

UNIVERZITA KARLOVA

FAKULTA PŘÍRODOVĚDECKÁ

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Zoologie



Mgr. Tereza Myslíková

Ztráty vody výparem u gekonů rodu *Paroedura*

Evaporative water loss in geckos of the genus *Paroedura*

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Zuzana Starostová, Ph.D.

Praha, 2020

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

V Praze, 06. 01. 2020

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych poděkovat Dr. Pavlačkové z UTB Zlín za zapůjčení Tewameteru pro měření ztrát vody pokožku. Dále bych chtěla poděkovat Lukáši Kratochvílovi za cenné rady. Děkuji také Janu Červenkoví a Tereze Radostné, za pomoc při péči o pokusná zvířata. Chtěla bych také poděkovat grantu GAUK (č. 1258217) za finanční podporu.

Velké poděkování patří také konzultantovi diplomové práce, kterým byl Mgr. Martin Hlubeň. Děkuji především za pomoc se statistickou analýzou dat, pomoc při experimentech a spolupráci.

Největší poděkování patří vedoucí práce, Mgr. Zuzaně Starostové Ph.D. Chtěla bych poděkovat především za pomoc při experimentech, za předání znalostí, zkušeností a velice cenných rad při spolupráci. Velice děkuji také za podporu, ochotu a trpělivost při zpracování diplomové práce.

Abstrakt

Udržování rovnovážného stavu tělních tekutin, zejména regulace ztrát vody výparem, je pro terestrické živočichy, včetně plazů, velmi důležitá. Největší podíl na celkových ztrátách vody výparem (TEWL) mají ztráty vody při dýchání a ztráty vody pokožkou. Z tohoto důvodu mohou ztráty vody výparem u plazů ovlivňovat především velikost těla, intenzita metabolismu a morfologie šupin pokrývajících tělo.

Diplomová práce se zaměřuje na ztráty vody výparem u madagaskarských gekonů rodu *Paroedura*. Zástupci rodu *Paroedura* jsou pro tento výzkum vhodnou skupinou, protože se jedná o monofyletický rod s dobře podpořenou hypotézou o fylogenetických vztazích, která byla v této diplomové práci ještě doplněna a zároveň se jednotlivé druhy liší tělesnými rozměry a také preferencí habitatu. Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda s zástupci rodu *Paroedura* liší v TEWL, jaký byl ancestrální stav TEWL u tohoto rodu a jaké morfologické nebo fyziologické faktory TEWL ovlivňují. Dalším cílem bylo přímo změření ztrát vody pokožkou. TEWL a intenzita metabolismu byly měřeny pomocí průtokové respirometrie. Výsledky ukazují, že zástupci rodu *Paroedura* se značně liší v hodnotách TEWL. Rekonstrukce ancestrálního stavu naznačuje, že původní hodnota TEWL byla poměrně vysoká. Většina, tedy 9 z 11 druhů zahrnutých do analýzy má TEWL výrazně nižší. Při porovnání TEWL s preferovaným habitatem studovaných druhů, se ukazuje, že druhy z vlhkých pralesních oblastí mají výrazně vyšší hodnoty a TEWL se snižuje s přechodem do aridnějšího prostředí. Nejlepšími prediktory, které vysvětlují variabilitu TEWL jsou hmotnost a velikost ventrálních šupin, které jsou však také silně korelovány s hmotností. Výsledky přímého měření ztrát vody pokožkou potvrzují výsledky měření TEWL a ztráty vody pokožkou jsou nejvyšší u druhů obývajících tropické deštné lesy. Výsledky diplomové práce naznačují, že často pozorovanou negativní závislost mezi TEWL a ariditou prostředí lze najít i u rodu *Paroedura*. Druhy rodu *Paroedura* se i díky změnám v TEWL dokázali přizpůsobit různé ariditě prostředí, tak mohli osídlit různé habitaty.

Klíčová slova: aridita prostředí, gekoni, Madagaskar, plazi, rychlost metabolismu, šupiny, velikost těla, výpar

Abstract

Keeping a balanced state in terms of liquids in an organism, especially evaporative water loss regulation, is essential for all terrestrial animals, including reptiles. Respiratory water loss and cutaneous water loss account for the highest percentage of total water loss. For this reason, the degree of evaporative water loss in reptiles can be primarily influenced by body dimensions, metabolism intensity and morphology of body surface scales.

This thesis focuses on water loss through evaporation in Madagascan *Paroedura* geckos. The *Paroedura* are suitable for this research because they represent a monophyletic genus with a strongly supported hypothesis about phylogenetic relationships. The thesis adds some facts to this theory. At the same time, individual *Paroedura* species differ in body dimensions and habitat preference. The aim of the thesis was to find out whether individual representatives of *Paroedura* differ in TEWL, to specify the characteristics of the ancestral state of TEWL in this genus and to test which morphological and physiological factors influence TEWL. Further aim was to measure cutaneous water loss. Measuring was carried out by flow-through respirometry. The results show that individual representatives of *Paroedura* differ remarkably in TEWL figures. The reconstruction of the ancestral state implies that the original TEWL was rather high. The majority, namely nine out of eleven genera included in the analysis, has a remarkably lower TEWL. A comparison of TEWL with the preferred habitat of studied species shows that the species living in humid rainforest areas have remarkably higher figures and TEWL tends to decrease with the transition to a more arid environment. The best predictors explaining TEWL are the weight and size of ventral scales. However, the size of the scales obviously strongly correlates with weight. Cutaneous water loss measurement confirms TEWL measurement and the figures are the highest in species living in tropical rainforests. The results of the thesis imply that the frequently observed negative correlation between TEWL and aridity of the environment can be seen in *Paroedura* genus as well. *Paroedura* species were able to adapt to environments with various degrees of aridity owing partly to TEWL changes and thus were able to settle in various habitats.

Key words: aridity, geckos, Madagascar, reptiles, metabolic rate, scales, body size, evaporation

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Ztráty vody výparem	1
1.1.1	Ztráty vody dýcháním (RWL)	2
1.1.2	Ztráty vody pokožkou (CWL)	3
1.2	TEWL a jednotlivé koreláty	4
1.2.1	TEWL a prostředí	4
1.2.2	TEWL a hmotnost těla	5
1.2.3	TEWL a intenzita metabolismu	5
1.3	TEWL u plazů	6
1.3.1	CWL a šupiny u plazů	8
1.3.2	RWL u plazů	9
1.3.3	Ztráty vody ze sliznice očí	9
1.4	Modelová skupina a její biologie a ekologie.....	11
1.4.1	rod <i>Paroedura</i>	11
1.4.2	Biologie rodu <i>Paroedura</i>	13
1.4.3	Madagaskar jako těžiště diverzity nejen rodu <i>Paroedura</i>	13
1.4.4	Druhy rodu <i>Paroedura</i> zahrnuté do diplomové práce	16
1.5	Cíle práce	25
2	Metodika	26
2.1	Rekonstrukce fylogeneze na základě sekvenčních dat.....	26
2.1.1	Materiál použitý pro sekvenování.....	26
2.1.2	Příprava vzorku pro sekvenaci.....	26
2.1.3	Zpracování sekvenčních dat.....	28
2.1.4	Tvorba alignmentu a rekonstrukce fylogenetických vztahů	29
2.2	Grafická úprava fylogenetických stromů	30

2.3	Měření a analýza TEWL a dalších morfologických a fyziologických korelátů TEWL u rodu <i>Paroedura</i>	31
2.3.1	Měření TEWL a INTENZITY METABOLISMU.....	31
2.3.2	Příprava na měření	31
2.3.3	Měření a analýza TEWL a INTENZITY METABOLISMU.....	34
2.3.4	Vyhodnocení a analýza dat TEWL a intenzity metabolismu	34
2.4	Měření CWL	35
2.4.1	Morfometrie ventrálních šupin	38
2.5	Statistická analýza a vyhodnocení dat TEWL, CWL a intenzity metabolismu	39
3	Výsledky	40
3.1	Zjištění příbuzenských vztahů mezi studovanými druhy rodu <i>Paroedura</i>	40
3.1.1	Vstupní data	40
3.1.2	Rekonstrukce fylogeneze.....	40
3.2	Naměřené hodnoty TEWL a intenzity metabolismu u zástupců rodu <i>Paroedura</i> .	42
3.2.1	Analýza TEWL u rodu <i>Paroedura</i>	42
3.2.2	Prediktory TEWL	44
3.2.3	Vztah mezi velikostí ventrálních šupin a hmotností.....	47
3.3	CWL u zástupců rodu <i>Paroedura</i>	48
4	Diskuze.....	50
5	Závěr	55
6	Seznam literatury	56
6.1	Seznam obrázků přejetých z internetu	64
7	Přílohy	65

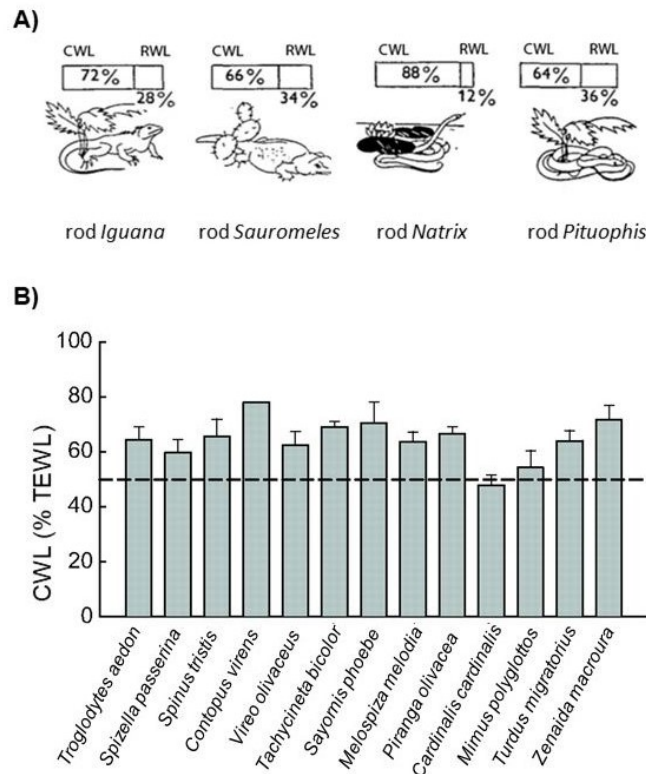
1 ÚVOD

1.1 ZTRÁTY VODY VÝPAREM

S přechodem živočichů z vody na souš docházelo k dramatickým změnám fyzikálních a chemických podmínek nového prostředí. Život na souši s sebou přirozeně přináší pozitiva, například snadný přístup ke kyslíku, naopak nevýhodou pobytu na souši je hrozba dehydratace. Voda v těle živočichů plní funkci univerzálního rozpouštědla. Je důležitá pro správný průběh všech fyziologických procesů, včetně metabolismu a osmoregulace. Regulace a udržování rovnovážného stavu tělních tekutin je životně důležité pro všechny suchozemské živočichy. Diverzita terestrických živočichů je obrovská, avšak největšího úspěchu v osídlení souše se povedlo pouze členovcům a obratlovcům. Zástupce těchto skupin pak můžeme najít i v těch nejextrémnějších prostředích s minimem vody (Withers, 1992; Schmidt-Nielsen, 2007). Hlavní zdroj vody pro živočichy je zajištěn přímým příjmem tekutin (pitím) a také jako součást potravy. Významným zdrojem vody je také produkce vody při oxidaci živin jako vedlejší produkt metabolismu (tzv. metabolická voda). U některých skupin živočichů, například u hmyzu, můžeme pozorovat i jiný zdroj vody. Někteří zástupci hmyzí říše dokáží získávat vodu z povrchu těla, a to jak v kapalném, tak i v plynném skupenství. Ztráta vody z těla živočichů se u terestrických živočichů uskutečňuje především evaporací (výparem) a produkcí moči a trusu (Schmidt-Nielsen, 2007).

