

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Zoologie



Bc. Kamila Opletalová

Morfologie spermií v sekundární kontaktní zóně slavíka obecného a slavíka tmavého
Sperm morphology in the secondary contact zone of Common Nightingale and Thrush
Nightingale

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Radka Reifová, Ph.D.
Konzultant: doc. Mgr. Tomáš Albrecht, Ph.D.

Praha, 2017

Prohlášení

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

V Praze, 15. 8. 2017

.....
Kamila Opletalová

Poděkování

Děkuji všem, kteří mi umožnili a usnadnili psaní této práce. Mé obrovské díky patří mojí skvělé školitelce, Radce Reifové, za vedení při psaní mé práce, její cenné rady a velkou trpělivost. Tomášovi Albrechtovi za konzultace, rady a vedení při praxi v terénu a pomoc se statistickou částí diplomové práce. Děkuji i dalším členům slavičího týmu, Jiřímu Reifovi za organizaci práce v terénu, Lubomíru Piálkovi za práci na sekvenování našich slavíků, Václavu Janouškovi za určení hybridů, Pavlovi Kverkovi za jeho zkušenosti, nakažlivý elán a humor. Pawel Dolata, Becky Cramer, Camille Sotas, Abel Souriau, Hanka Kohoutová – děkuji i vám, bez vás by to nešlo. Díky Pavlíně Opatové za zaškolení v laboratoři. Děkuji Kačence Matúškové za poskytnutí morální podpory, péče a zázemí, když to bylo nejvíce potřeba. A v neposlední řadě děkuji mým rodičům, Alešovi Opletalovi a Lence Opletalové za pomoc s formální úpravou textu a jejich podporu během psaní této práce, stejně jako po celou dobu studia, a Tomášovi Hurychovi, že mě během psaní nenechal vypustit duši.

Abstrakt

Samčí gamety (spermie) jsou často vystaveny silnému pohlavnímu výběru, a proto bývají morfologicky velmi rozmanité a často se liší i mezi blízkými příbuznými druhy. Rychlá evoluce morfologie spermií může být příčinou důležité role spermií v reprodukční izolaci mezi druhy. V rámci této diplomové práce jsem studovala možný vliv změn morfologie spermií v reprodukční izolaci u dvou sesterských druhů pěvců, slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) a slavíka tmavého (*L. luscinia*). Areály obou druhů se střetávají v sekundární kontaktní zóně probíhající střední a východní Evropou, kde se také příležitostně kříží. Porovnávala jsem morfologii spermií u samců obou druhů pocházejících z alopatrických a sympatrických oblastí a mezidruhových hybridů. Výsledky ukázaly, že oba druhy mají zásadně odlišnou délku spermií (rozdíl cca 20 % délky ve prospěch slavíka obecného). Hlavní důvod tohoto rozdílu je zejména odlišná délka krčku (obsahujícího mitochondrie) mezi druhy. Délka spermií mezidruhových hybridů byla intermediární mezi rodičovskými druhy, a zároveň byly oproti předpokladům spermie hybridů morfologicky nepoškozené. Tento nálezn odpovídá pozorované fertilitě F₁ hybridních samců. Za zásadní považuji zjištění, že druhy vykazují větší rozdíl ve velikosti hlavičky spermie v sympatrii ve srovnání s alopatrií, způsobený posunem ve velikosti hlavičky v sympatrii u slavíka obecného. Výsledky prezentované v této diplomové práci ukazují, že divergence v morfologii spermií mezi druhy v tomto případě nepřispívá k vnitřní postzygotické reprodukční izolaci mezi druhy, ale mohla by způsobovat částečnou postkopulační prezygotickou izolaci. Míra izolace by mohla být zvýšená v oblasti sympatrie v důsledku reinforcementu na gametické úrovni.

Klíčová slova

Mezidruhový hybrid, hybridní zóna, slavík, abnormality spermie, reprodukční izolace

Abstract

The male gametes (sperms) are under strong sexual selection and are therefore very diverse in their morphology and often differ even amongst closely related species. Sperms are thus assumed to play very important role in reproductive isolation between species, due to their fast evolution in morphology. In my master thesis, I have studied the possible role of sperm morphology divergence in reproductive isolation in two sister species of passerine birds, the common nightingale (*Luscinia megarhynchos*) and the thrush nightingale (*L. luscinia*). The areas of these species overlap in secondary contact zone running across central and Eastern Europe, where they occasionally hybridize. I have compared sperm morphology of males of both species originating in allopatric and sympatric localities as well as interspecies hybrids. The results showed significant differences in total sperm length which is approximately 20 % longer in the common nightingale. That is caused by great interspecies divergence in midpiece (containing mitochondria) length. Interspecific hybrids showed sperms with intermediate length but despite expectations completely morphologically normal. This outcome corresponds with observed fertility in F₁ hybrid males. What I consider to be an essential finding is a significant divergence in head size in sympatry compared to allopatry. That is caused by a shift of head length in the common nightingale in sympatry. Results presented in my thesis show that interspecies divergence in morphology does not contribute to intrinsic postzygotic reproductive isolation in nightingales but could lead to postcopulatory prezygotic isolation. This type of isolation could be more significant in sympatric area caused by reinforcement on gametic level.

Keywords

Interspecies hybrid, hybrid zone, nightingale, sperm abnormalities, reproductive isolation

Seznam zkratk

ATP – adenosintrifosfát

BC – backcross hybrid, zpětné křížení

F₁ – první filiální (dceřiná) generace

F₂ – druhá filiální generace

HS – hybridní sterilita

KK – křídelní krovky

PBS – fyziologický roztok

RIM – reprodukčně izolační mechanismy

RL – ruční letka

SO – slavík obecný (*Luscinia megarhynchos*)

SNP – jednonukleotidový polymorfismus (single nucleotide polymorphism)

SST – samičí skladovací tubuly (sperm storage tubules)

ST – slavík tmavý (*Luscinia luscinia*)

Obsah

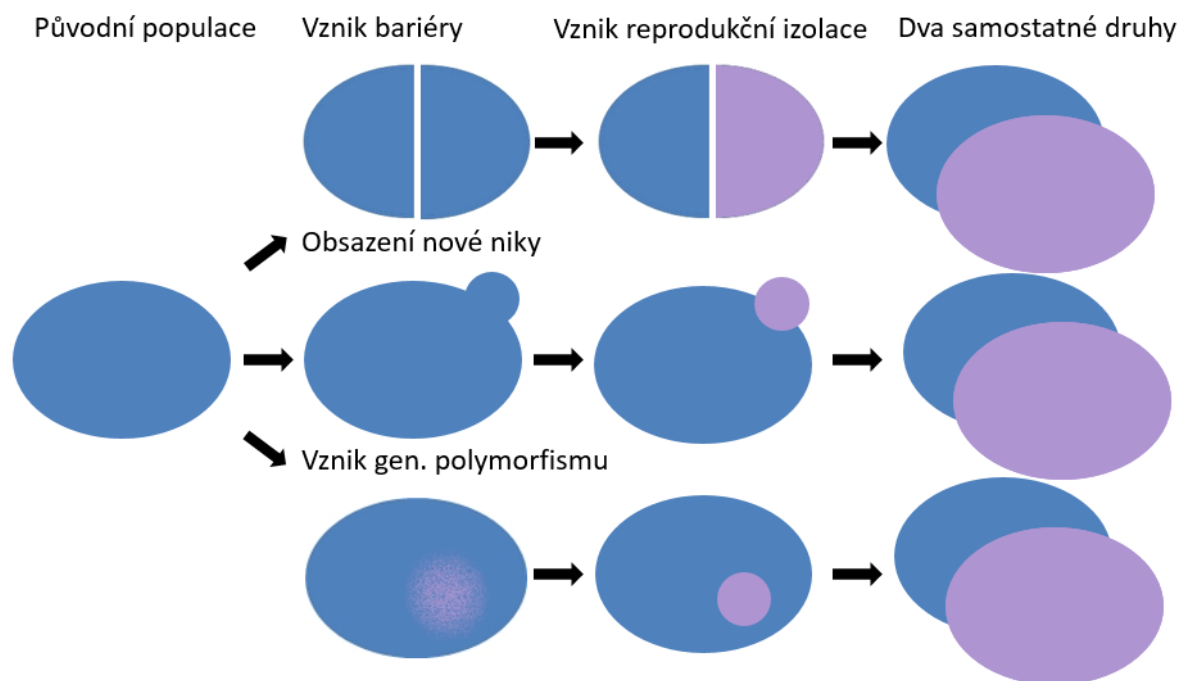
1.	Úvod	1
1.1.	Speciace	1
1.2.	Mezidruhová hybridizace	2
1.3.	Reprodukční izolace	3
1.4.	Morfologie spermií	5
1.4.1.	<i>Abnormality v morfologii spermií</i>	8
1.4.2.	<i>Morfologie spermií u ptáků</i>	8
1.5.	Modelový systém slavíků	10
1.5.1.	<i>Slavík obecný</i>	10
1.5.2.	<i>Slavík tmavý</i>	12
1.5.3.	<i>Mezidruhová hybridizace</i>	13
1.5.4.	<i>Výzkum modelového systému slavíků</i>	14
2.	Cíle práce	16
3.	Materiál a metody	17
3.1.	Odchyt ptáků.....	18
3.2.	Odběr vzorků spermií	18
3.3.	Příprava preparátů spermií.....	18
3.4.	Měření spermií.....	19
3.5.	Analýza abnormalit spermií.....	19
3.6.	Určení hybridů	20
3.7.	Statistická analýza dat	21
4.	Výsledky	23
4.1.	Srovnání morfologie spermií dvou druhů slavíků	23
4.2.	Srovnání morfologie spermií v sympatrické a alopatické oblasti	24
4.3.	Morfologie spermií u mezidruhových hybridů.....	27
5.	Diskuze	29
5.1.	Srovnání morfologie spermií dvou druhů slavíků	29
5.2.	Srovnání morfologie spermií v sympatrické a alopatické oblasti	31
5.3.	Morfologie spermií u mezidruhových hybridů.....	32
6.	Závěr	34
7.	Přehled literatury	35

1. Úvod

K vysvětlení odborných termínů, které ve své diplomové práci používám, je v první řadě potřeba vymezit pojem druh. Existuje několik odlišných a dokonce protichůdných výkladů, a někteří biologové by dokonce argumentovali, že druh, jako takový, existuje pouze jako subjektivní konstrukt člověka (Coyne and Orr, 2004; Mallet, 2001). Nejpřijímanější a nejpoužívanější definicí je takzvaný biologický koncept druhu. Ten popisuje druh jako populaci, ve které se jedinci mohou křížit mezi sebou, ale jsou reprodukčně izolováni od dalších podobných populací či skupin (Mayr, 1942, citováno dle Barton and Hewitt, 1985). Porozumění procesu vzniku druhů je důležitým cílem evoluční biologie již od doby Charlese Darwina, který položil základní kámen pro studium evoluce. V následujících kapitolách přiblížím odlišné mechanismy vzniku druhů, známé typy reprodukční izolace a detailněji se zabývám možnou rolí změn v morfologii spermií při vzniku reprodukční izolace, což je i hlavním cílem této diplomové práce.

1.1. Speciace

Vznik nových druhů v průběhu evoluce je proces označovaný termínem speciace. Speciaci můžeme rozdělit na alopatrickou, parapatrickou a sympatrickou (viz Obrázek 1). Za nejčastější bývá považována speciace alopatrická (Coyne and Orr, 2004), kdy nové druhy vznikají po rozdělení populace původního druhu, obvykle nějakou vnější překážkou (často geografického rázu), a vyvíjejí se po určitou dobu odděleně, bez přítomnosti genového toku. Izolované populace se postupem času přizpůsobují odlišnému prostředí, vznikají a fixují se v nich různé mutace. Když se po určité době dostanou obě populace do sekundárního kontaktu, jsou již natolik odlišné, že jejich křížení není možné, a tvoří dva nové živočišné druhy. Sympatrická speciace naopak probíhá bez jakékoli vnější bariéry za přítomnosti genového toku, zatímco parapatrická speciace pokrývá případy mezi těmito dvěma extrémy – populace jsou částečně geograficky odděleny, avšak stále mezi nimi dochází ke genetické introgresi, v oblasti, kde se populace střetávají. Výše popsané rozdělení lze z teoretického hlediska rovněž charakterizovat mírou počátečního genového toku (m), ke kterému zde dochází. V alopatrii genový tok neprobíhá ($m = 0$), v sympatrii probíhá intenzivně ($m = 0,5$) a v případě parapatrické speciace je vymezen intervalem $0 < m < 0,5$, čili míra genového toku je větší než 0 ale menší než 0,5 (Butlin et al., 2008).



Obrázek 1 – Typy speciace – odshora dolů: speciace alopatriká, parapatrická a sympatriká.

V minulosti převládal názor, že sympatriká speciace (nebo i jiné typy speciace za přítomnosti genového toku, včetně reinforcementu) jen obtížně a zřídka přispívá ke vzniku nových druhů. Mělo se za to, že kvůli intenzivnějšímu genovému toku nedojde k dostatečné divergenci populací, která by vedla ke vzniku reprodukční izolace (Coyne and Orr, 2004). Dnes již víme, že druhy vznikají nejen v oddělených alopatrikých populacích, ale i v sympatrii, a v dalších případech za přítomnosti genového toku (Bolnick and Fitzpatrick, 2007). Otázkou ovšem stále zůstává, nakolik lze speciaci rozřadit do těchto tří izolovaných kategorií (alopatriká, parapatrická či sympatriká speciace), když se v přírodě setkáváme s příklady na celé škále genového toku (Butlin et al., 2008).

