

**ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE**

**FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ**

Katedra ekologie



**Variabilita zbarvení vaječné skořápky**

Bakalářská práce

Autor práce: Kateřina Bubeníčková

Vedoucí práce: Ing. Jana Svobodová, Ph. D.

Praha, 2016

# ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

Fakulta životního prostředí

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Kateřina Bubeníčková

Aplikovaná ekologie

Název práce

Variabilita zbarvení vaječné skořápky

Název anglicky

Variability of eggshell colouration

---

### Cíle práce

Vysoká variabilita ve zbarvení vaječných skořápek ptáků je způsobena dvěma pigmenty, biliverdinem a protoporphyrinem (CasseyY et al. 2011). Za skvrnitost skořápek je však zodpovědný pouze protoporphyrin (Mikšík et al. 1996). Pro vysvětlení vysoké variability ve zbarvení vajec mezi i uvnitř snůšek bylo navrženo několik hypotéz, např. zpevňující či kryptická funkce pigmentu (Wallace 1889), vliv pigmentu na permeabilitu (tj. ztrátu vody) skořápky (HIGHAM et GOSLER 2006) a identifikace vlastních vajec (López-de-Heirrom et Moreno-Rueda 2010). Nejvíce pozornosti je však v poslední době věnováno signální funkci vajec, která informuje o kvalitě samic v postkopulačním období (Moreno et Osorno 2003).

1. Práce se bude zabývat proximálními i ultimálními příčinami proměnlivosti ve zbarvení ptačích skořápek.
2. Práce bude testovat, zda variabilita ve zbarvení protoporphyrinových skvrn souvisí s kondicí samic sýkory koňadry (*Parus major*).

### Metodika

Náš tým disponuje daty o samicích sýkory koňadry (hmotnost, základní míry, hematologická data, standardní digitální fotografie melaninového ornamentu, vzorky peří karotenoidního ornamentu), které byly odchyceny v blízkosti hnízdních budek na studijní ploše Čimický-Ďáblický háj. Počty erytrocytů budou vyhodnoceny standardními postupy pomocí mikroskopu (mikroskop CX41 s fázovým kontrastem, digitální kamera UI-1540-C, program QuickPhoto Industrial 12.3, Olympus). Vztah mezi kondicí samice a zbarvení vaječné skořápky bude testován standardními statistickými metodami.

Doporučený rozsah práce

ca 30 stran

Klíčová slova

anemická hypotéza, protoporfyrin, sýkora koňadra, *Parus major*, vaječné pigmenty

---

Doporučené zdroje informací

CASSEY P. et al., 2011: Why are birds' eggs colourful? Eggshell pigments co-vary with life-history and nesting ecology among British breeding non-passerine birds. *Biological Journal of the Linnean Society* 106: 657–672.

HIGHAM J. et GOSLER A., 2006: Speckled eggs: water-loss and incubation behaviour in the great tit *Parus major*. *Oecologia* 149: 561–570.

LÓPEZ-DE-HIERRO M. D. G. et MORENO-RUEDA G., 2010: Egg-spot pattern rather than egg colour affects conspecific egg rejection in the house sparrow (*Passer domesticus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64: 317–324.

MIKŠÍK I., HOLAN V. et DEYL Z., 1996: Avian eggshell pigments and their variability. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry and Molecular Biology* 113: 607–612.

MORENO J. et OSORNO J. L., 2003: Avian egg colour and sexual selection: does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality? *Ecology Letters* 6: 803–806.

WALLACE A. R., 1889: *Darwinism: an exposition of the theory of natural selection with some of its applications*. Macmillan, Londýn: 494 s.

---

Předběžný termín obhajoby

2015/16 LS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Jana Svobodová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

---

Elektronicky schváleno dne 16. 3. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Vedoucí katedry

---

Elektronicky schváleno dne 16. 3. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 10. 04. 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma „Variabilita zbarvení vaječné skořápky“ vypracovala samostatně pod odborným vedením Ing. Jany Svobodové, Ph.D. a že jsem uvedla veškeré použité literární prameny.

V Praze, dne 12.4.2016

.....

## **Poděkování**

Děkuji Ing. Janě Svobodové, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnovala během zpracování této bakalářské práce. Dále děkuji členům výzkumného týmu za poskytnutá data z minulých let.

V Praze, dne 12.4.2016

.....

## Abstrakt

Ptačí vejce jsou charakteristická velkou variabilitou zbarvení. Toto zbarvení je způsobeno dvěma hlavními typy pigmentů, biliverdinem a protoporfyrinem. Biliverdin je odpovědný za modrozelené zbarvení vajec a protoporfyrin za červenohnědé a černé skvrny na vejcích. Ačkoliv příčiny výsledné variability zbarvení vajec se snaží objasnit řada hypotéz, přesto nebyly plně vyjasněny, a proto stojí v popředí zájmu vědeckých výzkumů. V teoretické části práce jsou popsány jednotlivé typy hypotéz, které byly navrženy pro vysvětlení příčiny variability zbarvení vaječné skořápky. Hypotézy jsou zaměřeny na strukturální a signální funkci pigmentu a anemickou hypotézu; ty jsou v práci podrobněji popsány, jelikož jsou předmětem výzkumu této studie. Hypotéza o signální funkci pracuje s teorií, že pigmentace vajec reflektuje fyzickou kondici samic. Z dosud publikovaných studií o signální hypotéze bylo zjištěno, že 60% publikovaných výsledků podporuje teorii o vztahu skvrnitosti vajec a tělesnou kondicí samic. Většina prací studujících signální hypotézu byla prováděna na pěvcích (80%), a proto nelze tuto hypotézu aplikovat v obecném měřítku i na jiné druhy ptáků, jelikož na nich (mimo výjimky) nebyla dostatečně testována. Anemická hypotéza se snaží variabilitu zbarvení vajec vysvětlit pomocí teorie, kde vyplavovaný protoporfyrin ve větší koncentraci v důsledku anémie má za následek větší pigmentaci vajec. Cílem praktické části bylo testovat, zda závisí kvalita kondice samice na charakteru barvy skvrn sýkory koňadry (*Parus major*) a dále, jestli má poměr imaturních erytrocytů k celkovému počtu erytrocytů vliv (odraz míry anémie) na výsledné zbarvení vaječné skořápky. Výsledky studie prokázaly, že zbarvení vaječné skořápky souvisí s kondičními znaky samic, tedy že červenohnědé skvrny s menším jasnem a sytostí indikují větší plochu břišního melaninového pruhu. Tato práce tedy podpořila hypotézu o signální funkci protoporfyrinu výsledkem, že tělesné znaky kondice samice souvisí se zbarvením vaječné skořápky a to tak, že samice s horší fyzickou kondicí produkují více pigmentovaná vejce. Dále ve výzkumném šetření nebyl prokázán žádný vztah poměru imaturních erytrocytů k celkovému počtu erytrocytů a zbarvení vaječné skořápky. To znamená, že není možné potvrdit vztah anémie a variability zbarvení vaječné skořápky na naší populaci sýkory koňadry.

**Klíčová slova:** protoporfyrin, signální hypotéza, anemická hypotéza, kondice samice, *Parus major*

## Abstract

Bird's eggs are specific for big variability in eggshell coloration. This eggshell coloration is caused by two pigments – Biliverdin and Protoporphyrin. Biliverdin causes blue-green color of the egg and Protoporphyrin causes red-brown and black maculas on the surface of the eggshell. Many hypotheses try to clarify the reason of resultant variability in the eggshell coloration. The final reason of the variability in the eggshell coloration has not been yet explained and this is the reason, why this topic is subject of scientific researches. In the theoretical part of this thesis are described individual hypotheses, which describe variability in the eggshell coloration. These theses were focused on structural and signal function of pigment and the anemic hypothesis; these are explained in detail in the thesis, because they are the subjects of this thesis's research. Signal hypothesis works with theory, that egg's pigmentation informs the partner about female's condition quality. Results of recent published studies, which are focused on signal function, say, that 60% of results support the theory, that egg maculation relates to female's body condition. 80% of studies about signal function made there researches on passerines. This is the main reason, why signal function of pigment cannot be applied generally on all bird species, because the signal function was not properly or none tested on other species than passerines (out of few exceptions). Anemic hypothesis might explain the variability in the eggshell coloration with theory, protoporphyrin, which is derived in higher concentration from blood due to the anaemia, causes higher maculation on the surface of eggshell. Purpose of practical part of this thesis was finding out, whether female's condition quality depends on the character of color maculation in Great tit (*Parus major*). Furthermore if there exist correlation between ratio (of immature red blood cells and total sum of red blood cells) and eggshell coloration. Results of the study show, that the eggshell coloration may depend on female's condition. Specifically, red-brown macules with lower level of intensity and saturation pronounce larger area of melanin-based ventral stripe. In conclusion, this thesis supports signal function thesis of protoporphyrin and leads to the fact, that final eggshell coloration has an impact on the female's body condition. Results of this thesis does not prove any relationship between ratio (of immature red blood cells and total sum of red blood cells) and eggshell coloration. It leads to the fact, that there is no possible support for correlation between anaemia and variability in eggshell coloration in our population of Great tit.

**Key words:** protoporphyrin, signal hypothesis, anaemical hypothesis, female condition, *Parus major*





## Obsah

1. Úvod.....	11
2. Cíle práce .....	13
3. Literární rešerše .....	14
3.1. Protoporfyrin IX.....	14
3.2. Struktura vaječné skořápky.....	16
3.3. Význam zbarvení vaječné skořápky.....	16
3.3.1. Kryptická funkce .....	17
3.3.2. Strukturní funkce .....	18
3.3.3. Permeabilní funkce.....	19
3.3.4. Termoregulační funkce .....	20
3.3.5. Antibakteriální funkce .....	21
3.3.6. Hnízdní parazitizmus a mimetická vejce .....	21
3.4. Signální funkce .....	22
3.4.1. Signální funkce a biliverdin .....	23
3.4.2. Signální funkce a protoporfyrin .....	24
3.5. Anemická hypotéza .....	27
3.6. Metodika měření zbarvení vaječné skořápky protoporfyrinu .....	29
4. Praktická část .....	31
4.1. Úvod.....	31
4.2. Studovaný druh .....	31
4.3. Metodika.....	32
4.3.1. Analýza erytrocytů .....	32
4.3.2. Statistické analýzy .....	33
4.4. Výsledky .....	34
4.5. Diskuze.....	39
5. Závěr .....	41
6. Zdroje .....	43
7. Přílohy .....	I



# 1. Úvod

Zbarvení vaječné skořápky je způsoben dvěma pigmenty: biliverdinem a protoporfyrinem. Biliverdin způsobuje modrozelené zbarvení vajec, zatímco protoporfyrin červenohnědé a černé skvrny na povrchu vajec (Kennedy et Vevers, 1976). Zároveň tyto pigmenty plní v těle i jinou funkci než funkci pigmentu. Biliverdin je antioxidant a protoporfyrin je prooxidant. Protoporfyrin, na který je tato práce zaměřená, jelikož způsobuje zbarvení vajec u zkoumané sýkory koňadry (*Parus major*), může vyvolávat oxidativní stres v těle samic tím, že tvoří reaktivní formy kyslíku (tzv. volné radikály) anebo potlačuje antioxidantní systém. Protoporfyrin, jako škodlivá látka, může vyvolávat oxidativní stres, který má negativní účinky na organismus a může způsobit zničení buněk a tkání v organismu (Afonso et al., 1999).

Výsledná variabilita zbarvení vajec je velká a může se lišit mezi druhy (v rámci jednoho druhu či v jedné snůšce) (Mikšík et al., 1994). V oblasti zkoumání příčiny této variability zbarvení vaječné skořápky byly navrženy různé druhy hypotéz. Tyto hypotézy jsou recentní, a proto byla teoretická část práce zaměřena právě na ně. Signální a anemická hypotéza jsou v této práci rozebrány podrobněji, jelikož jsou předmětem praktické části této práce.

Signální funkce pigmentu předpokládá, že výsledná pigmentace vaječné skořápky informuje partnera o (pozitivní či negativní) fyzické kondici samice (Moreno et Osorno, 2003). Protoporfyrin je derivován z krve při biosyntéze hemu a mimo funkce pigmentu, který způsobuje skvrny na povrchu vejce, plní i jinou funkci (Kennedy et Vevers, 1976). Protoporfyrin je prooxidant, který je za normálních podmínek vyplavován přirozenou cestou z těla. V situaci, kdy se protoporfyrin akumuluje v játrech, způsobuje oxidativní stres v těle samic (Afonso et al., 1999). Tento oxidativní stres pak může způsobovat různé změny v tělesné kondici samice (Kilner, 2006). Proto Moreno et Osorno (2003) navrhli hypotézu, jak může pigment vajec odrážet kondici samic.

Podle De Costera et al. (2012) může být výsledná variabilita ve zbarvení vaječné skořápky u samic způsobena i anémií. Vzhledem k tomu, že protoporfyrin je ve větší míře derivován z krve při větší tvorbě červených krvinek v následku anémie, je očekávána intenzivnější pigmentace u samic, které anémií trpí (Cambell et Ellis, 2007).

V závěru teoretické části jsou popsány hlavní metodologické postupy pro kvantifikaci intenzity skvrn, které byly použity u průlomových studií, zabývajících se problematikou variability zbarvení vaječné skořápky.

Praktická část této práce se zabývá vztahem mezi variabilitou zbarvení vaječné skořápky a kondičními znaky samic sýkory koňadry (délka tarsu, standardizovaná hmotnost, index erytrocytů, velikost snůšky, karotenové zbarvení peří, plocha melaninového břišního pruhu). Dále byl zkoumán vztah mezi zbarvením vaječné skořápky a potencionální anémií u samic. Poměr imaturních erytrocytů a všech erytrocytů může souviset s anémií u ptáků a vysvětlovat tak výslednou variabilitu zbarvení vaječné skořápky (Yamato et al., 1996).

## 2. Cíle práce

Cílem teoretické části bakalářské práce je podání celkového přehledu o hypotézách, které byly navrženy pro vysvětlení variability ve zbarvení vajec a výsledků z nich plynoucích.

