

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra zoologie a ornitologická laboratoř



**Existuje kompromis mezi znaky
prekopulačního a postkopulačního výběru?**

Diplomová práce

Petr Zobač

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: Mgr. Miloš Krist Ph.D.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením Mgr. Miloše Krista Ph.D. a za použití uvedené literatury.

V Olomouci dne 30.7.2015

Podpis:

Poděkování:

Chtěl bych velice poděkovat vedoucímu práce Miloši Kristovi PhD. za trpělivé vedení diplomové práce, za všechny jeho rady a zkušenosti jež mi poskytnul a za všechnu námahu jež musel kvůli mně vynaložit. Obrovský dík patří také Mgr. Jakubu Vránovi, člověku, bez jehož rad týkajících se statistického hodnocení a obsluhy programu R bych tuto práci nikdy nenapsal. Za rady týkající se statistických analýz bych chtěl rovněž poděkovat i Mgr. Lence Harmáčkové a Mgr. Anaïs Edme. Anaïs Edme musím společně s Helenou Hejlovou poděkovat také i za většinu provedené laboratorní práce. Touto cestou děkuji i svému otci plk. RNDr. Františku Zobačovi, jehož neustálé výtky mě popoháněly v práci. Poděkovat musím neznámému potápěči, který vyfotil tak krásný záběr dugonga indického (*Dugong dugon*), že při pohledu na jím pořízenou fotografii jsem se uklidnil vždy, když jsem byl rozzuřen z důvodu provádění statistických analýz. Děkuji také pivovaru Radegast, jehož výrobek mě dovedl vyvést z týdenní tvůrčí krize způsobené úsměvem neznámé krásné zrzavé slečny z tramvaje č. 2 ve směru na Neředín krematorium. V neposlední řadě musím poděkovat Bc. Haně Gregorové za to, že musela trpělivě snášet všechny projevy mých labilních emocí a nálad v době psaní této práce.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení: Petr Zobač

Název práce: Existuje kompromis mezi znaky prekopulačního a postkopulačního výběru?

Typ práce: Diplomová práce

Pracoviště: Katedra zoologie a ornitologická laboratoř

Vedoucí práce: Mgr. Miloš Krist Ph.D.

Rok obhajoby práce: 2015

Abstrakt

Pohlavní výběr, jednu z nejdůležitějších hybných sil evoluce, rozdělujeme podle toho, zda probíhá před samotnou kopulací (prekopulační pohlavní výběr) nebo až po kopulaci (postkopulační pohlavní výběr). Typickým znakem samce, který zvyšuje pravděpodobnost úspěchu v prekopulačním pohlavním výběru, je jeho atraktivita. V postkopulačním pohlavním výběru je takovým znakem morfologie spermií vhodná k úspěchu v kompetici spermií nebo při vybírání spermie samicí při skryté volbě. Investice samců do znaků obou typů pohlavního výběru zvyšují jejich fitness. Otázkou je, jak investují samci do těchto znaků, zda investují do atraktivity i morfologie spermií stejným dílem nebo zda převažuje investice vždy do jednoho ze znaků. Na lejsku bělokrkém (*Ficedula albicollis*) jsem zkoumal, zda samci s většími ornamenty (bílá čelní a křídelní skvrna) mají morfologii spermií vhodnější pro úspěch v postkopulačním pohlavním výběru. Výzkum jsem prováděl měřeními délek spermií a jejich jednotlivých komponentů, velikosti čelní a křídelní skvrny a následnou statistickou analýzou. Nalezl jsem silnou pozitivní korelaci mezi velikostí křídelní skvrny dospělých samců a délkou hlavičky jejich spermií. Zároveň s tím jsem našel negativní korelaci mezi velikostí křídelní skvrny a délkou krčku spermie. To naznačuje, že atraktivnější samci mají spermie pomalejší, ale přežívající delší dobu a které mohou být úspěšnější při skryté volbě samicí. Zároveň s tím jsem objevil, že největší vliv na morfologii spermií má čas v průběhu hnízdní sezóny, neboť se s postupující hnízdní sezónou prodlužovaly spermie i jejich hlavičky a krčky, naopak se zmenšovaly bičinky, zároveň s tím se i snižovala variance v morfologii spermií. Nejspíše tomu je z důvodu stále ještě rostoucích varlat. Na tento výzkum mohou navázat další práce, které by k zjišťování vztahu atraktivity samců a jejich morfologie spermií přidaly i porovnání s počtem spermií v ejakulátu a s jejich pohyblivostí a délkou jejich přežívání. Rovněž na tento výzkum mohou navázat další práce, které by se dále zabývali málo zdokumentovaným tématem změn v morfologii spermií v průběhu hnízdní sezóny.

Klíčová slova: trade-off, kompetice spermií, atraktivita, pták, lejsk bělokrký

Abstract

Sexual selection, one of the most important driving force of evolution, can be divided according to if it takes place before copulation (precopulatory sexual selection) or between copulation and fertilization (postcopulatory sexual selection). Typical trait that increase a probability of male success in precopulatory sexual selection is his attractiveness. In the case of postcopulatory sexual selection, sperm morphology is the trait important for success in sperm competition or in cryptic female choice. Investments into both types of sexually selected traits may increase male fitness. However, it is not clear, if males invest in their attractiveness and sperm morphology equally or if they prefer to invest more in one of these traits. I examined in the collared flycatcher (*Ficedula albicollis*), if males with larger secondary sexual ornaments (white forehead patch and wing patch) also have better sperm morphology that could increase success in postcopulatory sexual selection. I examined this link by measuring length of sperms and their components, and forehead and wing patches. Then I statistically tested the relationships between these types of traits. I found a strong positive correlation between wing patch size and sperm head length and a negative one between wing patch size and midpiece length. It suggests that more attractive males have slower sperms, which have better longevity and which can be more successful in cryptic female choice. Moreover, I also found that largest influence on sperm morphology has the time in the breeding season. In the course of the breeding season sperms and their heads and midpieces were longer, sperm tails were shorter and variability in sperm morphology decreased. These effects were probably caused by permanently growing testes. This research could be followed by other works focusing on relation between male attractiveness and their sperm morphology and also number of sperm in ejaculate with their movement capability and longevity. Also this research could be followed by others, which would be focusing on poorly documented topic of changes in sperm morphology during breeding season

Key words: trade-off, sperm competition, attractiveness, bird, collared flycatcher

Obsah

| | |
|--|----|
| 1. Úvod | 1 |
| 1.1. Prekopulační pohlavní výběr | 3 |
| 1.2. Postkopulační pohlavní výběr | 5 |
| 1.3. Morfologie reprodukčního traktu | 5 |
| 1.3.1. Samičí | 5 |
| 1.3.2. Samčí | 6 |
| 1.4. Kompetice spermií | 6 |
| 1.4.1. Obecná morfologie spermií | 6 |
| 1.4.2. Množství a složení ejakulátu | 7 |
| 1.4.3. Význam morfologie spermií pro kompetiční schopnosti ejakulátu | 7 |
| 1.5. Vztah mezi prekopulačním a postkopulačním pohlavním výběrem | 10 |
| 2. Metodika | 12 |
| 2.1. Modelový druh | 12 |
| 2.2. Terénní práce | 15 |
| 2.3. Popis lokality | 15 |
| 2.4. Popis činnosti | 15 |
| 2.4.1. Období příletu na lokalitu | 16 |
| 2.4.2. Období krmení mláďat | 17 |
| 2.5. Laboratorní práce | 18 |
| 2.6. Měření délky spermií a jejich komponentů | 19 |
| 2.7. Měření plochy čelní skvrny | 20 |
| 2.8. Data | 21 |
| 2.9. Statistická analýza | 23 |
| 3. Výsledky | 24 |
| 3.1. Komponenty spermií | 24 |
| 3.2. Ornamenty atraktivity | 26 |
| 3.3. Testování vztahu atraktivity samců a morfologie spermií | 27 |
| 3.4. Vztah velikosti čelní skvrny a morfologie spermií | 27 |
| 3.5. Vztah velikosti křídelní skvrny a morfologie spermií | 30 |
| 3.6. Faktory ovlivňující prekopulační a postkopulační znaky ptáků | 35 |
| 3.7. Testování vlivu kondice | 35 |
| 3.8. Testování vlivu času | 37 |

| | |
|--|----|
| 3.8.1. Vliv dne odběru vzorku..... | 37 |
| 3.8.2. Vliv stáří samce..... | 40 |
| 3.8.3. Vliv přiletu samce na lokalitu..... | 41 |
| 4. Diskuze..... | 45 |
| 4.1. Vztah křídelní skvrny a morfologie spermií..... | 45 |
| 4.2. Vztah čelní skvrny a morfologie spermií..... | 48 |
| 4.3. Vztah komponentů morfologie spermií mezi sebou..... | 50 |
| 4.4. Faktory ovlivňující prekopulační a postkopulační znaky ptáků..... | 51 |
| 4.5. Vliv kondice na atraktivitu a morfologii spermií..... | 51 |
| 4.6. Vliv času na atraktivitu a morfologii spermií..... | 52 |
| 4.6.1. Vliv probíhající hnízdní sezóny..... | 52 |
| 4.6.2. Vliv stáří samce..... | 54 |
| 4.6.3. Vliv přiletu samce na lokalitu..... | 54 |
| 5. Závěr..... | 56 |
| 5.1. Možnosti dalšího výzkumu..... | 56 |
| 6. Literatura..... | 58 |

1. Úvod

Jednou z hybných sil evoluce je bezesporu pohlavní výběr, kdy si jedinec snaží zvolit ideálního partnera nebo soupeří s jiným jedincem o partnera. V jeho rámci dochází k odlišnému reprodukčnímu úspěchu jedinců s různými znaky a tímto pádem i směřování evoluce. Pohlavní výběr probíhá buď mezi jedinci stejného pohlaví, který má většinou formu kompetice o jedince druhého pohlaví, takový pohlavní výběr nazýváme jako intrasexuální, nebo mezi jedinci různého pohlaví, kdy si jedinec snaží zvolit sobě ideálního partnera, takový pohlavní výběr nazýváme jako intersexuální (Andersson 1994). Stejně tak pohlavní výběr rozlišujeme podle toho, kdy probíhá. Pokud probíhá před provedením kopulace, označujeme jej jako prekopulační pohlavní výběr. V rámci něj si jedinec volí dle určité charakteristiky jedince, s nímž se hodlá spářit. Stejně tak probíhá pohlavní výběr od momentu páření po oplodnění. Tento typ pohlavního výběru nazýváme jako postkopulační. Může probíhat jak intrasexuálně prostřednictvím kompetice spermií, tak i intersexuálně buď tak, že samice vybere či zvýhodní gamety od určitého samce ve svém reprodukčním traktu (Birkhead & Pizzari 2002; Bonduriansky & Chenoweth 2009), to nazýváme skrytá volba samice (Eberhard 1996) nebo že samec různě investuje svůj ejakulát do různých samic (Kelly & Jennions 2011; Tourmente *et al.* 2011). Je však otázkou, jak moc spolu prekopulační a postkopulační pohlavní výběr souvisí a jak moc se navzájem ovlivňují.

Obecně živočichové investují do dvou vzájemně ovlivněných znaků dvěma různými způsoby. Zaprvé mohou živočichové investovat do dvou či více propojených znaků vždy ve stejném poměru, který nezávisí na množství zdrojů. Například hypotetická ptačí samice, řídící se pouze tímto typem investic, by s přibývajícím zdroji investovala více jak do velikosti snůšky, tak i do obsahu vajec. Naopak s ubývajícím zdroji by oběma znakům ubírala stejným způsobem. Vztah mezi těmito dvěma znaky by se nám promítnul v grafu jako pozitivní korelace, která by byla způsobena pouze rozdíly v množství zdrojů dostupných jednotlivým samicím (Van Noordwijk & Jong 1986).

Zadruhé mohou živočichové investovat do dvou či více propojených znaků v různém poměru a to i v případě, že zdroje jsou pro všechny stejné. Hypotetické ptačí samice by pak investovaly za stejných podmínek různě buď více do velikosti snůšky, nebo do obsahu jednotlivých vajec. Tento typ investic by se nám v grafu promítnul jako kompromis (trade-off), tedy negativní korelace mezi velikostí vejce a počtem vajec ve snůšce. V tomto vztahu se

však málokdy dostává různým jedincům stejných zdrojů, proto různorodost zdrojů maskuje tento typ alokování do znaků (Van Noordwijk & Jong 1986).

Na základě teoretických úvah nelze určit, který z těchto mechanismů převáží a zda tedy bude vztah negativní nebo pozitivní, proto je potřeba pro různé skupiny živočichů provádět empirické studie.

Jak jsem uvedl na začátku úvodu, samice si vybírají samce podle jeho atraktivity a zároveň určité znaky spermií ovlivňují úspěch v kompetici spermií či při skryté volbě samicí. Reprodukční úspěch samce je tedy ovlivněn jak prekopulačními, tak postkopulačními znaky. Proto si kladu otázku, zda v průběhu evoluce mohlo dojít ke spojení a následně korelaci těchto dvou typů znaků. Hlavní otázkou mé práce tedy je, zda atraktivnější samci mají výhodnější morfologii spermií.

1.1. Prekopulační pohlavní výběr

Jak jsem již naznačil, prekopulační pohlavní výběr probíhá před spářením jedinců. Má dvě podoby. Zaprvé intrasexuální, kdy jedinci jednoho pohlaví dokazují své kvality při soubojích či činnostech dokazujících výdrž (Andersson 1994). Touto podobou se v této práci nebudu zabývat. Druhou podobou je intersexuální prekopulační pohlavní výběr, kdy si jedinci vybírají partnera podle určitých znaků. Během evoluce došlo takto často k vývinu různých ornamentů (Darwin 1859 in Andersson 1994), ozdob či zvláštních typů chování (Edward & Chapman 2011). Pokud si samice vybírají svého partnera podle takového znaku, snaží se o výběr samce s nejvyšší hodnotou daného znaku.

Tyto znaky mohou samicím sloužit k posouzení kvality samců. Například mohou signalizovat aktuální kondici samce. Jako typický příklad takového znaku můžeme uvést hřeben na hlavě kura domácího (*Gallus domesticus*), který je závislý na krátkodobém kondičním základu (Navara *et al.* 2012; Cornwallis & Birkhead 2007a). Některé takové znaky mohou sloužit k tomu, aby samice mohla snadno odhadnout, jaká bude imunita, či reprodukční schopnost daného samce, takovým znakem je například barevnost zobáku kačerů kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) (Peters *et al.* 2004). Jiné znaky mohou značit aktuální sociální stav samce, například hnízdící samci modropláštika rudohřbetého (*Malurus melanocephalus*) mají černé a červené peří. Hnědí samci nehnízdí, pomáhají se snůškou rodičům nebo se alespoň snaží vypadat jako nehnízdící (Rowe *et al.* 2010). Některé znaky atraktivnosti mají čistě genetický základ neovlivněný kondicí (Hegyi *et al.* 2002). U některých znaků je míra vlivu genetického základu a kondice či prostředí sporná, mnohé znaky jsou ovlivňovány obojím, ale v různé míře. Jako typický sporný znak můžeme uvést čelní skvrnu našeho modelového druhu, lejska bělokrkého. Zatímco některé starší práce uvádějí, že velikost skvrny je dána především kondicí (Gustafsson 1995), jiné práce prosazují spíše silnější vliv genetického základu (Qvarnström *et al.* 2006; Hegyi *et al.* 2002). Některé práce udávají, že za ideálních podmínek je znak ovlivněn čistě dědičností, zatímco v horších podmínkách už převládne vliv prostředí (Qvarnström 1999a).

Tyto ornamenty samců signalizují samicím možné přímé i nepřímé zisky. Přímé zisky ornamentů mohou být, pokud jsou ornamenty závislé na kondici, a tudíž značí lepší možnosti poskytování rodičovské péče či poskytování lepších zásnubních darů (Birkhead & Pizzari 2002; Cameron *et al.* 2003) nebo pokud souvisí s vlastností ejakulátu ve smyslu například lepší antibakteriální účinnosti ejakulátu (Rowe *et al.* 2011).

Častěji však atraktivní ornamenty značí nepřímé zisky, kdy pokud se samice páří s kvalitnějším partnerem, je její potomstvo kvalitnější, než kdyby se pářila s méně kvalitním partnerem (Birkhead & Pizzari 2002; Cameron *et al.* 2003). Nepřímé zisky rozdělujeme na geny životaschopnosti, geny atraktivity a genetickou kompatibilitu/komplementaritu, ačkoliv se z tohoto striktního dělení v dnešní době spíše ustupuje. Geny životaschopnosti ornamenty indikují, pokud jsou nějakým způsobem spjaté s kondicí a přežíváním jedince. U některých ptáků jsou většinou samci s většími ornamenty starší a zdravější (Buchholz 1991). Na tyto geny mohou mnohdy ukazovat znaky značící aktuální kondici, například hřeben kohoutů kura domácího (Navara *et al.* 2012; Cornwallis & Birkhead 2007a). Mnohdy na geny životaschopnosti mohou ukazovat i znaky, které jsou pro jedince hendikepem. Přehnané znaky zvyšují riziko predace a nárokují si potřebné látky či jiné náklady (Mautz *et al.* 2013).

Díky takzvanému runaway procesu mohou atraktivnější samci s většími ornamenty přenést na potomky především geny atraktivity. Tento proces, na jehož konci jsou geny atraktivity, je založen na korelaci samičích preferencí a samčích znaků. Z počátku je určitý znak favorizovaný přírodním výběrem (Kokko *et al.* 2002), časem se však geny znaku dostanou do vazby s geny pro preferenci takového znaku a potomci tedy zdědí znak i preferenci (Fisher 1930 in Andersson 1994). Toto může přejít až do fáze, kdy takto selektovaný znak není vhodný pro přežívání jedince. Takovýto přehnaný znak potom může být držen jako trade-off mezi reprodukčním úspěchem z důvodu atraktivity a přežíváním (Fisher 1930 in Kokko *et al.* 2002). Mnohdy volba samce s výraznějšími znaky může samici snížit přímé zisky, například u vlaštovek atraktivní samci s delšími ocasními pery poskytují horší rodičovskou péči, neboť jim delší pera zhoršují let (De Lope & Møller 1993).

1.2. Postkopulační pohlavní výběr

Jak bylo zmíněno na začátku, postkopulační pohlavní výběr probíhá od kopulace do oplodnění. V určitých případech může probíhat i po oplození a to například potratem určitých embryí nebo různou investicí do mláďat. Postkopulační pohlavní výběr má tři hlavní mechanismy. Jsou to kompetice spermií, skrytá volba samice a diferenciální alokace.

