi* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22714485/94418515>)

Žije v hustém podrostu horských lesů, včetně bambusového mlází (Obr. 20). Obývá nadmořské výšky od 1700 m.n.m. do 2400 m.n.m. Většinou hnízdí na konci období sucha s přesahem do období dešťů. Cetie je sedentární druh (Bairlein et al., 2006).

Sylviidae (pěnicovití)

Pěnicovití jsou druhy starého světa (Bairlein et al., 2006).

Sylvia atricapilla (pěnice černohlavá)

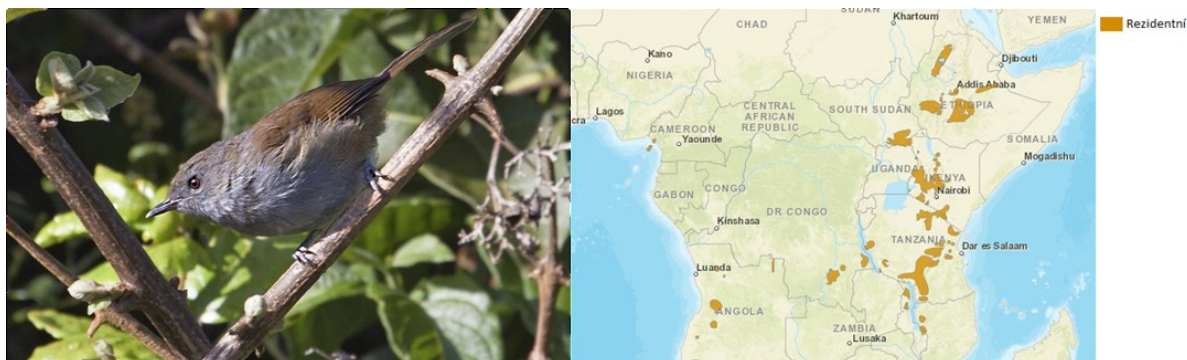


Obr. 21: *Sylvia atricapilla* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/22716901/87681382>)

Široce rozšířený druh, který obývá jakékoliv zalesněné habitaty (Obr. 21). Vyskytuje se od nejnižších poloh až k hranici lesa. Hnízdí od půlky dubna do srpna. Různé populace se liší migračním statutem. Populace žijící na atlantických a středomořských ostrovech jsou hodně sedentární. Částečně migrující populace žijí na středomořské pevnině a populace v severní a východní Evropě migrují na dlouhou vzdálenost. Západní populace (Německo) zimují v západním mediteránu a západní subsaharské

Africe. Populace hnízdící na východě migrují do východní Evropy a východní Afriky (Bairlein et al., 2006).

Sylvia abyssinica (timálie mniší)



Obr. 22: *Sylvia abyssinica* a jeho geografické rozšíření. (Zdroj : <https://www.iucnredlist.org/species/103872581/113116418>)

Timálie žijí v podrostu listnatých stále zelených lesů. V Kamerunu obývá nadmořské výšky od 900 m.n.m. do 2440 m.n.m. V Kamerunu hnízdí od listopadu do března. Timálie je dlouhověký a rezidentní druh (Collar & Robson, 2007; str. 135).

Izolace DNA

Izolace DNA byla provedena pomocí izolačního kitu firmy QIAGEN (Qiagen DNeasy® Tissue Kit). Byl dodržen postup podle protokolu dodávaného výrobcem.

Analýza mikrosatelitových lokusů

Ve své práci jsem zkoumala 22 mikrosatelitových lokusů. Analyzovala jsem pět lokusů umístěných v kandidátních genech pro behaviorální adaptace u kterých se předpokládá vliv na biorytmy a bázlivost a sadu 17 neutrálních lokusů, které sloužili jako kontrolní skupina. U neutrálních mikrosatelitů nepředpokládáme vliv selekce, tedy mohou sloužit jako ukazatel různých demografických událostí dané populace.

Primery pro lokusy kandidátních genů jsem převzala z následujících studií – CLOCK (Caprioli et al., 2012), NPAS2, ADCYAP1 a forward primer CREB1 (Steinmeyer, Mueller, & Kempnaers, 2009) a reverse primer CREB1 (Bourret & Garant, 2015). (Tab. 2) Primery neutrálních lokusů byly převzaty ze studií Dawson et al., (2010, 2013). V každém páru primerů byl forward primer označen fluorescenční barvou, díky které bylo později možné detekovat alely. Funkční protokoly a složení primerů do jednotlivých multiplexů bylo optimalizováno při pilotních studiích v laboratoři školitele. Sada primerů byla rozvržena do 6 multiplexů - 1M (CLOCK, NPAS2, CREB1), 2M (SERT, ADCYAP1 a primer pro určení pohlaví ATP), 4MP1 (TG02-088, TG02-120, CAM13, TG04-004, CAM01), 4MP2 (CAM03, CAM02), 4MP3 (TG11-011, TG05-046, TG04-12, TG12-015, CAM10, TG02-078) a 4MP4 (CAM05, CAM15, TG13-017, TG22-001). Reverzní primery některých neutrálních lokusů (TG04-004, CAM13, TG11-011, TG05-046, TG13-017, CAM05) byly upraveny prodloužením o několik nukleotidů pro usnadnění genotypování. (Brownstein et al., 1996).

Koncentrované primery byly uchovávány v 0,1 mM roztoku. Z těchto koncentrovaných roztoků jsem míchala primermixy, což byla směs různých primerů (v závislosti na multiplexu) doplněná destilovanou vodou do 100 µl. V primermixech byl různý poměr jednotlivých primerů. Objem jednotlivých primerů ve 100 µl primermixu je znázorněn v tabulkách 2 a 3.

Tab. 2: Sekvence použitých primerů, jejich barevné značení a množství ve 100 μ l primermixu.

multiplex	lokus	primer	značení	množství primeru (μl)
1M	CLOCK	f: GGGACAGGTGGTGACAGCTTATC r: CTGCTGATGGTCCTGCTGACT	6FAM	1
1M	CREB1	f: GGTCAGGCAGTTAAGATATTG r: AGAATAACGCAGCCCAGAGC	NED	1
1M	NPAS2	f: CTGTGGTAAATTTGATGATTCTGA r: ACACCAAGTTCTTTGCACAATG	VIC	1
2M	ADCYAP1	f: GATGTGAGTAACCAGCCACT r: ATAACACAGGAGCGGTGA	PET	1
2M	SERT	f: ATCTCCACACATTYCCCAGA r: AGGAACCCTAAATCTGCCCTAC	VIC	1

Tab. 3: Sekvence primerů neutrálních mikrosatelitů, jejich značení a množství ve 100 μ l primermixu. Všechny použité sekvence, krom označených RA, jsou převzaty z Dawson et al., (2010, 2013) F – forward primer; R – reverse; RA – reverse primer sekvence prodloužené přidáním dalších nukleotidů pro usnadnění genotypování. Degenerované báze použité v sekvencích: R = A, G; Y = C, T; M = A, C; S = C, G, W = A, T; K = G, T (Dawson et al., 2013)

multiplex	lokus	sekvence	značení	množství primerů (μ)
4MP1	TG02-088	F: TGTGTGTTGACAGTATTCTCTTGC	6FAM	3
		R: TTAAACCTAATAAACGTCACACAGTC		
	TG04-004	F: CTGGAGCAGTATTTATATTGATCTTCC	PET	4
		RA: GTTTGAAGATGTGTTTCACAGCATAACTG		
	CAM01	F: AAAGGCCAAGRCCAGTATG	PET	2
		R: CTCTCATCCACCCTGTTAGC		
CAM13	F: TCAAATACAGCAGCAGGCAG	VIC	2	
	RA: GTTTCATTACCAAACAGCATCCAG			
TG02-120	F: TTGGGCAAAGATGATATGAATG	NED	2	
	R: AGCCAGGTCCAGTTTCTAAGC			
4MP2	CAM03	F: ATTAGCATAGCTCAGCATTGCC	6FAM	2
		R: CGAGCATTCAAMCCTGTCATC		
	CAM02	F: GAATTAAGAYAGCAGATGCAGG	VIC	1
4MP3	TG04-12	F: TGAATTTAGATCCTCTGTTCTAGTGTC	NED	2
		R: TTACATGTTTACGGTATTTCTCTGG		
	CAM10	F: TATCCMGAGAATGGGCATC	PET	2
		R: KGCTCTCATTGTCATGCTG		
	TG11-011	F: ACAAACTAAGTACATCTATATCTGAAG	6FAM	3
		RA: GTTTAAATACAGGCAACATTGG		
	TG05-046	F: AAAACATGGCTTACAACTGG	VIC	1
		RA: GTTTGCTCAGATAAGGGAGAAAACAG		
	TG02-078	F: TGTTAAAGCCTGTTCCATAGG	PET	4
		R: TTCCCATAAAGTATGTACGC		
TG12-015	F: ACAACAGTGGCTTTACTGTGTGA	NED	4	
	R: TACAGCAGCTGCAGCAAAGT			
4MP4	CAM15	F: SGACGACTCCTTTATTTCCC	NED	1
		R: GTTTCTGACTTCCYAGGTAACAC		
	TG13-017	F: GCTTTGCATCTTGCCTAAA	VIC	2
		RA: GTTTGGTAACTACAACATTCCAACCTCT		
	CAM05	F: TTACACAGACTGCAAACCGC	6FAM	1
RA: GTTTCTGTTKCTCTAGTAATGAGATCCTG				
TG22-001	F: TTGGATTCAGAACATGTAGC	PET	2	
	R: TCTGATGCAAGCAAACAA			

Amplifikovala jsem fragmenty zkoumaných sekvencí metodou PCR (polymerase chain reaction). Na PCR jsem připravila směs 1 μ l primermixu, 3 μ l DNA a 4 μ l Type-it Multiplex PCR Master Mixu (obsahující polymerázu a pufr). (Tab. 4) Délku amplifikovaných fragmentů jsem zjistila pomocí fragmentační analýzy. Na tuto analýzu jsem připravila směs 1 μ l PCR produktu, 9 μ l formamidu a 0,3 μ l standardu. Konkrétně jsem používala standard GeneScan™ 500 LIZ® Size Standard (Applied Biosystems). (Tab. 6). Standard obsahuje DNA fragmenty o známých délkách a slouží jako měřítko pro studované alely. Směs PCR produktu, standardu a formamidu jsem zahřála na 95°C po dobu 2 minut. Fragmentační analýza byla následně provedena Laboratoří sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě UK.

Výstup fragmentační analýzy jsem zpracovávala v programu GeneMarker (Softgenetics) verze 1.90. V programu jsem určila délku jednotlivých alel jednotlivých lokusů pro každého jedince.

Tab. 4: Protokol přípravy směsi na fragmentační analýzu. **Tab. 5:** Program běhu PCR.

<u>složky PCR směsi</u>	<u>objem (μl)</u>	<u>teplota</u>	<u>délka</u>	<u>počet cyklů</u>
Type-it Multiplex PCR MM	4	95°C	5 min.	1x
primermix	1	95°C	0,5 min.	
DNA	3	53°C	1,5 min.	30x
		72°C	0,5 min.	
		60°C	30 min.	1x

Tab. 6: Protokol přípravy směsi na fragmentační analýzu.

<u>fragmentační analýza</u>	<u>objem (μl)</u>
formamid	9
LIZ500 (standard)	0,3
PCR produkt	1

Analýza mikrosatelitových lokusů

Ve své práci jsem zkoumala 22 mikrosatelitových lokusů. Analyzovala jsem pět lokusů umístěných v kandidátních genech pro behaviorální adaptace (předpokládaný vliv na biorytmy a bázlivost) a sadu 17 neutrálních lokusů, které sloužili jako kontrolní skupina. U neutrálních mikrosatelitů nepředpokládáme vliv selekce, tedy mohou sloužit jako ukazatel demografických událostí dané populace.

Analýza molekulárních dat

Genotypy získané analýzou výsledků fragmentační analýzy v programu GeneMarker (verze 1.90), jsem dále zpracovávala nejprve v programu Cervus verze 3.0.6. (Kalinowski et al., 2007). V tomto programu jsem spočítala počet alel, pozorovanou a očekávanou heterozygotnost.

Dále jsem v programu FSTAT verze 2.9.3. (Goudet, 2001) spočítala hodnoty allelic richness. Allelic richness je jedna z nejčastěji používaných metod využívaných k odhalení genetické (alelické) diverzity. Výpočet je standardizován na nejmenší počet vzorků metodou rarefaction, aby nedocházelo k chybným výsledkům při porovnávání různě velkých sad vzorků (Leberg, 2002). Porovnání genetické diverzity u zkoumaných druhů bylo provedeno pomocí randomizačních testů v programu FSTAT. Randomizační testy porovnávají skutečné rozdělení dat do skupin se sety dat vytvořenými náhodným přesouváním vzorků mezi skupinami (1000 permutací). Nejprve jsem provedla analýzu neutrálních mikrosatelitů pomocí oboustranného randomizačního testu (1000 permutací). Zvolila jsem oboustranný test, protože jsem se snažila zjistit, zda se populace liší. Touto analýzou jsem zjišťovala rozdíl mezi tropickými a temperátními druhy v allelic richness a gene diversity. Gene diversity značí heterozygotnosti zkoumané populace (H_s) (Nei, 1973). Pro výpočet allelic richness a gene diversity kandidátních lokusů metodou randomizačních testů jsem zvolila jednostranný test. Tímto testem jsem se snažila ověřit, zda platí předpoklad, že genetická diverzita kandidátních lokusů by měla být signifikantně nižší u temperátních druhů z důvodu působení stabilizující selekce.