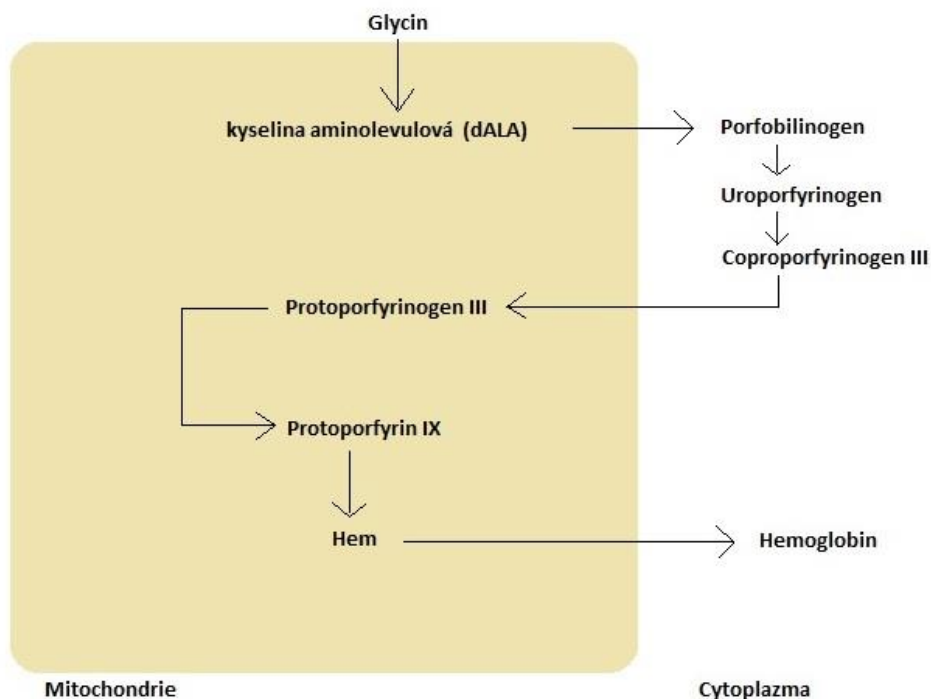
Praktická část bakalářské práce spočívala v analýze erytrocytů z krevních nátěrů samic sýkory koňadry (*Parus major*). Cílem byl zjistit vztah intenzity skvrn a anemické hypotézy. Dalším cílem praktické části bylo z poskytnutých dat vyzkoumat vztah mezi intenzitou skvrnitosti a kondičními znaky samic sýkory koňadry. Konkrétně testování vztahů parametrů barvy skvrn (odstín, sytost, jas) a kondiční znaky samice (délka tarsu, standardizovaná hmotnost, index erytrocytů, velikost snůšky, karotenoidní ornament peří, plocha melaninového břišního pruhu).

### 3. Literární rešerše

Tato část práce rozebírá a popisuje hypotézy hovořící o významu zbarvení vaječné skořápky, které je způsobené pigmentem protoporfyrinem IX (Cassey et al., 2011). Je zde popsána syntéza, funkce a vlastnosti protoporfyrinu IX, protože právě tento pigment způsobuje červeno-hnědé a černé skvrny na povrchu vaječné skořápky (Mikšík et al., 1994). V další, teoretické části práce, je popsána struktura vaječné skořápky, jelikož předmětem této práce je variabilita ve zbarvení vaječné skořápky. Je tedy důležité základní porozumění složení a struktury vaječné skořápky. Dále jsou popsány jednotlivé hypotézy týkající se funkce protoporfyrinu, mající vliv na fyzikální a chemické vlastnosti vaječné skořápky (Gosler et al., 2005; Higham et Gosler, 2006). Podrobněji jsou zde rozebírány hypotézy o signální funkci a anemické hypotéza, které mohou vypovídat o kvalitě kondice samice skrz výsledné zbarvení vaječné skořápky.

#### 3.1. Protoporfyrin IX

Protoporfyrin IX (1, 3, 5, 8–tetrametyl-2, 4-divinyl-6, 7-dipropionová kyselina) (dále jen protoporfyrin) je látka, která vzniká biosyntézou z glycinu (Battersby et al., 1980). V mitochondriích, během citrátového cyklu, se glycin syntetizuje na látku delta ALA (kyselina aminolevulová). Z delta ALA se v cytoplazmě následně vytváří porfobilinogen, z něho dále uroporfyrinogen III a z něho pak coproporfyrinogen III. Poté se syntéza přesouvá zpět do mitochondrií, kde z coproporfyrinogenu III. vzniká protoporfyrinogen III a dále vzniká protoporfyrin (viz obrázek 1). Při sloučení iontu železa a protoporfirinu dále vzniká hem, který je součástí hemoglobinu (Layer et al., 2010).



Obrázek 1 Schéma vzniku protoporphyrinu v organismech.

Zdroj: Leeper (1983).

Schopnost syntézy protoporphyrinu mají téměř všechny organismy, od bakterií až po savce (tedy i ptáci), s výjimkou několika vyhynulých druhů a vyšších druhů rostlin (Leeper, 1983).

Protoporphirin, je látka, která způsobuje červeno-hnědé a černé zbarvení na povrchu vaječné skořápky u ptáků (Cassey et al., 2011). Tento pigment je vyplavován z krve těsně po ovulaci a akumuluje se na vaječné skořápce, kde tvoří různě tmavé a různě velké skvrny. Převážně tvoří pomyslnou skvrnitou korunku ve spodní hemisféře vejce a různě distribuované skvrny ve zbylých částech vejce (Mikšík et al., 1996).

Protoporphyrin, mimo funkce pigmentu způsobující zbarvení skvrn na povrchu vaječné skořápky, figuruje v těle ptáků také jako prooxidant, který může vyvolávat oxidativní stres tím, že tvoří reaktivní formy kyslíku (tzv. volné radikály) anebo potlačuje antioxidantní systém. Protoporphyrin, jako škodlivá látka, může vyvolávat oxidativní stres, který má negativní účinky na organismus a může způsobit zničení buněk a tkání v organismu (Afonso et al., 1999).

Přítomnost protoporphyrinu ve vaječné skořápce je důležitý z několika důvodů. Protoporphyrin, obsažený ve vaječné skořápce ovlivňuje vlastnosti skořápky, má vliv na její kryptickou funkci (Wallace, 1889), mechanickou funkci (Gosler et al., 2005), permeabilitu (Higham et Gosler, 2006), aj. Velký význam má také výsledné zbarvení,

způsobené protoporfyrinem na signální funkci vejce, protože toto zbarvení může vypovídat o kvalitě kondice samice (Moreno et Osorno, 2003).

### **3.2. Struktura vaječné skořápky**

Vejce tvoří tři hlavní části: vaječná skořápka, bílek a žloutek. Vaječná skořápka je vápenitý obal ptačího vejce, který se skládá ze tří vrstev, z podskořápečné blány, vlastní skořápky a kutikuly. Vlastní vaječná skořápka je tvořena neflexibilním anorganickým materiálem, jehož základ tvoří krystaly vápníku, které vytváří vnější povrch vejce (Board et Sparks, 1991;). Vlastní vaječná skořápka je dále rozdělena na vnější a vnitřní vrstvu. Obě tyto vrstvy skořápky utváří vlákna táhnoucí se paralelně s povrchem skořápky. Vlákna vnějšího povrchu skořápky jsou kratší a silnější, zatímco vlákna vnitřní strany skořápky jsou delší a tenčí. Externí povrch skořápky může být navíc pokryt doplňkovou vrstvou, tvořenou organickou kutikulou nebo anorganickou vrstvou, kde tato vrstva slouží jako doplňková, ochranná vrstva vejce (Solomon et al., 1997). Vaječná skořápka zastupuje funkci životnosti vejce. V první řadě vaječná skořápka slouží jako médium, skrz které je vedeno teplo a zajišťuje fyzickou ochranu plodu. Vaječná skořápka funguje také jako zásobník vápníkových a hořčnatých iontů, které jsou důležité pro vývin embrya (Bond et al. 1988a). Póry, které jsou ve vaječné skořápce, mají schopnost zajišťovat výměnu plynů mezi vnitřkem vejce a vnějším prostředím (Paganelli et al., 1974). Druhou funkci vaječné skořápky způsobuje její zbarvení. Nejen, že se díky němu vejce v hníždě kamufluje před predátorem (Wallace 1889), ale právě zbarvení může mít vliv na signální funkci, která dává najevo kvalitu kondice samice (Moreno et Orsono 2003), aj.

### **3.3. Význam zbarvení vaječné skořápky**

Variabilita zbarvení vaječné skořápky se velmi liší jak v rámci jedné snůšky, tak mezidruhově (Cassey et al., 2011). Tuto variabilitu můžeme spatřovat v barvě i vzoru vaječné skořápky (Killner, 2006). Proto byly vytvořeny různé druhy hypotéz, které by mohly vysvětlit zbarvení vaječné skořápky a tak objasňovat výslednou variabilitu zbarvení vaječné skořápky.

Jako první navrhnutá hypotéza v historii, týkající se významu zbarvení vaječné skořápky, je hypotéza o kryptické funkci daného zbarvení, hovořící



o tzv. maskování vajec před predátory (Wallace, 1889). Další hypotézy, zkoumající význam zbarvení vaječné skořápky, byly zaměřeny především na to, jak protoporfyrinová depozice na povrchu vaječné skořápky ovlivňuje fyzikální vlastnosti vaječné skořápky. Jednou z prvních hypotéz, zkoumající význam zbarvení vaječné skořápky je hypotéza, zaměřená na vztah zbarvení vaječné skořápky a termoregulační schopnosti vejce. Po ní následovala další významná hypotéza, která se zabývá vztahem mezi protoporfyrinovou pigmentací skvrn a mechanickou funkcí vaječné skořápky (Gosler et al., 2005). V pozdějších letech se vědci zaměřili i na další hypotézy, zkoumající např. vztahy výsledného zbarvení vaječné skořápky na fyzikální či chemické vlastnosti vaječné skořápky, na permeabilní (Higham et Gosler, 2006) a antibakteriální funkci vaječné skořápky (Ishikawa et al., 2010).

### 3.3.1. Kryptická funkce

Kryptické zbarvení u živočichů je tvarové i povrchové uspořádání, které dělá organismus nenápadným vůči jeho prostředí. Primární funkcí tohoto zbarvení je maskování se před predátorem, kdy pro predátora je opticky obtížné identifikovat organismus od jeho prostředí. Ptáci toto zbarvení využívají pro ochranu snůšky před predátory proto, aby vejce měla největší možnou pravděpodobnost přežití. Právě tato teorie byla jako jedna z prvních využita k vysvětlení významu variability zbarvení vaječné skořápky (Wallace, 1889). Wallace (1889) jako první zmínil, že vývojově první vejce byla bílá a další zbarvení a skvrnitost byly adaptací na prostředí a hnízdní strategie. Čistě bílá vejce mají zejména ptáci, které chrání vejce jinak než právě zbarvením. Jde převážně o druhy ptáků, kteří hnízdí v dutinách a v uzavřených hnízdech (Newton, 1893) nebo pečují o hnízda velmi intenzivně a jsou schopny svá vejce aktivně bránit (Wallace, 1889). Predátoři jsou pro ptáky velmi nebezpeční; více než 50% hnízd je zničeno právě predátory a snižují tak reprodukční úspěšnost ptáků (Ricklefs, 1969). Riziko, že vejce budou napadena predátorem, je mnohonásobně vyšší během inkubace plodu než pro samotná vylíhnutá mláďata (Martin et al., 2000). Proto nejdůležitějším faktorem, ovlivňující nalezení hnízda, je jeho umístění (Kelly, 1993). Pravděpodobnost nalezení hnízda predátorem může být výrazně snížena vhodnou volbou lokality hnízda a snášením kryptických vajec (Westmoreland et Kiltie, 1996).

Zbylé druhy ptáků, kteří staví hnízda v otevřených, dobře viditelných prostorech, mají vejce zbarvená hnědě, šedě či zeleně nebo jsou doplněna červeno-hnědými skvrnami (Lack, 1958). Podle některých výzkumů však tato strategie nemá vliv na snížení predace. Této problematice se věnoval i Weidinger (2001), který svůj výzkum zaměřil

na kryptickou funkci vejce a stanovil hypotézu antipredační funkce barevnosti vejce. Zabývá se porovnáváním pravděpodobnosti predace u bílých a uměle zbarvených vajec, která se lidskému oku zdají nenápadná. Právě odlišné vnímání barev lidí a predátorů může vést k nepřesnostem v závěru. Dále Weidinger (2001) prováděl pokus s uměle obarvenými vejci bílé barvy, modré barvy a s vejci hnědě skvrnitými v otevřených hnízdech. Cílem bylo zjistit pravděpodobnost predace u různě barevných vajec. Výsledky predace však u různě zbarvených vajec nebyly dostatečně rozlišné. To může být vysvětleno například tím, že někteří predátoři se orientují spíše čichem než vizuálními projevy nebo umístěním hnízda v lokaci, či přítomností rodičů v hnízdě nebo použitím umělých nápadnějších hnízd (Martin et al., 2000). Zároveň druhy žijící v identických podmínkách, mající otevřená hnízda, mají různě pigmentovaná vejce, což může podle Gótmarka (1992) vést k závěru, že na pigmentaci se podílí především evoluční faktory (Tinbergen et al., 1962; Weidinger, 2001).

### 3.3.2. **Strukturní funkce**

Jak již bylo řečeno, protoporfyrin může plnit mnoho funkcí. Strukturní funkce mluví o vztahu protoporfyrinu, ovlivňující mechanickou strukturu vaječné skořápky. Gosler et al. (2005) zjistili, že tento pigment má schopnost zesílit ztenčená místa skořápky, která jsou způsobená vápníkovým deficitem. Zároveň je potvrzeno, že v místech s větší koncentrací protoporfyrinu, je vaječná skořápka méně pružná a zároveň má větší schopnost zadržovat vodu uvnitř vejce, která je důležitá pro správný vývoj plodu (Gosler et al. 2005; Higham et Gosler, 2006). Dále vědci zjistili, že protoporfyrinové skvrny se na vaječné skořápce více koncentrují v místech, která jsou méně silná. Jsou to světlá místa s nízkou nebo žádnou koncentrací protoporfyrinu. V místech, kdy byla právě pigmentová skvrna tmavší, byla skořápka tenčí. Výzkum byl zaměřen i na pozorování intenzity skvrn. Intenzita rostla s pořadím vajec ve snůšce, ke kterému mohlo dojít díky postupnému vyčerpávání vápníku ze zásob ve vápenných žlázách samice, a právě tento deficit mohl být doplněn a nahrazen pigmentem (Gosler et al., 2005). Tato metoda byla testována především na malých druzích ptáků, např. na sýkoře modřince. Na obdobné metodě výzkumu byly testovány Bulla et al. (2012) čejky chocholaté (*Venellus venellus*). Tento navazující výzkum podpořil výsledky Goslera et al. (2005), zatímco McCormack et Berg (2009), který výzkum prováděl na sojkách ostrovních (*Aphelocoma ultramarina*), došel k jiným výsledkům studie. K různým výsledkům studie mohlo dojít kvůli odlišným testovaným druhům, dále pak také kvůli rozdílným stanovištím,

kde probíhaly výzkumy. Právě McCormack et Berg (2009) testovali strukturní funkci na druhu sojky ostrovní, která obývá velkou škálu rozdílných stanovišť (místo, lišící se v gradientu nadmořské výšky). Kvůli rozdílným nadmořským výškám stanovišť dochází k odlišným koncentracím vápníku obsaženého v půdě, tedy je i odlišná koncentrace vápníku v potravě, kterou sojky přijímají v různých stanovištích (McCormack et Berg, 2009). Jak již bylo popsáno, mohou samice vápníkový deficit nahrazovat depozicí protoporfyrinu do vaječné skořápky, díky kterému dojde k vyztužení zeslabených míst vejce. Právě proto sojky ostrovní, žijící v oblastech, kde je vyšší koncentrace vápníku na stanovištích (než u jiných druhů, testovaných ve studiích např. Goslera et al., 2005; McCormack et Berg, 2009), neprodělávají tak silný vápníkový deficit, a proto nemusí ukládat velké množství protoporfyrinu do vaječné skořápky.