Ke kompetici spermií dochází, páří-li se jedna samice s více samci během jedné fertlní periody a dochází tudíž k souboji samců o zplození potomstva prostřednictvím jejich spermií (Parker 1970). Ke skryté volbě samicí dochází, pokud samice ve svém reprodukčním traktu zvýhodní určité spermie a ovlivní, kterým samcem bude oplodněna (Birkhead 1998a; Dixson 2002). Samice mohou použít k oplodnění určité spermie, vypudit sperma nechtěného samce, ovlivnit oplodnění různými vaječnickovými tekutinami nebo mohou potratit embrya zplozená nechtěným samcem (Birkhead 1998a; Rosengrave *et al.* 2008; Dean 2011). Diferenciální alokace je rozdílnost v investicích do embryí či mláďat v závislosti na kvalitě partnera, se kterým potomka zplodil a tím pádem na kvalitě těchto potomků. K tomu může docházet rozdílným obohacováním vajíček o různé látky nebo různou úrovní rodičovské péče (Sheldon 2000).

1.2.1. Morfologie reprodukčního traktu

Pro pochopení postkopulačního pohlavního výběru je důležité zmínit morfologii reprodukčního traktu daného taxonu, v našem případě ptáků.

1.2.1.1. Samičí reprodukční trakt

Samičí reprodukční aparát můžeme rozdělit na vaječník, vejcovod, skořápkovou žlázu a kloaku. Část kloaky, která je vyústěním reprodukčního ústrojí, nazýváme vagina. Skořápkovou žlázu mnohdy nazýváme děloha. Vejcovod dělíme na isthmus, magnum a infundibulum. U většiny ptačích taxonů je zachován pouze levý vaječník a levý vejcovod (Birkhead & Møller 1992). Pro mechanismy postkopulačního pohlavního výběru jsou důležité především struktury, které nazýváme jako tubuly skladující spermie, jakési kapsovitě útvary, do nichž mohou vstoupit mobilní spermie a být v nich vyživovány až po dobu deseti týdnů (Birkhead 1998b; Brillard & Bakst 1990; Freedman *et al.* 2001). U pěvců se tyto tubuly

nachází na spojení dělohy a vaginy, zatímco například u drůbeže se nachází kromě této lokace i v infundibulu (Briskie & Montgomerie 1993). Samice mívá 500 až 20 000 skladovacích tubulů, jejich počet je pozitivně korelován s velikostí těla, velikostí vajíčka a délkou vejcovodu (Birkhead & Møller 1992; Briskie & Montgomerie 1993). Ačkoliv do skladovacích tubulů mohou vstoupit spermie z různých kopulací, nepromíchávají se a vytváří vrstvy (Briskie 1996). Proto je ve výhodě ejakulát z poslední kopulace, neboť spermie z něj jsou uloženy nejbližší lumenu a mohou při ovulaci vajíčka nejdříve tubul opustit. Proto u ptáků dochází k takzvané precedenci posledního spermatu (Briskie & Montgomerie 1993). Po opuštění skladovacích tubulů putují spermie do vejcovodu, k oplodnění dochází nejčastěji v oblasti infundibula (Birkhead & Møller 1992). U drůbeže dochází k plnění různých tubulů spermiemi různých samců (King *et al.* 2002), což v souvislosti s existencí nervové tkáně tubulů směřuje k hypotézám, že skladovací tubuly mohou být prostředkem skryté volby samice (Freedman *et al.* 2001; Birkhead & Møller 1992).

1.2.1.2. Samčí reprodukční trakt

Reprodukční trakt samců ptáků se skládá z varlat uložených na dorzální straně těla, nadvarlat, chámovodů a místa uložení spermií na konci chámovodu na kloakální drsnatině na kloakálním výčnělku, kde jsou spermie uloženy při teplotě nižší, než je teplota těla (Birkhead & Møller 1992). Varlata se zvětšují před začátkem hnízdní sezóny prostřednictvím prodlužováním seminiferních kanálků a intersticiálních buněk, což může vést k variaci v morfologii spermií vytvořených během růstu varlat (Cramer *et al.* 2013b; Birkhead & Møller 1992). Spermie maturují v kloakálním výběžku, kde jsou uloženy při teplotě nižší, než je teplota těla (Kingma *et al.* 2012). Velikost varlat i kloakálního výběžku jsou ukazatelem promiskuity a tím i rizika kompetice spermií (Kingma *et al.* 2012; Birkhead 1998b).

1.2.2. Kompetice spermií

Jsou dva hlavní znaky ejakulátu pro úspěch v postkopulačním pohlavním výběru. Zaprvé je to počet spermií, jež samec poskytne samici při kopulaci. Zadruhé je to relativní oplodňovací účinnost ejakulátu, již rozumíme velikost, morfologii, rychlost, délku přežívání a metabolickou úspěšnost spermií (Birkhead *et al.* 2009).

1.2.2.1. Obecná morfologie spermií

Samčí gametou je spermie. Skládá se ze dvou základních částí a to z hlavičky a bičíku. Hlavička je nositelem genetické informace. V přední části hlavičky nalezneme akrozóm a u ptáků také kapsovitý útvar zvaný perforatorium. Druhá část spermie, bičík, je pohybovým aparátem gamety. Dělíme ho do 4 úseků. Obzvlášť důležitý je druhý, mitochondriální oddíl, který označujeme jako krček a slouží jako energetické centrum buňky. Spermie se pohybují rotací bičíku prostřednictvím fibril zvaných axonémy (Massany 1991). Zatímco v češtině se jako bičík označuje krček a bičík dohromady, pro tuto práci je vhodnější rozdělení podle anglické literatury, kde krček s bičíkem jsou označovány jako flagelum, které je rozděleno na krček (anglicky midpiece) a bičík (anglicky tail). Dle tohoto označení se budu v této práci řídit a bičíkem tedy rozumím část flagela bez krčku.

1.2.2.2. Množství a složení ejakulátu

Kromě morfologie spermií je pro reprodukční úspěch, především při kompetici spermií, ale i při skryté volbě samice, důležité množství ejakulátu a spermií. Zvýší-li samec počet spermií dodaný do samice, zvýší tím i svoji šanci na reprodukční úspěch (Kelly & Jennions 2011; Tourmente *et al.* 2011). Samci také dávají samici různé příděly ejakulátu a spermií podle kvality samice (Kelly & Jennions 2011), podle toho v jaké fázi fertlní periody se samice zrovna nachází, jak bylo zjištěno například u lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) (Michl *et al.* 2002), nebo podle toho, jak je samice geneticky kompatibilní se samcem, což bylo zjištěno například u kura bankivského (*Gallus gallus*) (Reinhold *et al.* 2002). Stejně tak může samec přidělovat rozdílné množství spermatu podle toho, zda se v jeho blízkosti nachází možný kompetitor (Kelly & Jennions 2011), tak je tomu i u člověka (Kilgallon *et al.* 2005). Pro úspěch v kompetici pomáhají také kromě spermií i semenné tekutiny (Birkhead *et al.* 2009).

Adaptace spermií ke kompetici mnohdy vede k pohlavnímu konfliktu, například látky k likvidaci spermií soupeře snižují fitness samice (Mautz *et al.* 2013). Co se týká celkové pohyblivosti, je důležitá především proporce pohyblivých spermií v ejakulátu a rychlost pohybu spermií (Birkhead *et al.* 2009).

1.2.2.3. Význam morfologie spermií pro kompetiční schopnosti ejakulátu

Morfologie spermií je pro kompetici spermií důležitá z různých hledisek, jako jsou rychlost, délku přežívání a schopnost pronikat do skladovacích tubulů. Kvalitu spermií můžeme označit jako komplex znaků a efektů spermií, které jsou také závislé na transportu a ukládání spermií a oplození (Smith 2012).

Důležitým vztahem pro energetickou dynamiku a funkci spermie je především vztah mezi délkou bičíku a krčku spermie (Calhim *et al.* 2011). Tudíž je-li prodloužen bičík, musí být prodloužen i krček spermie. Krček je totiž energetickým centrem spermie. Čím má spermie větší krček, tím více energie tedy produkuje. Velikost krčku může ukazovat na promiskuitu druhu, neboť druhy s většími krčky spermií mají větší riziko kompetice spermií (Lüpold *et al.* 2009). V kompetici spermií však není důležitá pouze rychlost, nýbrž i délka přežívání spermií, která může být určena tak, jak rychle spotřebují metabolicky aktivní spermie všechny zdroje energie a zvláště u živočichů s vnitřním oplozením může být důležitým faktorem úspěchu (Birkhead *et al.* 2009).

Problém velikosti krčku spermií je však v tom, že je-li krček spermie větší, může spermie rychleji spotřebovat energetické zásoby a tím pádem bude mít kratší dobu přežívání. Tak tomu bylo zjištěno například na pěvcích (Immler & Birkhead 2007). Delší spermie tedy mohou být rychlejší, ale dříve ztrácejí rychlost, takže s rostoucím časem pohybu jsou zvýhodňovány kratší spermie (Lifjeld *et al.* 2012). Na rozdíl od krčku, hlavičky spermií naopak snižují rychlost spermie (Lüpold *et al.* 2009). Ptačí spermie s většími hlavičkami jsou sice méně pohyblivé, ale zato mají delší dobu přežívání (Calhim *et al.* 2011). Rychlost spermií je také snižována se stářím samce i spermií samotných. Spermie jsou s věkem poškozovány termodynamickým a oxidačním stresem. Spermie jsou k termodynamickému stresu málo odolné, protože mají kondenzované chromozomy a malý transkripční aparát k opravě poškození. Oxidační stres poškozuje membránu spermií a redukuje pohyblivost (Møller *et al.* 2009; Birkhead *et al.* 2009).

Jak bylo již uvedeno znaky morfologie spermií, důležité pro úspěch v kompetici spermií, jsou ovlivněny především geneticky a jsou-li spermie s těmito znaky úspěšnější, dědí se na potomstvo (Calhim *et al.* 2011). To ovlivňuje variaci ve znacích spermií. U taxonů, u kterých je větší promiskuita, je větší riziko kompetice spermií a postkopulační pohlavní výběr má tedy mnohem větší vliv na selekci znaků spermií. Promiskuitnější druhy mají tedy nižší variaci ve znacích spermií, neboť jsou znaky selektovány k optimu (Calhim *et al.* 2007;

2011). U většiny druhů jsou úspěšnější delší spermie, promiskuitnější druhy mají tudíž spermie delší (Briskie *et al.* 1997).

Přestože většina studií uvádí, že znaky spermií jsou ovlivněny především dědičně, kupříkladu (Cramer *et al.* 2013b), tak naproti tomu ve studii u ryby gupky (*Poecilia reticulata*) byla délka spermií ovlivněna výživou a méně krmení a tudíž menší samci měli spermie kratší (Rahman *et al.* 2013).

Avšak morfologie spermií nemusí být ovlivněna pouze kompeticí spermií. Stejně tak ji může ovlivňovat i skrytá volba samice. Například samice si může vybrat k uskladnění v tubulech právě větší spermie (Snook 2005; Birkhead *et al.* 2009).

Především si ptačí samice vybírají k uskladnění spermie s delšími bičíky. Délka uskladněných spermií je také pozitivně spjata s délkou tubulů (Briskie *et al.* 1997). Výhodou pro proniknutí spermií do skladovacích tubulů může být také větší hlavička. Ta sice snižuje rychlost spermie, zato však zvyšuje její přežívání a zvyšuje dobu, po kterou spermie může proniknout do tubulů (Calhim *et al.* 2011).

Morfologie spermií může být také silně ovlivněna aktuální fází hnízdní sezóny. Varlata ptáků rostou totiž až do začátku hnízdní sezóny. Rostoucí varlata mají velkou variaci v délkách seminiferálních kanálků a proto na začátku hnízdní sezóny může být větší variace v délkách spermií. Takový vztah byl pozorován například u střízlíka zahradního (*Troglodytes aedon*) (Cramer *et al.* 2013b). Dle aktuální fáze hnízdní sezóny se pak mohou projevovat spermie různými kompetičními schopnostmi. Například samci orebice rudé (*Alectoris rufa*), měli rychlejší spermie v jarním období než v letním období (Santiago-Moreno *et al.* 2015).

Je také otázkou až jak moc ovlivňuje morfologie spermií úspěch v kompetici spermií, zda nemá mnohem větší efekt behaviorální strategie samce, například aby byl posledním kopulujícím samcem. Například u promiskuitního střízlíka zahradního nebyl žádný vztah morfologie spermií na paternitu a nebyl rozdíl v morfologii mezi spermiemi podváděných a podvádějících samců (Cramer *et al.* 2013a).

V rámci morfologie spermií nesmíme taky zapomenout zmínit hypotézy, že ne všechny spermie slouží k oplodnění vajíčka. Dle hypotéz může část spermií sloužit k zabíjení spermií kompetitora akrozomálním enzymem (Baker & Bellis 1988; Kura & Nakashima 2000), k ochraně fertálních spermií před spermicidními látkami samičího reprodukčního traktu

nebo k levnému zvětšení počtu spermií v ejakulátu a tím pádem zvýhodnění při skryté volbě samice (Holman & Snook 2006).

1.3. Vztah mezi prekopulačním a postkopulačním pohlavním výběrem

Když jsem zde popsal význam prekopulačního i postkopulačního pohlavního výběru, dostávám se k otázce, zda tyto dva typy pohlavního výběru spolu nejsou v souvislosti, a zda znaky prekopulačního pohlavního výběru nejsou ve vztahu se znaky postkopulačního pohlavního výběru. Pokud jsou tyto znaky jsou ve vzájemném vztahu, je také otázka, jakým způsobem je do nich investováno, jestli (podobně jako investice hypotetických samic do snůšky, jež jsme zmínili na začátku práce (Van Noordwijk & Jong 1986)) samci investují stejným relativním poměrem do znaků spermií i do atraktivity a celková alokace do obou funkcí tak závisí pouze na množství zdrojů nebo zda investují různě a mohou tak v extrémním případě třeba i „vsázet na jednu kartu“.

Zprvė mohou znaky prekopulačního pohlavního výběru značit kvalitu a kondici samce. Samice mohou tudíž některé jeho postkopulační znaky zvýhodnit při skryté volbě. Zadruhé mají kvalitní, a většinou zároveň atraktivní, samci snahu co nejvíce zlepšit znaky spermií a ejakulátu vedoucí k úspěchu v kompetici spermií a tudíž by měly být u nich znaky prekopulačního a postkopulačního pohlavního výběru pozitivně korelované (Mautz *et al.* 2013).

Dle metaanalýzy (Mautz *et al.* 2013) samčí sekundární pohlavní znaky nepredikují počet, délku přežívání, rychlost a délku spermií. V ní byla nalezena pouze silná pozitivní korelace mezi samčími sekundárními pohlavními znaky a délkou přežívání spermií. Vzhledem k tomu, že atraktivní samci mívají větší reprodukční úspěch a délka přežívání spermií je důležitou vlastností pro skrytou volbu samice, je možné, že atraktivní samci jsou zvýhodňováni spíše skrytou volbou než kompeticí spermií.

Znaky prekopulačního pohlavního výběru bychom si měli rozdělit na ty ovlivněné především kondicí a na ty ovlivněné především geneticky. Typickým příkladem znaku zakládaného krátce před reprodukcí je hřeben kohoutů kura domácího (*Galus domesticus*), jež je silně závislý na kondici jedince. U něj byla velikost hřebenu negativně korelována s délkou přežívání spermií, nejspíše v důsledku poškození spermií vyšší hladinou testosteronu, barva hřebenu byla pozitivně korelována s délkou přežívání spermií. Samci s menšími červenějšími hřebeny měli i větší procento pohyblivých spermií. Samce s větším hřebenem však samice preferuje při skryté volbě (Navara *et al.* 2012). U kura domácího je i zajímavé, že dominantní atraktivní samci tvořili mnohem větší počty spermií (Cornwallis & Birkhead 2007b). Naproti tomu u ryby gupky (*Poecilia reticulata*) měli výrazněji zbarvení a tedy lépe krmení samci

v lepší kondici spermie dokonce delší, neboť alokují více karotenů jak do zbarvení, tak do ejakulátu (Mautz *et al.* 2013), nicméně u zpěvného ptactva není morfologie spermií závislá na kondici (Cramer *et al.* 2013b). Na rozdíl od ryby gubky u modropláštíka nádherného byla červenost peří negativně korelována s motilitou spermií. Dochází u něj k trade-offu investic antioxidantů do peří a do spermatu a pokud investuje více antioxidantů do peří, ve spermatu pak chybí. Ač červenost má negativní efekt na kvalitu spermií, červenočerní, rozmnožující se, samci měli větší počet spermií než samci hnědí, kteří jsou helpři, nerozmnožují se nebo se páří potají (Rowe *et al.* 2010).

V případě námi zkoumaných křídelních a čelních skvrn lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) je otázkou, jaký vztah je mezi investicemi do skvrn a do ejakulátu. Nevíme, jestli se snaží samci lejska bělokrkého investovat do obou znaků vždy stejným poměrem, nebo zda se snaží různí jedinci investovat více buď do atraktivity, nebo do kvality ejakulátu. Problematické u těchto znaků je to, že jsou různé názory na kauzalitu velikostí skvrn. Starší práce (Gustafsson 1995) tvrdí, že jsou ovlivněny hlavně prostředím, novější práce (Hegyi *et al.* 2002; Qvarnström *et al.* 2006) tvrdí, že jsou ovlivněny především geneticky.

V této práci se snažím o ověření mojí hypotézy, zda u lejska bělokrkého spolu pozitivně korelují znaky prekopulačního pohlavního výběru, konkrétně plocha čelní a křídelní skvrny, a postkopulačního pohlavního výběru, tedy vhodné délky spermií a jejich komponentů. V případě, že by nebyla hypotéza potvrzena, zvažuji alternativní hypotézu, zda se samci nesnaží investovat pouze do jednoho z typů znaků na úkor druhého. O verifikaci mojí hypotézy jsem se pokoušel u samců lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*) statistickým porovnáním délek jejich spermií a délek jednotlivých komponentů spermií s velikostí jejich ornamentů. Statistické analýze předcházela odběr vzorků spermií ze zdokumentovaných samců lejska bělokrkého, jejich následné focení z mikroskopických preparátů, měření délek spermií a zároveň měření velikostí ornamentů.

2. Metodika

2.1. Modelový druh

Jako modelový druh pro tuto studii jsem si zvolil lejska bělokrkého (*Ficedula albicollis*). Jedná se o ptáka z řádu pěvci (*Passeriformes*) a čeledi lejskovití (*Muscicapidae*), jež je blízkce příbuzná s čeledí drozdovití (*Turdidae*) (Cepák 2008). Tento druh je velmi blízkce příbuzný s lejskem černohlavým (*Ficedula hypoleuca*), s nímž tvořil jeden druh až do posledního glaciálu (Salomonsen 1948 in Cepák 2008), a s lejskem černokrkým (*Ficedula semitorquata*).