Celkové ztráty vody z těla organismů jsou souhrnem jednotlivých komponent. Ztráty vody se u jednotlivých skupin značně liší v závislosti na jejich způsobu života. Obecně lze říci, že všichni terestrickí živočichové výrazně ztrácejí vodu evaporací. Hlavní podíl na celkových ztrátách vody výparem (*total evaporative water loss*, TEWL) mají u živočichů ztráty vody při dýchání (*respiratory water loss*, RWL) a ztráty vody pokožkou (*cutaneous water loss*, CWL) (Withers, 1992; Schmidt-Nielsen, 2007; Obr. 1). V míře ztrát vody výparem existují u různých skupin terestrických živočichů rozdíly (viz Obr. 1). Ztráty vody výparem výrazně závisí na okolních podmínkách prostředí. Mezi nejvýznamnější podmínky patří teplota a charakter prostředí. Další důležité faktory jsou relativní vlhkost vzduchu a rychlost větru (Mautz, 1980, 1982a; 1982b; Graham & Withers, 1998). V souvislosti s hlavními cestami ztrát vody výparem patří mezi nejdůležitější tyto faktory: velikost, stavba a povrch těla, intenzita metabolismu a stupeň aktivity (Thompson & Withers 1997; Graham & Withers, 1998). Schopnost regulace ztrát vody výparem je klíčová především u živočichů, kteří obývají

extrémně suchá prostředí (Williams, 1996; Van Sant et al., 2012; Cox & Cox, 2015; Oufiero & Van Sant, 2018).



Obr. 1.: A) Poměr ztrát vody pokožkou (CWL) a ztrát vody při dýchání (RWL) u zástupců šupinatých plazů. Poměr se může lišit, CWL ale vždy převažuje (upraveno podle Schmidt-Nielsen 1969). B) CWL vyjádřené jako procento TEWL u zástupců temperátních ptáků. CWL měřeno při 25 °C (upraveno podle Williams et al., 2012).

1.1.1 Ztráty vody dýcháním (RWL)

Při dýchání se voda ztrácí během výměny plynů. Hodnota respiračního výparu závisí na několika veličinách, mezi které patří ventilační poměr, teplota v plicích, teplota okolního prostředí a voda obsažená v atmosféře (McNab, 2002). Ke ztrátám vody dochází vždy, když je teplota těla vyšší než teplota prostředí. Ztráty vody dýcháním narůstají společně s teplotou. Při vysokých teplotách okolního prostředí slouží evaporace dýcháním k ochlazení organismu (Tattershall et al., 2006). Z důvodu ochlazení organismu pomocí dýchání se u suchozemských obratlovců vyvinuli některé specifické vzorce chování. U ptáků byl pozorován tzv. *gular fluttering*, který slouží k ochlazení hlavy. Savci využívají podobný způsob ochlazení, tzv. *panting*, jež je charakteristický zrychleným oddechováním při vysokých teplotách

nebo během náročné aktivity (McNab, 2002). U plazů byly podobné vzorce dýchání také zdokumentovány a budou popsány v samostatné kapitoly RWL u plazů.

Zajímavé je srovnání RWL a CWL u hmyzu, kde RWL může dosáhnout vyšších hodnot, protože voda se vypařuje přes systém trachejí (Chown, 2002). U některých zástupců hmyzu byla pozorována životní strategie, při které redukovali propustnost kutikuly natolik, že se dominantní komponentou TEWL se stála ztráta vody respiračním traktem, tedy trachejemi (Zachariassen et al., 1987; Zachariassen, 1996).

1.1.2 Ztráty vody pokožkou (CWL)

Ztráty vody pokožkou jsou druhou významnou složkou celkových ztrát výparem (např. Mautz, 1982 a,b). Evaporace přes kůži je závislá na mnoha faktorech, ty nejdůležitější jsou velikost těla a povrchu, proudění vzduchu, relativní vlhkost vzduchu a teplota prostředí (Mautz, 1982 a,b; McNab, 2002).

Soustředíme-li se na obratlovce, vyvolal přechod na souš a adaptace na suché prostředí u jednotlivých skupin velké změny. Pokud srovnáme kůži obojživelníků a prvních primárně terestrických obratlovců, plazů, nalezneme velké rozdíly. Odlišnosti najdeme především ve stavbě kůže, konkrétně části kůže, která se nazývá *stratum corneum*. Dalším rozdílem, kterým se od sebe liší jednotlivé skupiny obratlovců, jsou deriváty pokožky. U plazů jsou nejvýznamnějším derivátem šupiny (dále například krunýř želv či osteodermu krokodýlů), u ptáků je to peří a u savců srst (Alibardi, 2003). V problematice CWL jsou nejvíce prozkoumanou skupinou obratlovců plazi, protože jejich kůže dokáže zadržovat vodu více, než kůže jiných suchozemských obratlovců (Oufiero & Van Sant, 2018). Tématice CWL v souvislosti s pokryvem těla plazů bude věnována samostatná kapitola.

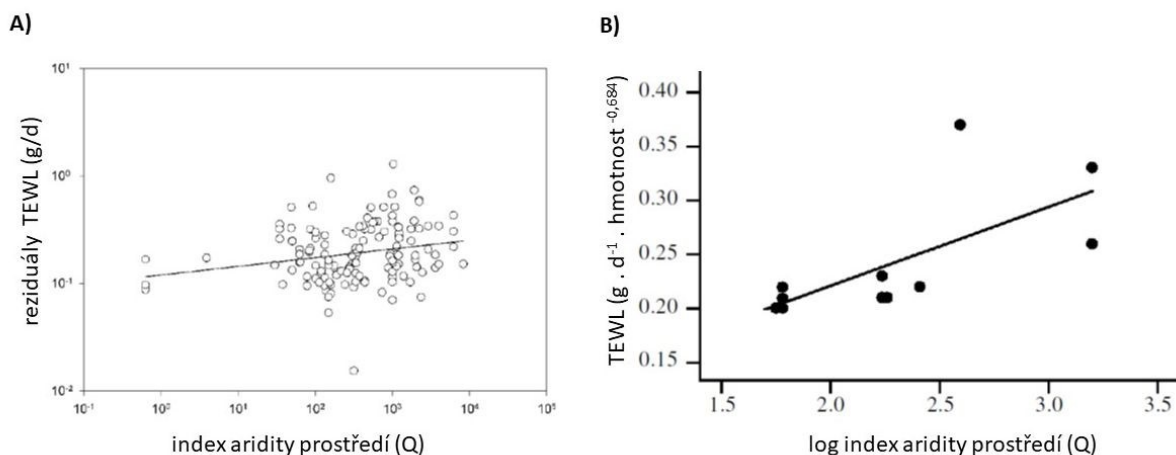
Jak již bylo zmíněno, pro plazy, ptáky a savce je specifická vrstva pokožky *stratum corneum*. Tato vrstva tvoří bariéru proti ztrátám vody výparem přes kůži a chrání tělo před nadměrným vysycháním (Lillywhite, 2006). Specifickou skupinou s ohledem na CWL jsou obojživelníci. Pokožka obojživelníků již zmíněnou vrstvu (*stratum corneum*) také obsahuje, ale stavba je výrazně odlišná. Pokožka většiny vodních, semiakvatických, ale i suchozemských druhů obojživelníků je velice tenká a z důvodu kožního dýchání je propustná pro vodu a plyny. Obojživelníci jsou tedy vystaveni vysokým hodnotám CWL a schopnost regulace ztrát je minimální (Liu & Hou, 2012). Tyto druhy se tedy musí bránit riziku vysychání, a proto jsou závislí na vodním zdroji či vlhkém prostředí (Liu & Hou, 2012). Obranou v období sucha mohou být různé změny v chování, například hloubení nor v zemi (Young et al., 2005), produkce ochranného slizu (Tracy et al., 2016) nebo úsporný postoj

(*water-conserving posture*), kterým dokáží výrazně omezit ventrální výpar (Young et al., 2005). U dalších skupin suchozemských obratlovců je vrstva *stratum corneum* dobře vyvinuta. Další výhodou proti ztrátám vody výparem je vývoj různých derivátů pokožky, které mají na snížení CWL velký vliv (Alibardi, 2003). U ptáků bylo jako termoregulační ochrana a ochrana proti nadměrným ztrátám CWL vyvinuto peří. U většiny savců je na povrchu těla srst, která také slouží jako termoregulační a izolační bariéra proti CWL. U savců zároveň došlo k vývoji potních žláz, které jsou velice důležité pro ochlazování těla (McNab, 2002; Alibardi, 2003).

1.2 TEWL A JEDNOTLIVÉ KORELÁTY

1.2.1 TEWL a prostředí

Živočichové, kteří žijí v aridních oblastech se musí neustále vypořádávat s podmínkami charakterizující tento typ prostředí. Mezi ty nejdůležitější patří okolní teplota, nízká vlhkost vzduchu a nedostatek pitné vody (Williams & Tieleman, 2001). Druhy obývající suché oblasti prokazují nižší průměrné hodnoty TEWL (Obr. 2). Podobné výsledky ukazují výzkumy u všech skupin suchozemských živočichů, u plazů (Mautz, 1982 a, b; Cox & Cox, 2015; Muñoz-Nolasco et al., 2019), ptáků (Williams, 1996; Tieleman et al., 2003), savců (Williams et al., 2004; Withers et al., 2006; Van Sant et al., 2012), ale také u bezobratlých živočichů (Zachariassen, 1996). Zajímavé je, že tento trend se vyskytuje jak u ektotermních, tak u endotermních živočichů. Život v aridním prostředí vyžaduje mnoho morfologických, behaviorálních a fyziologických adaptací. K morfologickým adaptacím k rezistenci TEWL patří například vznik rohovatější pokožky a derivátů pokožky (Alibardi, 2003). Behaviorální adaptace mohou být například změna aktivity, využití úkrytů nebo specifické vzorce v chování (zrychlené dýchání pro ochlazení), fyziologické adaptace mohou být například snížení intenzity metabolismu, termoregulace (McNab, 2002; Tattershall et al., 2006), hypertermie u ptáků (Nilsson et al., 2016) nebo produkce ochranného slizu u obojživelníků (Tracy et al., 2010). Adaptace následně ovlivňuje ekologickou a evoluční dynamiku kolonizace a diverzifikace u jednotlivých skupin živočichů (Lanier et al., 2013; Cox & Cox, 2015). Tyto mechanismy se projevují například v regulaci RWL a souvisí zejména se změnami v intenzitě metabolismu. U CWL změny souvisí s přítomností derivátů pokožky a důležitá je také stavba pokožky, vaskularizace podkoží, přítomnost lipidové vrstvy v epidermis nebo *stratum corneum* (Cohen, 1975; Roberts & Lillywhite 1980; Van Sant et al., 2012; Cox & Cox, 2015).



Obr 2.: Vztah mezi TEWL korigovanými na hmotnost a indexem aridity prostředí (Q) u savců (A) a u zástupců čeledi skřivanovití (Alaudidae) (B). Q se zvyšuje ve směru od aridního po vlhké prostředí. Grafy shodně ukazují, že TEWL se zvyšuje s rostoucí vlhkostí prostředí, tedy vyšším Q. Převzato a upraveno podle Van Sant et al. (2012) a Tieleman et al. (2003).