Teorii strukturní funkce tedy nelze obecně uplatňovat na všechny druhy ptáků, protože tato teorie byla testována převážně na malých druzích ptáků a na rozdílných stanovištích výskytu druhů. Větší druhy ptáků umí nedostatek vápníku, získaného převážně z potravy ve svém okolí, vyrovnávat rezervami pocházejících z větších kostí v těle (Dacke et al., 1993), právě proto tedy nemusí ukládat velké množství protoporfyrinu do vaječné skořápky.

### 3.3.3. Permeabilní funkce

Nemalou roli u vaječné skořápky hraje její schopnost zadržovat vodu. Velké množství odpařené vody může zapříčinit špatný vývin plodu nebo dokonce jeho zánik (Rahn et Ar, 1974). Díky tomu se Higham et Gosler (2006), v rámci svého výzkumu, zaměřili na permeabilitu vaječné skořápky, která je ovlivněná protoporfyrinovými skvrnami. Prokázali, že pigmentace má vliv na míru ztráty vody (Mass Loss per Day - MLD) během inkubace plodu. Pokud je použito více pigmentu, projeví se to ve snížení úbytku vody. Tenkost vaječné skořápky kriticky a inverzně ovlivňuje míru permeability vody skrz vaječnou skořápku díky prodloužení difuze vody skrz póry ve vaječné skořápce (Tazawa et Whittow, 2000). To znamená, že čím je tenčí vaječná skořápka, tím více z ní může unikat voda do okolí. V případě, kdy tato tenčí vrstva je pokrytá protoporfyrinem, je radikálně zmenšen úbytek vody skrz tato místa. Zároveň tenkost skořápky ovlivňuje míru ztráty vody během inkubace plodu (Rahn et Ar, 1974). Tmavé protoporfyrinové skvrny mají schopnost odrážet infračervené záření, které zahřívá povrch (Bakken et al., 1978). Díky této vlastnosti by v daných místech, pokrytých pigmentem na povrchu vaječné skořápky, mohla vznikat studenější místa, kde by byl významně snížený výpar vody (Gosler et al., 2005). Dále

byla prokázána pozitivní korelace mezi tloušťkou vaječné skořápky a obsahem vypařené vody právě u divokých sýkor koňader, z čehož vyplývá, že čím více je silnější vaječná skořápka, tím méně dochází k výparu vody z vejce do okolního prostředí. Zároveň ve výzkumu Highema et Goslera (2006) bylo poukázáno na fakt, že samice musí vhodně situovat postavení hnízda a správně pečovat o snůšku, protože pigment sloužící k zabránění výparu vody musí být správně vystaven světelnému záření.

Z výsledků studií tedy vyplývá, že čím více protoporfirinu je obsaženo ve vaječné skořápce a zároveň je vejce ideálně situováno v hnízdě, tím je docíleno nejmenšího možného výparu vody z vejce do vnějšího okolí (Higham et Gosler, 2006). Zároveň tento fakt by teoreticky mohl být spojen i se strukturální funkcí protoporfyrinu. Jelikož vyšší koncentrace protoporfyrinu je pozorována v tenčích místech vaječné skořápky (viz kapitola 3.3.2), kde tato zvýšená koncentrace slouží k jejímu vyztužení (Gosler et al., 2005), může tato zvýšená koncentrace pigmentu v tenčích místech skořápky fungovat jako inhibitor, který slouží k zabraňování úniku vody z vejce do okolí v tenčích místech vaječné skořápky, kde je prokázáno, že v těchto místech dochází k vyššímu úbytku vody.

#### **3.3.4. Termoregulační funkce**

Bakken et al. (1978) se zabývali termoregulační funkcí skořápky, tedy tím, jak protoporfyrinová i biliverdinová pigmentace ovlivňuje schopnost termoregulace vejce. Vycházeli z faktu Montevecchiho (1976), že u otevřeně hnízdících druhů může dojít k přehřátí vejce. Podle něho může být výsledný rozdíl teploty povrchu vejce až 3°C (Montevecchi, 1976). Montevecchi (1976) tvrdí, že i různě zbarvená vejce mají stejnou spektrální odrazivost, tudíž nedojde k velkému úniku tepla či naopak k přehřátí vejce jak u méně tak u více zbarvených vajec. Montevecchi (1976) manipuloval s vejci uměle obarvenými (nikoliv s vejci přirozenými) a to by mohlo mít vliv na výsledný rozdíl teploty povrchu vejce. Bakken et al. (1978) zjistili, že i různě zbarvená vejce mají stejnou spektrální odrazivost, která je natolik vysoká, že vejce mohou být vystaveny přímému slunečnímu záření až na dobu 36 minut, aniž by došlo k poškození plodu. Z toho vyplývá, že spektrální odrazivost je faktor, ovlivňující teplotu uvnitř vejce. Dále může protoporfyrin ovlivňovat termoregulaci vejce (Bakken et al., 1978).

Různé výsledky mohou být způsobeny použitím rozdílných metodických postupů, například zkoumáním laboratorních nebo přírodních vajec a barviv. Bakken

et al. (1978) na rozdíl od Montavecchiho et al. (1976) pracoval nejen s měřením povrchového rozdílu teplot, ale i se spektrální odrazivostí vajec, a právě proto mohli dojít k rozdílným výsledkům studie.

### 3.3.5. Antibakteriální funkce

Pigmenty obsažené ve vaječné skořápce jsou převážně porfyriny, které jsou často používány při léčbě nádorového bujení a hubení patogenů pomocí fotosensitizerů. Fotosensitizer je látka, která se aktivuje světlem (Dolmans et al., 2003; Ishikawa et al. 2010). Ishikawa et al. (2010) vytvořili experiment, mající za úkol zjistit antibakteriální funkci porfyrinů ve vejcích. Tato látka se nechává akumulovat do škodlivých (rakovinotvorných) buněk, kdy po ozáření vhodným spektrem světla přechází do excitovaných stavů a po dalších reakcích s molekulárním kyslíkem vzniká singletový kyslík. Tento typ kyslíku je vysoce reaktivní a narušuje membrány nechtěných buněk (Kriska et al., 1995). Na vejcích kuru domácího (hnědých, zelených a bílých vejcích) byly ponechány bakterie v kontaktu s pigmenty po dobu působení 30 minut a následně osvětleny. K tomu byly použity dva typy bakterií, gram-pozitivní (zastoupeny *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) a gram-negativní bakterie (*Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*). Po osvětlení bylo zjištěno, že téměř všechny gram-pozitivní bakterie byly zničeny, zatímco gram-negativní bakterie přeživaly. Nejvíce přeživších bakterií zůstalo na bílých vejcích, méně na zelených vejcích a nejméně na vejcích hnědých. Důvody těchto různorodých výsledků nebyly dále vysvětleny (Ishikawa et al., 2010). Ishikawa et al. (2010) navrhli, že pravděpodobně přírodní pigmenty, jako je právě protoporfyrin a biliverdin, používané při léčbě nádorového bujení, se původně vyvinuly pro podporu obranyschopnosti jedince (Ishikawa et al., 2010). Dále Mayes et Takeballi (1983) přišli ve svém výzkumu na to, že bakterie nacházejících se na povrchu vajec jsou právě ze skupiny gram-pozitivních bakterií, z čehož vyplývá, že vaječné pigmenty a především pak protoporfyrin, při vhodném ozáření, mohou mít vliv na antibakteriální schopnost vaječné skořápky a nechtěné bakterie tak likvidovat.

### 3.3.6. Hnízdní parazitismus a mimetická vejce

Hnízdní parazitismus je alternativní způsob rozmnožování, rozšířený u mnoha skupin ptáků (Davies, 2000), zároveň byl pozorován i u jiných druhů zvířat, např. u ryb, obojživelníků nebo hmyzu. Parazitické samice často snášejí svá vejce do cizího,

hostitelského hnízda a vůbec se nepodílejí na inkubaci ani na rodičovské péči mláděte, čímž se osvobozují od vlastního energetického výdeje (Davies 2000). Rozlišujeme dva hlavní druhy parazitizmu, parazitismus interspesifický a intraspecifický. Interspesifický charakterizuje využívání samic jednoho druhu pro mláďata samic jiného druhu. Při intraspecifickém parazitizmu dochází k parazitizmu v rámci jednoho druhu. Dále je možné parazitismus dělit na obligátní a fakultativní. Obligátní způsob je pro daný druh jediný možný způsob reprodukce, protože jedinci již nejsou schopni stavět vlastní hnízda, typickým příkladem je kukačka obecná (*Cuculus canorus*) (Volf et Horák, 2007). Fakultativní způsob spočívá ve využívání příležitostného parazitizmu, někdy i v rámci vlastního hnízda. Pro ptáky z hlediska dlouhého časového úseku bylo přínosné měnit zbarvení vajec. Díky tomu je pro hostitelskou samici snazší rozpoznat vlastní nebo parazitické vejce (Davies, 2000). Parazitické samice se snaží zlepšit v produkci mimetických vajec. Jsou to taková vejce, která se nejvíce podobají vejci hostitelské samice a nejsou jí rozpoznána (Welbergen et al., 2001). Hostitelské samice mohou na mimetická vejce reagovat dvěma způsoby. Zaprvé mohou snížit vnitrosněškovou variabilitu za současného zvýšení mezisněškové variability tak, aby bylo možné vejce rozpoznat okamžitě a následně je ze snůšky odstranit (Davies, 2000), nebo snášet všechna vejce téměř identická, aby jakékoliv jinak vypadající vejce mohlo být z hnízda odstraněno (Lovász et Moskát, 2004). Typicky parazitickou samicí je kukačka obecná, která snáší vejce pouze jednoho typu. Proto je pro ni důležité vybírat si správný druh hostitelů (Gibb et al., 2000). Hypotéza variabilnějšího zbarvení vaječné skořápky a větší investice samic do kvalitnějšího zbarvení je použitelná pouze u druhů, které parazitizmu podléhají. Právě proto nemůže být použita v obecném měřítku (Kratochvílová, 2014).

### **3.4. Signální funkce**

Nejvýraznějším charakterem ptačích vajec je jejich barevnost a pigmentace, skládající se z tmavých protoporfirinových skvrn nebo modro-zeleného zbarvení (Cassey et al, 2011). Různorodé zbarvení vajec může mít různé vysvětlení, vycházející z hypotézy o signální funkci. Tato poměrně nová hypotéza navrhuje, že zbarvení vajec a variabilita zbarvení by mohla sloužit jako specifický kód, který slouží k přenosu informací, které si ptáci předávají v době hnízdění (Moreno et Osorno, 2003). Z počátku tato hypotéza byla aplikována na modrozelená vejce a předpokládalo se, že samice s modro-zeleným zbarvením vajec ukazují svou

fenotypickou kvalitu samcům skrze usazení antioxidantu biliverdinu jako pigmentu (Campbell et Ellis, 2007). Tak může být pigment vyjádřením kondice samic nebo může sloužit jako genetická vazba mezi barvou vaječné skořápky a kondicí samice (Moreno et al., 2006). Na toto navázala řada výzkumů, která se zaměřila i na protoporfyrin.

#### 3.4.1. Signální funkce a biliverdin

Morono et Osorno (2003) jako první navrhli experiment, pracující s teorií signální funkce, založené na tom, že samice prostřednictvím zbarvení vajec dávají najevo svou kvalitu kondice. Moreno et Osorno (2003) pracovali s vejci modro-zeleného zbarvení. Hypotéza o signální funkci vychází z Darwinovi teorie pohlavního výběru, kde výrazné zbarvení (v tomto případě vajec) je považováno za prostředek selekce. Hypotéza o signální funkci je také spojována s teorií handicapu, poukazující na nákladné ukládání biliverdinu (antioxidantu) samic do vajec (Zahavi, 1975). Ta má tak méně prostředků (antioxidantů), pomáhající se jí vyrovnat s oxidativním stresem během kladení vajec. Oxidativní stres je vyvolán zvýšenou koncentrací progesteronu v krvi snášející samice (Hammond et al., 1980) a má za následek snížení enzymatické antioxidační obrany organismu (Dabrosin et al., 1998; Wassmann et al., 2005). Díky tomuto stavu se v organismu zvyšuje poptávka po antioxidačních látkách, které regulují oxidační stres (McGraw, 2005). Proto ukládání biliverdinu do vaječné skořápky omezuje množství možných použitelných antioxidantů pro vlastní fyziologickou obranu organismu (Moreno et Osorno, 2003). Přesto depozice biliverdinu do vaječné skořápky může být pro samici výhodná, jelikož určitá koncentrace pigmentu ve vaječné skořápce může informovat partnera o tom, že samice je schopná se vyrovnat se ztrátou vlastních antioxidantů (Zahavi, 1975) a tím zároveň samice poukazuje na svou vyšší fyzickou zdatnost (Moreno et Osorno, 2003). Samice tímto projevem dává najevo svůj handicap a ukazuje, že je schopná vyrovnávat se s úbytkem antioxidantu na úkor lepšího zbarvení vajec (Moreno et Osorno, 2003).

Při zpracovávání dat a výsledků výše popsaných studií nebyly zohledněny vedlejší faktory, které by mohly mít vliv na konečné výstupy. Mezi tyto faktory patří světelné podmínky hnízda, kontrast v hnízdě (kontrast zbarvení a zbarvení stavebního materiálu hnízda) a percepční schopnosti jedince, vnímající jinou škálu záření, než umožňuje lidský zrak (Endler, 1990).

Tato teorie byla testována u pigmentu biliverdinu u lejska černohlavého (Moreno et al., 2006b) a špačka černého (López-Rull et al., 2008), kde byla prokázána pozitivní

korelace mezi intenzitou modrozeleného zbarvení vaječné skořápky a koncentrací biliverdinu v krvi. Dále také Siefferman et al. (2006) prokázal u salašníka modrého (*Sialia sialis*), že starší samice a samice v lepší kondici snášely intenzivněji pigmentovaná vejce. Hanley et al. (2008) přispěli k pozitivnímu nálezu týkající se signální hypotézy u drozdce černo hlavého. Prokázali, že samice s větší antioxidační kapacitou snášely intenzivněji zbarvená vejce (Hanley et al., 2008). Naopak u jiných druhů nebyla prokázána žádná souvislost mezi koncentrací biliverdinu a zbarvením vaječné skořápky, jako např. u kosa černého či drozda zpěvného (Cassey et al., 2012). Hargitai et al. (2008) také neprokázali žádné signifikantní závislosti mezi tělesnými znaky kondice samic (délka tarsu, hematokrit) a zbarvením vaječné skořápky.

### 3.4.2. Signální funkce a protoporfyrin

Na výsledky hypotézy, týkající se signální funkce u modro-zeleného zbarvení, navazovaly další výzkumy, týkající se signální funkce s rozšířením na protoporfyrinovou pigmentaci.