Jedná se o druh velikosti menší než vrabec. Samci mají bíle zbarvenou spodinu a svrchu sytě černé zbarvení s bílým čelem, bílým límečkem kolem krku (jež ho odlišuje od lejska černohlavého), dvojitým bílým zrcátkem v křídle a bělavým kostřecem. Mimo hnízdní sezónu jsou kresby méně výrazné a límeček nezřetelný. Černé zbarvení temene a hřbetu se mění na hnědočerné, kostřec šedne a bílá barva břicha a boků se mění na okrovou. Samice má vrch hlavy a hřbet šedohnědé, šedý kostřec a bělavou spodinu. Mladí ptáci se podobají samicím (Cepák 2008).

V Evropě se jeho početnost odhaduje na 1,4 milionu hnízdicích párů (Šťastný *et al.* 2006). V ČR pravidelně hnízdí, jeho početnost se zvyšuje jihovýchodním směrem. V ČR se nachází oblast jeho společného výskytu s lejskem černohlavým a tudíž i hybridní zóna. Hnízdí především ve starších lesních porostech nížin, zejména v lužních lesích, popřípadě v doubravách či bučinách pahorkatin. Jeho početnost se v ČR zvyšuje a zvětšuje se jeho areál (Šťastný *et al.* in Cepák 2008). Během minulého století došlo k výraznému šíření na sever a na západ (Šťastný *et al.* 2006).

Jedná se o tažný druh, jarní přilet nastává od konce března a jeho vrchol nastává v polovině dubna. Podzimní odlet probíhá od poloviny srpna do poloviny září. Táhne jižním a jihovýchodním směrem do východní a jižní Afriky do oblastí řídkých savanových lesů (Cepák 2008b). Jeho přilet na hnízdiště je ukazatelem kvality a důležitým faktorem pro pohlavní výběr (Qvarnström 1999a).

Hnízdí jednotlivě, především monogamně, v dutinách. Hnízdní denzita je velmi vysoká, někdy připomíná až koloniální styl hnízdění, v ČR bylo maximálně zjištěno 15-25

párů na hektar (Šťastný *et al.* 2006). Okolí dutiny si brání. Samci obsadí teritorium s vhodnou hnízdní dutinou a zpěvem a poletováním kolem dutiny se snaží nalákat samici. Většina samců si obhájí více dutin (Král 1991a in Cepák 2008). Mnohdy dochází k tvorbě smíšených páru s lejskem černohlavým (Sætre *et al.* 1997). Základ hnízda je postaven ze suchých stébel trav a starého listí, kotlinka je vystlána jemnými vlákny. Samice začíná snášet vejce nejčastěji koncem dubna. Během sezóny má snůšku pouze jednou, druhá snůška následuje pouze, pokud první byla neúspěšná. Ve snůšce se nejčastěji vyskytuje 6 až 7 vajec. Vejce jsou jednobarevně světle modrá. Délka inkubace je 13-14 dní od snesení posledního vejce, mláďata jsou krmena po 13-18 dní (Cepák 2008).

Lejsek bělokrký se živí živočišnou potravou, ojedinele i rostlinou. Potrava je lovena především sezobnutím z vegetace při třepotavém letu. Hlavní potravou jsou housenky motýlů, pavouci, blanokřídlí, dvoukřídlí, brouci, ploštice, stejnokřídlí, chrostíci a srpice. Dále loví také stínky jako hlavní zdroj vápníku (Cepák 2008).

Samci tohoto druhu se vyznačují dvěma sexuálně selektovanými znaky vnějšího fenotypu. Jsou to čelní bílá skvrna a křídelní bílá skvrna. Čelní skvrna v populaci lejska bělokrkého velmi varíruje. Je otázka, jak je velikost čelní skvrny ovlivněna. Zatímco ve starších pracích (Gustafsson 1995) bylo umělým navyšováním snůšek zjištěno, že samci z početnějších snůšek měli menší čelní skvrny a tudíž že velikost čelní skvrny je dána primárně kondicí, novější práce (Qvarnström *et al.* 2006; Hegyi *et al.* 2002) tvrdí naopak, že je tento znak ovlivněn především genetickým základem a nikoliv kondicí. Například práce (Qvarnström 1999a) tvrdí, že čelní skvrna je ovlivněna dědičně, ale dle podmínek prostředí se mění míra, jak je znak dědičností ovlivněn, neboť za optimálních podmínek byly čelní skvrny synů odpovídající velikosti jako skvrny otců. Tato skvrna je málo ovlivněná věkem, přesto mají dle (Hegyi *et al.* 2002) větší plochu skvrny subadulti než ptáci starší než 2 roky. Samci s větší čelní skvrnou projevují větší snahy o reprodukci oproti samcům s menší skvrnou. Ačkoliv samicím mohou samci s větší skvrnou přinést nepřímé zisky, co se týče přímých benefitů, již tak výhodní pro samice nejsou, neboť v období krmení jsou v horší kondici a tudíž poskytují horší rodičovskou péči (Qvarnström 1999a).

Druhým znakem je bílá skvrna na křídelních letkách. Tato skvrna je také dědivá. Na rozdíl od čelní skvrny je s věkem zvyšována, je velký rozdíl mezi skvrnou subadultního samce a samcem starším dvou let. Velikost této skvrny je pozitivně spjata s přežíváním samce (Hegyi *et al.* 2002).

Lejssek bělokrký je druhem s vysokou úrovní promiskuity. Samice preferují samce, kteří mají větší čelní skvrnu. Pokud je samice v páru se samcem s malou čelní skvrnou, snaží se o extrapárové kopulace se samcem s větší skvrnou. Pokud je samice se samcem s velkou čelní skvrnou, provádí pouze párové kopulace (Gustafsson *et al.* 1995). Následkem toho je u lejska bělokrkého velké riziko kompetice spermií a tudíž má velký význam investice do ejakulátu. Samice u lejska bělokrkého se snaží o ovlivnění paternity svých mláďat behaviorálně tak, že se extrapárové kopulace snaží načasovat do střední fáze své fertilní periody (Michl *et al.* 2002).

2.2. Terénní práce

2.2.1. Popis lokality

Jako výzkumnou lokalitu jsme si stanovili kopec Velký Kosíř. Toto území se nachází severozápadně od Prostějova. Jeho souřadnice jsou 49.5497667N, 17.0496683E. Jedná se o lesnatý vrh v rámci Zábřežské vrchoviny obklopený rovinami oblasti Hornomoravského úvalu. Toto území je chráněné jako Přírodní park Velký Kosíř a v rámci jeho území se nalézají další maloplošná chráněná území: přírodní rezervace Malý Kosíř, národní přírodní památka Růžičkův lom, přírodní památka Andělova zmola a přírodní památka Studený kout. Oblast je pokrytá lesem, převážně smrkovými monokulturami, nicméně našich 6 výzkumných ploch se nacházelo především v částech porostlých listnatým lesem, především pařezinovou doubravou dubu zimního (*Quercus petrae*), a akátinou (*Robinia pseudoacacia*). Na plochách jsou i menší porosty pajasanu žláznatého (*Ailantus altissima*), buku lesního (*Fagus sylvestris*) či habru (*Carpinus betulus*) Na výzkumných plochách je jen velmi málo zastoupeno keřové patro. Bylinné patro je zastoupeno především několika málo druhy trav. Nalezneme zde i xerothermní byliny jako jsou pryšec chvojka (*Euphorbia sipassirias*) či tolita lékařská (*Vincetoxicum hirundinaria*). Všechny 6 výzkumných ploch obsahuje síť hnízdních budek s vletovým otvorem o průměru 32 mm zavěšených ve výšce 160 – 200 cm nad zemí. Budky jsou z vnitřní strany vybaveny aktivovatelnou sklopnou pastí nad vletovým otvorem a zábranou proti predátorům (kunám) pod vletovým otvorem. Budky jsou nejčastěji obsazovány sýkorou koňadrou (*Parus major*), sýkorou modřinkou (*Cyanistes caeruleus*), lejskem bělokrkým (*Ficedula albicollis*) či brhlíkem lesním (*Sitta europaea*), ojediněle zde zahnízdí i lejssek černohlavý (*Ficedula hypoleuca*).

2.2.2. Popis činnosti

Terénní práce k tomuto výzkumu proběhla v letech 2012 a 2013 (pozn. terénní práce proběhla i v roce 2014, ale data z této sezóny nejsou zahrnuta v této práci, neboť laboratorní práce ze vzorků z této sezóny probíhá teprve od prosince 2014 a nestihl bych včas naměřit délky komponentů spermií do uzávěrky odevzdání diplomové práce). Pro práci jsme stanovili dvě odlišná období a to sice období přiletu na lokalitu a období hnízdění. Výzkum během

příletu na lokalitu proběhl pouze v roce 2013 a to od 17.4. do 15.5. Výzkum během hnízdění proběhl v roce 2012 od 25.5. do 18.6. a v roce 2013 od 23.5. do 27.6.

2.2.2.1. Období příletu na lokalitu

Na výzkumu během příletů na hnízdiště se podílel tým pracovníků, z nichž každý dostal za úkol odchyt na jedné výzkumné ploše nebo u velkých ploch na části výzkumné plochy, vždy 35-60 hnízdních budek. Začátek práce proběhl vždy mezi 7. - 9. hodinou ranní, kdy jsme zkontrolovali všechny budky, zapsali jejich obsah, v případě existence hnízda v budce i ptačí druh, stav stavby hnízda a počet vajec či mlád'at. Pokud byla budka prázdná bez základů hnízda, aktivovali jsme past nad vletovým otvorem, tvořenou sklopnou destičkou zajištěnou stéblem trávy. Během tohoto výzkumu byla dočasně odstraněna prkénka pod vletovým otvorem (ochrana před predátory), neboť znemožňovala aktivování pastí. Tato prkénka byla zpětně přimontována do budky v okamžiku, kdy se líhnula první mlád'ata a byla tudíž již jen malá pravděpodobnost, že by kvůli této změně v budce rodiče snůšku opustili. Po provedení kontroly budek a aktivaci pastí jsme pravidelně kontrolovali budky s aktivovanými pastmi a při odchycení ptáka v budce, jsme jej vyndali z budky. V případě že se jednalo o samici lejska bělokrkého či jiný druh ptáka, pouze jsme zaznačili číslo kroužku, popřípadě pokud byl jedinec neokroužkovaný, tak jsme ho okroužkovali. Po zaznačení samice jsme deaktivovali past, po zaznačení jedince jiného druhu jsme past ponechali aktivní. Pokud jsme v budce odchytili poprvé odchyceného samce, tak jsme jej po zaznamenání a případném okroužkování zanesli z výzkumné plochy na terénní stanici mezi plochami. Vyjma prvního dne, kdy jsme poprvé odchycené samce drželi na terénní stanici v klecích (viz. níže) a past jsme v tomto případě nechali aktivovanou, jsme past deaktivovali. Na výzkumné ploše jsme jedince zvažili, určili jsme věk samce (subadultní loňský samec nebo adultní samec starší než rok), změřili délku tarsu, křídla, délky křidelních letek, délky skvrn na křidelních letkách, nafotili čelní skvrnu samce, odebrali krev jako genetický materiál, drážděním kloaky získali vzorek spermatu nebo exkrementů, které často spermie obsahují. Tento vzorek jsme pomocí skleněné kapiláry odebrali a konzervovali v 5 % formaldehydu. V rámci jiného výzkumu jsme zmanipulovali (tj. zvětšili nebo zmenšili) čelní skvrnu. Takto vyšetřené samce jsme označili žlutým plastovým kroužkem a vypustili je zpět na výzkumnou plochu. Během prvního dne výzkumu jsme ponechávali samce v klecích s dostatkem krmení (larev poterníka moučného) vody v klidu a šeru na terénní stanici, samci však měli příliš vysokou mortalitu (4/17), tudíž

jsme od dalšího dne přistoupili k okamžitému vypouštění samců hned po proceduře. Pokud jsme v budce odchytili samce označeného žlutým kroužkem, po zaznamenání kroužku jsme samce pustili a past deaktivovali.

2.2.2.2. Období krmení mlád'at

Terénní práci při výzkumu během období krmení mlád'at výzkum prováděl menší počet pracovníků. V hnízdech s mlád'aty lejska bělokrkého jsme dočasně odmontovali prkénko pod vletovým otvorem k ochraně před predátory a aktivovali jsme past. Past byla trochu jiného charakteru, nebyla tvořena sklopnou destičkou, ale padající mřížkou z drátků, aby se po uvíznutí prvního uvízlého rodiče v budce druhý rodič nebál vletět do budky také. Po přiměřeně dlouhé době, většinou po jedné hodině, v nejzazším čase maximálně do dvou hodin, jsme vyndali rodiče odchycené v budce, zaznamenali jejich kroužky, popřípadě je okroužkovali. Samici jsme zvažili, změřili délku tarsu, křídla a křídelních letek a odebrali krev jako genetický materiál. U samce jsme provedli to samé, ale navíc k tomu jsme opět drážděním kloaky získali spermie, které jsme pomocí skleněné kapiláry odebrali a konzervovali v 5 % formaldehydu, změřili velikost skvrn na křídelních letkách a vyfotografovali čelní skvrnu.

2.3. *Laboratorní práce*

Laboratorní práci jsme prováděli v laboratořích Akademie věd ve Studenci. Jejím účelem bylo nafotit spermie ze vzorků spermatu konzervovaných v 5 % formaldehydu. Tím že se výzkum prováděl až v laboratoři ze zakonzervovaných vzorků, jsme se bohužel připravili o možnost měření rychlosti spermií, procenta hybných spermií v ejakulátu či délkou přežívání spermií. Takovéto měření by však muselo být prováděno přímo v terénu a bylo by příliš problematické a nákladné. Prvním krokem bylo vytvořit mikroskopický preparát z roztěru vzorků. K tomuto jsme potřebovali pipetu, pipetovací špičky, předem označená podložní sklíčka, digestoř a rukavice jako ochranné pomůcky. Pipetou jsme nabrali vzorek spermií ve formaldehydu a pomalým vytlačováním jsme nanášeli vzorek esovitými kličkami na označené podložní sklíčko. Po nanesení vzorku na sklíčko jsme vzorky nechali zaschnout v digestoři. Po minimálně třech hodinách jsme vzorek lehounce opláchli velmi slabým proudem vody. Po oschnutí sklíčka jsme mohli mikroskopovat na mikroskopu napojeném na počítač. Postupným prohledáváním preparátu jsme vyhledávali spermie a pak je při 400násobném zvětšení fotografovali. Takto jsme vyfotografovali 20 spermií z každého vzorku. Pokud v preparátu spermie nebyly nalezeny nebo byly nalezeny v příliš malém počtu, dělali jsme ze vzorku další roztěr. V případě, že ve třech preparátech z jednoho vzorku nebylo nalezeno 20 spermií, byl vzorek označen jako vzorek bez spermií.

2.4. Měření délky spermií a jejich komponentů

K měření délky jednotlivých částí spermií jsem používal program ImageJ, program určený k měření převážně objektů na fotografiích (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Vždy před měřením je třeba program nastavit na správné měřítko. K měření komponentů spermií je třeba používat segmentovanou čáru, kvůli možnosti zalomení čáry při nerovnosti komponentu. Při měření hlavičky jsme museli dát pozor, abychom ji začali měřit již od začátku akrozómu. Když jsme skončili měření hlavičky, z daného místa jsme změřili i krček spermie, jež se nám jeví jako tmavější úsek v porovnání s bičíkem. Podobně tak jsme naměřili i poslední část, a sice bičík. Ze souboru fotografií jsme takto naměřili komponenty od 20 spermií od každého vzorku.

2.5. Měření plochy čelní skvrny

Na rozdíl od skvrny na křídelních letkách, kterou lze změřit v terénu, neboť důležitým rozměrem u ní je její délka kterou na letce zabírá, měření plochy čelní skvrny je komplikovanější. V terénu jsme museli odchyceného samce vyfotit s u hlavy přiloženým pravítkem, jež nám při počítačovém měření posloužilo jako měřítko. Čelní skvrnu jsme u každého samce vyfotografovali dvakrát, abychom eliminovali případné zkreslení během fotografování a měření. Ke konečnému měření jsme použili obdobně, jako v případě komponentů spermií program ImageJ. Není příliš vhodné měřit ze dvou fotografií dvě stejné čelní skvrny od jednoho samce hned po sobě, vhodnější je náhodné pořadí měřených fotografií čelní skvrny. Je zde totiž riziko, že bychom mohli provést stejnou lidskou chybu při obou měřeních stejné čelní skvrny. Před měřením skvrny jsme museli program ImageJ vždy správně kalibrovat. K tomu nám posloužily centimetry na pravítku, jež jsme vyfotili vedle čelní skvrny. Po kalibraci jsme nastavili měření plochy a obkreslili jsme celou plochu čelní skvrny. Nesměli jsme zde zapomenout ani na měření záhybů černého peří vnikajícího z okraje dovnitř do skvrny.

2.6. Data

Během obou výzkumných sezón bylo samcům v terénu odebráno celkem 318 vzorků spermatu/exkrementů.

Během sezóny 2012, kdy jsme sperma odebírali pouze během hnízdění, jsme odebrali 76 vzorků. Z toho 30 vzorků se dalo využít, neboť při laboratorní práci bylo v těchto vzorcích nalezeno alespoň 20 spermií. Ve třech vzorcích spermie nalezeny byly, ale bylo jich na tři preparáty nalezeno méně než 20. 43 vzorků spermie vůbec neobsahovalo.

Během sezóny 2013 byl samcům odebírán vzorek spermatu/exkrementů jak během přiletu, tak během hnízdění. Během přiletu na hnízdiště bylo odebráno 145 vzorků. Z toho 121 vzorků obsahovalo alespoň 20 spermií. 9 vzorků mělo ve vzorku spermie, ale bylo jich méně než 20 na tři roztěry. 12 vzorků spermie vůbec neobsahovalo. Během krmení mlád'at bylo odebráno 97 vzorků. Z toho 48 vzorků obsahovalo alespoň 20 spermií. 7 vzorků spermie mělo, ale bylo jich méně než 20 na tři roztěry. 44 vzorků neobsahovalo spermie vůbec. 29 samcům byl při sezóně 2013 odebrán vzorek jak při přiletu, tak i při hnízdění, s tím, že oba dva vzorky obsahovaly alespoň 20 spermií.

Celkově bylo za tyto dvě sezóny nafoceno a naměřeno 199 vzorků spermatu. Z toho 182 vzorků jsme odebrali ptákům dvouletým a starším, 17 vzorků jsem odebral subadultním samcům, jež byli v prvním reprodukčním roce.