1.2.2 TEWL a hmotnost těla

Velice důležitým faktorem, který ovlivňuje celkové ztráty vody výparem je velikost těla. Jedná se především o velikost povrchu, kterým dochází k výparu vody. Je tedy možné, že při porovnávání dvou jedinců ve stejném prostředí, z nichž jeden bude větší a bude mít větší povrch, bude mít i vyšší hodnoty TEWL. Právě z tohoto důvodu je velice komplikované mezidruhové srovnávání TEWL. Pro správné porovnávání a nezkrácené výsledky je potřeba převést TEWL do unikátních jednotek, které budou nezávislé na velikosti těla. Vhodným způsobem je například TEWL vztažený na jednotku hmotnosti těla (Mautz 1982 a, b).

1.2.3 TEWL a intenzita metabolismu

Intenzita metabolismu je pravděpodobně jedním z nejdůležitějších znaků, který ovlivňuje ztráty vody výparem. Hodnota metabolismu úzce souvisí s intenzitou dýchání, rychlejší dýchání má za následek vyšší hodnoty RWL (Mautz, 1982a). Rozdíly můžeme nalézt mezi ektotermními a endotermními živočichy. Ektotermové mají celkově nižší hodnoty bazálního metabolismu a důležitou roli pak hraje typ prostředí, ve kterém se vyskytují (McNab, 2002). Kromě teploty prostředí může mít vliv na intenzitu metabolismu ektotermů i aridita prostředí. Tuto hypotézu potvrdil například výzkum u gekona druhu *Sphaerodactylus macrolepis*, ve kterém autoři ukazují, že redukované hodnoty aerobního metabolismu mohou výrazně

ovlivňovat RWL. Výhodou této adaptace (snížení intenzity metabolismu) je lepší a výhodnější hospodaení s vodou v xerických oblastech (Snyder, 1975). Studie, která sledovala mezidruhové variace metabolismu u hadů, rovněž ukazuje, že hadi mají schopnost snižovat intenzitu metabolismu na suchých stanovištích, kde je menší množství srážek (Dupoe et al., 2017). Endotermové mají naopak velice intenzivní metabolismus. Důsledkem vysokých hodnot metabolismu mají také vyšší hodnoty RWL, protože respirace a metabolismus spolu úzce souvisí (Van Sant et al., 2012). Ale i u endotermních živočichů bylo dokumentováno, že druhy, které obývají aridní prostředí, například pouště, využívají fyziologické adaptace, které vedou ke snížení intenzity metabolismu. Snížení intenzity metabolismu se zvyšující se ariditou prostředí a následně také snížení TEWL bylo zjištěno například u ptáků z čeledi Alaudidae (Tieleman et al., 2003). Podobné výsledky byly nalezeny v přehledové studii věnované zoogeografii a metabolismu savců (Lovegrove, 2000), kde byl reanalýzou publikovaných dat ukázán jasný trend, že savci z aridních oblastí mají při stejné hmotnosti až o 24 % nižší hladinu bazálního metabolismu než ti, kteří žijí ve vlhkém prostředí. Zajímavé je, že tento rozdíl se snižuje se vzrůstající velikostí těla. Ztráty vody v tomto případě nebyly analyzovány, ale souvislost s TEWL lze předpokládat i u savců. Podobně jako v mezidruhových srovnáních, byl negativní vztah mezi ariditou prostředí a intenzitou metabolismu a souvislost se snižováním TEWL dokumentován i vnitrodruhově u drobného pěvce strnadce ranního (*Zonotrichia capensis*) (Sabat et al., 2006).

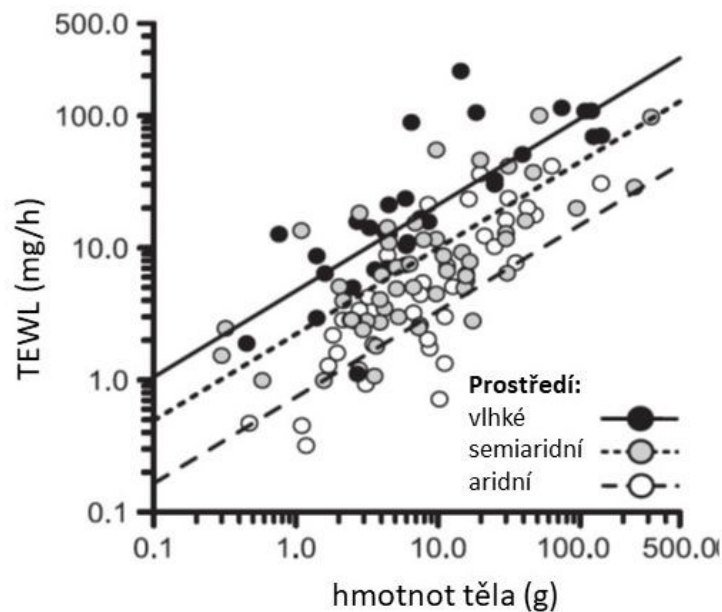
1.3 TEWL U PLAZŮ

Plazi vodu ztrácejí nejvíce evaporací přes kůži a dýcháním (viz také Obr. 1). K dalším ztrátám dochází vypařováním vody z oční sliznice a vylučováním odpadních látek (Mautz, 1982a, b), vypařování z kloaky (DeNardo et al., 2004), u mořských zástupců, například krokodýlů, se voda vylučuje ze solných žláz (Graham et al. 1998).

Plazi dokazují mimořádnou schopnost adaptace variabilitou biotopů, které úspěšně osídlili. Zástupce této pozoruhodné skupiny nacházíme od mírného až po tropický pás. Druhotně se vrátili do vody, ať už jako semiakvatické, sladkovodní či mořské druhy (Vitt & Caldwell, 2014). Zajímavé je, že plazi (především hadi a ještěři) patří mezi nejpočetnější zástupce obratlovců v aridních oblastech (Cox & Cox, 2015). I u plazů platí, že druhy obývající suché oblasti mají nižší průměrné hodnoty TEWL (shrnuto v Mautz, 1982b; Cox & Cox, 2015, Obr. 3). Tento vztah reflektuje fyziologické adaptace, které slouží k šetření vody v těle živočichů žijících v oblastech, kde je nedostatek zdrojů vody (Mautz, 1982b). S extrémními podmínkami, které panují v aridním prostředí, se plazi dokázali výborně

vypořádat. Adaptace na aridní habitaty zahrnuje různé behaviorální adaptace, jako je změna denní aktivity, využívání úkrytů, hloubení nor (Bulova, 2002; Cox & Cox, 2015), morfologické a fyziologické mechanismy, například snížení intenzity metabolismu, tolerance vysokých teplot, termoregulace, pohyb, velikost a pokryv těla (Cox & Cox, 2015).

V literatuře je i v současné době omezené množství studií, které by sledovaly mezidruhové rozdíly v TEWL s ohledem na fylogenetické vztahy mezi studovanými druhy. Fylogenetická analýza TEWL u plazů byla provedena u gekončků z rodu *Coleonyx* (Dial & Grismer, 1992), kde autoři sledovali vývoj TEWL v závislosti na typu prostředí a současně brali v potaz fylogenetické vztahy zkoumaných druhů. V této studii dospěli k výsledkům, že hodnota TEWL má v evolučním vývoji trend, při kterém se hodnoty výparu snižují, což pravděpodobně souvisí s ariditou prostředí a adaptacemi na tento typ prostředí. Za pomoci fylogenetických srovnávacích metod bylo také nedávno ukázáno, že v evoluci šupinatých plazů byly přechody mezi různými typy prostředí vždy spojeny s adaptivními změnami v TEWL (Cox & Cox, 2015).



Obr. 3.: Závislost mezi TEWL a hmotností těla u šupinatých plazů. Z grafu je patrné, že i u plazů hodnoty TEWL klesají se vzrůstající ariditou prostředí (převzato a upraveno podle Cox & Cox (2015)).

1.3.1 CWL a šupiny u plazů

Hodnoty CWL by měly v první řadě škálovat s povrchem těla, ale měly by být ovlivněny i typem a složením tělního pokryvu a pokožky. Plazi jsou důkazem toho, jak důležitý je při osidlování extrémních prostředí povrch těla. Šupiny jedince chrání před mechanickým poškozením, slunečním zářením a samozřejmě proti ztrátám vody (Alibardi, 2003). Šupiny vykazují velkou mezidruhovou variabilitu, liší se tvarem, velikostí, počtem a povrchem (Oufiero et al., 2011). Rozdíly mezi šupinami můžeme pozorovat také na ventrální a dorzální straně těla. Konkrétní příklad rozdílu lze pozorovat u ventrálních šupin, které u beznohých druhů plazů (například hadů) slouží také k pohybu (Dohm & Garland, 1993). Dorzální šupiny jsou více heterogenní a na jejich povrchu mohou být přítomny různé ornamenty (Oufiero et al., 2011).

V literatuře existuje několik studií, které se zaměřují na vztah mezi TEWL a šupinami. Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících TEWL se zdá být vztah mezi velikostí šupin a ariditou prostředí. Podmínky prostředí, například nedostatek vody či zvýšená teplota mají zásadní vliv na ztráty vody výparem. Pro dané živočichy je životně důležité, aby maximálně snižovali ztráty vody přes pokožku. Při výzkumu závislosti velikostí šupin a aridity prostředí (Calsbeek et al., 2006; Wegener et al., 2014) bylo zjištěno, že ke ztrátám vody pravděpodobně dochází v prostoru mezi šupinami. Vysvětlením je, že tyto struktury nejsou stejné stavby jako samotné šupiny, a tak dochází ke ztrátám vody. Podle zmíněných studií se tedy nejvýhodnější strategií v aridních oblastech zdají být velké šupiny s menším počtem prostorů mezi šupinami. Toto uspořádání napomáhá redukovat ztráty vody výparem tím, že minimalizuje povrch nechráněné kůže (Alibardi, 2003; Calsbeek et al., 2006; Wegener et al. 2014). V rozporu s těmito výsledky je například studie, která byla provedena u rodu *Sceloporus* (Oufiero et al., 2011). Autoři naopak tvrdí, že v prostředí, které je více aridní a má menší počet srážek, může být výhodnější větší počet menších šupin. V každém případě se zdá, že variabilita ve velikosti šupin může výrazně přispět k adaptivním změnám v CWL a tady i TEWL.

Kůže plazů je tvořena z různého počtu keratynocytů, jejichž počet je závislý na cyklu svleku kůže (Torri et al., 2014). Nad keratynocyty se nachází další vrstvy buněk, které jsou tvořené především z proteinů a lipidů. S ohledem na CWL plazů, je nejdůležitější lipidová vrstva (přechodná oblast mezi α a β vrstvami), protože tato vrstva slouží jako vodní bariéra, která zvyšuje nepropustnost tělního pokryvu u plazů. Přítomnost této vrstvy je jedním z vysvětlení mezidruhové variability CWL (Roberts & Lillywhite 1980; Torri et al., 2014).