Korespondenční analýzu dat jsem provedla v programu Genetix verze 4.0.6. (Belkhir, Borsa, Chikhi, Raufaste, & Bonhomme, 1996). Tato analýza patří mezi tzv. klasifikační (ordinační) analýzy. Ordinační analýzy jsou takové, které řadí objekty podél teoretického gradientu (ordinační osy) a snaží se uchovat trend a strukturu v datech (Haruštiaková et al., 2012). Korespondenční analýza nám

umožňuje graficky zobrazit vztah mezi jedinci a populacemi. (Zima et al. , 2004). Touto metodou jsem se snažila znázornit vztah mezi skupinou tropických a temperátních ptáků na základě genotypů kandidátních genů. Dále jsem tuto metodu využila při grafickém znázornění genetické diferenciace u dvou populací hýla rudého. Alternativní analýzou korespondenční analýzy je analýza hlavních koordinát (PCoA). Tato analýza se snaží v redukovaném prostoru zachovat vzdálenost mezi objekty a vyjádřit vztah, případně absenci vztahu těchto objektů . Výsledný graf tedy určí, které populace jsou si bližší, protože společně tvoří klastr (Zima et al., 2004; Haruštiaková et al., 2012;). Tuto analýzu jsem prováděla v programu GeneAEx 6.503 (Peakall & Smouse, 2012).

Bayesiánská „admixture“ analýza

Tato analýza umožňuje rozdělení jedinců do skupin podle jejich genetické podobnosti. Analýza se provádí na souboru genotypů více lokusů. Tuto analýzu jsem prováděla v programu Structure (verze 2.3.4.) (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000). Program rozřadí vzorky do určeného počtu skupin, nezávisle na jejich reálné příslušnosti k populaci, na základě genetické podobnosti. Parametry analýzy byly nastaveny takto: burn-in 100 000, MCMC (Markov chain Monte Carlo) 300 000. Genotypy byly rozděleny do dvou skupin (hodnota K) a analýza proběhla v 10 opakováních. Výsledky této analýzy jsem zobrazila pomocí programu Clumpak (Cluster Markov Packager Across K) (Kopelman, Mayzel, Jakobsson, Rosenberg, & Mayrose, n.d.). Tento program je volně dostupný online a umožňuje graficky zobrazit data získaná analýzou v programu Structure.

Fst a AMOVA

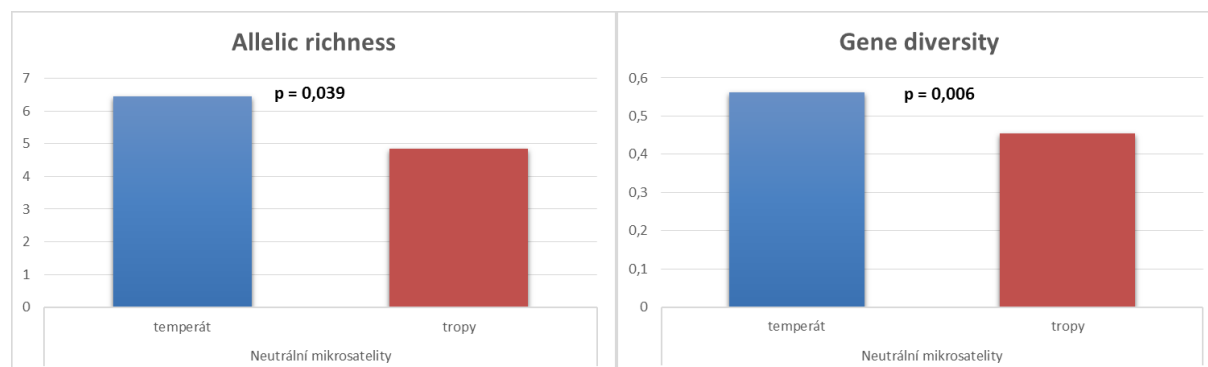
V programu GeneAEx 6.503 (Peakall & Smouse, 2012) jsem se snažila zjistit míru rozdílnosti mezi populacemi hýla rudého. Nejprve jsem spočítala párové Fst (pairwise Fst) a jeho průkaznost. Hodnota Fst nám říká, jak moc se od sebe jednotlivé populace (subpopulace) liší. Pokud je hodnota Fst rovna nule, pak mezi populacemi není žádný genetický rozdíl. Čím vyšší hodnota Fst, tím jsou populace diverzifikovanější. Následně jsem pomocí analýzy molekulární variance (AMOVA) zjistila kolik procent genetické variability je vysvětleno rozdílností mezi populacemi, uvnitř populace a mezi jedinci.

Výsledky

Ve své práci jsem se snažila zjistit genotyp 494 jedinců tropických a temperátních ptáků patřících do 6 čeledí. U většiny jedinců se mi podařilo získat kompletní genotypy zkoumaných lokusů.

Kontrolní analýza neutrálních mikrosatelitů

Nejprve jsem se snažila zjistit, zda nedošlo u tropických druhů ke snížení genetické variability v důsledku nějakých demografických událostí nebo chybnému sběru dat (např.: genotypování příbuzných jedinců). Snížená diverzita u tropických druhů by mohla zastřít reálný rozdíl variability kandidátních genů. Kontrolu jsem provedla oboustranným testem v programu FSTAT. U tropických druhů byla signifikantně nižší genetická diverzita (allelic richness) i heterozygotnost (gene diversity) (Graf 2).



Graf 2: Graf znázorňující hodnoty allelic richness a gene diversity, získané oboustranným randomizačním testem neutrálních mikrosatelitů u tropických a temperátních druhů.

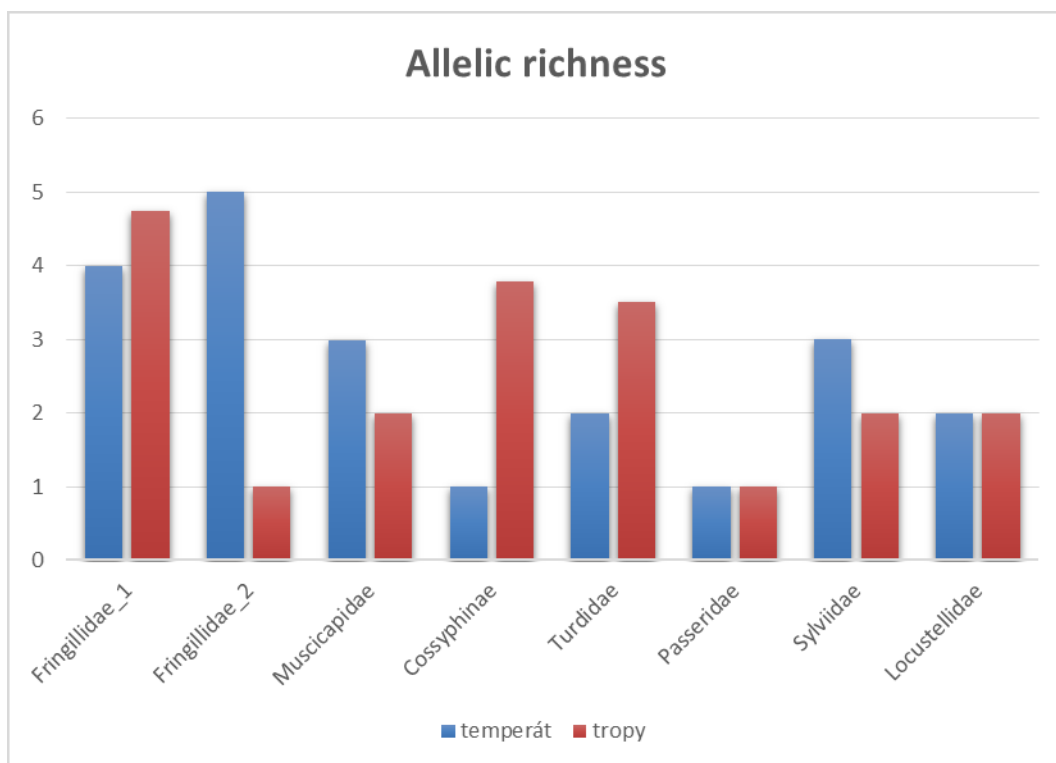
CLOCK

Frekvenční analýza v programu Cervus odhalila monomorfismus lokusu CLOCK u dvou temperátních druhů, *Erithacus rubecula* a *Passer domesticus*, a dvou tropických druhů, *Crithagra burtoni* a *Passer griseus*. Nejvíce polymorfní byl tento lokus u druhů *Linurgus olivaceus* a *Serinus serinus*. Celkově nebyl tento lokus nijak výrazně variabilní (Tab. 7).

Tab. 7.: Výsledky frekvenční analýzy lokusu CLOCK. *k* = počet alel; *N* = počet jedinců; *HObs* = pozorovaná heterozygotnost; *HExp* = očekávaná heterozygotnost

CLOCK	druh	k	N	HObs	HExp
	<i>Erithacus rubecula</i>	1	26	0	0
	<i>Oreocossypha isabellae</i>	4	33	0,121	0,403
	<i>Ficedula albicollis</i>	2	20	0,05	0,05
	<i>Muscicapa adusta</i>	2	20	0,05	0,05
	<i>Chloris chloris</i>	4	24	0,25	0,264
	<i>Linurgus olivaceus</i>	5	32	0,563	0,585
	<i>Serinus serinus</i>	5	24	0,333	0,368
	<i>Crithagra burtoni</i>	1	24	0	0
	<i>Passer domesticus</i>	1	24	0	0
	<i>Passer griseus</i>	1	34	0	0
	<i>Turdus merula</i>	2	24	0,083	0,082
	<i>Turdus pelios</i>	4	33	0,394	0,47
	<i>Locustella luscinioides</i>	2	24	0,167	0,156
	<i>Bradypterus lopezi</i>	2	22	0,045	0,045
	<i>Sylvia atricapilla</i>	3	24	0,333	0,324
	<i>Sylvia abyssinica</i>	2	24	0,25	0,454

Hodnoty allelic richness CLOCK lokusu se nejvíce lišily mezi tropickým a temperátním druhem v čeledích *Fringillidae* (*Serinus serinus*, *Crithagra burtoni*), *Turdidae* a podčeledi *Cossyphinae* (Graf 3). U čeledi *Passeridae* a *Sylviidae* se hodnoty mezi druhy vůbec nelišily.



Graf 3: Hodnoty allelic richness lokusu CLOCK jednotlivých tropických a temperátních druhů.

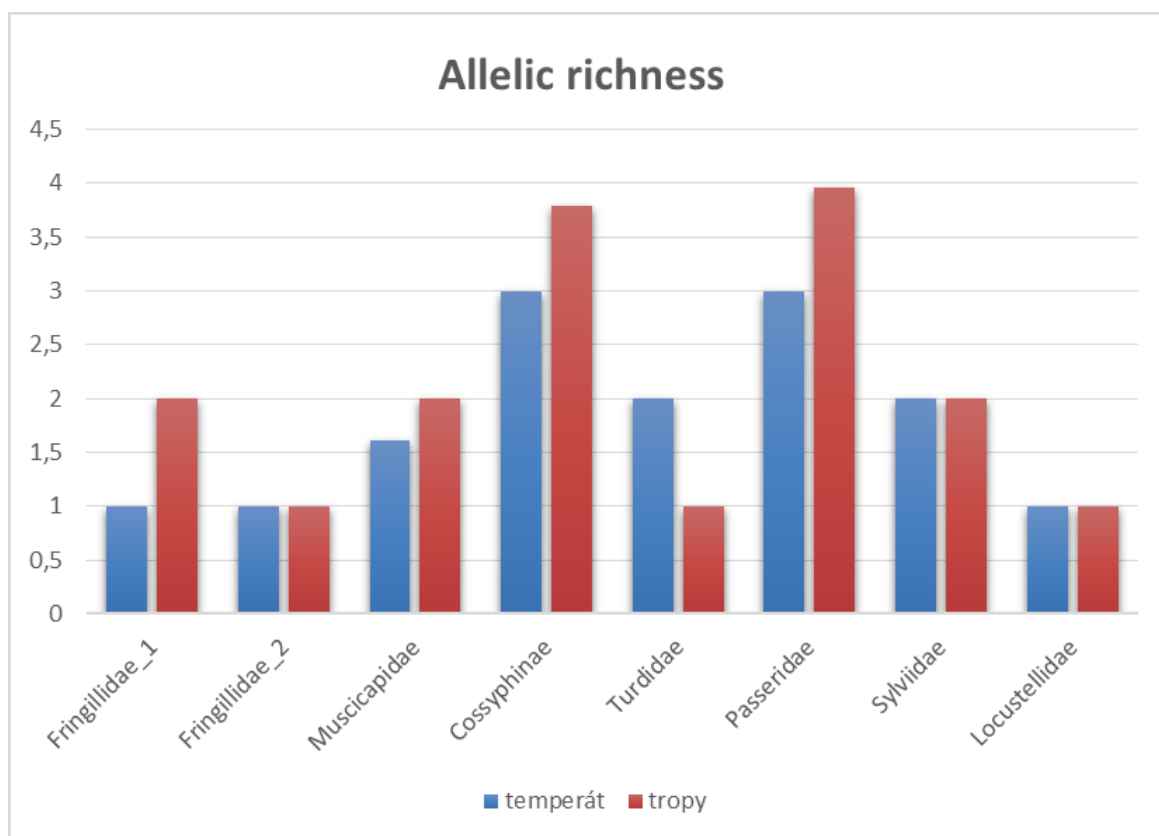
NPAS2

Frekvenční analýza ukázala velice nízkou variabilitu lokusu NPAS2 (Tab. 8). Tento lokus byl monomorfní u 6 druhů. U tří temperátních druhů, *Chloris chloris*, *Serinus serinus*, *Locustella luscinioides* a tří tropických druhů, *Crithagra burtoni*, *Turdus pelios* a *Bradypterus lopezi*. Čtyři z těchto druhů jsou si příbuzní – *Locustella luscinioides* a *Bradypterus lopezi*, *Serinus serinus* a *Crithagra burtoni*. Na NPAS2 lokusu se ukázala nízká míra heterozygotnosti.

