

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE

FAKULTA ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Katedra ekologie



Variabilita zbarvení vaječné skořápky ve snůškách sýkory koňadry

Diplomová práce

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

Autor diplomové práce: Bc. Anna Kratochvílová

Praha, 2016

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Bc. Anna Kratochvílová

Aplikovaná ekologie

Název práce

Variabilita ve zbarvení vaječné skořápky ve snůškách sýkory koňadry

Název anglicky

Variability in egg shell pigmentation of great tit clutches

Cíle práce

Vysoká variabilita ve zbarvení vaječných skořápek ptáků je způsobena dvěma pigmenty, biliverdinem a protoporphyrinem (CASSEY et al. 2011). Za skvrnitost skořápek je však zodpovědný pouze protoporphyrin (MIKŠÍK et al. 1996). Pro vysvětlení vysoké variability ve skvrnitosti 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-HIERRO et MORENO-RUEDA 2010). I když nejvíce pozornosti bylo věnováno signální funkci vajec, která informuje o kvalitě samic v postkopulačním období (MORENO et OSORNO 2003), vztah mezi zdravotním stavem samic a skvrnitostí jejich vajec nebyl dosud uspokojivě analyzován.

Práce bude testovat, zda hematologické parametry samic sýkory koňadry souvisí se zbarvením vaječných skořápek v jejich snůškách.

Metodika

1. Náš tým disponuje daty o samicích a snůškách sýkory koňadry (hmotnost, základní míry, hematologická data, standardní digitální fotografie melaninového ornamentu a snůšek, vzorky peří karotenoidního ornamentu), které byly odchyceny v blízkosti hnízdních budek na studijní ploše Čimický-Řáblický háj.
2. Hematologické parametry budou vyhodnoceny standardními postupy pomocí mikroskopu (mikroskop CX41, digitální kamera UI-1540-C, program QuickPhoto Industrial 12.3, Olympus).

Doporučený rozsah práce
ca 40 stran

Klíčová slova

diferenciální počet leukocytů, erytrocyty, Parus major, protoporfyrin

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

2016/17 ZS – FŽP

Vedoucí práce

Ing. Jana Svobodová, Ph.D.

Garantující pracoviště

Katedra ekologie

Elektronicky schváleno dne 13. 12. 2016

Ing. Jiří Vojar, Ph.D.

Vedoucí katedry

Elektronicky schváleno dne 14. 12. 2016

prof. RNDr. Vladimír Bejček, CSc.

Děkan

V Praze dne 14. 12. 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci na téma „Variabilita ve zbarvení vaječné skořápky ve snůškách sýkory koňadry“ vypracovala samostatně pod vedením Ing. Jany Svobodové, Ph.D., a že jsem uvedla všechny literární prameny, ze kterých jsem čerpala.

V Praze dne 14. 12. 2016

.....

Poděkování

Děkuji především vedoucí své diplomové práce Ing. Janě Svobodové, Ph.D. za odborné rady, trpělivost a čas, který mi věnovala. Dále děkuji RNDr. Michalovi Vinklerovi, Ph.D. a Ing. Petře Bauerové za odbornou instruktáž při analýze diferenciálního počtu leukocytů. Můj dík patří i celému výzkumnému týmu za zpracování a poskytnutí dat.

V Praze dne 14. 12. 2016

.....

Abstrakt

Zbarvení vaječné skořápky ve snůškách ptáků vykazuje výraznou vnitrodruhovou variabilitu, která zatím nebyla zcela objasněna. Jeho charakter je udáván dvěma pigmenty: modrozelený biliverdin zpravidla tvoří podkladovou barvu, zatímco hnědo-červený protoporfyrin je spojován s tvorbou skvrn. Vzhledem k povaze a metabolismu těchto dvou pigmentů v organismu ptáků se usuzuje, že mají vliv na hladinu oxidativního stresu, a jejich depozice do vaječné skořápky by proto mohla poukazovat na fyzickou kondici hnízdící samice. Z tohoto předpokladu vychází signální hypotéza zbarvení vaječné skořápky, která předpokládá, že její zbarvení by proto mohlo reflektovat individuální zdravotní stav a fyzickou kondici, případně by přímo mohlo indikovat anémii (anemická hypotéza). Tato práce testovala souvislosti mezi fyzickou kondicí samic sýkory koňadry (*Parus major*) a protoporfyrinovou makulací jejich vajec. Jako parametry zastupující fyzickou kondici byla zvolena standardizovaná hmotnost samic a jejich vybrané hematologické ukazatele (poměr heterofilů ku lymfocytům a podíl imaturních erytrocytů). Zbarvení vaječné skořápky bylo charakterizováno odstínem, sytostí a jasem protoporfyrinových skvrn, jejich standardizovaným počtem a procentuálním zastoupením, a reflektancí podkladové barvy skořápky. Bylo zjištěno, že samice vykazující vyšší hodnoty poměru heterofilů ku lymfocytům snášely v některých hnízdních sezónách vejce s větším počtem skvrn a vyšší reflektancí podkladové barvy. Vyšší počet skvrn na vejcích byl rovněž pozorován u samic s vyšším podílem imaturních erytrocytů v krvi. To naznačuje, že vyšší depozice protoporfyrinu indikuje zhoršený zdravotní stav a fyzickou kondici. Současně však bylo zjištěno, že větší a těžší samice snášely v některých případech vejce s nižší reflektancí podkladové barvy. Ačkoli výsledky jsou nejednoznačné, neodporují předpokladům signální hypotézy a částečně podporují anemickou hypotézu. Zjištěné závislosti však nebyly konzistentní pro všechny zkoumané hnízdní sezóny a naznačují tudíž, že v charakteru zbarvení vaječné skořápky hrají roli i další faktory.

Klíčová slova: pigmentace vaječné skořápky, protoporfyrin, signální funkce, anemická hypotéza, *Parus major*, diferenciální počet leukocytů, erytrocyty

Abstract

Eggshell coloration in bird clutches shows a striking variability within species which has not yet been fully explained. Its character is determined by the deposition of two main pigments: blue-green biliverdin is responsible for the background colour while brown-red protoporphyrin is associated with the dark spot pattern. Considering the role and metabolism of these two pigments in the avian organism it was suggested that they might have an important impact on the oxidative stress levels and their deposition into the eggshell is therefore suggested to possibly reflect the body condition of laying females during the laying periods. This is also the basic assumption for the signalling hypothesis of eggshell coloration which predicts the eggshell appearance to reflect the female body condition and individual health status or directly indicate anemia in birds (anemic hypothesis). Here it was tested whether there is a relationship between parameters representing the body condition of female great tits (*Parus major*) and the characteristics of protoporphyrin maculation of their eggs. Female body condition was expressed by standardized body weight and the selected haematological parameters (heterophil to lymphocyte ratio and relative immature erythrocyte counts). Eggshell coloration was characterized by spot colour (hue, saturation and brightness), spot counts and the reflectance of the background colour. It was found that females with higher heterophil to lymphocyte ratio laid eggs with more spots and higher reflectance of the background colour in some nesting seasons. Eggs with more spots on its surface were also laid by females with higher immature erythrocyte counts. These results suggest that more intensive deposition of protoporphyrin into the eggshell can indicate worse body condition of the laying females. On the other hand, it was also found that heavier females laid eggs with lower reflectance of the background colour. Despite this discrepancy, these results are not inconsistent with the assumptions of the signalling hypothesis and they partially support the anemia hypothesis. However, the above mentioned dependencies were inconsistent among the nesting seasons, indicating that further important determinants must be considered in the avian eggshell coloration.

Key words: eggshell pigmentation, protoporphyrin, signalling function, anemia hypothesis, *Parus major*, leucocyte count differential, erythrocytes

Obsah

Abstrakt	6
Abstract	7
1 Úvod	9
2 Literární rešerše.....	11
2.1 Vaječná skořápka a její pigmentace	11
2.1.1 Signální funkce zbarvení vaječné skořápky.....	11
2.1.2 Anemická hypotéza.....	15
2.2 Hematologické parametry jako ukazatelé fyzické kondice	16
2.2.1 Buněčná imunita a diferenciální rozpočet leukocytů	17
2.2.2 Erytrocyty.....	23
3 Cíle a předpoklady.....	25
3.1 Metodika.....	25
3.1.1 Zbarvení vajec	26
3.1.2 Hematologické parametry	27
3.1.3 Statistická analýza dat.....	28
3.2 Výsledky.....	29
3.3 Diskuze.....	37
3.4 Závěr	41
Seznam použitých zdrojů	43
Přílohy.....	51

1 Úvod

Zbarvení vaječné skořápky je tvořeno dvěma základními pigmenty: modro-zelený biliverdin zpravidla tvoří podkladovou barvu, zatímco červeno-hnědý protoporfyrin se na vejcích vyskytuje zejména v podobě skvrn (Mikšík et al. 1976). Vnitrodruhová i vnitrosnůšková variabilita ve zbarvení skořápky ptačích vajec zatím nebyla plně objasněna a je předmětem výzkumu. Existuje množství hypotéz, které pracují s intenzitou a charakterem zbarvení a přisuzují jim nejrůznější funkce. Patří mezi ně například funkce kryptická a antipredační (Timbergen et al. 1962), strukturní (Graveland et al. 1994, Gosler et al. 2005, Bulla et al. 2012), termoregulační (Montevecchi 1976), antibakteriální (Ishikawa et al. 2010), ochrana proti hnízdnímu parazitismu a mimetická funkce (Stokke et al. 1999, Davies 2000, Welbergen et al. 2001), či vliv na permeabilitu skořápky (Gosler et al. 2005, Higham et Gosler 2006). Přehled jednotlivých hypotéz je podrobně popsán v práci Kratochvílové (2014) a Špaténkové (2016). Při posuzování hypotéz je však nutno brát v úvahu konkrétní druh ptáka, a jeho hnízdní ekologii (Reynolds et al. 2009 in Bulla et al. 2012). Zejména v případě skrytě hnízdicích pěvců, jejichž vejce jsou charakteristická protoporfyrinou makulací, je význam takového zbarvení nejasný. Někteří autoři se přiklánějí k názoru, že v tomto případě plní strukturní funkci (viz Gosler et al. 2005). V současné době je však diskutována zejména signální funkce vajec související se sexuálním výběrem a teorií handicapu (Moreno et Osorno 2003). Nejnovější hypotézou na poli signální funkce zbarvení vaječné skořápky je pak anemická hypotéza (De Coster et al. 2012).

Individuální kondice jedince je komplexní a nelze ji jednoduše vyjádřit jedním parametrem. Vzhledem k finančním a časovým možnostem je však zapotřebí zvolit takový parametr, který lze snadno měřit a má vysokou opakovatelnost. Nejjednoduššími, a nejčastěji používanými ukazateli fyzické kondice u ptáků jsou hmotnost těla a délka tarsu, pomocí kterých lze vypočítat index tělesné hmotnosti (body mass index, Brown 1996). Mezi další parametry, které jsou často používány jako ukazatele fyzické kondice a zdravotního stavu jedinců patří také vybrané hematologické parametry. Tato práce se bude blíže věnovat zejména diferenciálnímu počtu leukocytů a podílu imaturních erytrocytů v periferní krvi. Tyto charakteristiky se mohou u jednotlivých jedinců výrazně lišit a používají se ke stanovení individuálního zdravotního stavu (Ardia et Schat 2008 in Vinkler et al. 2010). Podíl heterofilů

a lymfocytů se u ptáků běžně používá jakožto indikátor dlouhodobého stresu nejrůznějšího původu (Gross et Siegel 1983), a je proto široce využíván jako ukazatel fyzické kondice. Podíl imaturních erytrocytů může indikovat anémii, zranění spojené se ztrátou krve, zvýšený tlak krev-sajících ektoparazitů a další faktory ovlivňující zdravotní stav jedince (Williams et al. 2004).

Tato diplomová práce zkoumá na základě těchto teoretických poznatků souvislosti mezi parametry fyzické kondice hnízdících samic sýkory koňadry (*Parus major*) a zbarvením vajec ve snůšce. Sýkora koňadra snáší vejce se světlým podkladem a červeno-hnědými protoporfyrinovými skvrnami, které mohou vykazovat výraznou vnitrodruhovou variabilitu (Gosler et al. 2000). Cílem práce je otestovat, zda je tato variabilita vysvětlována některými zvolenými parametry fyzické kondice samic, a závěry pak porovnat s dosavadními výsledky, zejména v oblasti signální a anemické hypotézy. Výzkum navazuje na moji bakalářskou práci (Kratochvílová 2014), kterou v teoretické části doplňuje o nejnovější poznatky a rozšiřuje i její praktickou část. Zároveň navazuje i na diplomovou práci Špaténkové (2016), která na stejných datech zjistila závislosti mezi pigmentací vajec, hmotností samic a velikostí jejich břišního melaninového pruhu.

2 Literární rešerše

2.1 Vaječná skořápka a její pigmentace

Hlavní funkcí vaječné skořápky je ochrana vyvíjejícího se embrya před mechanickým poškozením, bakteriemi a dalšími negativními vlivy vnějšího prostředí. Zároveň prostřednictvím pórů zajišťuje výměnu plynů a slouží také jako zdroj vápníku. Tvorba vaječné skořápky ve skořápkové žláze je poměrně dobře popsána na kuru domácím a předpokládá se, že stejný mechanismus se uplatňuje i ostatních řádů ptáků (Deeming et Reynolds 2015, dále viz Kratochvílová 2014). Oproti tomu tvorba a depozice skořápkových pigmentů zatím nebyla v plné šíři objasněna. K pigmentaci dochází v závěrečných fázích tvorby vaječné skořápky prostřednictvím epitelových buněk skořápkové žlázy (Baird et al. 1975). Výsledný vzhled, tzv. makulace, je tvořen dvěma základními pigmenty: biliverdinem a protoporfyrinem (Kennedy et Vevers 1973). Oba pravděpodobně vznikají při biosyntéze krve jako produkt rozkladu hemu. K jejich syntéze dochází podle dosavadních poznatků přímo ve skořápkové žláze (Wang et al. 2009), ačkoli pro toto tvrzení zatím neexistují dostatečné důkazy. Vzhledem k jejich chemické povaze, plní pravděpodobně oba tyto pigmenty v organismu i další funkce. Biliverdin má antioxidační účinky, a jeho ukládání do skořápky proto může být pro samici riskantní (Moreno et Osorno 2003). Akumulace protoporfyrinu v játrech může naopak způsobovat oxidativní stres (Vanora et Batlle 1999) a existuje proto teorie, že jeho depozice do vaječné skořápky může být způsobem, jak se samice s tímto nepříznivým stavem vyrovnává (Deeming et Reynolds 2015).