1.3.2 RWL u plazů

Srovnávání výsledků měření RWL v různých studiích není spolehlivé, protože měření je extrémně citlivé na podmínky a provedení. RWL je měřeno tak, že výsledná hodnota je komponent ztrát vody z oblasti hlavy, očí a respiračního traktu (Mautz 1982a; 1982b). Poměr mezi hodnotami RWL a CWL je u jednotlivých druhů rozdílný (viz Obr. 1), ale při stálých podmínkách má RWL menší podíl na TEWL než CWL. Se stoupající teplotou se může tento poměr výrazně měnit (McNab 2002). Jak již bylo zmíněno u ptáků a savců, existují vzorce chování spojené se změnou intenzity dýchání s cílem ochlazení horních cest dýchacích a hlavy pozorováno i u plazů. Prvním typem je mělké, ale zrychlené dýchání (tzv. *panting*), který byl pozorován například u želv nebo některých hadů (Tattershall et al., 2006). Větší význam pro termoregulaci má tzv. *gaping*, při kterém zvíře doširoka otevírá tlamu, a tím dochází k ochlazování v oblasti hlavy. *Gaping* byl pozorován například u krokodýlů (Spotila et al., 1977) nebo některých ještěřů z pouštních oblastí, př. čukvala zavalitá (Crawford, 1972). U plazů lze také pozorovat *gular pumping* (dýchání s vysokou amplitudou) a *gular fluttering* (dýchání o vysoké frekvenci), které byly pozorovány u varanů a gekonů (Tattershall et al., 2006). Jak již bylo zmíněno RWL souvisí s intenzitou metabolismu. Studie, zaměřená na mezidruhové porovnání metabolismu u hadů sledovala vztah mezi intenzitou metabolismu a podmínkami prostředí. Výsledkem studie je pozitivní korelace mezi metabolismem a srážkami. Konkrétně bylo zjištěno, že intenzita metabolismu roste se zvyšujícími se srážkami. Tento výsledek potvrzuje, že nižší intenzita metabolismu je především u druhů v aridním prostředí a pravděpodobně se jedná o důsledek adaptací, které jsou důležité pro snížení rizika dehydratace a energetických nároků (Dupoe et al., 2017). Příkladem fyziologických adaptací souvisejících s RWL je například zvýšení počtu červených krvinek, pro lepší zásobování kyslíkem nebo termoregulace (Dupoe et al., 2017).

1.3.3 Ztráty vody ze sliznice očí

Jednou ze složek TEWL u plazů je výpar z povrchu oční sliznice (Mautz 1982b). Oční výpar ve studiích není příliš sledován, protože se jedná o minoritní složku TEWL. Často je zahrnut do celkového výparu, protože výpar z očí a hlavy je při měření většinou brán jako součást RWL (Mautz 1982a,b). Některé studie ovšem naznačují, že i oční výpar může pozměnit hodnoty TEWL. U plazů, kteří mají srostlá průhledná oční víčka, jejichž funkce je především ochranná, se může hodnota TEWL výrazně lišit oproti druhům s pohyblivými víčky (Mautz 1982a, b). Ve studii, která byla zaměřena na mezidruhové porovnání několika druhů ještěřů žijících

v různých typech habitatu, autoři naměřili odlišné hodnoty TEWL u druhů, které obývali podobnou ekologickou niku (Muñoz-Nolasco et al., 2019). Autoři pracovali s otázkou, zda na tento rozdíl může mít vliv fakt, že se jedná o druhy, které se právě liší tím, že buď mají srostlá oční víčka (*Lepidophyma inagoi* a *Phyllodactylus delcampoi*) a byla u nich naměřena nižší hodnota TEWL vztažená na jednotku hmotnosti, nebo mají pohyblivá víčka (*Sceloporus stejnegeri*), a mají hodnoty TEWL vyšší. Nijak však tuto hypotézu netestovali, a tak jejich vysvětlení zůstává spekulativní.

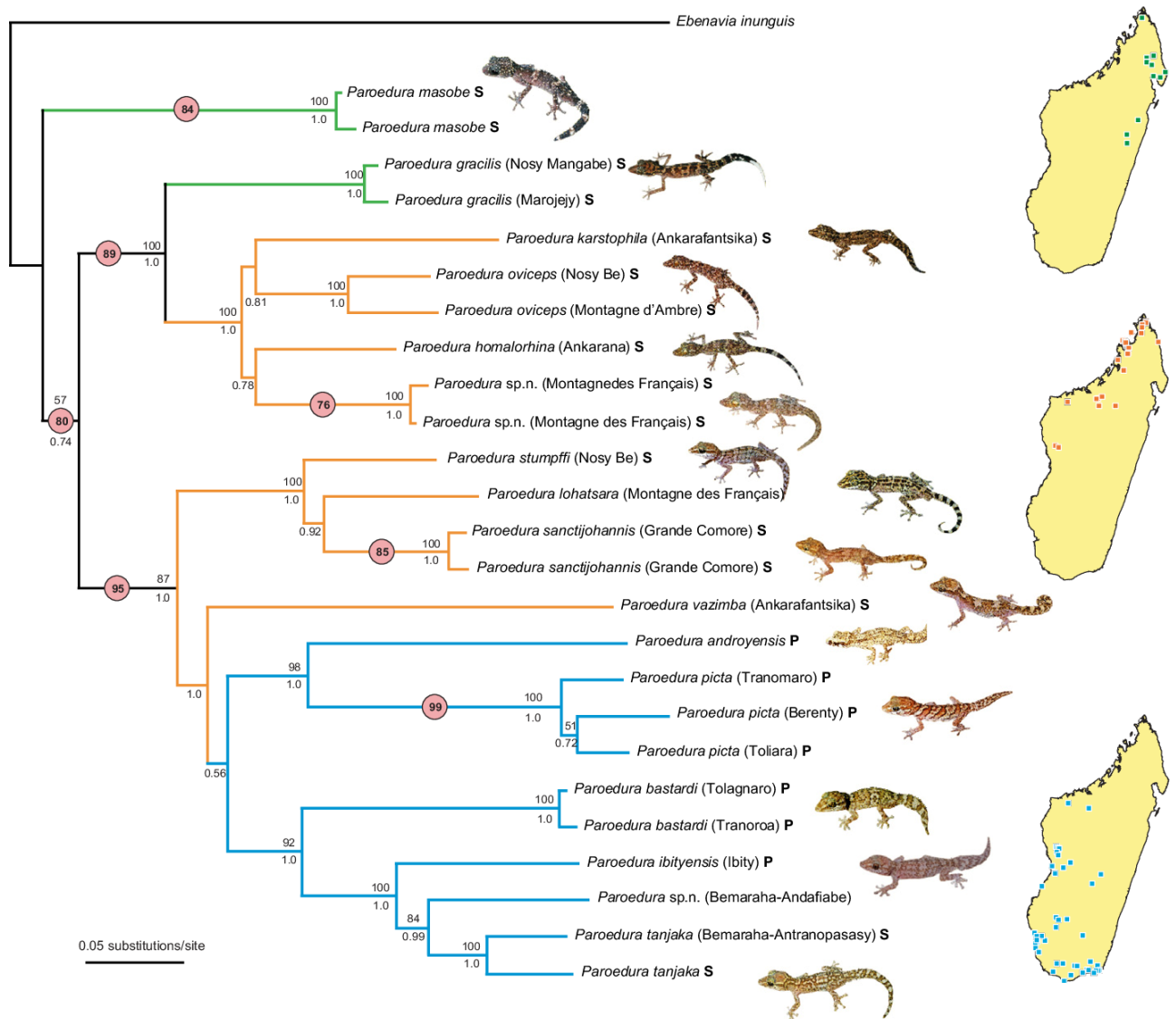
1.4 MODELOVÁ SKUPINA A JEJÍ BIOLOGIE A EKOLOGIE

1.4.1 rod *Paroedura*

Rod *Paroedura* je monofyletický rod gekonů z čeledi gekonovitých (*Gekkonidae*). Vyskytují se na Madagaskaru a Komorských ostrovech, přičemž většina zástupců jsou endemity ostrova Madagaskar (Nussbaum & Raxworthy, 2000; Jackman et al., 2008). Komorské ostrovy osídlily pouze dva druhy *P. sanctijohannis* a *P. stellata* (Hawlitschek & Glaw, 2013). Gekoni rodu *Paroedura* reprezentují zajímavou skupinu, která svým vývojem na izolovaných ostrovech prodělala velice úspěšnou adaptivní radiaci a speciaci (Glaw et al., 2018).

Rod *Paroedura* byl popsán Güntherem (1879) na základě druhu *P. sanctijohannis* (Dixon & Kroll, 1974). Původně byla většina druhů rodu *Paroedura* nesprávně zařazena do rodu *Phyllodactylus*. Na základě morfologických a anatomických rozdílů došlo později k vyčlenění rodu *Paroedura* (Dixon & Kroll, 1974). V rodu *Paroedura* jsou tradičně rozdělovány dvě morfologicky odlišné skupiny. První skupina, tzv. *sanctijohannis* group, má nosní dírky v kontaktu s rostrální šupinou, druhá skupina, tzv. *picta* group, je má oddělené a nejsou v kontaktu (Nussbaum & Raxworthy, 2000). Tento morfologický znak je důležitý pro rozlišení blízce příbuzných druhů v různých skupinách gekonů (Köhler et al. 2019).

V minulých letech proběhlo několik taxonomických revizí a byly objeveny a popsány nové druhy (Nussbaum & Raxworthy, 2000; Glaw et al., 2001; Glaw et al., 2018). Nejrecentněji byl popsán nový druh *P. neglecta*, což navýšilo celkový počet druhů v rodu *Paroedura* na 22 (Köhler et al., 2019). Fylogenetické vztahy v rámci rodu *Paroedura* byly celkem detailně prostudovány na základě několika mitochondriálních a jaderných genů Jackmanem et al. (2008). Z této studie vyplývá, že bazálním druhem je *P. masobe*, která je sesterská všem ostatním druhům, které pak tvoří dvě sesterské skupiny. Výše zmiňované morfologicky odlišné skupiny (*picta* group a *sanctijohannis* group) však netvoří monofyletické skupiny (Obr. 4). Novější taxonomické práce zaměřené na rod *Paroedura* (Glaw et al., 2014, 2018; Köhler et al., 2019) a velké fylogenetické analýzy přes všechny šupinaté plazy (Pyron et al., 2013; Zheng & Wiens, 2016) naznačují, že situace by mohla být o něco složitější a rod *Paroedura* stále obsahuje druhové komplexy s kryptickými druhy a fylogenetické vztahy vyžadují revizi (Glaw et al., 2018; Köhler et al., 2019).



Obr 4.: Rekonstrukce fylogenetických vztahů rodu *Paroedura* na základě dvou mitochondriálních a dvou jaderných lokusů. V závorkách jsou uvedeny lokality, ze kterých pochází jednotlivé druhy/jedinci určené pro tuto fylogenetickou analýzu. Písmena P nebo S za jménem druhu určují, zda daný druh patří do *picta* nebo *sanctijohannis* group. Obrázek ukazuje, že jednotlivé druhy obývají různé části ostrova. Převzato z Jackmann et al. (2008).

1.4.2 Biologie rodu *Paroedura*

Mezi společné znaky rodu *Paroedura* patří noční aktivita, insektivorní potrava, velké a výrazné oči bez pohyblivých víček s vertikální zorničkou (Nussbaum & Raxworthy, 2000). Samice mají invariantní snůšku a kladou dvě vajíčka, které zahrabávají do substrátu (Kratochvíl et al., 2006). U většiny druhů rodu *Paroedura* byl pozorován pozemní způsob života, čímž se výrazně liší od ostatních převážně arborikolních druhů madagaskarských gekonů (Dixon & Kroll, 1974; Glaw & Vences, 2000; Glaw et al., 2018).

Jednotliví zástupci rodu *Paroedura* se od sebe navzájem liší tělesnými rozměry (SVL, tj. délka těla od špičky rostra po kloaku) a hmotností. Nejmenší zástupce je *Paroedura androyensis* SVL – 40,55 mm (Starostová et al. 2010) a největším je *Paroedura masobe* SVL 90,1 mm (Rosa et al., 2011). Rozdíly v hmotnosti jsou také výrazné, nejdrobnější je opět *P. androyensis* (rozmezí: 1,29-2,00 g – vlastní pozorování), dospělí jedinci druhu *P. picta* mohou dosahovat hmotnosti přes 30 g (vlastní pozorování). U zástupců rodu *Paroedura* lze pozorovat platnost Renschova pravidla. To znamená, že u větších druhů (například *P. picta*) jsou výrazně větší a robustnější samci než samice, naopak u menších druhů (například *P. androyensis*, *P. vazimba*) jsou větším pohlavím samice (Starostová et al. 2010).