1.2. Mezidruhová hybridizace

Mezidruhová hybridizace je jev, při kterém se spolu kříží dva obvykle blízce příbuzné druhy, u nichž se ještě v evoluci nestihla vyvinout úplná reprodukční izolace. Mezidruhová hybridizace není v přírodě nikterak vzácná a dochází k ní u rostlin i u živočichů. Např. u ptáků v přírodě hybridizuje přibližně 10 % druhů (Grant and Grant, 1992). V České republice dochází k hybridizaci například mezi vlaštovkou obecnou (*Hirundo rustica*) a jiříčkou obecnou (*Delichon urbica*) (Randler, 2006), vránou obecnou šedou (*Corvus corone*) a vránou obecnou černou (*Corvus cornix*) (Haring et al., 2007), a příležitostně i ke křížení slavíka obecného

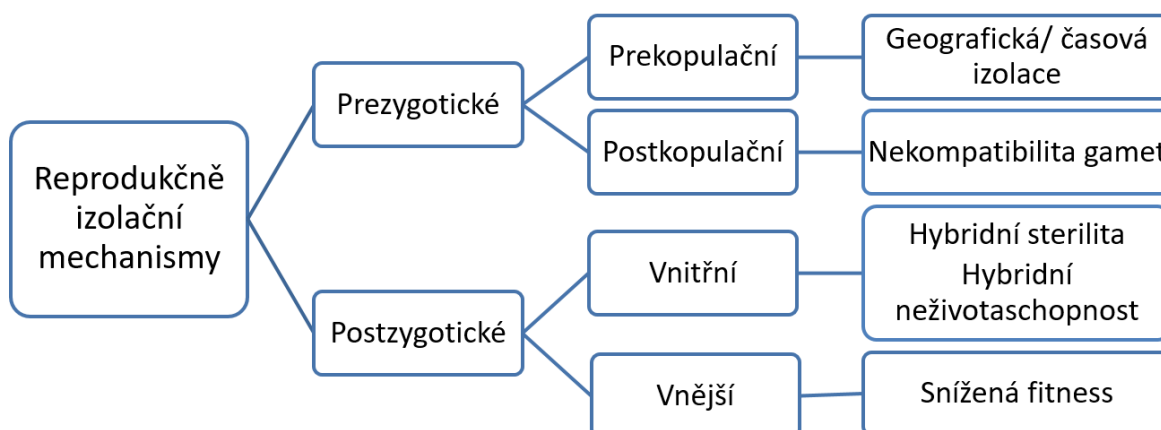
(*Luscinia megarhynchos*) a slavíka tmavého (*L. luscinia*) (Kverek, 2002, citováno dle Kverek 2007a; Reifová et al., 2011a) – podrobněji viz Kapitola 1.5 Modelový systém slavíků.

Pokud dále dochází k plodnému křížení hybridních jedinců s jedinci jednoho nebo obou rodičovských druhů, mluvíme o tzv. genové introgresi, kdy specifické alely jednoho druhu takto pronikají do genotypu druhého druhu (Rheindt and Edwards, 2011). Tímto způsobem by teoreticky mohlo postupem času dojít ke splynutí obou druhů zpět v jeden druh, avšak přírodní či pohlavní výběr působící proti mezidruhovým hybridům vede obvykle postupem času naopak k posílení reprodukční izolace a omezení hybridizace a genové introgrese (mluvíme o tzv. reinforcementu) (Servedio and Noor, 2003).

Hybridní zóny jsou oblasti, ve kterých dochází ke křížení blízkých příbuzných druhů v místech, kde se překrývají jejich areály výskytu. Často nabízejí unikátní podmínky pro výzkum hybridizace a speciace. Tyto zóny nicméně bývají proměnlivé, může docházet k jejich posunům a časem i k postupnému zániku současně s pokročilejší evolucí reprodukční izolace (Barton and Hewitt, 1985).

1.3. Reprodukční izolace

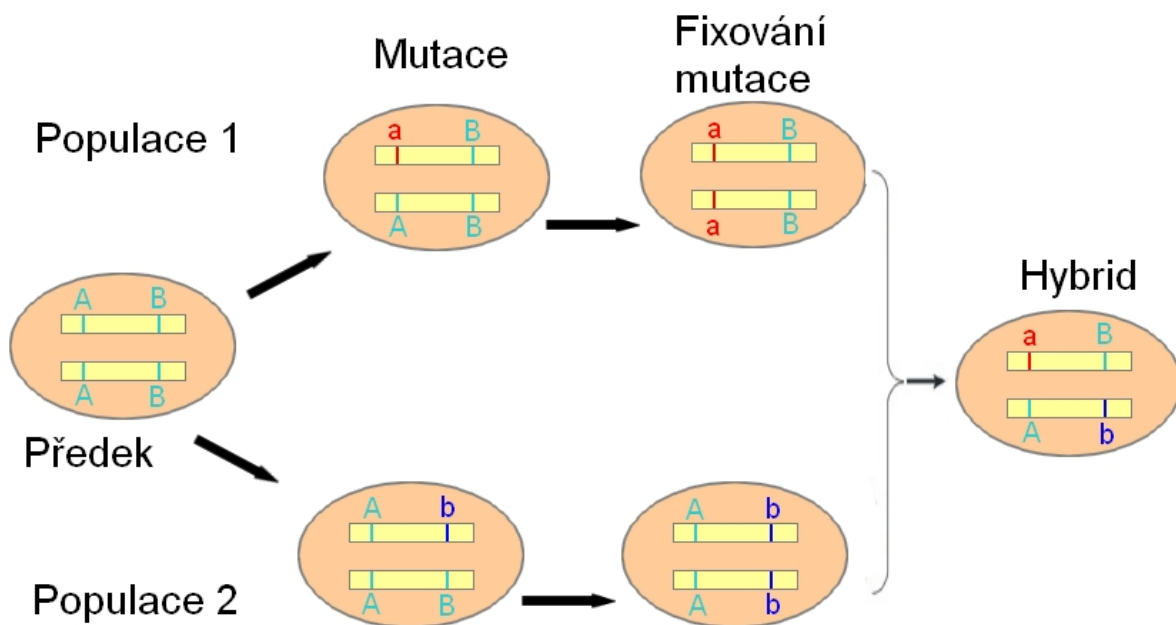
Reprodukčně izolační mechanismy (RIM) jsou mechanismy, které zabraňují hybridizaci a výměně genů mezi druhy, a dávají tak vzniknout reprodukční izolaci. RIM můžeme rozdělit na prezygotické a postzygotické (viz schéma na Obrázku 2), podle toho, zda se projevují před vznikem zygoty, či po jejím vzniku. Prezygotické RIM dále dělíme na prekopulační, které zabraňují křížení mezi druhy, a postkopulační, které brání splynutí gamet dvou druhů.



Obrázek 2 – Schéma rozdělení reprodukčně izolačních mechanismů s příklady.

Postzygotické RIM se projevují až na úrovni F_1 hybridů, nezamezují tedy mezidruhové hybridizaci, ale přispívají k omezení genového toku mezi hybridizujícími druhy, a tímto způsobem rovněž vedou ke vzniku reprodukční izolace. Vnější postzygotické RIM mohou snižovat fitness hybridů v závislosti na vnějším prostředí, například nedostatečnou adaptací hybridů s intermediárním fenotypem na prostředí rodičovských druhů, či sníženým reprodukčním úspěchem, rovněž z důvodu intermediárního fenotypu (hybridi často bývají méně atraktivní pro oba rodičovské druhy). Vnitřní postzygotické RIM jsou na rozdíl od vnějších nezávislé na vnějším prostředí a patří mezi ně hybridní sterilita a neživotaschopnost. Vznikají nahromaděním nekompatibilních mutací podle modelu Bateson-Dobzhansky-Muller (Bateson, 1909, citováno dle Orr, 1997; Dobzhansky, 1936; Muller, 1942, citováno dle Orr, 1997) – viz Obrázek 3.

Vnitřních postzygotických RIM se týká tzv. Haldaneovo pravidlo, které bylo formulováno v roce 1922 J. B. S. Haldanem. A to říká, že pokud je v F_1 populaci mezidruhových hybridů jedno pohlaví, které je vzácné či sterilní, je to pohlaví heterogametické (Haldane, 1922). Tím jsou u organismů s pohlavními chromozomy XY (například savci) samci, zatímco u organismů s pohlavními chromozomy ZW (např. ptáci) jsou tímto postiženým pohlavím samice.



Obrázek 3 – Schéma modelu Batesona, Dobzhanského a Mullera pro vznik vnitřní postzygotické reprodukční izolace. Převzato a upraveno dle Wu and Ting (2004).

Během speciace se obvykle jako první projevuje (někdy postupné) snížení fertility vedoucí k sterilitě heterogametického pohlaví. Poté se vyvíjí sterilita u homogametického pohlaví a později neživotaschopnost hybridů (opět nejprve u pohlaví heterogametického). Sled vzniku postzygotických reprodukčně izolačních mechanismů u ptáků je pro větší přehlednost znázorněn na Obrázku 4. U některých organismů byl však prokázán odlišný sled vzniku postzygotických RIM, kde se projevuje snížená životaschopnost u samců dříve, než snížená fertilita samic (Presgraves, 2002, 2008).



Obrázek 4 – Schéma sledu vzniku vnitřních postzygotických RIM u ptáků.

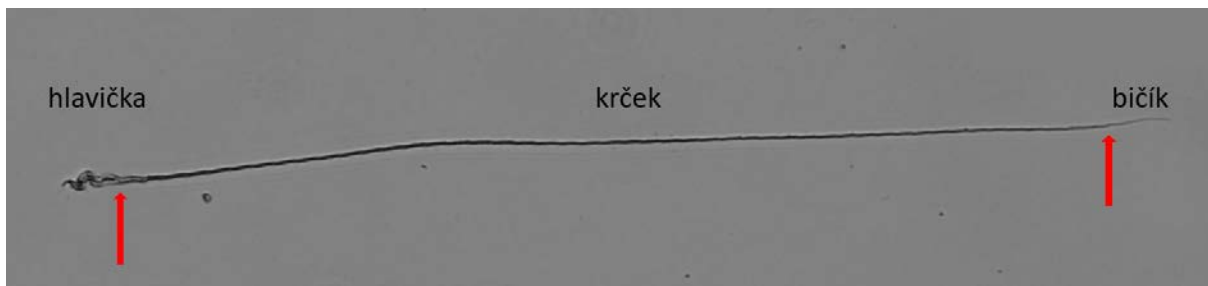
Rychlost vzniku RIM je odlišná u různých taxonů. Podle starších výzkumů (Prager and Wilson, 1975) vznikají postzygotické RIM (hybridní sterilita a neživotaschopnost) u savců až desetkrát rychleji než u ptáků či obojživelníků, avšak v současnosti řada výzkumů ptačích zástupců prokazuje, že tomu tak není (Ålund et al., 2013; Hansson et al., 2012; Supriya et al., 2016). Dále bylo zjištěno, že reprodukční izolace vzniká rychleji mezi druhy v sympatrii, ve srovnání s alopatrickými druhy (Coyne and Orr, 1998). Výzkum reprodukční izolace mezi vznikajícími druhy je v rámci studia evolučních procesů důležitým aspektem, neboť dokládá rychlost procesu speciace. Postkopulační RIM jsou dosud relativně málo prozkoumané a jejich výzkum by zasluhoval více pozornosti.

1.4. Morfologie spermií

Spermie jsou samčí gamety (pohlavní buňky), které patří mezi jedny z nejvariabilnějších živočišných buněk. Působí na ně intenzivní selekce, která způsobuje vysokou mezidruhovou i vnitrodruhovou variabilitu, a proto se očekává, že by divergence v samčích gametách mohla přispívat ke vzniku reprodukční izolace (Birkhead et al., 2008).

Spermie se skládá ze tří obvykle dobře rozpoznatelných částí (Obrázek 5):

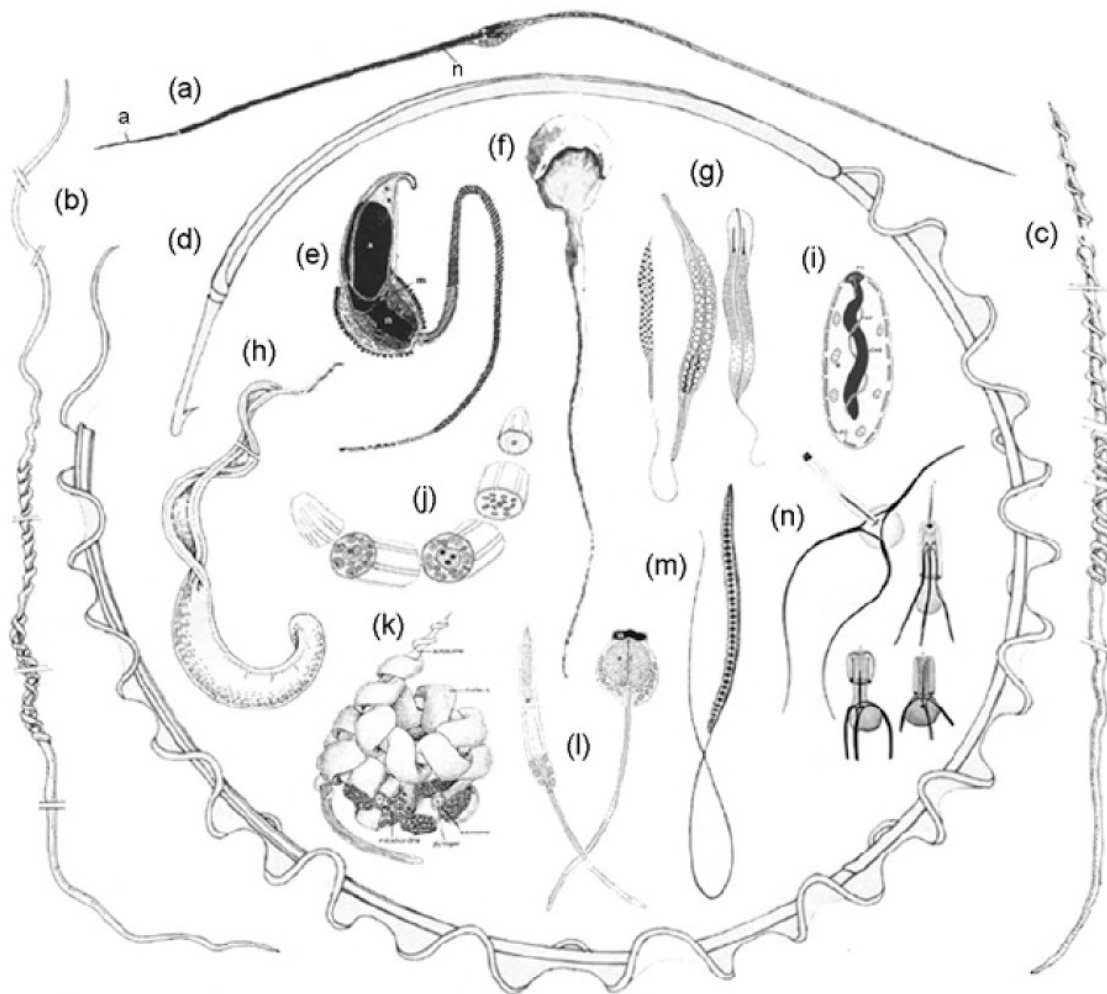
- (1) hlavička, nesoucí jádro s jednou sadou otcovských chromozomů,
- (2) krček, který obsahuje mitochondrie, které jsou odpovědné za produkci ATP, a tedy ve výsledku za energii pro pohyb spermie,
- (3) bičík pohánějící spermii.