Tab 8.: Výsledky frekvenční analýzy lokusu NPAS2. *k* = počet alel; *N* = počet jedinců; *HObs* = pozorovaná heterozygotnost; *HExp* = očekávaná heterozygotnosti

NPAS2	druh	k	N	HObs	HExp
	<i>Erithacus rubecula</i>	3	26	0,115	0,112
	<i>Oreocossypha isabellae</i>	4	33	0,333	0,572
	<i>Ficedula albicollis</i>	2	20	0,3	0,467
	<i>Muscicapa adusta</i>	2	20	0,3	0,467
	<i>Chloris chloris</i>	1	24	0	0
	<i>Linurgus olivaceus</i>	2	32	0,219	0,198
	<i>Serinus serinus</i>	1	24	0	0
	<i>Crithagra burtoni</i>	1	24	0	0
	<i>Passer domesticus</i>	4	24	0,667	0,673
	<i>Passer griseus</i>	4	34	0,412	0,42
	<i>Turdus merula</i>	2	24	0,125	0,12
	<i>Turdus pelios</i>	1	33	0	0
	<i>Locustella luscinioides</i>	1	24	0	0
	<i>Bradypterus lopezi</i>	1	22	0	0
	<i>Sylvia atricapilla</i>	2	24	0,042	0,042
	<i>Sylvia abyssinica</i>	2	24	0,042	0,042

Hodnoty allelic richness NPAS2 lokusu se ukázaly mírně vyšší nebo stejné pro tropické druhy oproti temperátním druhům, výjimkou byly druhy z čeledi *Turdidae* (Graf 4).



Graf 4: Hodnoty allelic richness lokusu NPAS2.

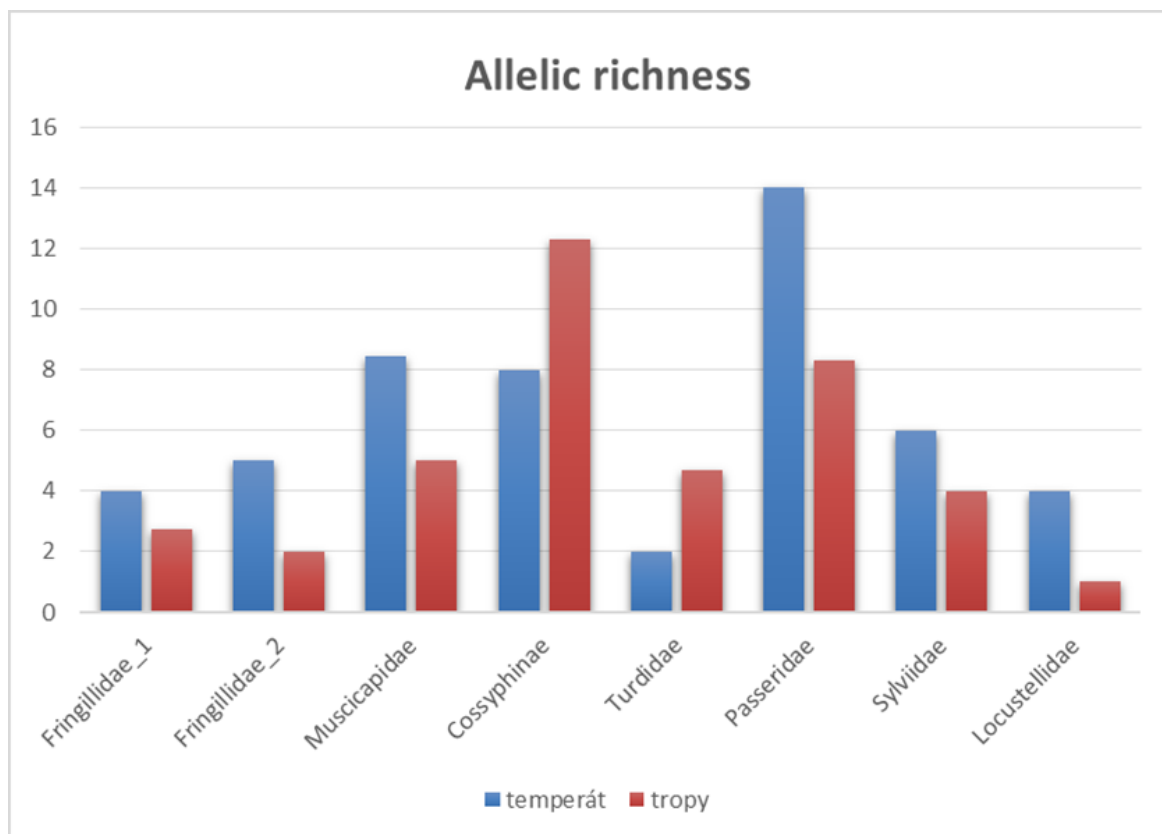
CREB1

Variabilita CREB1 lokusu je výrazně vyšší než předešlé dva lokusy (Tab. 9). Tento lokus je monomorfní pouze u jednoho druhu a tím je *Bradypterus lopezi*. Výrazně variabilnější oproti jiným druhům byl tento lokus u druhů *Oreocossypha isabellae*, kde se našlo 13 alel a *Passer domesticus*, kde se našlo 14 alel. U druhu *Passer domesticus* byla u tohoto lokusu nalezena i vysoká míra heterozygotnosti.

Tab. 9.: Výsledky frekvenční analýzy lokusu CREB1. *k* = počet alel; *N* = počet jedinců; *HObs* = pozorovaná heterozygotnost; *HExp* = očekávaná heterozygotnosti

CREB1	druh	k	N	HObs	HExp
	<i>Erithacus rubecula</i>	8	26	0,538	0,773
	<i>Oreocossypha isabellae</i>	13	33	0,606	0,877
	<i>Ficedula albicollis</i>	5	20	0,55	0,679
	<i>Muscicapa adusta</i>	5	20	0,55	0,679
	<i>Chloris chloris</i>	4	24	0,375	0,445
	<i>Linurgus olivaceus</i>	3	32	0,125	0,175
	<i>Serinus serinus</i>	5	24	0,5	0,612
	<i>Crithagra burtoni</i>	2	24	0,125	0,12
	<i>Passer domesticus</i>	14	24	0,875	0,918
	<i>Passer griseus</i>	9	34	0,765	0,863
	<i>Turdus merula</i>	2	24	0,458	0,403
	<i>Turdus pelios</i>	5	33	0,394	0,525
	<i>Locustella luscinioides</i>	4	24	0,667	0,648
	<i>Bradypterus lopezi</i>	1	22	0	0
	<i>Sylvia atricapilla</i>	6	24	0,583	0,599
	<i>Sylvia abyssinica</i>	4	24	0,625	0,629

Genetická diverzita lokusu CREB1 byla u většiny temperátních druhů vyšší než u tropických. Výjimkou byli dvě skupiny, *Cossyphinae* a *Turdidae* (Graf 5).



Graf 5: Allelic richness CREB1 lokusu u tropických a temperátních druhů.

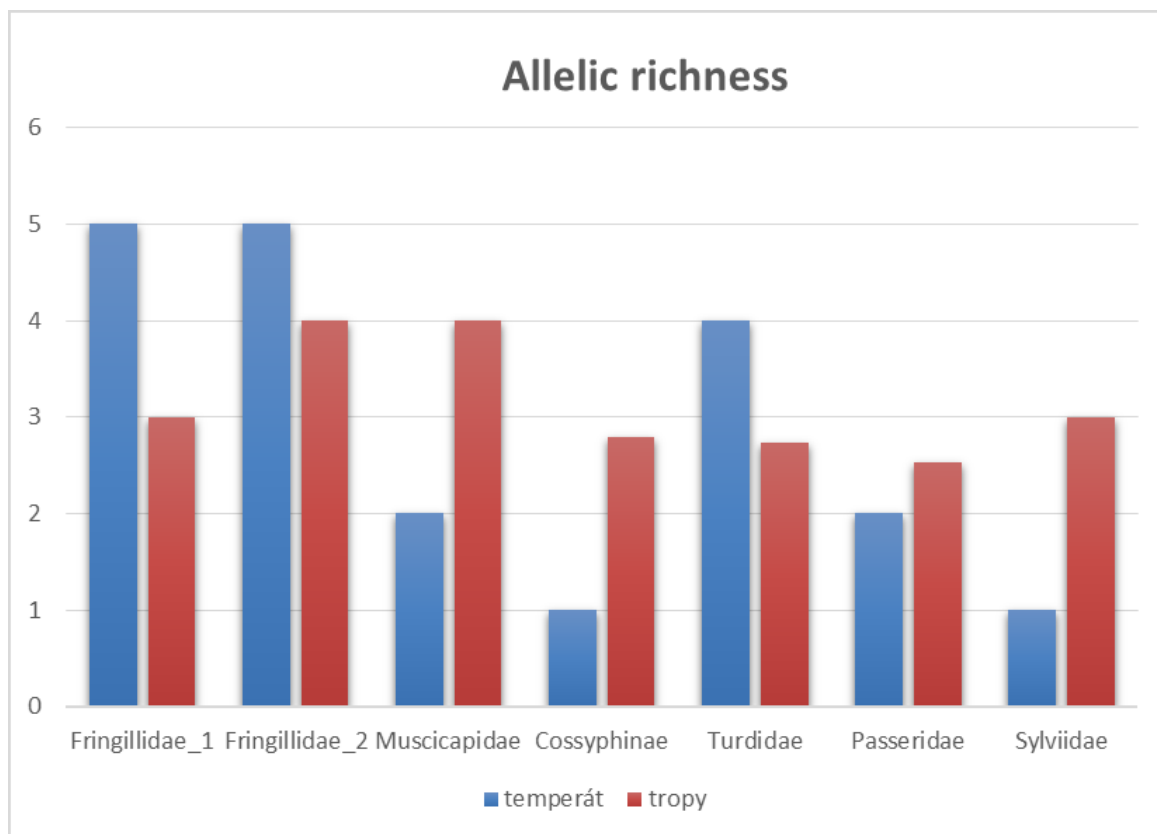
SERT

Lokus SERT byl monomorfní u dvou temperátních druhů, *Erithacus rubecula* a *Sylvia atricapilla* (Tab. 10). U tropických druhů byl tento lokus alespoň do určité míry polymorfní, ale celkově nevykazoval vysokou variabilitu. Tento lokus měl v průměrně i nízkou míru heterozygotnosti, výjimkou byla *Chloris chloris*.

Tab. 10: Výsledky frekvenční analýzy lokusu SERT. *k* = počet alel; *N* = počet jedinců; *HObs* = pozorovaná heterozygotnost; *HExp* = očekávaná heterozygotnosti

SERT	druh	k	N	HObs	HExp
	<i>Erithacus rubecula</i>	1	26	0	0
	<i>Oreocossypha isabellae</i>	3	33	0,303	0,363
	<i>Ficedula albicollis</i>	4	20	0,25	0,406
	<i>Muscicapa adusta</i>	4	20	0,25	0,406
	<i>Chloris chloris</i>	5	24	0,667	0,612
	<i>Linurgus olivaceus</i>	3	32	0,313	0,28
	<i>Serinus serinus</i>	5	24	0,208	0,27
	<i>Crithagra burtoni</i>	4	24	0,333	0,741
	<i>Passer domesticus</i>	2	24	0,042	0,042
	<i>Passer griseus</i>	3	34	0,029	0,086
	<i>Turdus merula</i>	4	24	0,375	0,361
	<i>Turdus pelios</i>	3	33	0,121	0,117
	<i>Locustella luscinioides</i>	3	24	0,083	0,082
	<i>Bradypterus lopezi</i>	2	13	0	0,271
	<i>Sylvia atricapilla</i>	1	24	0	0
	<i>Sylvia abyssinica</i>	3	24	0,167	0,159

Genetická diverzita lokusu SERT se hodně lišila mezi dvojicemi temperátních a tropických druhů (Graf 6).



Graf 6: Hodnoty allelic richness u tropických a temperátních druhů lokusu SERT.

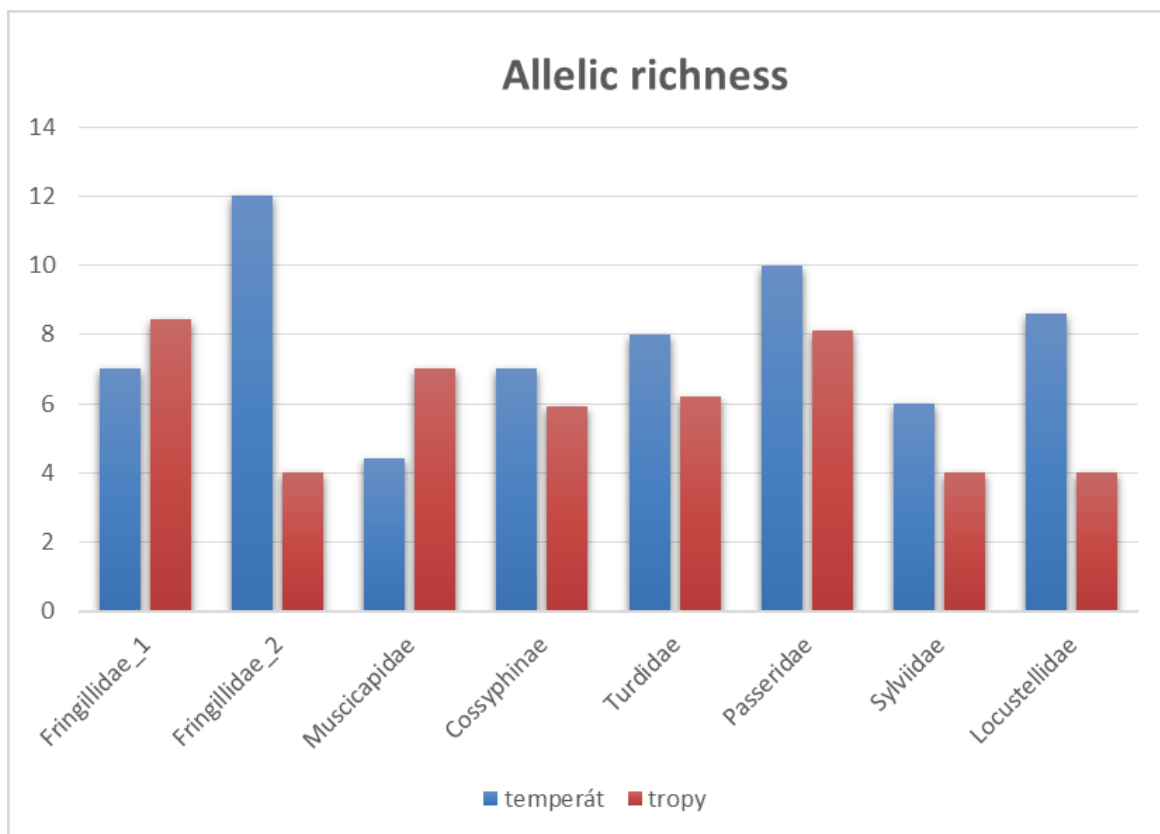
ADCYAP1

ADCYAP1 lokus byl nejvíce variabilní z kandidátních lokusů (Tab. 11). Tento výsledek je v souladu s předešlými studiemi. Všechny druhy byly polymorfní. U nejméně variabilních druhů pro tento lokus, *Crithagra lopezi*, *Bradypterus lopezi* a *Sylvia atricapilla*, jsem našla 4 alely. *Serinus serinus* byl nejvíce variabilní se 12 alelami. Tento lokus vykazoval vysokou míru heterozygotnosti.