Za tyto dvě sezóny byl měřen alespoň jeden vzorek od 154 samců lejska bělokrkého. Od 30 samců byly měřeny dva vzorky. Od sedmi samců byly měřeny tři vzorky, to znamená, že tito samci měli použitelný vzorek z každého období našeho výzkumu. Tím, že od některých samců byl měřen pouze jeden vzorek a u některých dva nebo tři, mohlo by dojít ke zkreslení získaných dat a tím pádem k pseudoreplikaci. Z tohoto důvodu jsem provedl kontrolní testování z dat, kde jsem od každého samce náhodně (dle hodů kostkou) vybral měření pouze jednoho vzorku. Vzhledem k pozdějšímu zjištění, že datum odběru spermií koreluje se znaky spermií (viz. výsledky), jsem provedl toto testování proti případné pseudoreplikaci z dat, kde byl pouze jeden vzorek od samce, ale zvlášť jsem otestoval měření ze vzorků odebraných při přiletu a ze vzorků odebraných při krmení.

Z našeho souboru měření jsem pro daná statistická zpracování daného znaku vyřadil 8 měřených vzorků, protože v grafu vykazovaly extrémní hodnoty komponentu spermií nebo ornamentu.

2.7. *Statistická analýza*

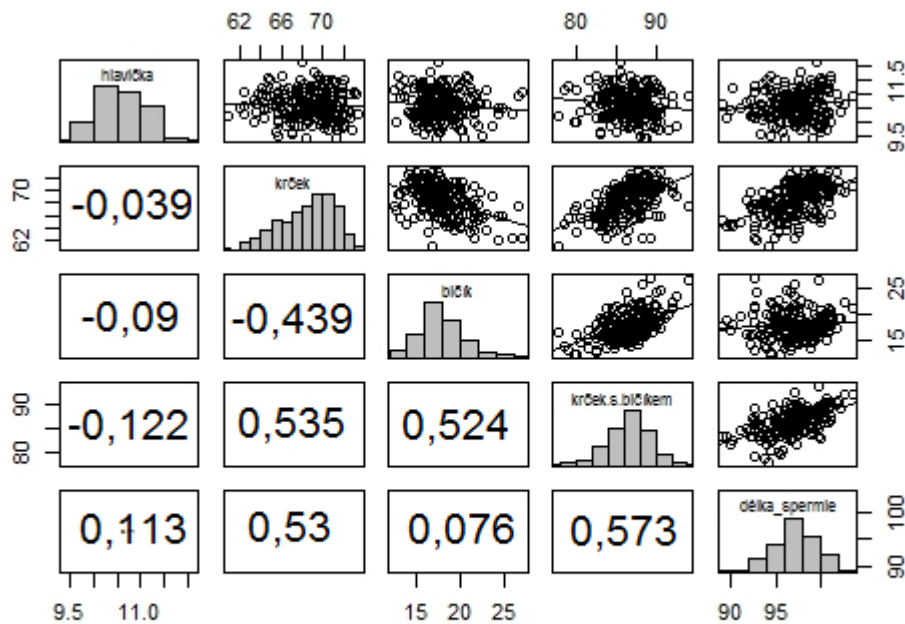
Ke statistickému zhodnocení dat jsem použil statistický program R. Pro měření vztahů mezi proměnnými jsem použil korelační analýzu. Pro měření změn jedné proměnné v různých obdobích jsem použil t-test.

3. Výsledky

3.1. Komponenty spermií

Před začátkem samotné analýzy, zda a jak jsou provázány komponenty spermií a znaky atraktivity jsem otestoval, zda spolu pozitivně korelují jednotlivé komponenty spermií a tudíž, zda je nutné testovat u každého s komponentů zvlášť, zda koreluje se znaky vnější atraktivity.

Výsledkem je, že nemůžeme použít jen jeden vzorový komponent k analýze, neboť spolu nejsou všechny komponenty pozitivně korelovány (viz. obrázek 1). Jediný signifikantní vztah (pokud nebudeme počítat vliv krčku na délku spermie, což je vzhledem k délce krčku matematická zákonitost) byla negativní korelace krčku a bičiku ($r = -0.439$, $p = < 0.001$). Proto, jsme přistoupili k srovnávání atraktivity a morfologie spermií s každým komponentem zvlášť.



Obrázek 1: Porovnání korelací délek jednotlivých komponentů spermií (v μm) mezi sebou, v uhlopříčce je znázorněná četnost spermií, nad uhlopříčkou jsou graficky znázorněny jednotlivé vztahy, pod uhlopříčkou jsou korelační koeficienty jednotlivých vztahů

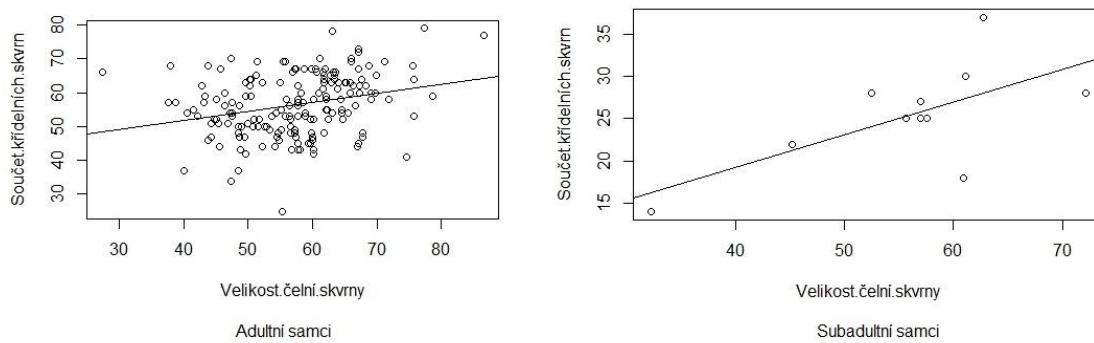
Jedním ze znaků zvyšujících pravděpodobnost úspěchu v postkopulačním pohlavním výběru je i nízká variabilita v morfologii spermií (Calhim *et al.* 2007; 2011). Při našem testování vztahu variability komponentů vyšlo, že čím je nižší variabilita délek spermií, hlaviček, krčků a krčku zároveň s bičíkem, tím delší v průměru tyto komponenty jsou. U bičíku je tento vztah úplně obrácený. (Viz. tabulka 1.)

Tabulka 1: Porovnání vztahu mezi průměrnými délkami spermií a jejich komponentů a variabilitou (hodnotou variačního koeficientu) v délkách těchto znaků

| | R | Df | p |
|----------------------|--------|-----|--------|
| Délka spermií | -0.393 | 196 | <0.001 |
| Délka hlavičky | -0.207 | 196 | 0.003 |
| Délka krčku | -0.332 | 196 | <0.001 |
| Délka bičíku | 0.682 | 196 | <0.001 |
| Délka krčku a bičíku | -0.348 | 196 | <0.001 |

3.2. Ornamenty atraktivity

Stejně jako bylo důležité zjistit, zda spolu korelují různé znaky spermií, bylo důležité otestovat, zda spolu korelují velikosti obou ornamentů atraktivity, tedy čelní a křídelní skvrna. U adultních samců byla velikost čelní a křídelní skvrny silně pozitivně korelována ($r = 0.269$, $p = < 0.001$). U subadultních samců byly tyto skvrny ještě v silnější korelaci ($r = 0.652$, $p = 0.03$). (Viz obrázek 2)



Obrázek 2: Korelace velikosti čelní skvrny (v mm²) a velikosti křídelní skvrny (součet délek všech skvrna na křídelních letkách v mm) u adultních a subadultních samců

3.3. Testování vztahu atraktivity samců a morfologie spermií

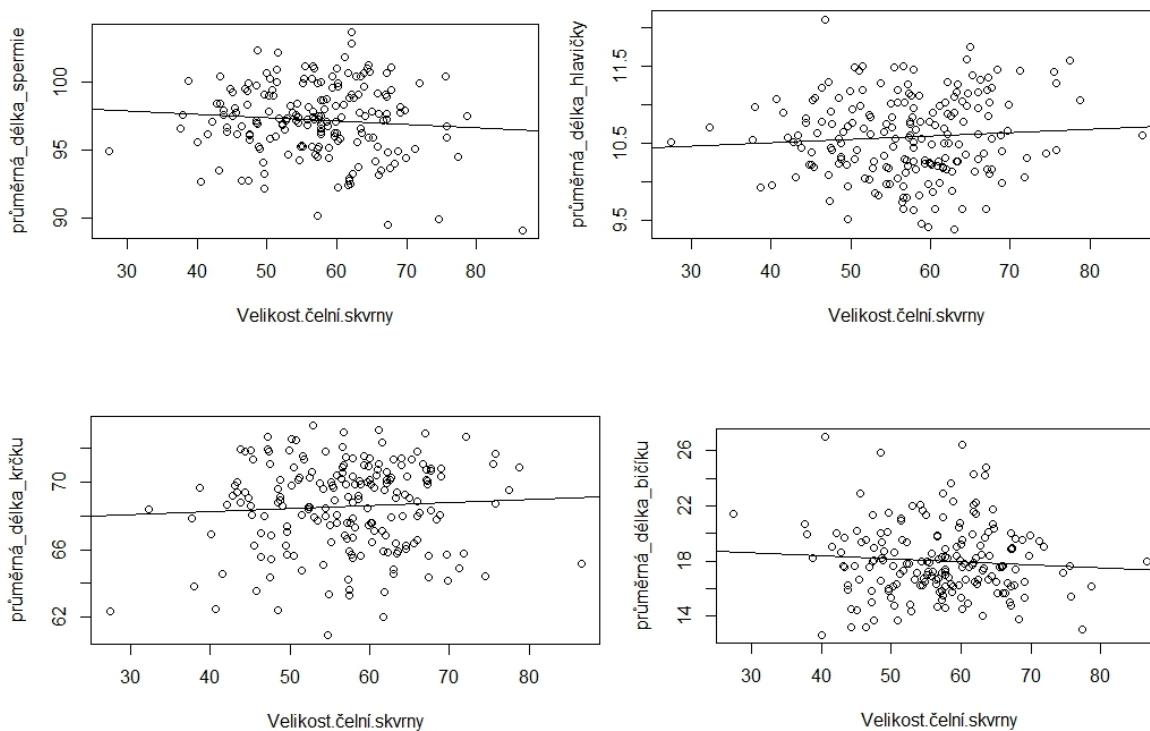
Při testování vztahů mezi ornamenty a morfologií spermií bylo třeba vhodně sestavit dataset. U křídelních skvrn dochází totiž k výrazné změně velikosti mezi subadultním a adultním obdobím, proto testování čelní skvrny mohlo proběhnout pro všechny samce najednou, zatímco testování křídelní skvrny muselo proběhnout zvlášť pro adultní a zvlášť pro subadultní samce. Pouze 12 subadultním samcům byly naměřeny spermie, což snižuje sílu statistických testů.

3.3.1. Vztah velikosti čelní skvrny a morfologie spermií

Testování vztahu velikosti čelní skvrny a morfologie spermií nenalezlo žádný významný vztah mezi velikostí plochy čelní skvrny a délkou nějakého z komponentů spermií. Nejvýraznějším, přesto zanedbatelným, vztahem zde je lehká pozitivní korelace čelní skvrny a hlavičky spermie ($r = 0.078$), jež má ale slabou signifikanci. Data z měření vztahu velikosti čelní skvrny a morfologie spermií jsou uvedeny v tabulce č. 2.

Tabulka 2: Korelační vztahy mezi velikostí plochy čelní skvrny samců a znaky spermií

| Proměnná | R | Df | P |
|---|--------|-----|-------|
| Délka spermie | -0.053 | 194 | 0.456 |
| Délka hlavičky | 0.078 | 194 | 0.277 |
| Délka krčku | 0.062 | 194 | 0.386 |
| Délka bičíku | -0.070 | 194 | 0.327 |
| Délka bičíku s krčkem | -0.007 | 194 | 0.92 |
| Poměr krček/bičík | 0.017 | 194 | 0.81 |
| Variační koeficient délek spermií | -0.044 | 194 | 0.537 |
| Variační koeficient délek hlavičky | -0.154 | 194 | 0.031 |
| Variační koeficient délek krčku | -0.078 | 194 | 0.273 |
| Variační koeficient délek bičíku | 0.07 | 194 | 0.328 |
| Variační koeficient délek krčku s bičíkem | -0.042 | 194 | 0.555 |
| Variační koeficient poměru krčku a bičíku | -0.135 | 194 | 0.059 |



Obrázek 3: Korelace mezi velikostí čelní skvrny (v mm²) a délkou spermií a jejich komponentů (v μm)

Pro případ, že by byl vztah zamaskován z důvodu několika měřených vzorků od stejných samců, otestoval jsem tyto vztahy v datasetu, kde bylo pouze po jednom měření od každého samce (viz. metodika). Toto testování jsme se rozhodli udělat, po zjištění vlivu času na znaky spermií, s dvěma datasety, ve kterých je každý samec jen jednou, a to test na samcích z příletu a na samcích při krmení (pokud byli samci při krmení 2012 i 2013, tak byl jeden randomizovaně odstraněn). Ani při těchto měřeních však nebyla zaznamenána žádná výraznější nebo signifikantní korelace mezi velikostí plochy čelní skvrny a délkou některého z komponentů spermií.

Také jsem chtěl při analýze předejít zamaskování vztahu vlivem věku samce, proto jsem vztah čelní skvrny a komponentů spermií otestoval i jen pouze pro adultní samce. Ani tato analýza nám však neukázala žádný signifikantní vztah a její výsledky byly podobné výsledkům předchozích testování. Nejsilnějším, přesto nesignifikantním, vztahem byla opět pozitivní korelace hlavičky a čelní skvrny ($r = 0.107$, $p = 0.15$)

Zatímco testování vztahu délek komponentů spermií a velikostí čelní skvrny významný výsledek nepřineslo, zajímavý je vztah mezi velikostí čelní skvrny a variancí v délkách znaků u jednotlivých samců. S rostoucí čelní skvrnou se snižovala variance v délkách hlaviček. (viz tabulka 2)

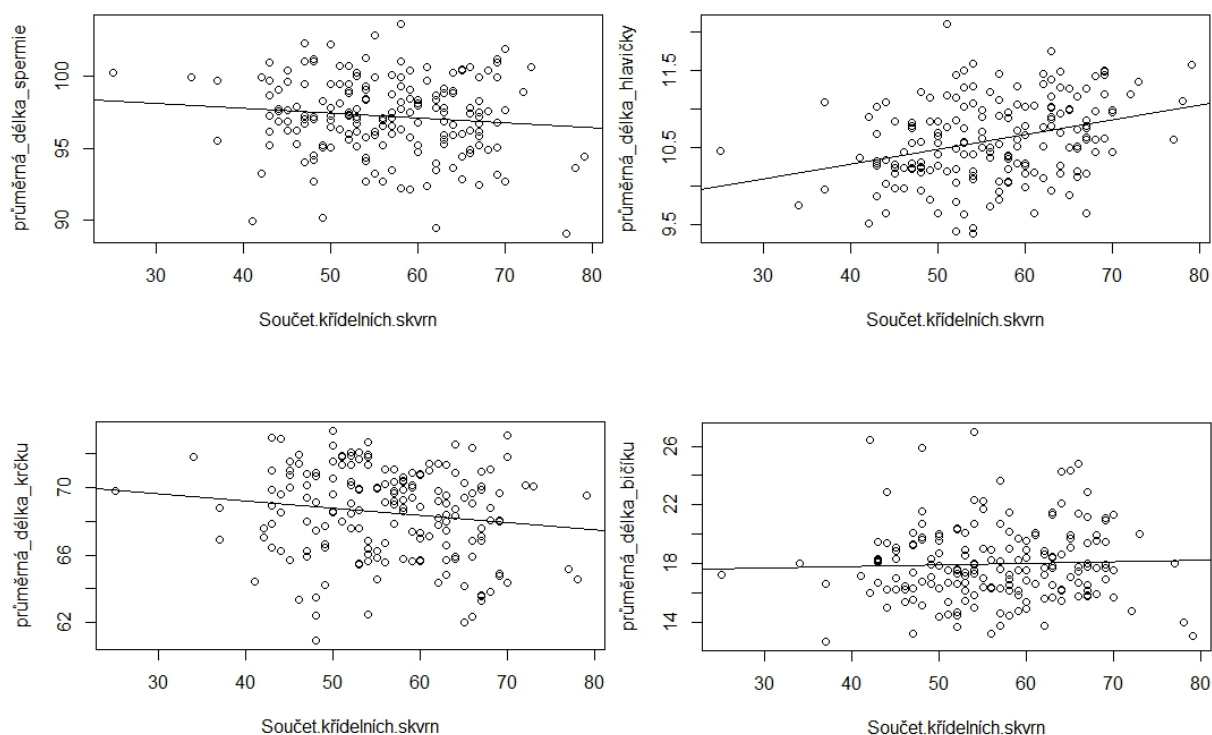
I zde jsem testoval data ve 2 datasetech, pokaždé pouze s jedním vzorkem od každého samce, a to zvlášť vzorky odebrané při přiletu a zvlášť při krmení. Ve vzorcích z přiletu se zopakovala poměrně silná negativní korelace mezi velikostí čelní skvrny a jak variačním koeficientem délek hlaviček spermií ($r = -0.211$, $p = 0.016$), tak i variačním koeficientem poměru krčku a bičíku ($r = -0.211$, $p = 0.016$). Oproti tomu při testování vzorků z období krmení žádnou signifikantní korelaci s těmito vztahy nenašlo (vztah velikosti čelní skvrny a variačního koeficientu délek hlaviček spermií - $r = -0.072$, $p = 0.592$; vztah čelní skvrny a variačního koeficientu poměru krčku a bičíku - $r = 0.033$, $p = 0.81$).

3.3.2. Vztah velikosti křídelních skvrn a morfologie spermií

Při testování vztahu morfologie spermií a velikosti křídelní skvrny adultních samců jsem našel silnou pozitivní korelaci mezi křídelní skvrnou a hlavičkou spermie. Druhým vztahem, jež jsem objevil, je negativní korelace velikosti křídelní skvrny a krčku spermie. Na délku bičíku velikost křídelní skvrny vliv neměla (viz tabulka 3).