Stejně jako biliverdin, tak i protoporfyrin, zastupuje v těle jinou funkci než funkci pigmentu, ovlivňující skvrnitost vaječné skořápky (Cambell et Ellis, 2007). Změna hladiny protoporfyrinu může výrazně ovlivnit samici během období hnízdění (Moreno et Osorno, 2003). Protoporfyrin je metabolit, který je vyplavován z krve a ve větší koncentraci může způsobovat oxidativní stres v těle samice (Dabrosin, 1998). Zvyšující se koncentrace progesteronu v krvi snášející samice ovlivňuje produkci protoporfyrinu (Soh et Koga, 1994). Zvýšená hladina protoporfyrinu v krvi má za následek aktivaci antioxidačních enzymů, které napravují poškození organismu způsobené oxidačním stresem (Afonso et al., 1999). Kvůli depozici protoporfyrinu (prooxidantu) do vaječné skořápky, dochází v krvi samice ke zvýšení koncentrace antioxidantů, které působí proti škodlivým prooxidantům (Moreno et Osorno, 2003). Intenzivnější koncentrace protoporfyrinu uloženého ve vaječné skořápce, stejně jako u biliverdinu, signalizuje samcům vyšší kondici samice (Moreno et Osorno, 2003).

Moreno et Osorno (2003) navrhli tři hypotézy, jak se může skvrnitost vztahovat ke kondičním znakům samic. Velká protoporfyrinová skvrnitost může naznačovat dvě možnosti zvýšené kvality kondice samice. V prvním případě může vyšší protoporfyrinová pigmentace reflektovat vyšší cirkulaci prooxidantů v krvi (Cambell et Ellis, 2007). Tato zvýšená hladina prooxidantů může indikovat zvýšenou hladinu



antioxidantů v krvi (látky ničící škodlivý protoporfyrin), reagující na oxidativní stres samice, s kterým je samice schopná se vypořádat a ukazuje tak na svou lepší kondici. Za druhé, vyšší depozice protoporfyrinu do vaječné skořápky může naznačovat schopnost samice vhodně odstraňovat škodlivý protoporfyrin do vaječné skořápky, který by se jinak akumuloval v krvi a odkazuje opět na svou lepší kondici. Za třetí, v opačném případě nízká protoporfyrinová skvrnitost může reflektovat vysokou cirkulaci protoporfyrinu v krvi jako neschopnost antioxidantního systému efektivně odstraňovat tento škodlivý metabolit a naznačovat tak nízkou kondici samice (Moreno et Osorno, 2003). Tyto hypotézy, v kombinaci s fakty, že pigmentace vaječné skořápky se liší v rámci druhu, naznačují predikci, jak se může protoporfyrinová pigmentace vztahovat ke kondici samice (negativně i pozitivně).

Podle metodiky Goslera et al. (2005) se pigmentové skvrny na povrchu vaječné skořápky vyjadřují dvěma hlavními komponenty, PC1 a PC2. PC1 zastupuje intenzitu barevných skvrn a PC2 vyjadřuje distribuci skvrn na povrchu vejce (viz kapitola 3.6). Komponenty mají rozlišné vlastnosti, proto v souvislosti s touto hypotézou byly testovány odděleně (Gosler et al., 2005). Gosler et al. (2012) potvrdili, že v rámci snůšek, tmavosti pigmentace a rozmístění pigmentace (intenzita, rozložení a velikost skvrny) vzrůstá v pořadí kladení vajec. Pro intenzivně zastoupený pigment bylo dokázáno, že u velkých samic (druh *Parus major*) a samic prokazujících vysokou vrozenou imunitu, v rámci snůšky variabilita tmavého pigmentu pozitivně koreluje jak s fyziologickými tak s kondičními rysy samice. Na rozdíl od intenzity pigmentace u rozmístění a velikostí skvrn pigmentu, nebyly nalezeny žádné vztahy mezi rozmístěním a velikostí pigmentu a velikostí těla samice, věkem samice, tělesnou kondicí a ani její vrozenou imunitou (De Coster et al., 2013).

Pozitivní vztah k signální hypotéze potvrdili Sanz et García-Navas (2009), když prováděli výzkum vztahující se právě k hypotéze na sýkorách modřinkách a zjistili, že intenzita skvrn pozitivně koreluje s délkou tarsu samic. Sanz et García-Navas (2009) dále vyzkoumali, že rovnoměrná distribuce skvrn u sýkory modřinky ukazuje na životaschopnost snůšky. Jestliže protoporfyrinové skvrny byly pravidelně agregovány na povrchu vejce, byla prokázána větší tloušťka vaječné skořápky, kratší doba inkubace, nižší ztráty vody (MLD), vyšší úspěšnost přežití snůšky a delší velikost tarsů vylíhnutých mláďat, což teoreticky může indikovat lepší fyziologickou kvalitu mláďat. Byla nalezena i pozitivní korelace při rovnoměrné agregaci pigmentových skvrn a samcovou aktivitou, týkající se krmení vylíhnutých mláďat. Jeho aktivita byla měřena během pozorování četnosti návštěvnosti hnízda (Sanz et Gascía-Navaz, 2009). Naopak inverzní nálezy vyzoroval

Martínez de la-Puente et al. (2007), kteří zjistili, že fyziologicky zdatnější samice sýkory modřinky kladly daleko méně intenzivně skvrnitá vejce než samice méně zdatné. S dalším nálezem přispěli i Stoddard et al. (2012), kdy při studii pozorovali charakter pigmentace v závislosti na hmotnosti samice a následné kondici vylíhlých mláďat. V případě sýkory koňadry zjistili, že nižší skvrnitost byla zaznamenána u těžších samic, ale charakter zbarvení nijak neovlivnil kondici mláďat (Stoddard et al., 2012). V případě výzkumu De Costera et al. (2012, 2013) bylo zjištěno, že v rámci snůšek sýkory koňadry exponenciálně vzrůstá tmavost pigmentace a rozmístění pigmentace (intenzita, rozložení a velikost skvrny) v závislosti na pořadí kladení vajec. Tato vnitrosnůšková variabilita má vliv nejen na energetické ztráty samice při procesu kladení vajec, oxidativní stres samice a teoreticky i na anemický stav samice, ale ovlivňuje výsledný pigment, strukturu, permeabilitu a jiné funkce skořápky (Sanz et Gascía-Navaz, 2009; De Coster et al. (2012, 2013).

Hargitai et al. (2016) zkoumali vztah koncentrace obsaženého protoporfyrinu ve vaječné skořápce a tělesné kondice samic vyjádřené jako velikost tarsu, velikost snůšky a pigmentace karotenoidního peří. Dále zkoumali vztah mezi koncentrací protoporfyrinu ve vaječné skořápce a oxidativním statutem samic a obsahem lymfocytů v krvi. Koncentraci protoporfyrinu obsaženého ve vaječné skořápce stanovili pomocí spektrofotometru. Oxidativní stres stanovili ze vzorku odebrané plasmy a obsah lymfocytů z krevního vzorku. Výsledky výzkumu potvrdili, že samice snáší více pigmentovaná vejce, mají-li vyšší obsah lymfocytů v krvi. Dále potvrdili, že vyšší koncentrace protoporfyrinu pozitivně koreluje s intenzitou skvrn, velikostí skvrn a procentuálním pokrytím skvrn na povrchu vejce. Dále Hargitai et al. (2016) vyzkoumali, že vyšší obsah lymfocytů v krvi samice může signalizovat výskyt hematofágních parazitů. Na to navázali hypotézou, že čím větší je obsah lymfocytů v krvi, tím je vyšší variabilita ve zbarvení vaječné skořápky, která může odrážet lepší schopnost jedince vypořádat se s infekcí. Dále vědci prokázali, že samice se světleji zbarveným karotenoidním peřím měly vyšší obsah protoporfyrinu ve vaječné skořápce a navrhli, že tento jev může být způsoben díky nutričnímu stresu či hemoparazitické infekci (Zahavi, 1975). Z výsledků výzkumu Hergitai et al. (2016) nedokázali objasnit vztah koncentrace protoporfyrinu a BMI faktorů samice (délka tarsu, velikost snůšky, aj.) ani vztah oxidativního stresu a vzoru skvrnitosti na vaječné skořápce.

Z dostupných výsledků dosavadních studií a na sobě nezávislých výzkumů různých druhů ptáků, bylo zaměřeno pouze málo hypotéz na vztah signální funkce a pigmentu protoporfyrinu (n = 5), (viz příloha č. 6). Pro přehlednější výstupy hypotéz týkající

se signální funkce byla vytvořena tabulka (příloha č. 6), obsahující průlomové články, týkající se signální funkce a biliverdinu (n = 7) a dále všechny nalezené články o signální funkci zaměřené na protoporfyrinovou pigmentaci (n = 5). Tyto práce byly vyhledávány pomocí serverů Bio One, Elsevier, PLoS Biology, Science Direct a Web of Knowledge. 80 % studií (n = 4), která zkoumala protoporfyrinovou pigmentaci, byla zaměřena na pěvce. 67% studií (n = 8) potvrdila (ať už pozitivní nebo negativní) korelaci intenzity skvrnitosti vajec a kondičními znaky samic. Další práce, které sice nepotvrdily tuto korelaci, přišli na další rozšíření teorie (n = 3). Hornsby et al. (2013) sice neprokázali vztah mezi skvrnitostí vajec a kondicí samic, ale zjistili pozitivní korelaci mezi skvrnitostí a kondicí mláďat. Hargitai et al. (2016) sice nepotvrdili závislost celkové koncentrace protoporfyrinu ve vejci, avšak zjistili závislost celkové koncentrace protoporfyrinu obsaženého ve vaječné skořápce a intenzitou skvrnitosti. Z jiných výsledků (např. Stoddard et al., 2012; Sanz et García Navas, 2009) je intenzita skvrn pozitivně či negativně korelována s tělesnými znaky samice. Tudíž celková koncentrace obsažená ve vaječné skořápce může i nemusí mít vztah i ke kondičním znakům samice. K objasnění této závislosti by bylo vhodné použít stejné metodologické postupy. Hargitai et al. (2016) použili k zjištění koncentrace protoporfyrinu spektrofotometrickou metodu, Stoddard et al. (2012) a Sanz et García Navas, (2009) použili jednoduchou optickou metodu k zjištění intenzity skvrn. Dále by bylo vhodné testovat tuto závislost na stejném druhu v různých stanovištích. Bulla et al. (2012) dále navrhli, že obsah vápníku na stanovišti může mít také vliv na výsledné zbarvení vaječné skořápky. Jedinci na různých stanovištích měly rozdílný přísun vápníku v potravě, tudíž samice, které měly větší obsah vápníku v potravě, měly méně intenzivně zbarvená vejce. To mohlo být způsobeno tím, že větší obsah vápníku z potravy byl vhodně využitý do vaječné skořápky, proto skořápka byla pevnější a samice nemusely tenkost skořápky vyztužit protoporfyrinem, a proto mohla být intenzita zbarvení vajec nižší.

Z celkových výsledků studií lze usoudit, že protoporfyrinová pigmentace vajec vykazuje (pozitivní i negativní) vztah s kondicí samice a snůšky, nemusí však být dále využívána jako kód pro přenos informací pro samce, uplatňovaný během období hnízdění.

### **3.5. Anemická hypotéza**

Anemická hypotéza je relativně nová dodatková hypotéza, která slouží k vysvětlení variability zbarvení vaječné skořápky (Gosler et al. 2005, De Coster et al, 2012).

Anémie je stav organismu, kdy je porušena tvorba erytrocytů nebo se projevuje jejich nadměrným zánikem. Anémie u samic ptáků může být vyvolána zvýšenou hladinou estrogenu v krvi, která snižuje tvorbu erytrocytů (Williams et al., 2004, Wagner et al., 2008) a zároveň může být vyvolána nutričním stresem spojeným s reprodukčním úsilím během hnízdění (Jones, 1983) nebo parazitismem (De Coster et al., 2012). Protoporfyrin je metabolit, který je vyplavován z krve (Kennedy et Vevers, 1973). Na základě tohoto faktu navrhli De Coster et al. (2012) hypotézu o vztahu mezi zbarvením vaječné skořápky a anémií. Větší zbarvení vaječné skořápky je očekáváno v důsledku vyplavování protoporfyrinu při zvýšené tvorbě krve (Campbell et Ellis, 2007). Campbell a Ellis (2007) prokázali, že ptáci jsou anemičtí díky zvýšené hladině estrogenu při sníženém počtu červených krvinek během kladení vajec. Vysoký obsah estrogenu totiž může působit nejen dočasné potlačení produkce červených krvinek, ale zároveň může řídit produkci vajec s výsledkem sníženého obsahu žloutku (Campbell et Ellis, 2007). Jelikož je protoporfyrin meziprodukt při biosyntéze krve (Kennedy et Vevers, 1973), předpokládá se, že jeho hladina se bude měnit i se stadiem anémie. Z toho vyplývá, že na základě stádia anémie bude i jiná depozice pigmentu do skořápek a pigment bude různě variabilní (De Coster et al., 2012). V rané fázi anémie má samice ještě relativně velký obsah červených krvinek než v pozdější fázi anémie a zároveň vyšší koncentraci volného protoporfyrinu v krvi. Proto je očekávána větší intenzita zbarvení vaječné skořápky (De Coster et al., 2012). S postupující anémií dochází k redukci krve a v závislosti na tom klesá celkový počet poškozených nebo stárnoucích erytrocytů v krvi (Kennedy et Vevers, 1973). Z těchto krvinek se derivuje protoporfyrin. Menší obsah červených krvinek se projevuje v menší koncentraci protoporfyrinu v krvi a v důsledku toho se očekává menší pigmentace vaječné skořápky (De Coster, et al., 2012). De Coster et al. (2013) tedy udělali experiment, kdy manipulovali s anémií u belgické populace sýkory koňadry tak, že záměrně zamořili polovinu hnízd hematofágním parazitem (*Ceratophyllus gallinae*). Tím zajistili dosažení anémie u poloviny jedinců. Po dokončení snůšky byly odebrány vzorky krve samic a hnízda byla převezena do laboratoře k testování. Imaturní červené krvinky byly vyjádřeny v procentu nezralých červených krvinek ke všem červeným krvinkám jako míra tvorby produkce krvinek. Tento poměr pozitivně koreloval s četností parazitů u samic. Zvýšení parazitů potvrzuje, že samice sýkor si prošly silnější anémií, pokud byly postiženy hematofágním parazitem během kladení vajec. Intenzita pigmentových skvrn se výrazně zvyšovala s pořadím vajec ve snůšce, to bylo prokázáno pouze u těch samic, u kterých bylo hnízdo zamořené menším počtem parazitů. Méně intenzivní pigmentaci zaznamenali u samic, jejichž hnízdo bylo zamořeno větším počtem

hematofágů a odůvodňují to tvrzením, že samice díky velké ztrátě krve, způsobené hematofágním parazitem, nemají dostatečné množství zdrojového protoporfyrinu obsaženého v krvi, který by se mohl ukládat do vaječné skořápky. Tento výsledek naznačuje, že anémie u samic během sání krve parazitem vedla ke snížení depozice protoporfirinu do vaječné skořápky, pokud jejich hnízda byla napadena menším množstvím parazitů a naopak (De Coster et al., 2012).

### **3.6. Metodika měření zbarvení vaječné skořápky protoporfyrinu**

Základní metody pro kvantifikaci protoporfirinu byly v minulosti několikrát publikovány (Lack 1958, Perrins 1981, Gosler 1993). Nejčastěji se používá vizuální optická metoda dle Goslera et al. (2005)., kdy pro měření jednotlivých skvrn jsou stanoveny tři jednotlivé faktory: intenzita (intensity – I), rozložení (distribution – D) a velikost skvrny (Spot-size – S).