Obrázek 5 – Spermie slavíka s označením částí spermie (hlavičkou, krčkem a bičíkem) a přechody mezi nimi.

V anglicky psané literatuře se spermie často rozlišují pouze na dvě části; hlavička (head) a flagellum, což je pojem obvykle zahrnující krček (midpiece) i s bičíkem (tail). Někdy se ovšem setkáme i s použitím termínu flagellum jako synonymum pro bičík. Pro účely této diplomové práce jsem se rozhodla držet dříve vysvětleného členění, viz Obrázek 5.

Mezidruhová variabilita ve velikosti a morfologii spermií je značná (viz Obrázek 6), a to nejen napříč živočišnou říší, ale i mezi blízkými příbuznými druhy (Birkhead et al., 2008; Jamieson, 2007; Lüpold et al., 2009). Můžeme pozorovat například spermie multiflagelátní nebo naopak zcela bez bičíků, jejichž ztráta je konvergentní u řady živočichů a je vysvětlována absencí kompetice spermií u monoandrických systémů (Morrow, 2004). Jedním z extrémů morfologie spermií jsou gigantické spermie, které nacházíme u drozofily. Dobře známá *Drosophila melanogaster* má průměrnou délku spermií 1,76 milimetrů (Cooper 1950, citováno dle Pitnick et al., 1995), což je pro srovnání 300x delší, než u člověka. Spermie příbuzné *D. bifurca* ovšem dosahují délky 58 milimetrů, což je dvacetinásobek její délky těla (Pitnick et al., 1995). Tato délka se zdá neuvěřitelná, obzvláště vzhledem k obvyklé produkci velkého množství malých spermií u většiny živočišných druhů, a obrovským nákladům organismu, které se na produkci takto extrémně dlouhých spermií musí vynaložit. Mechanismus, který je za tento jev zodpovědný, je dosud neznámý.



Obrázek 6 – Variabilita v morfologii spermií živočichů, zobrazeny jsou příklady bezobratlých i obratlovců (bez měřítka). (a) *Aeolosoma litorale* (olejnuška, kroužkovci); (b) *Acanthobdella peledina* (štětinovka sibiřská, kroužkovci); (c) *Erpobdella octocolata* (hltanovka bahenní, kroužkovci); (d) *Pleurodeles waltl* (žebrovník Waltlův, strunatci); (e) *Diurodrilus subterraneus* (kroužkovci); (f) *Cavia porcellus* (morče domácí, strunatci); (g) *Echinoderes* spp. (rypečka, chobotovci); (h) *Epiphanes senta* (vířníci); (i) *Erythraeus phalangioides* (členovci); (j) *Parasitus berlessei* (savenka Berleseho, členovci); (k) *Acerentulus tragardi* (hmyzenka, členovci); (l) *Tachypleus gigas* (vlevo) (ostrorep velký, členovci), *Nymphon* spp. (vpravo) (členovci); (m) *Myzostomum cirriferum* (kroužkovci); (n) *Nephrops norvegicus* (humr norský, členovci). Převzato z Birkhead et al. (2008).

Spermie jsou vystaveny silnému pohlavnímu výběru, který zahrnuje jednak kompetici spermií, a také tzv. skrytou volbu samice. Silný pohlavní výběr vede k rychlé divergenci v morfologii spermií mezi druhy. Divergence v morfologii spermií může přispívat k reprodukční izolaci dvěma způsoby. Buď zvýší míru postkopulační prezygotické izolace (například nekompatibilita gamet) anebo vede k vnitřní postzygotické RIM (např. hybridní sterilita).

Délka spermií je jeden z nejdůležitějších a nejčastěji studovaných atributů morfologie spermie. Dle některých výzkumů pozitivně koreluje s rychlostí pohybu (Gomendio and Roldan, 1991). Jedním z mechanismů stojících za selekčním tlakem na délku spermií je kompetice. Ta vzniká, pokud samice kopuluje v krátké době se dvěma nebo více samci, jejichž spermie poté

kompetují o oplození vajíček. Při srovnání blízkce příbuzných polyandrických a monoandrických druhů hlodavců a primátů bylo zjištěno, že spermie jsou ve výsledku delší u polyandrických druhů, u kterých je intenzita kompetice spermií výrazně vyšší, než u druhů monogamních (Gomendio and Roldan, 1991). Toto tvrzení bylo podpořeno i výsledky nedávných výzkumů u ptáků (Kleven et al., 2009; Lüpold et al., 2009). Výše popsané zjištění ale pravděpodobně není univerzální, a řada výzkumů spornou hypotézu vyvrací, například (Briskie and Montgomerie, 1992) při srovnání dvaceti druhů pěvců nenašli žádný vztah mezi délkou spermií a pářícím systémem, a v oboru panuje značný nesoulad v názorech autorů v dané problematice (Birkhead et al., 2008).

1.4.1. Abnormality v morfologii spermií

Spermatogeneze je vysoce citlivý proces, při kterém vznikají z diploidních spermatogonií meiotickým dělením haploidní spermatidy. Ty se pak v průběhu spermiogeneze mění ve spermie (pozorujeme např. kondenzaci jádra a vytvoření bičíku). V průběhu spermatogeneze i spermiogeneze může docházet k poruchám, které vedou k abnormalitám spermií, jež postihují různé části spermie a nabývají různé podoby. Pokud vznikne poškození hlavičky, spermie s velkou pravděpodobností nebude schopná oplodnit vajíčko, v případě postižení bičíku bude ovlivněna její schopnost pohybu. Při mikroskopickém pozorování lze abnormality spermií snadno odhalit. Abnormální spermie vznikají v určité míře vždy, avšak obvykle jsou odstraněny tzv. spermiofagií. Velké množství abnormalit vede ke snížení počtu nebo kvality spermií, čímž může být ovlivněna fertilita daného jedince (Howard et al., 2009).

1.4.2. Morfologie spermií u ptáků

Zatímco ptačí spermie nepěvčích zástupců se například od spermií plazů příliš neliší, spermie pěvců jsou svým fenotypem velmi odlišné. Humphreys (1972) porovnával spermie zástupců pěvců s nepěvčími druhy a objevil, že se zásadně liší nejen ve své délce (a to až trojnásobně ve prospěch pěvců), ale i svojí strukturou. Celá pěvčí spermie má spirální tvar, včetně hlavičky, která je nápadná dlouhým akrozomem, stejně tak krček je extrémně prodloužený s hůře znatelným přechodem mezi bičíkem. Struktura krčku, kterou Humphreys (1972) popsal jako undulující membránu, je šroubovitá mitochondriální pochva, která obtáčí krček po celé jeho délce. Morfologie spermií, jak již bylo zmíněno, bývá značně variabilní mezi různými druhy pěvců (Lüpold et al., 2009). Variabilita v morfologii spermií je do velké míry daná geneticky (Birkhead et al., 2005; Mossman et al., 2009), nicméně lze zde prokázat

i značnou míru fenotypové plasticity, při které jsou morfologické rozdíly způsobené změnami prostředí (Immler et al., 2012).

Spermie pěvců mají rovněž zcela odlišný způsob pohybu, což je pravděpodobně zapříčiněno šroubovitým tvarem jejich hlavičky. Zatímco spermie jiných obratlovců se posunují vpřed mrskáním bičíku, který obvykle tvoří nejdelší část spermie, u pěvců je pohyb vpřed generován šroubovitým otáčením spermie, která se točí kolem vlastní osy po směru hodinových ručiček (Vernon and Woolley, 1999).

Zásadním mechanismem ovlivňujícím kvalitu a morfologii spermií u ptáků je postkopulační pohlavní výběr (Immler et al., 2008), který zahrnuje kompetici spermií (Birkhead and Møller, 1998) a skrytou volbu samice (Birkhead, 1998a). Základní předpoklad je, že vyšší míra kompetice favorizuje větší délku a menší vnitrodruhovou variabilitu v celkové délce spermií k zajištění jejich optimální morfologie (Briskie and Montgomerie, 1992).

Vztah délky a rychlosti spermií ovšem pravděpodobně není tak přímočarý (Immler and Birkhead, 2007). Rychlost pohybu by mohla být nejspíše ovlivněna také poměrem velikostí jednotlivých komponent, například delší krček v poměru k bičíku by mohl znamenat více mitochondrií, které tak produkují více energie k pohonu spermie (Froman and Feltmann, 1998). Větší délka bičíku, který generuje pohyb vpřed, také může pozitivně ovlivnit motilitu spermie (Briskie and Montgomerie, 1992; Gomendio and Roldan, 1991).

Důležitý faktor, se kterým je rovněž nutno počítat, je schopnost samic ptáků uchovávat spermie ve svém pohlavním traktu ve speciálních skladovacích tubulech (Birkhead, 1998b). V závislosti na velikosti druhu mohou mít samice 300 – 20 000 tubulů (Briskie et al., 1997). Mimo skladovací tubuly (v angličtině označovány termínem sperm storage tubules, či zkratkou SST) spermie v samičím traktu poměrně rychle hynou, zatímco díky uskladňovací a vyživovací funkci tubulů přežívají až po dobu několika týdnů. Většina spermií, které jsou použity k oplození vajíček, pocházejí ze skladovacích tubulů. Tato schopnost je zejména důležitá u pěvců, kteří často během doby snášení již nekopulují. U několika druhů plazů bylo dokonce prokázáno uchování spermií až po dobu několika let (Birkhead and Møller, 1993).

Některé výzkumy prokázaly pozitivní vztah mezi délkou spermií a délkou skladovacích tubulů, kvůli jejich společné koevoluci (Birkhead and Møller, 1993; Briskie and Montgomerie, 1992). Spermie po kopulaci aktivně obsazují skladovací tubuly, v rámci kterých se ovšem nemísí se spermiemi z dřívějších kopulací, ale vytvářejí několik vrstev. Nespornou výhodou mají spermie z poslední kopulace, které dle výzkumu (Birkhead and Møller, 1993) zplodí většinu potomstva. Tento jev je nazýván přednost posledního spermatu.

Takzvaná skrytá volba umožňuje samici ovlivnit výslednou paternitu jejích potomků. Existuje několik mechanismů, jak tohoto docílit, počínaje délkou kopulace či množstvím dostupných skladovacích tubulů. Podle nové studie Cramer et al. (2016) tímto způsobem dochází v hybridní zóně lejsků k upřednostňování samic spermií konspicifických samců oproti samcům heterospicifickým, čímž omezují míru mezidruhové hybridizace.

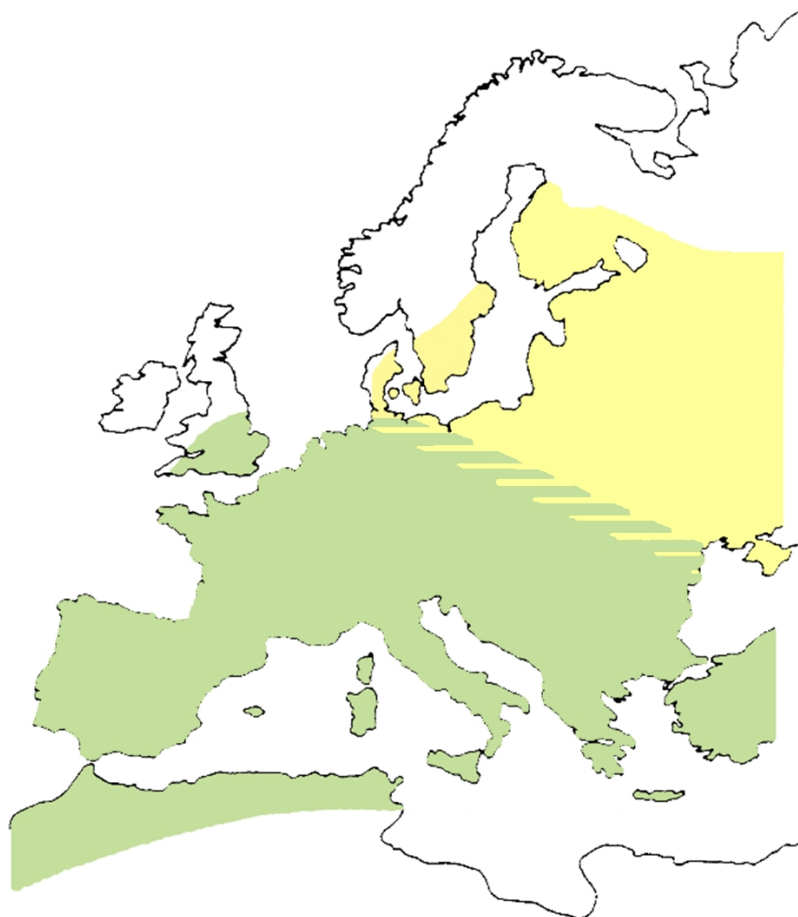
1.5. Modelový systém slavíků

Morfologie spermií je zkoumána na řadě ptačích druhů, včetně modelových zebříček (*Taeniopygia guttata*). Výzkum morfologie spermií na modelovém systému dvou blízké příbuzných druhů slavíků, slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) a slavíka tmavého (*Luscinia luscinia*), má za úkol prokázat vliv na vznik reprodukční izolace mezi těmito druhy.

Oba druhy divergovaly přibližně před 1,8 miliony let (Storchová et al., 2010). V současné době se jejich areály střetávají v sekundární kontaktní zóně, která prochází napříč centrální a východní Evropou. Oba druhy v sympatrii příležitostně hybridizují s frekvencí 3 – 5 % (Becker, 2007; Reifová et al., 2011b).