2.1.1 Signální funkce zbarvení vaječné skořápky

Signální funkce zbarvení vajec je jednou z hypotéz, která se snaží o vysvětlení výrazné vnitrodruhové variability zbarvení skořápky vajec ve snůškách ptáků. Její podstata tkví v myšlence, že vzhled vejce podává informaci o fyzické kondici hnízdící samice a odvozeně i o budoucí kvalitě jejího potomstva. Tato informace na základě Darwinovy teorie pohlavního výběru cílí na partnera, který je tím nucen k vyšší aktivitě při péči o potomstvo (Moreno et Osorno 2003).

2.1.1.1 Signální funkce modro-zelených vajec

Při navržení signální hypotézy argumentovali její autoři (Moreno et Osorno 2003) několika základními teoretickými předpoklady: (1) alternativní hypotézy mohou mít v případě skrytě hnízdících pěvců výrazné nedostatky (například kryptickou funkci v tomto případě přebírá hnízdo, nikoli samotné vejce); (2) vzhledem k povaze a roli protoporfyrinu a biliverdinu v organismu může ukládání pigmentů do skořápky vajec hnízdící samici oslabovat; (3) znaky ovlivňující sexuální výběr jsou z hlediska fylogeneze vysoce variabilní, stejně jako zbarvení vajec. Signální hypotéza na jejich základě předpokládá, že výrazněji zbarvená vejce by měla indikovat dobrou fyzickou či genetickou kvalitu samice, a měla by motivovat samce k vyšší účasti v péči o potomstvo. Termín „výrazněji zbarvená vejce“ lze však beze zbytku vztáhnout pouze na modro-zelená vejce, jejichž barva je tvořena pigmentem biliverdinem. Takto zbarvená vejce byla také použita při prvních experimentálních studiích na lejskovi černohlavém (*Ficedula hypoleuca*). První experiment (Moreno et al. 2004) tuto hypotézu částečně podpořil zjištěním, že 20 % variability v úsilí samců při péči o mláďata bylo vysvětleno zbarvením vajec. Rovněž tak Soler et al. (2005) podporují hypotézu, že sytěji zbarvená vejce evokují zvýšené úsilí samců. Souvislost s fyzickou kondicí samice však zjištěna nebyla. Moreno et al. (2005) proto navázali manipulativním experimentem, ve kterém hodnotili fyzickou kondici samic na základě jejich imunokompetence vůči antigenům (reakce na fytohemaglutinin a tetanus). Moreno et al. (2006) pak podávali samicím vysoce kalorickou stravu. V obou případech již byla zjištěna souvislost mezi fyzickou kondicí hnízdící samice a zbarvením vajec: samice s vyšší imunokompetencí a přikrmované samice snášely sytěji zbarvená vejce. Morales et al. (2006) doplňují, že sytější zbarvená vejce indikují nejen fyzicky zdatnou samici, ale rovněž vyšší obsah protilátek ve žloutku a vyšší šanci na přežití potomstva. Na základě těchto prvotních signifikantních výsledků bylo následně provedeno množství navazujících experimentů pracujících výhradně s biliverdinovou pigmentací, které testují signální hypotézu u různých druhů ptáků a vykazují nekonzistentní výsledky. Siefferman et al. (2006) zjistili pozitivní závislost sytosti modro-zeleného zbarvení vajec salašníka modrého (*Sialia sialis*) na morfologických parametrech samic. Krist et Grim (2007) sice vykázali pozitivní závislost mezi fyzickou kondicí samic lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) a sytostí zbarvení vajec, nicméně zároveň vyloučili souvislost mezi úsilím samce a zbarvením vajec. Soler et al. (2007) na druhou stranu uvádí, že výrazněji zbarvená vejce

špačka černého (*Sturnus unicolor*) predikují vyšší úsilí jak samce, tak i samice. Pozitivní závislost mezi kondicí samic a sytostí barvy vajec v následujících letech byla pozorována u lejska černohlavého (Morales et al. 2008), špačka černého (Lopéz-Rull et al. 2008, Frostin et al. 2016) a tereje modronohého (*Sula nebouxii*, Morales et al. 2011). Oproti tomu Cassey et al. (2008) zpochybnili platnost signální hypotézy u kosa černého (*Turdus merula*) a drozda zpěvného (*Turdus philomenos*), když zjistili, že zbarvení vajec kvantifikované na základě poznatků o vnímání barev u ptáků nekoreluje s mateřskými investicemi do vajec. Rovněž tak Hanley et Doucet (2009) nepotvrdili závislost mezi biliverdinovou pigmentací vajec racka delawarského, a fyzickou kondicí samic či zvýšeným úsilím samců (*Larus delawarensis*).

2.1.1.2 Signální funkce protoporfyrinové makulace

Souvislost protoporfyrinové pigmentace a signální hypotézy byla rovněž navržena v původní práci Moreno et Osorno (2003), avšak experimentální výzkum v této oblasti je datován až o několik let později. Na rozdíl od modro-zelených vajec má kvantifikace protoporfyrinové makulace některá specifika, která je nutno zohlednit. Gosler et al. (2000) a Gosler et al. (2005) charakterizovali skvrny na vejcích sýkory koňadry třemi parametry: intenzita (I), distribuce (D) a průměrná velikost (S), které byly vyhodnocovány vizuálně jedním pozorovatelem a byla jim přisouzena hodnota na uměle vytvořené škále. Z korelační matice těchto tří parametrů vychází dvě základní osy: pc1 (zahrnuje v sobě intenzitu a velikost skvrn) a pc2 (distribuce skvrn). Tato jednoduchá metoda se intenzivně využívá dodnes, viz například Sanz et García-Navaz (2009), Hierro et de Neve (2010), García-Navaz et al. (2011), Bulla et al. (2012) a Giordiano et al. (2015), Hargitai et al. (2016b). Oproti tomu Duval et al. (2013b) měřili reflektanci protoporfyrinových skvrn spektrofotometrem. Ačkoli je tato metoda obecně velmi přesná, není v případě protoporfyrinových skvrn příliš používaná. Lze ji totiž aplikovat pouze na skvrny o dostatečné velikosti, což vylučuje náhodný výběr skvrn a může výrazně manipulovat s výsledky. Dalšími alternativami jsou například metoda kapalinové chromatografie (viz například Duval et al. 2016) nebo analýza koncentrace pigmentů v roztoku (viz například Fargallo et al. 2012). Oblíbenou metodou je i pořizování digitálních fotografií vajec, které jsou následně vyhodnocovány pomocí grafického softwaru. Tato metoda vykazuje uspokojivou opakovatelnost, jelikož hodnoty nejsou nepříznivě ovlivněny subjektivním hodnocením pozorovatele, a zároveň je finančně i metodicky nenáročná. Byla

použita například v pracích Martínez-de la Puente et al. (2007), Sezer et Tekelioglu (2009), Stoddard (2012), Duval et al. (2013a) a byla rovněž využita pro analýzu dat použitých v této práci (viz Kratochvílová 2014, Špaténková 2014, Bubeníčková 2016). Je vysoce pravděpodobné, že právě nejednotnost výše zmíněných metod kvantifikace protoporfyrinové pigmentace může zčásti způsobovat nejednoznačnost výsledků, kterých bylo v této oblasti dosaženo (pro přehled viz Kratochvílová 2014). Rovněž tak lze zaznamenat výraznou diverzitu v použitých parametrech vyjadřujících fyzickou kondici samice. Z povahy protoporfyrinu a jeho role v organismu zároveň není jasné, zda by měla intenzita protoporfyrinové pigmentace vykazovat pozitivní či negativní trend ve vztahu ke kondici samice. Protoporfyrin je metabolitem, který vzniká při biosyntéze hemu (Deeming et Reynolds 2015), a jehož akumulace v játrech generuje v organismu oxidativní stres (Vanora et Batlle 1999). Zvýšená depozice do skořápek může proto znamenat jak dobrou fyzickou kondici (organismus disponuje vysokou antioxidační kapacitou, a je tudíž schopen akumulovat větší množství protoporfyrinu), tak i zhoršenou fyzickou kondici v krátkodobém měřítku (samice je oslabená v důsledku intenzivního rozpadu krevních částic a vysoké hladiny oxidativního stresu). První varianta souvisí s teorií handicapu, kdy samice signalizuje svou fyzickou zdatnost (resp. fyzickou zdatnost svého potomstva), které dosahuje navzdory oslabení (Moreno et Osorno 2003). Samice totiž při tvorbě vajec ukládá do žloutku životně důležité antioxidanty, čímž je zároveň odčerpává z vlastního organismu a vystavuje se tak vyšší míře oxidativního stresu. Vyšší depozice protoporfyrinu by tudíž signalizovala vyšší investici antioxidantů do vajec, a kvalitnější potomstvo (Hargitai 2016c). Tento závěr předpokládá pozitivní korelaci mezi množstvím antioxidantů uložených ve vejci při jeho tvorbě a budoucí životaschopností zárodka a vylíhnutého jedince. Deeming et Reynolds (2015) však upozorňují, že tento předpoklad ještě nebyl plně potvrzen dostatečnou experimentální základnou.

V návaznosti na předchozí práci (Kratochvílová 2014) zde budou zmíněny pouze recentní výzkumy uskutečněné na poli signální hypotézy protoporfyrinové makulace. Giordiano et al. (2015) provedli experiment na dvou skupinách hnízdících párů sýkory koňadry (*Parus major*) a zjistil, že příkrmování snižuje hladinu oxidativního stresu, a že hladina oxidativního stresu je ve spojitosti s distribucí skvrn na vejcích. Intenzita ani velikost skvrn však nebyly závislé na hladině oxidativního stresu. Oproti tomu Hargitai et al. (2016a, 2016b) opakovaně ukázali

negativní závislost jasu protoporfyrinových skvrn na kondici samic sýkory koňadry a kanára divokého (*Serinus canaria*). Samice s horší fyzickou kondicí snášely vejce s tmavšími skvrnami, a rovněž tato vejce obsahovala méně antioxidantů. Hargitai et al. (2016a) zároveň pozoroval i pozitivní závislost sytosti modro-zeleného zbarvení vajec kanára divokého na kondici hnízdící samice, a na obsahu antioxidantů ve stravě. Výzkum byl pak dále rozšířen v práci Hargitai et al. (2016c), který zdokumentoval signifikantní pozitivní závislost intenzity a plošného rozsahu skvrn na nepříznivých environmentálních podmínkách. Samice sýkory koňadry hnízdící v chladném počasí nebo v hustě osídlených oblastech snášely intenzivněji skvrnitá vejce, tzn. ukládaly více protoporfyrinu do skořápky vajec, aby snížily hladinu oxidativního stresu. Tato zjištění byla podpořena paralelně probíhajícím výzkumem depozice pigmentů do skořápek ve snůškách křepelky japonské (*Coturnix coturnix japonica*), při kterém samice s omezeným přístupem k potravě ukládaly do skořápky větší množství protoporfyrinu a menší množství biliverdinu (Duval et al. 2013, Duval et al. 2016).

Proti těmto výsledkům argumentuje několik recentních souvisejících výzkumů (Cassey et al. 2012, Brulez et al. 2014), na jejichž základě bylo zjištěno, že vizuální vzhled skořápky nemusí vždy odpovídat skutečnému množství pigmentů, které jsou v ní uloženy. Tyto výsledky jsou v silném rozporu se základní myšlenkou signální hypotézy. Hargitai (2016b) oproti tomu tyto námitky vyvrací, když ve své práci poukazuje na korelaci mezi zbarvením skvrn, jejich velikostí a procentuálním plošným zastoupením, a skutečnou koncentrací protoporfyrinu ve skořápce. Protichůdnost takových výsledků může být částečně vysvětlena použitými metodami, modelovým druhem, či nehomogenními podmínkami, ve kterých byly výzkumy prováděny.

2.1.2 Anemická hypotéza

Hnízdící samice bývají často anemické (vykazující snížený hematokrit, hemoglobin a počty červených krvinek, Williams et al. 2004). Příčina tohoto jevu nebyla dosud uspokojivě objasněna (Wagner et al. 2008, Williams et al. 2004). Diskutuje se o spojitosti s hladinou estrogenů, které jsou schopny potlačit erytropoézu, nebo s nutričním deficitem, kterému jsou ptáci během hnízdění vystaveni (Wagner et al. 2008). Rovněž tak byla v některých případech pozorována spojitost mezi sníženým hematokritem a vyšší hladinou žlutkových prekurzorů v krvi v období před započítím snůšky; nicméně tato hypotéza nebyla zcela

přijata vzhledem ke skutečnosti, že k vyrovnání hematokritu u samic docházelo až po delším časovém období po dokončení snůšky (Williams et al. 2004).

Novou hypotézu k vysvětlení anémie u hnízdících ptáků však navrhli De Coster et al. (2012), kteří zkoumají, zda její výskyt souvisí s množstvím protoporfyrinu uloženým do skořápky vajec. Vycházejí přitom z předpokladu, že protoporfyrin je prekurzorem hemu, a jako takový může být po depozici do vaječné skořápky indikátorem zdravotního stavu samice během snášení vajec. Jejich výzkum na sýkoře koňadře se týkal pouze vnitrosnůškové variability a sledoval změny v pigmentaci vajec, pokud je samice vystavena uměle zvýšenému tlaku krev sajících vnějších parazitů. Očekávaným efektem takto vyvolané anémie byla zvýšená krvetvorba doprovázená zvýšenou depozicí protoporfyrinu do vaječné skořápky. Nicméně výsledky tohoto experimentu nebyly zcela jednoznačné. Očekávaný efekt se objevil pouze u méně parazitovaných samic. Samice vystavené vysokému tlaku parazitů snášely naopak méně pigmentovaná vejce, což mohl být důsledek extrémní ztráty krve a nedostatečných zdrojů protoporfyrinu. Vzhledem k tomu, že cesta, kterou se protoporfyrin dostává do struktury vaječné skořápky, zatím není zcela známá, lze anemickou hypotézu interpretovat různými způsoby. De Coster et al. (2012) předpokládají jako jeho hlavní zdroj volný protoporfyrin erytrocytů rozptýlený v krvi (Kennedy et Vevers 1973 in De Coster et al. 2012). Při anémii může docházet k akumulaci tohoto volného protoporfyrinu z důvodu nedostatečného množství železa pro syntézu hemu (Langer et al. 1972 in De Coster et al. 2012). Nicméně zdrojem protoporfyrinu můžou být ve velké míře i rozpadající se (poškozené nebo přestárlé) erytrocyty (Wang et al. 2009). V takovém případě by anémie naopak vyústila v nižší depozici protoporfyrinu do vaječné skořápky. Třetí alternativou je pak možnost syntézy protoporfyrinu přímo ve skořápkové žláze (Baird et al. 1975 in De Coster et al. 2016), která však vylučuje souvislost anémie a pigmentace vajec. Podíl těchto jednotlivých zdrojů protoporfyrinu na jeho celkovém množství zatím nebyl objasněn (De Coster et al. 2012).