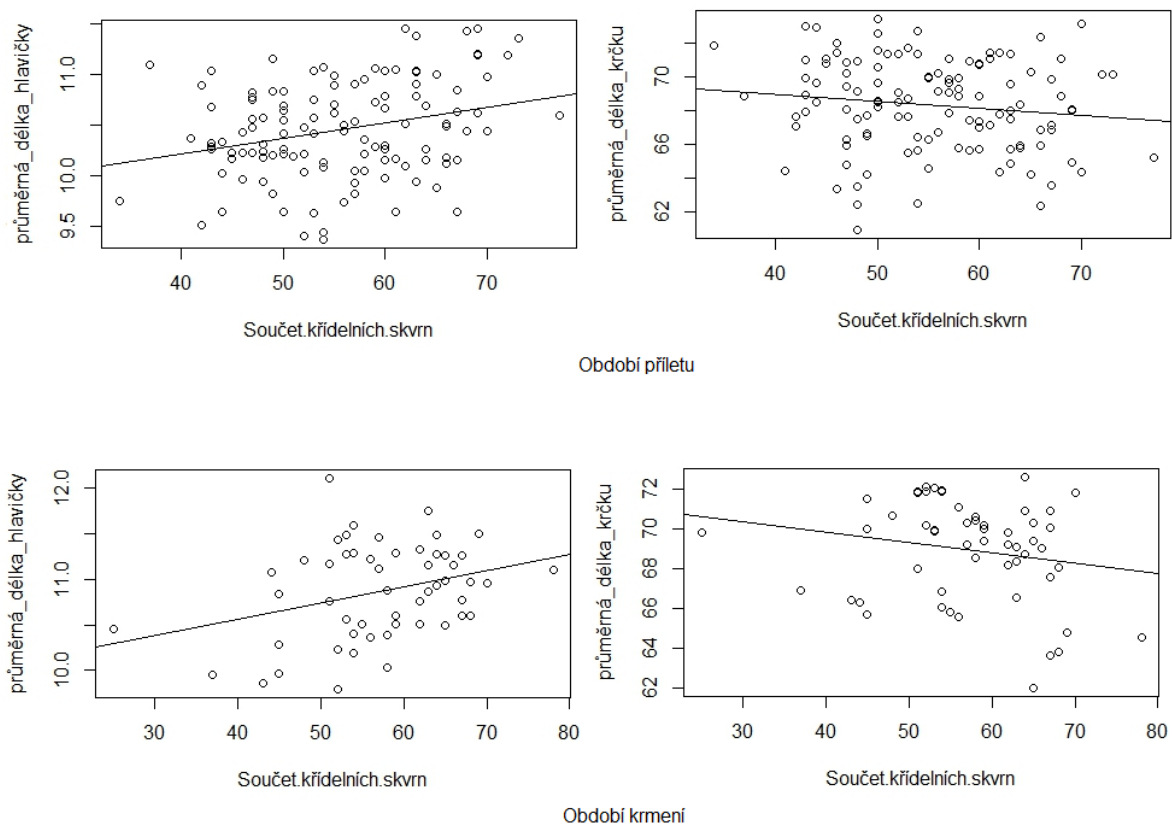
Tabulka 3: Korelační vztahy mezi velikostí křídelní skvrny a znaky spermií u adultních samců

| Znak spermií | R | Df | P |
|---|--------|-----|--------|
| Délka spermie | -0.117 | 178 | 0.118 |
| Délka hlavičky | 0.332 | 178 | <0.001 |
| Délka krčku | -0.148 | 178 | 0.048 |
| Délka bičíku | 0.038 | 178 | 0.611 |
| Délka bičíku s krčkem | -0.105 | 178 | 0.159 |
| Poměr krček/bičík | -0.108 | 178 | 0.149 |
| Variační koeficient délek spermií | -0.115 | 178 | 0.122 |
| Variační koeficient délek hlavičky | -0.1 | 178 | 0.18 |
| Variační koeficient délek krčku | -0.082 | 178 | 0.274 |
| Variační koeficient délek bičíku | -0.034 | 178 | 0.652 |
| Variační koeficient délek krčku s bičíkem | -0.117 | 178 | 0.115 |
| Variační koeficient poměru krčku a bičíku | -0.118 | 178 | 0.113 |



Obrázek 4: Korelace mezi velikostí křídelních skvrn adultních samců (součet délek všech skvrn na křídelních letkách v mm) a délkami spermií a jejich komponentů (v μm) při testování všech vzorků.

Abychom se vyhnuli pseudoreplikaci kvůli několikrát změřeným samcům, otestoval jsem tyto vztahy v datasetu, kde bylo pouze po jednom měření od každého samce (viz. metodika). Toto testování jsme se rozhodli udělat, po zjištění vlivu času na znaky spermií, s dvěma datasety, ve kterých je každý samec jen jednou, a to test na samcích z přiletu a na samcích při krmení (pokud byli samci při krmení 2012 i 2013, tak byl jeden randomizovaně odstraněn). V případě vztahu velikosti hlavičky spermií, nám obě dvě testování potvrdila pozitivní korelaci (krmení – $r = 0.32$, $p = 0.018$; přilet – $r = 0.284$, $p = 0.002$). V případě vztahu velikosti křídelní skvrny a délky krčku toto testování potvrdilo trendy negativní korelace, ač kvůli velkým p-hodnotám méně signifikantně (krmení – $r = -0.19$, $p = 0.168$; přilet – $r = -0.134$, $p = 0.145$). (Viz. obrázek 5.)



Obrázek 5: Korelace mezi velikostí křídelních skvrn adultních samců (součet délek všech skvrna na křídelních letkách v mm) a délkami hlaviček a krčků spermií (v μm) při testování vzorků odebraných od samců v období přiletu 2013 a krmení 2012 nebo 2013 (vždy 1 vzorek od samce)

Testování vztahu velikosti křídelní skvrny adultních samců a variance jejich spermií nepřinesla žádný významnější vztah, ale ukázala nesignifikantní náznaky negativních korelací velikosti křídelní skvrny a variance v délkách hlaviček, krčků, krčků s bičíkem a v poměru krčku a bičíku. Žádný významnější výsledek nepřineslo ani testování s dvěma datasety pro období přiletu a krmení vždy jen s jedním vzorkem od každého samce. Nejvýznamnější byla nesignifikantní korelace velikosti křídelní skvrny a variance poměru krčku a bičíku ($r = 0.118$, $p = 0.113$).

U měření vztahu křídelní skvrny subadultních samců a délek jejich komponentů nemůžeme výsledky kvůli velikým p hodnotám, způsobených malým počtem měřených jedinců, brát jako signifikantní. Vztah křídelní skvrny a hlavičky spermie byl u nich v silné

negativní korelaci ($r = -0.362$, $p = 0.274$). Variance v délkách krčku ($r = 0.416$, $p = 0.203$) a bičíku ($r = 0.354$, $p = 0.286$) byly v silné pozitivní korelaci s velikostí křídelní skvrny Ostatní vztahy byly méně významné. (Viz tabulka4.)

Tabulka 4: Korelační vztahy mezi velikostí křídelní skvrny a znaky spermíí u subadultních samců

| Znak spermíí | R | Df | P |
|---|--------|----|-------|
| Délka spermie | 0.145 | 9 | 0.671 |
| Délka hlavičky | -0.362 | 9 | 0.274 |
| Délka krčku | 0.106 | 9 | 0.755 |
| Délka bičíku | 0.154 | 9 | 0.651 |
| Délka bičíku s krčkem | 0.192 | 9 | 0.571 |
| Poměr krček/bičík | 0.079 | 9 | 0.817 |
| Variační koeficient délek spermíí | 0.188 | 9 | 0.579 |
| Variační koeficient délek hlavičky | -0.051 | 9 | 0.882 |
| Variační koeficient délek krčku | 0.416 | 9 | 0.203 |
| Variační koeficient délek bičíku | 0.354 | 9 | 0.286 |
| Variační koeficient délek krčku s bičíkem | 0.185 | 9 | 0.585 |
| Variační koeficient poměru krčku a bičíku | 0.262 | 9 | 0.437 |

3.4. Faktory ovlivňující prekopulační a postkopulační znaky ptáků

3.4.1. Testování vlivu kondice

Abychom mohli zhodnotit vztahy mezi atraktivitou a morfologií spermií, je potřeba zjistit, jak moc závisí oba dva typy znaků na kondici samce. Ačkoliv je kondice určována množstvím faktorů jedince (viz diskuze), v našem případě bereme jako orientační ukazatel kondice samce jeho aktuální hmotnost. Vztahy atraktivity a morfologie spermií s hmotností jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Korelační vztahy mezi hmotností samce a znaky jeho atraktivity a spermií

| Znak atraktivity nebo morfologie spermií | R | Df | P | Poznámka |
|---|--------|-----|-------|------------------------|
| Velikost čelní skvrny | 0.062 | 194 | 0.385 | |
| Velikost křídelní skvrny | 0.05 | 178 | 0.508 | pouze adultní samci |
| Velikost křídelní skvrny | -0.456 | 9 | 0.158 | pouze subadultní samci |
| Délka spermie | 0.027 | 196 | 0.708 | |
| Délka hlavičky | 0.06 | 196 | 0.407 | |
| Délka krčku | -0.066 | 196 | 0.359 | |
| Délka bičíku | 0.018 | 196 | 0.8 | |
| Délka bičíku s krčkem | -0.045 | 196 | 0.529 | |
| Poměr krčku a bičík | -0.02 | 196 | 0.78 | |
| Variační koeficient délek spermií | 0.009 | 196 | 0.897 | |
| Variační koeficient délek hlavičky | 0.01 | 196 | 0.886 | |
| Variační koeficient délek krčku | -0.026 | 196 | 0.721 | |
| Variační koeficient délek bičíku | 0.005 | 196 | 0.94 | |
| Variační koeficient délek krčku s bičíkem | 0.007 | 196 | 0.923 | |
| Variační koeficient poměru krčku a bičíku | -0.035 | 196 | 0.629 | |

Vztah mezi hmotností samce a morfologií některého z komponentů spermie nebo variabilitou délek komponentu nebyl zjištěn. Rovněž vztah hmotnosti s velikostí čelní skvrny samců nebyl nalezen. U adultních samců nebyl vztah ani mezi křídelní skvrnou a hmotností, u subadultních samců byla nalezena negativní korelace mezi těmito dvěma proměnnými, ale s malou signifikancí a při malém počtu samců.

3.4.2. Testování vlivu času

Ke zhodnocení vztahu mezi atraktivitou a morfologií spermií bylo třeba vzít v úvahu a otestovat i vliv času, neboť u ptáků teplota v jarním období stále ještě rostou varlata, což může ovlivnit samotnou morfologii spermií (Cramer *et al.* 2013b; Birkhead & Møller 1992). Vzhledem k tomu, že rozdíl v datu odchycení prvního samce na výzkumných plochách v roce 2012 a 2013 činil pouze jeden den, nebylo v potaz žádnou odlišnost v číslování dne odběru mezi těmito dvěma výzkumnými sezónami.

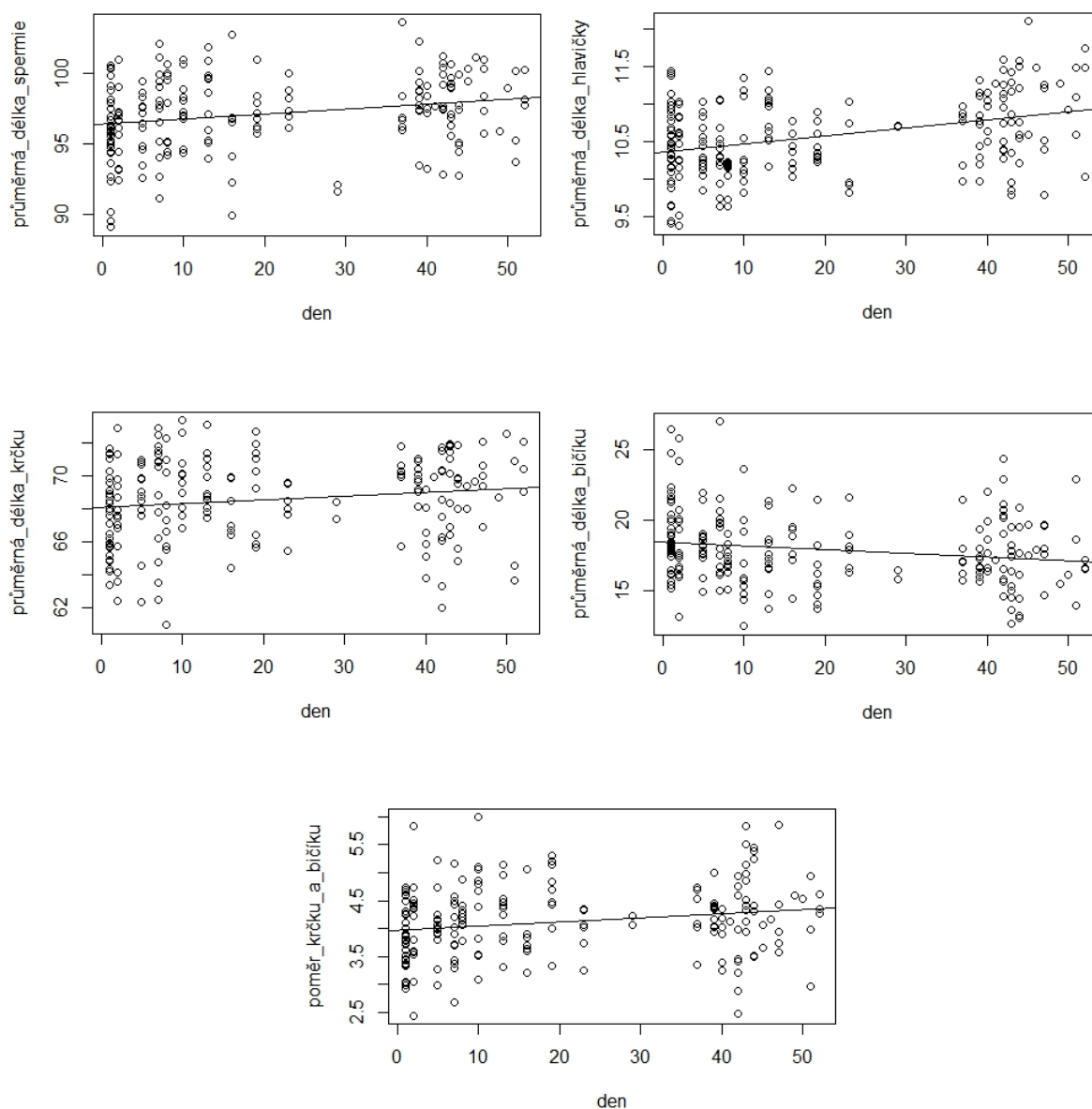
3.4.2.1. Vliv dne odběru vzorku

Vztahy dne, kdy byl samci vzorek odebrán, a morfologie spermií či atraktivity jsou shrnuty v tabulce 6.

Tabulka 6: Korelační vztahy mezi dnem odběru spermií samce a znaky spermií, atraktivitu a hmotnosti samce

| Znak | R | Df | P |
|--|--------|-----|--------|
| Délka spermie | 0.24 | 196 | <0,001 |
| Hlavička | 0.366 | 196 | <0,001 |
| Krček | 0.155 | 196 | 0.03 |
| Bičík | -0.178 | 196 | 0.012 |
| Bičík s krčkem | -0.021 | 196 | 0.767 |
| Poměr krček/bičík | 0.199 | 196 | 0.005 |
| Hmotnost | 0.285 | 196 | <0,001 |
| Velikost čelní skvrny | -0.103 | 194 | 0.151 |
| Velikost křídelní skvrny Adultních samců | 0.114 | 178 | 0.126 |
| Velikost křídelní skvrny Subadultních samců | -0.406 | 9 | 0.215 |
| Variační koeficient délek spermií | -0.194 | 196 | 0.007 |
| Variační koeficient délek hlaviček | -0.05 | 196 | 0.494 |
| Variační koeficient délek krčku | -0.157 | 196 | 0.03 |
| Variační koeficient délek bičíku | -0.195 | 196 | 0.007 |
| Variační koeficient délek krčku s bičíkem | -0.199 | 196 | 0.006 |
| Variační koeficient poměru krčku a bičíku | -0.211 | 196 | 0.003 |

Tento faktor se ukázal jako velmi významný. S pozdějším datem odběru se signifikantně zvětšovala délka hlavičky, o něco méně i krčku a tím i délka celé spermie. Naopak bičík byl s pozdějším dnem odběru kratší. Tím pádem se s pozdějším datem odběru značně měnil poměr krčku a bičíku. (Viz. obrázek 6)



Obrázek 6: Korelace mezi dnem odběru vzorku (den 1 na ose x = den odchytu prvního samce na lokalitě) a délkou spermií a jejich komponentů (v μm) a poměrem délek krčku a bíčku spermií.

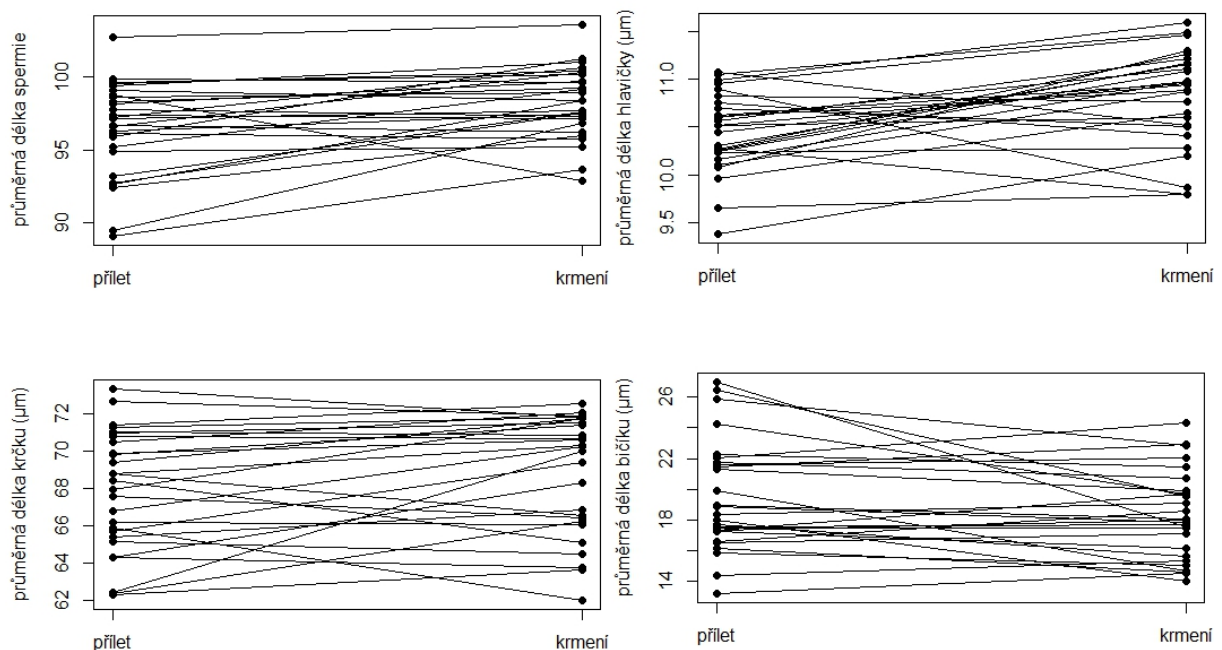
Postupující doba hnízdní sezóny nejenže ovlivňovala délky komponentů, ale také výrazně snižovala variabilitu v délkách komponentů u jednotlivých samců. S výjimkou délek hlavičky se s postupujícím obdobím výrazně snižovala variance v délkách všech komponentů stejně tak jako variance poměru délek krčku a bíčku.