1.5.1. Slavík obecný

Slavík obecný (*Luscinia megarhynchos*), je malý insektivorní pěvec (řád *Passeriformes*), který dle Prum et al. (2015) patří do čeledi lejskovitých (*Muscicapidae*). Dříve byl zařazován do čeledi drozdovitých (*Turdidae*). Jeho hlavní areál rozšíření je ve většině západní, centrální a jižní Evropy, s přesahem do severní Afriky a jihovýchodní Asie (viz Obrázek 7). Je to tažný pták se zimovišti v subsaharské Africe, který obvykle zůstává věrný svému hnízdišti (Kverek, 2007b).



Obrázek 7 – Mapa rozšíření slavíka obecného (zeleně) a slavíka tmavého (žlutě). Zobrazení hybridní zóny je schématické. Převzato z Storchová et al. (2010).

Žije poměrně skrytým životem v hustých křovinatých podrostech nízko nad zemí. Na rozdíl od slavíka tmavého se nevyhýbá ani člověkem pozměněné krajině a můžeme ho slyšet i v parcích, a dokonce i v zeleni vysázené kolem silnic a dálnic. Zbarvení slavíka obecného je nenápadně hnědé s rezavým nádechem hřbetní strany a zejména rezavými ocasními pery. Hrud' je světlá a obvykle beze skvrn (viz Obrázek 8 vlevo).

Relativně spolehlivým poznávacím znamením je jeho zpěv, který u slavíka obecného bývá nezaměnitelný, ovšem v hybridní zóně musíme počítat se schopností slavíka tmavého napodobovat zpěv slavíka obecného nebo inkorporovat části jeho zpěvu do svého repertoáru (Vokurková et al., 2013), což může znesnadnit identifikaci podle poslechu i zkušenému ornitologovi.



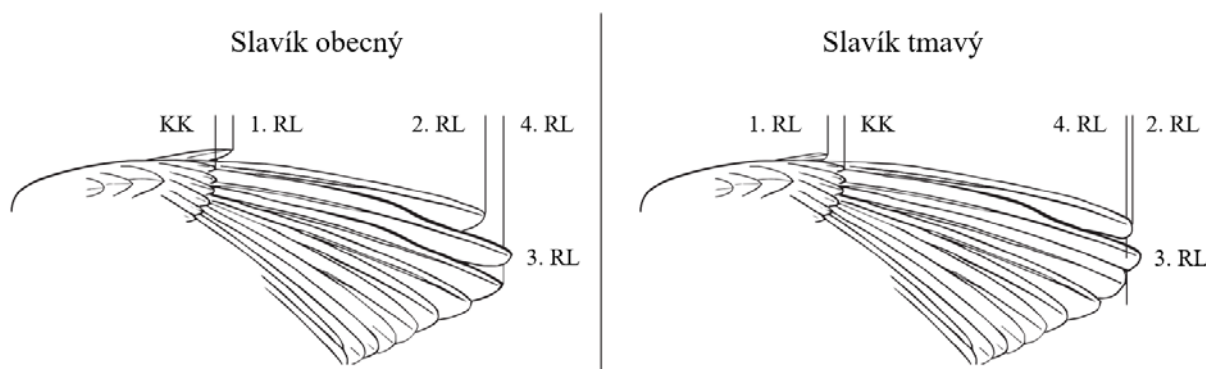
Obrázek 8 – Slavík obecný (vlevo), slavík tmavý (vpravo nahoře), hybrid (vpravo dole). Foto: Kamila Opletalová.

1.5.2. Slavík tmavý

Slavík tmavý (*Luscinia luscinia*) je o něco větší a mohutnější než slavík obecný, a vyskytuje se spíše dále na východě Evropy, od Polska až po Kazachstán (viz Obrázek 7). Základní charakteristiky má stejné jako jeho blízce příbuzný slavík obecný, s tím rozdílem, že preferuje spíše vlhčí stanoviště.

Zbarvení slavíka tmavého je, jak již jeho druhové jméno napovídá, tmavší než u slavíka obecného, hnědé, obvykle bez rezavého nádechu (Obrázek 8 vpravo nahoře). Hruď je světlá s tmavšími skvrnami či vlnkami. Poměrně bezpečný způsob určení je podle délky ručních letek. První ruční letka je u slavíka tmavého výrazně zkrácená, dokonce kratší než křídelní krovky. Dalším stejně důležitým rozpoznávacím znakem je relativní délka druhé a čtvrté ruční letky (viz Obrázek 9 vpravo).

Slavíci nemají znatelný pohlavní dimorfismus, a obvykle bývá těžké odlišit samce od samice. Rozpoznávání pohlaví je ulehčeno při odchycích v období páření, kdy se samicím vytváří hnízdní nažina a u samců můžeme v této době pozorovat kloakální protuberanci, neboli zduření kloaky způsobené naplněním seminálních váčků, které slouží k uchování spermií při nižší teplotě, oproti vysoké tělní teplotě, která spermiím neprospívá (Wolfson, 1952).



Obrázek 9 – Srovnání křídla slavíka obecného a slavíka tmavého. Převzato a upraveno dle Becker (2007).

1.5.3. Mezidruhová hybridizace

Vzhled mezidruhových hybridů je obvykle intermediární, ale může se pohybovat na celé škále mezi rodičovskými druhy a pro nezkušeného pozorovatele je extrémně obtížné hybrida rozeznat (viz Obrázek 8, vpravo dole). První mezidruhová hybridizace byla odhalena a popsána na našem území (Kverek, 2002, citováno dle Kverek 2007a).

Podle Kverkova popisu (2007a): „Zbarvením i zpěvem připomínali spíše slavíka obecného (hrud' i spodní krovky ocasní bez tmavého zbarvení, ocasní pera světleji rezavá, zpěv s převažujícími motivy slavíka obecného). Na křídle však s převládajícími znaky slavíka tmavého (s výjimkou zařazení 2. RL). Délka křídla, stejně jako hmotnost obou samců již vypovídá přesvědčivě ve prospěch slavíka tmavého.“

Mezidruhová křížení je často příhodnější zkoumat v laboratorních chovech, avšak i přírodní hybridní zóny jsou častým předmětem zájmu evolučních biologů, protože skýtají jedinečné prostředí pro pozorování a zkoumání mezidruhových interakcí v přírodních podmínkách.

1.5.4. Výzkum modelového systému slavíků

V rámci výzkumu modelového systému dvou druhů slavíků vedeného týmem mé školitelky, RNDr. Radky Reifové, Ph.D., jsou zkoumány genetické a ekologické aspekty speciálního procesu a reprodukčně izolační mechanismy, které oba druhy oddělují. Výsledky morfologické analýzy obou druhů slavíků v sympatrické a alopatické oblasti odhalily, že v oblasti sympatrie dochází k divergenci v morfologii zobáku, způsobené zvětšením zobáku u slavíka obecného v sympatrii (Reifová et al., 2011b). Tento posun znaků by mohl být následkem rozrůznění potravních nik obou druhů v sympatrické oblasti, a mohl by přispívat ke zvýšení reprodukční izolace mezi oběma druhy.

Zpěv ptáků, jakožto dorozumívací a rozpoznávací nástroj mezi ptáky, který rovněž hraje důležitou roli ve vytváření a udržování prezygotické reprodukční izolace, je dalším předmětem výzkumu našeho slavičího týmu. Na rozdíl od morfologie dochází u zpěvů ke konvergenci v sympatrii, která je způsobená tím, že slavíci tmaví v sympatrii kopírují zpěvy slavíka obecného (Vokurková et al., 2013). Tato konvergence by mohla být čistě důsledkem chyb v učení u slavíka tmavého, ale mohla by být i adaptivní v tom, že může druhům v sympatrii usnadnit vznik mezidruhovité teritoriality, a tím pádem snížit míru mezidruhovité kompetice (Kohoutová, 2017). Vzhledem k velké ekologické podobnosti obou druhů slavíků je kompetice mezi oběma druhy velmi silná a vede k agresivním heterospecifickým reakcím u obou druhů slavíků (Reif et al., 2015). Smíšené zpěvy slavíka tmavého by teoreticky mohly oslabovat prezygotickou izolaci mezi druhy, což ale nebylo prokázáno, neboť většina mezidruhových hybridů vzniká křížením samce slavíka obecného a samice slavíka tmavého (Vokurková et al., 2013).

Alternativou k výzkumu v přirozeném prostředí je chov v zajetí, odkud také pocházejí prvotní výsledky výzkumu fertility mezidruhových hybridů slavíků. Stadie (1991) prokázal, že při mezidruhovém křížení slavíků vznikají životaschopní hybridy. Při pokusech o zpětné křížení hybridních samců vznikalo plodné a životaschopné potomstvo, zatímco pokusy o spáření hybridních samic byly neúspěšné. Samice vůbec neprojevovaly zájem o páření, a nevytvářela se jim hnízdní nažina. Toto zjištění bylo také potvrzeno zkoumáním hybridů odchycených v přírodě, kde u hybridních samic rovněž nebyla pozorována přítomnost hnízdní nažiny (Reifová et al., 2011a).

Na základě výše popsaných výsledků můžeme prohlásit, že mezidruhové hybridy samičího pohlaví jsou u slavíků v souladu s Haldaneovým pravidlem sterilní. Mechanismy vysvětlující příčiny samičí hybridní sterility u ptáků jsou tématem dosud neprozkoumaným.

Vzhledem k výskytu backcross hybridů v populaci víme, že u hybridních samců je zachovaná určitá míra fertility, i ta by ale mohla být potenciálně snížena. Postkopulační prezygotická izolace u slavíků zatím není popsána, ale výsledky křížení obou druhů v zajetí (Stadie, 1991) naznačují, že by tato forma reprodukční izolace mohla být u slavíků přítomna, jelikož heterospecifická křížení produkují menší snůšky než konspecifická křížení.

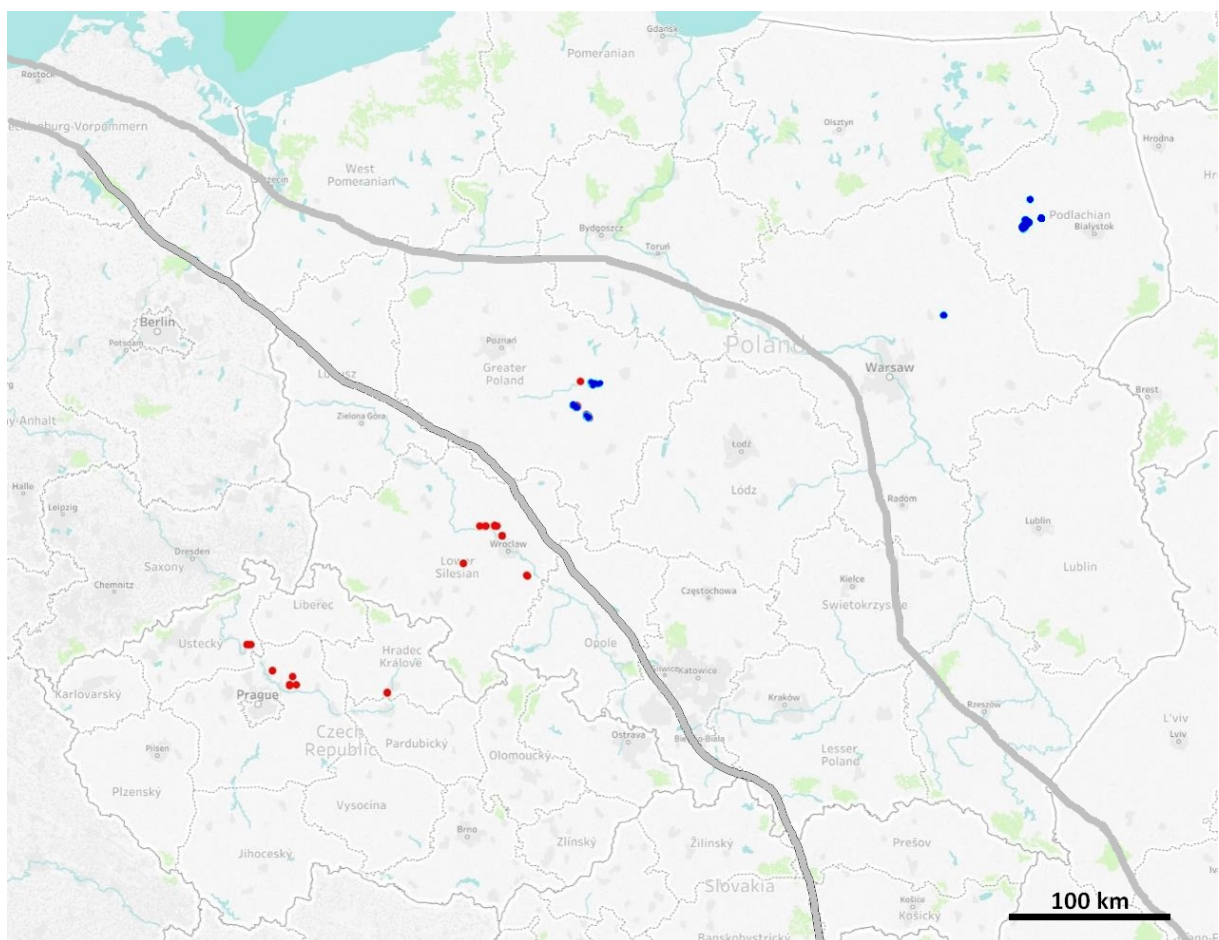
2. Cíle práce

Cílem této diplomové práce je prozkoumat morfologii spermií mezi dvěma druhy slavíků, slavíka obecného a slavíka tmavého, a zjistit, jak případné rozdíly mohou ovlivnit míru reprodukční izolace mezi druhy. Zaměřím se zvláště na následující otázky:

- (1) Liší se morfologie spermií mezi dvěma druhy slavíků?
- (2) Jak se liší morfologie spermií mezi alopatickými a sympatickými populacemi?
- (3) Jaká je morfologie spermií u mezidruhových hybridů?