2.2 Hematologické parametry jako ukazatelé fyzické kondice

Hematologické metody pro posouzení individuálního zdraví jsou v ekologických výzkumech široce rozšířené. Nejběžněji používanými hematologickými parametry jsou poměr počtu heterofilů ku počtu lymfocytů, diferenciální počty leukocytů, podíl imaturních erytrocytů,

hematokrit, průměrná velikost buňky, absolutní počty leukocytů a erytrocytů, a přítomnost krevních parazitů (Vinkler et al. 2010). Tato kapitola se bude věnovat diferenciálnímu počtu leukocytů, poměru počtu heterofilů ku počtu lymfocytů, a podílu imaturních erytrocytů v krvi ptáků. Bude zmíněn význam jednotlivých typů hematocytů a popsána jejich reakce na změny v organismu, které mohou souviset s patogeny, zraněním či dalšími negativními faktory vnějšího prostředí. Tyto základní teoretické poznatky jsou předpokladem pro odvození souvislostí s individuálním zdravím a fyzickou kondicí jedince, ačkoli se nejedná o vyčerpávající evidenci z oblasti hematologie ptáků.

2.2.1 Buněčná imunita a diferenciální rozpočet leukocytů

Imunitní systém organismu sestává z vrozené a získané (adaptivní) imunity. Vrozená imunita je označení pro neměnný soubor mechanismů, které tvoří první obrannou linii proti mikrobům. Adaptivní imunita je systém obrany, který je schopný vytvářet imunologickou paměť a zvyšovat schopnost imunitní reakce na základě předchozích zkušeností organismu s určitým typem patogenu. Systém adaptivní imunity je tvořen imunitou látkovou (antigeny produkované B lymfocyty) a imunitou buněčnou, jejímiž hlavními nositeli jsou T lymfocyty (Abbas et al. 2011). Klíčová role lymfocytů v imunitním systému byla objevena v průběhu 50. a 60. let devatenáctého století (Burnet 1971 in Davison et al. 2008), ačkoli to naznačovaly již experimenty prováděné o 40 let dříve na kuřatech (Murphy 1914 in Davison et al. 2008).

Leukocyty se dělí do dvou základních morfologicky odlišných skupin: agranulocyty a granulocyty. Agranulocyty neobsahují v cytoplazmě granula: jedná se o lymfocyty a monocyty. Granulocyty jsou naopak charakteristické obsahem barvitelných granul: patří mezi ně heterofily, eosinofily a basofily. Heterofily se vyskytují pouze u ptáků a plazů, funkčním ekvivalentem u savců jsou neutrofilové (Lucas et Jamroz 1961). Stručná morfologická charakteristika jednotlivých typů leukocytů je uvedena v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled typů leukocytů a jejich základních morfologických charakteristik při použití Wrightova barvení (Campbell 1995)

Lymfocyty	Fialové jádro bez laloků vyplňující většinu buňky; světle modrá cytoplasma
Monocyty	Světle fialové jádro, kulaté až laločnaté; modro-šedá cytoplasma s občasným obsahem vakuol; velké buňky
Heterofily	Světle fialové, laločnatě členěné jádro; bezbarvá cytoplasma obsahující cihlově červená vřetenovitá granula
Eosinofily	Fialové, laločnatě členěné jádro; světle-modrá cytoplasma obsahující oranžovo-červená kulatá granula
Basofily	Fialové jádro bez laloků; bezbarvá cytoplasma obsahující tmavě fialová granula

2.2.1.1 Lymfocyty

V imunitním systému hrají lymfocyty klíčovou roli, neboť se podílejí jak na látkové imunitě (B lymfocyty), tak na imunitě buněčné (T lymfocyty). B lymfocyty jsou buňky, které jsou po rozpoznání antigenu schopny změnit se v tzv. plazmatické buňky vytvářející protilátky. Jsou produkovány ve specializovaném orgánu zvaném Fabriciova burza umístěném v blízkosti kloaky. V případě savců vznikají tyto buňky v kostní dřeni (Davison et al. 2008). T lymfocyty jsou zodpovědné za obranu organismu proti cizorodým buňkám, nádorovým buňkám nebo buňkám napadeným viry nebo jinými intracelulárními parazity. Jsou diferencovány dle funkce: cytotoxické T lymfocyty přímo napadají a ničí nežádoucí buňky, pomocné T lymfocyty produkují proteiny zvané cytokiny, které aktivují různé složky vnitřního i adaptivního imunitního systému (Abbas et al. 2011). T lymfocyty jsou vytvářeny v brzlíku, a to jak u ptáků, tak u savců (Davison et al. 2008). V periferní krvi se kromě T lymfocytů a B lymfocytů vyskytuje ještě další specifický typ lymfocytů: tak zvané NK buňky (natural killer cells), jejichž úkolem je odstraňovat nežádoucí buňky, ale také regulovat další složky imunitního systému. Všechny výše zmíněné typy lymfocytů, ačkoli mají odlišné funkce a vznikají odlišným způsobem, se neliší svým vzhledem (Abbas et al. 2011) a v leukocytárním profilu proto spadají do stejné kategorie. Zvýšený podíl lymfocytů v leukocytárním profilu jedince oproti normálnímu stavu je označován jako lymfocytóza (Campbell et Ellis 2007). Obecně může lymfocytóza poukazovat na parazitickou infekci nebo na imunologickou výzvu různého typu

(Ochs et Dawson 2008). Silná lymfocytóza, při které jsou v krvi přítomny abnormálně velké lymfocyty s nezvykle vyhlížejícím jádrem, může být příznakem lymfocytické leukémie (Campbell et Ellis 2007). Lymfopenie (nízký podíl lymfocytů v leukocytárním profilu) je nejčastěji spojována s nadbytkem kortikosteroidů (Campbell et Ellis 2007) a imunosupresí, ačkoli byla pozorována i u zdravých organismů, které nejsou vystaveny tlaku parazitů (Ochs et Dawson 2008). Kortikosteroidy indukují apoptózu (programovanou buněčnou smrt) lymfocytů, tedy jejich sebedestrukci. Je typická pro akutní infekce, při kterých se vlivem stresu hladina kortikosteroidů zvyšuje (Campbell 2015). Mírná lymfopenie doprovázená zároveň mírnou heterofilií (zvýšený podíl heterofilů) je u ptáků a plazů považována za indikátor stresu (Maxwell 1993). Poměrem heterofilů a lymfocytů se bude dále zabývat kapitola H/L a stres.

2.2.1.2 Monocyty

Monocyty patří mezi fagocyty a představují další důležitou složku vnitřního i adaptivního imunitního systému. Jsou schopny migrovat do postižené oblasti těla, identifikovat mikroby, a prostřednictvím fagocytózy je pohltnout a zneškodnit. Kromě toho také čistí organismus od mrtvých buněk, vylučují cytokiny, které aktivují další typy buněk, a napomáhají k rekonstrukci poškozených tkání. Monocyty vznikají v kostní dřeni, odkud se dostávají do krevního oběhu a pak dále do tkání, kde se přeměňují na makrofágy (Abbas et al. 2011). Tyto buňky jsou vybaveny systémem receptorů, které umožňují rozpoznání mikroorganismů a aktivují fagocytózu. Při fagocytóze jsou nežádoucí částice pohlceny do fagozómů, do kterých je následně uvolněn obsah lysozómů s antimikrobiálními proteiny a enzymy (Davison 2008). Monocytóza, tedy abnormálně zvýšený podíl monocytů v krevním oběhu, typicky značí infekční onemocnění vyvolávající akutní nebo chronický zánět (Campbell 2015), nejčastěji pak zánět granulomatózní (granulom) (Campbell et Ellis 2007). V některých případech se může vyskytnout i v reakci na přítomnost cizího tělesa nebo při nedostatku některých živin (nejčastěji zinku), byla rovněž dokumentována při specifických houbových onemocněních, jako součást reakce na změnu hladiny kortikosteroidů nebo při neoplazii. Zpravidla se vyskytuje společně s heterofilií, neboť heterofily, stejně jako monocyty, jsou schopny fagocytózy, a reagují tudíž na podobné podněty. Při chronickém zánětu lze u ptáků obvykle pozorovat leukocytózu s výskytem zvýšeného podílu monocytů, heterofilů a basofilů,

doprovázenou zároveň anémií. Silná monocytóza společně s anémií byla pozorována u chronické klostridiální infekce (Campbell 2015).

2.2.1.3 Heterofily

Heterofily jsou granulocytární leukocyty, odpovídající přibližně strukturou i funkcí neutrofilům v krvi savců. Jsou charakteristické obsahem acidofilních vřetenovitých granul, které po Romanowově barvení získávají výraznou cihlově červenou barvu (Lucas et Jamroz 1961). Tyto granuly obsahují několik druhů enzymů: fosfatázy, arylsulfatázy, β -glukurodinázy, fosforylázy, lysozomy a další. Na rozdíl od savčích neutrofilů však neobsahují myeloperoxidázy (Maxwell et Robertson 1998). Existují tři základní typy granul, lišící se tvarem, barvivostí a obsahem jádra (Genovese et al. 2013). Heterofily jsou druhým nejpočetnějším typem leukocytů vyskytujícím se v periferní krvi většiny druhů ptáků (Maxwell et Robertson 1998). Vznikají v kostní dřeni, a z krve pak pronikají do tkání, kde po několika hodinách aktivity odumírají (Abbas et al. 2011). Jsou považovány za první obrannou linii v boji proti invazivním patogenům (Genovese et al. 2013). Reagují v raných stádiích zánětlivého procesu a jsou schopny mobilizace již během třiceti minut od zaregistrování prvotních stimulů k nastartování obrany organismu (Maxwell et Robertson 1998). Heterofily plní v imunitním systému vícero funkcí; jednou z nejdůležitějších je fagocytóza. Jsou vybaveny různými druhy receptorů, které ji spouštějí. Patogeny jsou při ní pohlceny do vnitřního prostoru buňky a zachyceny ve fagozómech. Následuje uvolnění obsahu granul (degranulace) do prostoru fagozómu a zneškodnění patogenu. Degranulace může vést i uvolnění mikrobiocidních substancí mimo prostor vlastní buňky v oblasti postižené infekcí. Další významnou funkcí heterofilů (a obecně všech fagocytů) je schopnost vyvolat oxidační (respirační) vzplanutí. Jedná se o proces, při kterém se v rámci krátkého časového úseku výrazně zvyšuje buněčná spotřeba kyslíku. Katalyzátorem je NADPH oxidáza; ta po aktivaci uvolňuje anionty O_2^- , jejichž část se následně váže do molekul peroxidu vodíku. Ty jsou pak zdrojem pro vytváření sloučenin se silným antibakteriálním účinkem. Účinek oxidativního vzplanutí je u ptáků obecně výrazně nižší, než je tomu u savců, a to vlivem nižší produkce kyslíkových aniontů a peroxidu vodíku (Genovese et al. 2013). Heterofilie spojená s celkovou leukocytózou je u ptáků spojována s širokou škálou infekčních onemocnění (bakteriálních, houbových, virových či parazitálních), ale i dalších obtíží, jako například zraněním či otravou

(Campbell et Ellis 2007). Heterofilie doprovázená zároveň lymfopenií je u ptáků považována za spolehlivý ukazatel míry stresu. V odborné literatuře je používán parametr H/L, což je poměr počtu heterofilů a lymfocytů (Gross et Siegel 1983, Maxwell 1993). Obecně se jeho hodnota zvyšuje s rostoucím stresem. Při velmi silném stresu se však může objevit naopak heteropenie (Maxwell et Robertson 1998). Dále se tomuto tématu věnuje kapitola H/L a stres.

2.2.1.4 Eosinofily

Eosinofily jsou dalším typem granulocytů. Vyskytují se ve stejné podobě jak u savců, tak u ptáků. Jsou charakteristické obsahem velkého počtu kulatých uniformních granul (Lucas et Jamroz 1961), která po Romanowově barvení získávají oranžovo-červenou barvu (Campbell 1995). Funkce eosinofilů zatím nebyla v plné šíři objasněna (Campbell et Ellis 2007). Jejich granula obsahují enzymy, které narušují buněčné stěny (Abbas et al. 2011). Změny počtu eosinofilů v krevním oběhu jsou nejčastěji spojovány se zánětlivými procesy nebo přítomností parazitů (Davis et al. 2008). Eosinofilie byla pozorována v reakci na přítomnost vnitřních nebo vnějších parazitů a je také poměrně často spojována s hypersenzitivními reakcemi (alergie). Diskutována je i její spojitost s mykoplazmatickými infekcemi. Eosinopenie je u ptáků pozorována zřídka (Campbell et Ellis 2007), a to nejčastěji v souvislosti se stresem (Davis et al. 2008).

2.2.1.5 Basofily

Basofily jsou granulocyty charakteristické obsahem metachromatických granul (absorpční spektrum použitého barviva se výrazně liší od absorpčního spektra tkáně, dochází tudíž ke spektrálnímu posunu). Barvením dle Romanowova získávají tyto granuly výraznou, tmavě fialovou barvu. Jsou extrémně snadno rozpustné ve vodě, a při kontaktu s vodou tedy okamžitě dochází k jejich zničení (Lucas et Jamroz 1961). Při přípravě krevních nátěrů se tudíž doporučuje vynechat fixaci čistým metanolem (Maxwell 1993). Maxwell et Robertson (1995) zdokumentovali výraznou variabilitu v počtech basofilů u různých druhů ptáků, z čehož část této variability byla vysvětlena faktory věku, pohlaví a environmentálními faktory. Basofily jsou strukturou a funkcí podobné mastocytům (žírným buňkám) (Abbas et

al. 2011), ačkoli jejich funkce ještě nebyla v plné šíři objasněna (Campbell et Ellis 2007). Basofilie je u ptáků poměrně vzácná, a je nejčastěji spojována s počátečními fázemi zánětů a s hypersenzitivními reakcemi. Byla také pozorována v reakci na stres (Campbell et Ellis 2007).

2.2.1.6 H/L a stres

Nespecifický stresový syndrom má obecně velmi podobné znaky u většiny živočichů včetně ptáků, plazů, obojživelníků, savců a ryb. Environmentální stres je reakcí na nepřiměřený tlak na organismus, který může mít povahu fyzikální, chemickou nebo biologickou. Primární reakcí organismu na působení stresoru jsou zvýšený krevní tlak, glykémie, zrychlená frekvence dýchání, svalový tonus a změna hladiny glukokortikoidů v krvi (Cirule et al. 2012). Měření hladiny glukokortikoidů je klasickou metodou pro přesné zjištění míry stresu. Nicméně stres generovaný samotným odchytem jedinců a odběrem vzorků může výsledky při použití této metody výrazně zkreslit, neboť množství kortikosteroidů se rapidně zvyšuje již 2 minuty po odchytu (Davis et al. 2008). Následuje kaskádovitá reakce různých fyziologických systémů, zahrnující i aktivaci složek imunitního systému. Vysoká hladina glukokortikoidů pak po sobě zanechává druhotnou reakci, která může být patrná v rámci několika hodin i dní, během kterých je nemožné získat objektivní vzorky (Cirule et al. 2012).