U samců, jež byli odchyceni při přiletu i při krmení, bylo možné porovnat znaky mezi těmito dvěma obdobími pomocí t-testu. Průměrný den odběru vzorku spermií při přiletu 2013 byl 22.duben., při krmení 29. květen. Průměrná doba mezi oběma odchyty tak činila 37,5 dne.

V rámci atraktivity byl jen malý rozdíl mezi těmito dvěma obdobími. Křídelní skvrna se lehce zvětšila, průměrně o 0.815 mm ($p = 0.042$). Čelní skvrna se lehce, ale nesignifikantně zmenšovala, průměrně o 2.3 mm² ($p = 0.1936$).

Samci při krmení byli také již o něco málo těžší, průměrný rozdíl byl -0.378 gramů ($p = 0.026$).

Co se týká komponentů spermií tak při krmení byly větší jak samotné spermie (průměrně o 1.759 μm, $p = 0.003$), tak i hlavičky (průměrně o 0.362 μm, $p = 0.002$) a krčky (průměrně o 0.91 μm, $p = 0.069$). Naopak se zmenšovala délka bičíku (průměrně o 1.144 μm, $p = 0.046$) a tím rostl poměr krčku a bičíku (průměrně o 0.298, $p = 0.033$). (Viz obrázek 7)

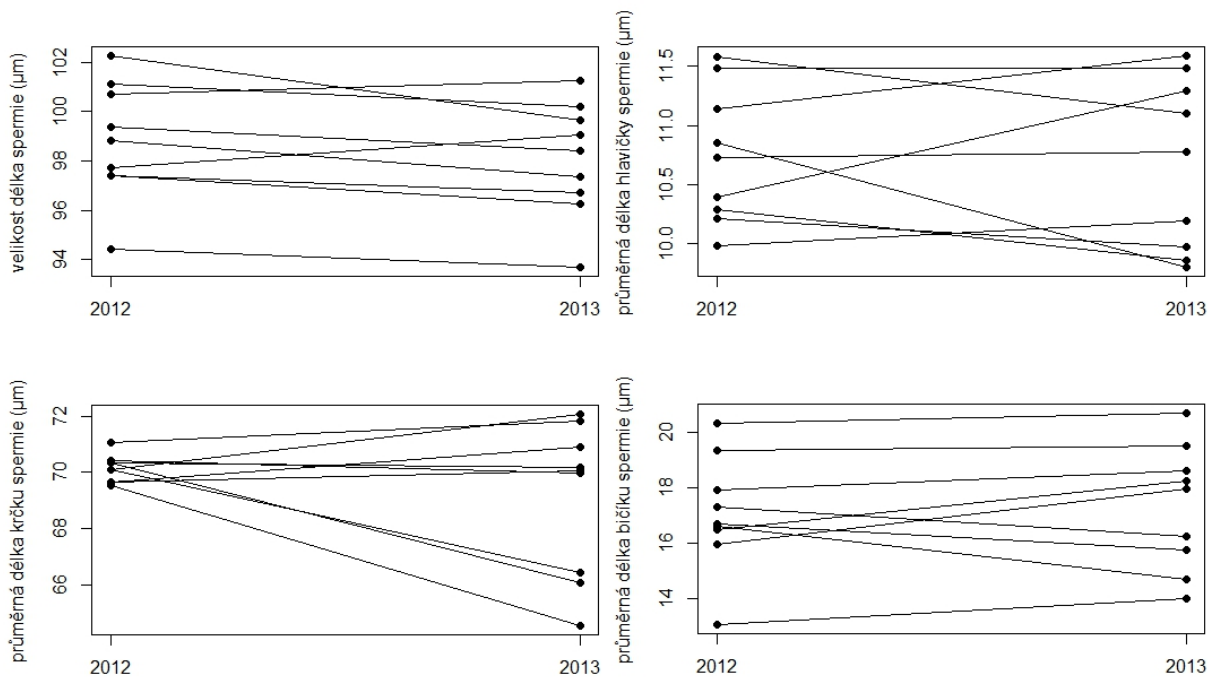


Obrázek 7: Porovnání změn délek spermií a jejich komponentů (v μm) u jednotlivých samců mezi obdobími přiletu 2013 a krmení 2013

3.4.2.2. Vliv stáří samce

Nutné je i prozkoumat vztah s rostoucím věkem odchyceného samce, proto jsme se rozhodli otestovat rozdíl mezi samci chycenými při krmení dvou různých sezón.

Vzhledem k malému počtu testovaných jedinců, všechny vztahy testování rozdílů mezi dvěma roky se vyznačovaly malou signifikancí (většími p-hodnotami). Námi získané výsledky jsou tudíž spíše jen orientační. Jediné lehce významnější změny byly v délce spermie, velikosti čelní skvrny a hmotnosti. Spermie se během jednoho roku stáří zmenšila průměrně o 0.745 μm ($p = 0.086$). V průměru o 3,4 mm^2 se zmenšila čelní skvrna samce ($p = 0.183$). Samci byly v dalším roce průměrně o 0.417 gramů těžší ($p = 0.081$). (Viz obrázek 8) Ostatní vztahy byly málo významné.



Obrázek 8: Porovnání změn v délkách komponentů spermií (v μm) u konkrétních samců mezi obdobími krmení 2012 a krmení 2013

3.4.2.3. Vliv přiletu samce na lokalitu

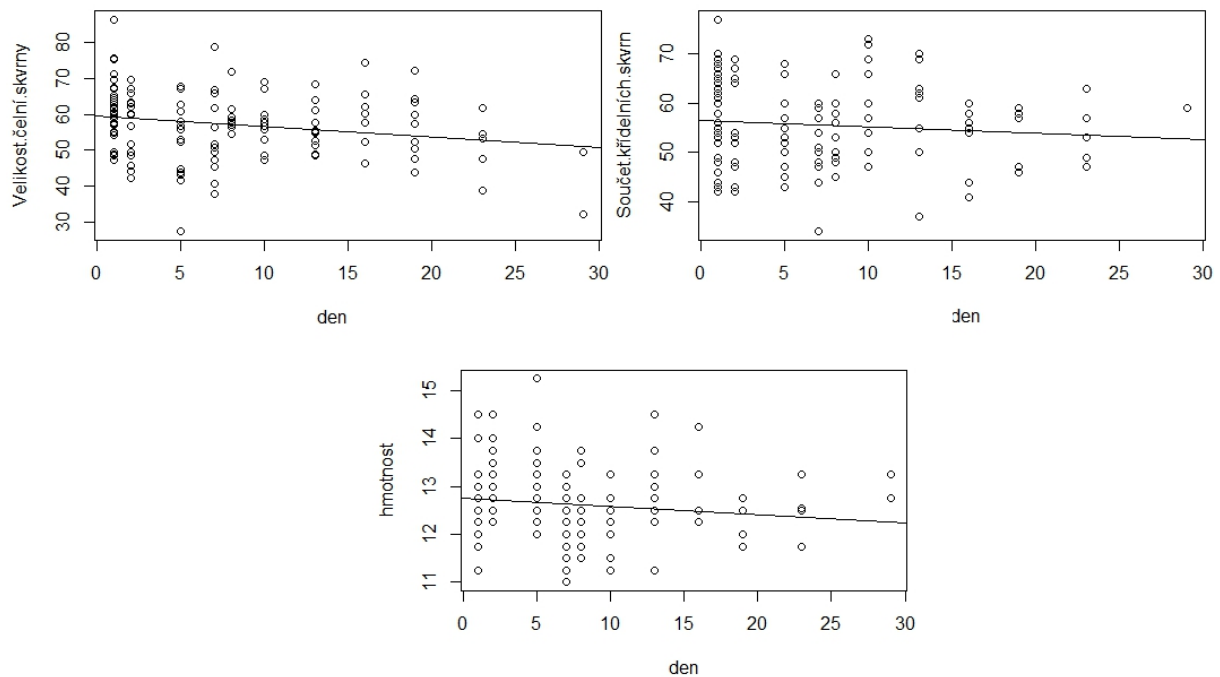
Důležité je i zmínit vliv data samotného odchyty samce, protože tento odchyt značí datum přiletu na lokalitu, což je znakem kvality samce a z důvodu možnosti zabrání kvalitního teritoria i faktor výběru samce samicí. Ačkoliv datum odchyty neodpovídá přesně

datu přiletu, díky naší metodě odchyty je malá pravděpodobnost, že by byl přilétlý samec na lokalitě déle než pár dní bez odchyty. Vztah znaků morfologie spermií a atraktivity s datem přiletu je shrnut v tabulce 7.

Tabulka 7: Korelační vztahy mezi dnem prvního odběru spermií samce při přiletu a znaky spermií, atraktivity a hmotnosti samce

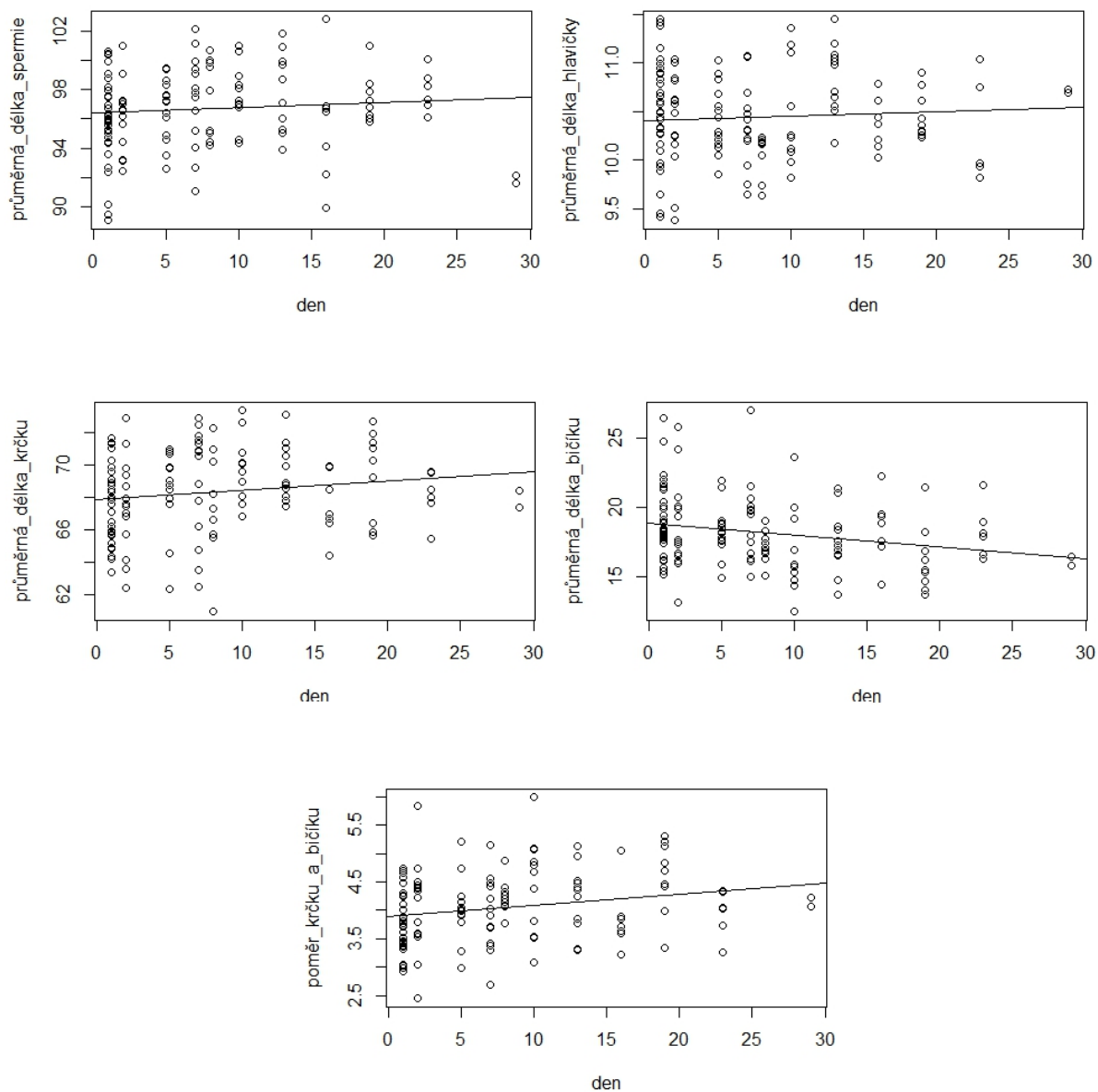
| Znak | R | Df | P |
|---|--------|-----|-------|
| délka spermie | 0.094 | 129 | 0.288 |
| Délka hlavičky | 0.065 | 129 | 0.463 |
| Délka krčku | 0.157 | 129 | 0.074 |
| Délka bičíku | -0.228 | 129 | 0.009 |
| Délka bičíku s krčkem | -0.065 | 129 | 0.46 |
| Poměr krčku a bičíku | 0.215 | 129 | 0.014 |
| Hmotnost | -0.155 | 129 | 0.077 |
| Velikost čelní skvrny | -0.219 | 127 | 0.012 |
| Velikost křídelní skvrny (ad) | -0.096 | 118 | 0.298 |
| Velikost křídelní skvrny (sub) | -0.471 | 5 | 0.286 |
| Variační koeficient délek spermií | -0.196 | 129 | 0.022 |
| Variační koeficient délek hlaviček | -0.177 | 129 | 0.043 |
| Variační koeficient délek krčku | -0.219 | 129 | 0.012 |
| Variační koeficient délek bičíku | -0.246 | 129 | 0.005 |
| Variační koeficient délek krčku s bičíkem | -0.185 | 129 | 0.034 |
| Variační koeficient poměru krčku a bičíku | -0.158 | 129 | 0.072 |

Dříve na lokalitu v sezóně 2013 přilétli samci s větší čelní skvrnou, protože datum odchyty a velikost čelní skvrny spolu signifikantně negativně korelovali. Vztah křídelní skvrny adultních samců je mnohem slabší a nesignifikantní. U subadultních samců přiletěli prvně samci s větší křídelní skvrnou, ale bylo testováno pouze 5 samců. Dříve přilétlí samci měli též trochu větší hmotnost. (Viz obrázek 9)



Obrázek 9: Korelace mezi dnem prvního odchyty samce na lokalitě (den 1 na ose x = den odchyty prvního samce na lokalitě) a velikostí čelní skvrny (v mm^2), velikostí křídelní skvrny adultních samců (součet délek všech skvrn na křídelních letkách v mm) a hmotností samce (v gramech)

Co se týče velikostí komponentů spermií, s pozdějším datem příletu se zvětšoval krček, zmenšoval bičík a tím pádem rostl poměr krčku a bičíku. Také se s pozdějším datem příletu snižovala variance v délkách všech komponentů spermií jednotlivých samců. (Viz obrázek 10) Zde ale musíme vzít v potaz i samotné pozdější období, nejen důkaz kvality samce.



Obrázek 10: Korelace mezi dnem prvního odchycení samce na lokalitě při přeletu na hnízdíště (den 1 na ose x = den odchytu prvního samce na lokalitě) a délkami spermíí a jejich komponentů (v μm) a poměrem krčku a bičíku

Ideální by bylo zjistit rozdíl v morfologii spermíí stejných samců mezi subadultním a adultním obdobím, bohužel jen jednomu subadultnímu samci z období krmení 2012 byly naměřeny spermie v období krmení 2013.

4. Diskuze

Na základě našich výsledků je zřejmé, že nemůžeme zcela zobecněně potvrdit naši hypotézu, že by všechny ornamenty atraktivity souvisely s výhodnějšími znaky spermií pro postkopulační pohlavní výběr. Nicméně určité vztahy související s touto hypotézou nám analýza dat ukázala.

4.1. *Vztah křídelní skvrny a morfologie spermií*

Hlavním vztahem vztahujícím se k naší hypotéze je bezesporu pozitivní korelace velikosti křídelní skvrny adultních samců a hlavičky spermií a negativní korelace této skvrny s krčkem spermií. Vztah mezi velikostí křídelní skvrny a hlavičkou spermie vyšel při každém testování. Vztah mezi křídelní skvrnou a krčkem spermie vyšel v testování všech vzorků a vyšel, i když s malou signifikancí, i při testování, kdy jsem zvlášť testoval vzorky z období krmení a zvlášť z období přiletu roku 2013.

Toto zjištění by šlo úplně proti hypotéze, že ptačí samci by se snažili investovat co nejvíce jak do své atraktivity, tak do znaků, které by zvyšovali jeho pravděpodobnost úspěchu v kompetici spermií. Kombinace velké hlavičky a krátkého krčku je totiž prediktorem pro pomalou rychlost spermie, neboť velikost hlavičky negativně koreluje s rychlostí spermie, zatímco velikost krčku s rychlostí koreluje pozitivně (Lüpold *et al.* 2009). V případě, že by o paternitě rozhodovala pouze kompetice spermií, byli by tito samci velmi znevýhodněni.

K tomuto vztahu je nutné ale zmínit dvě důležité věci. Zaprvé, že rychlost je jen jednou ze dvou vlastností, jež byly shledány jako nejdůležitější pro kompetitivnost ejakulátu. Tou druhou je přežívání spermií (Mautz *et al.* 2013). Zadruhé, že o úspěchu v postkopulačním pohlavním výběru nerozhoduje pouze kompetice spermií, ale i skrytá volba samicí. Spermie s větší hlavičkou sice nedosahují větších úspěchů v kompetici spermií, ale zato jsou mnohem úspěšnější v pronikání do skladovacích tubulů. Mají totiž mnohem delší přežívání, takže mají delší čas do tubulu proniknout (Calhim *et al.* 2011). Stejně tak délka krčku, jež má pozitivní vliv na rychlost spermie, negativně ovlivňuje přežívání spermie. Delší krčky totiž rychleji spotřebovávají energetické zdroje, po jejichž vypotřebování nejsou spermie schopny pohybu (Immler & Birkhead 2007). Naše výsledky pro vztah velikosti křídelní skvrny adultních samců a délky hlavičky a krčku spermií by odpovídaly souhrnným výsledkům metaanalýzy

(Mautz *et al.* 2013), jež tvrdí, že ornamenty atraktivity nemají vliv na znaky morfologie spermií, s výjimkou znaků, které ovlivňují délku přežívání spermií.