3. Materiál a metody

Výzkum slavíků v polské sympatrické oblasti probíhá již od roku 2006. Odchyt slavíků, u kterých se prováděl odběr ejakulátu za účelem analýzy morfologie spermií, byl zahájen až později, v roce 2012. V letech 2014 – 2016 jsem se podílela na odchycích a odebírání vzorků na terénním výzkumu v Polské a České republice. Slavíci obecní byli odchytáváni v alopatrických oblastech v České republice a na jihozápadě Polska. Alopatričtí slavíci tmaví pocházeli z lokalit ze severovýchodního Polska. Oba druhy a mezidruhová hybridy byli chytáni na sympatrických lokalitách v kontaktní zóně v centrálním Polsku (viz Obrázek 10).



Obrázek 10 – Mapa lokalit odchytů slavíků – slavík obecný (červená), slavík tmavý (modrá), s vyznačenou sympatrickou oblastí.

3.1. Odchyt ptáků

Jedinci byli odchytáváni na začátku hnízdní sezóny (první až třetí týden v květnu). K odchytu sloužily nárazové sítě, někdy za použití konspicifické playbackové nahrávky, a v menší míře rovněž i sklopné pasti s nástrahou (červem). Jednotlivé lokality pro odchyt slavíků byly vytipovány podle vhodnosti daného biotopu, poslechu pro potvrzení přítomnosti slavíků a také podle výskytu z předchozích let.

3.2. Odběr vzorků spermií

Po odchytu byli slavíci okroužkováni, zaevidováni do databáze odchycených jedinců a byla provedena řada morfologických měření zobáku, tarzu, křídel a křídelních letek. Dále byli zváženi a byl jim odebrán vzorek krve z brachiální žíly, který byl přemístěn do 96% etanolu pro pozdější genetickou analýzu za účelem identifikace hybridů. Samci byli identifikováni podle vyšší hmotnosti, absence hnízdní nažiny a přítomnosti kloakální protuberance.

Následně jim byl neinvazivní metodou kloakální masáže (Albrecht et al., 2013) za pomoci tenké skleněné kapiláry odebírán vzorek ejakulátu. Vzorky kontaminované trusem nebyly zařazeny do dalšího zkoumání z důvodu jejich snížené kvality. V některých případech byla masáž provedena opakovaně. Po dokončení odběru byli odchycení jedinci opět vypuštěni.

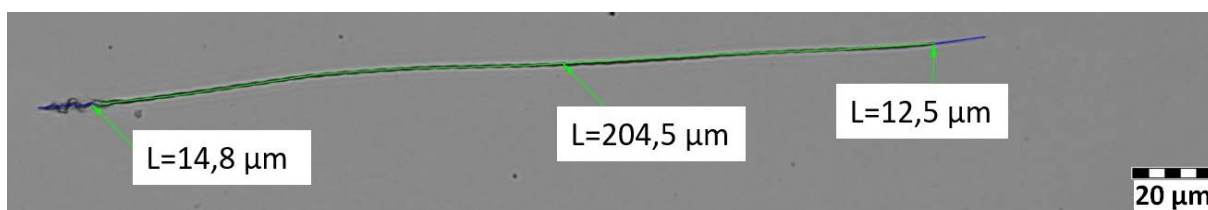
3.3. Příprava preparátů spermií

Vzorek ejakulátu slavíků (přibližně 0,5 – 3 μ l) byl nejprve rozředěn v malém množství (2 – 5 μ l) fyziologického roztoku (PBS), aby nedošlo ke slepení spermií. Část vzorku ejakulátu byla použita pro zatím stále probíhající výzkum motility spermií. Poté byl zbytek vzorku přesunut do Eppendorfovy zkumavky s 200 μ l 5% roztoku formalínu, aby došlo k jeho konzervaci pro pozdější analýzu morfologie a abnormalit spermií.

Ze vzorků odebraných v sezónách 2012 – 2016 jsem dále připravovala mikroskopické preparáty. Na podložní sklíčka jsem po promíchání nanasla pomocí automatické pipety 7 μ l roztoku formalínu se spermiemi. Po zaschnutí jsem sklíčka důkladně opláchla destilovanou vodou za účelem odstranění zbytků formalínu. V případě nedostatku spermií u daného jedince jsem předchozí postup opakovala podle potřeby až čtyřikrát.

3.4. Měření spermií

Po opětovném oschnutí sklíček jsem vzorky analyzovala na světelném mikroskopu (BX51, Olympus) při 200x zvětšení za použití digitální kamery DP71 (Olympus) a počítačového softwaru QuickPhoto Industrial 2.3 (Olympus). Pro každého jedince jsem vytvořila snímky dvaceti náhodně vybraných spermií, u kterých jsem v dalším kroku svého výzkumu měřila délku jednotlivých komponent – hlavičky, krčku a bičíku (viz Obrázek 11), opět v programu QuickPhoto Industrial. Celková délka spermie byla dopočítána sečtením délek těchto částí.

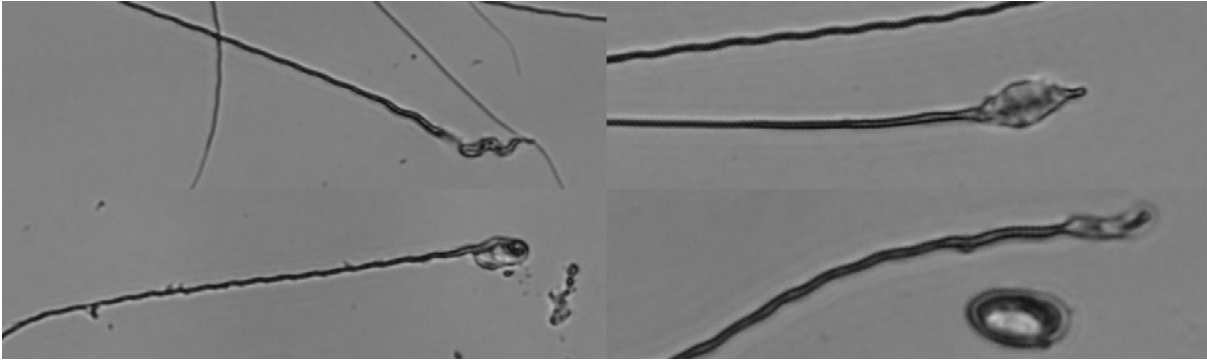


Obrázek 11 – Spermie slavíka tmavého s naměřenými hodnotami

Morfologicky abnormální spermie byly z této části výzkumu vyřazeny. Zpravidla jsou výsledky publikací zabývající se analýzou morfologie spermií kalkulovány s průměrnými hodnotami z pěti či deseti spermií pro každého jedince. Nicméně kvůli větší přesnosti měření byly moje analýzy prováděny zprůměrováním hodnot dvaceti spermií. Všechna měření jsem prováděla sama, k zachování jednotnosti měření je totiž nezbytné, aby měření prováděl vždy pouze jeden člověk z výzkumného týmu. Celkem jsem takto naměřila spermie 112 jedinců obou druhů slavíků ze sympatrie a alopatrie a šesti hybridů.

3.5. Analýza abnormalit spermií

Pro analýzu abnormalit spermií bylo použito u každého jedince sto náhodně vybraných spermií, u nichž jsem vyhodnocovala abnormality hlaviček spermií. U jednoho hybridního jedince bylo z důvodu nedostatku spermií analyzováno jenom padesát spermií. Zaměřila jsem se pouze na hlavičky, z důvodu snadnější identifikace abnormalit (příklady abnormalit viz Obrázek 12). Ostatní části spermie byly záměrně vyřazeny z analýzy abnormalit, protože například u krčku mohly zdánlivé abnormality být ve skutečnosti důsledky mechanického poškození spermie způsobené opakovanou manipulací se vzorkem. Ze sta vybraných spermií bylo určeno procento zastoupení abnormálních spermií. Celkem bylo analyzováno dvacet jedinců slavíka obecného, dvacet jedinců slavíka tmavého a šest mezidruhových hybridů.



Obrázek 12 – Příklady abnormalit hlavičky spermií u slavičků

3.6. Určení hybridů

Všichni sympatričtí jedinci, kteří byli zahrnuti do analýzy, byli genotypováni pomocí ddRAD sekvenování (Peterson et al., 2012). Sekvenování proběhlo ve spolupráci s RNDr. Ing. Lubomírem Piálkem, Ph.D. z Jihočeské Univerzity v Českých Budějovicích. Určení hybridů bylo následně provedeno pomocí programu NewHybrids (Anderson and Thompson, 2002) na základě 344 druhově diagnostických SNP (single nucleotide polymorphism) víceméně rovnoměrně rozmístěných v genomu. Tuto část provedl jeden z členů našeho týmu věnující se výzkumu slavičků, Mgr. Václav Janoušek, Ph.D. Testovali jsme, s jakou pravděpodobností program rozřadí jedince do následujících čtrnácti předem definovaných kategorií:

- čistý jedinec SO,
- čistý jedinec ST,
- F₁ hybrid,
- F₂ hybrid,
- BC₁ hybrid ve směru SO,
- BC₂ hybrid ve směru SO,
- BC₃ hybrid ve směru SO,
- BC₄ hybrid ve směru SO,
- BC₅ hybrid ve směru SO,
- BC₁ hybrid ve směru ST,
- BC₂ hybrid ve směru ST,
- BC₃ hybrid ve směru ST,
- BC₄ hybrid ve směru ST,
- BC₅ hybrid ve směru ST.

Výsledky analýzy v našem vzorku odhalily celkem šest hybridů. Zbytek jedinců byl určen jako čistí slavíci obecní nebo čistí slavíci tmaví (viz Tabulka 1). Pravděpodobnost, že jedinec spadá do zmíněné kategorie, byla vždy vyšší než 95 %.

Tabulka 1 – Počty jedinců zahrnutých do analýzy

Druh	Oblast	n
SO	sympatrie	39
SO	alopatrie	31
ST	sympatrie	26
ST	alopatrie	16
F ₁ hybridi	sympatrie	2
BC ₁ na SO	sympatrie	1
BC ₁ na ST	sympatrie	2
BC ₃ na ST	sympatrie	1

3.7. Statistická analýza dat

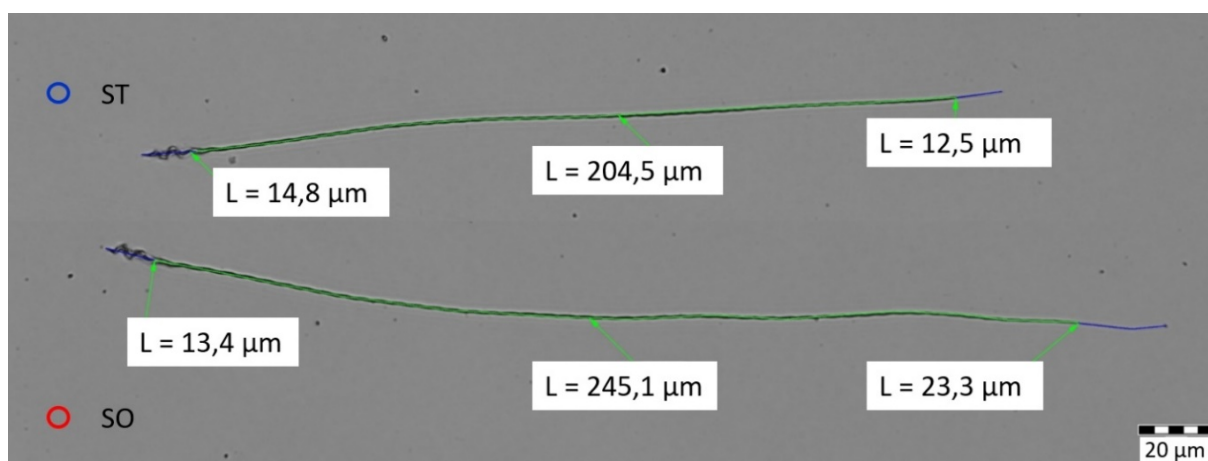
Ke statistické analýze získaných dat byl použit program R. Rozdíly v jednotlivých komponentách spermií mezi druhy jsem testovala pomocí dvouvýběrového t-testu, jehož výsledky jsou uvedeny v příslušných grafech s porovnáváním hodnotami. Testování faktorů ovlivňujících délku spermie obou druhů v sympatrii a alopatrii jsem prováděla pomocí lineárního modelu. Vysvětlovanými proměnnými byly: délka hlavičky, délka krčku a celková délka spermie. Jako vysvětlující proměnné byly použity: oblast (sympatrie/alopatrie), druh (slavík obecný/slavík tmavý) a interakce druh*oblast. Kovariáty byly juliánský den (číslo označující počet dní uplynulých od 1. ledna daného roku ke dni odběru vzorku) a latituda. Juliánský den byl do modelu zahrnut kvůli odfiltrování možného vlivu sezóny na morfologii spermie, a latituda, abychom odfiltrovali případný geografický gradient, který by také mohl mít vliv na morfologii spermie. Při zpracování získaných dat jsem pracovala s průměrnými výsledky naměřených hodnot pro daného jedince. Grafy zahrnuté v této práci byly vytvořeny v programu Statistica.

Opakovaně odchycení jedinci (retrapy), a to i během dalších sezón, byli do analýzy zařazeni pouze jednou. Přestože měření byla provedena pro každou jednotlivou část spermie (hlavička, krček, bičík), samostatné výsledky pro bičík spermii nebyly do diplomové práce zahrnuty. S ohledem na biologickou důležitost jednotlivých komponent se analyzovala délka hlavičky, krčku a celková délka spermie.

