

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie

Magisterská diplomová práce

**Genetická variabilita a diferenciace
eurasijských populací rákosníka obecného
(*Acrocephalus scirpaceus*)**



Bc. Drahomíra Fainová

Školitel: RNDr. Petr Procházka, Ph.D.



České Budějovice 2008

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především školitelovi Petrovi Procházkovi za skvělé vedení, ochotu, velkou trpělivost a cenné připomínky během sepisování práce. Dále patří velký dík Pepovi Bryjovi a Erice Bellinvií za jejich přátelský přístup, konzultace a předávání znalostí z genetiky. Jsem vděčná Erice za optimalizaci podmínek PCR, navržení multiplexů a pilotní analýzy a také kolegům ze zahraničí, kteří se podíleli na sběru vzorků. Všem studentům a pracovníkům laboratoře ve Studenci děkuji za přátelské prostředí a prima svérázný kolektiv☺. Závěrem bych chtěla ze srdce poděkovat Nezmarovi a všem blízkým!

Obsah

1	Abstrakt.....	4
2	Úvod.....	5
3	Cíle a predikce.....	11
4	Metodika.....	12
	4.1 Studovaný druh.....	12
	4.2 Odchytné lokality a materiál.....	13
	4.3 Mikrosatelity.....	14
	4.4 Genotypizace vzorků.....	16
	4.5 Analýza molekulárních dat.....	18
	4.5.1 Hardyho-Weinbergova rovnováha.....	18
	4.5.2 Nulové alely.....	19
	4.5.3 Genetická variabilita uvnitř populací.....	19
	4.5.4 Genetická diferenciace mezi populacemi.....	19
5	Výsledky.....	22
	5.1 Genotypizace vzorků.....	22
	5.2 Genetická variabilita uvnitř populací.....	22
	5.3 Genetická diferenciace mezi populacemi.....	23
6	Diskuze.....	31
7	Literatura.....	40

Přílohy

Článek: Procházka P., Bellinvia E., Fainová D., Hájková P., Elhalah A., Alomari K. (2008): Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Journal of Arid Environments, doi:10.1016/j.jaridenv.2008.02.005

1 Abstrakt

Fainová D. (2008): Genetická variabilita a diferenciace eurasijských populací rákosníka obecného (*Acrocephalus scirpaceus*) [Genetic variation and differentiation of Eurasian reed warbler (*Acrocephalus scirpaceus*) populations. Master Thesis, in Czech], Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Abstract: Eurasian Reed Warbler (*Acrocephalus scirpaceus*) is a long-distance migrant wintering in sub-Saharan Africa and breeding in reedbeds of the Western Palearctic. European populations migrate in two main directions (SW and SE). Though there is little morphological variation across the breeding range, Asian populations are traditionally separated from the nominate subspecies as the subspecies *fuscus*. My aim was to explore genetic differentiation among Eurasian Reed Warbler populations in respect to the factors which may have influenced the genetic diversity and divergence of the populations, such as a migratory divide, high migratory connectivity or isolation by distance. I used samples of 495 individuals from 36 populations across the breeding range using microsatellites. Pairwise fixation indexes F_{ST} showed significant differences among populations from the Iberian peninsula, Finland and the Middle East and the rest of populations. Exact tests of differentiation did not confirm non-random distribution between pairs of populations. Overall F_{ST} was statistical significant but very small ($F_{ST} = 0,018$). Analysis of molecular variance (AMOVA) revealed that 98% of variation was ascribable to variability of allele frequencies within populations. On the other hand, differences between populations contributed to overall variation with only 2%. Isolation by distance showed only weak relationship between geographical and genetic distances. Main analysis using Bayesian clustering approach implemented in software Structure 2.2. detected no genetic structure of population. Sampled Eurasian Reed Warbler populations seem to form one genetic population. Relatively low genetic diversification indicates large dispersal potential of the studied Reed Warbler populations, when gene flow successfully counters differentiation of population irrespective of large breeding area and high migrate connectivity between breeding and wintering area.

Prohlašuji, že jsem tuto magisterskou diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím uvedené literatury.

V Českých Budějovicích dne 28.4.2008

1 Úvod

Většina druhů vykazuje v rámci svého areálu variabilitu v mnoha znacích, ať už se jedná o morfometrii a zbarvení nebo o chování (Bensch et al. 1999, Irwin 2000, Zink & Dittmann 1993). Tyto geografické rozdíly jsou zpravidla důsledkem odlišných selekčních tlaků v různých částech areálu a z velké části jsou podmíněny geneticky, i když v mnoha případech může k zeměpisné proměnlivosti přispívat i fenotypická plasticita (Leafloor et al. 1998, Rhymer 1992).

Udržení dostatečné variability je významné pro zachování evolučního potenciálu druhů a podporu dlouhodobého přežívání jednotlivých populací (Frankham 1995, Lacy 1997, Leberg 1992). Pohyb živočichů a následný genový tok v metapopulační struktuře může podporovat a zvyšovat genetickou variabilitu v místních subpopulacích (Harrison & Hastings 1996). Vysoký stupeň genetické variability (např. působením genetického driftu anebo inbreedingu) je předpokladem schopnosti druhů účinně se bránit kompetici, před parazity, predátory, přizpůsobovat se změnám a kolísání podmínek prostředí (Amos & Harwood 1998). Naproti tomu pokud populacím hrozila ztráta genetické variability, potom nízká úroveň genetické variability v subpopulacích větších metapopulací byla identifikována jako kauzální faktor ve zvyšování pravděpodobnosti vyhynutí místních populací (Saccheri & Brakefield 2002, Westemeier et al. 1998).

Dynamické změny prostředí a klimatu mohou přinášet výrazné změny ekologických nik a v různé míře vedou k rozšíření či naopak zmenšení nebo fragmentaci areálu druhů (Hewitt 2000, Hewitt 2004). Tyto abiotické a biotické podmínky mohou silně působit na výběr habitatů a početnost koexistujících druhů. Změna velikosti, kvality a posun do jiných habitatů vyvolává u mnoha druhů snahu přizpůsobit se a reagovat na tyto podmínky např. změnou směru tahu na zimoviště (Bearhop et al. 2005). Tyto síly (selekční, vliv pohlavního výběru a rozdílných ekologických specializací), které často podmiňují vznik lokálních adaptací, mohou působit na genetické rozrůznění jednotlivých populací a v případě, že genový tok je dostatečně slabý a nestírá mezipopulační rozdíly, mohou druhy s vysokým stupněm diferenciace představovat stadium vedoucí ke vzniku subspecií či samotné speciaci (Amos & Harwood 1998). Z hlediska evoluční divergence druhu hrají významnou roli odlišné selekční tlaky a přirozený výběr, které mohou stačit k tomu, aby se populace rozdělila na různé ekologické formy, i když se jejich genetický materiál stále mísí.

Genetická variabilita populací

Variabilita organismů je významným faktorem v evoluci, poněvadž geneticky podmíněná proměnlivost je jednou ze základních podmínek fungování přirozeného výběru. Rozmanitost znaků je podmíněna jak geneticky, tak i podmínkami prostředí (Boake 1994). Zásadním zdrojem genetické proměnlivosti na úrovni druhu jsou mutace jako způsob vzniku nových alel společně s genetickým driftem, který náhodně mění frekvenci alel v populacích. Další silou podmiňující zachování genetického polymorfismu je selekce, jež souvisí s rozdílnou schopností reprodukce a přežití v různých biotopech.

V přírodních populacích živočichů dochází často k izolaci jednotlivých populací. Míra, jakou jsou jednotlivé populace odděleny, souvisí nejen s pohyblivostí daného druhu živočicha (např. v závislosti na jejich vzdálenosti a schopnosti disperze), ale je také ovlivněna lokálními podmínkami prostředí, odlišnými selekčními tlaky a úzce spjata se specifickým chováním např. asortativním párováním.

Působením těchto zmiňovaných skutečností dochází k trvalé či dočasné izolovanosti populací a s tím souvisejícímu snížení toku genů mezi populacemi (Castric et al. 2001). Existuje několik významných procesů, které se podílejí na ztrátě genetické variability v lokálních populacích a zapříčiňují rozrůznění populací. Jedná se především o genetický drift, omezený tok genů, selekci a inbreeding. Stupeň diference populací závisí na síle vlivu těchto faktorů.

Genetický drift a purifikující selekce způsobují podstatné snížení genetické variability, proto při ztrátě polymorfismu (poklesu genetické diverzity) lze očekávat zvětšení podílu homozygotů v populaci, expresi nebo fixaci škodlivých alel, zvýšení pravděpodobnosti inbreedingu a následné snížení schopnosti přizpůsobit se místním podmínkám (Amos & Harwood 1998, Galbusera et al. 2000, Jensen et al. 2007, Keller et al. 1994). Mnoho prospěšných adaptací může být vlivem driftu z populace odstraněno, dokonce i přes postupné a stabilizující zvýšení početnosti populace. Vliv genetického driftu se účinně projevuje obzvláště v malých populacích.

V populaci poznamenané efektem hrdla láhve („bottleneck effect“) za podmínek, kdy velikost populace rychle a výrazně poklesla, působí genetický drift nezávisle na působení selekce a může vyvolat dramatické změny ve frekvenci alel. V těchto populacích je znatelný velký úbytek počtu alel a heterozygotů na polymorfních lokusech (Amos & Harwood et al. 1998, Jensen et al. 2007). Snížení polymorfismu a efektivní velikosti populace může vést k redukci adaptivního potenciálu (Bijlsma et al. 1999,

Bijlsma et al.2000). V závislosti na působení genetického driftu, velikosti a izolovanosti dané populace lze předpokládat, že populace bude negativně ovlivněna ztrátou genetického polymorfismu (Frankham 1996, Frankham 1997).

Důkazy potenciálních genetických následků „bottlenecku“ v přirozených populacích poskytuje řada studií (Clegg 2002, Friar 2000, Hájková et al. 2007). Ačkoliv je zřejmé, že se mnoho vzácných alel z populací, které prošly „bottleneckem“, vytratí, nemusí to platit všeobecně a v některých případech, přestože početnost populace poklesne, nedojde ke ztrátě polymorfismu (Clegg et al. 2002, Friar et al. 2000). Tyto situace nastávají, když krátkodobý pokles početnosti je vystřídán strmým populačním růstem (Zenger et al. 2003) a nedostatek času tehdy totiž neumožní fixaci alel. Podle predikcí modelu zvýšení homozygosity, působí-li inbreeding dlouhodobě a postupně a u několika generací, je nárůst počtu homozygotů výsledkem nízké efektivní velikosti populace a inbreedingu. Na druhou pokud je účinek inbreedingu krátkodobý a intenzivní, „bottleneck“ v této souvislosti může mít i pozitivní vliv (Charlesworth & Charlesworth 1999).

Inbreeding (příbuzenské křížení) zvyšuje frekvenci homozygotů v populaci a ve svém důsledku může snížit fitness jedinců („inbreeding depression“) a následně zvýšit pravděpodobnost vymření populace (Bijlsma et al. 2000, Hedrick et al. 1996). Předpokládá se, že inbreeding mezi jedinci pocházejícími z malé populace způsobí, že se v populaci budou více v homozygotním stavu projevovat škodlivé recesivní alely. Tento jev se následně může projevit jako nižší plodnost, zmenší se pravděpodobnost dosáhnutí reprodukčního věku a lze očekávat zvýšenou úmrtnost mláďat (Caro & Laurenson 1994, Frankham 1998, Wright 1978).

Většina přirozených populací není zcela izolovaná a demografická i genetická struktura těchto populací se tvoří a mění vlivem rozdílné schopnosti jedinců šířit se. Imigrace nejen jednoznačně ovlivňuje schopnosti populace kolonizovat nová území anebo sytí a zvětšuje velikost populace, ale také se zřejmě podílí na obnovení a zvýšení genetické variability (Saccheri & Brakefield 2002), dále na zmírnění inbreedingu a posílení fitness (Ingvarson 2001). Jinak souvisí rychlost a způsob imigrace a genetická struktura populací. Rychlé šíření do dříve neobsazeného prostředí často s sebou nese vytvoření homogenní populační struktury, kdy převládá jeden genotyp, a působením „founder effect“ během probíhající kolonizace může způsobit i ztrátu a výrazné ochuzení variability („the leading edge hypothesis“, Hewitt 1999).

Ve studii Saccheriho & Brakefielda (2002), kde provedli experiment s imigrací, dokázali, že již malý počet migrantů může zvýšit genetickou diverzitu izolované populace (uvádí se 1 jedinec na generaci). Několik dalších studií na přirozených populacích se shoduje s výše zmíněným pokusem, že imigrace přispívá, i v případech, kdy je velmi nízká, ke zvýšení genetické variability (Hansson et al. 2000b, Ortego et al. 2007, Vilà et al. 2002). Z opačného pohledu na vliv migrace a variabilitu bylo zjištěno, že imigrace svým homogenizujícím účinkem může velmi významně zhoršovat schopnost lokální adaptace (Tallmon 2004).

Pro genetickou variabilitu populací je určující relativní významnost toku genů. Odhad relativní účinnosti genového toku a genetického driftu u volně žijících populací lze získat na základě analýzy geografické distribuce alelických frekvencí (Slatkin 1989). Genový tok i historické události mají vliv na genetickou diverzitu přirozených populací. K pochopení jejich účinku na genetickou variabilitu populací je vhodné posuzovat je vždy v příslušném ekologickém kontextu a v porovnání s rozdílnými taxonomickými skupinami, a na široké geografické škále (Dutech et al. 2004). Genový tok je důležitý, protože zmenšuje negativní vliv ztráty genetické variability („genetic erosion“) a v kontextu metapopulační struktury podporuje stabilitu subpopulací (Hanski 1999). Z toho vyplývá, že míra genetické variability a úroveň toku genů jsou podstatné pro genetickou diferenciaci mezi populacemi.

Genetická diferenciacie populací

Genetická divergencia populací je do značné míry podmíněna relativní silou přirozeného výběru a genetického driftu (které ji podporují) a intenzitou genového toku (který naopak působí proti diferenciaci). Důležitým faktorem, jenž přispívá k diferenciaci populací, může být rovněž snížená zdatnost imigrantů a selekce proti hybridům.

Jednou z nejsilnějších sil vedoucích k divergenci populací je izolace podmíněná geograficky. Z historického hlediska se na utváření současné podoby populačně-genetické struktury druhů projevilo pleistocénní zalednění. V Evropě mělo pleistocénní období za následek opakovaný ústup fauny i flóry ze severu do různých refugií na jihu po delší časová období (Hewitt 2002). Úroveň současné diferenciacie populací závisí na umístění těchto refugií, jejich vzájemné izolovanosti a následném průběhu postglaciální rekolonizace (Merilä et al. 1997, Taberlet et al. 1998). Studie u mnoha druhů zjistily, že v Evropě se populace během glaciálu, kdy probíhaly změny a posun habitatů,

diferencovaly, ale chybí znalosti o rekolonizaci v celém geografickém celku Eurasie (Bensch & Hasselquist 1999, Federov et al. 1999, Hewitt 2000, Kryukov & Suzuki 2000). Je otázkou, jestli genetické rozdíly mezi populacemi vznikly vlivem potenciálních izolačních bariér jako např. v oblasti Uralu nebo jsou důsledkem opakovaných expanzí a kontrakcí v čtvrtohorním rozšíření (Hewitt 2000, Merilä et al 1997).

Přirozený výběr může fungovat nejen na bázi izolace a lokálních adaptací odlišným abiotickým podmínkám v různých částech areálu, ale i na bázi diverzifikujících tlaků plynoucích z adaptací utvářených biotickými vlivy, jako je kompetice, pohlavní výběr apod. To znamená, že nejen odlišné ekologické podmínky, ale i chování (vznik nového taktiky sběru potravy, odlišný zpěv) může ve svém důsledku podporovat diferenciaci populací. Pokud je diferenciaci geneticky podmíněna, může mít dalekosáhlé důsledky pro genetickou strukturaci populací.

Migrace a tahové rozhraní

U tažných druhů ptáků může být samotná migrace vlivným faktorem, který se podílí na genetické diferenciaci populací. Směr migrace a další význačné komponenty ptačího tahu jsou geneticky podmíněny (Helbig 1996). U středoevropských pěvců kolem 18 % druhů migruje z hnízdišť na zimoviště v Africe dvěma rozdílnými směry: některé populace létají jihozápadní migrační cestou přes Pyrenejský poloostrov, část populací využívá jihovýchodní cestu (Bairlein 1985). Oblast, ve které jsou víceméně separované populace táhnoucí odlišnými směry, se nazývá tahové rozhraní (Salomonsen 1955, Schütz 1971). Jinými slovy tahové rozhraní lze popsat jako místo, kde se stýkají dvě parapatrické populace migrující odlišnými směry. Migrační rozhraní je udržováno selekcí proti hybridům populací s odlišnou preferencí směru tahu (Helbig 1992). Silná selekce proti hybridům vykazujícím suboptimální směr tahu tak může významně přispívat k reprodukční izolaci a následné divergenci populací s odlišným směrem tahu (Irwin & Irwin 2004). Studium migrace pěnice černohlavé (*Sylvia atricapilla*) a s tím souvisejících otázek (změna migračního chování, reprodukční úspěšnost a fitness) ukázalo, že došlo poměrně rychle k vytvoření nového zimoviště a že rozdílné načasování přiletu z odlišných zimovišť iniciovalo asortativní párování, které lze považovat za potenciál pro další divergenci populací, a dokonce naznačuje možnost postupné divergence směřující k dosud podceňované sympatrické speciaci (Bearhop et al. 2005).

Ve své diplomové práci jsem studovala diferenciaci eurasijských populací rákosníka obecného (*Acrocephalus scirpaceus*). Testovala jsem genetickou variabilitu a diferenciaci pomocí neutrálních genetických markerů - mikrosatelitů, které ukazují vysoký stupeň polymorfismu. Dala jsem přednost mikrosatelitům před mtDNA, protože na tomto markeru nebyla prokázána významná vnitrodruhová variabilita (Helbig & Seibold 1998). Předpokládala jsem, že pomocí mikrosatelitů zaznamenám významnou genetickou strukturovanost populací a naleznu rozdíly v souvislosti s jedním nebo více sledovanými faktory diferenciacie populací (tahové rozhraní, dva uznávané poddruhy, vliv efektu okraje areálu a izolovanosti populací jejich vzdáleností). Odlišné směry tahu, různá zimoviště a dva uznávané poddruhy naznačují potenciál pro genetickou diferenciaci populací tohoto druhu napříč hnízdním areálem. Součástí mojí práce je rovněž článek, který s tématem úzce souvisí a ve kterém jsem se společně s uvedenými autory pokusila odpovědět na otázku, zda degradace mokřadu v jordánské oáze Azraq ovlivnila genetickou variabilitu místní hnízdní populace rákosníka obecného. Zajímalo nás, zda u současné populace studovaného druhu bude možné najít sníženou genetickou variabilitu a určit efekt „bottlenecku“, který jsme předpokládali vzhledem k prudkému poklesu početnosti hnízdní populace v 90. letech.

3 Cíle a predikce

1. popsat genetickou variabilitu a diferenciaci populací rákosníka obecného analýzou mikrosatelitů a konfrontovat ji s existencí dvou uznávaných poddruhů a tahového rozhraní ve střední Evropě

- predikce: (1) protože má druh rozsáhlý areál, mozaikovitě hnízdí rozšíření a byly popsány dva poddruhy, očekávala jsem přítomnost geografické diferenciaci populací, přičemž jsem predikovala větší genetické rozdíly mezi geograficky vzdálenějšími populacemi. (2) s ohledem na odlišný směr tahu a poměrně silnou tahovou konektivitou mezi hnízdíšti a zimovišti, jsem předpokládala, že se budou populace geneticky lišit napříč tahovým rozhraním.

2. zjistit, jestli vysušení a dočasná degradace hnízdího biotopu ovlivnily genetickou variabilitu hnízdí populace v jordánské oáze Azraq

- v této souvislosti lze očekávat nízkou genetickou variabilitu a převahu heterozygotů v populaci, která zřejmě byla vystavena krátce trvajícím „bottleneck efektu“ (viz příložený manuskript, Přílohy).

4 Materiál a metody

Tato studie je součástí grantového projektu zabývajícího se problematikou diferenciací populací rákosníka obecného na tahovém rozhraní za využití populačně-genetických analýz, stabilních izotopů a kroužkovacích dat (European Reed Warbler populations across a migratory divide: insights into migration by analyses of DNA sequences, stable isotopes and ringing recoveries, řešitel P. Procházka). V rámci zmiňované studie byly díky P. Procházkovi a síti spolupracovníků po celé Evropě nasbírány vzorky krve celkem od 495 jedinců rákosníka obecného a podařilo se tak pokrýt hnízdní areál poddruhu *scirpaceus*. Pro obsáhnutí co největší genetické variability druhu probíhaly také sběry v asijské části areálu, kde má rozšíření poddruh *fuscus*. Vlastní laboratorní práci jsem realizovala v molekulární laboratoři Oddělení populační biologie Ústavu biologie obratlovců AV ČR, v.v.i., ve Studenci.