Tab. 11: Výsledky frekvenční analýzy lokusu ADCYAP1. *k* = počet alel; *N* = počet jedinců; *HObs* = pozorovaná heterozygotnost; *HExp* = očekávaná heterozygotnost

ADCYAP1	druh	k	N	HObs	HExp
	<i>Erithacus rubecula</i>	7	26	0,423	0,474
	<i>Oreocossypha isabellae</i>	6	33	0,545	0,543
	<i>Ficedula albicollis</i>	7	20	0,65	0,758
	<i>Muscicapa adusta</i>	7	20	0,65	0,758
	<i>Chloris chloris</i>	7	24	0,833	0,778
	<i>Linurgus olivaceus</i>	9	32	0,938	0,817
	<i>Serinus serinus</i>	12	24	0,667	0,824
	<i>Crithagra burtoni</i>	4	24	0,5	0,593
	<i>Passer domesticus</i>	10	24	0,833	0,814
	<i>Passer griseus</i>	9	34	0,441	0,802
	<i>Turdus merula</i>	8	24	0,708	0,746
	<i>Turdus pelios</i>	7	33	0,455	0,51
	<i>Locustella luscinioides</i>	9	24	0,792	0,762
	<i>Bradypterus lopezi</i>	4	22	0,636	0,623
	<i>Sylvia atricapilla</i>	6	24	0,75	0,716
	<i>Sylvia abyssinica</i>	4	24	0,5	0,66

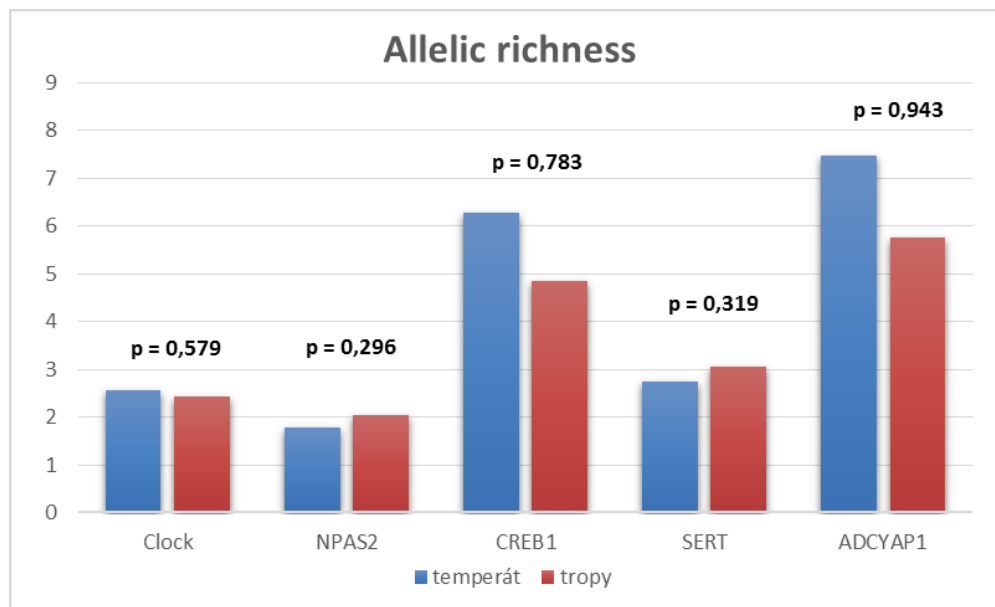
Genetická diverzita lokusu ADCYAP1 byla relativně podobná u všech dvojic zkoumaných druhů (Graf 7). Výjimkou byly dvě skupiny, Fringillidae 2 a Locustellidae, které vykazovaly výraznější rozdíl mezi tropickým a temperátním druhem.



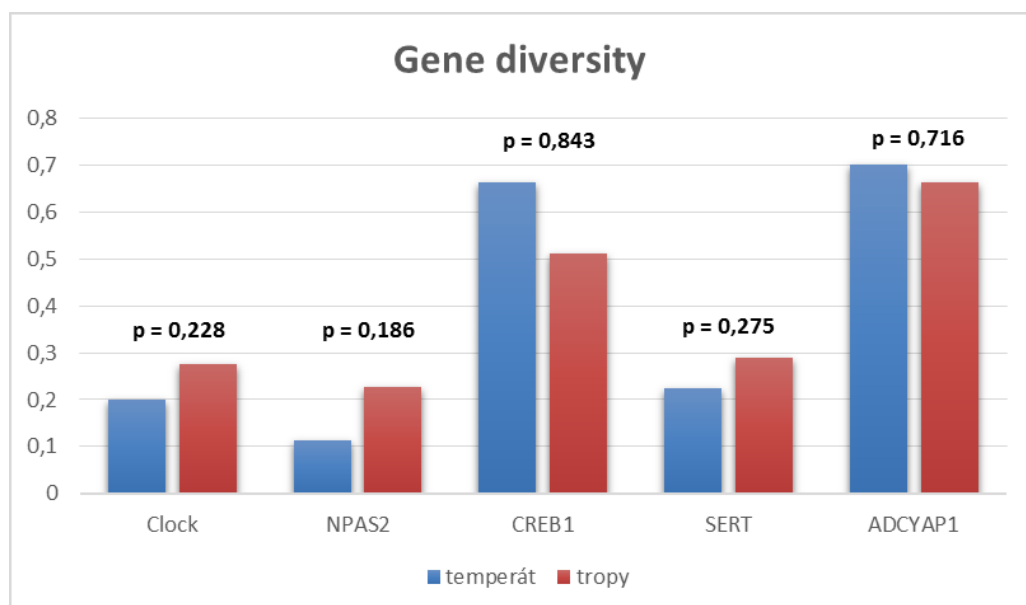
Graf 7: Hodnoty allelic richness lokusu ADCYAP1.

Randomizační testy

Jednostranné randomizační testy ukázaly, že genetická diverzita kandidátních lokusů temperátních druhů ptáků není výrazně nižší než diverzita těchto lokusů u tropických druhů. Předpoklad, že by vlivem stabilizující selekce mělo docházet ke snižování diverzity v lokusech spojených s biorytmy se tedy nepotvrdil (Graf 8). Žádný z lokusů nebyl signifikantně variabilnější u tropických druhů. Druhy se signifikantně nelišili ani v heterozygotnosti (gene diversity, Graf 9).



Graf 8: Srovnání allelic richness metodou jednostranného randomizačního testu.

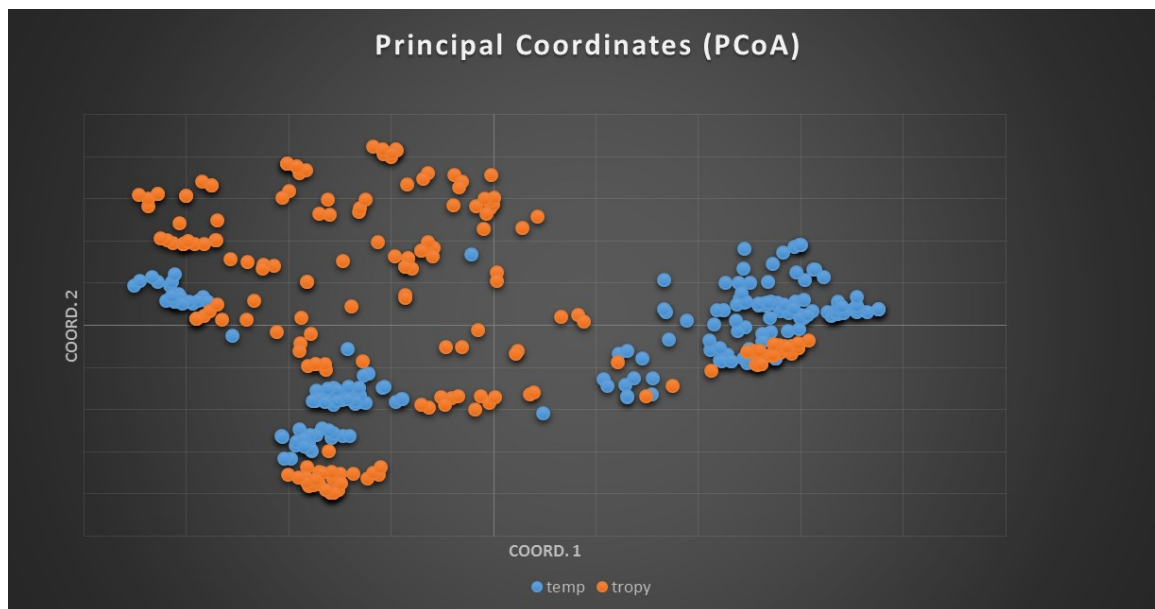


Graf 9: Srovnání gene diversity metodou jednostranného randomizačního testu.

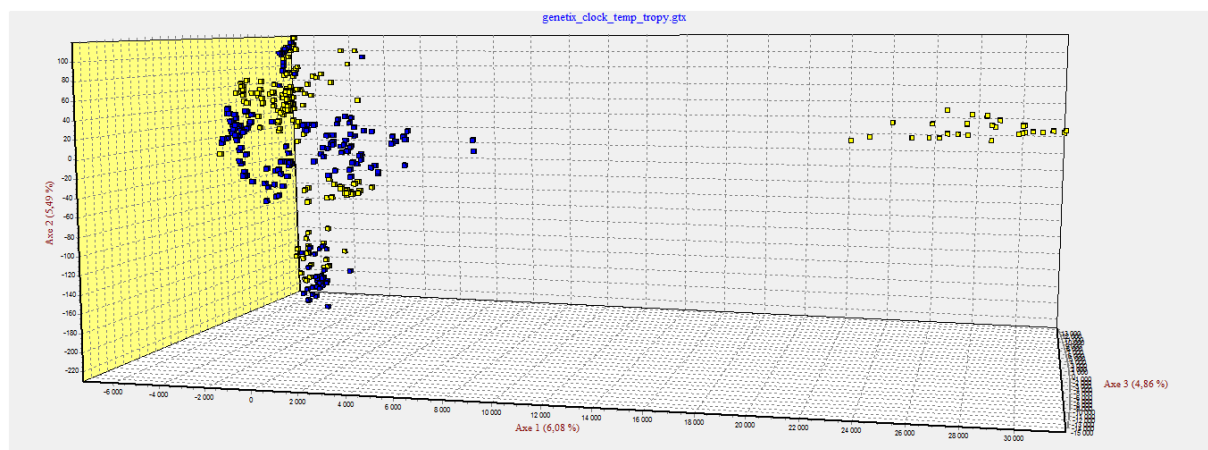
Tab. 12: Frekvence privátních alel u tropických a temperátních druhů.

	populace	lokus	alela	frekvence
Nízká frekvence privátních alel u tropických a temperátních druhů je velice nízká a tedy tyto dvě skupiny nemůžeme rozřazovat na základě diferenceiace v těchto kandidátních genech (Tab. 12). Privátní alela 175 u lokusu NPAS2 byla nalezena pouze u jednoho druhu a tím je <i>Ficedula albicollis</i> .	temp	ClockA	105	0,005
	temp	ClockA	126	0,123
	temp	ClockA	128	0,131
	temp	NPAS2A	175	0,153
	temp	NPAS2A	181	0,003
	temp	Creb1A	259	0,003
	temp	Creb1A	264	0,003
	temp	Creb1A	299	0,058
	temp	Creb1A	301	0,063
	temp	Creb1A	303	0,008
	temp	Creb1A	305	0,005
	temp	Creb1A	312	0,003
	temp	SERTA	330	0,005
	temp	ADCYAP1A	148	0,003
	temp	ADCYAP1A	171	0,058
	temp	ADCYAP1A	175	0,025
	temp	ADCYAP1A	176	0,013
	temp	ADCYAP1A	178	0,013
	temp	ADCYAP1A	179	0,003
	temp	ADCYAP1A	180	0,053
	temp	ADCYAP1A	181	0,003
	temp	ADCYAP1A	182	0,088
	temp	ADCYAP1A	184	0,005
	tropy	ClockA	108	0,025
	tropy	ClockA	109	0,003
	tropy	ClockA	115	0,010
	tropy	NPAS2A	159	0,003
	tropy	Creb1A	263	0,003
	tropy	Creb1A	265	0,003
	tropy	Creb1A	271	0,013
	tropy	Creb1A	273	0,003
	tropy	Creb1A	275	0,106
	tropy	Creb1A	290	0,005
	tropy	Creb1A	294	0,038
	tropy	SERTA	304	0,003
	tropy	SERTA	307	0,128
	tropy	SERTA	310	0,035
	tropy	SERTA	321	0,111
	tropy	ADCYAP1A	152	0,003

Korespondenční analýza a analýza hlavních koordinát ukázala, že při srovnání tropických a temperátních druhů jakožto populací nevidíme genetickou strukturu. Tropické a temperátní druhy tvoří bližší klastry (Graf 10).