Změna hladiny kortikosteroidů v krvi způsobuje charakteristické změny v počtu leukocytů v periferní krvi (Davis et al. 2008). Při vysokých hladinách kortikosteroidů (tzn. při působení stresoru) se zvyšuje množství heterofilů (neutrofilů) a snižuje množství lymfocytů, resp. zvyšuje se hodnota jejich podílu (H/L, Gross et Siegel 1983 in Campbell et Ellis 2007). Kortikosteroidy totiž mají vliv na redistribuci lymfocytů a jejich ukládání do tkání; zároveň podporují tvorbu heterofilů a prodlužují dobu jejich setrvání v krevním oběhu (Shini et al. 2010). Kromě toho způsobují i imunosupresi, a mají vliv na snížení tělesné hmotnosti (Cirule et al. 2012). Zjišťování počtů lymfocytů a heterofilů z diferenciálního počtu leukocytů je tudíž alternativní metodou k přímému měření hladiny kortikosteroidů v krvi (Shini et al. 2010). Tato metoda je považována za jednoduchou a velmi spolehlivou, a je často využívána při zjišťování stresu u ptáků a plazů (Maxwell 1993). Její výhodou je zejména skutečnost, že hodnota H/L se oproti hladině kortikosteroidů mění pozvolna: v závislosti na taxonu se jedná o hodiny až dny, (Maxwell 1993). Cirule et al. 2012 uvádí, že stres způsobený manipulací s jedinci sýkory koňadry má vliv na počty heterofilů po 30 až 60 minutách po odchytu, a na

počty lymfocytů 60 až 120 minut po odchytu (testováno na samcích). Tato lhůta ponechává dostatek času na odchyt a odběry krve, aniž by přitom byly výsledky zkresleny.

H/L může proto poukazovat na dlouhodobý environmentální stres, související například se zraněním, nemocí, nedostatkem potravy, ročním obdobím, rozmnožováním či péčí o potomstvo (Campbell et Ellis 2007). Vleck et al. 2000 tuto teorii potvrdili, když porovnávali hladinu kortikosteroidů a parametr H/L u tučňáka kroužkovaného (*Pygoscelis adeliae*) vystaveného různým typům stresorů. Zjistili, že zranění jedinci mají vyšší hodnoty H/L než zdraví jedinci, zatímco hladina kortikosteroidů se mezi těmito dvěma skupinami nelišila. Z toho usoudili, že H/L může být lepším indikátorem chronického stresu. H/L díky tomu nalézá široké použití jako ukazatel dlouhodobé individuální kondice ptáků (viz Vleck et al. 2000, Zulkifli et al. 2000, Bedáňová et al. 2006, Davis et al. 2008, Ochs et Dawson 2008, Quillfeldt et al. 2008).

2.2.2 Erytrocyty

Erytrocyty jsou oválné buňky obsahující ve svém středu oválné jádro (Lucas et Jamroz 1961), které během vývoje prodělávají morfologické změny. Savčí erytrocyty, na rozdíl od ptačích, obsahují jádro pouze asi prvních pět dní svého vývoje (Campbell et Ellis 2007). Imaturní (nezralé) erytrocyty jsou charakteristické méně kondenzovaným chromatinem a jsou snadno rozpoznatelné (Lucas et Jamroz 1961). V krvi ptáků se vyskytují v poměrně vysokém počtu: mohou tvořit až 38 % z celkového počtu erytrocytů (Vinkler et al. 2010).

Erytrocyty jsou z hlediska fyzické kondice v období hnízdění zmiňovány nejčastěji ve spojitosti s anémií (Williams et al. 2004). Anémie je stav, kdy lze v periferní krvi pozorovat snížené množství červených krvinek, nízký hematokrit a nízkou hladinu hemoglobinu (Campbell et Ellis 2007). Tento stav je běžně pozorován u hnízdících samic (Wagner et al. 2008), ačkoli jeho výskyt nebyl ještě zcela objasněn. Některé studie navrhují, že by anémie mohla pramenit z prostého přesměrování energie potřebné na erythropoézu do reprodukčních orgánů (Ronald et al. 1968). Jako potenciální příčina anémie je ale nejčastěji zmiňována vyšší produkce estrogenu. Ten způsobuje zvýšenou produkci žlutkových prekurzorů a mobilizaci vápníkových iontů. Ty jsou pak ve vysokém množství transportovány krví, čímž vychylují osmolaritu a viskozitu krevní plazmy, a způsobují uvolňování vody

z mezibuněčných prostor. (Monaghan et al. 1998 in Wagner et al. 2008). Tímto způsobem by se dal vysvětlit snížený hematokrit, avšak snížené množství červených krvinek tomuto scénáři neodpovídá (Wagner et al. 2008). Zároveň však bylo zjištěno, že estrogen může ve vyšších koncentracích potlačovat tvorbu prekurzorů červených a bílých krvinek v kostní dřeni (Blobel et Orkin 1996 in Wagner et al. 2008). Wagner et al. (2008) tuto variantu ve své práci podporují a doplňují, že hnězdící samice se z anémie zotavují poměrně dlouho, až do období líhnutí. Období anémie je za normálních okolností následováno intenzivní erytropoézou a v krvi lze v této fázi pozorovat vyšší počet imaturních (nezralých) erytrocytů. Proto se podíl imaturních erytrocytů používá jako indikátor anémie (Campbell et Ellis 2007). V současné době je testován i význam anemické hypotézy zbarvení vajec, která předpokládá, že anémie je důsledek ukládání pigmentů do vaječné skořápky (viz kapitola Anemická hypotéza).

3 Cíle a předpoklady

Praktická část se věnuje zkoumání a kvantifikaci vztahů mezi vzhledem vajec a vybranými kondičními parametry samic. Testována bude signální hypotéza protoporfyrinové makulace vaječné skořápky. Na jejím základě je očekávána buď negativní, nebo pozitivní závislost zbarvení vajec na kondičních parametrech samic. Signalizuje-li zvýšená hladina protoporfyrinu vyšší hladinu oxidativního stresu, předpokládá se, že intenzivněji zbarvená vejce budou indikovat fyzicky méně zdatné samice. Intenzivněji zbarvená vejce mohou však být na základě signální hypotézy očekávána i v případě fyzicky zdatných samic, pokud se jedná o indikátor vyšší antioxidační kapacity. Z hlediska anemické hypotézy je očekáváno výraznější zbarvení vajec u samic s vyšším podílem imaturních erytrocytů v krvi.

Vzhled vajec je pro účely této práce zastoupen parametry odstín (hue), sytost (saturation) a jas (brightness) protoporfyrinových skvrn, jejich průměrným počtem (dále počet skvrn), průměrným procentickým zastoupením skvrn (dále procentické zastoupení skvrn), a průměrnou reflektancí podkladové barvy vajec (dále reflektance). Jako kondiční parametry samic byl zvolen poměr procentuálního zastoupení heterofilů a lymfocytů v leukocytárním profilu (dále H/L), procento imaturních erytrocytů z celkového množství erytrocytů (dále podíl imaturních erytrocytů), standardizovaná hmotnost a velikost snůšky. Vysvětlované a vysvětlující proměnné společně s jejich základními statistickými charakteristikami jsou pro přehlednost uvedeny v kapitole Výsledky v tabulce 2.

3.1 Metodika

Modelovým druhem byla sýkora koňadra (*Parus major*). Data byla sbírána v letech 2011, 2012 a 2013 v lokalitě Čimický a Ďáblický háj v Praze Kobylisích o celkové rozloze 0,82 km² (viz Příloha 12 a 13). V lokalitě bylo instalováno 267 hnízdních budek, jejichž obsazenost sýkorou koňadrou se lišila v jednotlivých letech. Popis lokality a terénních prací je detailně popsán v práci Kratochvíloví (2014). Celkově byly za roky 2011, 2012 a 2013 shromážděny záznamy o 93 hnízdicích samicích a jejich snůškách: 25 v roce 2011, 57 v roce 2012, 10 v roce 2013 (reflektance byla zjištěna pouze pro rok 2011: 20 vzorků, a pro rok 2012: 57 vzorků). Odchyceným samicím byly odebrány vzorky krve, zjištěna hmotnost (digitální váha Pesola

PPS200, 200g, $d = 0,02$) a změřena délka tarsu levé nohy (digitální šupléra Kinex type 6040.2, přesnost 0,01mm). Standardizovaná hmotnost byla pak pro každou samici vypočítána jako poměr hmotnosti a délky tarsu.

3.1.1 Zbarvení vajec

Snůšky byly přímo v terénu naskenovány stolním scannerem Epson Perfection V30 (Epson America Inc., California, USA), jehož snímací sklo bylo opatřeno barevnými standardy (viz Příloha 3). Standardizované digitální snímky byly následně analyzovány pomocí softwaru Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems Inc., San Jose, USA), Corel Photo-Paint X6 (Corel, Ottawa, Canada) a ImageJ (Rasband W.S., ImageJ, U.S. National Institutes of Health, Bethesda, USA). Metodika určení parametrů H, S a B zbarvení protoporfyrinových skvrn byla popsána v práci Kratochvílové (2014). Zjišťovaly se HSB souřadnice barvy protoporfyrinových skvrn v programu Adobe Photoshop CS5, kdy výsledná hodnota každého z parametrů byla vypočítána jako průměr z měření všech vajec ve snůšce, přičemž na každém vejci bylo měřeno pět náhodně vybraných skvrn (více viz Kratochvílová 2014). Metodika zjištění počtu skvrn a jejich plošného zastoupení je podrobně popsána v práci Špaténkové (2014). V osvětlené části vejce byl v programu Corel Photo Paint X6 vybrán obdélníkový výřez 150x30 pixelů, ve kterém bylo provedeno nahrazení podkladové barvy bílou barvou a převedení na černobílý snímek. Následně byl analýzou v programu ImageJ vyhodnocen celkový počet skvrn, celkový obsah skvrn, průměrný obsah jedné skvrny a procentické zastoupení skvrn ve výřezu. Výsledná hodnota výše uvedených parametrů byla vypočtena jako aritmetický průměr hodnot pro jednotlivá vejce ve snůšce. Vzhledem ke korelacím mezi výše uvedenými parametry byly pro účely této práce vybrány pouze parametry počet skvrn a procentické zastoupení skvrn (více viz Špaténková 2014).

Podkladová barva vajec byla měřena spektrofotometrem v prostředí s homogenními světelnými podmínkami. Tímto způsobem byla zjištěna reflektance, z níž byly odvozeny barevné znaky charakterizující jas, sytost a odstín pro viditelné spektrum ptáků, viditelné spektrum člověka a ultrafialové spektrum. Pro každý parametr byla následně vypočtena hodnota aritmetického průměru pro celou snůšku. Vzhledem k silným korelacím mezi výše uvedenými parametry byla pro účely této práce zvolena průměrná hodnota reflektance ve viditelném spektru (400 – 700nm) jako dostačující charakteristika zbarvení podkladu vaječné

skořápky. Tato hodnota vznikla jako průměr hodnot reflektance pro všechny vlnové délky v tomto intervalu (dále viz Špaténková 2014). Reflektance vzorků z roku 2013 nebyla zjištěna.

3.1.2 Hematologické parametry

Krevní nátěry byly pořizovány ihned po odběru přímo v terénu, a to takovým způsobem, aby obsahovaly dostatečně velkou oblast rovnoměrně rozetřené, dobře čitelné jedné vrstvy buněk. Jako fixační činidlo nebyl použit methanol (obvykle používaný v případě krve savců), neboť snižuje barvivost basofilů (Maxwell et Robertson 1990 in Vinkler et al. 2010). Po převozu do laboratoře byly krevní nátěry obarveny Pappenheimovou metodou panoptického barvení. Vybrané hematologické parametry byly zjišťovány z takto připravených krevních nátěrů s použitím mikroskopu Olympus CX41 (Olympus, Tokyo, Japan) s imerzním objektivem s tisícínásobným zvětšením.

Metodika vyhodnocení podílu imaturních erytrocytů v celkovém počtu erytrocytů je blíže popsána v práci Bubeníčkové (2016). Z krevních nátěrů byly pořízeny digitální snímky fotoaparátem Olympus UI-1540-C (Olympus, Tokyo, Japan). Ty pak byly pomocí programu Corel Photo Paint X6 převedeny na černobílý rastr a následně analyzovány v programu ImageJ. Nástroj cell-counter je schopen u takto upravených snímků rozlišit zralé erytrocyty od imaturních a spočítat jejich celkové počty. Výsledná hodnota podílu imaturních erytrocytů každého vzorku byla vypočítána jako aritmetický průměr pěti měření (dále viz Bubeníčková 2016). Metodika vychází z práce Vinklera et al. (2010) a Campbell et Ellis (2007).

Diferenciální rozpočet leukocytů byl stanoven na základě metodiky Vinklera et al. (2010), který vychází z práce Lucas et Jamroz (1961) a Campbell et Ellis (2007). Počty jednotlivých typů leukocytů, tedy lymfocytů, monocytů, heterofilů, basofilů a eosinofilů, byly pro každý nátěr zjišťovány ve vzorku leukocytů o počtu 100 až 140. Repeatabilita (opakovatelnost) této metody byla předem ověřena na souboru dat o 29 vzorcích, který nebyl pro účely této práce použit. Výše zmíněnou metodou byly zjištěny absolutní počty lymfocytů, monocytů, heterofilů, basofilů, eosinofilů a imaturních erytrocytů, které byly následně na základě celkové velikosti vzorku převedeny na počty relativní. Jako dostačující parametr vycházející z leukocytárního profilu a představující charakteristiku fyzické kondice byl zvolen parametr H/L. Na základě výzkumů Gross et Siegel (1983, in Campbell et Ellis 2007) a Davies et al.

(2008) je hodnota tohoto parametru dobrým ukazatelem dlouhodobého stresu a individuálního zdravotního stavu u ptáků, a předpokládá se tedy závislost s fyzickou kondicí snášející samice.

3.1.3 Statistická analýza dat

Veškeré statistické analýzy a grafické výstupy byly vypracovány pomocí programů MS Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA) a R (The R Foundation for Statistical Computing c/o, Institute for Statistics and Mathematics, Vienna, Austria).

Data byla podrobena vstupní explorační analýze, při které byly zjištěny základní statistické parametry: minimum, maximum, aritmetický průměr, směrodatná odchylka a variační koeficient v procentech, a to jak v celém souboru dat, tak v pro jednotlivé roky (viz kapitola Výsledky, tabulka 2). Dále byly vyhotoveny korelační matice za použití Spearmanova korelačního koeficientu. Jedná se o korelační matici parametrů vstupujících do lineárních modelů a korelační matici parametrů vycházejících z diferenciálního počtu leukocytů. Za signifikantní hodnotu byla zvolena hodnota $r_s > 0,6$. (viz kapitola Výsledky, tabulky 3 a 4). Normalita dat byla ověřena pomocí Shapiro-Wilk testu. Soubory dat, u nichž nebylo normální rozdělení potvrzeno, byly upraveny pomocí logaritmické transformace, a opětovně testovány, než byly použity v modelech. Pokud nebylo tímto postupem dosaženo normality, byla při následném vytváření modelů závislosti použita Box-Coxova transformace, která hledá nejvhodnější možnou hodnotu exponentu pro umocnění dané vysvětlované proměnné (Box et Cox 1964).