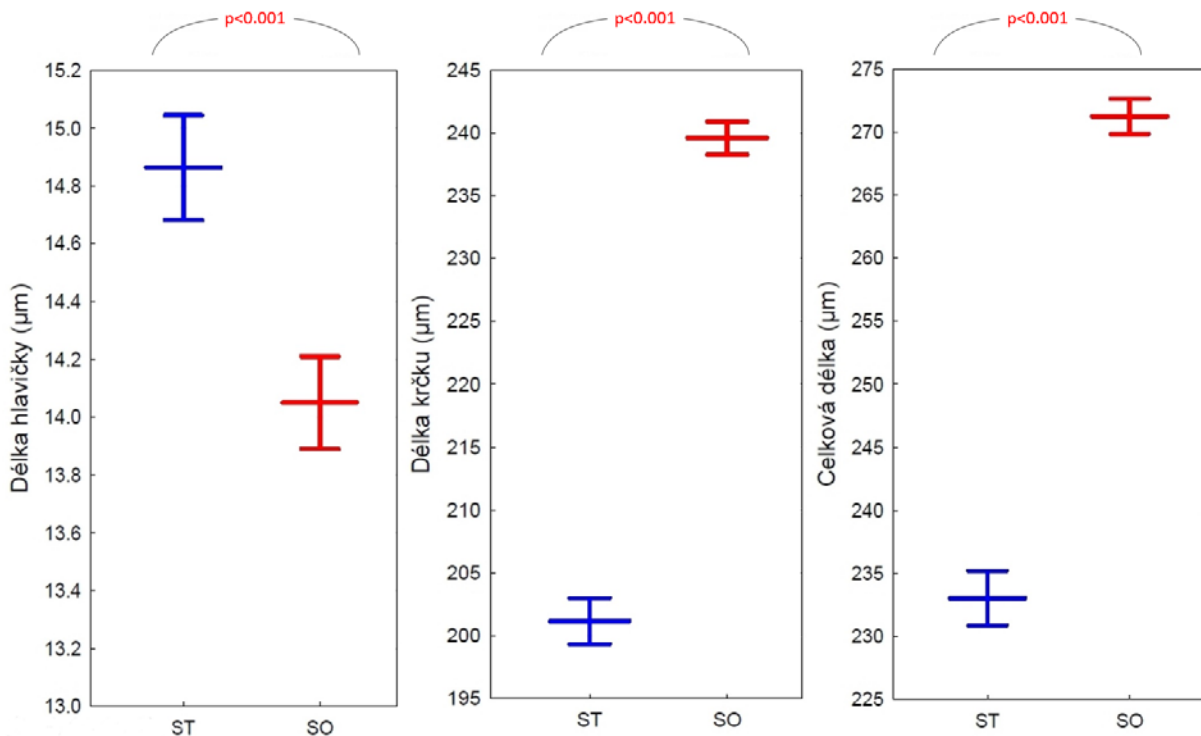
4. Výsledky

4.1. Srovnání morfologie spermií dvou druhů slavíků

Pro splnění prvního cíle této práce jsem nejprve srovnávala morfologii spermií mezi druhy slavíků, aniž bych rozlišovala mezi alopatrickými a sympatrickými vzorky. Oba druhy se významně lišily v morfologii spermií (Obrázek 13). Slavík tmavý měl signifikantně (t-test, $p < 0.001$) delší hlavičku spermie (průměrně $14,9 \pm 0,6 \mu\text{m}$) ve srovnání se slavíkem obecným (průměr $14,1 \pm 0,7 \mu\text{m}$). Naopak délka krčku byla signifikantně (t-test, $p < 0.001$) delší u slavíka obecného než u slavíka tmavého. Stejně tak analýza celkové délky spermie ukázala, že slavík obecný měl signifikantně (t-test, $p < 0.001$) větší průměrnou délku celé spermie ($271,2 \pm 5,9 \mu\text{m}$) oproti slavíku tmavému ($233,0 \pm 7,0 \mu\text{m}$). Vzhledem k tomu, že krček tvoří nejdelší část spermie u slavíků (přibližně 85 %), pozorovaný rozdíl v jeho délce byl příčinou pozitivní korelace s výsledky pro celkovou délku (Obrázek 14).



Obrázek 13 – Vizuální srovnání morfologie spermií slavíka tmavého (nahore) a slavíka obecného (dole).

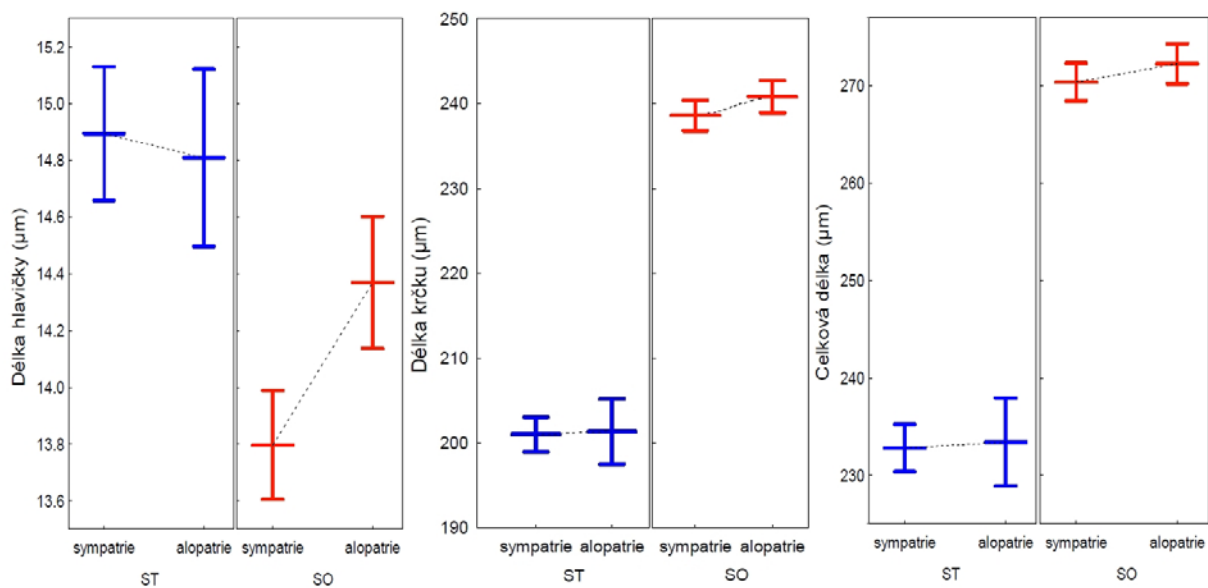


Obrázek 14 – Srovnání morfologie spermií slavíka tmavého (ST, modře) a slavíka obecného (SO, červeně). Zobrazen je průměr a 95% konfidenční interval.

4.2. Srovnání morfologie spermií v sympatrické a alopatrické oblasti

V dalším kroku jsem analyzovala velikosti jednotlivých komponent spermií v sympatrické a alopatrické oblasti u obou druhů (Obrázek 15). Za pomoci lineárního modelu jsem testovala vliv druhu (slavík obecný, slavík tmavý), oblasti (sympatrie, alopatrie) a jejich interakce na velikost jednotlivých komponent spermie. Kromě toho byly do modelu jako kovariáty zahrnuty latituda a juliánský den. Výsledky modelů pro délku hlavičky, krčku a celkovou délku spermie jsou uvedeny v tabulkách 2 – 4.

Modely pro délku krčku a celkovou délku spermie ukázaly signifikantní efekt druhu a marginálně signifikantní efekt juliánského dne (Tabulka 3, Tabulka 4). Jak délka krčku, tak celková délka spermie byla větší u slavíka obecného, a to jak v sympatrické, tak alopatrické oblasti (Obrázek 15). Model pro délku hlavičky spermie odhalil signifikantní efekt oblasti, juliánského dne a interakci druh*oblast (viz. Tabulka 2). Hlavička spermie se zvětšovala s juliánským dnem. Signifikantní interakce druh*oblast byla způsobena zejména posunem ve velikosti hlavičky mezi sympatrií a alopatrií u slavíka obecného (Obrázek 15).



Obrázek 15 – Srovnání morfologie spermií ST (modře) a SO (červeně) v sympatrii a alopatrii. Zobrazen je průměr a 95% konfidenční interval.

Tabulka 2 – Výsledky lineárního modelu pro délku hlavičky

	Odhad	SE ¹	t	P-value
Intercept ²	-17,389	12,580	-1,382	0,017
Oblast	-1,083	0,322	-3,363	0,001 **
Druh	-0,567	0,580	-0,977	0,331
Juliánský den	0,064	0,013	5,105	1,46E-06 ***
Latituda	0,456	0,232	1,966	0,052
Druh*oblast	1,514	0,569	2,662	0,009 **

¹SE – směrodatná chyba (standard error)

²Intercept – délka hlavičky spermie u SO

Pro všechny analýzy byly za signifikantní považovány výsledky s p-value < 0,05.

Tabulka 3 – Výsledky lineárního modelu pro délku krčku

	Odhad	SE ¹	t	P-value
Intercept ³	96,3862	128,704	0,749	0,4556
Oblast	-4,635	3,294	-1,407	0,1623
Druh	-44,244	5,9317	-7,459	2,52E-11 ***
Juliánský den	0,2675	0,1288	2,077	0,0402 *
Latituda	2,1376	2,3707	0,902	0,3693
Druh*oblast	6,0131	5,8175	1,034	0,3037

Tabulka 4 – Výsledky lineárního modelu pro celkovou délku spermie

	Odhad	SE ¹	t	P-value
Intercept ⁴	175,3291	144,499	1,213	0,2277
Oblast	-2,9475	3,6983	-0,797	0,4272
Druh	-41,1462	6,6596	-6,178	1,22E-08 ***
Juliánský den	0,2967	0,1446	2,051	0,0427 *
Latituda	1,1242	2,6616	0,422	0,6736
Druh*oblast	2,9205	6,5315	0,447	0,6557

¹SE – směrodatná chyba (standard error)

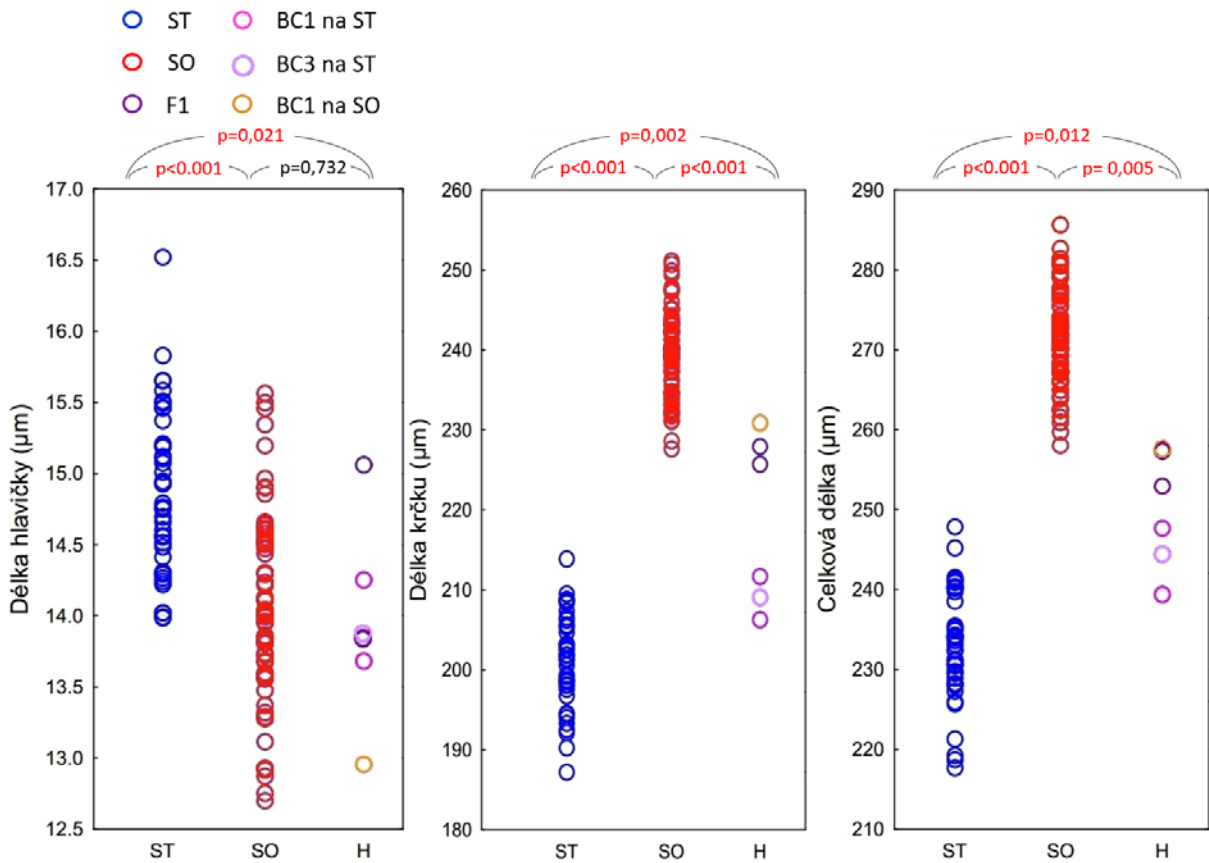
³Intercept – délka krčku spermie u SO

⁴Intercept – celková délka spermie u SO

Pro všechny analýzy byly za signifikantní považovány výsledky s p-value < 0,05.

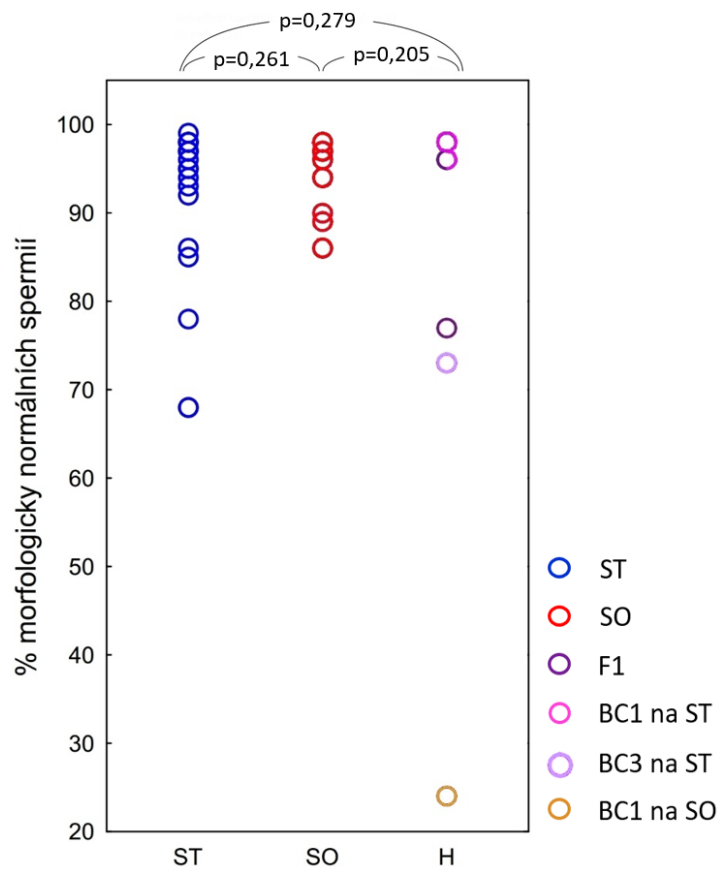
4.3. Morfologie spermií u mezidruhových hybridů

Navzdory nízkému počtu mezidruhových hybridů ($n = 6$) výsledky ukázaly (Obrázek 16), že délka hlavičky, krčku i celková délka spermií byla u hybridů intermediární mezi rodičovskými druhy. Průměrná délka spermie u hybridů byla $249,9 \pm 7,3 \mu\text{m}$.