4.1. Studovaný druh

Rákosník obecný je v Evropě běžně rozšířený druh z čeledi Sylviidae (Obr. 1), svým hnízdním výskytem vázaný na rákosiny (*Phragmites australis*, *Typha* spp.). Na základě geografického rozšíření a zbarvení se u tohoto druhu rozlišují dva podruhy *scirpaceus* a *fuscus* (Cramp 1992). Poddruh *scirpaceus* hnízdí v Evropě a poddruh *fuscus* se vyskytuje v asijské části areálu. Biometrické znaky obou poddruhů vykazují značný překryv (Pearson et al. 2002).

Zimoviště tohoto druhu se nachází v subsaharské Africe. Populace rákosníka obecného ze západní a z části střední Evropy migrují jihozápadním směrem přes Pyrenejský poloostrov. Jihovýchodním směrem táhnou rákosníci hnízdící ve střední a jihovýchodní části Evropy. Tahové rozhraní bylo stanoveno a vymezeno z dat z kroužkování a ze zpětných hlášení (Schlenker 1988, Zink 1973).



Obr. 1: Hnízdní areál rákosníka obecného (Leisler 1991).

Studovaný druh je vhodným modelovým organismem pro populačně-genetické studie. Jednak tím, že je hojný a široce rozšířený, jednak také tím, že díky specifickým biotopovým nárokům se vytváří víceméně mozaikovitý výskyt. Přestože se jedná o druh s vysokou schopností šířit se, má relativně úzkou ekologickou valenci, a důsledkem toho vzniká ostrůvkovité rozšíření napříč celým areálem. V průběhu 20. století se druh šířil na sever Evropy (Schulze-Hagen 1997). Vlivem vysychání mokřadů, degradací a úbytkem rákosových porostů dochází k lokálním fluktuacím a změnám ve velikosti populací. V 80.-90. letech 20. století byl zaznamenán pokles početnosti ve Velké Británii, Belgii a Španělsku zapříčiněný velkým znečištěním, nadměrnou eutrofizací vody a zmenšením plochy rákosin (Cramp 1992).

4.2 Odchytové lokality a materiál

Design výběru odchytových lokalit byl navržen tak, aby se co nejlépe pokryl celý areál rozšíření rákosníka obecného s důrazem na sběr dat v oblasti tahového rozhraní. Odchyty probíhaly vždy v hnízdní sezóně v letech 2003-2006. Od každého jedince bylo odebráno 5–15 μ l krve, která byla před izolací DNA uchována v 96% roztoku ethanolu. Vzorky krve byly získány z 21 hnízdních populací a k zpracování rovněž přibyly vzorky z 11

dalších evropských populací (po 10 vzorcích z každé populace, vyjma Dánska a Norska, kde $n = 5$) poskytnuté B. G. Stokkem (NTNU Trondheim). Od S. Fregin (Vogelwarte Hiddensee) navíc bylo zapůjčeno několik dalších vzorků z asijské části areálu. Celkem jsem zpracovala vzorky krví od 495 jedinců z 36 lokalit (Obr. 2).

Reprezentativní vzorek každé populace jedné lokality představuje minimálně 10 jedinců (Přílohy, Tab.1). Do některých analýz (viz dále) jsem také zahrnula vzorky z lokalit, kde byl odchyten menší počet jedinců.



Obr. 2: Přehled odchyťových lokalit napříč hnízdním areálem rákosníka obecného (názvy lokalit, používané zkratky lokalit, souřadnice, počet jedinců/lok. viz Přílohy, Tab. 1).

4.3 Mikrosatelity

Charakteristika

Mikrosatelity jsou úseky DNA tvořené mnohonásobnými tandemovými repeticemi nejčastěji o délce dvou až šesti párů bází. Vzhledem k vysoké mutační rychlosti jsou mikrosatelity vysoce polymorfní (Tautz 1989, Zima 2004). Rozmanitost alel je možné testovat a zjistit v laboratoři. Přestože je vlastní biologická funkce mikrosatelitových lokusů v genomu neznámá, umožňuje jejich variabilita provádět genetické studie u řady druhů rostlin a živočichů na úrovni populací i v rámci jedinců jedné populace.

Výhody plynoucí z možnosti využití mikrosatelitů činí tuto metodu velmi atraktivní v široké škále oborů od populačně-genetických až po makroekologicky zaměřené práce. Výhodu přináší především možnost poměrně snadno opakovatelné genotypizace, zároveň jejich výraznou předností je citlivost pro zachycení vnitropopulační variability, což je také spojeno s rozvojem relativně dobře uživatelsky zvladatelných genetických programů .

Mikrosatelitové markery lze získat vyhledáváním sekvencí obsahujících repetic v genomických knihovnách nebo např. metodou cross-amplifikace představující využití primerů identifikovaných u blízce příbuzných druhů. Ačkoliv mikrosatelitové primery nemohou být použity univerzálně, za určitých podmínek je amplifikace uskutečnitelná. Značná pozornost se věnuje výzkumu spjitosti mezi úspěšností cross-species amplifikace u ptáků a zdrojem primerů u evolučně vzdálených druhů (Dawson et al. 2000, Galbusera et al. 2000, Primmer et al. 1996), z jejichž výsledků vyplývá logická negativní závislost úspěšné cross-species amplifikace a evoluční vzdálenosti zdrojových druhů (Scribner & Pearce 2000). Některé dřívější studie dokázaly, že mikrosatelity popsané u jednoho druhu jsou použitelné pro více dalších druhů stejné čeledi. Ačkoli dosažené poznatky jsou přesvědčivým důkazem pro tuto metodu, limitující se stává úzký výběr testovaných primerů oproti velkému počtu zkoumaných druhů (Galbusera et al. 2000). Amplifikace je dostatečně úspěšná a svědčí o tom řada evolučně-genetických studií využívající výhradně takto získané mikrosatelity (Brumer et al 1998, Burland et al. 1998, Johnsen et al. 1998).

Struktura

Většina mikrosatelitů v genomu pravděpodobně tvoří dinukleotidové repetic. U obratlovců se nejčastěji vyskytují motivy (AC)_n nebo (AT)_n (Toth et al. 2000). Trinukleotidové mikrosatelity se běžně vyskytují jako sekvence (AAT)_n a (CAG)_n (Hancock et al. 1999) a u tetranukleotidových se nachází téměř výhradně sekvence (GATA)_n a (GACA)_n (Jarne & Lagoda 1996).

V kódujících oblastech obratlovců je přítomno pouze 9-15% mikrosatelitů (Jurka & Pethiyagoda 1995, Moran 1993, Van Lith & Van Zutphen 1996). Tuto nízkou frekvenci mikrosatelitů v kódujících oblastech lze pravděpodobně vysvětlit negativní selekcí posunových mutací při translaci. (Li et al. 2004, Metzgar et al. 2000).

Mikrosatelitové markery jsou tvořeny repetitivní sekvencí bází a na okrajích vymezeny přesně definovaným sledem bází (tzv. „flanking regions“). Tato sekvence se používá pro design primeru při PCR amplifikaci daného úseku DNA. Jednotlivé alely se liší počtem repeticí a následně tedy i celkovým počtem bází, tj. délkou lokusu.

Populačně-genetická analýza mikrosatelitů

Aplikace mikrosatelitů v populační genetice nese zásadní rozhodnutí při výběru mutačního modelu. Mutační rychlost mikrosatelitů, která je zodpovědná za vysokou různorodost mikrosatelitů, je poměrně vysoká 10^{-2} - 10^{-6} na lokus a generaci (Sia et al. 2000), ve srovnání s mutační rychlostí na kódující oblasti genomu. Takto vysokou mutační rychlost nám mohou vysvětlit dva hypoteticky předpokládané mutační mechanismy. První představuje „Infinite alleles“ (IA) models (Kimura & Crow 1964) a druhý pojmenovaný jako „Stepwise mutation“ (SM) model (Kimura & Ohta 1978). Tyto dva nejčastěji používané modely se liší především způsobem vzniku alel, rychlostí jejich vzniku a konkrétně definovanými podmínkami (např. IAM model nepovoluje homoplasie a identické alely jsou identical by descent (IBD), blízkost ve smyslu počtu repeticí neurčuje míru fylogenetické příbuznosti). S ohledem na své odlišnosti je upřednostňován model SM, poněvadž vystihuje vztah mezi individuální a populační strukturou. Oba modely mají i své nevýhody. Problémy s využitím SM modelu mohou způsobovat homoplasie, které mohou zkreslovat výsledky populačně-genetické analýzy. Dvě alely se jeví jako totožné, i když mají jiného předka. Chybné hodnocení vlivem homoplasie se objevuje především při celkovém hodnocení velkých populací (Estoup et al. 2002). Aplikace modelu se apriori u velkých populací nevylučuje, protože negativní vliv homoplasíí bývá eliminován studiem více lokusů.

4.4 Genotypizace vzorků

Izolace DNA

DNA jsem extrahovala ze vzorků krve komerčním kitem DNeasy Tissue Extraction Kit (QIAGEN, Inc.). Při izolaci jaderné DNA jsem postupovala podle metodických instrukcí výrobce kitu. Část odebrané krve konzervované 96% ethanolem jsem odebrala a umístila do 1,5 ml mikrozkušavky. Přebytečný ethanol jsem odlila a pro úplné odstranění ethanolu jsem vzorek krve nechala vysušit v termostatu s nastavenou teplotou na 55 °C po dobu maximálně 40 min. K vysušenému vzorku krve jsem přidala 180 µl pufru ATL

a 20 µl proteiny K. Směs jsem promíchala (Vortex GENIE – 2, Scientific industrie) a umístila do termostatu předehřátého na 55 °C po dobu 1 hodiny. Poté jsem vzorek opět promíchala a přidala 200 µl pufru AL, následně opět promíchala. Homogenní směs jsem nechala inkubovat při teplotě 70°C po dobu 10 min. Výsledný lyzát jsem smíchala s 200 µl 96% nedenaturovaného ethanolu. Důsledně jsem vzorek promíchala, aby nedošlo k precipitaci DNA.

V dalším kroku jsem směs přemístila do DNeasy Mini Spin kolony a odstředila v centrifuze s frekvencí 8000 ot./min po dobu 1 minuty. Následoval obdobný postup, kdy po přidání 500 µl pufru AW1 a odstředění při 8000 ot./min jsem kolony za stejných podmínek a stejné množství dalšího použitého pufru AW2 nechala stočit při frekvenci 13400 ot./min po dobu 5 minut. V konečné fázi promývání kolon a eluci DNA jsem přidala 150 µl pufru AE celkového objemu 200 µl a centrifugovala s 8000 ot./min po dobu 1 min a pro důkladné odstranění byl dodán zbytek objemu tj. 50 µl a vzorek znovu odstředěn za stejných podmínek. Izolovanou DNA jsem uchovávala v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

PCR amplifikace

Polymerázovou řetězovou reakcí (PCR) byla testována amplifikace celkem 11 mikrosatelitů (Přílohy, Tab. 2). Sekvence primerů pro tyto lokusy jsou převzaty z originálních publikací a aplikovány po vyzkoušení a doporučení kolegou H. Jensenem (NTNU Trondheim). Jednalo se o primery původně navržené pro blízké příbuzné druhy (*Acrocephalus arundinaceus*, Hansson et al. 2000a, a *Acrocephalus sechellensis*, Richardson et al. 2000) - lokusy Aar4, Aar5, Aar8 a Ase34, Ase58) a nebo pro jiné druhy (*Hirundo rustica*, Primmer et al. 1995, *Parus caeruleus*, Dawson et al. 2000, *Passer domesticus*, Neumann & Wetton 1996, *Phylloscopus occipitalis*, Bensch et al. 1997, *Ficedula hypoleuca*, Ellegren 1992, *Pica pica*, Martínez et. al 1999) - lokusy Hru5, Pca3, Pdo1, Pocc2, Fhu2, Ppi2. Většina těchto primerů byla již dříve testována na různých druzích rodu *Acrocephalus* (Hansson et al. 2000a, Richardson et al. 2000).

Amplifikace všech lokusů probíhala podle protokolů převzatých od kolegy Jensena s již optimalizovanými podmínkami. Pro PCR reakce byly sestaveny tři multiplex sety a optimalizovány podmínky. U lokusu Hru5 se nepodařilo optimalizovat podmínky pro PCR, a proto byl tento primer z analýz vyloučen. V průběhu laboratorních prací jsem testovala úspěšnost PCR reakcí na 1% agarosovém gelu v TBE pufru.

Směs pro PCR reakci byla připravena smícháním nukleotidů (dNTPs), DNA-polymerázy (*Taq* DNA polymeráza), chloridu hořečnatého (3mM MgCl₂) a pufru (1 x *Taq* DNA buffer). Ke každé reakci byly přidány značené „forward“ a neznačené „reverse“ primery v různých koncentracích, dále ddH₂O a izolovaná DNA. Forward primery byly značeny fluorescenční barvou (ABI PRISM): VIC (Aar5, Pca3, Ppi2), NED (Aar8, Fhu2, Pdoμ1), PET (Ase34, Pocc2) nebo 6-FAM (Aar4, Ase58).

PCR reakce probíhala za speciálních podmínek stanovených a optimalizovaných pro každý primer anebo multiplex (Přílohy, Tab. 3). Pro vlastní průběh reakce byl použit termocykler Mastercycler ep gradient S (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

Fragmentační analýza

Fragmentační analýza získaných produktů PCR byla provedena v sekvenátoru ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Inc.). PCR produkt (0,7 μl) byl smíchán s 0,7 μl velikostního standardu GeneScanTM – 500 LIZ (Applied Biosystems) a 12 μl Hi-DiTM Formamidu (Applied Biosystems). Jednotlivé fragmenty byly posléze separovány kapilární elektroforézou. Genotypy jednotlivých jedinců jsem odečetla z výstupu fragmentační analýzy v programu GeneMapper 3.7 (Applied Biosystems, Inc.).

4.5 Analýza molekulárních dat

4.5.1 Hardyho-Weinbergova rovnováha

Exaktní test Hardyho-Weinbergovy rovnováhy (HWE, Haldane 1954) testuje hypotézu, že zkoumaný diploidní organismus je produktem náhodného párování gamet. Zaznamenaná odchylka vypovídá o přítomnosti nulových alel nebo asortativním páření. V programu GENEPOP verze 3.4 (Raymond & Rousset 1995) jsem testovala odchylku od HWE na všech sledovaných lokusech v rámci jednotlivých populací ("exact probability test"). Hodnota signifikance (p) byla stanovena pomocí metody Markovova řetězce s 10 000 permutacemi („Markov Chain reaction“, Guo & Thompson 1992). Jako alternativní dostupnou metodu k exaktnímu HWE testu jsem v programu GENETIX (Belkhir et al 1996) vypočítala koeficient inbreedingu F_{IS} (Hartl & Clark 1997) vypovídající o potenciální ztrátě heterozygotů v důsledku nenáhodného párování.

4.5.2 Nulové alely

Pro stanovení frekvence nulových alel v jednotlivých populacích byly pro porovnání dvou různých algoritmů použity dva programy - FreeNA (Chapuis & Estoup 2007) a Cervus 3.0 (Kalinowski et al. 2007, Marshall et al. 1998). FreeNA používá pro odhad nulových alel metodu označovanou jako ENA (Chapuis & Estoup 2007). Princip korekce je založen na efektivní opravě zkreslených hodnot F_{ST} vyvolaných přítomností nulových alel a poskytuje odhad hodnot F_{ST} .

4.5.3 Genetická variabilita uvnitř populací

Základní deskriptivní populačně-genetické statistiky umožňují popsat genetickou diverzitu v rámci populací. Program FSTAT 2.9.3 (Goudet 2001) jsem použila k deskripci genetické struktury populací zahrnující průměrný počet alel, frekvence alel jednotlivých lokusů a výpočet očekávaných (H_e) (Nei 1978) a pozorovaných (H_o) heterozygotností pro dané lokusy na všech lokalitách. Využitím tohoto programu jsem rovněž stanovila alelickou bohatost (AR) („allelic richness“, Petit et al. 1999) korigovanou na velikost vzorků metodou "rarefaction" pro srovnání genetické variability u různě velkých vzorků. Na rozdíl od předchozích testů jsem do vstupních dat výpočtu AR zahrнула jen populace s více než 10 jedinci.

Software Arlequin 2.000 pro analýzu populačně-genetických parametrů (Schneider et al. 2000) byl použit k vypočtení vazbové nerovnováhy („linkage disequilibrium), který slouží k otestování nulové hypotézy, že distribuce alel mezi sledovanými lokusy je nezávislá.

4.5.4 Genetická diferenciace mezi populacemi

V programu GENEPOP verze 3.4 (Raymond & Rousset 1995) jsem provedla exaktní testy alelické a genotypové diferenciace (metodou Markovových řetězců). Na základě výpočtu alelické diferenciace mezi populacemi je testována nulová hypotéza, že distribuce jednotlivých alel je ve všech sledovaných populacích shodná. Nulová hypotéza pro genotypovou diferenciaci říká, že sledované populace mají stejné rozložení genotypů (Raymond & Rousset 1995).

Pro vyjádření stupně divergence mezi jednotlivými populacemi jsem použila fixační index F_{ST} podle Weira & Cockerhama (1984). F_{ST} testuje vliv rozdělení populace na subpopulace, přičemž lze vypočítat korigované F_{ST} na velikost vzorku a počet populací (Weir & Cockerham 1984). Výpočty obou koeficientů jsem provedla

v programu GENETIX (Belkhir et al. 1996). Fixační index (F_{ST}) odráží úroveň genetické variability mezi jednotlivými populacemi. Vyšší hodnoty F_{ST} signalizují snížení toku mezi populacemi a poukazují na vliv genetického driftu, kdy se v subpopulacích fixují odlišné alely. Významnost těchto indexů (tj. odlišnost od nuly) byla testována na základě 10000 permutací v programu Genetix. Párová porovnání F_{ST} pro všechny populace byla provedena opět pomocí programu Genetix a jeho signifikantní odlišnost od nuly byla stanovena také na základě 10000 permutací.

V softwaru Arlequin 2.000 byla provedena analýza molekulární variance (AMOVA) za účelem vysvětlení zdroje variability na základě frekvencí alel. Signifikace testu detekované genetické struktury (jedinců, uvnitř populací, mezi populacemi a mezi skupinami (Přílohy, Tab. 4) je založena na neparametrických permutacích (Excoffier et al. 1992).

V programu GENETIX (Belkhir et al 1996) jsem testovala izolaci vzdáleností „Isolation by distance“, pomocí níž se hodnotí, jestli koreluje genetická a geografická vzdálenost, přičemž zohledňuje mnohonásobná porovnání. Izolace vzdáleností se hodnotí pomocí Mantelova testu (Mantel 1967), který využívá permutace pro determinaci rozložení testovaných dat, k otestování daných dat a ke stanovení intervalu, kdy dochází k zamítnutí nulové hypotézy. Srovnávané parametry testu tvoří dvě matice. Jedna matice zahrnuje genetické diference populací a druhá obsahuje přirozené logaritmy geografických vzdáleností (\ln vzdáleností) mezi dvojicemi populací. Genetická diference mezi dvěma populacemi je vyjádřena hodnotou $F_{ST}/(1-F_{ST})$, která popisuje populace rozmístěné ve 2D prostoru lépe než standardní F_{ST} index (Rousset 1997). Geografickou vzdálenost jsem určila výpočtem vzdálenosti přímou vzdušnou čarou mezi jednotlivými lokalitami v programu PGSoft (Přílohy, TAb. 1). Hladina průkaznosti byla ověřena permutačním testem (10000) a u dílčích korelací zjišťována permutačním testem, kdy vždy jedna matrice zůstala konstantní a druhá s permutujícím řádkem i sloupcem.

Pomocí faktoriální korespondenční analýzy (FCA) v programu Genetix 4.05.2. lze získat grafický výstup, který znázorňuje vzájemný vztah jedinců nebo populací. Výsledkem je trojrozměrný nebo dvojrozměrný graf, ve kterém je znázorněna prostorová pozice všech jedinců ze sledovaných populací nebo pozice jednotlivých populací na základě jejich genotypu. FCA byla provedena pro všechny populace.