Závislost zbarvení vajec na kondici samic, na velikosti snůšky a na hnízdní sezóně (dále rok) byla ověřována pomocí jednoduchých lineárních regresních modelů (LM). Bylo vyhotoveno pět modelů pro závislé proměnné odstín, sytost, jas, počet skvrn a reflektance. Vysvětlujícími proměnnými byly parametr H/L, podíl imaturních erytrocytů, standardizovaná hmotnost, velikost snůšky a rok. Jednotlivé plné modely byly postupně zjednodušovány až na minimální adekvátní model (MAM) odstraňováním neprůkazných proměnných, přičemž byla při každém kroku sledována změna celkové vysvětlené variability pomocí analýzy variance. Pokud některá proměnná vykazovala signifikantní závislost na roku, byl soubor dat této proměnné rozdělen do jednotlivých let (2011, 2012, 2013) a testován pak pro každý rok

zvláště. Rok 2013 nebyl v takovém případě uvažován vzhledem k nízkému počtu dat. Jako signifikantní hodnota byla vždy uvažována hodnota $p < 0,05$. Signifikantní vztahy byly znázorněny v bodových grafech se znázorněnými konfidenčními intervaly na hladině významnosti 0,05 (viz kapitola Výsledky).

3.2 Výsledky

Z vysvětlovaných proměnných vykazuje vysokou variabilitu procentické zastoupení skvrn (CV = 47,43 %), počet skvrn (CV = 39,24 %) a parametr H (CV = 23,26 %). Z vysvětlujících proměnných je vysoce variabilní parametr H/L (CV = 95,45 %), podíl imaturních erytrocytů (CV = 32,15 %) a reflektance (CV = 22,85 %). Parametry zjištěné z explorační analýzy vstupních dat pro celé soubory dat i pro jednotlivé roky jsou uvedeny v tabulce 2. Z korelační matice byla zjištěna pozitivní korelace mezi počtem skvrn a procentuálním zastoupením skvrn ($r_s = 0,72$, $n = 93$, viz tabulka 3), proto byly analyzovány modely pouze pro počet skvrn. Dále byla zjištěna mírná pozitivní korelace mezi parametry zbarvení protoporfyrinových skvrn H a B ($r_s = 0,59$, $n = 93$, viz tabulka 3), která však nedosáhla hraniční hodnoty. Korelační matice parametrů vycházejících z diferenciální počtu leukocytů vykazovala očekávanou silnou negativní korelaci mezi počty lymfocytů a heterofilů ($r_s = -0,88$, $n = 98$, viz tabulka 4).

Parametry odstín a jas skvrn nebyly pomocí lineárních regresních modelů vysvětleny žádnou z vysvětlujících proměnných. Sytost skvrn se statisticky významně lišila v jednotlivých hnízdních sezónách ($F = 4,644$, $df = 91$, $p = 0,034$, viz tabulka 5), žádná závislost při testování jeho variability pro rok 2011 a 2012 však zjištěna nebyla. Počet skvrn rovněž vykazoval výraznou změnu variability v jednotlivých letech ($F = 27,67$, $df = 91$, $p < 0,001$, tabulka 6): zatímco v roce 2011 nevykázal žádnou závislost, v roce 2012 tento parametr pozitivně souvisel s H/L ($F = 6,847$, $df = 81$, $p = 0,011$, viz obrázek 2, tabulka 7) a podílem imaturních erytrocytů ($F = 3,349$, $df = 80$, $p = 0,040$, viz obrázek 1, tabulka 7). Reflektance podkladové barvy skořápky se statisticky významně lišila v jednotlivých letech ($F = 47,22$, $df = 74$, $p < 0,001$, viz tabulka 8): v roce 2011 vykazovala pozitivní závislost na standardizované hmotnosti samic ($F = 9,161$, $df = 18$, $p = 0,007$, viz obrázek 3, tabulka 9) a v roce 2012 pak na podílu imaturních erytrocytů ($F = 9,47$, $df = 74$, $p = 0,003$, viz obrázek 4, tabulka 10). Plné modely všech vysvětlovaných proměnných jsou uvedeny v Příloze 1 až 11.

Tabulka 2: Přehled vstupních dat a explorační analýza ($n_{\text{celkem}} = 93$, $n_{2011} = 25$, $n_{2012} = 57$, $n_{2013} = 10$)

Celkem					
	Minimum	Maximum	Průměr	SD	CV [%]
H	8,29	27,07	15,93	3,70	23,26
S	14,21	37,47	28,05	4,33	15,45
B	74,73	93,74	83,82	4,10	4,89
Počet skvrn	7,90	64,55	25,98	10,20	39,24
Plošné zastoupení skvrn	0,84	10,68	10,68	5,07	47,43
Reflektance	30,49	102,64	71,48	16,33	22,85
H/L	0,11	5,88	0,90	0,86	95,45
Podíl imaturních erytrocytů	2,57	16,71	7,22	2,32	32,15
Standardizovaná hmotnost	0,65	0,91	0,80	0,05	6,03
Velikost snůšky	2,00	13,00	9,59	1,83	19,11
2011					
	Minimum	Maximum	Průměr	SD	CV [%]
H	10,59	25,10	15,95	3,21	20,12
S	22,72	35,78	30,10	2,76	9,18
B	78,65	92,52	84,74	3,97	4,69
Počet skvrn	10,10	64,55	35,06	11,74	33,49
Procentické zastoupení skvrn	1,03	22,07	12,26	5,36	43,75
Reflektance	73,74	102,64	88,01	8,57	9,74
H/L	0,14	4,21	1,08	0,90	83,81
Podíl imaturních erytrocytů	5,09	16,71	8,58	2,88	33,57
Standardizovaná hmotnost	0,70	0,91	0,81	0,07	8,08
Velikost snůšky	2,00	13,00	9,00	2,37	26,29

2012					
	Minimum	Maximum	Průměr	SD	CV [%]
H	8,29	27,07	15,79	4,16	26,37
S	14,21	37,47	26,85	4,73	17,60
B	74,73	93,74	83,76	4,27	5,09
Počet skvrn	7,90	50,11	23,49	7,55	32,13
Procentické zastoupení skvrn	0,84	20,09	9,00	3,84	42,63
Reflektance	30,49	87,58	65,28	14,09	21,52
H/L	0,11	2,86	0,71	0,56	78,30
Podíl imaturních erytrocytů	2,57	14,78	6,83	1,88	27,56
Standardizovaná hmotnost	0,65	0,89	0,79	0,04	4,77
Velikost snůšky	7,00	13,00	9,69	1,44	14,87
2013					
	Minimum	Maximum	Průměr	SD	CV [%]
H	11,29	19,92	16,48	2,19	13,27
S	21,00	35,00	29,19	3,36	11,52
B	77,56	87,11	82,32	3,00	3,64
Počet skvrn	11,54	24,09	19,44	3,74	19,24
Procentické zastoupení skvrn	4,66	24,61	14,72	5,71	38,81
Reflektance	-	-	-	-	-
H/L	0,34	5,88	1,31	1,39	106,14
Podíl imaturních erytrocytů	4,40	8,94	6,17	1,48	23,93
Standardizovaná hmotnost	0,71	0,86	0,79	0,05	5,82
Velikost snůšky	7,00	13,00	10,50	1,86	17,69

Tabulka 3: Korelační matice zkoumaných proměnných (n = 93, Spearmanův korelační koeficient, signifikantní hodnota $r_s > 0,6$ je vyznačena tučně)

	H	S	B	Počet skvrn	Procentické zastoupení skvrn	Reflektance	H/L	Podíl imaturních erytrocytů	Standardizovaná hmotnost	Velikost snůšky
H	1,00									
S	-0,42	1,00								
B	0,59	-0,38	1,00							
Počet skvrn	0,01	0,31	0,08	1,00						
Procentické zastoupení skvrn	0,05	0,26	-0,02	0,72	1,00					
Reflektance	-0,04	0,30	0,07	0,25	0,16	1,00				
H/L	-0,05	-0,01	-0,03	0,26	0,14	0,06	1,00			
Podíl imaturních erytrocytů	-0,10	0,08	0,14	0,20	0,19	0,40	-0,09	1,00		
Standardizovaná hmotnost	0,02	0,05	0,03	-0,02	0,01	0,09	-0,44	0,19	1,00	
Velikost snůšky	0,07	0,03	0,03	-0,03	-0,01	0,03	0,00	-0,03	0,13	1,00

Tabulka 4: Korelační matice proměnných vycházejících z diferenciálního počtu leukocytů (n = 93, Spearmanův korelační koeficient, signifikantní hodnota $r_s > 0,6$ je vyznačena tučně)

	Lymfocyty	Monocyty	Heterofily	Basofily	Eosinofily
Lymfocyty	1,00				
Monocyty	0,12	1,00			
Heterofily	-0,88	-0,16	1,00		
Basofily	-0,28	-0,30	-0,03	1,00	
Eosinofily	-0,10	-0,18	-0,08	0,08	1,00

Tabulka 5: Minimální adekvátní model závislosti parametru S na roku (n = 93, df = 91, Box-cox transformace $\lambda = 2$)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	169776,9900	78412,8900	2,1650	0,0330
Rok	-83,9900	38,9800	-2,1550	0,0338
Multiple R-squared: 0,0486				

Tabulka 6: Minimální adekvátní model závislosti počtu skvrn na roce (n = 93, df = 91, logaritmická transformace)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	658,5779	124,6002	5,2860	<0,001
Rok	-0,3258	0,0619	-5,2600	<0,001
Multiple R-squared: 0,2331				

Tabulka 7: Minimální adekvátní model závislosti počtu skvrn na parametrech H/L a podíl imaturních erytrocytů v roce 2012 (n = 57, df = 80, logaritmická transformace)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	2,7161	0,1478	18,3820	<0,001
H/L	0,1792	0,0600	2,9860	0,0038
Imaturní erytrocyty	0,0491	0,0174	2,8210	0,0060
Multiple R-squared: 0,1614				

Tabulka 8: Minimální adekvátní model závislosti reflektance na roku (n = 76, df = 74)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	46920,7900	6817,5500	6,8820	<0,001
Rok	-23,2880	3,3890	-6,8720	<0,001
Multiple R-squared: 0,3896				

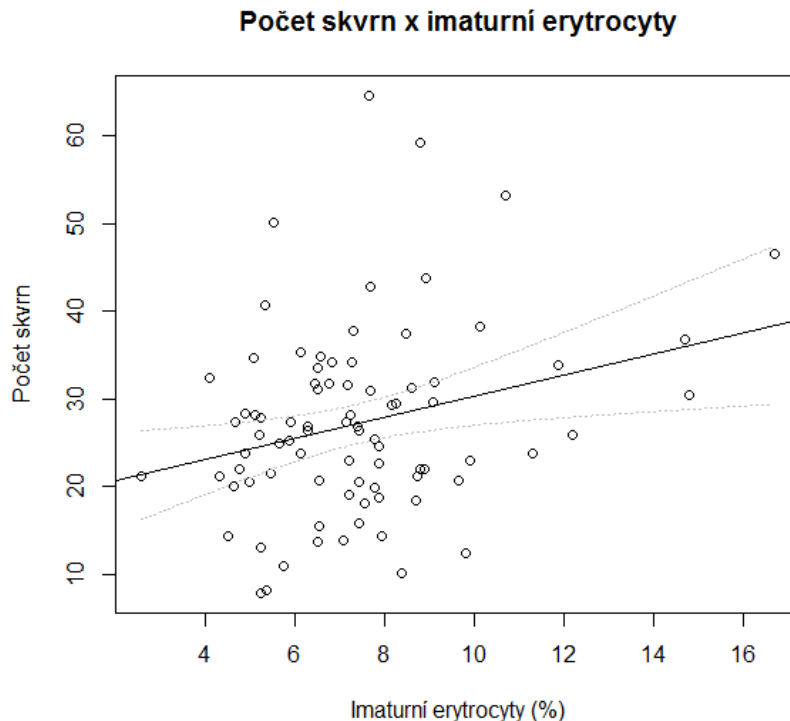
Tabulka 9: Minimální adekvátní model závislosti reflektance na standardizované hmotnosti samic v roce 2011 (n = 20, df = 18).

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	27,5600	20,2200	1,3630	0,1896
Standardizovaná hmotnost	74,8100	24,7200	3,0270	0,0073
Multiple R-squared: 0,3373				

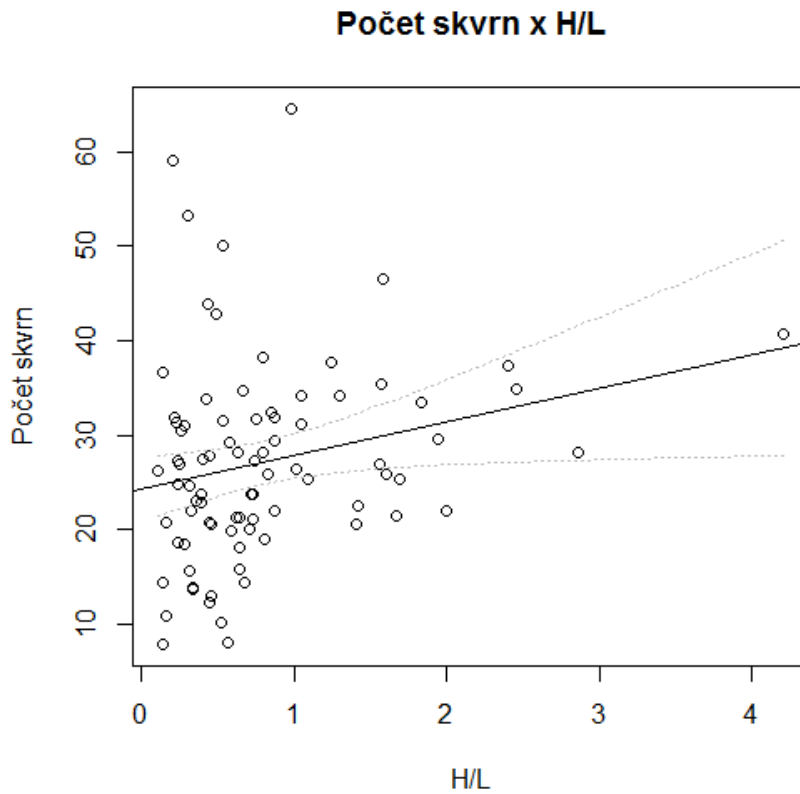
Tabulka 10: Minimální adekvátní model závislosti reflektance na podílu imaturních erytrocytů v roce 2012 (n = 57, df = 74)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	54,5140	5,7700	9,4360	<0,001
Imaturní erytrocyty	2,2770	0,7400	3,0770	0,0030
Multiple R-squared: 0,1135				