Graf 10: Analýza hlavních koordinát neukázala rozdělení jedinců na tropické a temperátní druhy.



Graf 11: Korespondenční mapa skupin tropických a temperátních druhů na základě kandidátních genů.

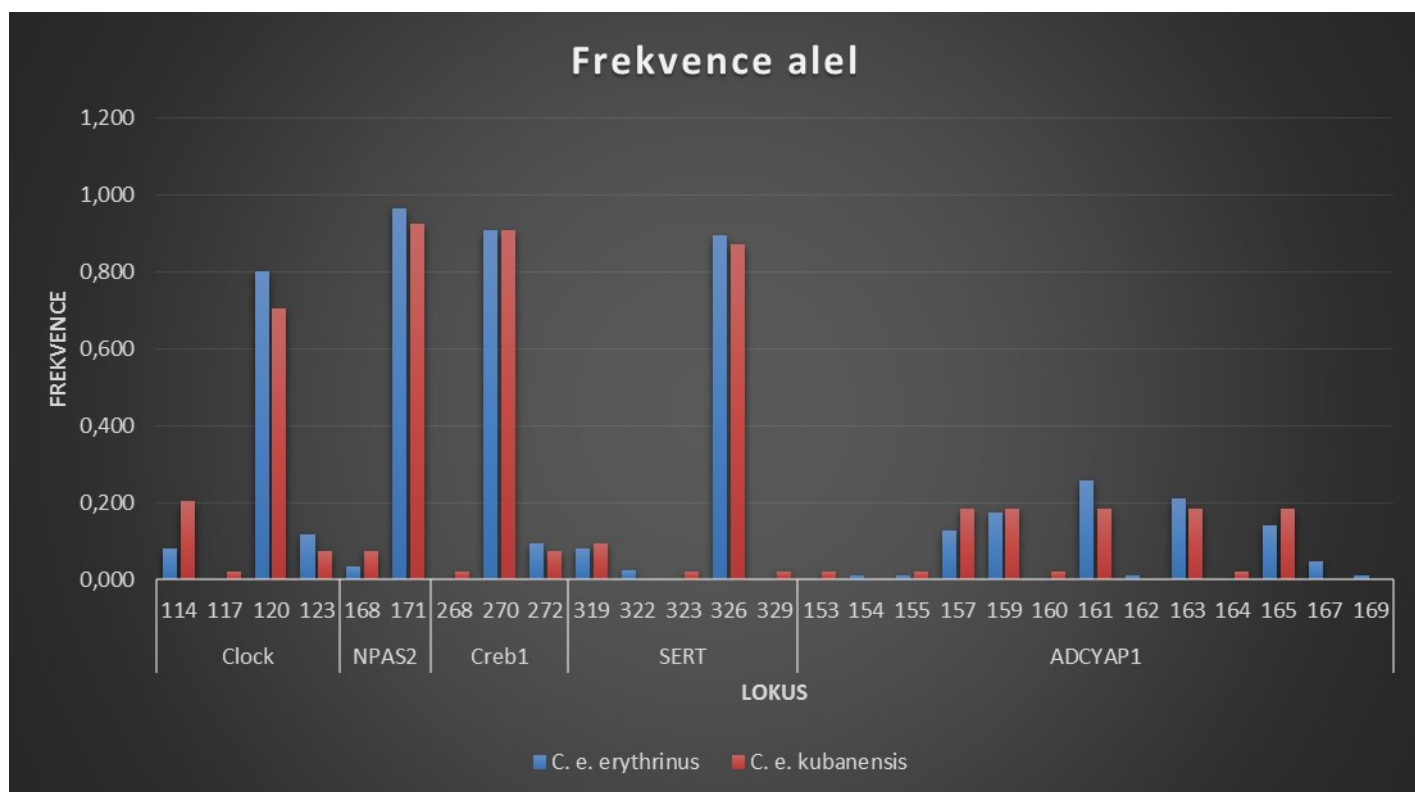
Korespondenční mapa nám ukazuje, že tropické a temperátní druhy tvoří vzájemně si bližší skupiny na základě kandidátních genů. Vybočující skupinou je *Ficedula albicollis* s privátní alelou na lokusu NPAS2 (Graf 11).

Carpodacus erythrinus

Frekvenční analýza (program GeneAEx) genotypů kandidátních genů hýla rudého odhalila nízký počet a frekvenci privátních alel u obou populací (Tab. 13). Nejvíce privátních alel bylo nalezeno na lokusu ADCYAP1. Na tomto lokusu se nacházely 4 privátní alely u populace *C. e. erythrinus* a 3 privátní alely u populace *C. e. kubanensis*. Nejfrekventovanější privátní alelou byla ADCYAP1 alela 167 s frekvencí výskytu 0,047 což odpovídá 4 alelám z 86. Vzácnost privátních alel naznačuje, že zkoumané lokusy nebudou tím řídícím mechanismem stojícím za různými tahovými trasami hýla rudého. Celková frekvence alel kandidátních genů se mezi danými populacemi výrazně neliší (Graf 12).

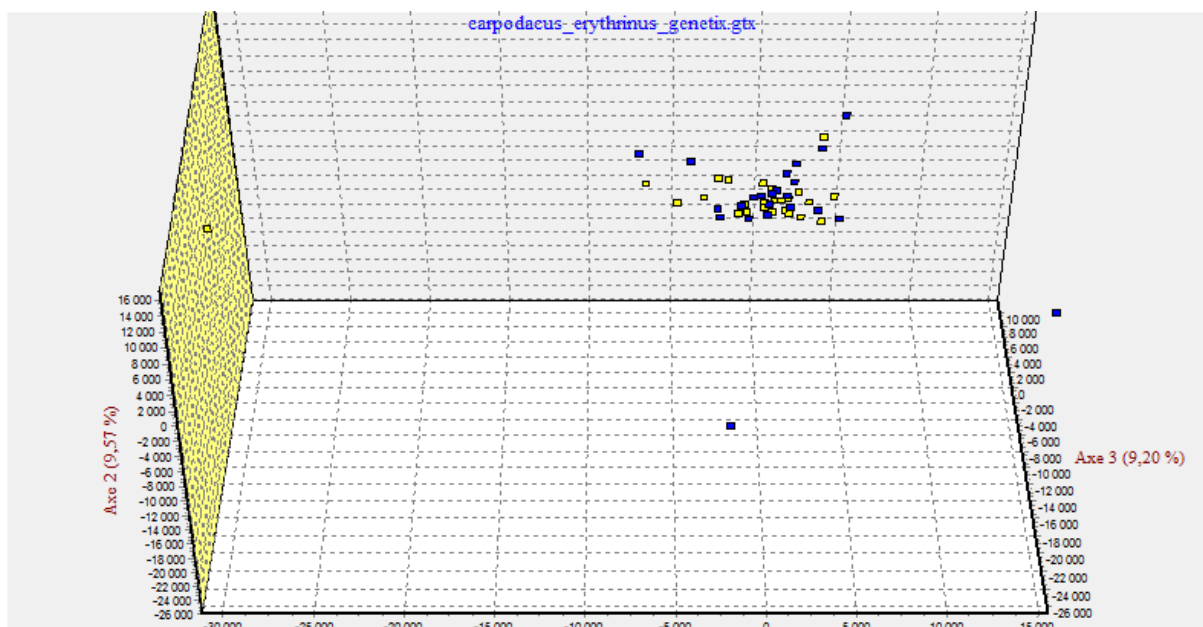
Tab. 13: Frekvence privátních alel kandidátních genů dvou populací hýla rudého. CZG = *C. e. erythrinus*; BulTur = *C. e. kubanensis*

populace	lokus	alela	frekvence
CZG	SERTA	322	0,023
CZG	ADCYAP1A	154	0,012
CZG	ADCYAP1A	162	0,012
CZG	ADCYAP1A	167	0,047
CZG	ADCYAP1A	169	0,012
BulTur	ClockA	117	0,019
BulTur	Creb1A	268	0,019
BulTur	SERTA	323	0,019
BulTur	SERTA	329	0,019
BulTur	ADCYAP1A	153	0,019
BulTur	ADCYAP1A	160	0,019
BulTur	ADCYAP1A	164	0,019



Graf 12: Frekvence alel jednotlivých kandidátních lokusů u dvou populací hýla rudého.

Z výsledků korespondenční analýzy genotypů kandidátních lokusů můžeme vidět, že dvě populace hýla rudého v těchto lokusech neliší (Graf 13). Tato analýza slouží spíše jako zobrazovací metoda a pro průkaznost pozorované patrnosti bylo potřeba výsledek ověřit.

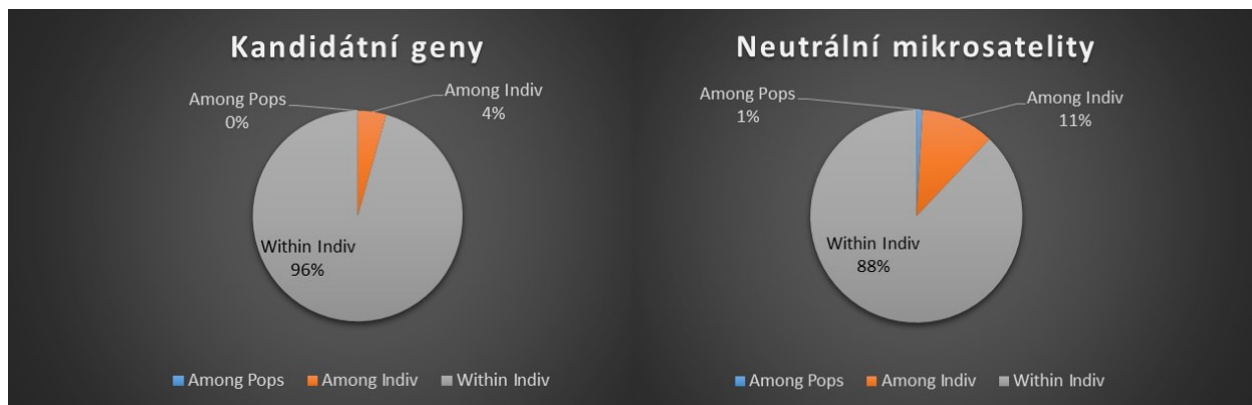


Graf 13: Graf zobrazující výsledky korespondenční analýzy kandidátních genů u hýla rudého. Žlutou barvou jsou znázorněni jedinci patřící k poddruhu *C.e.erythrinus*, modrou barvou pak jedinci patřící k poddruhu *C.e.kubanensis*.

Výsledek jsem ověřila metodou výpočtu F_{st} a analýzou molekulární variance (AMOVA). Párové F_{st} populací hýla rudého signifikantně neprokázalo žádnou významnou genetickou diferenciaci ($p > 0,05$) mezi dvěma poddruhy u kandidátních lokusů (Tab. 14). F_{st} hodnota u neutrálních mikrosatelitů byla sice nízká, ale průkazně se lišila od nuly ($p < 0,05$). Genetická diverzita neutrálních mikrosatelitů dvou populací hýla rudého byla vysvětlena v 1% rozdílností mezi populacemi (Graf 14).

Tab. 14: Hodnoty F_{st} pro jednotlivé lokusy a celkově pro kandidátní geny (KG) a neutrální mikrosatelity (NM) získané párovým testováním.

	Clock	NPAS2	Creb1	SERT	ADCYAP1	KG	NM
F_{st}	0,021	0,002	-0,017	-0,013	-0,007	-0,002	0,009
p - hodnota	0,091	0,404	0,992	0,914	0,760	0,549	0,016



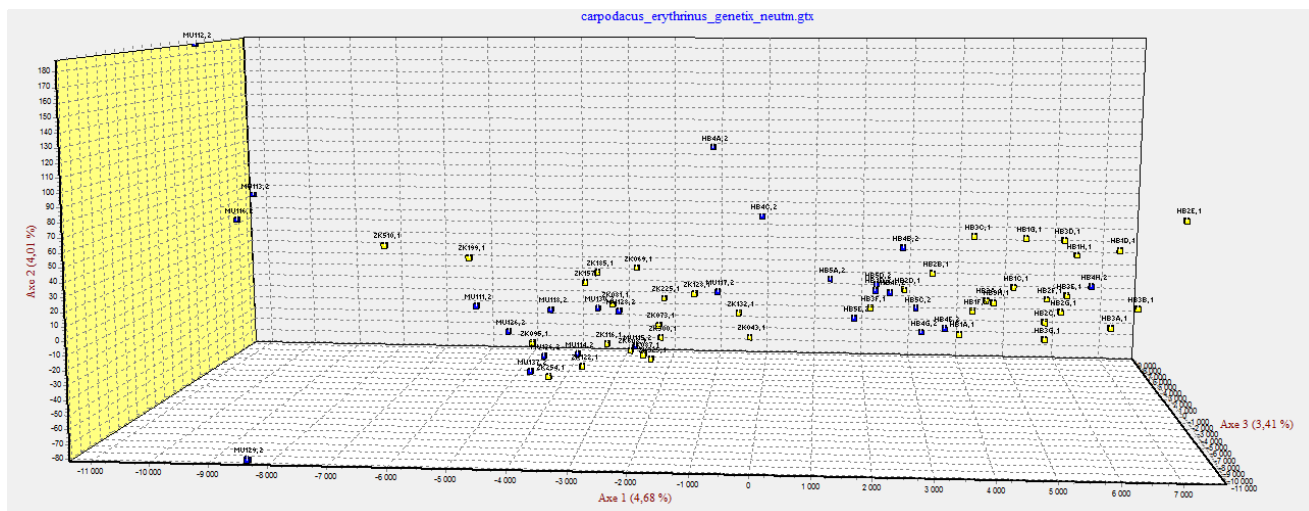
Graf 14: Zobrazení rozložení genetické diverzity v rámci zkoumaných populací hýla rudého.