Genetická struktura populací založená na individuálních genotypech ("individual based") byla provedena v programu Structure 2.1 (Pritchard et al. 2000). Principem této

analýzy je přiřazení jedinců na základě jejich genotypů do předem definovaného počtu skupin, přičemž se nezohledňuje příslušnost jedince k jeho reálné populaci. Tento program zahrnuje bayesovskou shlukovací „admixture“ analýzu, kdy je soubor jedinců rozdělen na základě genotypů do K skupin (= populací). Pro každé K je vypočítávána věrohodnost („likelihood“) modelu. Výpočet byl prováděn pro parametry $K = 1 - 10$, burn-in period = 100 000, počet iterací 500 0000, hodnota ALPHA je náhodná, pro každou populaci jiná, počáteční ALPHA = 1.0, ALPHAMAX = 10, APLPHAPROPSD = 0,25, ALPHAPRIORA = 0,05, ALPHAPRIORB = 0.001. Pro každé K byla simulace třikrát opakována. Výběr modelu se řídí podle nevyšší věrohodnosti. Na základě nejlepšího modelu (tj. modelu, který s nejvyšší věrohodností rozdělí jedince do K skupin) lze následně určit příslušnost daného jedince do některé z K populací.

5 Výsledky

Do provedených analýz byly zahrnuty pouze lokality s korigovaným počtem vzorků tzn. nad deset jedinců na lokalitu. Celkem bylo pro většinu genetických analýz použito 24 lokalit s 443 jedinci (od 10 do 40 jedinců na populaci) (Přílohy, Tab.1). Výjimkou je test detekce populačně-genetické struktury v programu Structure, kde bylo vyhodnoceno všech 495 jedinců z 36 populací (viz Obr. 2, str. 13, kapitola Metodiky).

5.1 Genotypizace vzorků

Pro veškeré genetické analýzy až na uvedené výjimky bylo použito deset lokusů amplifikovaných ve třech multiplexech PCR. Alely lokusů Aar5, Ase34, Fhu2 a Ppi2 se délkou nelišily vždy o délku repetice, ale i o 1 bp, obdobně u lokusu Ase58 o 3 bp namísto 6 bp, což je vysvětlitelné tím, že v minulosti pravděpodobně došlo k mutaci typu inzerce-delece i mimo jednotku repetice („indels“). Všechny lokusy byly polymorfní s rozsahem počtu alel od 5 do 29 na lokus. Všechny lokusy (napříč populacemi) vyhovovaly Hardyho-Weinbergově rovnováze ($P > 0,05$).

5.2 Genetická variabilita uvnitř populací

Výsledky výpočtů frekvence nulových alel v programu FreeNA u všech 10 lokusů na 24 lokalitách ukázaly, že se podíl nulových alel vyšší než 0,05 vyskytuje ve 33 případech. Programy Cervus i FreeNA se shodly, že největší frekvence nulových alel se vyskytuje u lokusu Ppi2 (FreeNA: 7 populací s frekvencí vyšší než 0,05 – Španělsko ES, Francie FR, Chorvatsko HR_SE, Polsko PL, Rumunsko RO_D, Kypr CY, Jordánsko JO) (viz Přílohy, Tab. 1).

Počet alel, očekávaná (HE) a pozorovaná (HO) heterozygotnost pro analyzované populace na všech lokusech jsou shrnuty v Tab.1. Průměrný počet alel kolísal od 2 do 20 na populaci/lokus. Průměrná heterozygotnost HE a HO činila 0,64 a 0,67 a mezi populacemi kolísala minimálně. Hodnoty alelické diverzity (AR; počítána pro 10 diploidních jedinců, tj. nejmenší vzorek na populaci) na lokus kolísaly v rozpětí od 1,7 do 9,7. Průměrná hodnota AR pro jednotlivé populace se pohybovala od 4,8 do 5,9 (nejvyšší hodnoty AR byly zaznamenány u populací SK, IT, HR_SE a naopak nejmenší u HU_W, RO_D, CY). AR umožňuje porovnání mezi populacemi a lze jej v tomto případě použít pro hodnocení, jak se AR liší mezi populacemi na obou stranách tahového rozhraní.

Interpopulační diferenciace hodnocení AR mezi populacemi ze severní části areálu (FL, LT, PL) a z jižní části (SP, SP_E, PT, IT, CY, TK_M) ($AR = 5,46$, $AR = 5,39$, $P = 0,64$) a mezi JZ a JV táhnoucími populacemi ($AR = 5,45$, $AR = 5,35$, $P = 0,63$) jsou velmi podobné, hodnoty se signifikantně neliší („two sample permutation test“ v FSTATu).

Z 24 hodnocených populací byla zaznamenána odchylka od Hardyho-Weinbergovy rovnováhy (HWE, $P > 0,05$) u osmi populací (Chorvatsko HR_SE a HR_I, Slovensko SK, Jordánsko JO, Španělsko ES, Polsko PL, Turecko TK_M, Maďarsko HU_W). F_{IS} je u tří populací signifikantně větší než nula (Tab. 1) a signalizuje možný úbytek heterozygotů a vysoké hodnoty inbreedingu nebo vysokou frekvencí nulových alel (kolikrát se u 10 lokusů vyskytla vysoká frekvence nulových alel: Chorvatsko HR_SE – 2x, HR_I – 3x, Slovensko SK – 1x, Jordánsko JO – 3x, Španělsko ES – 2x, Polsko PL – 1x, Turecko TK_M – 2x, Maďarsko HU_W – 2x) Výsledek F_{IS} je pravděpodobně ovlivněn malým počtem vzorků těchto populací, kdy mohlo dojít k nenáhodnému vzorkování. Všechny tyto populace mají shodně po 10 jedincích,.

5.3 Genetická diferenciace mezi populacemi

Celkový fixační index F_{ST} činí 0,015 a signifikantně se liší od nuly (reálná hodnota F_{ST} je podstatně vzdálena od simulovaných hodnot, $p < 0,005$ se signifikantně liší od nuly, což znamená, že sledované populace jsou geneticky rozdílné. Přestože je celková hodnota F_{ST} signifikantní, její velmi malá hodnota značí nevýraznou genetickou diferenciaci mezi populacemi. Přičemž hodnota celkové F_{ST} vypočítaná pomocí FreeNa s korekcí ENA je téměř totožná o velikosti 0,015, test signifikace potvrdil odlišnost od nuly („bootstrapping resampling“, 95 % konfidenční interval, 0,010 - 0,021).

Populace	F_{IS}	P (H-W)	AR	H_E	H_o
PT	0,04	0,10	5,36	0,66	0,64
ES	0,04	0,19	5,26	0,66	0,63
ES_D	0,05	0,15	5,68	0,69	0,66
FR	0,09	0,06	5,42	0,67	0,62
DENW	0,07	0,08	5,74	0,71	0,66
DEB	-0,02	0,70	5,14	0,67	0,68
IT	0,04	0,18	6,10	0,73	0,70
HR_I	0,19	0,00	5,16	0,68	0,56
HR_SE	0,04	0,11	5,58	0,69	0,67
CZ_SY	0,06	0,06	5,14	0,65	0,61
CZ_HO	0,01	0,41	5,61	0,69	0,69
PL	0,13	0,00	5,42	0,69	0,60
SK	0,07	0,02	6,32	0,75	0,70
HU_W	0,11	0,02	4,99	0,65	0,59
HU_C	0,00	0,42	5,33	0,69	0,69
HU_E	-0,09	0,98	5,50	0,68	0,74
LT	0,08	0,06	5,47	0,63	0,58
FL	0,02	0,26	5,09	0,67	0,66
BG_W	0,07	0,01	5,53	0,69	0,64
RO_T	0,09	0,05	5,59	0,68	0,62
RO_D	0,24	0,00	4,78	0,67	0,51
TK_M	0,05	0,04	5,94	0,72	0,68
CY	0,04	0,21	4,79	0,58	0,56
JO	0,09	0,00	5,44	0,68	0,62

Tab. 1: Výsledné hodnoty fixačních indexů F_{IS} , alelické diverzity AR (korigované na velikost populace $N=10$), průměrné pozorované H_o a očekávané heterozygotnosti H_E a výsledky testu vychýlení z Hardyho-Weinbergovy rovnováhy P (H-W). Tučně jsou vyznačeny signifikantní hodnoty F_{IS} . Zkratky populací jsou uvedeny v Tab. 1 v Přílohách.

Párová F_{ST} mezi jednotlivými populacemi se pohybují v rozmezí -0,001 - 0,068. Tyto hodnoty jsou však nízké a naznačují jen velmi slabou genetickou diferenciaci mezi populacemi. Ze 625 párových porovnání 124 vykazuje, že se populace signifikantně liší ve frekvenci alel a genotypů i fixačních indexů. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi populacemi z Blízkého Východu, Pyrenejského poloostrova, Finska a zbytkem studovaných populací. Pokud nedošlo k diferenciaci, nelze jednoznačně popsat, že je způsobena tím, jestli se populace nacházejí blízko sebe a proto se neliší. Příkladem jsou dvě populace z Chorvatska HR_SE a HR_I a obdobně obě populace z Německa se, které se vzájemně od sebe neliší, ale u mnoha sousedních populací byly zaznamenány

signifikantní odlišnosti (např. Maďarsko HU_C a HU_W $F_{ST} = 0,03$, $P < 0,001$, Portugalsko a Španělsko $F_{ST} = 0,023$, $P < 0,001$, Česká republika CZ_HO a CZ_SY $F_{ST} = 0,28$, $P < 0,001$). Největší míra diferenciacce byla zjištěna mezi populacemi Španělsko ES – Finsko FL, Kypr CY-Španělsko ES.

Interpopulační diferenciacce v rámci ssp. *fuscus* a *scirpaceus* ($F_{ST} = 0,014$, $F_{ST} = 0,017$, $P = 0,82$) a mezi JZ a JV táhnoucími populacemi ($F_{ST} = 0,016$, $F_{ST} = 0,011$, $P = 0,49$) jsou velmi slabé, hodnoty se signifikantně neliší („two sample permutation test“ v FSTATu).

Analýza molekulární variance (AMOVA)

Výsledky AMOVY ukázaly, že 98 % genetické variability lze přičíst na vrub rozdílům v rámci populací, kdežto rozdíly mezi populacemi přispívají k celkové variabilitě pouhými 2 % (Tab. 2). Pomocí AMOVY byl rovněž testován stupeň variability mezi dvěma skupinami populací. V první skupině (1) jsou rozřazeny populace táhnoucí jihovýchodním nebo jihozápadním směrem, skupina druhého testu (Tab. 3) (2) tvoří rozdělené populace poddruhu *scirpaceus* a *fuscus* (Tab. 4). Výsledky testu (1) značí velmi nízké procento vysvětlené variability vztahující se k rozdílům mezi definovanými skupinami (1,5%) a vysokou variabilitu mezi samotnými jedinci uvnitř populací (98,4%). Shodně lze interpretovat výsledky AMOVY mezi skupinami dvou poddruhů. Tento výsledek je potvrzením analýzy variability mezi všemi populacemi.

Zdroj variability	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Vysvětlená variabilita
Mezi populacemi	1	170,8	0,05	1,6 %
Uvnitř populací	23	3151,5	3,27	98,4 %
Celková variabilita	849	3425,3	3,33	
F_{ST} :	0,034			

Tab.2: Analýza variance alelických frekvencí (AMOVA). Procento vysvětlené variability odráží míru vysvětlené odlišnosti buď mezi populacemi nebo v rámci populací mezi jedinci.

Zdroj variability	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Vysvětlená variabilita
Mezi skupinami	1	8,07	0,007	0,22 %
Mezi populacemi uvnitř skupin	22	101,8	0,064	1,4 %
Uvnitř populací	827	2672	3,25	98,4 %
Celková variabilita	849	2781,9	3,23	
F_{ST} :	0,016			

Tab.3: Analýza variance alelických frekvencí (AMOVA) populací táhnoucích buďto jihozápadním nebo jihovýchodním směrem. Procento vysvětlené variability odráží míru vysvětlené odlišnosti mezi skupinami, populacemi a v rámci populací mezi jedinci.

Zdroj variability	d.f.	Suma čtverců	Variance komponentů	Vysvětlená variabilita
Mezi poddruhy	1	8,6	0,009	0,29%
Mezi populacemi uvnitř poddruhů	22	101,3	0,045	1,37%
Uvnitř populací	827	2672	3,23	98,30%
Celková variabilita	849	2781,9	3,28	
F_{ST} :	0,016			

Tab.4: Analýza variance alelických frekvencí populací rozdělených do skupin zahrnující populace poddruhu *scirpaceus* nebo *fuscus* . Procento vysvětlené variability odráží míru vysvětlené odlišnosti mezi skupinami, populacemi a v rámci populací mezi jedinci.

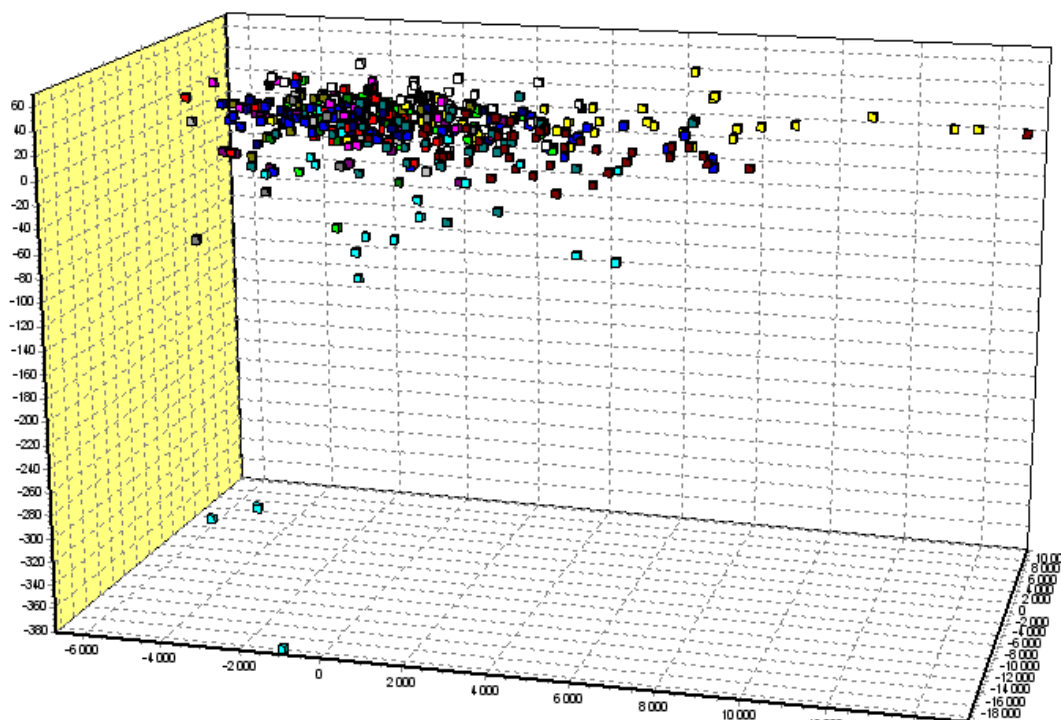
Faktoriální korespondenční analýza

Na základě faktoriální korespondenční analýzy (FCA) je na Obr. 3. znázorněna poloha jedinců v trojrozměrném prostoru, kde jednotlivé body představují genotypovou identitu jedinců. Poloha jedinců, kteří patří do různých populací, se v grafu prolíná. Je zde zřejmé, že populace vzdálené, ležící na okrajích areálu i populace nacházející se blízko sebe tvoří těsný shluk jedinců. Ačkoliv jedinci z populací Španělska, Portugalska, Turecka, částečně i někteří jedinci z Jordánska a Turecka zaujímají v grafu jinou polohu, čímž vykazují genetickou odlišnost, lze konstatovat, že rozložení jedinců různých populací v grafu neodpovídá jejich geografickému původu a vzdálenosti.

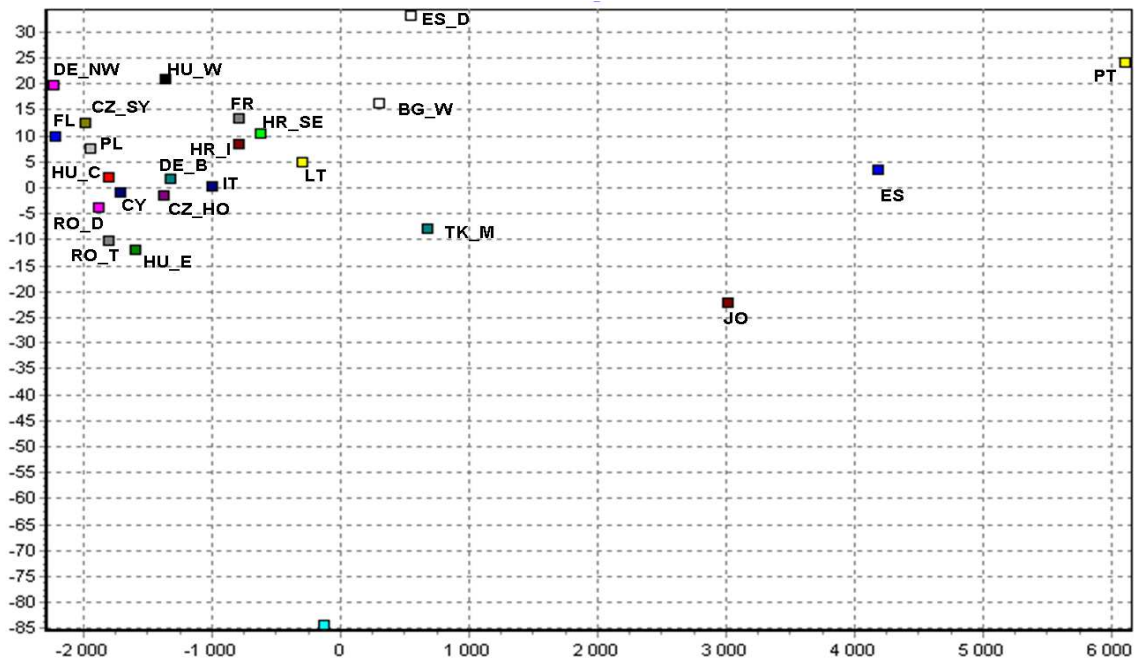
FCA pro průměrné hodnoty genotypů populací znázorňuje, jak jsou si jednotlivé populace geneticky podobné. Výsledek je přehlednější než pro samotné jedince a značí jisté odlišení populací Pyrenejského poloostrova a populací z východní části areálu (Obr. 4). Je třeba ale podotknout, že procento vysvětlené variability jednotlivými faktory FCA je celkově velmi nízké (viz Obr. 3 a 4).

Izolace vzdáleností

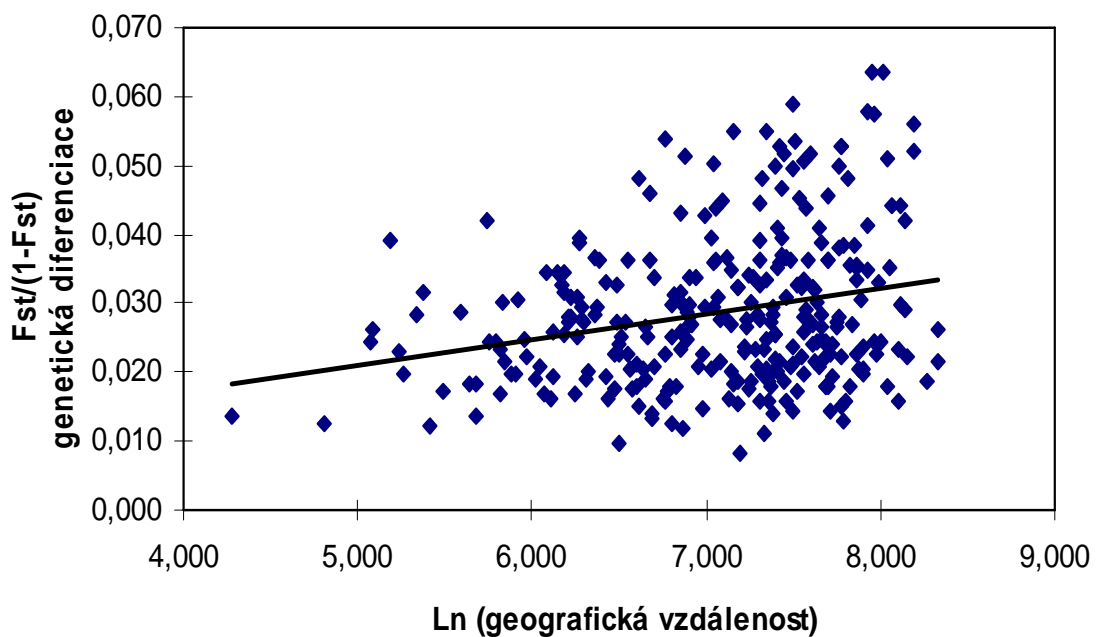
Výsledky Mantelova testu pro izolaci vzdáleností u populací napříč eurasijským hnízdním areálem rákosníka obecného jsou znázorněny na Obr. 6. Testem byla sice prokázána signifikantní závislost (koeficient determinace $R^2 = 0,06$, $Z = 64,6$, $p = 0,022$), velmi nízký koeficient determinace závislosti genetické a geografické vzdálenosti ale značí slabou korelaci a je tedy zřejmé, že vliv izolace vzdáleností je nepatrný.