Podkladová barva u vajec se měří pomocí spektrofotometru. Měřicí sonda tohoto zařízení se přikládá k vejci pod úhlem 90° ve vzdálenosti 2 mm na náhodně vybrané místo mimo protoporfyrinové skvrny (Holveck et al., 2012). Parametry skvrnitosti (I, D, S) se získávají ze standardních digitálních snímků pomocí analýzy z prostředí softwarů typu Photoshop CS5 apod. Procentuální zastoupení skvrn na povrchu vaječné skořápky je možné získat pomocí analýzy (např. v softwaru Image J) (Špatenková, 2014).

U výše popsané metodiky je vhodné, aby celé hodnocení prováděl jeden člověk a tím došlo k zabránění v nepřesnostech v datech. Každý člověk má jiné percepční schopnosti a subjektivní pocity, díky kterým může skvrny zařadit do jiné kategorie než jiná osoba. Zároveň při vyhodnocování by měly být po celou dobu zachovány stejné světelné podmínky tak, aby nedošlo ke zkreslení. V případě, že jsou v datech obsažena čistě bílá vejce, měla by být z datového souboru vyřazena, protože u nich nelze stanovit parametry I, D, S (Kratochvílová, 2014).

Výsledná data můžeme zpracovávat několika způsoby. První je popis a rozdělení do kategorií zbarvení jako I (intenzita), D (distribuce), S (jas) nebo jsou data zpracována analýzou hlavních komponent (Principal Component Analysis, dále jen PCA). Hlavní komponenta (PC1) vysvětluje největší procento variability zbarvení a je používána nejčastěji pro jas. Druhá komponenta (PC2) vysvětluje podstatně menší variabilitu a je používána většinou pro vyjádření parametrů odstínu a sytosti

(Cherry et Bennett, 2001).

Výše popsaná metodika podle Goslera (1993) byla převzata a použita v dalších pracích, např. v práci Bruleza et al. 2014. Ti sice uznávají, že tato metoda může být finančně i technologicky náročná, ale také tvrdí, že i jiné optické metody jsou dostačující. Vychází z faktu, že i když na vejci nejsou viditelné skvrny, neznamená to, že vaječná skořápka neobsahuje žádný protoporfirin (Kennedy et Vevers 1973). Z toho Brulez et al. (2014) vyvodili, že existuje rozdíl mezi celkovým množstvím obsaženého protoporfyrinu a množstvím protoporfyrinu, které je zjištěné pouze z pozorovaných skvrn. Rozdílnost analýz prováděli na vejcích sýkory koňadry (*Parus major*) a sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*). Pigmentace byla měřena třemi různými metodami: přímou chemickou analýzou, vizuální optickou metodou a pixelovou optickou metodou. Přímá chemická analýza byla provedena na základě metodiky podle Mišika et al. (1996), kdy skořápky byly ponechány působení metanolu a 5% kyseliny sírové. Výsledný roztok byl zneutralizován. Dále byly odpařeny přebývající složky, extrakt byl rozředěn a změřen pomocí HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Výsledné celkové množství obsaženého protoporfirinu bylo vyjádřeno v  $\mu\text{g}$  a zároveň i v koncentraci na jeden gram skořápky, tj.  $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Další použitou metodou byla vizuální optická metoda, která pracuje s viditelnými skvrnami podle metodiky Goslera et al. (2005), založena na stanovení hlavních komponent. Poslední metodou byla pixelová optická metoda (Pixel Pigment Scoring Method, dále jen PPSM). Tato metoda byla již dříve používána např. Stoddardem et al. (2012). Jedná se o detailní optickou analýzu, která pracuje s digitálními fotografiemi vajec. Ve speciálním počítačovém softwaru je stanoven práh, který určuje, kdy se odstíny barvy nachází v oblasti podkladové barvy nebo už budou považovány za projev pigmentace. Výsledné hodnoty měření pomocí optických metod byly porovnány s přímou chemickou analýzou. Z výsledků vyplynulo, že existuje korelace mezi optickými metodami (jak s vizuální optickou metodou, tak s pixelovou optickou metodou) a metodou chemickou. Dále bylo prokázáno, že pixelová optická metoda (PPSM) je silnější metoda než klasická optická metoda (Brulez et al., 2014).

## 4. Praktická část

### 4.1. Úvod

Cílem této části práce je zjištění vztahu mezi skvrnitostí (určenou parametry H, S, B barvy a procentuální skvrnitostí) vaječné skořápky a tělesnou kondicí u samic druhu sýkora koňadra (*Parus major*). Parametry barvy odstín (H), sytost (S), jas (B) a procentuální skvrnitost jsou použity pro vyjádření charakteru barvy skvrn. Jako vhodné faktory odrážející kondici samice byly zvoleny index erytrocytů (poměr imaturních erytrocytů k celkovému počtu všech erytrocytů), délka tarsu (mm), standardizovaná hmotnost ( $\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$ ), plocha břišního melaninového pruhu ( $\text{mm}^2$ ), velikost snůšky, karotenoidní ornament (chroma pro spektrum vlnových délek s reflektancí žlutých karotenoidů –  $R_{450}$  –  $R_{700}$ ). Vztahy mezi těmito faktory a tělesnými znaky samic nebyly analyzovány, jelikož by testování bylo nad rámec této bakalářské práce.

Parametry barvy (H, S, B) a procentuální skvrnitost byly analyzovány pomocí pixelové optické metody. Parametry tělesné kondice samic byly získány již v terénu pomocí jednoduchých metrických zařízení a index erytrocytů získán z krevních nátěrů. Metodický postup se nelišil od předchozích studií vědeckých pracovníků (tohoto týmu), více o sběru dat v terénu a metodice měření parametrů barvy v diplomové práci Špatenkové (2014).

### 4.2. Studovaný druh

Sýkora koňadra (*Parus major*) je druh pěvce z čeledi sýkorovitý. Sýkora koňadra je největší a nejtěžší evropská sýkora. Je velká 13,5 – 15 cm a váží asi 20 gramů. Její původní areál rozšíření je mezi Irskem až Kamčatkou, dále sahá až do jihovýchodní Asie, Malajsie a Indonésie. V České republice se vyskytuje ve všech výškových zonacích i v pásmu kleče (Hudec et al., 1995).

Sýkora koňadra je typická svým ornamentem, který je na ventrální žluté části těla tvořen černým pruhem. Má modročernou hlavu s bílými skvrnami v oblasti tváří, mechově nazelenalou dorzální stranu a modrošedá křídla s bílými pásky. Samec, na rozdíl od samice, má sytější žlutou stranu těla a širší černý pruh, který uprostřed břicha tvoří černou skvrnu (Hudec et al., 1995).

Sýkora koňadra je velice přizpůsobivý druh, a proto je možné ji najít téměř všude. Jedná se o druh hnízdící v dutinách či dírách, díky své flexibilitě ji můžeme nalézt hnízdit i na netypických místech (např. v hromadě dříví, v kovových trubkách, starých hnízdech). Tento druh hnízdí jednotlivě, teritoriálně a monogamně. Samice si vybírá samce především podle ornamentu. Páry se vytvářejí většinou nově po rozpadu zimních hejn. Hnízdo samice vystylá převážně mechem a jinými rostlinami, občas používá i peří. Délka stavění hnízda trvá 2 až 6 dnů, v případě prvního hnízdění může trvat až 20 dnů. Sýkora hnízdí běžně dvakrát do roka v období od dubna do července. Velikost snůšky mívá 7 až 12 vajec o velikost 17,5 mm na 13,5 mm a hmotnosti okolo 1,5 gramu. Velikost vajec závisí na množství potravy, na době hnízdění či stáří a na vitalitě samice. Vejce mohou být kladena každý den nebo v jiné frekvenci, např. 3 vejce za dva dny, může docházet i k jednodenní pauze. Délka sezení na vejcích se pohybuje mezi 12 a 17 dny, kdy na vejcích sedí pouze samice a samec ji krmí. Mláďata se líhnou zhruba 1 až 3 dny a jsou krmena oběma rodiči, hnízdo opouštějí po 14 až 23 dnech (Figura, 2013).

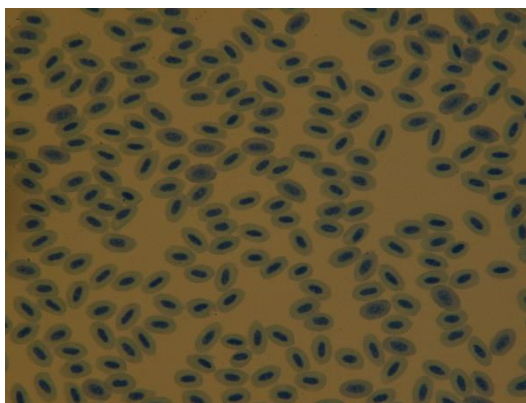
### **4.3. Metodika**

Sběr použitých dat probíhal v lokalitě Čimický-Ďáblický háj v Praze – Kobylisích (50°8'10.591'' N, 14°27'51.144'' E) o celkové rozloze obou lokalit 0,82 km<sup>2</sup>. Data mi byla poskytnuta členy vědeckého týmu a jsou použita ze sběru v roce 2012. Úkolem praktického zpracování dat bylo vyhodnotit krevní nátěry samic sýkory koňadry (*Parus major*) a vytvořit data set pro následné statistické vyhodnocení.

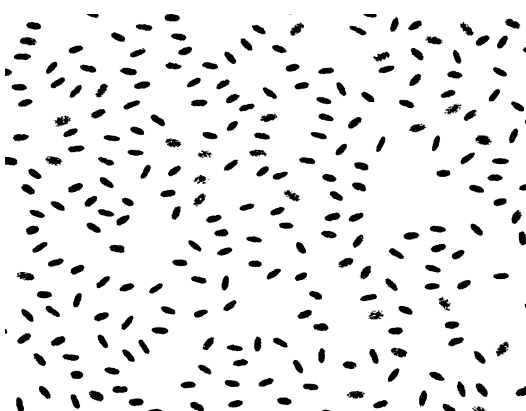
#### **4.3.1. Analýza erytrocytů**

Z krevních nátěrů se fotily fotografie digitální kamerou (Olympus UI-1540-C) pod mikroskopem (Olympus CX41 s fázovým kontrastem) s imerzním objektivem a 100x zvětšením. Pro každého jedince bylo vytvořeno 5 fotografií z jednoho krevního nátěru. Následně byly fotografie upraveny na 1-bit black and white raster s rozlišením 80 dpi v programu Corel Photo Paint X6. Tyto upravené fotografie byly dále analyzovány v programu ImageJ, kde pomocí cell-counteru byla spočítána celková suma všech erytrocytů a zvláště imaturních erytrocytů v krvi. Pro index erytrocytů (suma imaturních erytrocytů k celkovému počtu všech erytrocytů) byl z hodnot pěti indexů erytrocytů vypočten aritmetickým průměr výsledný index pro každého jedince (Vinkler et al., 2010).





Obrázek 2 Fotografie erytorcytů pod mikroskopem.



Obrázek 3 Fotografie erytrocytů upravená pro analýzu dat.

Veškeré fotografie byly zpracovány v softwaru Corel Photo Paint X6 (Copyright © 2012 Corel Corporation, the U. S.) a ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015) .

#### 4.3.2. Statistické analýzy

Pro index erytrocytů (poměr imaturních erytrocytů k celkovému počtu všech erytrocytů) byla nejprve vypočtena repeatabilita dle Lessells et Boag (1987, příloha č. x). Dále byla provedena explorativní analýza dat (tabulka 1) a byly zjištěny vzájemné korelace (tabulka 2) charakterů barvy vajec (H, S, B a procentuální skvrnitost). Vztahy mezi zbarvením vaječné skořápky (H, S, B a procentuální skvrnitost) a faktory kondice samice (index erytrocytů – vyjádřený jako poměr imaturních erytrocytů k celkovému počtu všech erytrocytů, délka tarsu (mm), standardizovaná hmotnost ( $\text{g}\cdot\text{mm}^{-1}$ ), plocha

břišního pruhu ( $\text{mm}^2$ ), velikost snůšky, karotenoidní ornament peří), byly testované pomocí lineárních modelů. Vysvětlované proměnné v jednotlivých modelech byly H, S, B a procentuální skvrnitost a vysvětlující proměnné byly index erytrocytů, délka tarsu, standardizovaná hmotnost, plocha břišního pruhu, velikost snůšky a karotenoidní ornament peří. Z každého modelu byly vždy odstraňovány neprůkazné vysvětlující proměnné ( $p < 0.05$ ), až byl stanoven minimální adekvátní model (MAM). Před vytvořením modelů byly zjištěny charakteristiky dat (explorativní datová analýza, viz tabulka 1). Hodnoty vysvětlovaných proměnných odstínu a sytosti nesplňovaly parametry normality dat. Odstín neodpovídal předpokladům pro normalitu dat, a proto byl upraven logaritmickou transformací. Sytost byla upravena pomocí boxcox transformace ( $\lambda = 1.1$ ). Jas a procentuální skvrnitost splňovaly normální rozdělení, tudíž pro tyto dvě vysvětlované proměnné nebylo nutné provést žádné transformace. Pro všechny vysvětlované (H, S, B, procentuální skvrnitost) byly vytvořeny jednotlivé lineární modely.

Veškeré analýzy dat byly provedeny v softwaru RStudio (R Core Team (2014); R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

#### **4.4. Výsledky**

Největší variabilitu z vysvětlovaných proměnných (H, S, B, Proc\_skrvn) vykazuje procentuální zastoupení skvrn ( $CV = 34.18 \%$ ), dále pak odstín (H) skvrn ( $CV=26.23 \%$ ). Daleko menší variabilitu vykazuje saturace (S) barvy skvrn ( $CV = 16,35 \%$ ) a nejmenší variabilitu vykazuje (B) ( $CV = 5,17 \%$ ). Z vysvětlujících proměnných největší variabilitu vykazuje index erytrocytů ( $CV = 42.35 \%$ ) a dále plocha pruhu ( $CV = 21,83 \%$ ). Variabilita ostatních vysvětlovaných proměnných nepřesahuje variační koeficient vyšší než 20%.