Grafické zobrazení výsledků Bayesiánské admixture analýzy z programu Structure potvrzuje výsledek, že se tyto dvě populace geneticky neliší ve sledovaných kandidátních lokusech (Graf 15). Graf zobrazuje pravděpodobnost, že jedinec patří do dané populace. Zde vidíme, že program není schopen jedince rozdělit do dvou skupin na základě genetické diverzity.



Graf 15: Grafické zobrazení pravděpodobnosti příslušnosti jedinců k jednotlivým populacím.

Výsledky korespondenční analýzy neutrálních mikrosatelitů ukazují, že zkoumaní jedinci vykazují populační strukturu základě jejich genetické diverzity neutrálních mikrosatelitů (Graf 16).



Graf 16: Korespondenční mapa zobrazující blízkost jedinců obou populací hýla rudého. Žlutou barvou jsou znázorněni jedinci patřící k poddruhu *C.e.erythrinus*, modrou barvou pak jedinci patřící k poddruhu *C.e.kubanensis*.

Stejný výsledek se potvrdil i v programu Structure (Graf 17).



Graf 17: Grafické zobrazení pravděpodobnosti příslušnosti jedinců k jednotlivým populacím.

Shrnutí výsledků

Ve své práci jsem se snažila ověřit předpoklad, že temperátní druhy budou mít oproti druhům tropickým sníženou variabilitu v genech souvisejících s načasováním cirkunálního cyklu a s migrací. Výsledky randomizačních oboustranných testů neutrálních mikrosatelitů ukázaly signifikantně sníženou allelic richness i gene diversity u tropických druhů. Jednostranné randomizační testy lokusů kandidátních genů neukázaly signifikantně sníženou variabilitu u temperátních druhů.

V druhé části své práce, ve které jsem se zabývala dvěma populacemi hýla rudého, jsem zjistila, že tyto dvě populace se geneticky významně neliší ani na lokusech kandidátních genů, ani na lokusech neutrálních mikrosatelitů.

Diskuze

V posledních letech se hodně studovaným tématem staly biorytmy a geny s nimi spojené. Asociační studie se zaměřovaly na kandidátní geny, které se s danými vlastnostmi spojují. Studovány byly jak druhy chované v zajetí, tak druhy žijící volně. Vztahy genů a behaviorálního fenotypu volně žijících, nemodelových organismů bylo možné díky tomu, že si geny zachovávají svou funkci i u fylogeneticky velmi vzdálených linií (Fitzpatrick et al., 2005). Některé asociační studie vysvětlovaly výsledný fenotyp vlivem jedné alely. Například u vlaštovek obecných bylo zpoždění odletu na hnízdiště a tedy opoždění celého hnízdění spojováno s delší alelou na CLOCK lokusu. Jiné studie spojovaly délku Clock alel s geografickým rozšířením a tím souvisejícím načasováním odletu na hnízdiště. Vysvětlovaly délku alel jednoho lokusu jako adaptaci k včasnému odletu na hnízdiště v závislosti na latitudě. Asociační studie byly ve svých výsledcích velmi nekonzistentní.

Diverzita tropických a temperátních druhů

Pro srovnání diverzity tropických a temperátních druhů jsem získala genotypy skoro 500 jedinců z 6 čeledí. Studovanými tropickými druhy byly *Linurgus olivaceus*, *Crithagra burtoni*, *Oreocossypha isabellae*, *Muscicapa adusta*, *Passer griseus*, *Turdus pelios*, *Sylvia abyssinica* a *Bradypterus lopezi*. Mezi studované temperátní druhy jsem zařadila druhy *Chloris chloris*, *Serinus serinus*, *Erithacus rubecula*, *Ficedula albicollis*, *Passer domesticus*, *Turdus merula*, *Sylvia atricapilla* a *Locustella luscinioides*. Nejprve jsem prověřila, jak se liší genetická variabilita lokusů neutrálních mikrosatelitů mezi tropickými a temperátními druhy. K tomu jsem využila oboustranné randomizační testy programu FSTAT. Nalezla jsem u tropických druhů nižší genetickou diverzitu neutrálních mikrosatelitů.

Frekvence alel

Nejčastěji studovaným kandidátním genem v souvislosti s biorytmy byl CLOCK. Na tomto lokusu jsem našla celkově nízkou míru polymorfismu. Počet alel se pohyboval od 1 do 5. Monomorfní byl tento lokus u 4 druhů (*Erithacus rubecula*, *Crithagra burtoni*, *Passer domesticus*, *Passer griseus*). U pěti druhů jsem našla pouze dvě alely (*Ficedulla albicollis*, *Muscicapa adusta*, *Turdus merula*, *Locustella luscinioides*, *Bradypterus lopezi* a *Sylvia abyssinica*). Pozorovaná heterozygotnost byla také v průměru nízká. Tato zjištění odpovídají údajům předešlých studií (Bazzi et al., 2015; Caprioli et al., 2012; Chakarov et al., 2013; Dor, Lovette, et al., 2011; Johnsen et al., 2007; Liedvogel & Sheldon,

2010). Naopak u druhů *Cyanistes caeruleus* a *Luscinia svecica* (Johnsen et al., 2007), *Saxicola rubetra* (Saino et al., 2015) a *Junco* (Peterson et al., 2013) byl nalezen podstatně vyšší počet alel, dokonce až 9. U druhu *Sylvia atricapilla* našli Jakob C. Mueller et al., (2011) 8 alel na CLOCK lokusu, zatímco v mé práci jsem objevila pouze 3 alely. Dalším genem studovaným v souvislosti s biorytmy je NPAS2. U tohoto genu jsem zjistila ještě menší variabilitu než u předešlého lokusu. Počet alel se pohyboval od 1 do 4, ale nejčastěji byl lokus monomorfní nebo se 2 alelami. Tato zjištění souhlasí s výsledky studií dělaných na druhu *Sylvia atricapilla* (Jakob C. Mueller et al., 2011) a *Buteo buteo* (Chakarov et al., 2013). Naopak *Tachycinetta bicolor* (Bourret & Garant, 2015) a *Phylloscopus trochilus* (Bazzi et al., 2017) měli v předchozích studiích vyšší počet alel. U budníčka to bylo 5 alel, u vlaštovky dokonce 7. Na CREB1 lokusu jsem, stejně jako předešlé studie (Bazzi et al., 2017; Bourret & Garant, 2015; Chakarov et al., 2013; Jakob C. Mueller et al., 2011), našla velký rozptyl počtů alel u různých druhů. U afrického druhu *Bradypterus lopezi* byl tento lokus monomorfní, zatímco *Passer domesticus* měl 14 alel na tomto lokusu. U druhu *Sylvia atricapilla* jsem našla pouze 1 alelu na lokusu SERT, zatímco studie Jakob C. Mueller et al., (2011) našli 3 alely. ADCYAP1 lokus byl v mé práci hodně polymorfní, počet alel se pohyboval od 4 do 12. Toto zjištění souhlasí s předchozími studiemi tohoto lokusu (např.: Bazzi et al., 2015; Chakarov et al., 2013; Peterson et al., 2013) Můžeme tedy vidět, že počty alel se výrazně liší u různých druhů, ale i vnitrodruhově. Nenašla jsem žádnou patrnost variability u migrantů na dlouhou vzdálenost.

Snížená variabilita tropických druhů

Předpokládala jsem vliv stabilizující selekce na lokusech kandidátních genů souvisejících s biorytmy u temperátních druhů ptáků, protože v prostředí v jakém tyto druhy žijí a harmonogram jejich životního cyklu je citlivý na načasování. Vlivem stabilizující selekce by se tedy dala očekávat u těchto druhů snížená genetická variabilita v kandidátních genech, protože stabilizující selekce upřednostňuje průměrné fenotypy a z populace odstraňuje fenotypy extrémní. Jednostranné randomizační testy genetické variability kandidátních lokusů, kde jsem předpokládala nižší genetickou variabilitu u temperátních druhů, tento můj předpoklad nepotvrdily. Tato analýza nepřinesla signifikantní výsledek. Kontrolní analýza neutrálních mikrosatelitů ukázala snížení genetické variability u tropických druhů, což by mohlo být důvodem, proč se nám nepodařilo naši hypotézu potvrdit. Při porovnávání mohlo snížení celkové genetické variability u tropických druhů zastřít vliv stabilizující selekce u temperátních druhů. Snížení genetické variability může mít mnoho příčin, a proto musíme být při interpretaci takových výsledků opatrní. Snížení genetické variability u tropických druhů mohlo být způsobeno chybou při sběru dat, pokud byli genotypováni příbuzní jedinci. Toto ale není pravděpodobná příčina, protože vzorky temperátních druhů byly sbírány podobným způsobem. Snížení genetické variability a heterozygotnosti v populaci může být způsobeno například inbreedingem (Charlesworth, 2003). Ptáci v tropech mají nižší populační velikosti a ta je dalším faktorem ovlivňujícím genetickou diverzitu (Frankham, 1996). Genetická variabilita může být ovlivněna i životním tempem daných organismů. Mutační rychlost je spojována s rychlostí metabolismu (Martin & Palumbi, 1993). Rychlost metabolismu je u ptáků spojována s prostředím, ve kterém žijí (Weathers, 1979). Tropické druhy ptáků mají nižší bazální metabolický výdej (Bushuev et al., 2018), zatímco temperátní druhy mají rychlejší životní tempo a vyšší metabolismus. Tedy snížená genetická variabilita u tropických druhů ptáků může být vysvětlena jejich způsobem života.

Tropické druhy, blízké příbuzné druhům temperátním, jsou spíše horské druhy a nížinné tropické čeledi nemají v temperátním pásu většinou žádné zástupce. V horském prostředí funguje sezóna do určité míry také. Dalším faktorem, který může významně přispívat k sezónnosti prostředí, jsou období dešťů. Ačkoliv mají africké druhy delší hnízdní období, často i po celý rok, může být hnízdění časováno v závislosti na těchto obdobích (viz. *Bradypterus lopezi*).

Carpodacus erythrinus

Dalším zkoumaným druhem v mé práci byl hýl rudý. U dvou poddruhů hýla rudého byly nalezeny odlišné tahové trasy, ačkoliv areál zimoviště byl totožný (Klvaňa et al., 2014). Snažila jsem se zjistit, zda neobjevím vztah mezi genotypem kandidátních genů a migrační trasou. Jedinci odchycení v Čechách a v Německu patřili k poddruhu *Carpodacus erythrinus erythrinus*, zatímco jedinci odchycení v Bulharsku a Turecku patřili k poddruhu *Carpodacus erythrinus kubanensis*. Ve své práci jsem ve zkoumaných vzorcích našla populační strukturu pouze na lokusech neutrálních mikrosatelitů. Poddruhy se ale geneticky nelišily na kandidátních lokusech. Rozdíl mezi populacemi byl u neutrálních mikrosatelitů sice malý, ale signifikantně nenulový. Jasně vymezení poddruhu *C. e. kubanensis* bylo dříve potvrzeno na základě mitochondriální DNA (Pavlova et al., 2005; Šašková, 2010). Tento rozdíl může být způsoben rychlejší mutační rychlostí mitochondriální DNA oproti jaderné (Brown, George, JR., & Wilson, 1979). Ve své práci jsem se zabývala mikrosatelitovými lokusy, které ačkoliv se nacházejí na jaderné DNA, vykazují také vyšší mutační rychlosti. Mutační rychlost mikrosatelitových úseků se může různit i mezi alelami (Schlotterer, Ritter, Harr, & Brem, 1998; Whittaker et al., 2003). Počty privátních alel byly u jednotlivých populací velmi málo frekvencované, což by mohlo naznačovat, že tyto poddruhy nejsou izolované a dochází mezi nimi k velkému toku genů. Toto ale vyvrací studie Hunget al. (2013), která na základě mitochondriální DNA a genů vázaných na pohlaví nezjistila žádný tok genů mezi poddruhy. U jiných druhů byly alely spojovány přímo s rozdílným fenotypem. Například u vlaštovky obecné bylo načasování migrace opožděno u jedinců nesoucí konkrétní alelu Q8 (Dor et al., 2011). Je tedy zvláštní, že u jedinců s takto odlišným fenotypem nebyl nalezen žádný významný rozdíl ve výskytu alel. Velikost vzorků se mezi těmito studii nelišila. Vliv genotypu na výsledný migrační fenotyp se zřejmě může hodně lišit mezi druhy. Dalším možným vysvětlením tohoto výsledku je, že vybrané lokusy těchto genů nejsou zrovna těmi, které u tohoto druhu odpovídají za výsledný migrační fenotyp. Zdá se, že odhalit souvislosti týkající se tahových tras hýla rudého nebude tak snadné. Podle připravované studie Lisovski et al. se zdá, že stejně jako u severských populací (Stach et al., 2016), se tahová trasa hýlů z Německa liší mezi jarní a podzimní migrací, tedy jsou schopni následovat obě trasy. Toto schéma se nepotvrdilo u české populace. Je možné, že u hýlů není tahová trasa dána variabilitou genotypu, ale třeba je řízena jinými epigenetickými nebo environmentálními faktory.

Výsledek mé práce ukazuje na to, že řízení migrace a biorytmů celkově bude velice komplexní mechanismus, který nebude jednoduché rozkrýt.