Obr. 3: Faktoriální korespondenční analýza (FCA, 1. osa 8,74%, 2. osa 8,34%, 3. osa 7,73%) vypočítaná v programu Genetix 4.05.2 (Belkhir et al. 1996-2004) pro 495 jedinců jednotlivých populací. Každý bod v grafu představuje jednoho jedince, barevně jsou odlišeny jednotlivé populace.



Obr. 4: Faktoriální korespondenční analýza (FCA, 1. osa 8,77%, 2. osa 8,34%) pro jednotlivé populace. Graf je obdobný jako obr. 4, neznázorňuje jedince, ale jsou zobrazeny populace v dvojrozměrném prostoru.



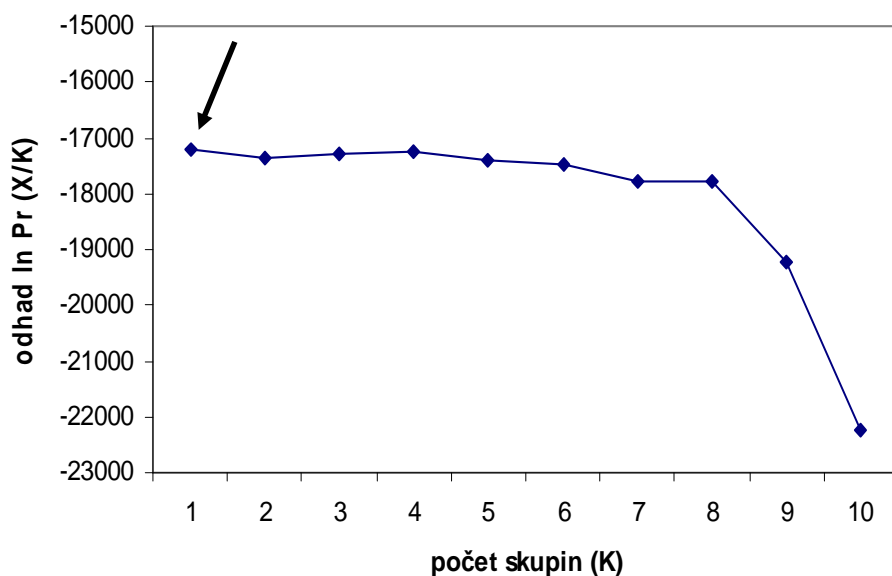
Obr. 5: Grafické znázornění testu „Isolation by distance“. Data pro 24 populací proložená lineární regresí: $F_{ST}/(1-F_{ST}) = \ln(\text{geografická vzdálenost})$.

Bayesovská shlukovací analýza

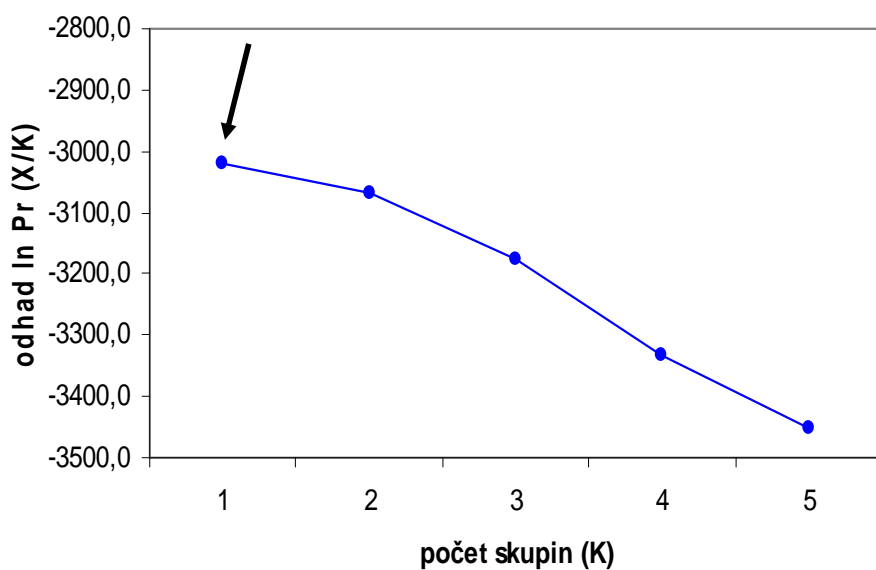
Výstupem bayesovské analýzy v programu Structure 2.1 jsou hodnoty věrohodnosti modelu pro jednotlivá K . Nejvhodnější model pro stanovení počtu populací je určen na základě maximální hodnoty odhadu věrohodnosti modelu $\ln Pr(X/K)$. Provedla jsem celkem dvě analýzy pro odhalení (1) struktury v rámci všech populací - test diferenciace z hlediska existence dvou uznávaných poddruhů a (2) struktury mezi středoevropskými populacemi napříč tahovým rozhraním.

(1) Výsledky první analýzy ukazují (Obr. 6), že prvních pět výsledných odhadů věrohodnosti modelu má velmi podobnou hodnotu. Přesto z výsledných hodnot lze vyvodit, že nejparsimoniálnějším modelem je zahrnutí všech jedinců do jedné populace [$\ln Pr(X/K) = -17216,1$]. Odvození jedné skupiny odpovídá výsledkům FCA ukazující velmi nízkou diferenciaci mezi místopisně definovanými poddruhy. Zajímavé také je, že se nevytvořila žádná čitelná genetická struktura, všechny populace zůstávají spolu v jedné klasifikované populaci, což se může jevit jako překvapivé vzhledem k jejich geografickým vzdálenostem a k existenci dvou poddruhů.

(2) Vzhledem k možnému silnému efektu velkého počtu geograficky velmi vzdálených populací s velkou vnitropopulační variabilitou byla testována detekce populační struktury u vybraných populací ležících blízko tahovému rozhraní. Nejvěrohodnějším modelem se ukázalo být přiřazení populací do jedné skupiny $K = 1$. (Obr. 7). Výsledek značí, že jako v předchozí analýze nebyla detekována žádná populačně-genetická struktura.



Obr. 6: Bayesovská shlukovací analýza všech populací – odhad maximálního počtu skupin K (rozřazení individuí do „reálných populací“). Graf znázorňuje hodnoty věrohodnosti modelu pro jednotlivá K. Věrohodnost modelu je vyjádřena přirozeným logaritmem $\ln Pr (X/K)$ (Pritchard 2000).



Obr. 7: Bayesovská shlukovací analýza populací napříč tahovým rozhraním – odhad maximálního optimálního počtu skupin K (rozřazení individuí do „reálných populací“). Graf znázorňuje hodnoty věrohodnosti modelu pro jednotlivá K. Věrohodnost modelu je vyjádřena přirozeným logaritmem $\ln Pr (X/K)$ (Pritchard 2000).

6 Diskuze

V předložené práci, která je zaměřena na studium populačně-genetické struktury, jsem se zabývala genetickou variabilitou a diferenciací eurasijských populací rákosníka obecného. Mé výsledky naznačují celkově velmi slabou diferenciaci populací. Obdobně nebyla zjištěna genetická struktura populací, která by odrážela odlišné migrační směry nebo existenci dvou poddruhů. Tyto dva výsledky jsou dále podrobně diskutovány. Relativně nízké genetické rozrůznění studovaných populací indikuje velký disperzní potenciál rákosníka obecného, kdy genový tok účinně zabraňuje diferenciaci populací bez ohledu na rozsáhlý hnízdní areál a vysokou tahovou konektivitu mezi hnízdišti a zimovišti. V opačném případě, pokud je genový tok slabý, lze uvažovat o morfologickém rozrůznění poddruhů a migračního chování jako o recentní události.

Genetická variabilita populací

Osm z 24 hodnocených populací se odchylovalo od Hardyho-Weinbergovy rovnováhy (HWE) a signifikantní koeficienty inbreedingu (F_{IS}) byly zaznamenány u 3 populací. Tyto výsledky teoreticky naznačují možnost, že párování v rámci těchto populací je nenáhodné a může docházet k inbreedingu, např. vlivem výrazného snížení efektivní velikosti populací. Nenáhodné párování je doloženo u populací, jež prodělaly „bottleneck“ (Boessenkool et al. 2007, Lambert et al. 2005). U studovaného druhu nebyla zaznamenána odchylka od celkové HWE a u zmiňovaných 8 populací byla odchylka buď mírná nebo se vyskytla u populací, kde vlivem malého počtu vzorků a jejich náhodné kombinaci určitých genotypů lze pravděpodobně zjistit „falešnou“ odchylku od HWE. Avšak kromě jordánské populace se jedná o jinak početné populace, které nejsou vystaveny negativním vlivům prostředí ani jimi ohroženy.

Odhad nulových alel se používá ve studiích zaměřených na populačně-genetické otázky testující HWE a v případech, kdy se usuzuje na ztrátu heterozygotnosti (např. Wahlundův efekt) (Chapuis & Estoup 2007). Proto díky testu odhadu nulových alel provedeného na všech lokusech a populacích studovaného druhu se lze vyvarovat tomu, že by přítomnost nulových alel ovlivnila hodnocení diferenciace populací např. vlivem zmenšení genetické diverzity v rámci populací, jež by neodpovídalo skutečnosti (Paetkau & Strobeck 1994). Přítomnost nulových alel u studovaného druhu byla zaznamenána především u lokusu Ppi2, ale vzhledem k velikosti hodnoceného vzorku dat napříč celým areálem a oproti tomuto zanedbatelnému počtu populací, kde byly nulové alely

detekovány, jsem tento lokus nevyločila z následných analýz. Nulové alely působí problémy při hodnocení populací s velkou efektivní velikostí, kdy je pro „flanking regions“ typická vysoká mutační rychlost“, a proto se liší populace od populace, pro které byl primer původně navržen. I přes zahrnutí lokusu Ppi2 a populací, kde byly nulové alely přítomny, byly porovnávány F_{ST} před i po korekci ENA srovnatelné, a proto další analýzy nebyly ovlivněny zkreslením výsledků, kdy při výrazném snížení vnitropopulační genetické diverzity úměrně roste míra genetické diferenciace (fixační index F_{ST}) a genetické vzdálenosti mezi populacemi (Paetkau et al. 1997, Slatkin 1985). Domnívám se tedy, že odchylky od HWE a signifikantní F_{IS} jsou buď artefaktem při sběru materiálu (nenáhodné vzorkování – odchyt příbuzných jedinců u malých velikostí vzorků $n = 10$ u některých lokalit) nebo mohly být částečně u některých populac způsobeny přítomností nulových alel.

Mezi zkoumanými lokusy se hodnoty AR („allelic richness“) značně lišily, poněvadž každý z lokusů vykazoval různý stupeň polymorfismu. Hodnoty AR byly u všech zkoumaných populací podobné a v rámci populací poměrně vysoké. Tento jev lze celkem snadno vysvětlit tím, že vnitropopulační variabilita v rámci sledovaných populací je srovnatelná a toto zjištění potvrzují i výsledky faktoriální korespondenční analýzy (FCA). O značné genetické variabilitě je uvažováno jako o nezbytné podmínce, která zajišťuje dlouhodobé přežívání (Hansson et al. 2005) a adaptivní potenciál druhu (Hess & Edwards 2002, Reed & Frankham 2003). Míra genetické variability je ovlivněna různými silami, např. velmi významnou je působení selekce. Vliv selekce se projevuje při expresi genů a může působit proti genetickému driftu způsobujícímu ztrátu genetické variability, zatímco výrazný vliv selekce zvětšuje rozmanitost, jejímž zdrojem je prosazení výhodných variant genů spojením s jejich následnou fixací (Hughes & Yeager 1998, Lynch & Walsh 1998).

Genetická diferenciace

V hypotéze vysvětlující variabilitu v různých znacích v závislosti na geografickém rozšíření (Nicholls et al. 2006- vokalizace, Bensch et al. 1999 - migrace) je kladen důraz na geografickou izolaci mezi populacemi jako na zásadní sílu, která podmiňuje variabilitu sledovaných znaků chování nebo fenotypového projevu (Nicholls et al. 2006). Předpokládala jsem, že na úrovni neutrálních genetických markerů naleznou variabilitu odpovídající rozdílnostem v rámci studovaného druhu, jehož populace se liší odlišnými

směry tahu a dvěma uznávanými poddruhy s odlišnostmi v areálu rozšíření a ve zbarvení, a to i přesto, že diferenciace mezi populacemi by měla být omezená účinky genového toku, který eliminuje rozdíly.

Párová porovnání frekvence alel, genotypů i párových F_{ST} ukázala, že populace z Blízkého východu, Finska a Pyrenejského poloostrova se signifikantně liší od ostatních. Jak párové hodnoty fixačních indexů, tak celková F_{ST} jsou ale velmi nízké, značí jen slabou genetickou diferencí. Párové porovnání F_{ST} mezi populacemi bylo vyhodnoceno nejen pro všechny populace, ale také s důrazem na populace lišící se příslušností k poddruhů a podle odlišného směru migrace. Nízké hodnoty F_{ST} byly získány pro srovnání poddruhů *fuscus* a *scirpaceus* i mezi populacemi táhnoucími na zimoviště JZ nebo JV směrem. Jinými slovy tyto populace se geneticky příliš nelišily. K shodnému zjištění došli autoři práce zabývající se morfologickou divergencí poddruhů a genetickou diferenciací populací na tahovém rozhraní u slavíka modráčka *Luscinia svecica* (Hellgren et al. 2008, Johnsen et al. 2006). Domnívám se, že to, že se tyto skupiny populací studovaného druhu geneticky neliší, je pravděpodobně způsobeno tím, že mezi nimi dochází k toku genů prostřednictvím disperze mladých ptáků a meziroční přesídlování dospělců, jejichž význam pro snížení genetických rozdílů mezi populacemi lze považovat za podstatný. Tyto pohyby mají pochopitelně velký význam nejen z hlediska populačně-genetického (např. zamezení inbreedingu), ale i ekologického (např. výběr vhodného kvalitního biotopu, schopnost disperze po disturbanci na původním hnízdišti apod.). Hodnoty F_{ST} mezi populacemi u různých druhů ptáků se pohybují v rozmezí od 0,014 do 0,075 (Burg et al. 2005, Gibbs et al. 2000, Ruegg et al. 2006). V rámci našeho studovaného druhu se F_{ST} blíží těmto popsaným hodnotám, respektive odpovídají spodní hranici výše uvedeného intervalu.

Vysvětlená genetická variabilita uvnitř populací postihuje 98% celkových rozdílů mezi hodnocenými populacemi. Lze tak usuzovat, že ani jedna ze sledovaných charakteristik (tahové rozhraní, dva poddruhy) není u studovaného druhu dostatečnou příčinou zvýšení genetické variability vedoucí k diferenciaci. Tento výsledek mikrosatelitových analýz a analýzy variance alelických frekvencí (AMOVA) se shoduje s výsledky získanými z analýz sekvencí mtDNA, kde nukleotidová divergence obou poddruhů činila pouhých 1,63-2,55 % (Helbig & Seibold 1998). Pravděpodobně má tok genů (stejně jako u F_{ST}) zásadní význam a s ohledem na disperzní schopnosti druhu je zdrojem genetické variability a zabraňuje diferenciaci, proto je u studovaného druhu

podstatná interpretace o potenciální disperzní schopnosti druhu v souvislosti s posouzením genového toku a jeho příspěvku k divergenci populací. Disperzní schopnosti u většiny druhů ptáků (včetně zde studovaného) vykazují intraspecifické rozdíly, kdy se liší míra filopatrie v závislosti na pohlaví nebo věku jedinců. V rámci těchto studií lze vysledovat obecnou zákonitost vzdáleností a schopnosti disperse: frekvence distribuce disperzních vzdáleností klesá s rostoucími vzdálenostmi a disperzní vzdálenosti mladých ptáků (usídlení) jsou větší než hnízdní disperse dospělců (přesídlení) (Ferrer 1993, Matthysen et al. 1995, Paradis et al. 1998). Ze 220 dospělých (+1 K) rákosníků obecných okroužkovaných v hnízdním období na území ČR a SR a zastižených po více letech opět v hnízdním období, bylo 199 (90,9 %) věrných svému hnízdišti, 21 přesídlilo na vzdálenost 1-322 km (průměr 59,5 km). Z 15 ptáků okroužkovaných jako nevzletná mláďata na hnízdě a nahlášených v některých z následujících hnízdních období hnízdilo 11 (73 %) na téměř místě a 4 se usídlila ve vzdálenosti 3-70 km od svých rodišť. Omezená je tato interpretace kroužkovacích dat tím, že data pocházejí pouze z jedné lokality a proto může docházet dochází k zanedbání a zkreslení počtu ptáků rozptýlených a nenavraccjících se na tu samou lokalitu. Z odhadu disperzních vzdáleností v studii Paradise et al. (1998), kdy autoři srovnávali vzdálenosti přesídlení a usídlení na základě britských zpětných hlášení, pro rákosníka obecného uvádějí významný rozptyl (3 jedinci měli rozptyl nad 100 až 300 km od místa kroužkování). Z toho lze usuzovat na velký disperzní potenciál, který, vzhledem k nespornému podhodnocení nálezů mimo tradiční místa kroužkování (tj. na lokalitách vzdálených od místa odchytyových akcí), může být významnou silou zabraňující diferenciaci populací tohoto druhu.

Předpokládala jsem přítomnost geografické diferenciaci eurasijských populací, přičemž jsem predikovala, že jsou pravděpodobné dvě možnosti, kdy (1) buď budou převládat velké genetické rozdíly u populací západní a východní části areálu a populací napříč tahovým rozhraním v souvislosti s možnou historickou izolovaností a s ohledem na vliv selekce proti hybridům u tahového rozhraní anebo (2) nízké genetické vzdálenosti budou odrážet velmi recentní oddělení populací táhnoucích odlišnými směry. Podle bayesovské detekce populačně-genetické struktury v programu Structure se jako nejvěrohodnější model ukázalo zahrnutí všech zkoumaných jedinců do jedné skupiny. Tento výsledek znamená, že studované populace rákosníka obecného představují z genetického hlediska jednu víceméně panmiktickou populaci. Pokud bereme v úvahu, že sice hodnota celkového F_{ST} a některá párová porovnání F_{ST} vyšly signifikantní, ale

byly velmi nízké, a tudíž značí slabou diferenciaci, pak i tento výsledek je v souladu s ostatními. Předpoklad, že strukturovanost je dána poddruhy nebo odlišnými migračními směry, tak nebyl potvrzen. Podobný výsledky uvádí studie morfologické a molekulární variability napříč tahovým rozhraním budníčka většího (*Phylloscopus trochilus*) (Bensch et al. 1999). Výsledky analýz sekvencí mtDNA a mikrosatelitů neukázaly téměř žádné genetické rozdíly mezi oběma poddruhy *trochilus* i *acredula*

Mnoho studií neprokázalo genetickou diferenciaci populací (ať už na úrovni mtDNA nebo neutrálních genetických markerech), přestože se tyto populace fenotypově i svým chováním výrazně lišily (review Zink 1997). Naproti tomu bylo zjištěno např. že mezi populacemi migrujícího druhu lesňáčka pokřovního (*Dendroica discolor*) probíhá jen slabý genový tok, přičemž u tohoto druhu byla dokázána významná genetická rozdílnost na základě odlišných morfologických znaků a charakteru migrace (Berthold 1993). I když se genetická izolace může zdát být u dálkových migrantů překvapivá, jak ilustruje příklad lesňáčka, může být genový tok mezi populacemi stabilně nízký, v souladu s oddělenými hnízdními habitaty v případě zmiňovaného druhu i s existencí dvou definovaných poddruhů (Buerkle 1999).

Podobně navzdory probíhajícímu toku genů mohou být populace geneticky odlišné např. v ptačím zpěvu. Geografická rozmanitost v ptačím zpěvu jako adaptivní schopnost založená na rozdílné kvalitě přenosu zvuku v různých prostředích (Slabbekoorn & Smith 2002) se může vyvíjet a trvale zachovat především vlivem silného selekčního tlaku přirozených podmínek prostředí. Z obecného pohledu toto zjištění odpovídá obecnému ekologickému modelu vnitrodruhové fenotypické divergence (Endler 1977, Ogden & Thorpe 2002). Paralelně některé studie ukazují, jak selekční tlak může mít tak silný vliv, který i u populací geneticky diferenciovaných způsobí, že pod vlivem stejného selekčního tlaku prostředí mají tyto populace stejný zpěv (Nagel & Schluter 1998).