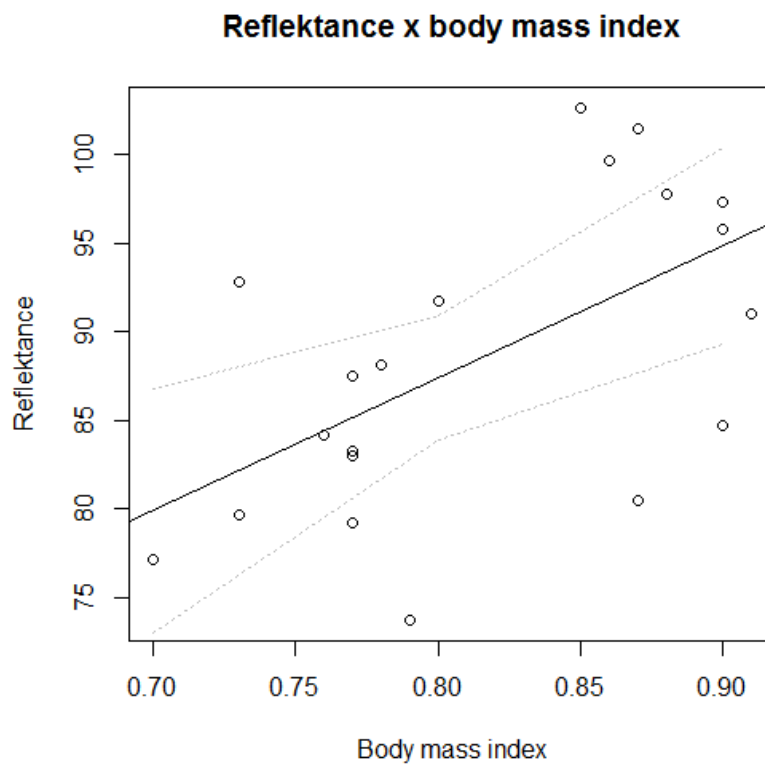
Obrázek 1: Závislost počtu skvrn na podílu imaturních erytrocytů v roce 2012 (n = 57, konfidenční intervaly na hladině významnosti 0,05)



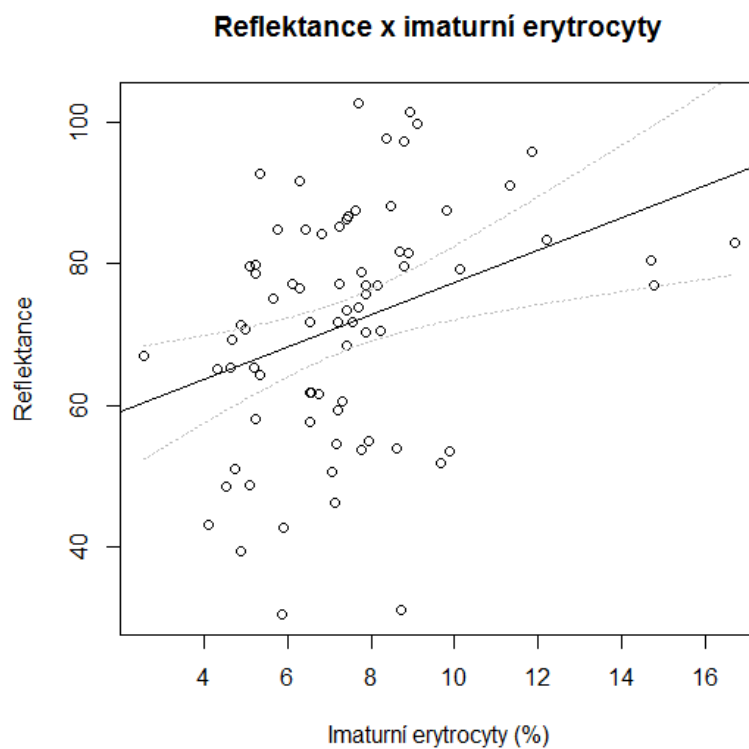
Obrázek 2: Závislost počtu skvrn na parametru H/L v roce 2012 (n = 57, konfidenční intervaly na hladině významnosti 0,005).



Obrázek 3: Závislost reflektance podkladové barvy skořápky na standardizované hmotnosti samic v roce 2011 (n = 20, konfidenční intervaly na hladině významnosti 0,005).



Obrázek 4: Závislost reflektance podkladové barvy skořápky na podílu imaturních erytrocytů v roce 2012 (n = 57, konfidenční intervaly na hladině významnosti 0,005).



3.3 Diskuze

Z výsledků této práce lze vyvodit následující závěry: (1) charakter makulace vaječné skořápky (počet skvrn a reflektance podkladové barvy skořápky) se výrazně mění v hnízdních sezónách. (2) počet protoporfyrinových skvrn vykazuje v některých případech závislost na hematologických parametrech (podíl imaturních erytrocytů, H/L), (3) reflektance podkladu vaječné skořápky v některých případech vykazuje závislost na morfologických parametrech snášejších samic (standardizovaná hmotnost) a jejich hematologických parametrech (H/L),

Využití hematologických parametrů při testování signální hypotézy zbarvení vajec je zatím ojedinělé, ačkoli v jiných oblastech je široce využíváno (viz Davis et al. 2008). V této práci bylo zjištěno, že počet protoporfyrinových skvrn indikuje v některých případech vyšší hodnoty parametru H/L a vyšší podíl imaturních erytrocytů. Současně bylo zjištěno, že vyšší hodnoty průměrné reflektance pozitivně korelují s podílem imaturních erytrocytů. Vyšší průměrná reflektance indikuje tmavší zbarvení podkladu vajec (viz Špaténková 2016) a předpokládá se tedy, že podkladová barva obsahuje více protoporfyrinu (Kennedy et Vevers 1976). Počet skvrn zároveň pozitivně koreluje s procentuálním zastoupením skvrn. Obecně lze tedy na základě těchto zjištění říci, že samice s vyššími hodnotami parametru H/L a vyšším podílem imaturních erytrocytů v krvi snášely více pigmentovaná vejce.

Na základě předpokladu, že H/L je u ptáků ukazatelem dlouhodobého stresu (Gross et Siegel 1983 in Campbell et Ellis 2007) či zhoršeného aktuálního zdravotního stavu (Campbell et Ellis 2007, Davis et al. 2008), lze z těchto výsledků vyvodit, že samice, které jsou vlivem stresu v horší fyzické kondici, snášejí více pigmentovaná vejce, tudíž akumulují v organismu více protoporfyrinu. Zvýšená koncentrace protoporfyrinu zpravidla doprovází biosyntézu hemu (Casini et al. 2001 in Moreno et Osorno 2003) a jeho akumulace v játrech pak generuje oxidativní stres (Vanore et Batlle 1999). Zvýšené hodnoty parametru H/L a zvýšená koncentrace protoporfyrinu vyskytující se současně tudíž mohou poukazovat na oslabení v důsledku nepříznivých infekčních či neinfekčních faktorů, jako například hladovění, nemoc, zranění, parazitismus a další (Campbell et Ellis 2007, Cirule et al. 2012). Výsledky této práce tedy naznačují, že dlouhodobý stres či aktuálně zhoršený zdravotní stav se mohou „propisovat“ do skořápky vajec prostřednictvím zvýšené depozice protoporfyrinu, a mohou tak podávat snadno získatelnou informaci o fyzickém stavu hnízdící samice. Tyto závěry jsou

v souladu s principy signální hypotézy dle Moreno et Osorno (2003), kteří navrhují, že vzhled vajec by mohl podávat informaci o fyzickém stavu hnízdící samice, a odvozeně i budoucí „kvalitě“ jejího potomstva (Giordiano et al. 2012). Bylo zjištěno, že samice s vyšší oxidační kapacitou jsou schopny investovat více antioxidantů do žloutku a zajistit tak vyšší životaschopnost potomstva (Giordiano et al. 2012). Závislost mezi množstvím protoporfyrinu uloženého do skořápky vajec a hematologickými parametry byla u sýkory koňadry potvrzena i v práci Hargitai et al. (2016b), která vykazuje pozitivní korelaci intenzity protoporfyrinových skvrn a počtu lymfocytů v krvi. To je zcela opačný trend, než jaký byl zjištěn v rámci této práce. Hargitai et al. (2016b) považuje vyšší počet lymfocytů za indikátor parazitického onemocnění, nicméně rovněž navrhuje, že by mohl reflektovat lepší imunokompetenci, a odvozeně lepší fyzickou kondici. V tom případě by samice prostřednictvím depozice protoporfyrinu signalizovaly vyšší oxidační kapacitu a lepší schopnost vypořádat se s oxidativním stresem (Moreno et Osorno 2003).

Zvýšený podíl imaturních erytrocytů v krvi obecně poukazuje na probíhající krvetvorbu v důsledku nejrůznějších příčin. Vysoký podíl imaturních erytrocytů může být i indikátorem prodělané anémie, což je poměrně běžný jev u hnízdících samic ptáků (Wagner et al. 2008). Jeho souvislost s vyšší depozicí protoporfyrinu do skořápky vajec, která byla zjištěna v této práci, odpovídá předpokladu, že protoporfyrin je vedlejším produktem krvetvorby (Casini et al. 2001 in Moreno et Osorno 2003). Předpokládáme-li tedy, že zvýšený podíl imaturních erytrocytů v celkovém profilu erytrocytů je indikátorem dříve prodělané anémie, lze učinit závěr, že intenzivněji pigmentovaná vejce svědčí o zhoršené fyzické kondici hnízdící samice. Vzhledem k tomu, že krev byla samicím odebírána ve fázi péče o vylíhlé potomstvo, lze předpokládat, že případnou anémií trpěla právě při snášení vajec. I v tomto případě se jedná o argument podporující signální hypotézu zbarvení vaječné skořápky a korespondující s anemickou hypotézou dle De Coster et al. (2012), kteří očekávají větší množství protoporfyrinu uloženého ve skořápkách vajec u anemických samic. Ve svém pilotním výzkumu potvrzují, že podíl imaturních erytrocytů signifikantně souvisí s anémií (anémie zde byla vyjádřena na základě počtu krev-sajících parazitů). Samotný vztah mezi anémií a protoporfyrinovou pigmentací však u nich, na rozdíl od této práce, zjištěn nebyl. Anemická hypotéza jakožto jedna z variant signální hypotézy zbarvení vaječné skořápky zatím nedisponuje dostatečnou experimentální základnou pro porovnání dosažených výsledků.

Překvapivě byla zároveň pozorována pozitivní závislost mezi indexem tělesné hmotnosti a průměrnou reflektancí, která naznačuje, že větší a těžší samice snášely vejce s tmavším podkladem, obsahující více protoporfyrinu. Toto zjištění vykazuje opačný trend závislosti než výše uvedené závěry založené na vyhodnocení závislosti pigmentace na hematologických parametrech, avšak tato rozdílnost může být částečně vysvětlena oddělenými mechanismy, kterými je tvořena podkladová barva na rozdíl od skvrn (Mikšík et al. 1976), odlišnými environmentálními podmínkami v jednotlivých hnízdních sezónách či zkreslením výsledků při nízkém počtu vstupních dat (v roce 2011 byla zjištěna průměrná reflektance pouze u 20 snůšek, v tomto roce zároveň nebyl zjištěn žádný vztah mezi makulací vajec a hematologickými parametry samic). I morfologické parametry ve vztahu k pigmentaci vykazují nejednoznačné výsledky. Například Stoddard et al. (2012) ve svém výzkumu zjistil, že těžší samice sýkory koňadry snášely méně pigmentovaná vejce. Zároveň je potřeba zvážit i význam genetických faktorů při posuzování vzhledu skořápky (Gosler et al. 2000).

Evidence o vztahu mezi protoporfyrinovou makulací vajec a fyzickou kondicí hnízdicích ptáků je poměrně rozsáhlá a umožňuje mezidruhové porovnání. Intenzivněji pigmentovaná vejce indikovala horší fyzickou kondici například v případě křepelky japonské (*Coturnix coturnix japonica*, Duval et al. 2013b), kanára divokého (*Serinus canaria*, Hargitai et al. 2016a) a sýkory modřinky (*Cyanistes caeruleus*, Martínez-de la Puente et al. 2007). V případě sýkory modřinky byla překvapivě pozorována i opačná závislost (intenzivněji pigmentovaná vejce indikovala lepší fyzickou kondici, Sanz et García-Navaz 2009, Holveck et al. 2012). Signální hypotéza však v mnoha případech vykazuje i určité nedostatky, a to zejména z hlediska chybějící evidence o budoucí životaschopnosti potomstva či o zvýšeném úsilí samce při péči o snůšku. Takové výsledky vykazuje čejka chocholatá (*Vanellus vanellus*, Bulla et al. 2012), špaček obecný (*Sturnus vulgaris*, Hornsby et al. 2013), poštolka obecná (*Falco tinnunculus*, Martínez-Padilla et al. 2010), křepelka japonská (*Coturnix coturnix japonica*, Duval et al. 2013b), ale i sýkora koňadra (*Parus major*, Stoddard et al. 2012). Úsilí samce je v těchto experimentech kvantifikováno většinou pomocí videozáznamů jako počet návštěv hnízda, či na základě jeho fyzické kondice, která by se měla snižovat se zvyšujícím se úsilím. Reynolds et al. (2009, in Bulla et al. 2012) zároveň namítá, že aplikace signální hypotézy u druhů hnízdicích v dutinách je diskutabilní, vzhledem ke špatným světelným podmínkám, ve kterých může samec jen velmi obtížně hodnotit vzhled vajec. Zvažování signální hypotézy

pak zcela zamítá v případech, kdy je o snůšku pečováno jen jedním z rodičů. Předmětem této práce však nebylo vyhodnocení participace samce v péči o snůšku a nemůže tudíž přispět do této diskuze vlastními výsledky.

Rozpory lze nalézt i z hlediska použité metody vyhodnocování charakteru protoporfyrinové pigmentace. V této práci byla použita vizuální metoda hodnocení makulace s využitím grafického softwaru, která vykazala signifikantní opakovatelnost. Brulez et al. (2013, 2014) však porovnávali data získaná vizuálním hodnocením pigmentových skvrn dle Gosler et al. (2000, „spot scoring method“) a pomocí grafického softwaru s přímým měřením koncentrace protoporfyrinu obsaženého ve skořápce. Upozorňují, že jejich data mají při použití těchto metod velmi slabou opakovatelnost, a to i v případě, že jsou vyhodnocovány jedním pozorovatelem v homogenních podmínkách. Zjistili sice korelace mezi koncentrací pigmentu a výsledky dosaženými oběma výše uvedenými metodami, ale nepovažují tyto korelace za dostatečně silné, aby mohlo vizuální hodnocení skvrn spolehlivě charakterizovat protoporfyrinovou pigmentaci. Rovněž tak Cassey et al. (2012) upozorňují, že přímé měření koncentrace pigmentů na skořápkách kosa černého (*Turdus merula*) a drozda zpěvného (*Turdus philomenos*) vykazuje jiné charakteristiky než měření reflektance kapalinovou spektrofotometrií. Přitom však výše zmíněné metody jsou intenzivně používané a opakovatelnost v těchto publikacích je uspokojivá: viz například Gosler et al. (2005), Sanz et García-Navaz (2009), Hierro et de Neve (2010), García-Navaz et al. (2011), Bulla et al. (2012), Duval et al. (2013b), Giordiano et al. (2015), Hargitai et al. (2016b), Špaténková (2016). Měření koncentrace navíc neumožňuje kvantifikovat charakter plošné distribuce skvrn, u které byla v mnoha případech zjištěna signifikantní závislost na parametrech fyzické kondice samic.