Vzhledem k tomu, že délka hlavičky spermií ale měla pozitivní, ač sice ne dostatečně signifikantní, vztah s délkou celé spermie a zároveň je uváděno, že k uskladnění v tubulech jsou preferovány spíše delší spermie (Snook 2005; Birkhead *et al.* 2009), nemůžeme vyloučit ani to, že spermie atraktivních samců jsou ukládány v tubulech jak kvůli velikosti hlavičky, tak kvůli délce celé spermie. Této myšlence však poněkud odporuje výsledek, opět jen málo signifikantní, že vztah křídelní skvrny a celkové délky spermie je spíše v negativní korelaci.

Pokud bych bral při měření celého datasetu zjištěný vztah negativní korelace velikosti křídelní skvrny a krčku spermie jako náznak vztahu, pak bychom to mohli označit jako trade-off mezi investicemi do prekopulačního a postkopulačního pohlavního výběru. Je možné, že zmenšení krčku spermie je úsporou, díky níž samec může investovat více do vnější atraktivity. Pro tento případ by bylo vhodné zjistit množství spermií, jež samci investují do jednoho ejakulátu, pro zjištění zda samci s větší křídelní skvrnou neinvestují spíše do počtu spermií než do morfologie spermií vhodné pro úspěch v kompetici. Pokud by investice atraktivnějších samců do počtu spermií zjištěna byla, odpovídalo by to podobným výsledkům, jež byly zaznamenány u modropláštika nádherného (*Malurus cyaneus*), u kterého červenější atraktivnější samci mají méně kvalitní spermie, mají ovšem mnohem větší množství spermií než neatraktivní samci s rychlejšími spermii (Rowe *et al.* 2010).

Co se týká variance v délkách komponentů spermií, velikost křídelní skvrny adultních samců nám neukazuje žádný signifikantní vztah s variancí délek komponentů spermií. Při testování těchto vztahů na datasetech s daty pouze z období přiletu a pouze z období krmení, nebyl nalezen žádný vztah na vzorcích z období přiletu. Naopak při období krmení byl zjištěn náznak vztahu s variabilitou v délkách spermií ($r = -0.208$, $p = 0.125$) a v délkách krčku s bičkem ($r = -0.22$, $p = 0.103$). Zajímavé je, že při testování variability délek komponentů spermií a velikosti plochy čelní skvrny na takto rozdělených datasetech vyšel naopak vztah pouze na datech z období přiletu.

U subadultních samců byl při našem testování problém malého počtu měřených vzorků od těchto samců. Proto jsou výsledky z měření jejich vztahů křídelní skvrny a komponentů spermií jen málo signifikantní. I přes příliš velkou p-hodnotu (0.274) je zajímavé, že u subadultních samců byla silná negativní korelace mezi velikostí křídelní skvrny a délkou hlavičky ($r = -0.362$). Kdyby byl tento vztah signifikantní, například pokud

by vyšel stejný vztah u většího počtu testovaných subadultních samců, ukazoval by na úplně obrácený trend než u adultních samců. Podobně tak i málo signifikantní ($p = 0.203$) pozitivní korelace ($r = 0.416$) s variačním koeficientem délek krčku by byla v rozporu s náznakem vztahu u adultních samců. Tyto vztahy by byly hodny přezkoumání při dalším výzkumu, kde by již byl větší počet naměřených vzorků od subadultních samců.

4.2. Vztah čelní skvrny a morfologie spermií

Zatímco testování vztahu křídelních skvrn a morfologie spermií nám přineslo vztah atraktivity s určitými komponenty spermií, testování vztahu čelní skvrny s morfologií spermií nám neukázalo žádný významnější vztah.

Přitom testování vztahu křídelních skvrn a čelních skvrn nám ukázala silnou pozitivní korelaci (adultní samci $r = 0.269$, $p < 0.001$; Subadultní samci $r = 0.652$, $p = 0.03$), tudíž by nebylo nemožné očekávat podobný vztah obou typů ornamentů s morfologií spermií.

Slabá nesignifikantní pozitivní korelace byla vždy naměřena u vztahu délky hlavičky spermie a velikosti čelní skvrny, což by mohlo naznačovat možnost podobného vztahu investic do delšího přežívání spermií atraktivních samců na úkor jejich rychlosti.

Žádný jiný vztah mezi velikostí čelní skvrny a komponenty spermií se mi nepodařilo nalézt ani v celkovém datasetu, ani v datasetu ve kterém je jen jedno měření od každého samce, ani v datasetu pouze s adultními samci.

Toto zjištění na čelních skvrnách nepotvrzuje naši hypotézu, že atraktivnější (alespoň co se týče čelní skvrny) samci mají morfologii spermií vhodnější pro úspěch v kompetici spermií, ani alternativní hypotézu, že samci investují více pouze do jednoho typu znaků. Naše zjištění by však potvrdilo výsledek metaanalýzy (Mautz *et al.* 2013) o tom, že sekundární pohlavní znaky nepredikují znaky spermií. Ačkoliv slabá pozitivní korelace mezi velikostí čelní skvrny a velikostí hlavičky spermie byla nesignifikantní, mohla by naznačovat na případný vztah odpovídající výsledku této metaanalýzy, že jediný typ znaků spermie, co jsou predikovány sekundárními pohlavními znaky, jsou znaky odpovědné za přežívání spermií.

Zatímco nebyl žádný vztah mezi velikostí čelní skvrny a průměrnými délkami komponentů spermií, nalezena byla silná negativní korelace mezi velikostí plochy čelní skvrny a variabilitou v délkách hlaviček a poměru krčku a bičíku. Když jsme však provedli testování těchto dvou vztahů na datasetech, kde bylo pouze měření jednoho vzorku od samce, a to zvláště pro období přiletu a zvláště pro období krmení, tyto dva vztahy se významně projevily pouze při období přiletu. Zvláštní přitom je, že délky hlaviček jsou v našem testování jediným znakem, jejichž variance není nijak významně ovlivněna časem. Navíc samci s větší čelní skvrnou přilétali dříve, proto musíme zavrhnout tvrzení, že by tento vztah byl způsoben datem odběru vzorku. Možným vysvětlením tohoto vztahu by byla

hypotéza, že atraktivním samcům přestávají růst varlata dříve a tudíž mají při období přiletu menší variabilitu v délkách hlaviček a v poměru krčku a bičíku.

4.3. Vztah komponentů morfologie spermií mezi sebou

Jediným vztahem komponentů spermií mezi sebou, je silná negativní korelace mezi délkou krčku a délkou bičíku. Tento vztah můžeme pozorovat například i s postupujícím časem v hnízdní sezóně. Zatímco délka celého flagela se výrazně nemění, mění se výrazně, zda jeho větší část zaujme buď krček, nebo bičík.

Zajímavý vztah vyšel při srovnání délek komponentů a variabilitou v těchto délkách. S výjimkou bičíku u všech komponentů s klesající variabilitou délek signifikantně a silně rostla průměrná hodnota délky komponentů. U bičíku byl tento vztah obrácený, neboť nejméně variabilní spermie mají delší krček na úkor délky bičíku. Samci se tedy snažili dosáhnout cílené velikosti spermií a jejich komponentů, ale například vlivem ještě ne plně vyvinutých všech seminiferálních kanálků varlat na začátku sezóny, kdy varlata stále ještě rostou (Birkhead 1998b; Birkhead & Møller 1992), se jim nedařilo tohoto optima dosáhnout u velké proporce spermií.

4.4. Faktory ovlivňující prekopulační a postkopulační znaky ptáků

4.4.1. Vliv kondice na atraktivitu a morfologii spermií

Různé studie u různých taxonů uvádějí různé ovlivnění znaků prekopulačního i postkopulačního pohlavního výběru kondicí. Proto jsem se rozhodl otestovat i vliv kondice, abych zamezil tomu, že jiné zjištěné vztahy byly vlastně ovlivněny nejvíce kondicí. Jako hlavní a jediný faktor kondice jedince jsem si zvolil hmotnost samce. Není sice příliš vhodné brát hmotnost samce jako jediný ukazatel kondice, neboť kondice je určována velkým množstvím různých faktorů, viz např. (Brown 1996), ale jelikož primárně tato práce nebyla zaměřena na ovlivnění znaků kondicí, hmotnost nám tedy stačí jako orientační ukazatel pravděpodobné kondice. Jako další znak ukazující na kondici samce můžeme považovat datum příletu samce na hnízdiště, zde je však nutné brát na vědomí i vliv samotného času, proto se jím budeme zabývat zvlášť.

V případě atraktivních ornamentů jsem nenašel žádný signifikantní vztah. Jediný vztah, jež toto testování zjistilo, byla silná nesignifikantní negativní korelace mezi velikostí čelní skvrny subadultních samců a jejich hmotností. U tohoto vztahu, stejně jako u ostatních vztahů subadultních samců, narážíme opět na problém malého množství naměřených vzorků. Tento vztah by mohl naznačovat určitý trade-off, kdy by mladí samci investovali buď do své kondice, nebo do své atraktivity. Proto by bylo vhodné při příštích výzkumech tento dataset obohatit o další data subadultních samců, pro validnější otestování tohoto vztahu.

Toto naše zjištění malého vlivu hmotnosti a náznakem tudíž i kondice (přinejmenším u adultních samců) na velikost atraktivních ornamentů lejska bělokrkého by vyvracelo výsledky starších studií (Gustafsson 1995) a naopak potvrzovalo výsledky novějších studií (Hegyi *et al.* 2002; Qvarnström *et al.* 2006), že velikost ornamentů samců lejska bělokrkého je dána primárně geneticky a jen v malé míře kondicí. Na druhou stranu, tyto práce braly v úvahu mnohem více faktorů jedince a jeho životního prostředí udávajících kondici samce, tudíž jejich výsledky jsou mnohem validnější a není vhodné jejich výsledky potvrzovat či zpochybňovat pouze naším testováním hmotnosti.

Co se týká vztahu hmotnosti a morfologie spermií, nebyl nalezen žádný signifikantní ani významnější vztah. To by potvrzovalo predikce, že znaky morfologie spermií jsou

ovlivňovány především geneticky a jen minimálně vlivem prostředí a kondice (Calhim *et al.* 2007; 2011).

4.4.2. Vliv času na atraktivitu a morfologii spermií

4.4.2.1. Vliv probíhající hnízdni sezóny

Na rozdíl od ptáků hnízdících v tropech, samci ptáků hnízdících v temperátních oblastech vykazují během roku alometrii ve velikosti varlat během roku (Birkhead 1998b). Varlata se začínají zvětšovat před blížící se hnízdni sezónou. Varlata se před hnízdni sezónou zvětšují především kvůli prodlužování seminiferálních tubulů a kvůli navýšení počtu intersticiálních buněk produkujících hormony (Birkhead & Møller 1992). V období počátku hnízdni sezóny varlata stále ještě rostou a je velká variance v délkách seminiferálních tubulů. Například u střízlíka zahradního (*Troglodytes aeodon*) tato variance délek seminiferálních tubulů ovlivňuje i vyšší varianci v délkách spermií (Cramer *et al.* 2013b). Prodlužují-li se seminiferální tubuly s ubíhajícím časem hnízdni sezóny, je pravděpodobné, že kromě nižší variance ve znacích spermií kvůli ukončování růstu tubulů, se budou měnit znaky spermií určitým směrem. Tento jev jsme se rozhodli otestovat, abychom zjistili, jak probíhající čas ovlivňuje morfologii spermií a zda by nemohl ovlivňovat zjištěné vztahy mezi prekopulačním a postkopulačním pohlavním výběrem.

U některých ptáků se mění během roku vnější fenotyp. Například u lejska bělokrkého se mimo hnízdni sezónu stávají ornamenty méně zřetelnými (Cepák 2008). Proto jsme se rozhodli i otestovat, zda během hnízdni sezóny nemůže docházet ke změnám ve velikostech znaků atraktivity.

Vliv času se nám ukázal jako velice významný faktor. Jak jsme očekávali kvůli prodlužování seminiferálních tubulů, s pozdějším datem odběru vzorku se signifikantně zvětšovala celková délka spermií. Nejvýznamnější vztah však byl mezi pozdějším datem odběru a délkou hlavičky spermií. U spermie se s pozdějším datem odběru zvětšoval krček a zkracoval bičík. Tímto pádem se nám velmi značně měnil poměr krčku a bičíku. Také při porovnávání spermií jednoho samce z období přiletu na hnízdniště a z období krmení mláďat se ukázalo, že mezi obdobími se zvětšovala délka celé spermie, hlavičky a krčku a že se zmenšovala délka bičíku. Vzhledem k tomu, že poměr krčku a bičíku je velmi ústředním znakem pro rychlost spermie (Calhim *et al.* 2011), usuzuji, že spermie z pozdějšího období sezóny jsou mnohem úspěšnější při kompetici spermií. Vzhledem k tomu, že velikost

hlavičky spermie je významným prediktorem úspěchu při skryté volbě samicí (Calhim *et al.* 2011), stejně tak jako celková délka spermie (Snook 2005; Birkhead *et al.* 2009), by měly být spermie z pozdějšího období sezóny vhodnější i pro skrytou volbu samicí. Komplex těchto znaků nám ukazuje, že spermie z pozdějšího období by měly být ve všech parametrech výhodnější pro úspěch v postkopulačním pohlavním výběru. Bohužel jsme při tomto výzkumu neměřili rychlost a procento pohyblivých spermií v ejakulátu. Výsledky změn morfologie spermií během sezóny, naznačující, že spermie z pozdějšího období sezóny by měly výhodnější morfologii pro úspěch v kompetici spermií, by byly v rozporu s výsledky výzkumu na orebici rudé (*Alectoris rufa*), kdy na jaře měli samci spermie rychlejší než v létě (Birkhead *et al.* 2009).

I když výsledky ukazují, že spermie z pozdějšího období jsou výhodnější pro úspěch v kompetici spermií, v pozdějším období hnízdní sezóny se samcům snižuje počet příležitostí ke kopulacím, neboť s pokračující hnízdní sezónou více samic končí s kladením vajec a již jen pečují o snůšku či mlád'ata.

Ačkoliv se změna morfologie spermií vlivem času v důsledku růstu varlat jeví jako zákonitá, v literatuře je jen velmi málo prozkoumaná a popsána. Bylo by proto vhodné porovnat tento vztah i na dalších taxonech sezónně hnízdicích ptáků.

Stejně jako ve studii na střízlíku zahradním (*Troglodytes aeodon*) (Cramer *et al.* 2013b), jsem i na lejskovi bělokrkém objevil silnou negativní korelaci mezi postupujícím časem, a tím pádem i pozvolným ukončováním růstu varlat, a snižováním variability délek jak spermií, tak i délek jejich komponentů a poměru krčku a bičíku. V pozdějším období tedy samci produkovali méně variabilnější spermie vhodnější ke kompetici spermií. Jediný znak, který nevykazoval změny ve varianci s ubíhajícím časem, byla délka hlaviček spermií. Čistě hypoteticky, by tato neměnicí se variabilita hlaviček mohla být způsobena tím, že by po celou dobu tvorby spermií mohly být tvořeny i spermie s jinou funkcí než k oplodnění vajíčka a to buď spermie zabijácké (Baker & Bellis 1988; Kura & Nakashima 2000) nebo obětní (Holman & Snook 2006).

Zajímavý je ale fakt, jak úspěšní jsme byli ve focení spermií z jednotlivých období výzkumné sezóny. V roce 2013 jsme při přiletu na hnízdiště, tedy v první části hnízdní sezóny, kdy by měly být dle našich výsledků spermie méně kvalitní, odebrali celkem 145 vzorků spermií. Z toho ve 122 vzorcích bylo nalezeno alespoň 20 spermií. To znamená, že dostatečné množství spermií bylo nalezeno 84,1% vzorků z období přiletu. Během období

krmení v této sezóně bylo 20 spermií nalezeno pouze v 48 vzorcích z 97 odebraných, tj. ve 49,5% vzorků. Podobně tomu bylo i při krmení v roce 2012 kdy ze 76 vzorků bylo alespoň 20 spermií pouze ve 30 vzorcích, tedy ve 39,47% vzorků. Je otázka, čím tento efekt byl způsoben. Usuzuji, že s největší pravděpodobností to bylo způsobeno odlišným množstvím spermií ve dvou různých obdobích. V době krmení již většina párů pečovala o potomstvo a minimum samic mělo potřebu se v této době pářit. Samci proto mohli v tomto období produkovat mnohem menší množství spermií, protože jednak by se jim investice do gamet v té době tolik nevyplatila a jednak v této době musí samci investovat především do rodičovské péče a tvorba mnoha gamet by pro ně byla zbytečná zátěž. Rovněž tento vztah může být způsoben odlišnými hladinami samčích pohlavních hormonů a tím pádem odlišnou tvorbou spermií. Například výzkum u orebic rudých (*Alectoris rufa*) zjistil, že vrcholná hladina testosteronu byla u tohoto druhu během března, pak rychle klesla. Orebice pak tvořila největší množství spermií během května, kdy byly spermie v ejakulátu v největší hustotě. Od června se již tvorba ejakulátu snižovala (Santiago-Moreno *et al.* 2015).

Co se týče změn atraktivity mezi obdobím přiletu a krmení, byly rozdíly minimální. Sice vyšlo signifikantně, že se mezi obdobími zvětšila křídelní skvrna, ale průměrný rozdíl byl necelý milimetr, což by mohlo být nejspíše způsobeno oděrem drobných ručních krovek a tím pádem odhalení větší plochy bílé skvrny na letkách. Rozdíl ve velikosti čelní skvrny byl zaprvé nesignifikantní a zadruhé rozdíl cca. 2 mm² může být způsoben jak oděrem skvrny, tak i možnou lidskou chybou, neboť měření plochy čelní skvrny (a jakékoliv nerovné plochy obecně) na počítači vykazuje drobnou nepřesnost odpovídající několika mm².

4.4.2.2. Vliv stáří samce

Testování rozdílů v atraktivitě a v morfologii spermií mezi dvěma roky neukázalo žádné významnější vztahy. Jediným vztahem částečně se blížícím signifikanci bylo zmenšení spermie s následujícím rokem, ale pouze o necelý mikrometr, což je minimální změna. Zajímavé je, že test nesignifikantně naznačil zmenšování čelní skvrny o 3,4 mm², ale opět se jedná o tak drobný rozdíl, že může být způsoben i variabilitou v lidském měření.

4.4.2.3. Vliv přiletu samce na lokalitu

Trochu ošidné je testování vztahu znaků s datem prvního odchycení samce při přiletu na hnízdiště. Tento faktor má totiž kombinovaný vliv. Datum přiletu je významným ukazatelem kvality samce, samci se totiž snaží dostat se na hnízdiště v co nejkratším čase, aby si mohli dříve zabrat kvalitní teritorium. Zároveň, jsme ale již zjistili, že s časem se mění délky spermií a jejich komponentů, tudíž nevíme, zda vztahy mezi znaky spermií a datem přiletu jsou ovlivněny spíše kvalitou samců nebo samotným časem, po který rostou varlata.