Pro studium genetické diferenciace populací se jeví zásadní spojení znalostí geografické distribuce a komplexních informací o morfologii, habitatech a chování druhů. Pro rákosníka obecného je charakteristické, že obývá v celém hnízdním areálu stejný typ biotopu (rákosiny), morfologicky je poměrně uniformní (liší se jen délkou křídla v souvislosti se vzdáleností hnízdiště od zimoviště) a zpěv nevykazuje žádné rozdíly (Pearson et al. 2002). Mozaikovitě roztroušené hnízdní populace napříč rozsáhlým geografickým areálem vykazují metapopulační strukturu (Foppen et al. 2000)

a mohou tak teoreticky poskytovat příhodné podmínky pro lokální adaptace v některých izolovaných populacích (Hanski & Gilpin 1997). V části střední Evropy populace rákosníka obecného táhnou dvěma odlišnými směry a lze určit tahové rozhraní (Schlenker 1988, Zink 1973).

Genetická diferenciace na úrovni tahového rozhraní a poddruhů

Migrační rozhraní ve střední Evropě (oddělený jihozápadní a jihovýchodní směr tahu, Zink 1973) v souvislosti s relativně vysokou tahovou konektivitou mezi hnízdním a nehnízdícím areálem (Procházka et al. 2008) může podmiňovat genetickou diferenciaci mezi populacemi. Předpokládala jsem, že populace studovaného druhu se budou geneticky lišit. Tato predikce se nepotvrdila, i když migrační chování je geneticky podmíněno. Je třeba si uvědomit, že migrace je flexibilní znak (Berthold & Helbig 1992) a jeho změna, jejíž výsledky pozorujeme a odvozujeme v současnosti, může být velmi nedávnou událostí, jež zatím nevedla k divergenci (Berthold et al. 2001). V populacích změna tahového chování a s ním spjaté tahového rozhraní perzistuje i když populace nejsou zcela reprodukčně izolovány. Následně se tato variabilita i přesto může v migračním chování zachovat, aniž by se shodně tzn. detekovanou variabilitou projevila na diferenciaci neutrálních markerů. Domnívám se, že změna tahového chování u studovaného druhu může být relativně rychlá a nemusí se projevit na genetické úrovni.

Migrace je přirozeně plastický znak a vymezit populačně specifické tahové cesty bývá problematické (Webster et al. 2002) a proto je velmi obtížné studovat mechanismy způsobující změny tahového chování a následné důsledky. Ovšem ve studii změny migračního chování pěníce černohlavé (Bearhop et al. 2005) se podařilo dokázat, že vývoj alopatrické zimující populace, je podmíněn asortativním párováním na sympatrickém hnízdišti. Časně přilétnuvší samice vybírají časně přilétnuvší samce z téhož zimoviště. Za posledních 50 let pěníce černohlavé hnízdící v části střední Evropy změnila směr tahu a část populací již netáhne na zimoviště na Pyrenejském poloostrově, ale začaly zimovat na Britských ostrovech. Jejich počet za posledních 10 let se zvyšuje. Navzdory tomu, že studie není podpořena genetickými analýzami, výsledky této práce přinášejí zásadními poznatky, měnící pohled na rychlost změny směru tahu a to, jak částečná časová segregace v hnízdním období a změna migračního chování může vést k vytvoření subpopulační struktury v rámci druhu a vytvářet tak potenciál pro sympatrickou speciaci. Tato variabilita a pozměněné chování se nemusí geneticky

prokázat, jelikož k jejich vzniku mohlo dojít v nedávné době (Berthold et al. 2001), podobně jako u pěnice černohlavé. Zůstává tedy spekulací, jestli existence odlišného směru migrace u rákosníka obecného lze považovat za recentní událost, kdy nově vzniklé alely neměly dostatek času, aby se zafixovaly (Takahata 1983).

Z jiného pohledu mnoho migrujících ptáků zdolává velmi velké vzdálenosti mezi svými hnízdišti a zimovišti, přičemž i přes velmi dobré disperzní schopnosti a obsazování příhodných biotopů u většiny ptáků lze nalézt relativně vysokou hnízdní filopatii a fidelitu (Greenwood & Harvey 1982). U rákosníka obecného byla zjištěna vysoká tahová konektivita mezi hnízdišti a zimovišti. Vysoká migrační konektivita může vytvářet potenciál pro potenciální specifické adaptace a odpovědi na změny prostředí vedoucí k divergenci populací. Pokud existují silné selekční tlaky na divergenci jednotlivých populací, může dojít až k speciaci (Webster & Marra 2005). Vlivem historických událostí např. zalednění, pod různými selekčními tlaky prostředí a selekcí proti hybridům se u studovaného druhu mohlo vyvinout tahové rozhraní (Bensch et al. 1999). Přesto výsledky této práce vzhledem na rozsáhlý hnízdní areál a vysokou tahovou konektivitu mezi hnízdišti a zimovišti nepotvrdily diferenciaci populací.

Intraspecifická variabilita u živočichů často vedla taxonomy k popisu odlišných subspecií. Výklad a způsob, jak chápat tuto taxonomickou jednotku není ucelený, její klasifikace je většinou založena na geografické izolaci rozdílných morfotypů (Zink 2003). U ptáků je mnoho poddruhů popsáno podle jejich morfologie a podle vzhledu např. zbarvení (Vaurie 1959), případně na základě regionálních odchylek zpěvu (Groth 1993, Loughheed & Handford 1992). Přestože bylo rozlišování poddruhů mnohokrát kritizováno (Zink 2004), dodnes je mnozí systematikové užívají. Navíc se ukazuje se, že jejich odlišování může být užitečné, protože existence poddruhů je jedním z ukazatelů biodiverzity, které máme k dispozici a může nám tak mnohé napovědět o diferenciaci druhů a vnitrodruhové variabilitě (Price 2008).

Příkladem pěkné shody v morfologické a genetické diferenciaci je např. strnavec zpěvný (*Melospiza melodia*) na severozápadě Severní Ameriky (Pruett & Winker 2005). Protože popisy subspecií vycházejí často z geografické distribuce a malých odlišností ve zbarvení, a navíc jsou často založeny na malé sérii jedinců, ne vždy odpovídají popsané poddruhy geneticky homogenním jednotkám. Tak například u střízlíka kaktusového (*Campylorhynchus brunneicapillus*) v Americe běžně rozšířeného druhu, u něhož byly popsány geograficky oddělené poddruhy, existují podle mtDNA dva geneticky oddělené

taxonomické celky, ačkoliv se uznává celkem 6 poddruhů (Zink et al. 2001). Srovnávací studie subspecifické variability 41 druhů ptáků zjistila, že pouze 3 % zkoumaných poddruhů vytváří evolučně a geneticky oddělené taxonomické jednotky (Zink 2004). Phillimore & Owens (2006) u většího vzorku druhů ale zjistili, že 36 % poddruhů reprezentovalo distinktní fylogenetické linie. Přestože subspecifické členění nekoresponduje s reálnými genetickými jednotkami v rámci jednotlivých druhů, existence poddruhů nám může nezřídka mnohé napovědět o evoluční historii druhu, probíhající alopatrické speciaci a v případech, kdy se jedná o velmi dobře diferencované poddruhy jak morfologicky, behaviorálně i geneticky, je pak na místě je taxonomicky považovat za „dobré“ druhy (Johnson 1982).

V tomto případě jsou oba poddruhy rákosníka obecného velmi podobné, liší se jen drobnými znaky ve zbarvení opeření (šedší zátylek a bílé okraje rýdovacích per u ssp. *fuscus*) a rozšířením; výběr prostředí i zpěv jsou u obou forem shodné (Pearson et al. 2002). Otázkou zůstává, nakolik je přechod mezi oběma poddruhy strmý. Podle dostupných zdrojů se oba poddruhy stýkají v Turecku (Roselaar 1995), zdá se však, že přechod mezi nimi je spíše pozvolný a je dost dobře možné, že se jedná o klasickou klinální variabilitu ve zbarvení, kdy v aridních oblastech mají ptáci šedší zbarvení. Pokud by se potvrdily výsledky z analýz mikrosatelitů i na jiném selekčně neutrálním markeru (např. mtDNA), pak by odlišení těchto poddruhů bylo svým způsobem zbytečné.

Shrnutí a vyhlídky dalšího studia

Výsledky analýzy mikrosatelitů nepotvrdily genetickou divergenci na vnitrodruhové úrovni, přestože ji bylo možné očekávat v souvislosti s existencí dvou uznávaných poddruhů a tahového rozhraní. Všechny mé výsledky zřetelně ukazují na homogenní genetickou strukturu populací, ovšem současně nemůžeme rozeznat mezi relativní významností vlivu historických událostí a současným tokem genů (Templeton et al. 1995).

Alternativně lze vysvětlit, proč neutrální genetické markery nezachytily genetickou diferenciaci, je jejich nevhodně zvoleným výběrem. U neutrálních genetických markerů, pomocí nichž lze popsat genetickou variabilitu na úrovni populační struktury, se předpokládá, že tyto lokusy odrážejí adaptivní variabilitu v populacích (King & Burke 1999), ale lokální selekční tlaky na adaptačně významných lokusech nemusí být snadno detekovány (Hedrick 1994) a funkční lokusy nemusejí správně odrážet tok genů mezi různými geografickými oblastmi s různým selekčním tlakem.

Otázkou zůstává, zda by použití více lokusů, které by vykazovaly genetickou asociaci s funkčními geny zodpovědnými za expresi vrozeného populačně-specifického směru tahu, neukázaly signifikantní rozdíly napříč tahovým rozhraním. Rovněž použití nezávislých genetických markerů by jistě pomohlo lépe rozhodnout, zda se studované populace opravdu geneticky neliší. Pilotní analýzy sekvencí mtDNA (cytochrom b, kontrolní oblast – E. Bellivia, H. Winkler in litt.) naznačují, že pyrenejské populace se zdají být odlišné od zbytku evropských populací. To, zda tomu doopravdy tak je, ukáže ale až další studium v budoucnu.

7 Literatura

- Amos W. & Harwood J. (1998):** Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 353: 177-186.
- Bairlein F. (1985):** Efficiency of food utilization during fat deposition in the long-distance migratory garden warbler, *Sylvia borin*. *Oecologia* 68: 118–125.
- Bearhop S., Fiedler W., Furness R.W., Votier S.C. , Waldron S., Newton J., Bowen G.J., Berthold P. & Farnsworth K. (2005):** Assortative mating as a mechanism for rapid evolution of a migratory divide. *Science* 310: 502–504.
- Belkhir K., Borsa P., Chikhi L., Raufaste N. & Bonhomme F. (1996-2004):** GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Berthold P. & Helbig A.J. (1992):** The genetics of bird migration: Stimulus, timing, and direction. *Ibis* 134 (Suppl. 1): 3540.
- Berthold P. (1993):** Bird migration: a general survey. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-253
- Bensch S., Price T. & Kohn J. (1997):** Isolation and characterization of microsatellite loci in a *Phylloscopus* warbler. *Mol. Ecol.* 6: 91-92.
- Bensch S. & Hasselquist D. (1999):** Phylogeographic population structure of great reed warblers: an analysis of mtDNA control region sequences. *Biological Journal of the Linnean Society* 66: 171-185.
- Bensch S., Andersson T. & Akesson S. (1999):** Morphological and molecular variation across a migratory divide in willow warblers, *Phylloscopus trochilus*. *Evolution* 53: 1925-1935.
- Berthold P., Van Den Bossche W., Fiedler W., Kaatz C., Kaatz M., Leshem Y., Nowak E. & Querner U. (2001):** Detection of a new important staging and wintering area of the White Stork *Ciconia ciconia* by satellite tracking. *Ibis* 143 : 450–455.
- Bijlsma R., Bundgaard J. & Boerema A.C. (2000):** Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. *J. Evol. Biol.* 13: 502-514.

- Bijlsma R., Bundgaard J. & Van Putten W.F. (1999):** Environmental dependence of inbreeding depression and purging in *Drosophila melanogaster*. *J. Evol. Biol.* 12: 1125–1137.
- Boake C.R.B. (1994):** Evaluation of applications of the theory and methods of quantitative genetics to behavioral evolution. In *Quantitative genetic studies of behavioral evolution* (ed. C. R. B. Boake), Chicago University Press, pp. 305±325.
- Boessenkool S., Taylor S.S., Tepolt C.K., Komdeur J. & Jamieson I.G. (2007):** Large mainland populations of South Island robins retain greater genetic diversity than offshore island refuges. *Conservation Genetics* 8: 705-714.
- Buerkle C.A. (1999):** The historical pattern of gene flow among migratory and nonmigratory populations of prairie warblers (Aves:Parulinae). *Evolution* 53: 1915-1924.
- Burg T.M., Gaston A.J., Winker K. & Friesen V.L. (2006):** Effects of Pleistocene glaciers on population structure of North American chestnut-backed chickadees. *Molecular Ecology* 15: 2409-2419.
- Burland T.M., Barratt E.M. & Racey P.A. (1998):** Isolation and characterization of microsatellite loci in the brown long-eared bat, *Plecotus auritus*, and cross-species amplification within the family Vespertilionidae. *Molecular Ecology*: 136-138.
- Campbell K. A. (1993):** Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 8: 234-239.
- Caro T. M. & Laurenson M.K. (1994):** Ecological and genetic factors in conservation: a cautionary tale. *Science* 263: 485-486.
- Castric V., Bonney F. & Bernatchez L. (2001):** Landscape structure and hierarchical genetic diversity in the brook charr *Salvelinus fontinalis*. *Evolution* 55: 1016–1028.
- Clegg S.M., Dehnan S.M., Kikkawa J., Moritz C., Estoup A. & Owens I.P.F. (2002):** Genetic consequences of sequential founder events by an island-colonizing bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99: 8127-8132.
- Cramp S. (editor) (1992):** *The Birds of the Western Palearctic*, vol. 6. Warblers, Oxford University Press, Oxford, pp. 1-687.
- Croteau E.K., Loughheed S.C., Krannitz P.G., Mahony N.A., Walker B.L. & Boag P.T. (2007):** Genetic population structure of the sagebrush Brewer's sparrow, *Spizella breweri breweri*, in a fragmented landscape at the northern range periphery. *Conservation Genetics* 8: 1453-1463.

- Dawson D.A., Hanotte O., Greig C., Stewart I.R.K. & Burke T. (2000):** Polymorphic microsatellites in the blue tit *Parus caeruleus* and their cross-species utility in 20 songbird families. *Molecular Ecology* 9: 1941-1944.
- Dover G. A. (1982):** Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 299: 111-117.
- Dutech C., Joly H.I. & Jarne P. (2004):** Gene flow, historical population dynamics and genetic diversity within French Guiana populations of a rainforest tree species, *Vouacapoua americana*. *Heredity* 92: 69–77.
- Ellegren H. (1992):** Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites-a new approach to studies of genetic relationships in birds. *Auk* 109: 886-895.
- Endler J.A. (1977):** Geographic variation, speciation and clines. Princeton Univ. Press, Princeton, NJ, pp 1-256.
- Estoup A., Jarne P. & Cornuet, J.M. (2002):** Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology* 11: 1591-1604.
- Federov V., Goropashnaya A., Jarrell G. H. & Fredga K. (1999):** Phylogeographic structure and mitochondrial DNA variation in true lemmings (*Lemmus*) from the Eurasian arctic. *Biol. J. Linn. Soc.* 66: 357-371.
- Ferrer M. (1993):** Juvenile dispersal behaviour and natal philopatry of a long-lived raptor, the Spanish Imperial Eagle *Aquila adalbert*. *Ibis* 135: 132-138.
- Foppen R.P.B., Chardon J.P. & Liefveld W. (2000):** Understanding the role of sink patches in source-sink metapopulations: reed warbler in an agricultural landscape. *Conservation Biology* 14: 1881-1892.
- Frankham R. (1995):** Conservation genetics. *Annu. Rev. Genet.* 29: 305–327.
- Frankham R. (1996):** Relationship between genetic diversity and population size in wildlife. *Conserv. Biol.* 10: 1500–1508.
- Frankham R. (1997):** Do island populations have lower genetic variation than mainland populations? *Heredity* 78: 311 327 .
- Frankham R. (1998):** Inbreeding and extinction: Island populations. *Conserv. Biol.* 12: 665–675.
- Frankham R., Ballou J.D. & Briscoe D.A. (2002):** Introduction to conservation genetics. Cambridge university Press, pp. 1-304.

- Friar E.A., Ladoux T., Roalson E.H. & Robichaux R.A. (2000):** Microsatellite analysis of a population crash and bottleneck in a Mauna Kea silversword, *Argyroxiphium sandwicense* ssp. *sandwicense* (Asteraceae), and its implications for reintroduction. *Molecular Ecology* 9: 2027-2034.
- Galbusera P., Lens L., Waiyaki E., Schenck T. & Matthysen E. (2000):** Genetic variability and gene flow in the globally, critically endangered Taita thrush. *Conserv Genet* 1: 45-55
- Gerlach G. & Musolf K. (2000):** Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. *Konserv. Biol.* 4: 1066-1074.
- Gibbs H.L., Dawson R.J.G. & Hobson K.A. (2000):** Limited differentiation in microsatellite DNA variation among northern populations of the yellow warbler: evidence for male-biased gene flow. *Molecular Ecology* 9: 2137-2147.
- Goudet J. (2001):** FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Greenwood P. J. & Harvey P. (1982):** The natal and breeding dispersal of birds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13:1-21.
- Groth J.G. (1993):** Evolutionary differentiation in morphology, vocalizations, and allozymes among nomadic sibling species in the North American red crossbill (*Loxia curvirostra*) complex. *Univ. California Publication in Zoology*, no. 127. Berkeley, CA.
- Guo S.W. & Thompson E.A. (1992):** Performing exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361– 372.
- Hájková P., Pertoldi C., Zemanová B., Roche K., Hájek B., Bryja J. & Zima J. (2007):** Genetic structure and evidence for recent population decline in Eurasian otter populations in the Czech and Slovak Republics: implications for conservation. *J. Zool. (London)* 272: 1–9.
- Haldane J.B.S. (1954):** An exact test for randomness of mating. *Journal of Genetics* 52: 631-635.
- Hancock J. M., Shaw P.J., Bonneton P. & Dover G.A. (1999):** High sequence turnover in the regulatory regions of the developmental gene hunchback in insects. *Mol. Biol. Evol.* 16: 253-265.
- Hanski I. & Gilpin M.E. (1997):** Metapopulation biology — ecology, genetics and evolution. Academic Press, London in **Hanski I. (1999).**
- Hanski I. (1999):** Metapopulation ecology. Oxford University Press, Oxford, pp. 1-314.

- Hansson B., Bensch S., Hasselquist D., Lillandt B.-G., Wennerberg L. & von Schantz T. (2000):** Increase of genetic variation over time in a recently founded population of great reed warblers (*Acrocephalus arundinaceus*) revealed by microsatellites and DNA fingerprinting. *Molecular Ecology* 9: 1529-1538.
- Hansson M.C., Bensch S. & Brännström O. (2000):** Range expansion and the possibility of an emerging contact zone between two subspecies of chiffchaff *Phylloscopus collybita* ssp. *J. Avian Biol.* 31: 548-558.
- Hansson B., Åkesson M., Slate J. & Pemberton J. (2005):** Linkage mapping reveals sex-dimorphic map distances in a passerine bird. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* 272: 2289-2298.
- Hartl D.L. & Clark A.G. (1997):** Principles of population genetics. 3rd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- Hedrick P.W. (1994):** Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *Am. Nat.* 143: 945-964.
- Hedrick P.W., Lacy R.C., Allendorf F.W. & Soulé M.E. (1996):** Direction in conservation biology: comments on Caughley. *Conservation Biology* 10: 1312–1320.
- Helbig A.J. (1992):** Population differentiation of migratory directions of migratory directions in birds: comparison between ringing results and orientation behaviour of hand-raised migrants. *Oecologia* 90: 483-488.
- Helbig A.J. (1996):** Genetic basis, mode inheritance and evolutionary changes of migratory directions in Palearctic warblers (Aves:Sylviidae). *J.Exp.Biol.:* 199-49-55.
- Helbig A.J. & Seibold I. (1999):** Molecular phylogeny of Palearctic-African *Acrocephalus* and *Hippolais* warblers (Aves: Sylviidae). *Molecular Phylogeny and Evolution* 11: 246-260.
- Hellgren O., Bensch S., Hobson K.A. & Lindstrom A. (2008):** Population structure and migratory directions of Scandinavian bluethroats *Luscinia svecica* - a molecular, morphological and stable isotope analysis *Ecography* 31: 95-103
- Hess C.M. & Edwards S.V. (2002):** The evolution of the major histocompatibility complex in birds. *Bioscience* 52: 423-431.
- Hewitt G. (1999):** Postglacial recolonization of European Biota. *Biol. J. Linn. Soc.* 68: 87–112.
- Hewitt G.M. (2000):** The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hewitt G.M. (2002):** The genetic legacy of the quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.