Proměnná	Průměr	Medián	Min	Max	SD	CV (%)
<b>Kondiční znaky</b>						
Standardizovaná hmotnost	0,79	0,79	0,65	0,87	0,036	4,50
Index erytrocytů	7,31	7,19	4,10	25,82	3,098	42,35
Délka tarsu	22,24	22,26	20,54	23,40	0,664	2,98
Caroten chroma	0,52	0,53	0,35	0,65	0,072	13,67
Břišní pruh	265,58	269,52	143,63	392,18	57,990	21,83
Velikost snůšky	9,70	10,00	7,00	13,00	1,476	15,22
<b>Skvrnitost vaječné skořápky</b>						
Procentuální skvrnitost	10,91	9,20	0,84	20,09	3,73	34,18
Odstín (H)	15,75	15,10	8,30	27,10	4,13	26,23
Sytost (S)	27,04	27,90	14,20	37,50	4,42	16,35
Jas (B)	83,76	83,45	74,70	93,70	4,33	5,17

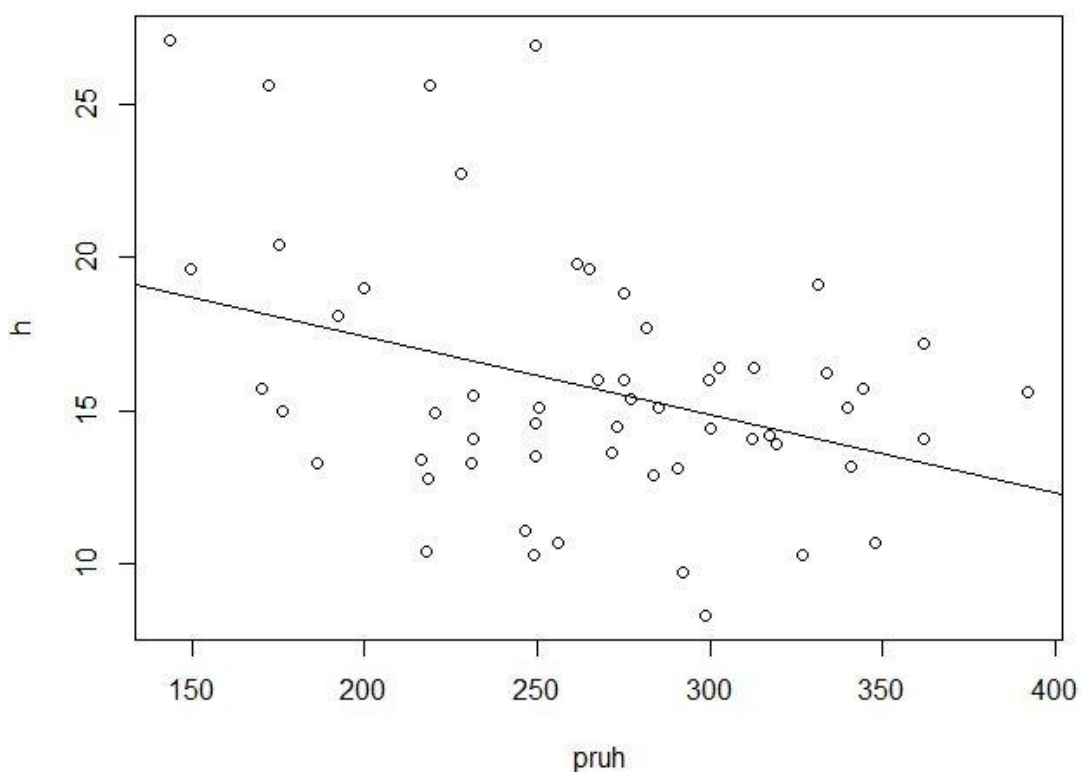
Tabulka 1 Explorativní analýza dat (n=56).

Pro H (odstín), S (sytost), B (jas) a procentuální skvrnitost (procentuální zastoupení skvrn na povrchu vaječné skořápky) byla spočítána korelace pro zjištění vzájemných vztahů (n = 56; pro H, S, B a procentuální skvrnitost). Na základě výsledků korelačních koeficientů (Spearmanův korelační koeficient  $r_s$ , n = 56; jako významné korelace jsou brány ty, které mají hodnoty  $r_s \geq 0.6$ ) se korelační koeficient pro H a B  $r_s$  blíží k 0,6 nebyly však dokázány žádné průkazné korelace mezi vysvětlovanými proměnnými (viz tabulka 2).

	H	S	B	Procentuální skvrnitost
H	1.00			
S	- 0.36	1.00		
B	0.56	- 0.30	1.00	
Procentuální skvrnitost	0.18	0.24	0.08	1.00

Tabulka 2 Korelační matice parametrů H, S, B a Procentuální skvrnitosti.

V modelu pro vysvětlovanou proměnnou odstín (H), byla zjištěna negativní korelace mezi odstínem a plochou melaninového břišního pruhu (n = 56; DF = 54; F = 1.57; p < 0.01; viz MAM - tabulka 3, ostatní proměnné příloha č. 3). Čím více se odstín skvrn blíží k červené barvě, tím se snižuje plocha břišního pruhu.

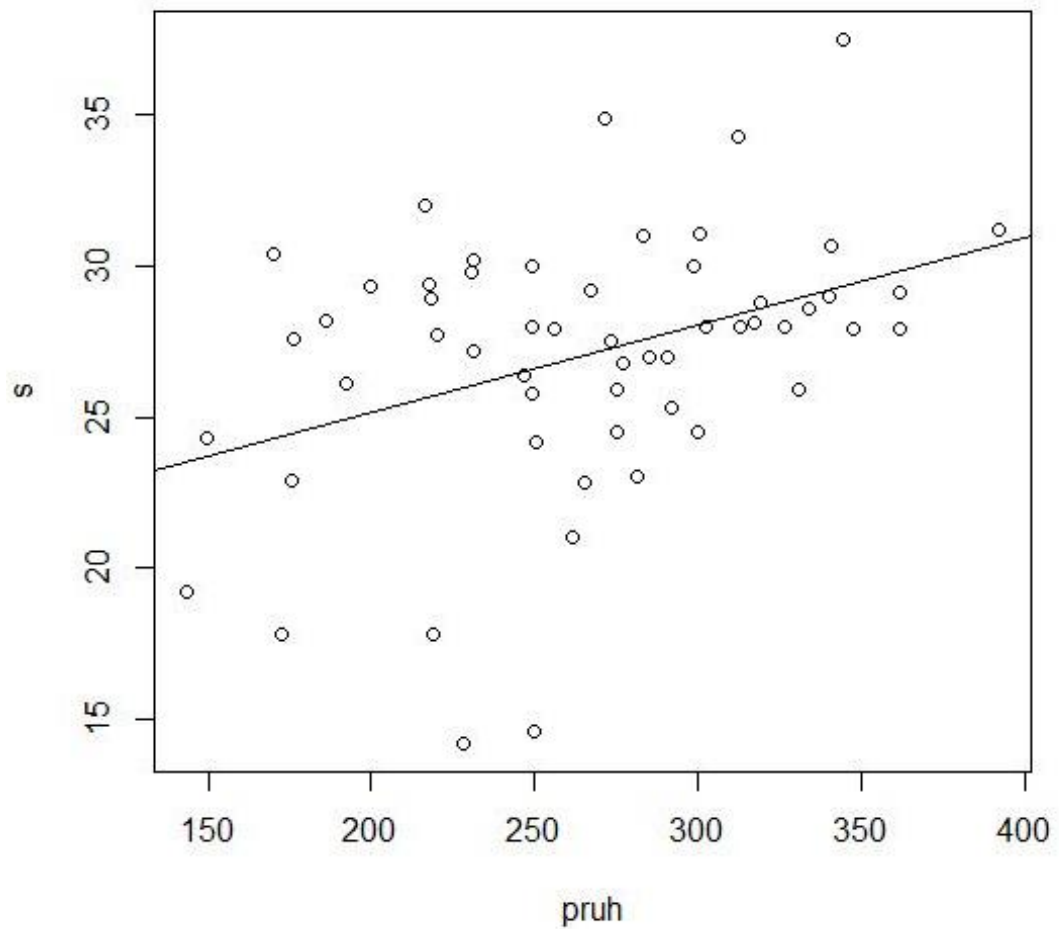


Obrázek 4 Graf závislosti odstínu skvrny na ploše břišního pruhu.

	Směrnice	SE	F	p
Intercept	3.94	1.44	2.74	0.008
Plocha břišního pruhu	- 0.001	0.0005	- 2.47	0.01

Tabulka 3 Minimální adekvátní model pro odstín (H).

Pro sytost skvrn (S), byla prokázána signifikantní závislost plochy břišního pruhu ( $n = 56$ ;  $DF = 54$ ;  $F = 8.97$ ;  $p < 0.005$ ; viz MAM - tabulka 4, ostatní proměnné příloha č. 4). Byla zjištěna pozitivní korelace mezi sytostí skvrn a plochou pruhu. Z toho vyplývá, že čím větší je sytost skvrn, tím větší je plocha břišního pruhu.

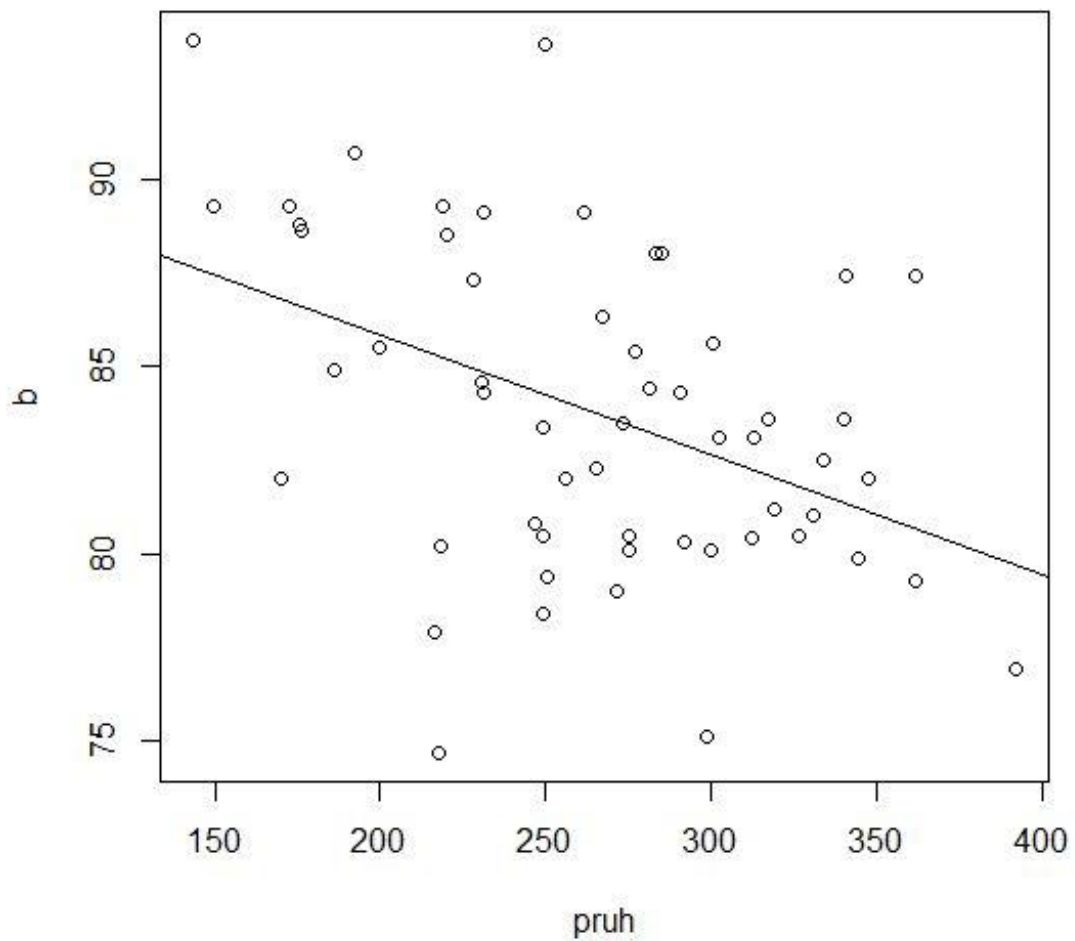


Obrázek 5 Graf závislosti sytosti skvrny na ploše břišního pruhu.

	Směrnice	SE	F	p
Plocha břišního pruhu	- 0.03	0.009	3.13	0.002

Tabulka 4 Minimální adekvátní model pro sytost (S).

Mezi jasnými skvrnami (B) a vysvětlujícími proměnnými byla zjištěna signifikantní závislost u parametru plochy břišního pruhu ( $n = 56$ ;  $DF = 54$ ;  $F = 12,17$ ;  $p < 0.0009$ ; viz MAM - tabulka 5, ostatní proměnné příloha č.5), kde jas klesá s menší plochou břišního pruhu.



Obrázek 6 Graf závislosti jasu skvrny na ploše břišního pruhu.

	Směrnice	SE	F	p
Intercept	96.61	25.76	3.75	0.0004
Plocha břišního pruhu	- 0.03	0.009	- 3.18	0.002

Tabulka 5 Minimální adekvátní model pro jas (B).

Při zkoumání závislosti procentuální skvrnitosti (Proc\_skrvn) na kondičních faktorech samic nebyly zjištěny žádné signifikantní závislosti (viz příloha č. 4).

## 4.5. Diskuze

Zbarvení vaječné skořápky u sýkory koňadry, tedy charakteristiky protoporfyrinových skvr (H, S, B), souvisí s velikostí plochy melaninového břišního pruhu. U parametrů barvy (H, B) protoporfyrinových skvrn byla prokázána negativní korelace jednotlivých parametrů (H,B) a plochou břišního pruhu samic, zatímco pro parametr barvy S byla prokázána pozitivní korelace břišního melaninového pruhu.

Podle Fitze et Richnera (2002) plocha melaninového břišního pruhu pozitivně koreluje s kondicí samic. Můžeme tedy dojít k závěru, že sytější červenohnědá skvrnitost závisí na konkrétních znacích kondice samice, v tomto případě na ploše břišního pruhu. Tato závislost odpovídá i tvrzení Morena et Osorna (2003) - samice s horší fyzickou kondicí produkují více pigmentovaná vejce. Výsledek výzkumu ukazuje, že samice sýkory koňadry s vysokou protoporfyrinovou skvrnitostí mohou reflektovat vysokou cirkulaci hladiny protoporfyrinu v krvi, projevující se neschopností antioxidantního systému efektivně odstraňovat škodlivý metabolit (protoporfyrin) a prokazuje nízkou kondici samice. Z výsledků této studie lze říct, že některé zjištěné vztahy mezi zbarvením vaječné skořápky a kondičními znaky (velikosti břišního melaninového pruhu) by mohly mít význam v samčím pohlavním výběru jako signál kondice kvality samic (Moreno et Osorno, 2003).

Sanz et García Navas (2009) dokázali pozitivní korelaci mezi délkou tarsu samice a intenzivnější protoporfyrinovou pigmentací s tím, že větší pigmentace ukazuje na větší životaschopnost snůšky. Oproti Sanz et García Navas (2009) byla v této studii prokázána negativní korelace mezi intenzitou skvrnitosti a břišním melaninovým pruhem. Samice sýkory koňadry s větším melaninovým pruhem kladly vejce s menším jasnem a sytostí, jejich odstín se přibližoval více k červené barvě. Stejný vztah mezi odstínem pigmentace a melaninovým pruhem samic prokázali ve své studii na sýkoře modřince Martínéz de la-Puerta et al. (2007). Dále prokázali negativní korelaci mezi hmotností samic a pigmentací vajec, zdatnější samice u sýkory modřinky kladly méně zbarvená vejce. Stoddard et al. (2012) zkoumali vztah mezi hmotností samic a skvrnitostí vajec a proti Martínézovi de la-Puerta (2007) došli k závěru, že samice s nižší hmotností snášely méně skvrnitá vejce. Ze závěru studií vyplývá, že vztah tělesné kondice samic se může vztahovat k intenzitě skvrnitosti jak pozitivně tak negativně. Doposud však nebyly objasněny příčiny tohoto vztahu.