Vzhled vajec se signifikantně lišil v jednotlivých hnízdních sezónách. Ačkoli předmětem této práce nebylo vyhodnocení environmentálních podmínek v jednotlivých letech, lze předpokládat, že se jedná o příčinu této výrazné variability. Rozhodujícími faktory mohou být klimatické podmínky a s tím spojená dostupnost potravy, abundance predátorů a parazitů, či výskyt sezónních onemocnění, které mají vliv na zdraví a fyzickou kondici ptáků. Většina dostupných publikací pracuje pouze s daty z jedné hnízdní sezóny a neumožňuje tak porovnání zjištěné variability.

3.4 Závěr

Tato diplomová práce je shrnutím nejnovějších poznatků v oblasti pigmentace ptačích vajec. Zaměřuje se zejména na aktuálně diskutované hypotézy, které byly navrženy za účelem vysvětlení její variability v případě protoporfyrinové pigmentace. Těmi jsou signální hypotéza dle Moreno et Osorno (2003) a od ní odvozená anemická hypotéza dle De Coster et al. (2012).

Základní myšlenka signální hypotézy vychází z předpokladu, že vzhled vajec podává informaci o fyzické zdatnosti samice a její snůšky, a měl by tak ovlivňovat chování partnera. Její uplatnění v případě protoporfyrinové pigmentace je zatím nejasné. Hypotéza přitom zahrnuje obě teoretické varianty: větší množství protoporfyrinu uloženého do skořápky vajec může znamenat jak dobrou, tak i špatnou fyzickou kondici. V případě anemické hypotézy se pak usuzuje, že může poukazovat na anémii. V rámci této práce byl testován možný vztah mezi makulací vajec sýkory koňadry a fyzickou zdatností hnízdících samic. Pro vyjádření fyzické zdatnosti byla použita standardizovaná hmotnost a vybrané hematologické parametry (H/L a podíl imaturních erytrocytů), které mohou velmi dobře reflektovat zdravotní stav a celkovou kondici ptáků. Bylo zjištěno, že počet protoporfyrinových skvrn v hnízdní sezóně 2012 pozitivně koreloval s parametrem H/L a podílem imaturních erytrocytů, a reflektance v roce 2012 rovněž pozitivně korelovala s podílem imaturních erytrocytů. Tyto výsledky částečně podporují signální hypotézu zbarvení vaječné skořápky a naznačují, že více pigmentovaná vejce indikují zhoršenou fyzickou kondici samice. Zároveň se jedná i o argument podporující anemickou hypotézu. Oproti tomu bylo rovněž zjištěno, že reflektance v roce 2011 pozitivně korelovala se standardizovanou hmotností samic, což poukazuje na opačný trend interpretace signální hypotézy. Nicméně tento výsledek vznikl na základě malého vzorku dat a může být zkreslen.

Ačkoli tato práce nevykazuje žádné obecné závěry, její výsledky podporují tvrzení, že vzhled vajec může v některých případech informovat o fyzické kondici hnízdící samice. Vzhledem k vysoké diverzitě dostupných výsledků v této oblasti je nasnadě, že zbarvení ptačích vajec je komplexním znakem, který je ovlivňován jak geneticky, tak i mnoha dalšími faktory. Pro budoucí výzkum bude pravděpodobně nezbytné využití multifaktorových analýz a zahrnutí dalších parametrů. Vysvětlení variability v charakteru protoporfyrinové makulace by

umožnilo nedestruktivní posuzování kvality genofondu či aktuální fyzické kondice a našlo by široké využití například v konzervační biologii.

Seznam použitých zdrojů

ABBAS A. K., LICHTMAN A. H. H., PILLAI S., 2011: *Cellular and Molecular Immunology* (7th edition). Elsevier Health Sciences, Philadelphia, USA.

BAIRD T., SOLOMON S. E., TEDSTONE D. R., 1975: *Localisation and characterisation of egg shell porphyrins in several avian species*. *British Poultry Science* 16: 201-208.

BEDÁŇOVÁ I., VOŠLÁKOVÁ E., VEČEREK V., PIŠŤKOVÁ V., CHLOUPEK P., 2006: *Haematological Profile of Broiler Chickens under Acute Stress Due to Shacling*. *ACTA VET. BRNO* 76: 129-135.

BOX G. E. P., COX D. R., 1964: *An analysis of transformations*. *Journal of the Royal Statistical Society B* 26: 211-246.

BROWN M. E., 1996: *Assessing body condition in birds*. *Current Ornithology* 13: 67-135.

BRULEZ K., CASSEY P., MEESON A., MIKŠÍK I., WEBBER S. L., GOSLER A. G., REYNOLDS S. J., 2014: *Eggshell spot scoring methods cannot be used as a reliable proxy to determine pigment quantity*. *Journal of Avian Biology* 45: 94-102.

BUBENÍČKOVÁ K., 2016: *Variabilita zbarvení vaječné skořápky*. Bakalářská práce, Fakulta životního prostředí České zemědělské univerzity v Praze.

BULLA M., ŠÁLEK M., 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.

CAMPBELL T. W., 1995: *Avian Hematology and Cytology*, Iowa State Press, USA.

CAMPBELL T. W., 2015: *Exotic Animal Hematology and Cytology* (4th edition). Wiley Blackwell, Danvers, Massachusetts, USA.

CAMPBELL T. W., ELLIS C. K., 2007: *Avian and exotic animal hematology and cytology* (3rd edition). Blackwell, Ames.

CASSEY P., EWEN J. G., BLACKBURN T. M., HAUBER M. E., VOROBYEV M., MARSHALL N. J., 2008: *Eggshell colour does not predict measures of maternal investment in eggs of Turdus thrushes*. *Naturwissenschaften* 95: 713-721.

CASSEY P., MIKŠÍK I., PORTUGAL S. J., MAURER G., EWEN J. G., ZARATE E., SEWELL M. A., KARADAS F., GRIM T., HAUBER M. E., 2012: *Avian eggshell pigments are not consistently correlated with colour measurements or egg constituents in two Turdus thrushes*. *Journal of Avian Biology* 43: 503-512.

CIRULE D., KRAMA T., VRUBLEVSKA J., RANTALA M. J., KRAMS I., 2012: *A rapid effect of handling on counts of white blood cells in a wintering passerine bird: a more practical measure of stress?* *Journal of Ornithology* 153: 161-166.

DAVIES N. B., 2000: *Cuckoos, Cowbirds and Other Cheats*. T & A. D. Poyser, London.

DAVIS A. K., MANEY D. L., MAERZ J. C., 2008: *The use of leukocyte profiles to measure stress in vertebrates: a review for ecologists*. *Functional Ecology* 22: 760-772.

DAVISON F., KASPERS B., SCHAT K. A., 2008: *Avian Immunology*. Elsevier Ltd., London, UK.

DE HIERRO L. M. D., DE NEVE E., 2010: *Pigment limitation and female reproductive characteristics influence egg shell spottiness and ground colour variation in the house sparrow (Passer domesticus)*. *Journal of Ornithology* 151: 833-840.

DEEMING D. CH., REYNOLDS S. J., 2015: *Nests, Eggs and Incubation: New ideas about avian reproduction*. Oxford University Press, UK.

DUVAL C., CASSEY P., LOVELL P. G., MIKŠÍK I., REYNOLDS S. J., SPENCER K. A., 2016: *Maternal influence on eggshell maculation: implications for cryptic camouflaged eggs*. *Journal of Ornithology* 157: 303-310.

DUVAL C., CASSEY P., MIKŠÍK I., REYNOLDS S. J., SPENCER K. A., 2013a: *Condition-dependent strategies of eggshell pigmentation: an experimental study of Japanese quail (Coturnix coturnix japonica)*. *Journal of Experimental Biology* 216: 700-708.

DUVAL C., CASSEY P., LOVELL P., MIKŠÍK I., REYNOLDS S. J., SPENCER K. A., 2013b: *Eggshell appearance does not signal maternal corticosterone exposure in Japanese quail: an experimental study with brown-spotted eggs*. Plos One: published online (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0080485>).

FARGALLO J. A., LOPÉZ-RULL I., MIKŠÍK I., ECKHARDT A., PERALTA-SÁNCHEZ J. M., 2012: *Eggshell pigmentation has no evident effect on offspring viability in common kestrels*. Evolutionary Ecology 28: 627-637.

FROSTIN R. B., DOUCET S. M., CHRISTIANS J. K., 2016: Haematocrit, eggshell coloration and sexual signaling in the European starling (*Sturnus vulgaris*). BMC Ecology (published online: <https://bmcecol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12898-016-0084-x>).

GARCÍA-NAVAZ V., SANZ J. J., MERINO S., MARTÍNEZ-DE LA PUENTE J., LOBATO E., DEL CERRO S., ROVERO J., DE CASTANEDA R. R., MORENO J., 2011: *Experimental evidence for the role of calcium in eggshell pigmentation pattern and breeding performance in Blue Tits *Cyanistes caeruleus**. Journal of Ornithology 152: 71-82.

GENOVESE K. J., HE H., SWAGGERTY CH. L., KOGUT M. H., 2013: *The avian heterophil*. Developmental and Comparative Immunology 41: 334-340.

GIORDIANO M., COSTANTINI D., PICK J. L., TSCHIRREN B., 2015: *Female oxidative status, egg antioxidant protection and eggshell pigmentation: a supplemental feeding experiment in great tits*. Behavioral Ecology and Sociobiology 69: 777-785.

GOSLER A. G., BARNETT P. R., REYNOLDS S. J., 2000: *Inheritance and variation in eggshell patterning in the great tit *Parus major**. Journal of the Royal Statistical Society B 267: 2469-2473.

GOSLER A. G., HIGMHAM J. P., REYNOLDS S. J., 2005: *Why are bird's eggs spackled?* Ecology Letters 8: 1105-1113.

GRAVELAND J., van der WAL R., van BALEN J. H., van NOORDWIJK A. J., 1994: *Poor reproduction in forest passerines from decline of snail abundance on acidified soils*. Nature 368: 446-448.

HANLEY D., DOUCET S. M., 2009: *Egg coloration in ring-billed gulls (Larus delawarensis): a test of the sexual signalling hypothesis*. Behavioral Ecology and Sociology 63: 719-729.

HARGITAI R., BOROSS N., NYIRI Z., EKE Z., 2016a: *Biliverdin- and protoporphyrin-based eggshell pigmentation in relation to antioxidant supplementation, female characteristics and egg traits in the canary (Serinus canaria)*. Behavioral Ecology and Sociobiology 70: 2093.

HARGITAI R., GERGELY N., MÁRTON H., NYIRI Z., LACZI M., HEGYI G., EKE S., TÖRÖK J., 2016b: *Darker eggshell spotting indicates lower yolk antioxidant level and poorer female quality in the Eurasian Great Tit (Parus major)*. The Auk: 133: 131-146.

HARGITAI R., HERÉNYI M. NAGY G., NYIRI Z., EKE Z., TÖRÖK J., 2016: *Effects of environmental conditions on the egg mass, yolk antioxidant level, eggshell thickness and eggshell spotting patterns of Great Tits (Parus major)*. Journal of Ornithology 157: 995-1006.

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

HOLVECK M-J., GRÉGORIE A., STASZEWSKI V., GUERREIRO R., PERRET P., BOULINIER T., DOUTRELANT C., 2012: *Eggshell spottiness reflects maternally transferred antibodies in Blue Tits*. Plos One: published online (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0050389>).

HORNSBY M. A. W., FAIRN E. R., BARBER C. A., 2013: *Male European Starlings do not use egg spots as a cue to adjust investment in nestlings*. The Wilson Journal of Ornithology 125: 109-115.

ISHIKAWA S., SUZUKI K., FUKUDA E., ARIHARA K., YAMAMOTO Y., MUKAI T., ITOH M., 2010: *Photodynamic antimicrobial activity of avian eggshell pigments*. Federation of European Biochemical Societies Letters 584: 770-774.

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

KRIST M., GRIM T., 2007: *Are blue eggs a sexually selected signal of female collared flycatchers? A cross-fostering experiment*. Behavioral Ecology and Sociology 61: 863-876.

LOPÉZ-RULL I., MIKŠÍK I., GIL D., 2008: *Egg pigmentation reflects female and egg quality in the spotless starling *Sturnus unicolor**. Behavioral Ecology and Sociology 62: 1877-1884.

LUCAS A. M., JAMROZ C., 1961: *Atlas of avian hematology*. United States Department of Agriculture, Washington, USA.

MARTÍNEZ-DE LA PUENTE J., MERINO S., MORENO J., TOMÁS G., MORALES J., LOBATO E., GARCÍA-FRAILE S., 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.

MARTÍNEZ-PADILLA J., DIXON H., VERGARA P., PÉREZ-RODRÍGUEZ L., FARGALLO J. A., 2010: *Does egg coloration reflect male condition in birds?* Natuwissenschaften 97: 469-477.

MAXWELL M. H., 1993: *Avian blood leukocyte responses to stress*. World's Poultry Science Journal 49: 34-43.

MAXWELL M. H., ROBERTSON G. W., 1995: *The avian basophilic leukocyte: a review*. World's Poultry Science Journal 51: 307-325.

MAXWELL M. H., ROBERTSON G. W., 1998: *The avian heterophil leucocyte: a review*. World's Poultry Science Journal 54: 155-178.

MIKŠÍK I. HOLÁŇ V., DEYL Z., 1976: *Avian eggshell pigments and their variability*. Comparative Biochemistry and Physiology B 113: 607-612.

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

MORALES J., SANZ J. J., MORENO J., 2006: *Egg colour reflects the amount of yolk maternal antibodies and fledging success in a songbird*. Biology Letters 2: 334-336.

MORALES J., VELANDO A., MORENO J., 2008: *Pigment allocation to eggs decreases plasma antioxidants in a songbird*. Behavioral Ecology and Sociology 63: 227-233.

MORALES J., VELANDO A., TORRES R., 2011: *Biliverdin-based egg coloration is enhanced by carotenoid supplementation*. Behavioral Ecology and Sociology 65: 197-203.