Obrázek 16 – Morfologie spermií u hybridů ve srovnání s rodičovskými druhy. P-value byly počítány pomocí t-testu.

Analýza abnormalit spermií dále ukázala, že F₁ hybridi a BC hybridi na ST nevykazovali vyšší procento abnormálních spermií než rodičovské druhy. Zvýšené procento abnormálních spermií (76 %) bylo pozorováno pouze u jednoho zpětného křížence na SO, ale vzhledem k tomu, že se jednalo o jednoho jedince ve zkoumaném vzorku, není jasné, zda šlo o náhodu či o systematický jev (Obrázek 17).



Obrázek 17 – Procento morfologicky normálních spermií u rodičovských druhů a hybridů. P-value byly počítány pomocí t-testu.

5. Diskuze

5.1. Srovnání morfologie spermií dvou druhů slavíků

Výsledky této diplomové práce ukázaly, že morfologie spermií je u obou druhů slavíků značně odlišná. Rozdíl je zejména v délce krčku spermie, která tvoří nejdelší část spermie, a následně i v celkové délce spermie, která je o 20 % delší u slavíka obecného než u slavíka tmavého. Rychlá evoluce spermií je obvykle způsobena silným selekčním tlakem, který je spjat s intenzivní kompeticí, která na ně působí (Snook, 2005). Díky tomu můžeme pozorovat dramatické rozdíly v morfologii a velikosti spermií i mezi blízce příbuznými druhy (Jamieson, 2007; Lüpold et al., 2009; Pitnick et al., 2009).

Rozdíly v délce spermií se mohou projevat i na vnitrodruhové úrovni. Dva poddruhy sýkory uhelníčka (*Periparus ater*) (Schmoll and Kleven, 2011) vykazovaly 3% rozdíl v délce spermií, a u poddruhů slavíka modráčka (*Luscinia svesica*) byl rozdíl dokonce 11,6 % délky spermií (Hogner et al., 2013). Zdá se tedy, že rychlá divergence v morfologii spermií může být charakteristická pro rod *Luscinia*. Navzdory množství výzkumů, které se divergencí v morfologii spermií zabývají, není dosud zcela jasné, jakým způsobem rozdíly v morfologii spermií přispívají k reprodukční izolaci.

Podle řady prací publikovaných o této problematice jsou delší spermie zvýhodněny v prostředí s vysokou mírou kompetice spermií, což bylo prokázáno u savců (Gomendio and Roldan, 1991; Lüpold et al., 2009). Pěvci, přestože jsou převážně sociálně monogamní, mají proměnlivou míru extrapárových kopulací, která se používá jako přímý indikátor intenzity kompetice spermií. Přestože pro slavíka obecného ani pro slavíka tmavého nejsou dostupná data, která by prozrazovala míru extrapárových kopulací, můžeme předpokládat, že k nim, stejně jako u blízce příbuzného slavíka modráčka (*Luscinia svesica*), dochází (Hogner et al., 2013). Výzkumy modelového systému hybridizujících lejsků bělokrkých a černohlavých, kteří jsou příbuzní slavíkům (patří do stejné čeledi *Muscicapidae*), rovněž prokázaly zvýšenou míru extrapárových kopulací u samic s heterospecifickým partnerem. Samice se mimopárově pářily s konspicivními samci za účelem snížení nevýhod heterospecifického párování (Ålund et al., 2013; Veen et al., 2001).

Slavík obecný měl spermie výrazně delší než slavík tmavý. Tento rozdíl byl daný zejména delším krčkem u spermií slavíka obecného. Krček spermie tvoří u pěvců nejdelší část spermie a nese mitochondrie, které vytvářejí energii. Delší spermie s delším krčkem tedy mohou produkovat více energie pro svůj pohyb (Rowe et al., 2013), a tím být zvýhodněny

v kompetici o oplození vajíček. V souladu s tímto předpokladem bylo zjištěno, že většina F₁ mezidruhových hybridů v sympatrii vznikla z křížení samce slavíka obecného a samice slavíka tmavého (Vokurková et al., 2013). Na druhou stranu některé studie vyvrací souvislost délky spermie s mírou kompetice spermií u pěvců, a předpokládá se, že větší vliv na jejich délku má koevoluce spermií a samičího reprodukčního traktu (Briskie and Montgomerie, 1992; Briskie et al., 1997; Immler and Birkhead, 2007). K úplnému objasnění této problematiky je další výzkum nezbytný.

U slavíka tmavého byla pro změnu zjištěna větší velikost hlavičky spermie. Tento rozdíl byl ale daný zejména zmenšením velikosti hlavičky spermie u slavíka obecného v sympatrii. Ve složitějším modelu zahrnujícím efekt oblasti, druhu, juliánského dne a latitudy, efekt druhu na velikost hlavičky nebyl prokázán.

Dle publikovaných výzkumů může větší délka bičíku pozitivně ovlivňovat pohybové schopnosti spermie (Briskie and Montgomerie, 1992; Gomendio and Roldan, 1991). Při srovnání obou druhů slavíků nebyl prokázán signifikantní rozdíl v délce bičíku.

Odlišná morfologie spermií u obou druhů slavíků by teoreticky mohla vést ke zvýšené postkopulační prezygotické reprodukční izolaci. Ta se může odehrávat na různých úrovních od uchování spermií v skladovacích tubulech, přes různou rychlost pohybu spermií reprodukčním traktem k vajíčku, až po samotný proces oplození. Vzhledem k výskytu mezidruhových hybridů v přírodě víme, že tato bariéra u slavíků nemůže být úplná, ale mohla by alespoň částečně snižovat pravděpodobnost vzniku hybridů, pokud se samice kříží se samci obou druhů. Svou roli zde nejspíš hraje i skrytá volba samice, ač není zcela jasné, na jakém principu dochází k diskriminaci heterospecifických spermií. Zvýšená pravděpodobnost oplození spermiemi vlastního druhu navzdory křížení s konspecifickými i heterospecifickými samci byla pozorována u mnoha druhů živočichů (Howard et al., 2009), včetně některých pěvců (Cramer et al., 2016).

Další výzkumy u slavíků by měly zjistit, zda postkopulační prezygotická izolace existuje také u slavíků, a pokud ano, jaký je její konkrétní mechanismus. Výsledky křížení obou druhů v zajetí (Stadie, 1991) ukazují, že heterospecifická křížení vedou k menším snůškám než konspecifická křížení, což naznačuje, že by postkopulační prezygotická izolace mohla být u slavíků opravdu přítomna. Zmíněná studie je však založena na velmi malém počtu křížení a postrádá statistické vyhodnocení výsledků. Experiment by proto bylo dobré zopakovat.

5.2. Srovnání morfologie spermií v sympatrické a alopatrické oblasti

Velmi zajímavý výsledek této diplomové práce představuje zjištění, že u slavíka obecného došlo k posunu ve velikosti hlavičky spermie mezi sympatrií a alopatrií. Díky tomuto posunu je délka hlavička spermie odlišnější mezi druhy v sympatrii než v alopatrii.

Podle některých výzkumů větší hlavička spermie zvýhodňuje při obsazování skladovacích tubulů v pohlavním traktu samice (Calhim et al., 2011). Ovšem i naopak mohou mít sníženou pohyblivost kvůli většímu odporu, který vzniká při pohybu spermií viskózním prostředím (Humphries et al., 2008).

Ačkoli k tomu nemáme přímé důkazy, je možné, že tento posun v morfologii spermií by mohl zvyšovat míru postkopulační prezygotické izolace v sympatrii a mohl by představovat příklad reinforcementu na gametické úrovni. Většina známých příkladů reinforcementu se týká prezygotické izolace, a příkladů reinforcementu na postkopulační prezygotické úrovni je jen velice málo (Matute, 2010). K prokázání přítomnosti reinforcementu je podmínkou, že druhy nemají ukončenou reprodukční izolaci, což modelový systém slavíků splňuje, vzhledem k výskytu pozdějších generací mezidruhových hybridů.

Zjištěný posun ve velikosti hlavičky mezi sympatrií a alopatrií mírně komplikuje zjištění, že na velikost hlavičky má silný vliv juliánský den. Teoreticky by tedy posun ve velikosti hlavičky mezi sympatrií a alopatrií mohl být důsledkem jiné doby sběru spermií v sympatrii a alopatrii, a posunu v načasování sezóny v různých oblastech. Teoreticky by se mohlo jednat o příklad fenotypové plasticity. Za účelem vyloučení této možnosti jsme do modelu přidali juliánský den a latitudu. I po jejich odfiltrování zůstal posun ve velikosti hlavičky spermií u slavíka obecného v sympatrii signifikantní.

Tento zvýšený rozdíl v morfologii spermií pravděpodobně dokládá intenzivnější selekci proti hybridizaci při heterospecifickém párování v hybridní zóně (reinforcement). Posun znaků na gametické úrovni je jev, který je u obratlovců dosud ojedinělý.

5.3. Morfologie spermií u mezidruhových hybridů

Divergence v morfologii spermií může přispět také k postzygotické reprodukční izolaci. Pokud jsou mutace uplatňující se při vzniku spermií nekompatibilní na genetickém pozadí jiného druhu, mohou u mezidruhových hybridů nastat problémy s tvorbou spermií. V takovém případě hybridy mají poškozené, anebo žádné spermie. S ohledem na Haldaneovo pravidlo vedou hybridní nekompatibility u ptáků dříve ke vzniku hybridní sterility samic, a až později k hybridní sterilitě samců. Mechanismy, které by vysvětlovaly samičí hybridní sterilitu, jsou dosud neprozkoumané. Ani výzkumu spermií a jejich vlivu na hybridní sterilitu u ptáků nebyla v minulosti věnována taková pozornost.

Vzhledem ke značné divergenci v morfologii spermií mezi druhy slavíků nás zajímalo, jak budou vypadat spermie u mezidruhových hybridů, a zda budou vykazovat zvýšené množství abnormalit. Výsledky této práce ukázaly, že morfologie spermií u hybridů je intermediální mezi rodičovskými druhy. Svou přechodnou morfologií by mohly být znevýhodněny v kompetici se spermii obou rodičovských druhů, či samičí volbou. Procento abnormálních spermií u hybridů až na jednoho jedince nebylo vyšší než u rodičovských druhů.

Naše zjištění kontrastují s výsledky výzkumů na modelovém systému blízce příbuzných druhů lejsků. Lejscí jsou malí pěvci čeledi *Muscicapidae*, do které patří i slavíci. Dva druhy lejsků, lejsk bělokrký (*Ficedula albicollis*) a lejsk černohlavý (*Ficedula hypoleuca*) se rovněž vyskytují v Evropě a hybridizují spolu v hybridní zóně, která je předmětem intenzivního zkoumání v České republice a ve Švédsku.

Navzdory faktu, že tyto druhy divergovaly před méně než jedním milionem let (Backström et al., 2013; Nadachowska-Brzyska et al., 2013), což je doba dokonce kratší než u slavíků, bylo zjištěno, že se v populaci nevyskytují žádní backcross hybridy (Kawakami et al., 2014), a u mezidruhových hybridů jsou obě pohlaví sterilní. Hybridní samice po spáření kladly neoplozená vajíčka (Gelter et al., 1992), a nedávný výzkum zaměřený na fertilitu hybridních samců prokázal, že ejakulát většiny samců neobsahoval žádné spermie, zatímco u malého procenta lejsků byly přítomné pouze abnormální spermie (Ålund et al., 2013). Při srovnání se staršími publikacemi, kde převládal názor, že postzygotická reprodukční izolace se u ptáků vyvíjí poměrně pomalu (dle Price and Bouvier (2002) přibližně sedm milionů let), je zjištění u lejsků vysoce překvapivé.

Výzkum abnormalit spermií u slavíků byl primárně motivován hypotézou, že mezidruhový hybrid by mohli mít zvýšené množství abnormálních spermií ve srovnání s rodičovskými druhy, a tedy potenciálně sníženou fertilitu. Navzdory malému počtu

hybridních jedinců, kteří byli zahrnuti do analýzy, je zřejmé, že tento projev snížené fertility se u mezidruhových hybridů slavíků dosud nevyvinul. Až na jednoho hybrida ve zkoumaném vzorku byla u všech odchycených jedinců naměřena nízká míra abnormalit. Výjimku tvoří jediný backcross hybrid ve směru slavíka obecného. Je otázka, zda je to náhoda, nebo ve směru křížení na slavíka obecného se v pozdějších backcross generacích abnormality vyskytují ve vyšší míře. Pro potvrzení či vyvrácení této možnosti by bylo potřeba analyzovat více vzorků.

Výsledky mého výzkumu ukazují, že velká divergence v morfologii spermií zde nepřispívá k reprodukční izolaci a F_1 hybridní samci jsou stále fertillní. Při srovnání s lejsky se postzygotická reprodukční izolace u slavíků vyvíjí zřejmě o poznání pomaleji.

6. Závěr

Modelový systém slavíků v hybridní zóně v Polsku je v mnoha ohledech ideálním nástrojem ke studiu speciace a reprodukční izolace. Navzdory nedávné divergenci se oba zkoumané druhy zásadně liší v délce krčku a následně i v celkové délce spermií, a to přibližně o 20 % celkové délky. Tento velký rozdíl by se mohl promítat jako jeden z faktorů přispívajících k postkopulační prezygotické reprodukční izolaci, nicméně je třeba dalšího výzkumu pro potvrzení této možnosti.