- Hewitt G.M. (2004):** Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 359: 183-195.
- Hughes A.L. & Yeager M. (1998):** Natural selection at major histocompatibility complex loci of vertebrates. *Annual Review of Genetics* 32: 415-435.
- Chapuis M.P. & Estoup A. (2007): Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol. Biol. Evol.* 24 (3): 621-631.
- Charlesworth B. & Charlesworth D. (1999):** The genetic basis of inbreeding depression. *Genet Res* 74: 329-340
- Ingvarsson P.K. (2001):** Restoration of genetic variation lost-the genetic rescue hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 62-63.
- Irwin D. E. (2000):** Song variation in an avian ring species. *Evolution* 54: 998-1010.
- Irwin D.E. & Irwin J.H. (2004):** Siberian migratory divides: the role of seasonal migration in speciation. *Birds of two worlds: the ecology and evolution of migratory birds* (ed. by R. Greenberg and P.P. Marra), pp. 27-40. John Hopkins University Press, Baltimore.
- Jarne P. & Lagoda P. J. L. (1996):** Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution* 11(10): 424-429
- Jeffreys A. J., Tamaki K., MacLeod A., Monckton D. G., Neil D. L. & Armour J. A. L. (1994):** Complex gene conversion events in germline mutation at human minisatellites. *Nature Genet.* 6: 136-145.
- Jensen H., Bremset E.M., Ringsby T.H. & Saether B.E. (2007):** Multilocus heterozygosity and inbreeding depression in an insular house sparrow metapopulation. *Molecular Ecology* 16: 4066-4078.
- Johnsen A., Andersson S., Fernandez J.A., Kemenaers, B, Pavel V., Questiau S., Raess E.R., Rindal E. & Lifjeld J.T (2006):** Molecular and phenotypic divergence in the bluethroat (*Luscinia svecica*) subspecies complex. *Mol.Ecol.* 15: 4033-4047.
- Johnsen A., Andersson S., Örnberg J. & Lifjeld J. T. (1998):** Ultraviolet plumage ornamentation affects social mate choice and sperm competition in bluethroats (*Aves: Luscinia s. svecica*): a field experiment. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* 265: 1313-1318.
- Johnson N. K. (1982):** Retain subspecies - At least for the time being. *Auk* 99: 605-606
- Jurka J. & Pethiyagoda C. (1995):** Simple repetitive DNA sequences from primates: compilation and analysis. *J. Mol. Evol.* 40:120-126.

- 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.
- Keller L.F., Arcese P., Smith J.N.M., Hochachka W.M. & Stearns S.C. (1994):** Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature* 372: 356-357.
- Kimura M. & Crow J. F. (1964):** The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.
- Kimura M. & Ohta T. (1978):** Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 75: 2868-2872.
- King T.L. & Burke T. (1999):** Special issue on gene conservation: identification and management of genetic diversity. *Mol. Ecol.* 8: S1-S3.
- Kryukov A.P. & Suzuki H. (2000):** Phylogeography of carrion, hooded, and jungle crows (Aves, Corvidae) inferred from partial sequencing of the mitochondrial cytochrome b gene. *Russian Journal of Genetics* 36: 922-929.
- Lacy R.C. (1997):** Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. *J. Mammal* 78: 320-335.
- Lambert D.M., King T., Shepherd L.D., Livingston A., Anderson S. & Craig J.L. (2005):** Serial population bottlenecks and genetic variation: translocated populations of the New Zealand saddleback (*Philesturnus carunculatus rufusater*). *Conservation Genetics* 6: 1-14.
- Leberg P.L. (1992):** Effects of population bottlenecks on genetic diversity as measured by allozyme electrophoresis. *Evolution* 46: 477-494.
- Levinson G. & Gutman G. A. (1987):** Slippedstrand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular and Biology Evolution* 4: 203-221.
- Li Y. C., Korol A. B., Fahima T. & Nevo E. (2004):** Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol. Biol. Evol.* 21: 991-1007.
- Lougheed C. & Handford (1992):** Vocal dialects and the structure of geographic variation in morphological and allozymic characters in the rufous-collared sparrow, *Zonotrichia capensis*. *Evolution* 46: 1443-1456.
- Lynch M & Walsh B (1998):** *Genetics and Analysis of Quantitative Traits* . Sinauer Associates, Inc, Sunderland.

- Mantel N. (1967):** The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- Marshall T. C., Slate J., Kruuk L. E. B. & Pemberton J. M. (1998):** Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol Ecol.* 7:639-655. http://www.fieldgenetics.com/pages/aboutCervus_Overview.jsp.
- Martinez J.G., Soler J.J., Soler M., Møller A.P. & Burke T. (1999):** Comparative population structure and gene flow of a brood parasite, the great-spotted cuckoo (*Clamator glandarius*) and its primary host, the magpie (*Pica pica*). *Evolution* 53: 269–278.
- Matthys E., Adriaensen F. & Dhondt A.A. (1995):** Dispersal distances in great spotted woodpecker *Picoides major* near warsaw (Central Poland). *Acta Ornithol.* 37: 1-5.
- Merilä J., Björklund M. & Baker A.J. (1997):** Historical demography and present day population structure of the greenfinch *Carduelis chloris* - an analysis of mtDNA control-region sequences. *Evolution*: 51: 946-956.
- Metzgar D., Bytof J. & Wills C. (2000):** Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA. *Genome Res.* 10: 72-80.
- Moran C. (1993):** Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *J. Heredity* 84: 274-280.
- Nagel L. & Schluter D. (1998):** Body size, natural selection, and speciation in Sticklebacks. *Evolution* 52: 209-218.
- Nei M. (1978):** Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Neumann K. & Wetton J.H. (1996):** Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow *Passer domesticus*. *Molecular Ecology* 5: 307–309.
- Nicholls J.A., Austin J.J., Moritz C. & Goldizen A.W. (2006):** Genetic population structure and call variation in a passerine bird, the satin bowerbird, *Ptilonorhynchus violaceus*. *Evolution* 60: 1279–1290.
- Ogden R. & Thorpe R.S. (2002):** Molecular evidence for ecological speciation in tropical habitats. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 99: 13612-13615.
- Ortego J., Aparicio J.M., Calabuig G. & Cordero, P.J. (2007):** Increase of heterozygosity in a growing population of lesser kestrels. *Biology Letters* 3: 585-58.
- Paetkau D. & Strobeck C. (1994):** Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Mol. Ecol.* 3: 489-495.

- Paetkau D., Waits L.P. & Clarkson P.L. (1997):** An empirical evaluation of genetic distance statistics using microsatellite data from bear (*Ursidae*) populations. *Genetics* 147: 1943-1957.
- Paradis E., Baillie S.R., Sutherland W.J. & Gregory R.D. (1998):** Patterns of natal and breeding dispersal in birds. *Journal of Animal Ecology* 67: 518-536.
- Pearson R.G., Dawson T.P., Berry P.M. & Harrison P.A. (2002):** SPECIES: a spatial evaluation of climate impact on the envelope of species. *Ecological Modelling* 154: 289-300.
- Petit E., Excoffier L. & Mayer F. (1999):** No evidence of bottleneck in the postglacial recolonization of Europe by the noctule bat (*Nyctalus noctula*). *Evolution* 53: 1247-1258.
- Phillimore A.B. & Owens I.P.F. (2006):** Are subspecies useful in evolutionary and conservation biology? *Proceedings of the Royal Society of London B* 273:1049-1053.
- Price T. D. (2008):** Speciation in Birds. Roberts and Co., Boulder, CO, USA.
- Primmer C., Ellegren H., Saino N. & Möller A.P. (1996):** Directional evolution in germline microsatellite mutations. *Nature Genet.* 13: 391-393.
- Pritchard J.K., Stephens M. & Donnelly P. (2000):** Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959 (program structure, version 2.1 available from: http://pritch.bsd.uchicago.edu/software/structure2_1.html).
- Procházka P., Bellinvia E., Fainová D., Hájková P., Elhalah A. & Alomari K. (2008):** Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, *Journal of Arid Environments*, doi:10.1016/j.jaridenv.2008.02.005
- Pruett C.L. & Winker K. (2005):** Biological impacts of climatic change on a Beringian endemic: Cryptic refugia in the establishment and differentiation of the rock sandpiper (*Calidris ptilocnemis*). *Climatic Change* 68: 219-240.
- Raymond M. & Rousset F. (1995): GENETPOP (version 1.2): population genetics software for exact test and ecumenicism. *J. Hered.* 86: 248-249.
- Reed D.H., O'Grady J. J., Ballou J.D. & Frankham R. (2003):** The frequency and severity of catastrophic die-offs in vertebrates. *Anim. Conserv.* 6:109-114.
- Rhymer J.M. (1992):** An experimental study of geographic variation in avian growth and development. *J. Evol. Biol.* 5: 287–306.
- Richardson D.S., Jury F.L., Dawson D.A., Salgueiro P., Komdeur J. & Burke T. (2000):** Fifty Seychelles warbler (*Acrocephalus sechellensis*) microsatellite loci

polymorphic in Sylviidae species and their cross-species amplification in other passerine birds. *Molecular Ecology* 9: 2155-2234.

Roselaar C.S. (1995): Songbirds of Turkey: an atlas of biodiversity of Turkish passerine birds, Pica Press, UK.

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

Ruegg K.C., Hijmans R.J. & Moritz C. (2006): Climate change and the origin of migratory pathways in the Swainson's thrush, *Catharus ustulatus*. *Journal of Biogeography* 33: 1172-1182.

Saccheri I.J. & Brakefield P.M. (2002): Rapid spread of immigrant genomes into inbred populations. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269: 1073-1078.

Salomonsen F. (1955): The evolutionary significance of bird migration. *Dan. Biol. Medd.* 22, no. 6.

Scribner K.T. & Pearce J.M. (2000): Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. In: Baker A. (editor), *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science, Ltd., Oxford, U.K., p. 235-273.

Schlenker R. (1988): Zum Zug der Neusiedlersee (Österreich)-Population des Teichrohrsängers (*Acrocephalus scirpaceus*) nach Ringfunden. *Vogelwarte* 34: 337-343.

Schluter D. & Nagel L. M. (1995): Parallel speciation by natural selection. *Am. Nat.* 146, 292-301.

Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. (2000): ARLEQUIN, version 2.000: A Software for Population Genetics Data Analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland (program available from: <http://lgb.unige.ch/arlequin/>).

Schulze-Hagen K. (1997): *Acrocephalus scirpaceus* - Reed Warbler. In: Hagemeyer E. J. M., Blair M. J. (editors) *The EBCC Atlas of European Breeding Birds: Their Distribution and Abundance*. T & AD Poyser, London, pp. 572-573.

Schütz A. (1971): *Das Problem der Relevanz*. Frankfurt/Main: Suhrkamp.

Sia E. A., Butler C.A., Dominska M., Greenwell P., Fox T.D. & Petes T.D. (2000): Analysis of microsatellite mutations in the mitochondrial DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 250-255.

- Slabbekoorn H. & Smith T.B. (2002):** Birdsong, ecology, and speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B* 357: 493-503.
- Slatkin M. (1985):** Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16: 393-430.
- Slatkin M. (1989):** Detecting small amounts of gene flow from phylogenies of alleles. *121*: 609-612.
- Taberlet P., Fumagalli L. & Wust-Saucy A.G. (1998):** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Mol. Ecol.* 7: 453-464.
- Takahata M. (1983):** Gene identity and genetic differentiation of populations in the finite island model. *Genetics* 104: 497-512.
- Tallmon D.A., Luikart G. & Waples R.S. (2004):** The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology and Evolution* 9: 489-496.
- Tautz D. (1989):** Hypervariability of simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development* 4: 1193-9.
- Templeton A.R., Routman E. & Philips C.A. (1995):** Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics* 140: 767-782.
- Van Lith H.A. & Van Zutphen L.F. (1996):** Characterization of rabbit DNA microsatellites extracted from the EMBL nucleotide sequence database. *Anim. Genet.* 27: 387-395.
- Vaurie C. (1959):** The Birds of the Palearctic Fauna. Passeriformes. London: Witherby.
- Vila` C., Sundqvist A.K., Flagstad R., Seddon J., Björnerfeldt S., Kojola I., Casulli A., Sand H., Wabakken P. & Ellegren H. (2002):** Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270: 91-97.
- Webster M.S., Marra P.P., Haig S.M., Bensch S. & Holmes R.T. (2002):** Links between worlds: unraveling migratory connectivity. *Trends in Ecology & Evolution* 17: 76-83.
- Webster M.S. & Marra. P.P. (2005):** The importance of understanding migratory connectivity and seasonal interactions. *Birds of two worlds: the ecology and evolution of migration* (ed. by R. Greenberg and P.P. Marra), Johns Hopkins University, Baltimore, Maryland, pp. 199-209.

- Weir B.S. & Cockerham C.C. (1984):** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Westermeier R.L., Brawn J.D., Simpson S.A., Esker T.L., Jansen R.W., Walk J.W., Kershner E.L., Bouzat J.L. & Paige K.N. (1998):** Tracking the long-term decline and recovery of an isolated population. *Science* 282: 1695–1698.
- Wright S. (1978):** *Evolution and the genetics of populations IV.* University of Chicago Press, Chicago, Illinois in **Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. (2000).**
- Zenger K.R., Richardson B.J. & Vachot-Griffin A.M. (2003):** A rapid population expansion retains genetic diversity within European rabbits in Australia. *Molecular Ecology* 12: 789-794.
- Zima J., Macholán M., Munclinger P. & Piálek J. (2004):** Genetické metody v zoologii. Karolinum, Praha, pp. 1-239.
- Zink G. (1973, 1975, 1981):** *Der Zug europäischer Zugvögel.* Lief. 1-3. Möggingen.
- Zink R.M. & Dittmann D.L. (1993):** Gene flow, refugia, and evolution of geographic variation in the song sparrow (*Melospiza melodia*). *Evolution* 47: 717–729.
- Zink R.M. (1997):** Phylogeographic studies of North American birds. In: *Avian Molecular Evolution and Systematics* (ed. Mindell DP), San Diego: Academic Press, pp. 301-324.
- Zink R.M., Kessen A., Line T.V. & Blackwell-Rago R.C. (2001):** Comparative phylogeography of some aridland bird species. *Condor* 103: 1-10.
- Zink R.M., Drovetski S.V., Questiau, S., Fadeev I.V., Nesterov E.V., Westberg M.C. & Rohwer S. (2003):** Recent evolutionary history of the bluethroat (*Luscinia svecica*) across Eurasia. *Mol. Ecol.* 12: 3069-3075.
- Zink R.M. (2004):** The role of subspecies in obscuring avian biological diversity and misleading conservation policy. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B.* 271: 561-564.

Přílohy

Tab. 1: Souhrn odchyťových lokalit. Uvedené jsou informace o každé lokalitě zakreslené na mapě pod pořadovým číslem, přiřazené zkratce, jejich zeměpisné poloze a počtu jedinců. Tučně je vyznačeno 24 lokality s počtem jedinců nad 10 jedinců.

Čís.v Obr. 2.	Populace/Lokalita	N	Souřadnice
1	Portugalsko (PT), Estarreja	28	40°43'N 08°35'W
2	SZ Španělsko (ES), Barrañán	15	43°15'N 08°35'W
3	SV Španělsko (ES_D), delta Ebra	10	40°43'N 00°43'E
4	Francie (FR), Bretagne, Etang du Trunvel	10	48°00'N 04°30'W
5	Německo (DE_NW), Nordrhein-Westfalen, Diergarten	10	51°11'N 06°16'E
6	Německo (DE_B), Bavorsko, Poppenwind, Mohrhof	10	49°39'N 10°50'E
7	Polsko (PL), Milicz	10	51°31'N 17°15'E
8	Dánsko (DK), Arresø	5	55°58'N 12°05'E
9	Norsko (NW), Aurskog-Høland	5	59°43'N 11°27'E
10	Česká republika (CZ_SY), Svitavy	21	49°53'N 16°17'E
11	Z Maďarsko (HU_W), Fenékpuszta	10	46°43'N 17°15'E
12	Chorvatsko (HR_I), inland, Draganići ribnjaci	10	45°34'N 15°38'E
13	Italie (IT), Lagnone	10	41°09'N 14°18'E
14	Chorvatsko (HR_C), dalmatské pobřeží, Vransko jezero	6	43°53'N 15°33'E
15	JV Chorvatsko (HR_SE), delta Neretvy	31	42°57'N 17°34'E
16	JV Česká republika (CZ_HO), Hodonín	26	48°54'N 17°02'E
17	střední Maďarsko (HU_C), Kolon-tó, Izsák	29	46°47'N 19°21'E
18	Slovensko (SK), Trnavské rybníky	21	48°32'N 17°51'E
19	V Maďarsko (HU_E), Hortobágy	12	47°34'N 21°10'E
20	Rumunsko (RO_T), Transylvánie, Lake Sic	10	46°57'N 23°54'E
21	Rumunsko (RO_D), delta Dunaje	10	45°10'N 29°38'E
22	V Bulharsko (BGE), Durankulak	26	43°42'N 28°31'E
23	Z Bulharsko (BG_W), Dragoman	4	42°55'N 22°55'E
24	Litva (LT), Ventės Ragas	10	55°21'N 21°13'E
25	Finsko (FL), Turku, Rauvola	32	60°40'N 22°30'E
26	Rusko (RU), Petergoff, St. Peterburg	9	59°00'N 29°85'E
27	Turecko (TK_M) Mogan Gölü	32	39°46'N 32°48'E
28	Turecko (TK_S) Sultansazliđi	6	38°20'N 35°15'E
29	Turecko (TK_B) Balıkdami	4	39°12'N 31°39'E
30	Kypr (CY), Polis	12	35°02'N 32°25'E
31	Izrael (ILE), Eilat, Kenneret	12	29°33'N 34°56'E
32	Jordánsko (JO), Azraq	40	31°49'N 36°48'E
33	Ázerbajdžán (AZ)	3	39°21'N 49°11'E
34	Saudská Arábie (SA), Rijád	2	24°38'N 46°43'E
35	Kuvajt (KU)	1	29°22'N 47°41'E
36	Kazachstán (KZB, KZS, KZA) Balchaš + Sorbulak & Alaköl	4	45°12'N 73°59'E

Tab. 2: Sekvence primerů čerpané z originálních publikací.

Primer	Sekvence 5'-3'	Studie	Studovaný druh	Barevné značení
Aar4	GTT TGT GCA TCA ATT AGT CAT G GAT GAC TAA GGT GGC CTC TGG TGT G	Hansson et al. 2000a	<i>A. arundinaceus</i>	FAM
Aar5	GAC CTC TGT ATG TGC GTG TCT GAG TGG ACTCAG GAG T	Hansson et al. 2000a	<i>A. arundinaceus</i>	VIC
Aar8	TAG TGA TGC CCT GCT AGG TA AAG TGC TCC TTA ATA TTT GGC A	Hansson et al. 2000a	<i>A. arundinaceus</i>	NED
Ase34	GTT ATT TCT TTT GGC CCT CAG C GGA GAC ACC ACA CCA ATG C	Richardson et al. 2000	<i>A. sechellensis</i>	PET
Ase58	ATT CCA GGG ATT GGG CAG CTC AA GCG AAA TTG AGC AGT	Richardson et al. 2000	<i>A. sechellensis</i>	FAM
Fhu2	GTG TTC TTA AAA CAT GCC TGG AGG GCA CAG GTA AAT TGC TGG GCC	Primmer, et al. 1996	<i>Ficedula hypoleuca</i>	NED
Hru5	TCA ACA AGT GTC ATT AGG TTC AAC TTA GAT AAG GAA GGT ATA T	Hansson et al. 2000a	<i>A. arundinaceus</i>	FAM
Pca3	GCT GTT TGT GAG CCG GGG TGT TAC AAC CAA AGC GGT CAT TTG	Dawson et al. 2000	<i>Parus caeruleus</i>	VIC
Pdop1	TCT GG CTG TTG CTA TCA GAAGGA GCA CGG CTG TC TTT CAA CAA ACT	Neumann & Wetton 1996	<i>Passer domesticus</i>	NED
Pocc2	AAC CAC ACT GAG TAA GCT GCT G CAC AGA CCA TTC GAA	Bensch et al. 1997	<i>Phylloscopus occipitalis</i>	PET
Ppi2	GCA GA	Hansson et al. 2000a	<i>A. arundinaceus</i>	VIC

Tab. 3: PCR amplifikace a multiplexy. V prvních třech sloupcích jsou údaje uvedené pro multiplexy, pro primery Aar5 a Ppi2 jen podmínky PCR amplifikace. Pdoμ1 má stejné podmínky přípravy jako multiplex Aar8+Pocc2, ale přidává se jen jeden primer 0,5 μl a tím se mění poměr vody na 4,8 μl.