Vztah obsaženého protoporfyrinu ve vaječné skořápce a intenzity skvrn potvrdili Hergitai et al. (2016), a zároveň prokázali, že samice, které kladly vejce s tmavší

pigmentací, měly více lymfocytů v krvi (je možné vyloučit anémii) a měly světleji žlutý karotenoidní ornament. V tomto výzkumu na samicích sýkory koňadry bylo prokázáno, že intenzita skvrn závisí na kondici samice (resp. na ploše břišního pruhu). Z toho může plynout i závěr, že celková koncentrace obsaženého protoporfyrinu ve vaječné skořápce může souviset s kondičními znaky samic.

Cambell et Ellis (2007) prokázali, že k anémii u ptáků dochází v případě, mají-li snížený obsah červených krvinek v krvi. Proto byl výzkum této práce navržen tak, abychom mohli hypotézu otestovat a zjistit, zda vyjádření procentuálního zastoupení imaturních červených krvinek v krvi, jako míra produkce červených krvinek v následku anémie, souvisí s pigmentací vajec. U sýkory koňadry nebyly prokázány žádné vztahy mezi procentuálním vyjádřením imaturních erytrocytů a pigmentací vajec (H, S, B, procentuální skvrnitost). K tomuto výsledku mohlo dojít např. díky tomu, že samice nebyly anemické či netrpěly nutričním stresem. Dále tento výsledek může ovlivnit i fakt, že samice nemusely mít dostatek volného protoporfyrinu v krvi, který by se deponoval do vaječné skořápky. Naopak De Coster (2013) prokázal, že intenzita pigmentových skvrn narůstala s pořadím vajec ve snůšce pouze u samic, které neprodělaly silnou anémii. Samice, které prodělaly silnou anémii, neměly pigmentovaná vejce z důvodu, že neměly dostatek volného protoporfyrinu v krvi, který by mohly ukládat do vaječné skořápky.

Z celkových výsledků studie lze vyvodit, že samice s více červenými skvrnami, větší sytostí skvrn a menším jaselem, mají horší tělesnou kondici. To může být odrazem zhoršené kondice samice v reakci na probíhající oxidativní stres (Moreno et Osorno, 2003). Skvrnitost vajec může ovlivňovat samčí pohlavní výběr samice v závislosti na její kondici (Moreno et Osorno, 2003). Celkový obsah protoporfyrinu ve vaječné skořápce může souviset s kondičními znaky samic.



## 5. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývala variabilitou zbarvení vaječné skořápky, způsobenou protoporfyrinem nebo biliverdinem. Protoporfyrin deponovaný ve vaječné skořápce, ovlivňuje několik jejích vlastností. Má vliv na mechanické vlastnosti skořápky, na permeabilitu vaječné skořápky a má antibakteriální funkci. Protoporfyrin uložený ve vaječné skořápce může ukazovat na míru kvality kondice samice. Výsledné zbarvení vaječné skořápky způsobené protoporfyrinem může samcům vysílat signál formou informací o genetické kvalitě samice (Moreno et Osorno, 2003). Depozitovaný obsah protoporfyriu má vliv na výslednou variabilitu zbarvení vaječné skořápky. Na základě výsledků uvedených studií nelze jednoznačně konstatovat, co konkrétně má vliv na rozdílnou koncentraci protoporfyriu v krvi.

V praktické části práce byla testována závislost skvrnitosti vaječné skořápky na ornamentech peří (karotenoidní ornament, plocha břišního melaninového pruhu) a tělesné kondici samice (standardizovaná hmotnost, délka tarsu, poměr imaturních erytrocytů k celkovému počtu všech erytrocytů, velikost snůšky).

Podle předpokladů bylo prokázáno, že existuje vztah mezi variabilitou skvrn a kondicí samice. Charaktery barvy skvrn (odstín, jas) negativně korelovaly s velikostí plochy břišního melaninového pruhu samic, zatímco sytost skvrn vykazovala pozitivní korelaci s plochou břišního pruhu. Červenohnědé skvrny na vejcích s menším jasem a větší sytostí poukazovaly na větší plochu břišního melaninového pruhu. Z toho vyplývá, že tělesná kondice má vliv na menší skvrnitost vaječné skořápky, a tak může být výsledné zbarvení odrazem špatné kondice samice. Procentuální skvrnitost nevykazovala žádný vztah s tělesnou kondicí samic. Dále nebyl prokázán žádný vztah mezi skvrnitostí vajec a poměrem imaturních erytrocytů k celkovému počtu všech erytrocytů. To znamená, že není možné potvrdit vztah mezi anémií a výslednou variabilitou zbarvení vaječné skořápky.

V budoucím výzkumu by bylo vhodné do analýz zahrnout další parametry kondice samice, míru stresu, hladinu volného protoporfyriu v krvi nebo také míru nutričního stresu. Dále by bylo vhodné výzkum doplnit o testování vztahů celkové koncentrace protoporfyriu obsaženého ve vaječné skořápce a jednotlivých ukazatelů charakteru skvrnitosti (odstín, sytost, jas).

Pokud by se charaktery barvy skvrnitosti vaječné skořápky jednoznačně prokázaly a potvrdily se konkrétní ukazatele kondice samice jako signifikantní ve vztahu

ke konkrétním charakterům barvy skvrnitosti, bylo by možné je využívat jako metodu k určování kondice hnízdících samic.

## 6. Zdroje

Afonso S., Vanore G. Et Battle A., 1999: Protoporphyrin IX and oxidative stress. *Free Radical Research* 31: 161-170.

Bakken G. S., Vanderbilt V. C., Buttemer W. A. et Dawson W. R., 1978: Avian eggs: thermoregulatory value of very high near-infrared reflectance.

Battersby A. R., Fooker C. J. R, Matchman G. W. J et McDonald E., 1980: Biosynthesis of the pigment of life: formation of the macrocycle. *Nature* 285: 17 – 21.

Board R. G. et Sparks N. H. C., 1991: Shell structure and formation in avian eggs. In: Deeming D. C. et Ferguson M. W. J. [eds]: *Egg incubation: its effect on embryonic development in birds and reptiles*. Cambridge University Press, Cambridge: 71-86.

Brulez K., Cassey P., Meeson A., Mikšík I., Webber S. L., Gosler A. G. Et Reynolds S. J., 2014: Eggshell spot scoring methods be used as a reliable proxy to determine pigment quantity. *Journal of Avian Biology* 45: 94-102.

Bulla M., Šálek M. et Gosler A. G., 2012: Eggshell spotting does not predict male incubation but marks thinner areas of a Shorebird's shells. *The Auk* 129: 26 – 35.

Cambell T. W. et Ellis C. K., 2007: *Avian and exotix animal hematoloy and cytology*, 3rd edn. Blackwell Publishing Proffesional, Oxford: 287 s.

Cassey P., Mikšík I., Portugal S. J., Maurer G., Ewen J. G., Zarate E., Sewel M. A., Karadas F., Grim T. et Hauber M. E., 2012: Avian eggshell pigments are not consistently correlated with colour measurments or egg constituents in two *Turdus* trushes. *Journal of Avian Biology* 43: 503-512.

Cassey P., Thomas G. H., Portugal S. J., Maurer G., Hauber M. E., Grim T., Lovell P. G. Et Mikšík I., 2012: Why are bird's eggs colourful? Eggshell pigments co-vary with life-history and nesting ekology among British breeding non-passerine birds. *Biological Journal of the Linnean Society* 106: 657-672.

Corel Photo Paint X6 (Copyright © 2012 Corel Corporation, the U. S.)

Dabrosin C., Hammar C. et Ollinger K., 1998: Impact of oestradiol and progesterone on antioxidant aktivty in normal human breast epithelial cells in culture. *Free Radical Research* 28: 241-249.

Dacke C. G., Arkle S., Cook D. J., Wormstone I. M., Jones S., Zaidi M. et Bascal Z. A., 1993: Medullary bone and avian calcium regulation. *Journal of Experimental*

Biology 184: 63-88.

Davies N. B., 2000: Cuckoos, cowbirds and other cheats. T. & A. D. Poyser, London: 310 s.

De Coster G., De Neve L. et Lens L., 2012: Intraclutch variation in avian eggshell pigmentation: the anaemia hypothesis. *Oecologia* 170: 297-304.

De Coster G., De Neve L. et Lens L., 2013: Intra-clutch variation in avian eggshell pigmentation covaries with female quality. *Journal of Ornithology* 154: 1 057-1065.

Dolmans D. E., Fukumura D. et Jain R. K., 2003: Photodynamic therapy for cancer. *Nature Reviews Cances* 3: 380-387.

Endler J. A., 1990: On the measurement and classification of colour in studies of animal color patterns. *Biological Journal of the Linnean Society* 41: 315-352.

Figura R., 2013: Hnízdní ztráty dutinových pěvců: sezónní vlivy a reprodukční odpovědi. Dept. Inn: Univerzita Palackého v Olomouci.

Fitz P. S. et Richner H., 2002: Differential effects of a parasite on ornamental structures based on melanins and carotenoids. *Behavioral Ecology* 13: 401-407.

Gibb H. L., Sorenson M. D., Marchetti K., Brooke M. De L., Davies N. B. et Nakamura H., 2000: Genetic evidence for female host specific races of the common cuckoo. *Nature* 407: 183-186.

Gosler A. G., 1993: The great tit. Paul Hamlyn Ltd, London: 155 s.

Gosler A. G., Higham J. P. et Reynolds S. J., 2005: Why are bird's eggs speckled? *Ecology Letters* 8: 1105-1113.

Götmark F., 1992: Blue eggs do not reduce nest predation in the song thrush *Turdus philomelos*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 30: 245-252.

Hanley D., Heiber G. Et Dearbon D. C., 2008: Testing an assumption of the sexual-signaling hypothesis: does blue-green egg color reflect maternal antioxidant capacity? *Condor* 110: 767-771.

Hammond R. W., Olson D. M., Frenkel R. B., Biellier H. V. et Hertelendy F., 1980: Prostaglandins and steroid hormones in plasma and ovarian follicles during the ovulation cycle of the domestic hen (*Gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology* 42: 195-202.

Hargitai R., Herényi M. et Török J., 2008: Eggshell coloration in relation to male ornamentation, female condition and egg quality in the collared flycatcher *Ficedulla*

*yalbicollis*. Journal of Avian Biology 39: 413-422.

Hargitai R., Nagy G., Herényi M., Nyiri Z., Laczi M, Hegyi G., Eke Z. et Török J., 2016: Darker eggshell spotting indicates lower yolk antioxidant level and poorer female quality in the Eurasian Great Tit (*Parus major*). The Auk 133: 131-146.

Higham J. et Gosler A., 2006: Speckled eggs: water-loss and incubation behaviour in the great tit *Parus major*. Oecologia 149: 561-570.

Hudec K., Chytil J., Šťastný K. et Bejček V., 1995: Ptáci České republiky. Sylvia 31: 97-149.

Holveck M. J., Grégorie A., Staszewski V., Guerrerrio R., Perret P., Boulinier T. et Doutrelant C., 2012: Eggshell spottiness reflects maternally transferred antibodies in blue tits. PLoS ONE 7 (11).

Hornsby M. A. W., Fairn E. R. et Barber C. A., 2013: Male European starlings do not use egg spots as a cue to adjust investment in nestling. The Wilson Journal of Ornithology 125: 109-115.

Cherry M. I. et Bennett A. T. D., 2001: Egg colour matching in an african cuckoo, as revealed by ultraviolet-visible reflectance spectrophotometry. Proceedings of the Royal Society of London, Series B 268: 565-571.

ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2015)

Ishikawa S., Suzuki K., Fukuda E., Arihara K., Yamayoto Y., Mukai T. et Itoh M., 2010: Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments. Federation of European Biochemical Societies Letters 584: 770-774.

Jones P. J., 1983: Haematocrit values of breeding Red-billed queleas *Quelea quelea* (Aves: *Ploceidae*) in relation to body condition and thymus activity. Journal Zoology 201: 217-222.

Kelly J. P., 1993: The effect of nest predation on habitat selection by dusky flycatchers in limber pine-juniper woodland. Condor 95: 83-93.

Kennedy G. Y. et Vevers H. G., 1973: Eggshell pigments of Araucano fowl. Comparative Biochemistry and Physiology 44: 11-25.

Kilner R. M., 2006: The evolution of egg colour and patterning in birds. Biological Reviews 81: 383-406.

Kratochvílová A., 2014: Variabilita ve zbarvení vaječné skořápky. Bakalářská práce, Fakulta životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze.

Kriská T., Korecz L., Nemes I. et Gál D., 1995: Physico-chemical modelling of the role of the free radicals in photodynamic therapy. III. Interactions of stable free radicals with excited photosensitizers studied by kinetic ESR spectroscopy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 215: 192-198.

Lack D., 1958: The significance of the colour of turdine eggs. *Ibis* 100: 145-166.

Layer G., Reichelt J. et Jahn D., 2010: Structure and function of enzymes in heme biosynthesis. *Protein Science* 19: 1137-1161.

Leeper F. J., 1983: The biosynthesis of porphyrins, chlorophylls, and vitamin B12. *Natural Products Reports* 2: 19-47.

Lessels C. M. et Boag P. T., 1987: Unrepeatable repeatabilities: a common mistake. *Auk* 104: 116-121.

López-Rull I., Mikšík I. et Gil D., 2008: Egg pigmentation reflects female and egg quality in the spotless starling *Sturnus unicolor*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 62: 1 877-1 884.

Lovász P. et Moskát C., 2004: Break-down of arms race between the red-backed shrike (*Lanius collurio*) and common cuckoo (*Cuculus canorus*). *Behaviour* 141: 245-262.

Martin T. E., Scott J. et Menge C., 2000: Nest predation with maternal activity: separating nest site and parental activity effects. *Proceedings of the Royal Society of London B* 267: 2 287-2 293.

Martínez-de la Puente J., Merino S., Moreno J., Tomás G., Morales J., Lobato E., García-Fraile S. et Martínez J., 2007: Are eggshell spottiness and colour indicators of health and condition in blue tits *Cyanistes caeruleus*? *Journal of Avian Biology* 38: 377-384.

Mayes F. J. et Takeballi M. A., 1983: Microbial contamination of the hen's egg: a review. *Journal of Food Protection* 46: 1 092-1 098.

McCormack J. E. et Berg E. C., 2009: Small-scale Divergence in Egg Color Along An Elevation Gradient in the Mexican Jay (*Aphelocoma ultramarina*): A Condition-Dependent Response?

McGraw K. J., 2005: The antioxidant fiction of many animal pigments: are there consistent health benefits of sexually selected colourants? *Animal*

Behaviour 69: 757-764.

Mikšík I., Holáň V. et Deyl Z., 1994: Quantification and variability of eggshell pigment content. *Comparative Biochemistry Physiology A-Molecular and Integrative Physiology* 3: 769-772.

Mikšík I., Holáň V. et Deyl Z., 1996: Avian eggshell pigments and their variability. *Comparative Biochemistry and Physiology B* 113: 607-612.