Jednotlivé druhy se také odlišují zbarvením ve škále od béžové po černou a charakteristickými barevnými kresbami (Glaw & Vences, 1994). Zatímco šupiny ventrální strany těla jsou v rámci druhu velikostně podobné a hladké, což platí až na velikostní rozdíly i mezidruhově, dorzální strana je u jednotlivých zástupců nápadná přítomností tuberkulů (například *P. picta*), trnů (například *P. lohatsara*, *P. stumpffi*) a hřbetních pásů (například *P. masobe*) (Glaw & Vences, 2003).

1.4.3 Madagaskar jako těžiště diverzity nejen rodu *Paroedura*

Madagaskar je čtvrtý největší ostrov na světě (Brown et al., 2014). Nejbližším kontinentem je Afrika, která je vzdálená přibližně 400 km. Afrika a Madagaskar jsou od sebe odděleny Mosambickým průlivem (Yoder & Nowak, 2006). Jedná se o ostrov po dlouhou dobu izolovaný od ostatní pevniny, což mělo za následek vytvoření unikátní fauny a flory a vysoký stupeň biologické diverzity (Brown et al., 2014). Vzniklo tak i velké množství endemitů, z nichž někteří se vyskytují pouze na velmi malých areálech. Je známo velké množství druhů, které se vyskytují pouze na jedné nebo dvou lokalitách na Madagaskaru (Vences et al., 2009; Rosa et al., 2011; Glaw et al., 2018; Köhler et al., 2019). Množství druhů endemicky žijících na Madagaskaru je značné. Jedná se až o 100 % původních druhů obojživelníků, 92 % plazů,

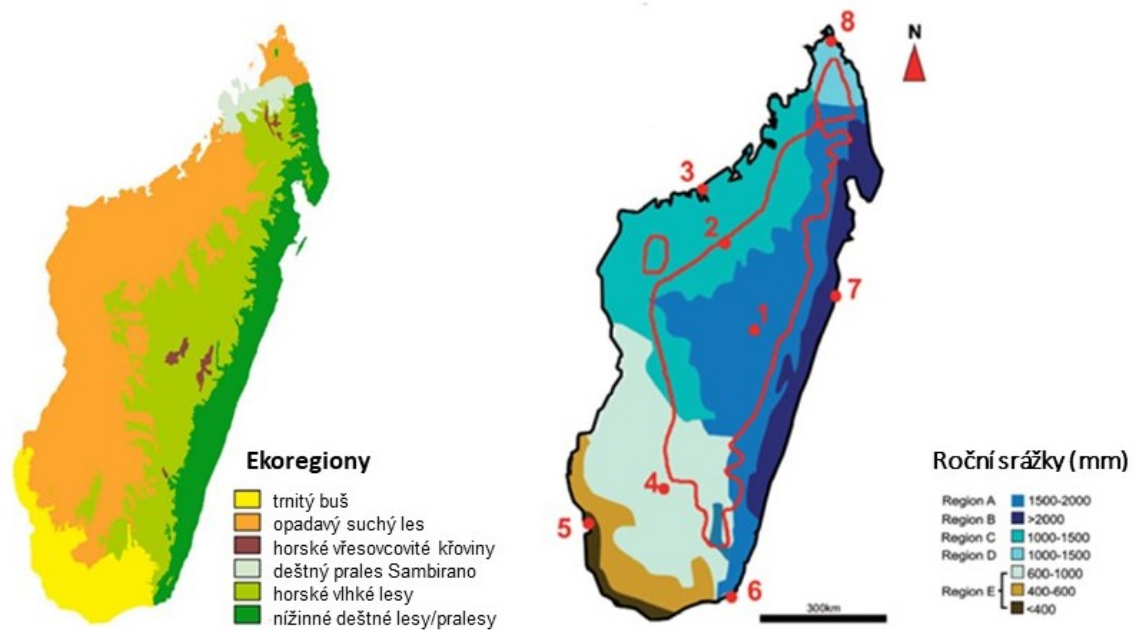
44 % ptáků, 100 % suchozemských savců a více než 90 % rostlin, které nikde jinde na světě nenajdeme (Brown et al., 2014) a mezi ně patří i gekoni rodu *Paroedura*.



Obr 5.: Srovnání různých ekoregionů, které můžeme najít na Madagaskaru.

Z leva: NP Betampona, tropický deštný les¹; NP Tsimanampetsotsa, trnitá buš²; NP Ankarafantsika, opadavý suchý les³

Vzhledem k velikosti ostrova (přibližně 587 000 km²) je Madagaskar pozoruhodným místem s širokou škálou bioklimatických zón a ekoregionů (Obr. 5). Východní pobřeží ostrova pokrývají nížinné tropické pralesy. Biom tropických nížinných lesů sahá přibližně 100 km do vnitrozemí až k úpatí východní části centrálního pohoří. Směrem k centrálnímu pohoří se ve výšce asi 800 m nad mořem mění nížinný deštný les na vlhký horský les. Tento ekoregion pokrývá úpatí centrálního pohoří do výšky asi 2000 m nad mořem. Nad touto hranicí přechází horský deštný les ve vegetaci tvořenou majoritně zástupci čeledi *Ericaceae* a tvoří unikátní biom horských vřesovitých křovin. V západní části ostrova pod hranicí 800 m nad mořem přechází horský deštný les v suchý opadavý les. Jihozápadní část ostrova je vlivem vysokých teplot a nízkých srážek extrémně aridní. Biom v tomto regionu se nazývá trnitá buš a dominantou jsou zástupci rostlin z čeledi *Didiericaceae*. Posledním biotem je deštný prales v severozápadním cípu ostrova, který je znám také jako Sambirano. Jedná se o deštný prales, který je geograficky a biologicky odlišný oproti deštným lesům na východě ostrova. Je zde patrný velký vliv monzunových dešťů a dopadá zde velké množství srážek (Yoder & Nowak, 2006; Obr. 5 a 6).



Obr 6.: Obrázek vlevo ekoregiony Madagaskaru (převzato a upraveno z publikace Yoder & Nowak (2006). Obrázek vpravo roční srážky v jednotlivých ekoregionech (převzato a upraveno z Szabó et al. 2015).

Madagaskar je také pozoruhodný tím, že hranice mezi jednotlivými ekoregiony jsou velice ostré. Specifičnost biotů je způsobena tím, že v daných biomech je charakteristická druhová skladba flory a s dominantními druhy (Vences et al., 2009). Velice důležité jsou také bioklimatické faktory, jako jsou vzdušné proudy, přítomnost srážek a nadmořská výška. Zjednodušeně lze říct, že bioklimatická zonace je základem diverzifikace druhů, což vede k vysokému stupni mikroendemismu (Vences et al., 2009). Srážky na Madagaskaru jsou ovlivněny přítomností centrálního pohoří (Obr. 6). Na severu, středu a jihu pohoří dominují masivy, jejichž nejvyšší vrcholy dosahují až do výšky téměř 2900 m nad mořem. Klima a množství srážek je ovlivňováno pasáty a také přítomností náhorních plošin. Největší množství srážek spadne v oblasti východního pobřeží. Klima v západní a jižní části ostrova je zastíněno přítomností centrálního pohoří a dopadá zde menší množství srážek (Vences et al., 2009; Szabó et al., 2015)

1.4.4 Druhy rodu *Paroedura* zahrnuté do diplomové práce

1.4.4.1 *Paroedura androyensis* (Grandidier, 1867)

Tento druh se vyskytuje v jižní části Madagaskaru (viz Obr 7). Obývá opadavé suché lesy pobřežních oblastí a lesy v blízkosti vodních ploch a toků (Rabibisoa et al., 2011). Žije pozemním způsobem života (Schönecker, 2008; Rabibisoa et al., 2011), aktivita byla zaznamenána v noci na zemi (Glaw & Vences, 2003). Tento druh dorůstá velmi malých rozměrů, jedná se o nejmenšího zástupce rodu *Paroedura*. Samice jsou větším pohlavím a dosahují v průměru SVL 40,55 mm (Starostová et al., 2010). Výrazným znakem je mohutný ocas, který často bývá stočený. Zbarvení *P. androyensis* je šedé až hnědé se světlými a tmavými znaky na dorzální straně těla (Schönecker, 2008).

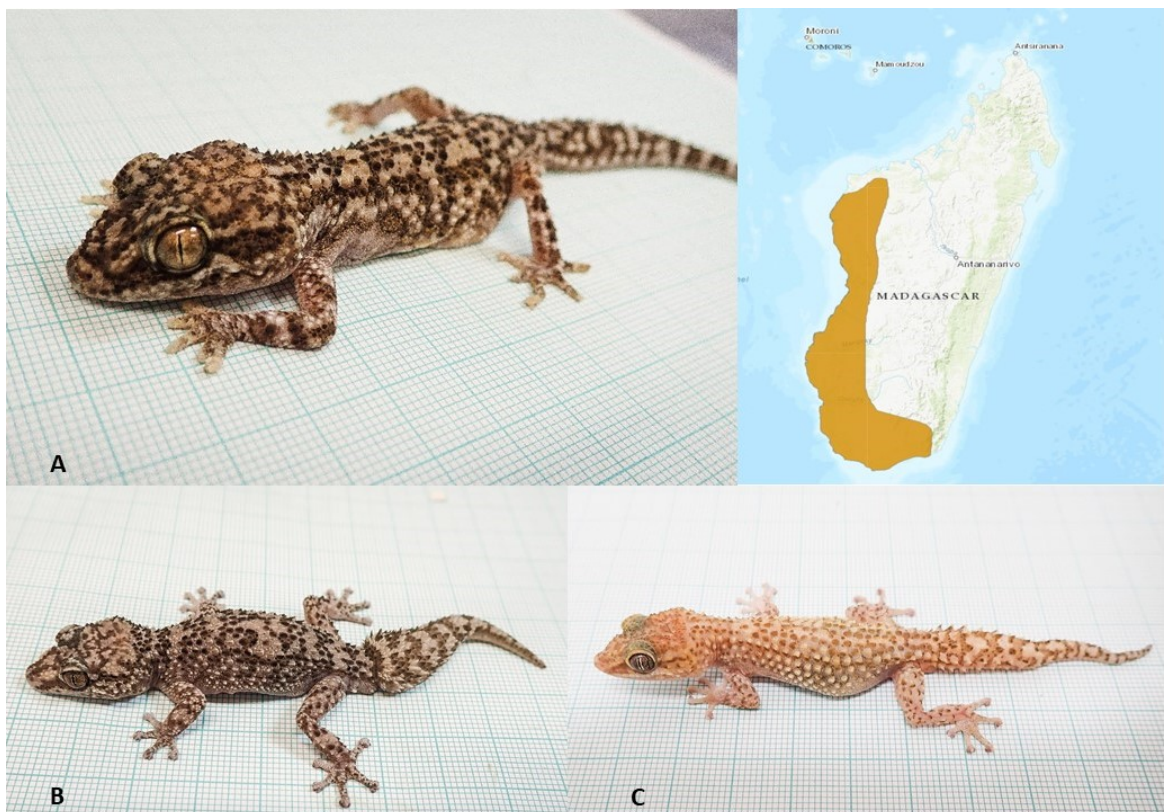


Obr 7.: Dospělý jedinec *P. androyensis* a oblast výskytu tohoto druhu⁴.