Ase58+Fhu2+Pca3		Aar4+Ase34		Aar8+Pocc2		Aar5, Ppi2	
Mix	10μl	Mix	10μl	Mix	10μl	Mix	10μl
Buff	1	Buff	1	Buff	1	Buff	1
Mg	1	Mg	0,75	Mg	1	Mg A-P	0,75-1
dNTP	1	dNTP	1	dNTP	1	dNTP	1
P1	0,5	P1	0,5	P1A	0,5	P1A	0,25
P2	0,5	P2	0,5	P2A	0,5	P2A	0,25
P3	0,5	P3	0,5	P3P	0,25	P3P	0,5
P4	0,5	P4	0,5	P4P	0,25	P4P	0,5
P5	0,5	Taq	0,2	Taq	0,2	Taq	0,2
P6	0,5	DNA	1	DNA	1	DNA	1
Taq	0,2	H2O	4,05	H2O	4,3	H2O	5,55-4,8
DNA	1			Pdoμ1	0,5/4,8		
H2O	2,8						

Tab. 4: Skupiny pro výpočet analýzy molekulární variance (AMOVA) v programu Arlequin. První skupina zohledňuje rozdělení na dva poddruhy (1 - scirpaceus, 2 - fuscus). Druhá skupina reprezentuje rozdělení populací táhnoucí odlišnými směry (1 - jihozápadně, 2 - jihovýchodně).

Populace	Skupina 1	Populace	Skupina 2
PT	1	PT	1
ES	1	ES	1
ES_D	1	ES_D	1
FR	1	FR	1
DE_NW	1	DE_NW	1
DE_B	1	DE_B	1
IT	1	IT	1
HR_I	1	CZ_SY	1
HR_SE	1	PL	1
CZ_SY	1	LT	1
CZ_HO	1	FL	1
PL	1	HR_I	2
SK	1	HR_SE	2
HU_W	1	CZ_HO	2
HU_C	1	SK	2
HU_E	1	HU_W	2
LT	1	HU_C	2
FL	1	HU_E	2
BG_W	1	BG_W	2
RO_T	1	RO_T	2
RO_D	1	RO_D	2
TK_M	2	TK_M	2
CY	2	CY	2
JO	2	JO	2



Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan

Petr Procházka^{a,*}, Erica Bellinvia^{a,1}, Drahomíra Fainová^{a,b}, Petra Hájková^a, Anwar Elhalah^c, Khaldoun Alomari^{c,2}

^a*Institute of Vertebrate Biology AS CR, v.v.i., Květná 8, 603 65 Brno, Czech Republic*

^b*Department of Zoology, Faculty of Science, University of South Bohemia, Branšiovská 31, 370 05 České Budějovice, Czech Republic*

^c*The Royal Society for the Conservation of Nature, P.O. Box 1215, Amman 11941, Jordan*

Received 8 November 2007; received in revised form 8 February 2008; accepted 15 February 2008

Abstract

After a population bottleneck, genetic drift can result in sudden and dramatic changes in allele frequencies that occur independently of selection. In such instances, many beneficial adaptations may be eliminated even if the population later increases again. Conversely, immigration may successfully counter the adverse effect of reduced population size, bringing new or lost alleles and replenishing thus genetic diversity of a reduced population. Extensive groundwater abstraction from the Azraq Oasis led to a considerable deterioration of the unique wetland ecosystem during the 1980s and most of the aquatic vegetation consequently died off in the early 1990s. At that time, numbers of local reed warblers (*Acrocephalus scirpaceus*) dramatically dropped to a few pairs. The numbers slightly increased again after wetland restoration efforts were begun. To infer possible consequences of the population collapse on genetic diversity, we genotyped 40 local breeders at 10 polymorphic microsatellite loci. After 15 years from the crash, the population showed no evidence for past genetic bottlenecks. The absence of reduced genetic diversity suggests that the population has largely benefited from gene flow. The study shows how immigration may sustain the viability of fragmented populations of migratory birds after restoration of their former breeding habitat.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Acrocephalus scirpaceus*; Bottleneck; Gene flow; Genetic drift; Genetic rescue; Microsatellite

1. Introduction

Habitat destruction, fragmentation or deterioration cause serious population declines in many animal species around the globe. In a bottleneck, where the population suddenly contracts to a small size, genetic drift

* Corresponding author. Tel.: +420 543422550; fax: +420 543211346.

E-mail address: prochazka@ivb.cz (P. Procházka).

¹ Present address: Department of Plant Physiology, Faculty of Science, Charles University, Viničná 5, 128 44 Praha 2, Czech Republic.

² Present address: IUCN West Asia/Middle East (WAME) Regional Office, P.O. Box 942230, Amman 11194, Jordan.

can result in sudden and dramatic changes in allele frequencies independently of selection, which can have profound effects on the evolutionary history of the population. Loss of polymorphism can lead to increased homozygosity, expression of recessive deleterious alleles, inbreeding depression and decreased adaptive potential (Amos and Harwood, 1998; Galbusera et al., 2000; Jensen et al., 2007; Keller et al., 1994). In such instances, many beneficial adaptations may be eliminated even if the population later increases again. Although many rare alleles are likely to get lost, not all populations that have been reduced to a small size need necessarily show low genetic polymorphism (Clegg et al., 2002; Friar et al., 2000; Pemberton et al., 1996; Waldman et al., 1998). These cases may concern situations of only short-term population decreases followed by rapid population expansion (e.g., Zenger et al., 2003) when there was not enough time for allele fixation. There are also other mechanisms that maintain genetic polymorphism, e.g., when drift is opposed by balancing selection (Paterson et al., 1998), or selection against inbred individuals (Bensch et al., 1994; Coltman et al., 1999).

Most natural populations, however, are not isolated and dispersing individuals significantly influence both demography and genetic variation of the recipient populations. Immigration thus not only enables colonization or increases population size, but may also replenish genetic variation, alleviate inbreeding depression and boost fitness, an effect which has been termed 'genetic rescue' by Ingvarsson (2001). Translocation experiments demonstrated that even a low number of immigrants may significantly increase genetic diversity of isolated populations (Madsen et al., 1999; Saccheri and Brakefield, 2002). Several studies on natural populations similarly showed that immigration contributes to an increase of genetic variation (Hansson et al., 2000; Ortego et al., 2007; Vilà et al., 2002). Gene flow can therefore significantly compensate for the genetic impoverishment of a population by introducing new alleles or replacing those lost through genetic drift (Slatkin, 1985). On the other hand, immigration may impose a risk of outbreeding depression owing to dilution of local adaptation and/or disruption of epistasis (Tallmon et al., 2004).

To understand the effects of short-term fluctuations in population size on genetic diversity, there is clearly a need to analyze such situations in different taxonomical groups and ecological contexts. This study provides a possibility to witness potential genetic consequences of a bottleneck in a natural population of a long-distance migrant passerine breeding in an isolated desert oasis. The Azraq Oasis has been a unique wetland in the Jordanian Eastern Desert. With its former area of up to 26 km² (Scates, 1968), the marshland used to be the most important wetland in the region otherwise dominated by arid habitats, serving as a significant breeding, stopover and wintering site for many waterbirds. Due to extensive groundwater extraction since 1983, the water table has lowered and previously permanent pools, marshes and water meadows dried out completely, and most of the aquatic vegetation died off in 1992–1993. In addition, the remnants of the aquatic vegetation were heavily grazed by livestock, feral horses and water buffalo, and regularly burnt to promote growth for grazing. In 1994, a rehabilitation project started and approximately 10% of the original water input was returned to the wetland reserve (BirdLife International, 2005). The deterioration of the marshland caused decreases in all waterbird species and many of them disappeared from the site (Andrews, 1995). Due to the loss of nesting habitat, the former reed warbler (*Acrocephalus scirpaceus*) population estimated at about 400 breeding pairs in mid-1960s (Wallace, 1983) dramatically decreased to a few pairs in early 1990s (Andrews, 1991; I.J. Andrews, personal communication). Two years after the launch of the wetland restoration project, the numbers slightly increased to 15–40 pairs again (Khoury, 1996). Since that time, no population estimates have been conducted.

Here, we investigate whether this adverse water regime and the degradation of the marshland affected the local breeding reed warblers in terms of their genetic variation. We hypothesized that the unfavourable breeding habitat conditions, followed by a significant decrease in numbers, had an impact on the genetic structure of the local population. Using microsatellites, genetic markers that show a high degree of polymorphism (Jarne and Lagoda, 1996), we tested the hypothesis that the recent bottleneck has reduced genetic diversity in the Azraq reed warblers. Alternatively, because of the dispersal potential of this migratory bird, immigration to the restored wetland may have effectively countered the negative impact of the reduced population size, leaving the local population without traces of impoverished genetic diversity.

Please cite this article as: Procházka, P., et al., Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan. Journal of Arid Environments (2008), doi:10.1016/j.jaridenv.2008.02.005

2. Methods

2.1. Study species

The reed warbler is a long-distance migrant wintering in sub-Saharan Africa and breeding throughout the Western Palearctic in marshland, such as reed (*Phragmites australis*) or reedmace (*Typha* spp.) stands along rivers, ponds, lakes or ditch margins (Cramp, 1992). The species is patchily distributed across its breeding range depending on the availability of suitable nesting sites. Individual populations may thus be viewed in the metapopulation context (Foppen et al., 2000).

2.2. Sample collection

The birds were mist-netted in the Azraq Wetland Reserve, Jordan (31°50'N, 36°50'E) during 2–7 July 2006. The nets were placed on paths in the reed beds dominated by *P. australis* and interspersed with *Tamarix* shrubs in the rehabilitated area situated in the western part of the reserve. The reed warbler is the dominant bird species in this part of the reserve. During the six morning mist-netting sessions (05:00–08:00 h, 120 m of nets), a total of 104 local breeders were ringed. We took a blood sample (5–15 µl) from the brachial vein from 40 individuals. The blood samples were stored in 96% ethanol.

2.3. DNA extraction and amplification

Total DNA was extracted from the blood samples using DNeasy Tissue Kit (Qiagen). Genotyping was performed using 10 polymorphic microsatellite markers (Table 1) selected by Henrik Jensen and his colleagues (NTNU Trondheim, Norway) from a set of primers used in various bird studies. Most of the primers had been developed for or had already been tested on other *Acrocephalus* species.

Amplification by polymerase chain reaction (PCR) was performed according to the following conditions: an initial denaturation step of 3 min at 94 °C, followed by 32–36 cycles of touch-down annealing of 45 s at different temperatures (see Table 1) and 45 s at 72 °C, with final extension of 3 min at 72 °C. Whenever possible, primers for different loci were combined in a single reaction (multiplex). Each 10 µl reaction consisted of 1–10 ng of DNA (1 µl), 1 µl of 10 × PCR buffer with (NH₄)₂SO₄, 1 µl 2 mM dNTP and 0.1 µl of 5 U/ml Taq DNA polymerase (Fermentas); primers and MgCl₂ concentration varied (see Table 1). Each forward primer was labelled at the 5'-end with one of the following fluorescent dyes (Applied Biosystems): VIC (Aar5, Pca3, Ppi2), NED (Aar8, FhU2, Pdoµ1), PET (Ase34, POCC2) or 6-FAM (Aar4, Ase58). Locus Aar5 was amplified in duplex with Ase34, Aar8 with POCC2, and Ase58, FhU2 and Pca3 in a triplex reaction.

Electrophoresis of fluorescent PCR products was performed on an ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). DNA fragment sizes were estimated using GENEMAPPER 3.7 software (Applied Biosystems); two persons (E.B., D.F.) independently scored all the alleles.

Table 1
Origin of primers and PCR conditions used

Locus	Source	Annealing temperature × no. of cycles	MgCl ₂ (mM)	Primer (µmol)
Aar4	Hansson et al. (2000)	60 °C × 2, 58 °C × 30	1.875	0.5
Aar5	Hansson et al. (2000)	65 °C × 2, 62 °C × 2, 59 °C × 2, 56 °C × 28	1.875	0.25
Aar8	Hansson et al. (2000)	62 °C × 2, 59 °C × 2, 56 °C × 2, 53 °C × 2, 50 °C × 28	2.5	0.25
Ase34	Richardson et al. (2000)	60 °C × 2, 58 °C × 30	1.875	0.5
Ase58	Richardson et al. (2000)	65 °C × 2, 62 °C × 2, 59 °C × 2, 56 °C × 28	2.5	0.5
FhU2	Ellegren (1992)	65 °C × 2, 62 °C × 2, 59 °C × 2, 56 °C × 28	2.5	0.5
Pca3	Dawson et al. (2000)	65 °C × 2, 62 °C × 2, 59 °C × 2, 56 °C × 28	2.5	0.5
Pdoµ1	Neumann and Wetton (1996)	56 °C × 35	2.5	0.5
POCC2	Bensch et al. (1997)	62 °C × 2, 59 °C × 2, 56 °C × 2, 53 °C × 2, 50 °C × 28	2.5	0.5
Ppi2	Martinez et al. (1999)	65 °C × 2, 62 °C × 2, 59 °C × 2, 56 °C × 28	2.5	0.5

Please cite this article as: Procházka, P., et al., Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan. Journal of Arid Environments (2008), doi:10.1016/j.jaridenv.2008.02.005

2.4. Statistical analyses

The number of alleles (n_a), allelic richness corrected for sample size (AR), observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity were calculated for each locus using FSTAT version 2.9.3.2 (Goudet, 2001; available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>).

We tested for departure from Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) using exact tests based on a Markov chain algorithm implemented in the programme GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 1995; available from <http://genepop.curtin.edu.au/>). p -values from multiple tests were corrected for significance using sequential Bonferroni adjustment (corrected $p = 0.005$) (Rice, 1989). The frequency of null alleles was estimated by maximum likelihood calculations in the programme ML-Relate (Kalinowski et al., 2006).

Because we had no possibility to collect samples before the wetland deterioration to trace the population's demographic trajectory, we aimed to infer the recent demographic history from a single sample using three different methods:

- (1) Test of heterozygosity excess (Cornuet and Luikart, 1996) which detects the loss of rare alleles in a bottlenecked population relative to that expected under mutation-drift equilibrium (neutrality) for an observed heterozygosity calculated from microsatellite frequency data. In a population which has recently been reduced in size, both the number of alleles (allelic diversity) and heterozygosity are reduced. However, allelic diversity is reduced faster than heterozygosity, resulting in deficiency in the observed number of alleles relative to the number of alleles expected from the observed heterozygosity. Microsatellite data were processed in the programme BOTTLENECK (Cornuet and Luikart, 1996; available from <http://www.ensam.inra.fr/URLB/>). We considered all three models of molecular evolution: the infinite allele model (IAM), the stepwise mutation model (SMM) and the two-phase model (TPM), which is probably closer to the true mode of mutation at most microsatellite loci (Di Rienzo et al., 1994; Piry et al., 1999). The proportion of alleles attributed to SMM under TPM was set to 85%, with a variance of 3 (equal to the number of repeat differences among two most distant adjacent alleles). Ten thousand iterations were used for each mutation model. One-tailed Wilcoxon signed rank test for heterozygote excess was applied as a test of significance (Cornuet and Luikart, 1996; Piry et al., 1999) and the distribution of allele frequencies was tested against the L-shaped distribution as expected under the mutation-drift equilibrium (Luikart et al., 1998).
- (2) The mean ratio of the number of alleles to the range in allele size (M) which discriminates if the study population has been recently reduced in size or has been small in the long term (Garza and Williamson, 2001). While the number of alleles decreases quickly during a bottleneck due to increased genetic drift, only the loss of the smallest or largest allele will lead to a reduction in the range in allele size. The test was performed using the software M RATIO available from <http://www.pfeg.noaa.gov/tib/carlos.htm>. The value of M was calculated using the following parameters: mean size of not one-step mutations $A_g = 2.2$, proportion of not one-step mutations $1-p_s = 0.15$, and pre-bottleneck $\theta = 1.6$ (where $\theta = 4N_e\mu$: effective population size $N_e = 400$, mutation rate $\mu = 10^{-3}$).
- (3) Finally, we used a coalescent-based approach implemented in the programme MSVAR version 1.3 (Beaumont, 1999; Storz and Beaumont, 2002; available from http://www.rubic.rdg.ac.uk/_mab/software.html). This software can be used to assess population declines and/or expansions, both recent and historical. It estimates posterior probability distribution of several genealogical and demographic parameters using Markov Chain Monte Carlo simulations based on the observed distribution of microsatellite alleles and their repeat numbers (Beaumont, 1999). The software gives four important output estimates: current (N_0) and ancestral (N_1) effective population size, μ and t_a (time since population decline or expansion). The programme assumes a SMM, closed population and population in HWE. We used information from our field observations and the literature to choose appropriate prior distributions for each of the input parameters (ancestral effective population size $N_1 = 400$; current effective population size $N_0 = 50$; $\mu = 10^{-3}$ – 10^{-4} ; $t_a = 42$ generations). Five independent chains, each of 20,000 points, were run for the exponential model (which is more suitable for short timescale fluctuations; Beaumont, 1999) of decline/expansion. Outputs were analyzed using a script written in R (R Development Core Team, 2007). MSVAR is sensitive to immigration, since large proportion of immigrants may create a signal of recent

Please cite this article as: Procházka, P., et al., Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan. *Journal of Arid Environments* (2008), doi:10.1016/j.jaridenv.2008.02.005

bottleneck (Excoffier and Heckel, 2006). Therefore, by contrasting the results from MSVAR and the two previous programmes we wanted to explore if there is an indication for a possible effect of immigration in the study population.

3. Results

Number of alleles varied from 3 to 18 per locus (average 8.9, AR = 8.47) with observed heterozygosities between 0.14 and 0.92 (overall $H_O = 0.67$, $H_E = 0.70$; Table 2). Only the locus Ppi2 showed significant departure from HWE after Bonferroni correction (Table 2). A global test for heterozygote deficiency was highly significant ($p < 0.0001$) when all loci were included, however, it proved not significant ($p = 0.247$) when the locus Ppi2 (with highly significant excess of homozygotes; $p < 0.0001$) was excluded. The low heterozygosity of this locus was most probably caused by the occurrence of null alleles, because maximum likelihood estimations by the programme ML-Relate showed a considerable frequency of null alleles (0.217) at this locus. Therefore, we excluded it from the subsequent bottleneck analyses. After exclusion of Ppi2, the data did not significantly deviate from HWE ($p = 0.061$).

None of the three mutational models computed in the programme BOTTLENECK indicated past genetic bottlenecks in the population (Wilcoxon sign-rank tests IAM: $p = 0.150$, TPM: $p = 0.918$, SMM: $p = 0.981$). In addition, there was no significant deviation from the normal L-shaped distribution of allele frequencies as expected for a stable population under mutation-drift equilibrium. Similarly, the M RATIO programme also did not provide any evidence that the population went through a genetic bottleneck (average $M = 0.858$, $p = 0.114$). On the other hand, results from the programme MSVAR, based on five independent runs using exponential model, indicated a very strong recent genetic bottleneck. Estimated modes for mean current effective population size (N_0) ranged from 74 to 131 and for ancestral effective population size (N_1) between 3317 and 6456, suggesting thus a very strong reduction to 1.1–3.9% of the past effective population size. Dating of the population collapse was estimated at 12–16 generations which corresponds to years 1990–1994. The signal of bottleneck in MSVAR must be viewed with caution (see Sections 2 and 4), because the programme assumes closed population, a situation unlikely for our case.

4. Discussion and conclusions

Our data revealed that despite the recent reduction in size, the local breeding population shows a remarkable genetic diversity. The indices of genetic diversity are comparable to a Turkish population from Central Anatolia genotyped at the same 10 microsatellite loci, which had 3–18 alleles per locus (mean 10.3) with overall $H_O = 0.68$ and $H_E = 0.70$ ($N = 32$ individuals; P. Procházka et al., unpublished data). Allelic richness of the Jordanian population corrected for sample size (AR = 8.47) did not differ significantly from

Table 2
Genetic diversity of the sampled reed warblers at 10 microsatellite loci

Locus	N	n_a	Allele size (bp)	H_O	H_E	HWE
Aar4	40	12	115–141 (26)	0.900	0.892	0.267
Aar5	40	5	72–80 (8)	0.475	0.507	0.254
Aar8	40	4	93–99 (6)	0.150	0.144	1.000
Ase34	40	15	228–260 (32)	0.825	0.886	0.084
Ase58	40	9	197–245 (48)	0.900	0.877	0.132
FhU2	40	6	131–144 (13)	0.550	0.663	0.018
Pdop1	40	6	167–191 (24)	0.525	0.527	0.479
Pca3	40	11	137–160 (23)	0.800	0.845	0.128
POCC2	40	3	184–190 (6)	0.425	0.404	1.000
Ppi2	40	18	241–286 (45)	0.500	0.924	0.000

N , number of individuals genotyped; n_a , number of alleles; size (bp), size range of alleles in number of base pairs; H_O , observed heterozygosity; H_E , expected heterozygosity; HWE, p -value of the probability of departure from Hardy–Weinberg equilibrium.