Závěr

Tato práce se sestávala ze dvou hlavních částí. V první části své práce jsem se snažila ověřit hypotézu, že u temperátních druhů ptáků, které žijí ve vysoce sezónních podmínkách a podnikají každoroční migrace na vzdálená zimoviště, jsou tyto geny pod vlivem stabilizující selekce. Vliv stabilizující selekce jsme na tyto geny předpokládaly z toho důvodu, že pokud jsou tyto geny zodpovědné za správné načasování migrace a jiných událostí cirkanuálního cyklus, jsou pro tyto druhy životně důležité. Tedy jsem předpokládala sníženou genetickou variabilitu na mikrosatelitových lokusech kandidátních genů u temperátních druhů oproti druhům tropickým. Tento vztah se nám neukázal, což může být způsobeno celkově sníženou genetickou variabilitou u tropických druhů z neznámého důvodu.

V druhé části své práce jsem se zabývala dvěma poddruhy hýla rudého, konkrétně střeoevropským *Carpodacus erythrinus erythrinus* a východním poddruhem *Carpodacus erythrinus kubanensis*. U těchto dvou populací bylo díky geolokátorovým studiím zjištěno, že se jejich tahové trasy liší, ačkoliv areál zimoviště je stejný. Snažila jsem se tedy zjistit, zda jsou tyto dvě populace geneticky odlišné na lokusech kandidátních genů, které by měli s migrací souviset. Neobjevila jsem genetickou diferenciaci na lokusech souvisejích s biorytmy. Na lokusech neutrálních mikrosatelitů se ukázala slabá populační struktura. V dalších pracích by bylo potřeba sledovat i další možné vlivy, které by mohly ve spolupráci s genotypem ovlivňovat výsledný fenotyp migračního chování.

Seznam použité literatury

- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (1998). *Základy buněčné biologie*.
- Arizaga, J., Van Wilgenburg, S. L., Alonso, D., Cortés, J. A., Leconte, M., Rguibi, H., ... Hobson, K. A. (2016). Breeding origins and pattern of migration of Bluethroats *Luscinia svecica* wintering from Iberia to Senegal as revealed by stable isotopes. *Bird Study*, *63*(2), 196–202. <https://doi.org/10.1080/00063657.2016.1182963>
- Azzi, A., Dallmann, R., Casserly, A., Rehrauer, H., Patrignani, A., Maier, B., ... Brown, S. A. (2014). Circadian behavior is light-reprogrammed by plastic DNA methylation. *Nature Publishing Group*, *17*(3), 377–382. <https://doi.org/10.1038/nn.3651>
- Bailey, M. J., Beremand, P. D., Hammer, R., Bell-Pedersen, D., Thomas, T. L., & Cassone, V. M. (2003). Transcriptional Profiling of the Chick Pineal Gland, a Photoreceptive Circadian Oscillator and Pacemaker. *Molecular Endocrinology*, *17*(10), 2084–2095. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0121>
- Bairlein, F., Alström, P., Aymí, R., Clement, P., Dyrz, A., Gargallo, G., ... Svensson, L. (2006). *Handbook of the Birds of the World – vol. 11*. (J. del Hoyo, A. Elliott, & D. A. Christie, Eds.).
- Bazzi, G., Ambrosini, R., Caprioli, M., Costanzo, A., Liechti, F., Gatti, E., ... Rubolini, D. (2015). Clock gene polymorphism and scheduling of migration : a geolocator study of the barn swallow *Hirundo rustica*. *Nature Publishing Group*, (July), 1–7. <https://doi.org/10.1038/srep12443>
- Bazzi, G., Cecere, J. G., Caprioli, M., Gatti, E., Gianfranceschi, L., Podofillini, S., ... Rubolini, D. (2016). Clock gene polymorphism, migratory behaviour and geographic distribution: a comparative study of trans-Saharan migratory birds. *Molecular Ecology*, *25*(24), 6077–6091. <https://doi.org/10.1111/mec.13913>
- Bazzi, G., Galimberti, A., Hays, Q. R., Bruni, I., Cecere, J. G., Gianfranceschi, L., ... Bioscience, D. (2016). Adcyap1 polymorphism covaries with breeding latitude in a Nearctic migratory songbird , the Wilson ' s warbler (*Cardellina pusilla*), 3226–3239. <https://doi.org/10.1002/ece3.2053>
- Bazzi, G., Podofillini, S., Gatti, E., Gianfranceschi, L., Cecere, J. G., Spina, F., ... Rubolini, D. (2017). Candidate genes have sex-specific effects on timing of spring migration and moult speed in a long-distance migratory bird. *Oxford University Pressuniversity Press*, *63*, 479–486. <https://doi.org/10.1093/cz/zow103>

- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Bonhomme, F. (1996). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Bell-pedersen, D., Cassone, V. M., Earnest, D. J., Golden, S. S., Hardin, P. E., Thomas, T. L., & Zoran, M. J. (2005). CIRCADIAN RHYTHMS FROM MULTIPLE OSCILLATORS : LESSONS FROM DIVERSE ORGANISMS, (June), 1–13. <https://doi.org/10.1038/nrd1633>
- Berthold, P. (1996). *Control of Bird Migration*. Springer Netherlands. Retrieved from <https://books.google.cz/books?id=jzM2NHIA6KIC>
- Bertolucci, C., Cavallari, N., Colognesi, I., Aguzzi, J., Chen, Z., Caruso, P., ... Pinotti, M. (2008). Evidence for an Overlapping Role of CLOCK and NPAS2 Transcription Factors in Liver Circadian Oscillators. *Molecular and Cellular Biology*, 28(9), 3070–3075. <https://doi.org/10.1128/MCB.01931-07>
- Bourret, A., & Garant, D. (2015). Candidate gene – environment interactions and their relationships with timing of breeding in a wild bird population. <https://doi.org/10.1002/ece3.1630>
- Brown, W. M., George, M., JR., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Resources*, 76(4), 1967–1971. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12575>
- Brownstein, M. J., Carpten, J. D., & Smith, J. R. (1996). Modulation of Non-Templated Nucleotide Addition by Taq DNA Polymerase: Primer Modifications that Facilitate Genotyping. *Biotechniques*, 20(6).
- Buhr, E. D., & Takahashi, J. S. (2013). Molecular components of the mammalian circadian clock. *Springer-Verlag*. <https://doi.org/10.1038/35011511>
- Bushuev, A., Tolstenkov, O., Zubkova, E., Solovyeva, E., & Kerimov, A. (2018). Basal metabolic rate in free-living tropical birds: the influence of phylogenetic, behavioral, and ecological factors. *Current Zoology*, 64(1), 33–43. <https://doi.org/10.1093/cz/zox018>
- Canli, T., & Lesch, K. P. (2007). Long story short: The serotonin transporter in emotion regulation and social cognition. *Nature Neuroscience*, 10(9), 1103–1109. <https://doi.org/10.1038/nn1964>
- Caprioli, M., Ambrosini, R., Boncoraglio, G., Gatti, E., Romano, A., Romano, M., ... Saino, N. (2012). Clock Gene Variation Is Associated with Breeding Phenology and Maybe under Directional Selection in the Migratory Barn Swallow, 7(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035140>
- Carlezon Jr., W. A., Duman, R. S., Nestler, E. J., Carlezon, W. a, Duman, R. S., & Nestler, E. J. (2005). The many faces of CREB. *Trends in Neurosciences*, 28(8), 436–445.

<https://doi.org/10.1016/j.tins.2005.06.005>

- Cassone, V., & Menaker, M. (1984). *Is the avian circadian system a neuroendocrine loop? J. The Journal of experimental zoology* (Vol. 232). <https://doi.org/10.1002/jez.1402320321>
- Cepák, J., Formánek, J., Horák, D., Jelínek, M., Klvaňa, P., Schröpfer, L., ... Zárýbnický, J. (2013). *Atlas migrace ptáků*. Aventinum.
- Chakarov, N., Jonker, R. M., Boerner, M., Hoffman, J. I., & Krüger, O. (2013). Variation at phenological candidate genes correlates with timing of dispersal and plumage morph in a sedentary bird of prey. *Molecular Ecology*, 22(21), 5430–5440. <https://doi.org/10.1111/mec.12493>
- Charlesworth, D. (2003). Effects of Inbreeding on the Genetic Diversity of Populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358, 1051–1070. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1296>
- Collar, N. (2005). *Handbook of the Birds of the World – vol. 10*. (J. del Hoyo, A. Elliott, & D. A. Christie, Eds.).
- Collar, N., Newton, I., Clement, P., & Arkhipov, V. (2010). *Handbook of the Birds of the World – vol. 15*. (J. del Hoyo, A. Elliott, & D. A. Christie, Eds.).
- Collar, N., & Robson, C. (2007). *Handbook of the Birds of the World – vol. 12*. (J. del Hoyo, A. Elliott, & D. A. Christie, Eds.).
- Contina, A., Bridge, E. S., Ross, J. D., Shipley, J. R., & Kelly, J. F. (2018). Examination of clock and *Adcyap1* gene variation in a neotropical migratory passerine. *PLoS ONE*, 13(1), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190859>
- Cramp, S., & Perrins, C. M. (1994). *Handbook of the Birds of Europe, the Middle East and North Africa, vol. 5*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Dawson, D. A., Ball, A. D., Spurgin, L. G., Martín-Gálvez, D., Stewart, I. R. K., Horsburgh, G. J., ... Burke, T. (2013). High-utility conserved avian microsatellite markers enable parentage and population studies across a wide range of species. *BMC Genomics*, 14. Retrieved from <http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=medl&AN=23497230>
- Dawson, D. A., Horsburgh, G. J., Küpper, C., Stewart, I. R. K., Ball, A. D., Durrant, K. L., ... Burke, T. (2010). New methods to identify conserved microsatellite loci and develop primer sets of high cross-species utility - as demonstrated for birds. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 475–494.

<https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02775.x>

DeBruyne, J. P., Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (2007). CLOCK and NPAS2 have overlapping roles in the suprachiasmatic circadian clock. *Nature Neuroscience*, *10*(5), 543–545.

<https://doi.org/10.1038/nn1884>

Dor, R., Cooper, C. B., Lovette, I. J., Massoni, V., Bulit, F., Liljestrom, M., & Winkler, D. W. (2011). Clock gene variation in Tachycineta swallows. *Ecology and Evolution*, *2*(1), 95–105.

<https://doi.org/10.1002/ece3.73>

Dor, R., Lovette, I. J., Safran, R. J., Billerman, S. M., Huber, G. H., Vortman, Y., ... Winkler, D. W. (2011). Low Variation in the Polymorphic Clock Gene Poly-Q Region Despite Population Genetic Structure across Barn Swallow (*Hirundo rustica*) Populations, *6*(12).

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028843>

Dunlap, J. C. (1999). Molecular Bases for Circadian Clocks Review. *Cell*, *96*, 271–290.

Edwards, H. A., Hajduk, G. K., Durieux, G., Burke, T., & Dugdale, H. L. (2015). No association between personality and candidate gene polymorphisms in a wild bird population. *PLoS ONE*, *10*(10), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138439>

Fitzpatrick, M. J., Ben-Shahar, Y., Smid, H. M., Vet, L. E. M., Robinson, G. E., & Sokolowski, M. B. (2005). Candidate genes for behavioural ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, *20*(2), 96–104. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.11.017>

Frankham, R. (1996). Relationship of Genetic Variation to Population Size in Wildlife. *Society for Conservation Biology*, *10*(6), 1500–1508.

Friesen, O. W., & Block, G. D. (1984). What is a biological oscillator? *American Physiological Society*, 847–851.

Gau, D., Lemberger, T., Gall, C. Von, Kretz, O., Minh, N. Le, Gass, P., ... Geneva, C.-. (2002). Phosphorylation of CREB Ser142 Regulates Light-Induced Phase Shifts of the Circadian Clock University of Geneva, *34*, 245–253.

Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H. B., Davis, F. C., Lisa, D., King, D. P., ... Weitz, C. J. (2002). Role of the CLOCK Protein in the Mammalian Circadian Mechanism controls the periodicity and persistence of Role of the CLOCK Protein the Mammalian Circadian Mechanism in, *280*(5369), 1564–1569.

Goudet, J. (2001). FSTAT a program to estimate and test gene diversities and fixation indices.

- Goymann, W., Helm, B., Jensen, W., Schwabl, I., Moore, I. T., Building, G. K., & Glasgow, G. (2012). A tropical bird can use the equatorial change in sunrise and sunset times to synchronize its circannual clock, (May), 3527–3534. <https://doi.org/10.1098/rspb.2012.0743>
- Gwinner, E., & Scheuerlein, A. (1998). Seasonal changes in daylight intensity as a potential zeitgeber of circannual rhythms in equatorial Stonechats, *139*, 407–412. Retrieved from [papers2://publication/uuid/5C0A544A-5608-47C9-9589-AC89D5A5E53F](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10169227/)
- Hannibal, J., Ding, J. M., Chen, D., Fahrenkrug, J., Larsen, P. J., Gillette, M. U., & Mikkelsen, J. D. (1998). Pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) in the retinohypothalamic tract: A daytime regulator of the biological clock. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *865*(7), 197–206. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb11179.x>
- Haruštiaková, D., Jarkovský, J., Littnerová, S., & Ladislav, D. (2012). *Vícerozměrné statistické metody v biologii*.
- Hirunagi, K. (1998). Extra-retinal Photoreceptors in Birds Morphological and Functional, *69*(6), 533–545.
- Homberg, J. R., & Lesch, K. P. (2011). Looking on the bright side of serotonin transporter gene variation. *Biological Psychiatry*, *69*(6), 513–519. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2010.09.024>
- Honma, S. (2018). The mammalian circadian system: a hierarchical multi-oscillator structure for generating circadian rhythm. *Journal of Physiological Sciences*, *68*(3), 207–219. <https://doi.org/10.1007/s12576-018-0597-5>
- Hořák, D., Tószögyová, A., & Storch, D. (2015). Relative food limitation drives geographical clutch size variation in South African passerines: A large-scale test of Ashmole's seasonality hypothesis. *Global Ecology and Biogeography*, *24*(4), 437–447. <https://doi.org/10.1111/geb.12261>
- Hung, C., Drovetski, S. V., & Zink, R. M. (2013). Molecular Phylogenetics and Evolution Recent allopatric divergence and niche evolution in a widespread Palearctic bird, the common rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *66*(1), 103–111. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.09.012>
- Johnsen, A., Fidler, A. E., Kuhn, S., Carter, K. L., Hoffmann, A., Barr, I. R., ... Kempnaers, B. (2007). Avian Clock gene polymorphism : evidence for a latitudinal cline in allele frequencies. *Molecular Ecology*, *16*, 4867–4880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03552.x>
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*,