Znakem s touto spornou kauzalitou je prodlužování krčku spermie a zkracování bičíku s pozdějším přiletem. Vzhledem k tomu, že vliv času během celé sezóny se projevoval stejným vztahem, jako pravděpodobnější možnost se jeví vliv růstu varlat. Kdybychom vliv růstu varlat nebrali v potaz, ukazoval by tento vztah na trade-off mezi investicemi buď do nejrychlejšího uražení cesty na hnízdiště nebo do znaků postkopulačního pohlavního výběru.

Stejně tak jak se měnily délky komponentů spermií se silně a signifikantně snižovala variance v jejich délkách, nejsilněji u délek krčku a délek bičíku, zde je ale ještě větší pravděpodobnost ovlivnění ubíhajícím čase. Jedině v případě snižování variance v délkách hlaviček můžeme zvažovat silnější ovlivnění kvůli vztahu s atraktivitou samce, neboť variabilita délek hlaviček se s ubíhajícím časem příliš neměnila.

Dříve na lokalitu přiletěli samci většími čelními skvrnami, což ukazuje, že samci s většími čelními skvrnami jsou kvalitnější a v lepší kondici. Na to, že dříve přilétlí samci jsou v lepší kondici, ukazuje i výsledek, že tito samci měli větší hmotnost

5. Závěr

Mým testováním nemůžu zcela obecně potvrdit naši hypotézu, že spolu pozitivně korelují znaky prekopulačního pohlavního výběru a postkopulačního pohlavního výběru a tím pádem mají atraktivnější samci výhodnější morfologii spermií. Tímto testováním jsem však zjistil, že adultní samci lejska bělokrkého s větší křídelní skvrnou mají spermie s delšími hlavičkami a menšími krčky. To naznačuje, že tyto samci, kteří jsou díky větší křídelní skvrně atraktivnější, mají spermie sice pomalejší, ale zato přežívající po delší dobu a které jsou schopny snáze pronikat do samičích skladovacích tubulů. Dále jsem zjistil, že na morfologii spermií má největší vliv čas probíhající hnízdní sezóny, nejspíše tím, že samcům v této době stále ještě rostou varlata a prodlužují se seminiferní kanálky.

5.1. Možnosti dalšího výzkumu

Náš výzkum je jen jedním dalším v řetězci výzkumů tohoto tématu a očekávám, že na něj naváží další výzkumy.

Samozřejmě by bylo vhodné zopakovat porovnání námi zjištěného vztahu křídelní skvrny adultních samců a morfologie spermií na vzorcích od jiných samců. Vhodné by bylo také provést výzkum tohoto vztahu na příbuzných druzích a to na lejsku černohlavém (*Ficedula hypoleuca*) a lejsku černokrkém (*Ficedula semitorquata*).

Nedostatkem našeho výzkumu je malé množství vzorků od subadultních samců. Při větším množství vzorků od subadultních samců v dalších výzkumech by bylo vhodné otestovat náznak silné negativní korelace mezi velikostí křídelní skvrny a délkou hlavičky spermií. Rovněž by bylo užitečné při větším množství odchycených subadultních samců provést porovnání změn ve velikosti ornamentů a v délkách spermií a jejich komponentů mezi subadultním a adultním obdobím.

Náš výzkum se zabýval pouze morfologií spermií. Bylo by vhodné tento výzkum zopakovat i s měřením počtu spermií v ejakulátu, jejich rychlosti a délky jejich přežívání. Tento výzkum by mohl na základě našeho zjištění pozitivní korelace křídelní skvrny lejska bělokrkého s hlavičkou spermie a negativní korelace s krčkem spermie testovat hypotézu, že atraktivní samci lejska bělokrkého produkují větší množství spermií, které jsou sice pomalejší, ale mají delší dobu přežívání.

Zatímco je relativní dostatek studií zabývajících se změnami počtu spermií během hnízdní sezóny, vliv času a tím pádem i růstu varlat na morfologii spermií u sezónně hnízdících ptáků je zdokumentován velmi nedostatečně. Přitom tento vliv nám naše studie ukázala jako velmi významný a jeho další zdokumentování u ptáků je velmi důležité jak k samotnému lepšímu zdokumentování tohoto vztahu, tak i k zamezení zkreslení výsledků výzkumů jiných vlivů na morfologii spermií.

6. Literatura

1. ANDERSSON, M. 1994. Sexual selection. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 599 p.
2. BAKER, R. R. a M. A. BELLIS. 1988. Kamikaze sperm in mammals. *Animal Behaviour*. roč. 36, č. 3, s. 936-939.
3. BIRKHEAD, T. R. 1998a. Cryptic female choice: Criteria for establishing female sperm choice. *Evolution*, roč. 52, č. 4, s. 1212-1218.
4. BIRKHEAD, T. R. 1998b. Sperm competition in birds. *Reviews of Reproduction*. roč. 3, č. 2, s. 123-129.
5. BIRKHEAD, T. R. a A. P. MØLLER. 1992. Sperm competition in birds: Evolutionary causes and consequences. London: Academic Press London, 282 s.
6. BIRKHEAD, T. R. a T. PIZZARI. 2002. Postcopulatory sexual selection. *Nature Reviews Genetics*. roč. 3, č. 4, s. 262-273.
7. BIRKHEAD, T., D. J. HOSKEN a S. PITNICK. 2009. Sperm biology: an evolutionary perspective. Amsterdam: *Academic Press*, xxxii, 642 s.
8. BONDURIANSKY, R., S. F. CHENOWETH. 2009. Intralocus sexual conflict: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology and Evolution*. roč. 24, č. 5, s. 280-288.
9. BRILLARD, J. P. a M. R. BAKST. 1990. Quantification of spermatozoa in the sperm-storage tubules of turkey hens and the relation to sperm numbers in the perivitelline layer of eggs. *Biology of Reproduction*. roč. 43, č. 2, s. 271-275.
10. BRISKIE, J. V. 1996. Spatiotemporal patterns of sperm storage and last-male sperm precedence in birds. *Functional Ecology*, roč. 10, č. 3., s. 375-383.
11. BRISKIE, J. V. a R. MONTGOMERIE. 1993. Patterns of sperm storage in relation to sperm competition in passerine birds. *The Condor*. roč. 95, č. 2, s. 442-454.
12. BRISKIE, J. V., R. MONTGOMERIE a T. R. BIRKHEAD. 1997. The evolution of sperm size in birds: meta-analyses of strategic ejaculation. *Evolution*. roč. 51, č. 3, s. 937-945.
13. BROWN, M. E. 1996. Assessing Body Condition in Birds. *Current Ornithology*. roč. 13, s. 67-135.
14. BUCHHOLZ, R. 1991. Older males have bigger knobs: Correlates of ornamentation in two species of curassow. *The Auk*. roč. 108, č. 1, s. 153-160.

15. CALHIM, S., M. C. DOUBLE, N. MARGRAF, T. R. BIRKHEAD a A. COCKBURN. 2011. Maintenance of Sperm Variation in a Highly Promiscuous Wild Bird. *PLOS ONE*. roč. 6, č. 12, č.čl. e28809.
16. CALHIM, S., S. IMMLER a T. R. BIRKHEAD. 2007. Postcopulatory Sexual Selection Is Associated with Reduced Variation in Sperm Morphology . *PLOS ONE*. roč. 2, č. 5, č. čl. e413.
17. CAMERON, E., T. DAY a L. ROWE. 2003. Sexual conflict and indirect benefits. *Journal of Evolutionary Biology*. roč. 16, č. 5, s. 1055-1060.
18. CEPÁK, J. 2008a. Fauna ČSSR. Vyd. 1. Praha: Aventinum, 607 s.
19. CEPÁK, J. 2008b. Atlas migrace ptáků České a Slovenské republiky. Vyd. 1. Praha: Aventinum, 607 s.
20. CORNWALLIS, C. K a T. R BIRKHEAD. 2007. Experimental evidence that female ornamentation increases the acquisition of sperm and signals fecundity. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. roč. 274, č. 1609, s. 583-590.
21. CORNWALLIS, C. K., T. R. BIRKHEAD. 2007. Changes in Sperm Quality and Numbers in Response to Experimental Manipulation of Male Social Status and Female Attractiveness. *The American Naturalist*. roč. 170, č. 5, s. 758-770.
22. CRAMER, E. R. A., T. LASKEMOEN, O. KLEVEN a J. T, LIFJELD. 2013b. Sperm length variation in House Wrens *Troglodytes aedon* . *Journal of Ornithology*. roč. 154, č. 1. s. 129-138.
23. CRAMER, E. R. A., T. LASKEMOEN, O. KLEVEN, K. LABARBERA, I. J. LOVETTE a J. T. LIFJELD. 2013a. No evidence that sperm morphology predicts paternity success in wild house wrens. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. roč. 67, č. 11, s. 1845-1853.
24. DE LOPE, F. a A. P. MØLLER. 1993. Female reproductive effort depends on the degree of ornamentation of their mates. *Evolution*. roč. 47, č. 4, s. 1152-1160.
25. DEAN, R., S. NAKAGAWA a T. PIZZARI. 2011. The risk and intensity of sperm ejection in female birds. *The American Naturalist*. roč. 178, č. 3, s. 343-354.
26. DIXSON, A. 2002. Sexual selection by cryptic female choice and the evolution of primate sexuality. *Evolutionary Anthropology*. roč. 11, č. 1, s. 195-199.
27. EBERHARD, W. G. 1996. Female control: sexual selection by cryptic female choice. Princeton, N.J.: Princeton University Press, 501 p.

28. EDWARD, D. A. a T CHAPMAN. 2011. The evolution and significance of male mate choice. *Trends in Ecology and Evolution*. roč. 26, č. 12, s. 647-654.
29. FREEDMAN, S. L., V. G. AKUFFO a M. R. BAKST. 2001. Evidence for the innervation of sperm storage tubules in the oviduct of the turkey (*Meleagris gallopavo*). *Reproduction*. roč. 121, č. 5, s. 809-814.
30. GUSTAFSSON, L., A. QVARNSTRÖM a B. C. SHELDON. 1995. Trade-offs between life-history traits and a secondary sexual character in male collared flycatchers. *Nature*. roč. 375, č. 6529, s. 311-313.
31. HEGYI, J., J. TOROK a L. TOTH,. Qualitative population divergence in proximate determination of a sexually selected trait in the collared flycatcher. 2002. *Journal of Evolutionary Biology*. roč. 15, č. 5, s. 710-719.
32. HOLMAN, L. a R. R. SNOOK. 2006. Spermicide, cryptic female choice and the evolution of sperm form and function. *Journal of Evolutionary Biology*. roč. 19, č. 5, s. 1660-1670.
33. IMMLER, S. a T. R BIRKHEAD. Sperm competition and sperm midpiece size: no consistent pattern in passerine birds. 2007. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. roč. 274, č. 1609, s. 561-568.
34. KELLY, C. D. a M. D. JENNIONS. 2011. Sexual selection and sperm quantity: meta-analyses of strategic ejaculation. *Biological Reviews*. roč. 86, č. 4, s. 863-884.
35. KILGALLON, S. J. a L. W. SIMMONS. 2005. Image content influences men's semen quality: not playing by the numbers. *Biology Letters*. roč. 1, č. 3, s. 253-255.
36. KING, L. M., J. P. BRILLARD, W. M. GARRET, M. R. BAKST a A. M. DONOGHUE. 2002. Segregation of spermatozoa within sperm storage tubules of fowl and turkey hens. *Reproduction*. roč. 123, č. 1, s. 79-86.
37. KINGMA, S. A., M. L. HALL a A. PETERS. 2012. Sperm storage reflects within- and extra-pair mating opportunities in a cooperatively breeding bird. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. roč. 66, č. 8, s. 1115-1123.
38. KOKKO, H., R. BROOKS, J. M. MCNAMARA, A. I. HOUSTON, G. RUDOLFSSEN, J. T. LIFJELD a J. G. EWEN. 2002. Strategic female reproductive investment in response to male attractiveness in birds: tests, mechanisms and implications. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. roč. 269, č. 1498, s. 1331-1340.

39. KURA, T. a Y. NAKASHIMA. 2000. Conditions for the evolution of soldier sperm classes. *Evolution*. roč. 54, č. 1, s. 72-80.
40. LIFJELD, J. T., T. LASKEMOEN, O. KLEVEN, A. T. M. PEDERSEN, H. M. LAMPE, G. RUDOLFSSEN, T. SCHMOLL a T. SLAGSVOLD. 2012. No evidence for pre-copulatory sexual selection on sperm length in a passerine bird. *PLOS ONE*. roč. 7, č. 2, č.čl. 32611.
41. LÜPOLD, S., S. CALHIM, S. IMMLER, T. R BIRKHEAD, D. A. DAWSON, G. J. HORSBURGH a J. G. EWEN. 2009. Sperm morphology and sperm velocity in passerine birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. roč. 276, č. 1659, s. 1175-1181.
42. MASSANY, L. 1991. Funkčná morfológia spermie. 1. vyd. Bratislava: Veda, 189 s.
43. MAUTZ, B. S., A. P. MØLLER a M. D. JENNIONS. 2013. Do male secondary sexual characters signal ejaculate quality? A meta-analysis. *Biological Reviews*. roč. 88, č. 3, s. 669-682.
44. MC GARY, S., I. ESTEVEZ a M.R. BAKST. 2003. Potential relationships between physical traits and male broiler breeder fertility. *Poultry science*. roč. 82., č. 2, s. 328-337.
45. MICHL, G., J. TÖRÖK a S. C. GRIFFITH. 2002. Experimental analysis of sperm competition mechanisms in a wild bird population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. roč. 99, č. 8, s. 5466-5470.
46. MØLLER, A. P., T. A. MOUSSEAU, G. RUDOLFSSEN, J. BALBONTIN, A. MARZAL, I. HERMOSELL a F. DE LOPE. 2009. Senescent sperm performance in old male birds. *Journal of Evolutionary Biology*. roč. 22, č. 2, s. 334-344.
47. NAVARA, K. J., E. M. ANDERSON a M. L. EDWARDS. 2012. Comb size and color relate to sperm quality: a test of the phenotype-linked fertility hypothesis. *Behavioral ecology*. roč. 23, č. 5 s. 1036-1041.
48. PARKER, G. A. 1970. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insect. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. roč. 45, č. 4, s. 525-567.
49. PETERS, A., A. G. DENK, K. DELHEY a B. KEMPENAERS. 2004. Carotenoid-based bill colour as an indicator of immunocompetence and sperm performance in male mallards: a review. *Journal of Evolutionary Biology*. roč. 17, č. 5, s. 1111-1120.

50. QVARNSTROM, 1999. A. Genotype-by-Environment Interactions in the Determination of the Size of a Secondary Sexual Character in the Collared Flycatcher (*Ficedula albicollis*). *Evolution*. roč. 53, č. 5, s. 1564-1572.
51. QVARNSTRÖM, A, J. E. BROMMER a L. GUSTAFSSON. 2006. Testing the genetics underlying the co-evolution of mate choice and ornament in the wild. *Nature*. roč. 441, č. 7089, s. 84-86.
52. QVARNSTROM, A. 1999. Different reproductive tactics in male collared flycatchers signalled by size of secondary sexual character. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. roč. 266, č. 1433, s. 2089-2093.
53. RAHMAN, M. M., J. L. KELLEY a J. P. EVANS. 2013. Condition-dependent expression of pre- and postcopulatory sexual traits in guppies. *Ecology and Evolution*. roč. 3, č. 7, s. 2197-2213.
54. REINHOLD, K., J. KURTZ a L. ENGQVIST. 2002. Cryptic male choice: sperm allocation strategies when female quality varies. *Journal of Evolutionary Biology*. roč. 15, č. 2, s. 201-209.
55. ROSENGRAVE, P., N. J. GEMMELL, V. METCALF, K. MCBRIDE a R. MONTGOMERIE. 2008. A mechanism for cryptic female choice in chinook salmon. *Behavioral Ecology*. roč. 19, č. 6, s. 1179-1185.
56. ROWE, M, J P. SWADDLE, S. PRUETT-JONES a M. S. WEBSTER. 2010. Plumage coloration, ejaculate quality and reproductive phenotype in the red-backed fairy-wren. *Animal Behaviour*. roč. 79, č. 6, s. 1239-1246.
57. ROWE, M., G. A. CZIRJÁK, K. J. MCGRAW a M. GIRAUDEAU. 2011. Sexual ornamentation reflects antibacterial activity of ejaculates in mallards. *Zoological Science*. roč. 7, č. 5, s. 740-742.
58. SÆTRE, G. P., T. MOUM, S. BUREŠ, M. KRÁL, M. ADAMJAN a J. MORENO. 1997. A sexually selected character displacement in flycatchers reinforces premating isolation. *Nature*. roč. 387, č. 6633, s. 589-595.
59. SANTIAGO-MORENO, J., C. CASTANO, A. TOLEDANO-DIAZ, M. C. ESTESO, A. LOPEZ-SEBASTIAN, N. GANAN, M. J. HIERRO, F. MARCHAL, J. L. CAMPO a E. BLESBOIS. 2015. Characterization of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) sperm: Seasonal changes and influence of genetic purity. *Poultry Science*. roč. 94, č. 1, s. 80-87.
60. SHELDON, B. C. 2000. Differential allocation: tests, mechanisms and implications. *Trends in Ecology and Evolution*. roč. 15, č. 10, s. 397-402.

61. SMITH, C., C. 2012. Opposing effects of sperm viability and velocity on the outcome of sperm competition. *Behavioral Ecology*. roč. 23, č. 4, s. 820-826.
62. SNOOK, R. 2005. Sperm in competition: not playing by the numbers. *Trends in Ecology and Evolution*. roč. 20, č. 1, s. 46-53.
63. ŠŤASTNÝ, K, V. BEJČEK a K. HUDEC. 2006. Atlas hnízdního rozšíření ptáků v České republice 2001 - 2003. Vyd. 1. Praha, 463 s.
64. TORRES-CALLEJA, J., M. GONZÁLEZ-UNZAGA, R. DECELIS-CARRILLO, L. CALZADA-SÁNCHEZ a N. PEDRÓN. 2001. Effect of androgenic anabolic steroids on sperm quality and serum hormone levels in adult male bodybuilders. *Life Sciences*. roč. 68, č. 15, s. 1769-1774.
65. TOURMENTE, M, M. GOMENDIO a E. R. S ROLDAN. 2011. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals. *BMC Evolutionary Biology*. roč. 11, č. 1, č.čl. 12.
66. VAN NOORDWIJK, A. J. a G. DE JONG. 1986. Their Influence on Variation in Life History Tactics. *The American Naturalist*. roč. 128, č. 1, s. 137-147.