Montavecchi W. A., 1976: Field experiments on the adaptive significance of avian eggshell pigmentation. *Behaviour* 58: 26-39.

Moreno J. et Osorno J. L., 2003: Avian egg colour and sexual selection: does eggshell pigmentation reflect female condition and genetic quality? *Ecology Letters* 6: 803-806.

Moreno J., Lobato E., Morales J., Merino S., Tomás G., Martínez-de la Puente J., Sanz J. J., Mateo R. et Soler J.J., 2006b: Experimental evidence that egg color indicates female condition at laying in songbird. *Behavioral Ecology* 17: 651-655.

Newton A., 1893: *A Dictionary of Birds*. Adam and Charles Black, London: 1 088 s.

Paganelli C. V., Olszowka A. et Ar A., 1974: The avian egg: surface area, volume and density. *Condor* 76: 319-325.

Perrins C. M., 1981: British tits. *The Auk* 98: 852-855.

Rahn H. et Ar A., 1974: The avian egg: incubation time and water loss. *Condor* 76: 147-152.

Ricklefs R. E., 1969: An analysis of nestling mortality in birds. *Smithsonian Contributions to Zoology* 9: 1-48.

Rosendorf P., 2006: Přírodní památka Ládví a Ďáblický háj. Chráněná území Prahy 8. Ekocentrum Křivatec při 01/34. ZO ČSOP Křivatec, Praha: 12s.

RStudio (R Core Team (2014); R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Sanz J. J. et García-Navas V., 2009: Eggshell pigmentation pattern in relation to breeding performance of blue tit *Cyanistes caeruleus*. *Journal of Animal Ecology* 78: 31-41.

Siefferman L. et Hill G., 2005: Evidence for sexual selection on structural plumage coloration in female eastern bluebirds (*Sialia sialis*). *Evolution* 59: 1 819-1 828.

Soh T. et Koga O., 1994: The effects of sex steroid hormones on the pigment accumulation in the shell gland of Japanese quail. *Poultry Science* 73: 179-185.

Solomon S. E., 1997: Egg and eggshell quality. Iowa State University Press, Ames: 149 s.

Stoddard M. C., Fayer A. L., Kilner R. M. et Hinde C. A., 2012: Egg speckling patterns do not advertise offspring quality of influence male provisioning in Great Tits. PLoS ONE 7: e40211.

Špatenková P., 2014: Variabilita zbarvení vaječné skořápky ve snůškách sýkory koňadry. Diplomová práce, Fakulta životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze.

Tazawa H. et Whittow G. C., 2000: Incubation physiology. Sturkie's Avian Physiology, 5th ed., San Diego, Academic Press: 617-634.

Tinbergen N., Borekhuysen G. J., Feekes G. J., Houghton J. C. W. et Kruuk H., 1962: Egg shell removal by the black-headed gull, *Larus ridibundus*: a behavioral component of camouflage. Behaviour 19: 74-117.

Vinkler M., Schnitzer J., Munclinger P., Votypka J. et Albrecht T., 2010: Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils on peripheral blood. Journal of Ornithology 151: 841-849.

Volf P. et Horák P., 2007: Paraziti a jejich biologie. Praha, Triton: 318 s.

Wagner E. C., Prevorsek J. S., Wynne-Edwards K. E., Williams T. D., 2008: Hematological changes associated with egg production: estrogen dependence and repeatability. Journal of Experimental Biology 211: 400-408.

Wallace A. R., 1889: Darwinism: an exposition of the theory of natural selection with some of its applications. Macmillan, London: 494 s.

Wassmann K., Wassmann S. et Nickenig G., 2005: Progesterone antagonizes the vasoprotective effect of estrogen on antioxidant enzyme expression and function. Circulation Research 97: 1 046-1 054.

Weidinger K., 2001: Does egg colour affect predation rate on open passerine nests? Behavioural Ecology and Sociobiology 49: 456-464.

Wellbergen J., Komdeur J., Kats R. et Berg M., 2001: Egg discrimination on the Australian Reed Warbler (*Acrocephalus australis*): rejection response toward model and conspecific eggs depending on timing and mode of artificial parasitism. Behavioral Ecology 1: 8-15.

Westmoreland D. et Kiltie R. A., 1996: Egg crypsis and clutch survival in free species of blackbirds (*Icteridae*). Biological Journal of Linnean Society 58: 159-172.



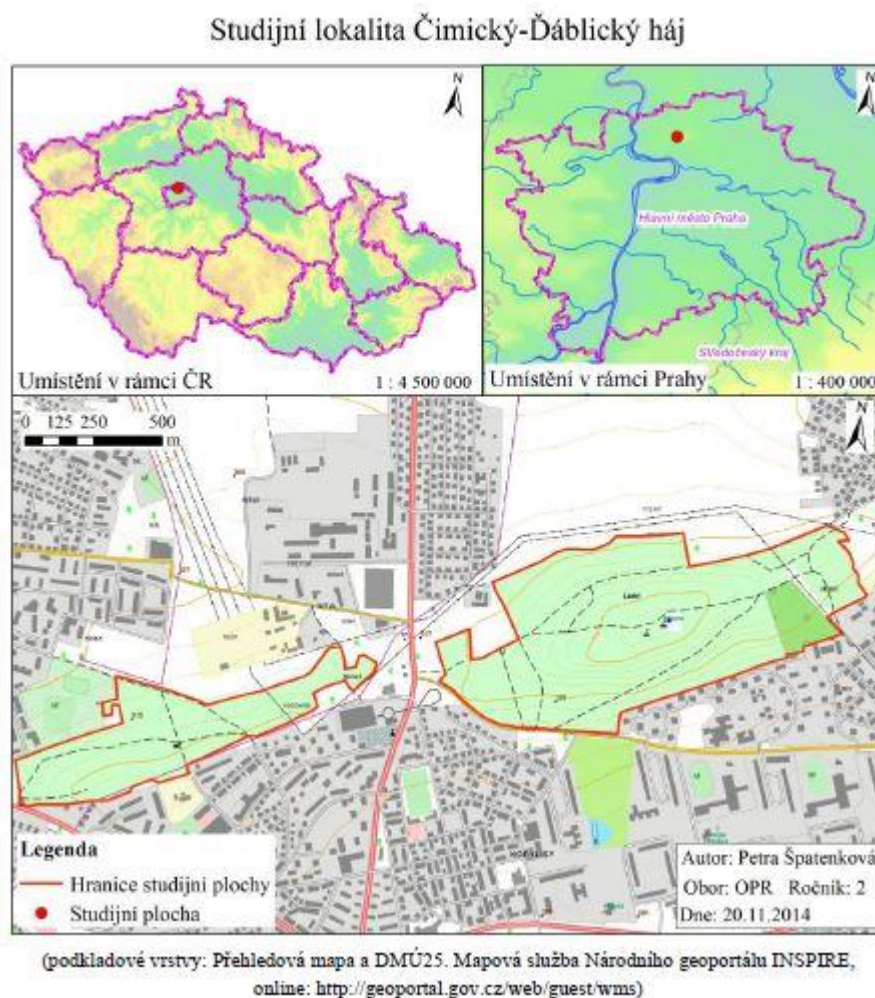
Williams T. D., Challenger W. O., Christians J. K., Evanson M., Love O. et Vézina F., 2004: What causes the decrease in haematocrit during egg production? *Function Ecology* 18: 330-336.

Yamato O., Goto I. et Maeda Y., 1996: Hemolytic anemia in wild seaducks caused by marine oil pollution. *Journal of Wildlife Diseases* 32: 381-384.

Zahavi A., 1975: Mate selection – a selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* 53: 205-214.

## 7. Přílohy

Příloha č. 1: Mapa studijní plochy v rámci Prahy a ČR.



Zdroj: Špatenková (2014).

Příloha č. 2: Hodnota repeatability pro parametr index erytrocytů ( $n = 10$ ,  $p < 0.001$ ).

Vysvětlující paramet	Repeatabilita
Index erytrocytů	0.988

Příloha č. 3: Výsledky lineárního modelu (plný model) pro závislost odstínu na parametrech tělesné kondice ( $n = 56$ ,  $DF = 54$ ; tučně zvýrazněné proměnné jsou členy minimálního adekvátního modelu).

	Směrnice	SE	F	p
<b>Intercept</b>	<b>3.94</b>	<b>1.44</b>	<b>2.74</b>	<b>0.008</b>
Délka tarsu	-0.02	0.04	-0.57	0.56
Index erytrocytů	-0.01	0.01	-1.05	0.29
Standardizovaná hmotnost	0.22	0.91	0.24	0.8
Velikost snůšky	-0.009	0.02	-0.43	0.66
<b>Plocha břišního pruhu</b>	<b>-0.001</b>	<b>0.0005</b>	<b>-2.47</b>	<b>0.01</b>
Caroten chroma	-0.23	0.45	-0.51	0.61

**Příloha č. 4:** Výsledky lineárního modelu (plný model) pro závislost sytosti na parametrech tělesné kondice (n = 56, DF = 54; tučně zvýrazněné proměnné jsou členy minimálního adekvátního modelu).

	Směrnice	SE	t	p
Intercept	-14.21	25.83	-0.55	0.58
Délka tarsu	1.28	0.88	1.45	0.15
Index erytrocytů	-0.13	0.31	-0.44	0.66
Standardizovaná hmotnost	-4.69	16.43	-0.28	0.77
Velikost snůšky	0.43	0.38	1.12	0.26
<b>Plocha břišního pruhu</b>	<b>0.03</b>	<b>0.009</b>	<b>3.13</b>	<b>0.002</b>
Caroten chroma	9.5	8.08	1.17	0.24

**Příloha č. 5:** Výsledky lineárního modelu (plný model) pro závislost jasu na parametrech tělesné kondice (n = 56, DF = 54; tučně zvýrazněné proměnné jsou členy minimálního adekvátního modelu).

	Směrnice	SE	t	p
<b>Intercept</b>	<b>96.61</b>	<b>25.76</b>	<b>3.75</b>	<b>0.0004</b>
Délka tarsu	-0.18	0.87	-0.2	0.83
Index erytrocytů	0.1	0.31	0.33	0.73
Standardizovaná hmotnost	0.75	16.39	0.04	0.96
Velikost snůšky	-0.28	0.38	-0.73	0.46
<b>Plocha břišního pruhu</b>	<b>-0.03</b>	<b>0.009</b>	<b>-3.18</b>	<b>0.002</b>
Caroten chroma	1.77	8.06	0.22	0.82

**Příloha č. 6:** Výsledky lineárního modelu (plný model) pro závislost procentuální skvrnitosti na parametrech tělesné kondice (n = 56, DF = 55).

	Směrnice	SE	t	p
Intercept	332.6	238.7	1.393	0.17
Délka tarsu	0.7	0.81	-0.86	0.39
Index erytrocytů	0.21	0.29	0.46	0.46
Standardizovaná hmotnost	- 17.95	15.1	- 1.18	0.24
Velikost snůšky	0.04	0.35	0.12	0.9
Břišní pruh	- 4.11 · 10 <sup>-4</sup>	9.09 · 10 <sup>-3</sup>	- 0.04	0.96
Caroten chroma	7.13	7.472	0.95	0.34

**Příloha č. 7:** Seznam článků, týkajících se funkce pigmentace skořápek. Součástí seznamu jsou stručné informace o obsahu těchto článků. Vybrány byly průlomové články týkající se signální funkce a biliverdinu a všechny nalezené články, které se týkají signální funkce a protoporfyrinu. (Články byly nalezeny prostřednictvím serverů Bio One, Elsevier, PloS Biology, Science Direct a Web of Knowledge).

Autor	Rok	Pigment	Druh	Zařazení druhu	Metoda měření pigmentu	Zkoumané parametry samice	Výsledky	Poznámky
Moreno et al.	2004	biliverdin	lejsek černohlavý	pěvci	spektrofotometrie	hmotnost	Nebyla zjištěna souvislost s kondicí samice	Snůšky s intenzivnější pigmentací vyvolávaly větší míru péče samců
Moreno et al.	2005	biliverdin	lejsek černohlavý	pěvci	spektrofotometrie	množství protilátek po podání látky pro stimulaci lymfocytů (fytohemaglutinin)	samice s vyšší produkcí protilátek snášely intenzivněji pigmentovaná vejce; intenzita barvy se snižovala s věkem a pořadím vajec ve snůšce	
Siefferman et al.	2006	biliverdin	salašník modrý	pěvci	spektrofotometrie	hmotnost	samice s lepší kondicí snášely intenzivněji pigmentovaná vejce	
Martínez de la Puente et al.	2007	<b>protoporfyrin</b>	sýkora modřinka	pěvci	spektrofotometrie, optická analýza	hmotnost, ornamenty peří, hladina imunoglobulinu a stresových proteinů v krvi	samice s horší kondicí snášely více intenzivně zbarvená vejce	
Cassey et al.	2008	biliverdin	kos černý, drozd zpěvný	pěvci	spektrofotometrie	hmotnost, hladina antioxidantů v krvi	samice s vyšší hladinou antioxidantů snášely více pigmentovaná vejce	

Hanley	2008	biliverdin	drozdec černohlavý	pěvci	spektrofotometrie	hmotnost, hladina antioxidantů v krvi	samice s větší antioxidační kapacitou snášely intenzivněji zbarvená vejce	
Hargitai et al.	2008	biliverdin	lejsek bělokrký	pěvci	spektrofotometrie	hmotnost, délka tarsu, hematokrit	Nebyla zjištěna souvinnost s kondicí samice	
López-Rull et al.	2008	biliverdin	špaček černý	pěvci	spektrofotometrie, HPLC	délka hrdelního peří	samice v lepší kondici snášely vejce s vyšším obsahem biliverdinu, avšak biliverdin obsažený ve vaječné skořápce nekoreloval s intenzitou barvy	
Sanz et García Navas	2009	<b>protoporfyrin</b>	sýkora modřinka	pěvci	optická analýza	hmotnost, délka tarsu	intenzivněji skvrnitá vejce snášely samice s delším tarsem	
Bulla et al.	2012	<b>protoporfyrin</b>	čejka chocholátá	dvoukří dlí	optická analýza		nebyly zjištěny žádné vztahy mezi pigmentací a tělesnou kondicí samic	
Stoddard et al.	2012	<b>protoporfyrin</b>	sýkora koňadra	pěvci	optická analýza	hmotnost, délka tarsu, parametry křídla, ocasní pera, věk	samice s větší hmotností snášely méně skvrnitá vejce	
Hornsby et al.	2013	<b>protoporfyrin</b>	špaček obecný	pěvci	přítomnost skvrn (ano / ne)	-		ve více skvrnitých snůškách se líhla mláďata s lepší fyzickou kondicí

Hergitai et al.	2016	<b>protoporfyrin</b>	sýkora koňadra	pěvci	HPLC	standardizovaná hmotnost, velikost těla	nebyly zjištěny žádné vztahy mezi pigmentací a tělesnou kondicí samic	byla zjištěna korelace mezi celkovým obsahem protoporfyrinu ve skořápce a parametry barvy skvrn
-----------------	------	----------------------	----------------	-------	------	---	---	---

---