1.4.4.2 *Paroedura bastardi* (Mocquard, 1900)

P. bastardi se vyskytuje na západě a jihozápadě ostrova (viz Obr. 8) (Raxworthy, 2011a). Obývá suché lesy, trnité buše, skalnaté oblasti a byla objevena také ve vesnici (Glaw & Vences, 2007). Na dorzální straně těla jsou charakteristické poměrně ostré tuberkuly (Glaw & Vences, 2003). Velikost těla je velice variabilní a někteří autoři rozdělují několik velikostních forem. SVL menších forem se udává kolem 60 mm, SVL větších forem se pohybuje kolem 80 mm (Glaw & Vences, 2003).

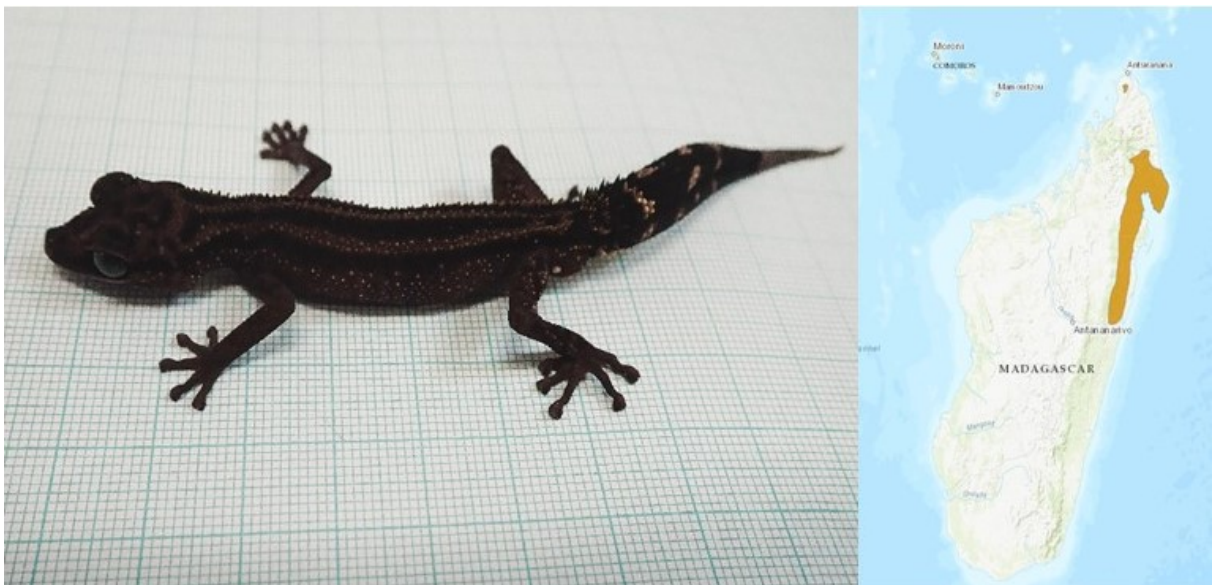
Výzkumy z posledních let naznačují, že se pravděpodobně jedná o druhový komplex (Glaw & Vences, 2003; Jackmann et al., 2008; Glaw et al., 2018, M. Vences, osobní sdělení). Zástupci druhového komplexu mají zploštělý tvar těla, důvodem je přizpůsobení typu prostředí, ve kterém se často vyskytují – skalnaté oblasti. Plochý tvar těla zvířatům umožňuje, aby se schovala ve štěrbinách mezi kameny (Glaw & Vences, 2003). Způsob života *P. bastardi* je poměrně variabilní. Velké formy byly spatřeny na stromech, malé formy většinou blízko země (Glaw & Vences, 2003). V diplomové práci jsou zařazeny 3 “druhy“ náležející do tohoto druhového komplexu. Z důvodu neznámé lokality původu bohužel nelze přesně charakterizovat preferovaný typ habitatu jednotlivých zástupců. Na základě sekvenčních dat a literárních údajů lze alespoň částečně odhadnout oblast původu (viz Diskuze).



Obr: 8.: A) Dospělý jedinec *P. bastardi* a oblast výskytu jedinců z tohoto druhového komplexu⁵. B) Dospělý jedinec *P. aff. bastardi* 1. C) Dospělý jedinec *P. aff. bastardi* 2.

1.4.4.3 *Paroedura gracilis* (Boulenger, 1896)

P. gracilis se vyskytuje na severovýchodě ostrova (Obr. 9). Obývá deštné pralesy, příležitostně se vyskytuje na plantážích (Raxworthy, 2011f). Preferuje stejný typ prostředí jako *P. masobe* a u těchto dvou druhů lze pozorovat určité podobné znaky, například tmavé zbarvení, dlouhé, štíhlé nohy, velké oči, pruh na hřbetě. *P. gracilis* dorůstá menších rozměrů, celková délka těla může být až 130 mm (Schönecker, 2008). Zbarvení je šedé až tmavé se světlými podélnými pruhy na hřbetě a světlými skvrnami na ocasu. Dorzální strana těla je pokryta drobnými tuberkuly (Schönecker, 2008).



Obr. 9.: Dospělý jedinec *P. gracilis* a oblast výskytu⁶

1.4.4.4 *Paroedura lohatsara* Glaw, Vences & Schmidt, 2001

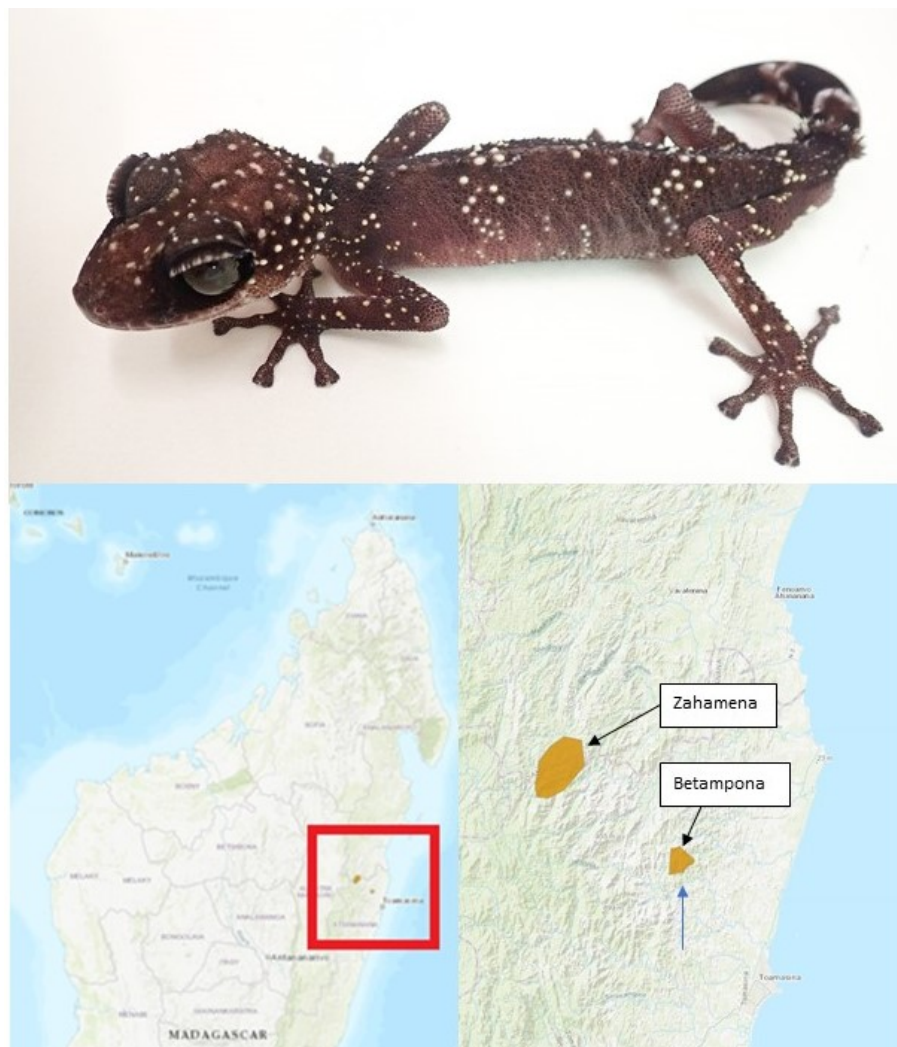
Výskyt *P. lohatsara* je potvrzen pouze z oblasti Montagne des Français v severní části Madagaskaru (Obr. 10). Tato lokalita se vyznačuje krasovým podkladem a suchým opadavým lesem (Glaw et al., 2001). Pozorování jedinci byli spatřeni v noci, kdy se pohybovali po skalních ochozech a větvích ve výšce do dvou metrů nad zemí (Glaw et al. 2001; Glaw et al. 2003). *P. lohatsara* patří mezi větší druhy, maximální SVL u odchycených jedinců byla naměřena 80,6 mm (Glaw et al., 2001). Dospělci mají primárně světlou barvu s výraznými tmavými až černými skvrnami, které si zachovávají podobu pruhování. Některé větší trny a tuberkuly mohou být bělavé barvy. Na dorzální straně těla jsou přítomny výrazné tuberkuly, které jsou uspořádány do řad. Výrazný je také poměrně dlouhý a úzký ocas, který je pokrytý drobnými trny (Glaw et al., 2001).



Obr. 10.: Dospělý jedinec *P. lohatsara* a oblast výskytu⁷, obrázek vpravo dole přibližuje lokalitu Montagne des Français.

1.4.4.5 *Paroedura masobe* Nussbaum & Raxworthy, 1994

P. masobe je v současnosti známa ze dvou izolovaných lokalit – Zahamena a Betampona (Rosa et al., 2011), které se nachází v centrální části ostrova v blízkosti východního pobřeží (Obr. 11). Tento druh obývá primární tropické pralesy v nižších nadmořských výškách. Nalezení jedinci byli pozorováni ve vegetaci, kde se pohybovali na větvích, ve výšce 0,3-1,5 m nad zemí (Rosa et al., 2011). *P. masobe* je společně s druhem *P. tanjaka* největším druhem rodu *Paroedura*, SVL u pozorovaného jedince, dospělého samce, bylo naměřeno 91 mm (Rosa et al., 2011). Tělo je velice štíhlé s dlouhými končetinami, charakteristickým znakem tohoto druhu jsou velké a výrazné oči, které mají černou duhovku. Zbarvení je tmavé, dorzální část těla je pokryta drobnými bílými a černými tuberkuly. Bílé tuberkuly vytváří na dorzální straně těla a ocasu příčné bílé pruhy (Glaw et al., 2003; Schönecker, 2008).



Obr: 11.: Dospělý jedinec *P. masobe*. a oblast výskytu⁸, obrázek vpravo dole přiblížení lokalit Betampona a Zahamena.

1.4.4.6 *Paroedura oviceps* (Boettger, 1881)

P. oviceps se vyskytuje na severozápadním cípu ostrova Madagaskar (Obr. 12). Obývá suché opadavé a vlhké opadavé lesy (Glaw & Vences, 2007; Raxworthy, 2011c). Pohybuje se především po kmenech silných stromů a po skalnatých ochozech podél toků (Glaw et al., 2003). Celková délka těla může být až 120 mm (Schönecker, 2008). Zbarvení těla je světle hnědé až hnědé s černými skvrnami a tmavými pruhy na ocasu. Na dorzální straně těla je množství drobných tuberkulů (Schönecker, 2008).