Značná divergence v délce spermie překvapivě nepřispívá k postzygotické izolaci. Analýza morfologických abnormalit spermií neukázala zvýšenou míru abnormálních spermií u hybridů ve srovnání s rodičovskými druhy. Oproti dřívějším názorům, že je u ptáků důležitá především prekopulační reprodukční izolace, a izolace postkopulační se vyvíjí až později, výsledky mého výzkumu ukazují, že to nemusí být vždy úplně pravda.

Velice zajímavým zjištěním je srovnání dat ze sympatrické a alopatrické oblasti, které ukázalo rozdíl ve velikosti hlavičky v sympatrii. Pokud by bylo potvrzeno, že posun znaků ve velikosti hlavičky v sympatrii u slavíka obecného je opravdu projevem reinforcementu proti hybridům, byl by to jeden z prvních příkladů reinforcementu na gametické úrovni u obratlovců. K tomu bude ovšem potřeba další výzkum. Celkové výsledky diplomové práce zdůrazňují potenciálně značný vliv postkopulační prezygotické izolace ve speciaci ptáků.

7. Přehled literatury

*Sekundární citace

Albrecht, T., Kleven, O., Kreisinger, J., Laskemoen, T., Omotoriogun, T. C., Ottosson, U., Reif, J., Sedláček, O., Hořák, D., Robertson, R. J., et al. (2013). Sperm competition in tropical versus temperate zone birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 280, 20122434.

Ålund, M., Immler, S., Rice, A. M., and Qvarnström, A. (2013). Low fertility of wild hybrid male flycatchers despite recent divergence. *Biology Letters* 9, 169.

Anderson, E. C., and Thompson, E. A. (2002). A model-based method for identifying species hybrids using multilocus genetic data. *Genetics* 160, 1217–1229.

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

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

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

Becker, J. (2007). Nachtigallen *Luscinia megarhynchos*, Sprosser *L. luscinia* und ihre Hybriden im Raum Frankfurt (Oder)–weitere Ergebnisse einer langjährigen Beringungsstudie. *Vogelwarte* 45, 15–26.

Birkhead, T. R. (1998a). Cryptic female choice: criteria for establishing female sperm choice. *Evolution* 52, 1212–1218.

Birkhead, T. R. (1998b). Sperm competition in birds. *Reviews of Reproduction* 3, 123–129.

Birkhead, T. R., and Møller, A. P. (1993). Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals. *Biological Journal of the Linnean Society* 50, 295–311.

Birkhead, T. R., and Møller, A. P. (1998). Sperm competition and sexual selection (Academic Press).

Birkhead, T. R., Pellatt, E. J., Brekke, P., Yeates, R., and Castillo-Juarez, H. (2005). Genetic effects on sperm design in the zebra finch. *Nature* 434, 383–387.

- Birkhead, T. R., Hosken, D. J., and Pitnick, S. S. (2008). Sperm biology: an evolutionary perspective (Academic Press).
- Bolnick, D. I., and Fitzpatrick, B. M. (2007). Sympatric speciation: models and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38, 459–487.
- Briskie, J. V., and Montgomerie, R. (1992). Sperm size and sperm sompetition in birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 247, 89–95.
- Briskie, J. V., Montgomerie, R., and Birkhead, T. R. (1997). The evolution of sperm size in birds. *Evolution* 51, 937–945.
- Butlin, R. K., Galindo, J., and Grahame, J. W. (2008). Sympatric, parapatric or allopatric: the most important way to classify speciation? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363, 2997–3007.
- Calhim, S., Double, M. C., Margraf, N., Birkhead, T. R., and Cockburn, A. (2011). Maintenance of sperm variation in a highly promiscuous wild bird. *PLoS ONE* 6, e28809.
- * Cooper, K. W. (1950). *Biology of Drosophila* (Wiley, New York), citováno dle Pitnick, S., Spicer, G. S., and Markow, T. A. (1995). How long is a giant sperm? *Nature* 375, 109–109.
- Coyne, J. A., and Orr, H. A. (1998). The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions: Biological Sciences* 353, 287–305.
- Coyne, J. A., and Orr, H. A. (2004). *Speciation* (Sinauer Associates Sunderland, MA).
- Cramer, E. R. A., Ålund, M., McFarlane, S. E., Johnsen, A., and Qvarnström, A. (2016). Females discriminate against heterospecific sperm in a natural hybrid zone. *Evolution* 70, 1844–1855.
- Dobzhansky, T. (1936). Studies on hybrid sterility. II. Localization of sterility factors in *Drosophila pseudoobscura* hybrids. *Genetics* 21, 113–135.
- Froman, D. P., and Feltmann, A. J. (1998). Sperm mobility: a quantitative trait of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *Biology of Reproduction* 58, 379–384.
- Gelter, H. P., Tegelström, H., and Gustafsson, L. (1992). Evidence from hatching success and DNA fingerprinting for the fertility of hybrid pied × collared flycatchers *Ficedula hypoleuca* × *albicollis*. *Ibis* 134, 62–68.
- Gomendio, M., and Roldan, E. R. S. (1991). Sperm competition influences sperm size in mammals. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 243, 181–185.

- Grant, P. R., and Grant, B. R. (1992). Hybridization of bird species. *Science* 256, 193–197.
- Haldane, J. B. S. (1922). Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journal of Genetics* 12, 101–109.
- Hansson, B., Tarka, M., Dawson, D. A., and Horsburgh, G. J. (2012). Hybridization but no evidence for backcrossing and introgression in a sympatric population of great reed warblers and clamorous reed warblers. *PLoS ONE* 7, e31667.
- Haring, E., Gamauf, A., and Kryukov, A. (2007). Phylogeographic patterns in widespread corvid birds. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45, 840–862.
- Hogner, S., Laskemoen, T., Lifjeld, J. T., Pavel, V., Chutný, B., García, J., Eybert, M.-C., Matsyna, E., and Johnsen, A. (2013). Rapid sperm evolution in the bluethroat (*Luscinia svecica*) subspecies complex. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 67, 1205–1217.
- Howard, D. J., Palumbi, S. R., Birge, L. M., and Manier, M. K. (2009). Sperm and speciation. In *Sperm biology: an evolutionary perspective*, (Academic Press), pp. 367–403.
- Humphreys, P. N. (1972). Brief observations on the semen and spermatozoa of certain passerine and non-passerine birds. *Journal of Reproduction and Fertility* 29, 327–336.
- Humphries, S., Evans, J. P., and Simmons, L. W. (2008). Sperm competition: linking form to function. *BMC Evolutionary Biology* 8, 319.
- Immler, S., and Birkhead, T. R. (2007). Sperm competition and sperm midpiece size: no consistent pattern in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 274, 561–568.
- Immler, S., Calhim, S., and Birkhead, T. R. (2008). Increased postcopulatory sexual selection reduces the intramale variation in sperm design. *Evolution* 62, 1538–1543.
- Immler, S., Gonzalez-Voyer, A., and Birkhead, T. R. (2012). Distinct evolutionary patterns of morphometric sperm traits in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 279, 4174–4182.
- Jamieson, B. G. M. (2007). *Reproductive biology and phylogeny of birds. Part A* (Enfield, (NH): Science Publishers).
- Kawakami, T., Backström, N., Burri, R., Husby, A., Olason, P., Rice, A. M., Ålund, M., Qvarnström, A., and Ellegren, H. (2014). Estimation of linkage disequilibrium and interspecific

gene flow in *Ficedula* flycatchers by a newly developed 50k single-nucleotide polymorphism array. *Molecular Ecology Resources* 14, 1248–1260.

Kleven, O., Fossøy, F., Laskemoen, T., Robertson, R. J., Rudolfson, G., and Lifjeld, J. T. (2009). Comparative evidence for the evolution of sperm swimming speed by sperm competition and female sperm storage duration in passerine birds. *Evolution* 63, 2466–2473.

Kohoutová, H. (2017). Evoluční význam smíšených zpěvů v kontaktní zóně dvou druhů slavíků. Diplomová práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta, Katedra Zoologie.

* Kverek, P. (2002). Další kříženec slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) se slavíkem tmavým (*Luscinia luscinia*). *Sylvia* 38, 67–70, citováno dle Kverek, P. (2007a). Pozor na možné křížence slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) se slavíkem tmavým (*Luscinia luscinia*). *Kroužkovatel* 3, 21-23.

Kverek, P. (2007a). Pozor na možné křížence slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) se slavíkem tmavým (*Luscinia luscinia*). *Kroužkovatel* 3, 21-23.

Kverek, P. (2007b). Vybrané výsledky kroužkování hnízdní populace slavíka obecného (*Luscinia megarhynchos*) na Mladoboleslavsku. *Panurus* 16, 59–64.

Lüpold, S., Calhim, S., Immler, S., and Birkhead, T. R. (2009). Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 276, 1175–1181.

Mallet, J. (2001). The speciation revolution. *Journal of Evolutionary Biology* 14, 887–888.

Matute, D. R. (2010). Reinforcement of gametic isolation in *Drosophila*. *PLoS Biology* 8. e1000341

* Mayr, E. (1942). Systematics and the origin of species, from the viewpoint of a zoologist (Harvard University Press), citováno dle Barton, N. H., and Hewitt, G. M. (1985). Analysis of hybrid zones. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16, 113–148.

Morrow, E. H. (2004). How the sperm lost its tail: the evolution of aflagellate sperm. *Biological Reviews* 79, 795–814.

Mossman, J., Slate, J., Humphries, S., and Birkhead, T. (2009). Sperm morphology and velocity are genetically codetermined in the zebra finch. *Evolution* 63, 2730–2737.

- * Muller, H. J. (1942). Isolating mechanisms, evolution and temperature. *Biology Symposium* 6, 71–125, citováno dle Orr, H. A. (1997). Haldane's rule. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 195–218.
- Nadachowska-Brzyska, K., Burri, R., Olason, P. I., Kawakami, T., Smeds, L., and Ellegren, H. (2013). Demographic divergence history of pied flycatcher and collared flycatcher inferred from whole-genome re-sequencing data. *PLoS Genetics* 9, e1003942.
- Orr, H. A. (1997). Haldane's rule. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28, 195–218.
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., and Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS ONE* 7, e37135.
- Pitnick, S., Spicer, G. S., and Markow, T. A. (1995). How long is a giant sperm? *Nature* 375, 109–109.
- Pitnick, S., Hosken, D. J., and Birkhead, T. R. (2009). Sperm morphological diversity. In *Sperm Biology: An Evolutionary Perspective*, pp. 69–149.
- Prager, E. M., and Wilson, A. C. (1975). Slow evolutionary loss of the potential for interspecific hybridization in birds: a manifestation of slow regulatory evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 200–204.
- Presgraves, D. C. (2002). Patterns of postzygotic isolation in *Lepidoptera*. *Evolution* 56, 1168–1183.
- Presgraves, D. C. (2008). Sex chromosomes and speciation in *Drosophila*. *Trends in Genetics* 24, 336–343.
- Price, T. D., and Bouvier, M. M. (2002). The evolution of F1 postzygotic incompatibilities in birds. *Evolution* 56, 2083–2089.
- Prum, R. O., Berv, J. S., Dornburg, A., Field, D. J., Townsend, J. P., Lemmon, E. M., and Lemmon, A. R. (2015). A comprehensive phylogeny of birds (*Aves*) using targeted next-generation DNA sequencing. *Nature* 526, 569–573.
- Randler, C. (2006). Extrapair paternity and hybridization in birds. *Journal of Avian Biology* 37, 1–5.

- Reif, J., Jiran, M., Reifová, R., Vokurková, J., Dolata, P. T., Petrusek, A., and Petrusková, T. (2015). Interspecific territoriality in two songbird species: potential role of song convergence in male aggressive interactions. *Animal Behaviour* 104, 131–136.
- Reifová, R., Kverek, P., and Reif, J. (2011a). The first record of a female hybrid between the common nightingale (*Luscinia megarhynchos*) and the thrush nightingale (*Luscinia luscinia*) in nature. *Journal of Ornithology* 152, 1063–1068.
- Reifová, R., Reif, J., Antczak, M., and Nachman, M. W. (2011b). Ecological character displacement in the face of gene flow: evidence from two species of nightingales. *BMC Evolutionary Biology* 11, 138.
- Rheindt, F. E., and Edwards, S. V. (2011). Genetic introgression: an integral but neglected component of speciation in birds. *The Auk* 128, 620–632.
- Rowe, M., Laskemoen, T., Johnsen, A., and Lifjeld, J. T. (2013). Evolution of sperm structure and energetics in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 280, 20122616.
- Schmoll, T., and Kleven, O. (2011). Sperm dimensions differ between two coal tit *Parus ater* populations. *Journal of Ornithology* 152, 515–520.
- Servedio, M. R., and Noor, M. A. F. (2003). The role of reinforcement in speciation: theory and data. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 34, 339–364.
- Snook, R. R. (2005). Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 46–53.
- Stadie, C. (1991). Erdsanger I; Nachtigall und Sprosser. *Europäische Vogelwelt* 3, 130–189.
- Storchová, R., Reif, J., and Nachman, M. W. (2010). Female heterogamety and speciation: reduced introgression of the Z chromosome between two species of nightingales. *Evolution* 64, 456–471.
- Supriya, K., Rowe, M., Laskemoen, T., Mohan, D., Price, T. D., and Lifjeld, J. T. (2016). Early diversification of sperm size in the evolutionary history of the old world leaf warblers (*Phylloscopidae*). *Journal of Evolutionary Biology* 29, 777–789.
- Veen, T., Borge, T., Griffith, S. C., Saetre, G.-P., Bures, S., Gustafsson, L., and Sheldon, B. C. (2001). Hybridization and adaptive mate choice in flycatchers. *Nature* 411, 45.

Vernon, G. G., and Woolley, D. M. (1999). Three-dimensional motion of avian spermatozoa. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 42, 149–161.

Vokurková, J., Petrusková, T., Reifová, R., Kozman, A., Mořkovský, L., Kipper, S., Weiss, M., Reif, J., Dolata, P. T., and Petrušek, A. (2013). The causes and evolutionary consequences of mixed singing in two hybridizing songbird species (*Luscinia spp.*). *PLoS ONE* 8, e60172.

Wolfson, A. (1952). The cloacal protuberance: a means for determining breeding condition in live male passerines. *Bird-Banding* 23, 159–165.

Wu, C.-I., and Ting, C.-T. (2004). Genes and speciation. *Nature Reviews Genetics* 5, 114–122.