- 16, 1099–1106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03089.x>
- Kewley, R. J., Whitelaw, M. L., & Chapman-smith, A. (2004). The mammalian basic helix – loop – helix / PAS family of transcriptional regulators, *36*, 189–204. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(03\)00211-5](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(03)00211-5)
- Klvaňa, P., Cepák, J., Albrecht, T., Munclinger, P., & Šurulinkov, P. (2014). Sledování migrace hýlů rudých za použití geolokátorů. *Kroužkovatel*, *17*, 7–8.
- Kopelman, N. M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N. A., & Mayrose, I. (n.d.). CLUMPAK: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molecular Ecology Resources*. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12387>
- Leberg, P. L. (2002). Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology*, *11*, 2445–2449.
- Lee, B., Li, A., Hansen, K. F., Cao, R., Yoon, J. H., & Obrietan, K. (2010). CREB Influences Timing and Entrainment of the SCN Circadian Clock. *J Biol Rhythms*, *25*(6), 410–420. <https://doi.org/10.1177/0748730410381229>.CREB
- Lemay, M. A., & Russello, M. A. (2014). Latitudinal cline in allele length provides evidence for selection in a circadian rhythm gene. *Biological Journal of the Linnean Society*, *111*(4), 869–877. <https://doi.org/10.1111/bij.12267>
- Lesch, K.-P., Bengel, D., Heils, A., Sabol, S. Z., Benjamin, D., Petri, S., ... Dennis, L. (1996). Association of Anxiety-Related Traits with a Polymorphism in the Serotonin Transporter Gene Regulatory Region Published by : American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2892226>. *Science*, *274*(5292), 1527–1531. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385897-9.00003-3>
- Li, Y. C., Korol, A. B., Fahima, T., & Nevo, E. (2004). Microsatellites within genes: Structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, *21*(6), 991–1007. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh073>
- Liedvogel, M., & Sheldon, B. C. (2010). Low variability and absence of phenotypic correlates of Clock gene variation in a great tit *Parus major* population. *Journal of Avian Biology*, *41*(5), 543–550. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2010.05055.x>
- Liedvogel, M., Szulkin, M., Knowles, S. C. L., Wood, M. J., & Sheldon, B. C. (2009). Phenotypic correlates of clock gene variation in a wild blue tit population: Evidence for a role in seasonal timing of reproduction. *Molecular Ecology*, *18*(11), 2444–2456. <https://doi.org/10.1111/j.1365->

294X.2009.04204.x

- Lislevand, T., Chutný, B., Byrkjedal, I., Pavel, V., Briedis, M., Adamik, P., & Hahn, S. (2015). Red-spotted Bluethroats *Luscinia s. svecica* migrate along the Indo-European flyway: A geolocator study. *Bird Study*, *62*(4), 508–515. <https://doi.org/10.1080/00063657.2015.1077781>
- Lisovski, S., Neumann, R., Ahola, M. P., Albrecht, T., Bauer, S., Cepak, J., ... Briedis, M. (n.d.). The Indo-European Flyway: Opportunities and constraints reflected by Common Rosefinches breeding across Europe.
- Martin, A. P., & Palumbi, S. R. (1993). Body size, metabolic rate, generation time, and the molecular clock. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *90*(9), 4087–4091. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4087>
- McMillan, J. P., Underwood, H. A., Elliott, J. A., Stetson, M. H., & Menaker, M. (1975). Extraretinal light perception in the sparrow IV. Further evidence that the eyes do not participate in photoperiodic photoreception. *Journal of Comparative Physiology ■ A*, *97*(3), 205–213. <https://doi.org/10.1007/BF00617543>
- Mettler, R., Segelbacher, G., & Martin Schaefer, H. (2015). Interactions between a candidate gene for migration (*ADCYAP1*), morphology and sex predict spring arrival in blackcap populations. *PLoS ONE*, *10*(12), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144587>
- Miyamoto, Y., & Sancar, A. (1999). Circadian regulation of cryptochrome genes in the mouse. *Molecular Brain Research*, *71*(2), 238–243. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00192-8](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00192-8)
- Mueller, J. C., Partecke, J., Hatchwell, B. J., Gaston, K. J., & Evans, K. L. (2013). Candidate gene polymorphisms for behavioural adaptations during urbanization in blackbirds. *Molecular Ecology*, *22*(13), 3629–3637. <https://doi.org/10.1111/mec.12288>
- Mueller, Jakob C., Pulido, F., & Kempnaers, B. (2011). Identification of a gene associated with avian migratory behaviour. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*(1719), 2848–2856. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.2567>
- Nagy, A. D., & Csernus, V. J. (2007). The role of PACAP in the control of circadian expression of clock genes in the chicken pineal gland. *Peptides*, *28*(9), 1767–1774. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.07.013>
- Nei, M. (1973). Analysis of Gene Diversity in Subdivided Populations MASATOSHI NEI Center for Demographic and Population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *70*(12), 3321–3323. Retrieved from <https://www.pnas.org/content/pnas/70/12/3321.full.pdf>

- Newton, I. (2007). *The Migration Ecology of Birds. The Migration Ecology of Birds.*
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-517367-4.X5000-1>
- Nilsson, A. L. K., Alerstam, T., & Nilsson, J. Å. (2008). Diffuse, short and slow migration among Blue Tits. *Journal of Ornithology*, 149(3), 365–373. <https://doi.org/10.1007/s10336-008-0280-3>
- O'Malley, K. G., & Banks, M. A. (2008). A latitudinal cline in the Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) Clock gene: Evidence for selection on PolyQ length variants. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1653), 2813–2821.
<https://doi.org/10.1098/rspb.2008.0524>
- O'Malley, K. G., Ford, M. J., & Hard, J. J. (2010). Clock polymorphism in Pacific salmon: Evidence for variable selection along a latitudinal gradient. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1701), 3703–3714. <https://doi.org/10.1098/rspb.2010.0762>
- Panda, S., Hogenesch, J. B., & Kay, S. A. (2002). Circadian rhythms from flies to human, (June).
<https://doi.org/10.1038/417329a>
- Pavlova, A., Zink, R. M., & Rohwer, S. (2005). Evolutionary history, population genetics, and gene flow in the common rosefinch (*Carpodacus erythrinus*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(3), 669–681. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2005.02.010>
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenAEx 6 . 5 : genetic analysis in Excel . Population genetic software for teaching and research — an update, 28(19), 2537–2539.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Peterson, M. P., Abolins-Abols, M., Atwell, J. W., Rice, R. J., Milá, B., & Ketterson, E. D. (2013). Variation in candidate genes CLOCK and ADCYAP1 does not consistently predict differences in migratory behavior in the songbird genus Junco. *F1000Research*, 1–16.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.2-115.v1>
- Pittendrigh, C. (1993). Temporal Organization: Reflections of a Darwinian Clock-Watcher. *Annual Review of Physiology*, 55(1), 17–54. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.55.1.17>
- Pittendrigh, C. S. (1967). Circadian systems. I. The driving oscillation and its assay in *Drosophila pseudoobscura*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 58(4), 1762–1767.
<https://doi.org/10.1073/pnas.58.4.1762>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data.

- Quadros, I. M., Takahashi, A., & Miczek, K. A. (2010). *Serotonin and Aggression. Handbook of Behavioral Neuroscience* (Vol. 21). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S1569-7339\(10\)70106-5](https://doi.org/10.1016/S1569-7339(10)70106-5)
- Reppert, S. M., & Weaver, D. R. (2002). Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, *418*, 935–941.
- Riyahi, S., Sánchez-Delgado, M., Calafell, F., Monk, D., & Senar, J. C. (2015). Combined epigenetic and intraspecific variation of the DRD4 and SERT genes influence novelty seeking behavior in great tit *Parus major*. *Epigenetics*, *10*(6), 516–525.
- Romano, A., Possenti, C. D., Caprioli, M., Gatti, E., Gianfranceschi, L., Rubolini, D., ... Parolini, M. (2018). Circadian genes polymorphism and breeding phenology in a resident bird, the yellow-legged gull. *Journal of Zoology*, *304*(2), 117–123. <https://doi.org/10.1111/jzo.12501>
- Saino, N., Ambrosini, R., Albetti, B., Caprioli, M., De Giorgio, B., Gatti, E., ... Rubolini, D. (2017). Migration phenology and breeding success are predicted by methylation of a photoperiodic gene in the barn swallow. *Scientific Reports*, *7*(February), 1–10. <https://doi.org/10.1038/srep45412>
- Saino, N., Bazzi, G., Gatti, E., Caprioli, M., Cecere, J. G., Possenti, C. D., ... Spina, F. (2015). Polymorphism at the Clock gene predicts phenology of long-distance migration in birds, 1758–1773. <https://doi.org/10.1111/mec.13159>
- Saino, N., Romano, M., Caprioli, M., Fasola, M., Lardelli, R., Micheloni, P., ... Gianfranceschi, L. (2013). Timing of molt of barn swallows is delayed in a rare *Clock* genotype. *PeerJ*, *1*, e17. <https://doi.org/10.7717/peerj.17>
- Šašková, L. (2010). Genetická struktura izolovaných populací hýla rudého (*Carpodacus erythrinus*).
- Schlotterer, C., Ritter, R., Harr, B., & Brem, G. (1998). High mutation rate of a long microsatellite allele in *Drosophila melanogaster* provides evidence for allele-specific mutation rates. *Molecular Biology and Evolution*, *15*(10), 1269–1274. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025855>
- Shaw, P. J., Cirelli, C., Greenspan, R. J., & Tononi, G. (2000). Correlates of Sleep and Waking in *Drosophila melanogaster*. *Science*, *287*(5459), 1834–1837. <https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1834>
- Shigeyoshi, Y., Taguchi, K., Yamamoto, S., Takekida, S., Yan, L., Tei, H., ... Okamura, H. (1997). Light-Induced Resetting of a Mammalian Circadian Clock Is Associated with Rapid Induction of the

- Cell*, 91(7), 1043–1053. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80494-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80494-8)
- Stach, R., Kullberg, C., Jakobsson, S., Ström, K., & Fransson, T. (2016). Migration routes and timing in a bird wintering in South Asia, the Common Rosefinch *Carpodacus erythrinus*. *Journal of Ornithology*, 157(3), 671–679. <https://doi.org/10.1007/s10336-016-1329-3>
- Steinmeyer, C., Mueller, J. C., & Kempnaers, B. (2009). Search for informative polymorphisms in candidate genes: Clock genes and circadian behaviour in blue tits. *Genetica*, 136(1), 109–117. <https://doi.org/10.1007/s10709-008-9318-y>
- Stevenson, T. J., & Prendergast, B. J. (2014). Reversible DNA methylation regulates seasonal photoperiodic time measurement. *PNAS*, 110, 16651–16656. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402460111>
- Stutchbury, Bridget Joan Morton, E. S. (2001). *Behavioral ecology of tropical birds*. *Journal of Chemical Information and Modeling*. Academic Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Summers-Smith, D. (2009). *Handbook of the Birds of the World - vol. 14*. (D. A. Christie, A. Elliott, & J. del Hoyo, Eds.).
- Tachibana, T., Oikawa, D., Adachi, N., Boswell, T., & Furuse, M. (2007). Central administration of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide differentially regulates energy metabolism in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 147(1), 156–164. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.12.043>
- Tachibana, T., Saito, S., Tomonaga, S., Takagi, T., Saito, E. S., Boswell, T., & Furuse, M. (2003). Intracerebroventricular injection of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits feeding in chicks. *Neuroscience Letters*, 339(3), 203–206. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(03\)00017-X](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(03)00017-X)
- Tachida, H., & Iizuka, M. (1992). Persistence of repeated sequences that evolve by replication slippage. *Genetics*, 131(2), 471–478.
- Taylor, B., & Clement, P. (2006). *Handbook of the Birds of the World - vol. 11*. (J. del Hoyo, A. Elliott, & D. A. Christie, Eds.).
- Thresher, R. J., Miyamoto, Y., Kazantsev, A., Hsu, D. S., Petit, C., Selby, C. P., ... Smithies, O. (1998). Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science*, 282(5393), 1490–1494. <https://doi.org/10.1126/science.282.5393.1490>

- Timm, K., Van Oers, K., & Tilgar, V. (2018). SERT gene polymorphisms are associated with risk-taking behaviour and breeding parameters in wild great tits . *The Journal of Experimental Biology*, 221(4), jeb171595. <https://doi.org/10.1242/jeb.171595>
- Toth, G., Gaspari, Z., & Jurka, J. (2000). Microsatellites in Different Eukaryotic Genomes : Survey and Analysis. *Genome Research*, 967–981.
- Weathers, W. W. (1979). Oecologia Climatic Adaptation in Avian Standard Metabolic Rate, 89, 81–89.
- Whittaker, J. C., Harbord, R. M., Boxall, N., Mackay, I., Dawson, G., & Sibly, R. M. (2003). Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates. *Genetics*, 164(2), 781–787.
- Wikelski, M., Martin, L. B., Scheuerlein, A., Robinson, M. T., Robinson, N. D., Helm, B., ... Gwinner, E. (2008). Avian circannual clocks: Adaptive significance and possible involvement of energy turnover in their proximate control. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1490), 411–423. <https://doi.org/10.1098/rstb.2007.2147>
- Zima, J., Macholán, M., Munclinger, P., & Piálek, J. (2004). *Genetické metody v zoologii*. Karolinum.
- Zimmerman, N. H., & Menaker, M. (1979). The pineal gland: a pacemaker within the circadian system of the house sparrow. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(2), 999–1003. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.2.999>