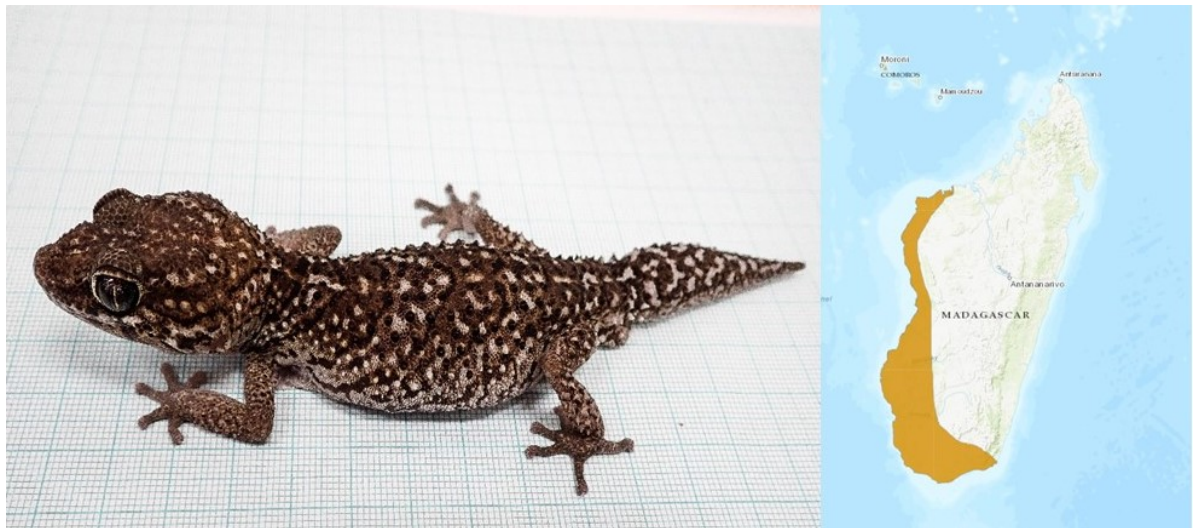


Obr: 12.: Dospělý jedinec *P. oviceps* a oblast výskytu⁹.

1.4.4.7 *Paroedura picta* (Peters, 1854)

P. picta se vyskytuje na západě a jihovýchodě Madagaskaru (Obr. 13). Obývá savany, trnitá buš a suché lesy. Žije pozemním způsobem života, pohybuje se nejčastěji po písčném podkladu nebo v listové opadance (Raxworthy, 2011d). Patří mezi větší druhy gekonů rodu *Paroedura*, SVL může dosahovat až 90 mm (Starostová et al., 2010) a celková délka těla až 170 mm (Schönecker, 2008). U druhu *P. picta* dochází k výraznému pohlavnímu dimorfismu, kdy samci jsou výrazně větší a těžší než samice a mají robustní hlavu, kterou využívají v soubojích. Zbarvení je poměrně variabilní a objevuje se několik barevných forem (Glaw et al., 2003; Schönecker, 2008).

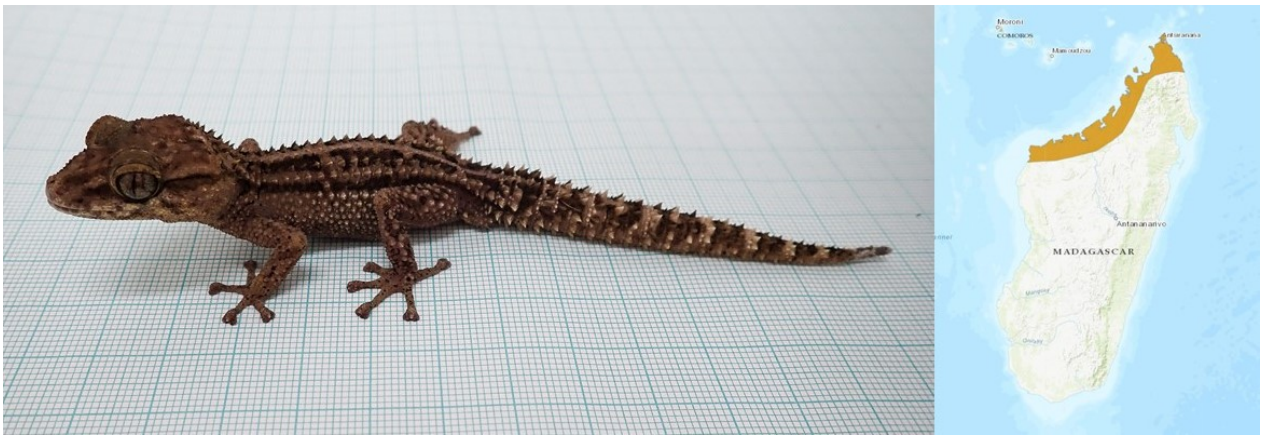
P. picta, je pravděpodobně nejznámějším druhem rodu *Paroedura* a v podstatě se stává novým modelovým druhem plaza s osekvenovaným genomem, transkriptomem i mitochondriálním genomem (Hara et al., 2015, 2018; Starostová & Musilová, 2016). V literatuře můžeme nalézt mnoho různých výzkumů, ve kterých byli zvoleni jako modelová zvířata. *P. picta* byla zkoumaná z hlediska sexuálního chování (Brillet, 1993), termoregulace (Blumberg et al., 2002), fyziologie růstu a reprodukce (např. Kratochvíl et al., 2006, 2008; Kubička & Kratochvíl, 2009; Starostová et al., 2010) nebo vývojové biologie (Sato et al., 2010). Samice *P. picta* jsou známy velice rychlým vývojovým cyklem, pohlavně zralé jsou již ve staří několika měsíců, a proto jsou schopné velice rychlé reprodukce (Kubička & Kratochvíl, 2009).



Obr: 13.: Dospělý jedinec *P. picta*, a oblast výskytu¹⁰.

1.4.4.8 *Paroedura stumpffi* (Boettger, 1879)

P. stumpffi se vyskytuje severozápadní části ostrova Madagaskar (Obr. 14). Obývá vlhké i suché opadavé lesy a také sekundární vegetaci v nižších nadmořských výškách (Glaw et al. 2003; Raxworthy, 2011e). V suchém lese byla pozorována na zemi a na kmenech větších stromů (Glaw et al., 2003). Celková délka těla dosahuje až 143 mm (Schönecker, 2008). Zbarvení je hnědé s nažloutlými příčnými pruhy a jedním centrálním proužkem. Na povrchu hřbetu je velké množství tuberkulů a trnů. Ocas je tvořen tmavými a světlými pruhy a je pokryt velkým množstvím drobných trnů (Schönecker, 2008).



Obr: 14.: Dospělý jedinec *P. stumpffi* a oblast výskytu¹¹.

1.4.4.9 *Paroedura vazimba* Nussbaum & Raxworthy, 2000

P. vazimba se vyskytuje na severozápadě ostrova v suchých listnatých lesích (Obr. 15). Pozorování jedinci byli nalezeni na kmenech a větvích stromů. *P. vazimba* je podobný druh *P. androyensis*, který se nalézá v jiné části ostrova, na jihozápadě Madagaskaru. Shodné znaky lze spatřit ve velikosti a hmotnosti těla, habitatu a také ve využití podobné ekologické niky v příslušných regionech výskytu (Nussbaum & Raxworthy, 2000). Je to tedy druhý nejmenší zástupce rodu *Paroedura*, průměrné hodnoty SVL samců jsou 42.66 mm a samic 46.56 a i zde jsou větším pohlavím samice (Starostová et al., 2010). Dorzolaterální šupiny jsou heterogenní, hřbet je pokryt několika řadami drobných tuberkulů. Zbarvení je světle až tmavě hnědě s nepravidelnými znaky. Na dorzální straně těla jsou charakteristické čtyři příčné a tmavé pruhy, první je těsně za hlavou, druhý za rameny, třetí ve středu těla a čtvrtý nad slabinami. Pruhování plynule pokračuje i na ocase, který je pokryt drobnými trny (Nussbaum & Raxworthy, 2000).



Obr: 15.: Dospělý jedinec *P. vazimba*, a oblast výskytu¹².

1.5 CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této diplomové práce je změřit a porovnat TEWL u gekonů rodu *Paroedura*.

A dále pak:

- 1) Na základě zjištěných fylogenetických vztahů mezi zástupci tohoto rodu určit, jaký byl ancestrální stav TEWL.
- 2) Zjistit jaké z měřených morfologických a fyziologických proměnných (hmotnost těla, intenzita metabolismu, velikost ventrálních šupin) mají největší vliv na TEWL u rodu *Paroedura*.
- 3) Otestovat metodu měření CWL za pomoci Tewameteru TM300 u rodu *Paroedura*.

2 METODIKA

2.1 REKONSTRUKCE FYLOGENEZE NA ZÁKLADĚ SEKVENČNÍCH DAT

2.1.1 Materiál použitý pro sekvenování

Pro přípravu vzorků na sekvenaci částí dvou mitochondriálních a jednoho jaderného genu byl odebrán vzorek krve z brachiální cévy. Odběr byl proveden u tří jedinců, zástupců taxonů *Paroedura* aff. *bastardi* 1 (samec s označením T3), *P.* aff. *bastardi* 2 (samec s označením C) a u zástupce druhu *P. vazimba* (samec s označením B).

2.1.2 Příprava vzorku pro sekvenaci

Izolace DNA byla provedena za použití kitu DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). DNA byla izolována ihned po odběru krve podle protokolu od výrobce. Přítomnost DNA byla po izolaci ověřena elektroforeticky na 0.8 % agarózovém gelu. Pro určení příbuzenských vztahů mezi druhy z druhového komplexu *P. bastardi* jsme se rozhodli sekvenovat markery použité v předchozích studiích, a to část mitochondriálního genu pro podjednotku NADH dehydrogenázy ND4 a přidružené tRNA (tRNA-His, tRNA-Ser, and tRNA-Leu) dále v textu souborně označováno jako ND4 o délce přibližně 533 párů bazí (bp) a část jaderného genu kódující phosducin o délce 395 bp (Jackman et al., 2008) a část mitochondriálního genu pro cytochrom oxidázu o délce přibližně 660 bp (COI; Koubová et al. 2014).

Vybrané úseky byly amplifikovány z celkové DNA za použití metody polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro amplifikaci jednotlivých úseků DNA byly použity primery z literárních zdrojů nebo byl pro COI navržen primer nový (Tab. 1). Na vzorky *P.* aff. *bastardi* 1 a 2 nefungovaly primery pro COI použité v předchozích studiích, proto byl za použití referenční sekvence pro kompletní gen pro COI u příbuzného druhu *P. picta* (GenBank přístupové číslo: KR149293) a aplikace Primer3web version 4.1.0 (Untergasser et al. 2012) navrhnout nový primer. Složení reakčních směsí pro PCR reakcí je v uvedeno v Tab. 2. Celkový objem PCR reakce byl 25 nebo 50 μ l na vzorek v závislosti na koncentraci výsledného produktu. PCR reakce probíhaly v termocykléru iCyclerTM Thermal Cycler (Bio-Rad). Teplotní program pro PCR byl převzat z práce Koubová et al. (2014). Program termocycleru pro PCR byl: 94 °C po dobu 180 s, následuje 40 cyklů: 1. krok 94 °C po dobu 30 s, 2. krok 52 °C po dobu 30 s a 3. krok 72 °C po dobu 60 s. Finální krok při teplotě 72 °C po dobu 5 minut. Produkt PCR byl společně s délkovým standardem (Gene Ruler 100bp DNA Ladder, Fermentas) nanášen na 2 % agarózový gel a kontrolován pomocí elektroforézy. Z gelu byl

následně příslušný produkt vyříznut a přečištěn pomocí kitu QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) dle návodu výrobce. Vyčištěný produkt byl zaslán na sekvenaci Sangerovou metodou do Laboratoře sekvenace DNA na Přírodovědecké fakultě (<https://www.natur.cuni.cz/biologie/servisni-laboratore/laborator-sekvenace-dna>), kde byl zpracován.