Please cite this article as: Procházka, P., et al., Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan. *Journal of Arid Environments* (2008), doi:10.1016/j.jaridenv.2008.02.005

the Turkish population ($AR = 10.24$, two-sided test after 1000 permutations: $p = 0.321$). The Azraq population showed microsatellite diversity similar to that of the sedge warbler *Acrocephalus schoenobaenus* (Dawson et al., 2000; Marshall et al., 2003), great reed warbler *Acrocephalus arundinaceus* (Hansson et al., 2000) and Basra reed warbler *Acrocephalus griseldis* (Hansson and Richardson, 2005). The insular endemic population of the Seychelles warbler *Acrocephalus sechellensis*, however, had significantly lower measures of genetic diversity ascribable to a severe genetic bottleneck (Hansson and Richardson, 2005).

Notwithstanding the known demographic history of the species in the oasis, we found no evidence for genetic bottleneck. The results from the BOTTLENECK and M RATIO programmes did not detect any signs of genetic bottleneck in the current population. The opposite result from MSVAR is most probably a false signal of bottleneck. The local reed warbler population has apparently been enhanced by birds dispersing from elsewhere and thus our data most probably did not meet the programme assumptions. The programme is sensitive to immigration, since large proportion of immigrants may mimic a signal of recent bottleneck (Excoffier and Heckel, 2006). The signal of strong recent bottleneck in MSVAR thus indirectly points at the possibility of significant immigration. No evidence for genetic bottleneck and the striking genetic diversity implies that despite the dramatic population decline in the 1990s the local population must have benefited from influx of immigrants after the partial restoration of the wetland. Because no detailed monitoring of the local bird numbers has been conducted, it is possible that during the years of the strongest deterioration of the oasis, the original population either had been reduced to only few pairs or even became extinct, and the site was consecutively reoccupied after the management measures were employed to save the wetland ecosystem. The current population could then consist of immigrants of different origin, i.e., with different alleles and allele frequencies. A global heterozygote deficit may indicate a Wahlund effect (Wahlund, 1928), which suggests population sub-structuring due to sourcing from different populations with different allele frequencies. However, estimates in the programme ML-Relate suggest that rather being a consequence of Wahlund effect, the excess of homozygotes in our sample is caused by the occurrence of null alleles at the Ppi2 locus.

Although the Azraq Oasis lies largely isolated in the Jordanian Eastern Desert far from similar suitable breeding habitats for reed warblers, it represents a very important stopover site for the species (Alomari, 2006). We assume that both juvenile and breeding dispersal may have been responsible for the quick resurgence of the population. The question that remains unanswered is what was the genetic stock of the pre-bottleneck population and from where the immigrants came.

Birds as flying organisms are generally characterized by relatively high dispersal abilities. Dispersal propensity is larger in migratory and wetland species, perhaps due to their movement potential and adaptations to the patchiness of habitats through space and time (Paradis et al., 1998). Although many birds show pronounced breeding and wintering site fidelity (Cuadrado, 1992; Greenwood and Harvey, 1982), both natal and breeding dispersal promote gene flow and enable thus long-term persistence of populations (Ingvarsson, 2001; Keller et al., 2001). Furthermore, long-lived birds may retain genetic diversity because their long generation time may minimize genetic drift and buffer against rapid genetic pauperization (Hailer et al., 2006). It is thus not surprising that most studies which have found evidence for bottleneck in birds investigated either island populations (e.g., Akst et al., 2002; Boessenkool et al., 2007; Lambert et al., 2005) or over-harvested game species (Mock et al., 2004; Oyler-McCance et al., 2007; Tejedor et al., 2005). Galbusera et al. (2004) demonstrated how relatively higher dispersal capacity can sustain habitat fragmentation in the white-starred robin *Pogonochila stellata* compared to the sympatric and critically endangered Taita thrush *Turdus helleri*. Similarly, Croteau et al. (2007) found no evidence for reduced gene flow in the migrant North American sagebrush Brewer's sparrow *Spizella breweri breweri* in a semi-arid fragmented landscape in British Columbia. They hypothesize that juvenile dispersal is responsible for quick natural recolonization of patchy habitats. The same may apply for the reed warbler, which shows higher natal than breeding dispersal (Dorsch and Dorsch, 1985). As dispersal is generally more female-biased in birds (Greenwood and Harvey, 1982; Johnson and Gaines, 1990) and male reed warblers have higher local return rates than females (Dorsch and Dorsch, 1985), we expect a female-biased pattern of dispersal also in our study species. This has been indeed confirmed in the closely related great reed warbler using genetic techniques—female immigrants' genotypes had significantly lower assignment probability to a reference population than males and the majority of novel alleles were carried by females (Hansson et al., 2003).

Please cite this article as: Procházka, P., et al., Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan. Journal of Arid Environments (2008), doi:10.1016/j.jardenv.2008.02.005

Our study presents an interesting finding which has implications for conservation of migratory birds. Many avian migrants have experienced declines in numbers due to the risks and limitations encountered both *en route* and in their breeding and non-breeding grounds (Newton, 2004; Sanderson et al., 2006). The threat of habitat destruction and deterioration has been especially critical for waterbirds, since wetlands have faced threats of droughts, pollution and destruction worldwide (Brinson and Malvarez, 2002). The most notable is probably the case of the aquatic warbler, *Acrocephalus paludicola*, which once bred across large parts of the Western Palearctic. After extensive drainage of fen mires, its breeding range has shrunk considerably and the species is now classified as globally threatened (Aquatic Warbler Conservation Team, 1999). The case of reed warblers from the Azraq Oasis amidst the Jordanian Desert shows how immigration may maintain the viability of fragmented populations of migratory birds after restoration of their former breeding habitat.

Acknowledgements

We are grateful to Henrik Jensen, Bård G. Stokke, and Johan R. Vikan for providing sequences of microsatellite primers successfully cross-amplified in the reed warbler; Josef Bryja and other staff of the lab at Studenec for their selfless help and a stimulating environment. Milica Požgayová and two anonymous referees commented on earlier versions of the manuscript. Ashraf Elhalah and local staff of the Azraq Wetland Reserve kindly assisted in the field, and Sami Tarabay allowed us to work in the reserve. The study was supported by GAAV (KJB600930508), travel and accommodation of P.P. within Jordan was covered by RSCN. The initial contact with Jordanian colleagues was enabled through the Southeast European Bird Migration Network (SEEN).

References

- Akst, E.P., Boersma, P.D., Fleischer, R.C., 2002. A comparison of genetic diversity between the Galápagos penguin and the Magellanic penguin. *Conservation Genetics* 3, 375–383.
- Alomari, K., 2006. Preliminary results of ringing activities at Azraq Wetland Reserve, Eastern Jordan. In: Procházka, P., Sedláček, O. (Eds.), Proceedings of the 8th Workshop of the Southeast European Bird Migration Network (SEEN), 2–5 February 2006, Praha, Czech Republic, p. 10 (Programme and abstract book).
- Amos, W., Harwood, J., 1998. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 353, 177–186.
- Andrews, I.J., 1991. Is Azraq still an oasis? *OSME Bulletin* 27, 13–19.
- Andrews, I.J., 1995. The Birds of the Hashemite Kingdom of Jordan. Andrews, Musselburgh.
- Aquatic Warbler Conservation Team, 1999. World population, trends and conservation status of the aquatic warbler *Acrocephalus paludicola*. *Vogelwelt* 120, 65–85.
- Beaumont, M.A., 1999. Detecting population expansion and decline using microsatellites. *Genetics* 153, 2013–2029.
- Bensch, S., Hasselquist, D., von Schantz, T., 1994. Genetic similarity between parents predicts hatching failure: non-incestuous inbreeding in the great reed warbler. *Evolution* 48, 317–326.
- Bensch, S., Price, T., Kohn, J., 1997. Isolation and characterization of microsatellite loci in a *Phylloscopus* warbler. *Molecular Ecology* 6, 91–92.
- BirdLife International, 2005. BirdLife's online World Bird Database: The Site for Bird Conservation. Version 2.0. BirdLife International, Cambridge, UK. Available from: <<http://www.birdlife.org>>.
- Boessenkool, S., Taylor, S.S., Tepolt, C.K., Komdeur, J., Jamieson, I.G., 2007. Large mainland populations of South Island robins retain greater genetic diversity than offshore island refuges. *Conservation Genetics* 8, 705–714.
- Brinson, M.M., Malvarez, A.I., 2002. Temperate freshwater wetlands: types, status, and threats. *Environmental Conservation* 29, 115–133.
- Clegg, S.M., Dehnan, S.M., Kikkawa, J., Moritz, C., Estoup, A., Owens, I.P.F., 2002. Genetic consequences of sequential founder events by an island-colonizing bird. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, 8127–8132.
- Coltman, D.W., Pilkington, J.G., Smith, J.A., Pemberton, J.M., 1999. Parasite-mediated selection against inbred Soay sheep in a free-living, island population. *Evolution* 53, 1259–1267.
- Cornuet, J.M., Luikart, G., 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144, 2001–2014.
- Cramp, S. (Ed.), 1992. The Birds of the Western Palearctic, vol. 6. Warblers, Oxford University Press, Oxford.
- Croteau, E.K., Loughheed, S.C., Krannitz, P.G., Mahony, N.A., Walker, B.L., Boag, P.T., 2007. Genetic population structure of the sagebrush Brewer's sparrow, *Spizella breweri breweri*, in a fragmented landscape at the northern range periphery. *Conservation Genetics* 8, 1453–1463.

Please cite this article as: Procházka, P., et al., Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan. *Journal of Arid Environments* (2008), doi:10.1016/j.jaridenv.2008.02.005

- Cuadrado, M., 1992. Year to year recurrence and site fidelity of blackcaps *Sylvia atricapilla* and robins *Erithacus rubecula* in a Mediterranean wintering area. *Ring and Migration* 13, 36–42.
- Dawson, D.A., Hanotte, O., Greig, C., Stewart, I.R.K., Burke, T., 2000. Polymorphic microsatellites in the blue tit *Parus caeruleus* and their cross-species utility in 20 songbird families. *Molecular Ecology* 9, 1941–1944.
- Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B., 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 91, 3166–3170.
- Dorsch, H., Dorsch, I., 1985. Dynamik und Ökologie der Sommervogelgemeinschaft einer Verlandungszone bei Leipzig. *Beiträge zur Vogelkunde* 31, 237–358.
- Ellegren, H., 1992. Polymerase-chain-reaction (PCR) analysis of microsatellites—a new approach to studies of genetic relationships in birds. *Auk* 109, 886–895.
- Excoffier, L., Heckel, G., 2006. Computer programs for population genetics data analysis: a survival guide. *Nature Reviews* 7, 745–758.
- Foppen, R.P.B., Chardon, J.P., Liefveld, W., 2000. Understanding the role of sink patches in source-sink metapopulations: reed warbler in an agricultural landscape. *Conservation Biology* 14, 1881–1892.
- Friar, E.A., Ladoux, T., Roalson, E.H., Robichaux, R.A., 2000. Microsatellite analysis of a population crash and bottleneck in a Mauna Kea silversword, *Argyroxiphium sandwicense* ssp. *sandwicense* (Asteraceae), and its implications for reintroduction. *Molecular Ecology* 9, 2027–2034.
- Galbusera, P., Lens, L., Schenck, T., Waiyaki, E., Matthysen, E., 2000. Genetic variability and gene flow in the globally, critically endangered Taita thrush. *Conservation Genetics* 1, 45–55.
- Galbusera, P., Githiru, M., Lens, L., Matthysen, E., 2004. Genetic equilibrium despite habitat fragmentation in an Afrotropical bird. *Molecular Ecology* 13, 1409–1421.
- Garza, J.C., Williamson, E.G., 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10, 305–318.
- Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from: <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Greenwood, P.J., Harvey, P.H., 1982. The natal and breeding dispersal in birds. *Annual Review of Ecology and Systematics* 13, 1–21.
- Hailer, F., Helander, B., Folkestad, A.O., Ganusevich, S., Garstad, S., Hauff, P., Koren, C., Nygård, T., Volke, V., Vilà, C., Ellegren, H., 2006. Bottlenecked but long-lived: high genetic diversity retained in white-tailed eagles upon recovery from population decline. *Biology Letters* 2, 316–319.
- Hansson, B., Richardson, D.S., 2005. Genetic variation in two endangered *Acrocephalus* species compared to a widespread congener: estimates based on functional and random loci. *Animal Conservation* 8, 83–90.
- Hansson, B., Bensch, S., Hasselquist, D., Lilland, B.-G., Wennerberg, L., von Schantz, T., 2000. Increase of genetic variation over time in a recently founded population of great reed warblers (*Acrocephalus arundinaceus*) revealed by microsatellites and DNA fingerprinting. *Molecular Ecology* 9, 1529–1538.
- Hansson, B., Bensch, S., Hasselquist, D., 2003. A new approach to study dispersal: immigration of novel alleles reveals female-biased dispersal in great reed warblers. *Molecular Ecology* 12, 631–637.
- Ingvarsson, P.K., 2001. Restoration of genetic variation lost—the genetic rescue hypothesis. *Trends in Ecology and Evolution* 16, 62–63.
- Jarne, P., Lagoda, P.J.L., 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution* 11, 424–429.
- Jensen, H., Bremset, E.M., Ringsby, T.H., Sæther, B.-E., 2007. Multilocus heterozygosity and inbreeding depression in an insular house sparrow metapopulation. *Molecular Ecology* 16, 4066–4078.
- Johnson, M.L., Gaines, M.S., 1990. Evolution of dispersal: theoretical models and empirical tests using birds and mammals. *Annual Review of Ecology and Systematics* 21, 449–480.
- Kalinowski, S.T., Wagner, A.P., Taper, M.L., 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6, 576–579.
- Keller, L.F., Arcese, P., Smith, J.N.M., Hochachka, W.M., Stearns, S.C., 1994. Selection against inbred song sparrows during a natural population bottleneck. *Nature* 372, 356–357.
- Keller, L.F., Jeffery, K.J., Arcese, P., Beaumont, M.A., Hochachka, W.M., Smith, J.N., Bruford, M.W., 2001. Immigration and the ephemerality of a natural population bottleneck: evidence from molecular markers. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268, 1387–1394.
- Khoury, F., 1996. Observations on the avifauna of the Azraq wetland, Jordan, June 1995. *Sandgrouse* 18, 52–57.
- Lambert, D.M., King, T., Shepherd, L.D., Livingston, A., Anderson, S., Craig, J.L., 2005. Serial population bottlenecks and genetic variation: translocated populations of the New Zealand saddleback (*Philesturnus carunculatus rufusater*). *Conservation Genetics* 6, 1–14.
- Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J.M., Sherwin, W.B., 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *Journal of Heredity* 89, 238–247.
- Madsen, T., Shine, R., Olsson, M., Wittzell, H., 1999. Conservation biology—restoration of an inbred adder population. *Nature* 402, 34–35.
- Marshall, R.C., Buchanan, K.L., Catchpole, C.K., 2003. Sexual selection and individual genetic diversity in a songbird. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270 (Suppl.), S248–S250.
- Martinez, J.G., Soler, J.J., Soler, M., Møller, A.P., Burke, T., 1999. Comparative population structure and gene flow of a brood parasite, the great spotted cuckoo (*Clamator glandarius*), and its primary host, the magpie (*Pica pica*). *Evolution* 53, 269–278.
- Mock, K.E., Latch, E.K., Rhodes Jr., O.E., 2004. Assessing losses of genetic diversity due to translocation: long-term case histories in Merriam's turkey (*Meleagris gallopavo merriami*). *Conservation Genetics* 5, 631–645.

Please cite this article as: Procházka, P., et al., Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan. *Journal of Arid Environments* (2008), doi:10.1016/j.jaridenv.2008.02.005

- Neumann, K., Wetton, J.H., 1996. Highly polymorphic microsatellites in the house sparrow *Passer domesticus*. *Molecular Ecology* 5, 307–309.
- Newton, I., 2004. Population limitation in migrants. *Ibis* 146, 197–226.
- Ortego, J., Aparicio, J.M., Calabuig, G., Cordero, P.J., 2007. Increase of heterozygosity in a growing population of lesser kestrels. *Biology Letters* 3, 585–588.
- Oyler-McCance, S.J., Ransler, F.A., Berkman, L.K., Quinn, T.W., 2007. A rangewide population genetic study of trumpeter swans. *Conservation Genetics* 8, 1339–1353.
- Paradis, E., Baillie, S.R., Sutherland, W.J., Gregory, R.D., 1998. Patterns of natal and breeding dispersal in birds. *Journal of Animal Ecology* 67, 518–536.
- Paterson, S., Wilson, K., Pemberton, J.M., 1998. Major histocompatibility complex variation associated with juvenile survival and parasite resistance in a large unmanaged ungulate population (*Ovis aries* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95, 3714–3719.
- Pemberton, J.M., Smith, J.A., Coulson, T.N., Marshall, T.C., Slate, J., Paterson, S., Albon, S.D., Clutton-Brock, T.H., 1996. The maintenance of genetic polymorphism in small island populations: large mammals in the Hebrides. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 351, 745–752.
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J.M., 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity* 90, 503.
- R Development Core Team, 2007. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available from: <<http://www.R-project.org>>.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. Genepop Version 1.2—population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86, 248–249.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 43, 223–225.
- Richardson, D.S., Jury, F.L., Dawson, D.A., Salgueiro, P., Komdeur, J., Burke, T., 2000. Fifty Seychelles warbler (*Acrocephalus sechellensis*) microsatellite loci polymorphic in Sylviidae species and their cross-species amplification in other passerine birds. *Molecular Ecology* 9, 2155–2234.
- Saccheri, I.J., Brakefield, P.M., 2002. Rapid spread of immigrant genomes into inbred populations. *Proceedings of the Royal Society of London B* 269, 1073–1078.
- Sanderson, F.J., Donak, P.F., Pain, D.J., Burfield, I.J., van Bommel, F.P.J., 2006. Long-term population declines in Afro-Palaearctic migrant birds. *Biological Conservation* 131, 93–105.
- Scates, M.D., 1968. Notes on the hydrobiology of Azraq Oasis, Jordan. *Hydrobiologia* 31, 73–80.
- Slatkin, M., 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16, 393–430.
- Storz, J.F., Beaumont, M.A., 2002. Testing for genetic evidence of population expansion and contraction: an empirical analysis of microsatellite DNA variation using a hierarchical Bayesian model. *Evolution* 56, 154–166.
- Tallmon, D.A., Luikart, G., Waples, R.S., 2004. The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *Trends in Ecology and Evolution* 9, 489–496.
- Tejedor, M.T., Monteagudo, L.V., Hadjisterkotis, E., Arruga, M.V., 2005. Genetic variability and population structure in Cypriot chukar partridges (*Alectoris chukar cypriotes*) as determined by microsatellite analysis. *European Journal of Wildlife Research* 51, 232–236.
- Vilà, C., Sundqvist, A.-K., Flagstad, Ø., Seddon, J., Björnerfeldt, S., Kojala, I., Casulli, A., Sand, H., Wabakken, P., Ellegren, H., 2002. Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London B* 270, 91–97.
- Wahlund, S., 1928. Zusammensetzung von Population und Korrelationserscheinung vom Standpunkt der Vererbungslehre aus betrachtet. *Hereditas* 11, 65–106.
- Waldman, J.R., Bender, R.E., Wirgin, I.I., 1998. Multiple population bottlenecks and DNA diversity in populations of wild striped bass, *Morone saxatilis*. *Fishery Bulletin* 96, 614–620.
- Wallace, D.I.M., 1983. The breeding birds of the Azraq Oasis and its desert surround, Jordan, in the mid-1960s. *Sandgrouse* 5, 1–18.
- Zenger, K.R., Richardson, B.J., Vachot-Griffin, A.-M., 2003. A rapid population expansion retains genetic diversity within European rabbits in Australia. *Molecular Ecology* 12, 789–794.

Please cite this article as: Procházka, P., et al., Immigration as a possible rescue of a reduced population of a long-distant migratory bird: Reed warblers in the Azraq Oasis, Jordan. *Journal of Arid Environments* (2008), doi:10.1016/j.jaridenv.2008.02.005