MORENO J., LOBATO E., MORALES J., MERINO S., TOMÁS G., PUENTE J. M., SANZ J. J., MATEO R., SOLER J. J., 2006: *Experimental evidence that egg colour indicated female condition at laying in a songbird*. Behavioral Ecology 17: 651-655.

MORENO J., MORALES J., LOBATO E., MERINO S., TOMÁS G., PUENTE J. M., 2005: *Evidence for the signalling function of egg colour in the pied flycatcher Ficedula Hypoleuca*. Behavioral Ecology 16: 931-937.

MORENO J., 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., OSORNO J. L., MORALES J., MERINO S., TOMÁS G., 2004: *Egg coloration and male parental effort in the pied flycatcher Ficedula hypoleuca*. Journal of Avian Biology 35: 300-304.

OCHS C. L., DAWSON R. D., 2008: *Patterns of variation in leucocyte counts of female tree swallow Tachycineta bicolor: Repeatability over time and relationship with condition and costs of reproduction*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 150: 326-331.

QUILLFELDT P., RUIZ G., RIVERA M. A., MASELLO J. F., 2008: *Variability in leucocyte profiles in thin-billed prions Pachyptila belcheri*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part A 150: 26-31.

RONALD K., FOSTER M. E., DYER M. I., 1968: *Physical properties of blood in the red-winged blackbird (Agelaius phoeniceus)*. Canadian Journal of Zoology 46: 157-163.

SANZ J., GARCÍA-NAVAZ V., 2009: *Eggshell pigmentation pattern in relation to breeding performance of blue tits Cyanistes caeruleus*. Journal of Animal Ecology 78: 31-41.

SEZER M., TEKELIOGLU O., 2009: *Quantification of Japanese Quail eggshell colour by image analysis*. Journal of Biological Research 42: 99-105.

SHINI S., HUFF G. R., SHINI A., KAISER P., 2010: *Understanding stress-induced immunosuppression: Exploration of cytokine and chemokine gene profiles in chicken peripheral leukocytes*. Poultry Science 89: 841-851.

SIEFFERMAN L., NAVARA K. J., HILL G., 2006: *Egg coloration is correlated with female condition in eastern bluebirds (Sialia sialis)*. Behavioral Ecology and Sociology 59: 651-656.

SOLER J. J., MORENO J., AVILÉS J. M., MOLLER A. P., 2005: *Blue and green egg-color intensity is associated with parental effort and mating system in passerines: support for the sexual selection hypothesis*. Evolution 59: 636-644.

SOLER J. J., NAVARRO C., CONTRERAS T. P., AVILÉS J. M., CUERVO J. J., 2007: *Sexually selected egg coloration in spotless starlings*. The American Naturalist 171: 183-194.

STODDARD M. C., FAYET A. L., KILNER R. M., HINDE C. A., 2012: *Egg speckling patterns do not advertise offspring quality of influence male provisioning in Great Tits*. Plos One: published online (<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0040211>).

STOKKE B. G., MOKSNES A., RØSKAFT E., RUDOLFSEN G., HONZA M., 1999: *Rejection of artificial cuckoo (Cuculus canorus) eggs in relation to variation in egg appearance among reed warblers (Acrocephalus scipaceus)*. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 266: 1483-1488.

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

TIMBERGEN N., BOREKHUYSEN G. J., FEEKES G. J., HOUGHTON J. C. W., KRUIK H., 1962: *Egg shell removal by the black-headed gull, Larus ridibundus: a behavioral component of camouflage*. Behaviour 19: 74-117.

VANORE A. S., BATLLE A., 1999: *Protoporphyrin IX and oxidative stress*. Free radical research 31: 161-170.

VINKLER M., SCHNITZER J., MUNCLINGER P., 2010: *Haematological health assessment in a passerine with extremely high proportion of basophils in peripheral blood*. J Ornithol 151: 841-849.

VLECK C. M., VERTALINO N., VLECK D., BUCHER T. L., 2000: *Stress, corticosterone, and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adélie penguins*. The Condor 102: 392-400.

WAGNER E. C., STABLES CH. A., WILLIAMS T. D., 2008: *Hematological changes associated with egg production: direct evidence for changes in erythropoiesis but a lack of resource dependence?* The Journal of Experimental Biology 211: 2960-2968.

WANG X. T., ZHAO C. J., LI J. Y., LIAN L. S., WU C. X., DENG X. M., 2009: *Comparison of the total amount of eggshell pigments in Dongxiang brown-shelled eggs and Dongxiang blue-shell eggs.* Poultry Science 88: 1735-1739.

WELBERGEN J., KOMDEUR J., KATS R., BERG M., 2001: *Egg discrimination in the Australian reed warbler (Acrocephalus australis): rejection response toward model and conspecific eggs depending on timing and mode of artificial parasitism.* Behavioral Ecology 12: 8-15.

WILLIAMS T. D., CHALLENGER W. O., CHRISTIANS J. K., EVANSON M., LOVE O., VEZINA F., 2004: *What causes the decrease in haematocrit during egg production?* Functional Ecology 18: 330-336.

ZULKIFLI I., CHE N. M. T., CHONG CH., LOH T. C., 2000: *Heterophil to lymphocyte ratio and tonic immobility reactions to preslaughter handling in broiler chickens treated with with ascorbic acid.* Poultry Science 79: 402-406.

Přílohy

Příloha 1: Plný lineární regresní model pro závislost odstínu skvrn na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti, velikosti snůšky a hnízdní sezóně (n = 93, df = 87, logaritmická transformace)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	44,2287	91,9507	0,4810	0,6320
H/L	0,0201	0,0311	0,6470	0,5190
Podíl imaturních erytrocytů	-0,0098	0,0115	-0,8520	0,3960
Standardizovaná hmotnost	0,5991	0,5813	1,0310	0,3060
Velikost snůšky	0,0101	0,0140	0,7230	0,4710
Rok	-0,0201	0,0457	-0,4570	0,6490
Multiple R-squared: 0,0278				

Příloha 2: Plný lineární regresní model pro závislost sytosti skvrn na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti, velikosti snůšky a hnízdní sezóně (n = 93, df = 87, Box-cox transformace $\lambda = 2$)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	975,0430	87739,4490	2,0940	0,0391
H/L	-35,6500	29,6730	-1,2950	0,1986
Podíl imaturních erytrocytů	9,1320	10,9510	0,1140	0,9092
Standardizovaná hmotnost	-324,3240	554,6790	-0,7200	0,4735
Velikost snůšky	4,8700	13,3120	0,8630	0,3905
Rok	-90,8240	43,5980	-2,0830	0,0402
Multiple R-squared: 0,0719				

Příloha 3: Plný lineární regresní model pro závislost sytosti skvrn na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti a velikosti snůšky v hnízdní sezóně 2011 (n = 25, df = 20)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	33,6623	9,9976	3,3670	0,0031
H/L	-0,9800	0,9005	-1,0880	0,2894
Podíl imaturních erytrocytů	-0,0532	0,2280	-0,2330	0,8180
Standardizovaná hmotnost	-3,6490	12,3556	-0,2950	0,7708
Velikost snůšky	0,0988	0,2787	0,3550	0,7266

Multiple R-squared: 0,0626

Příloha 4: Plný lineární regresní model pro závislost sytosti skvrn na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti a velikosti snůšky v hnízdní sezóně 2012 (n = 57, df = 78, Box-cox transformace $\lambda = 2$)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	864,5450	493,3740	1,7520	0,0837
H/L	-15,8000	40,4800	-0,3900	0,6974
Podíl imaturních erytrocytů	12,8040	11,1430	1,1490	0,2540
Standardizovaná hmotnost	-220,9760	605,1550	-0,3650	0,7160
Velikost snůšky	2,6340	0,1830	0,1830	0,8554

Multiple R-squared: 0,0188

Příloha 5: Plný lineární regresní model pro závislost jasu skvrn na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti, velikosti snůšky a hnízdní sezóně (n = 93, df = 87)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	1546,6421	1618,8843	0,9550	0,3420
H/L	0,6453	0,5475	1,1790	0,2420
Podíl imaturních erytrocytů	0,2099	0,2021	1,0390	0,3020
Standardizovaná hmotnost	5,2064	10,2344	0,5090	0,6120
Velikost snůšky	0,1070	0,2456	0,4350	0,6640
Rok	-0,7306	0,8044	-0,9080	0,3660

Multiple R-squared: 0,0494

Příloha 6: Plný lineární regresní model pro závislost počtu skvrn na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti, velikosti snůšky a hnízdní sezóně (n = 93, df = 87, logaritmičká transformace)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	581,8165	136,8656	4,2510	<0,001
H/L	0,0729	0,0463	1,5750	0,1190
Podíl imaturních erytrocytů	0,0275	0,0171	1,6090	0,1110
Standardizovaná hmotnost	-0,3817	0,8653	-0,4410	0,6600
Velikost snůšky	-0,0114	0,0208	-0,5470	0,5860
Rok	-0,2875	0,0680	-4,2280	<0,001
Multiple R-squared: 0,2792				

Příloha 7: Plný lineární regresní model pro závislost počtu skvrn na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti a velikosti snůšky v hnízdní sezóně 2011 (n = 25, df = 20)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	46,6742	41,7700	1,1170	0,2770
H/L	-0,3752	3,7622	-0,1000	0,9220
Podíl imaturních erytrocytů	0,7985	0,9527	0,8380	0,4120
Standardizovaná hmotnost	-23,5431	51,6218	-0,4560	0,6530
Velikost snůšky	0,1592	1,1642	0,1370	0,8930
Multiple R-squared: 0,0396				

Příloha 8: Plný lineární regresní model pro závislost počtu skvrn na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti a velikosti snůšky v hnízdní sezóně 2012 (n = 57, df = 78, logaritmičká transformace)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	2,9718	0,7958	3,7340	0,0004
H/L	0,1772	0,0653	2,7140	0,0081
Podíl imaturních erytrocytů	0,0491	0,0180	2,7330	0,0078
Standardizovaná hmotnost	-0,0672	0,9761	-0,0690	0,9453
Velikost snůšky	-0,0212	0,0232	-0,9110	0,3652
Multiple R-squared: 0,1704				

Příloha 9: Plný lineární regresní model pro závislost reflektance podkladové barvy skořápky na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti, velikosti snůšky a hnízdní sezóně (n = 77, df = 70)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	4,313e+04	7,889e+03	5,4670	<0,001
H/L	-1,371e-01	2,520e+00	-0,0540	0,9570
Podíl imaturních erytrocytů	6,828e-01	6,893e-01	0,9910	0,3250
Standardizovaná hmotnost	2,162e+01	3,656e+01	0,5910	0,5560
Velikost snůšky	6,204e-02	1,014e+00	0,0610	0,9510
Rok	-2,142e+01	3,917e+00	-5,4670	<0,001
Multiple R-squared: 0,4046				

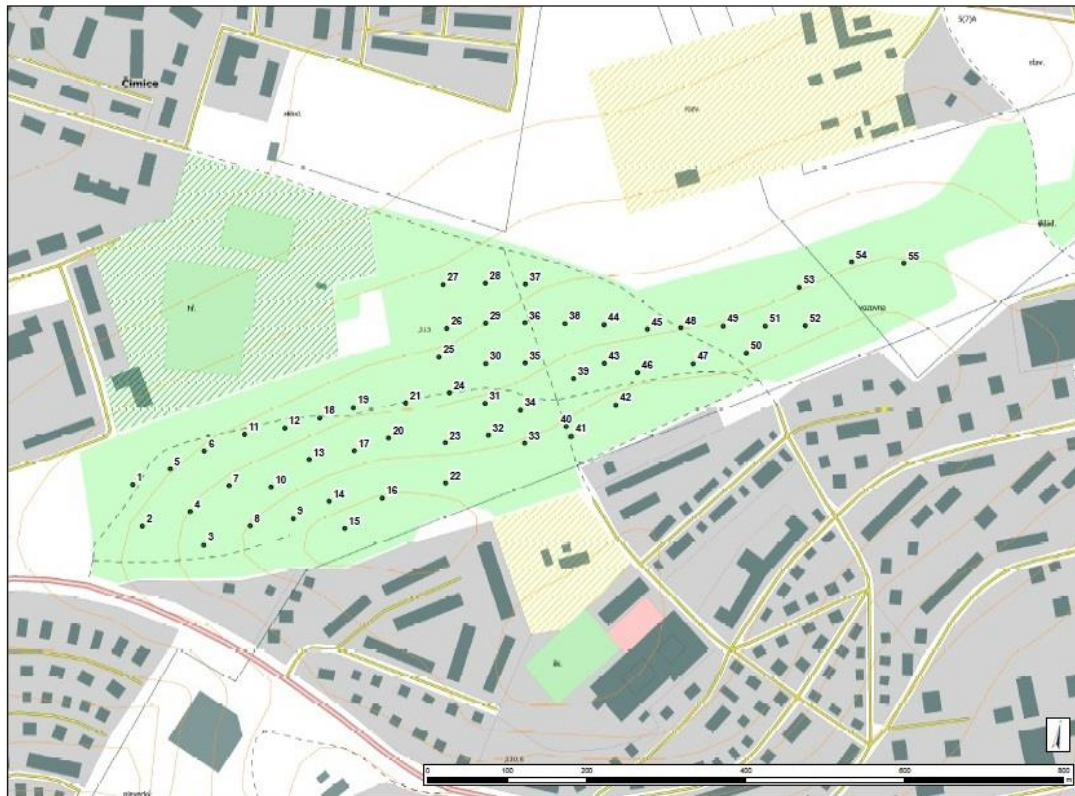
Příloha 10: Plný lineární regresní model pro závislost reflektance podkladové barvy skořápky na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti a velikosti snůšky v hnízdní sezóně 2011 (n = 20, df = 15)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	-8,9796	26,4113	-0,3400	0,7386
H/L	3,9824	2,1898	1,8190	0,0890
Podíl imaturních erytrocytů	-0,6519	0,5253	-1,2410	0,2337
Standardizovaná hmotnost	119,8798	29,7574	4,0290	0,0011
Velikost snůšky	0,1867	1,0007	0,1870	0,8545
Multiple R-squared: 0,5264				

Příloha 11: Plný lineární regresní model pro závislost reflektance podkladové barvy skořápky na parametru H/L, podílu imaturních erytrocytů, standardizované hmotnosti a velikosti snůšky v hnízdní sezóně 2012 (n = 57, df = 71)

	Směrnice	SE	t	p
(Intercept)	0,3988	36,2342	0,0110	0,9913
H/L	3,7596	2,8668	1,3110	0,1939
Podíl imaturních erytrocytů	2,0693	0,7603	2,7220	0,0082
Standardizovaná hmotnost	67,2496	42,2194	1,5930	0,1156
Velikost snůšky	-0,1124	1,2024	-0,0930	0,9258
Multiple R-squared: 0,1503				

Příloha 12: Lokalita Čimický háj v Praze s vyznačením instalovaných hnízdnic budek



Příloha 13: Lokalita Ďáblický háj v Praze s vyznačením instalovaných hnízdnic budek