Primer	Marker	Zdroj	Sekvence primeru
ND4f1	ND4	Jackman et al., 2008	5'-GCAAATACAAACTAYGAACG-3'
Leur1	ND4	Jackman et al., 2008	5'-CATTACTTTTTACTTGGATTTGCACCA-3'
PHOF2	phosducin	Bauer et al., 2007	5'-AGATGAGCATGCAGGAGTATGA-3'
PHOR1	phosducin	Bauer et al., 2007	5'-TCCACATCCACAGCAAAAACTCCT-3'
COI (PBA 1+2)	COI F	navržen nový primer	5'-ATCGGCACCCTCTACCTCTT-3'
COI (PBA 1+2)	COI R	navržen nový primer	5'-CACTTCTGGGTGTCCAAAAA-3'
COI (PVA)	RepCOI-F	Nagy et al., 2012	5'-TNTTMTCAACNAACCACAAAGA-3
COI (PVA)	RepCOI-R	Nagy et al., 2012	5'-ACTTCTGGRTGKCCAAARAAT CA-3'

Tab. 1.: Primery, které byly použity při přípravě sekvenčních dat.

Reakční směs	na 1 reakci (µl)
PPP Master Mix (Top-Bio)	12,5
PCR H ₂ O	9,5
forward primer (0,01 mM)	1
revers primer (0,01 mM)	1
celková genomová DNA	1
celkový objem	25

Tab. 2.: Složení reakční směsi pro přípravu PCR, která byla použita při přípravě vzorků na sekvenaci.

2.1.3 Zpracování sekvenčních dat

U všech úseků použitých genů byly osekvenovány vždy oba řetězce DNA, které byly překontrolovány a manuálně spojeny v programu BioEdit 7.0.5.3 (Hall, 1999). Celkem bylo získáno 7 sekvencí (úseky ND4, phosducin a COI pro *P. aff. bastardi* 1 a 2 a částečná sekvence COI pro druh *P. vazimba*). Při kontrole protein-kódujících úseků DNA na případnou přítomnost jaderných pseudogenů přeložením do aminokyselinové sekvence v programu Mega-X verze 10.0.5 (Kumar et al., 2018) bylo zjištěno, že u taxonu *P. aff. bastardi* 1 sekvence pro COI obsahuje uvnitř dva stop kodony, a jedná se tedy o pseudogen. Z tohoto důvodu byl úsek pro COI vyloučen z dalších analýz a fylogenetické vztahy pro studované zástupce rodu *Paroedura* byly rekonstruovány pouze za použití částí genů pro ND4 a phosducin.

Vstupní data pro alignment a následné fylogenetické analýzy byla složena z mnou získaných sekvencí a sekvencí dalších studovaných druhů rodu *Paroedura* a druhu *Ebenavia inunguis* z genové banky (GenBank, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>; Tab. 3). Druh *Ebenavia inunguis* byl vybrán jako vnější skupina (outgroup) pro fylogenetické analýzy. Tento druh byl použit ve studiích zkoumající fylogenetické vztahy rodu *Paroedura* (Jackman et al., 2008; Glaw et al., 2018) a jeho pozice jako sesterského rodu k rodu *Paroedura* a oprávněnost použití jako outgroup byla podpořena i nedávnými velkými fylogenetickými analýzami zahrnujícími velkou část šupinatých plazů (Pyron et al., 2013; Zheng & Wiens, 2016). Celkem tedy bylo do fylogenetické analýzy zařazeno 18 jedinců z 12 taxonů.

		číslo sekvence (GenBank)	
Druh	označení jedince	phosducin	ND4
<i>Paroedura androyensis</i>	ZCMV 2483	EF490695	EF536218
<i>Paroedura bastardi</i>	ZSM 180/2004	EF536187	EF536237
<i>Paroedura bastardi</i>	FGZC 313	EF536186	EF536236
<i>Paroedura gracilis</i>	FGZC 2795	EF536185	EF536235
<i>Paroedura gracilis</i>	ZSM 82/2005	EF536170	EF536219
<i>Paroedura lohatsara</i>	FGMV 2002.936	EF536179	EF536228
<i>Paroedura masobe</i>	JFBM 18	EF536169	EF536217
<i>Paroedura masobe</i>	JS 15	EF536168	EF536216
<i>Paroedura oviceps</i>	ZSM 336/2004	EF536184	EF536234
<i>Paroedura oviceps</i>	ZSM 83/2005	EF536183	EF536233
<i>Paroedura picta</i>	WRB 3	EF536174	EF536223
<i>Paroedura picta</i>	FGMV 2002.B1	EF536173	EF536222
<i>Paroedura picta</i>	ZSM 85/2005	EF536172	EF536221
<i>Paroedura stumpffi</i>	FGMV 2001.F46	EF536178	EF536227
<i>Paroedura vazimba</i>	ZSM 481/2001	EF536171	EF536220
<i>Ebenavia inunguis</i>	ZSM 81/2005	EF536167	EF536215

Tab. 3.: Seznam druhů a jedinců jejichž sekvence byly získány z genové banky a přístupová čísla k jednotlivým sekvencím. Všechny sekvence byly publikovány v práci Jackmann et al. (2008).

2.1.4 Tvorba alignmentu a rekonstrukce fylogenetických vztahů

Sekvenované úseky DNA (ND4 a phosducin) byly nejprve alignovány zvláště v programu Clustal X 2.1 (Thompson et al., 1997; Larkin et al., 2007) s přednastavenými parametry za otevření a prodloužení mezery, oříznuty sekvence primerů, začištěny konce sekvencí v programu BioEdit a posléze byly alignmenty spojeny, tak aby byla důsledně zachována identita jedince. Z výsledného alignmentu byly v programu Clustal X 2.0 vytvořeny vstupní soubory ve formátu NEXUS a PHYLIP pro následné testování a analýzy.

V programu PAUP* (verze 4.0b10, Swofford, 2003) byla provedena analýza dat metodou maximální parsimonie. Mezery byly kódovány jako chybějící data. Nejkratší strom byl hledán metodou heuristického hledání s náhodným přidáváním taxonů a hledáním nejlepšího stromu metodou rozdělení a znovuspojení stromu (tree bisection and reconnection,

TBR) a to celkem v deseti opakováních (příkazy hsearch addseq = random nrep = 10 swap = TBR). Topologie větví byla ověřena metodou bootstrapping s 1000 pseudoreplikacemi (Felsenstein, 1985).

Bayesovská analýza byla provedena v programu MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist, 2001; Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Pro analýzu byl dataset rozdělen na dvě části (partitions ND4 a phosducin) odpovídající sekvencím daného mitochondriálního a jaderného úseku. Pro každou část byl separátně na základě Akaikeho informačního kritéria (AIC) navržen model evoluce sekvence v programu jModelTest 2.1.10 (Darriba et al., 2012), který byl následně zadán do programu MrBayes 3.1.2. Pro ND4 byl zvolen model evoluce: TPM1uf+I+G (Lset base = (0,3731 0.3177 0,0933) nst = 6 rmat = (1,0000 5,3167 0,6496 0,6496 5,3167) rates = gamma shape = 0,7390 ncat = 4 pinvar = 0,1400) a pro phosducin: TIM1ef+G (Lset base = equal nst = 6 rmat = (1,0000 4,1396 0,2121 0,2121 6,7421) rates = gamma shape = 0,1220 ncat = 4 pinvar = 0). Pro Bayesovskou analýzu tak byl pro část ND4 pro specifikaci modelu evoluce sekvence použit příkaz lset nst = 6 rates = invgamma a pro phosducin lset nst = 6 rates = gamma. Obě části datasetu byly při analýze rozpojeny (příkazem unlink), takže si program mohl optimalizovat parametry evolučních modelů pro každou část samostatně. Po proběhnutí 5 milionů generací bylo zkontrolováno dosažení ustálené hodnoty pravděpodobností ($\ln L$) v programu Tracer v 1.7 (Rambaut et al., 2018) a zda standardní odchylka mezi jednotlivými analýzami byla menší než 0,01. Obě tato kritéria byla v pořádku, a tak po odstranění topologií stromů z prvních 25 % generací (příkazy sump burnin = 12500 a sumt burnin = 12500), byl vytvořen konsenzuální výsledný strom s posteriorními pravděpodobnostmi jednotlivých větví. Vstupní dataset pro fylogenetické analýzy ve formátu NEXUS je v elektronické příloze.

2.2 GRAFICKÁ ÚPRAVA FYLOGENETICKÝCH STROMŮ

Výsledné stromy získané výše popsanými postupy byly vizualizovány a zakořeněny za použití outgroup (druh *Ebenavia inunguis*) v programu FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2018) a poté graficky upraveny do konečné podoby v programu PowerPoint.

2.3 MĚŘENÍ A ANALÝZA TEWL A DALŠÍCH MORFOLOGICKÝCH A FYZIOLOGICKÝCH KORELÁTŮ TEWL U RODU *PAROEDURA*

2.3.1 Měření TEWL a INTENZITY METABOLISMU

Měření probíhalo na 11 taxonech (většinou platných druzích) rodu *Paroedura* chovaných v zajetí v chovech plazů na PřF UK. Výčet měřených druhů a počty, měřených, respektive úspěšně změřených jedinců jsou uvedeny v Tab. 5 v části Výsledky. V chovném zařízení byly zajištěny podmínky, které splňovaly nároky jednotlivých druhů (Schönecker, 2008). Na tyto podmínky byli aklimatizováni po dobu nejméně 5 měsíců. Mezi nejdůležitější faktory patřila teplota prostředí a typ substrátu. Pokusná zvířata byla držena ve světelném režimu 12 h světlo: 12 h tma. Světlo se zapíná v 6:00 ráno a vypíná v 18:00 večer.

2.3.2 Příprava na měření

Přípravná fáze na měření zahrnovala lačnění a aklimatizaci měřených jedinců na teplotu měření. Potrava byla naposledy podána v odpoledních hodinách mezi v 16:00 a 17:00. Mezi 9:00 a 10:00 hodinou následujícího dne bylo terárium zkontrolováno a zbylá potrava odstraněna. Posléze byl měřený jedinec tři dny bez potravy a lačnil, voda byla po celou dobu této fáze k dispozici.

Měření je nutné provádět ve standardizovaných podmínkách. Teplota měření byla zvolena na 25 °C, na základě znalostí o aktivitě jednotlivých druhů a zkušeností v chovu (Blumberg et al., 2002; Schönecker, 2008; Starostová et al., 2010). Měření TEWL může ovlivnit celá řada faktorů (Mautz, 1980). Z tohoto důvodu byli měření jedinci nejen lačnění, ale také aklimatizováni na teplotu měření v klimatickém boxu s konstantní teplotou 25 °C ($\pm 0,5$ °C). Umístění do klimatického boxu bylo vždy mezi 16:00 až 17:00 dne předcházejícího měření, tedy třetí den lačnění. Zvířata byla přemístěna do boxu s rozměry 20x20x15 cm. Na dno boxu byl vložen papírový ubrousek, vzorek substrátu z terária, úkryt z terária a miska s vodou. Tento přenosný box byl vložen do klimatického boxu a ponechán tam do začátku měření (přibližně 10:00 – 11:00 hodin následujícího dne).

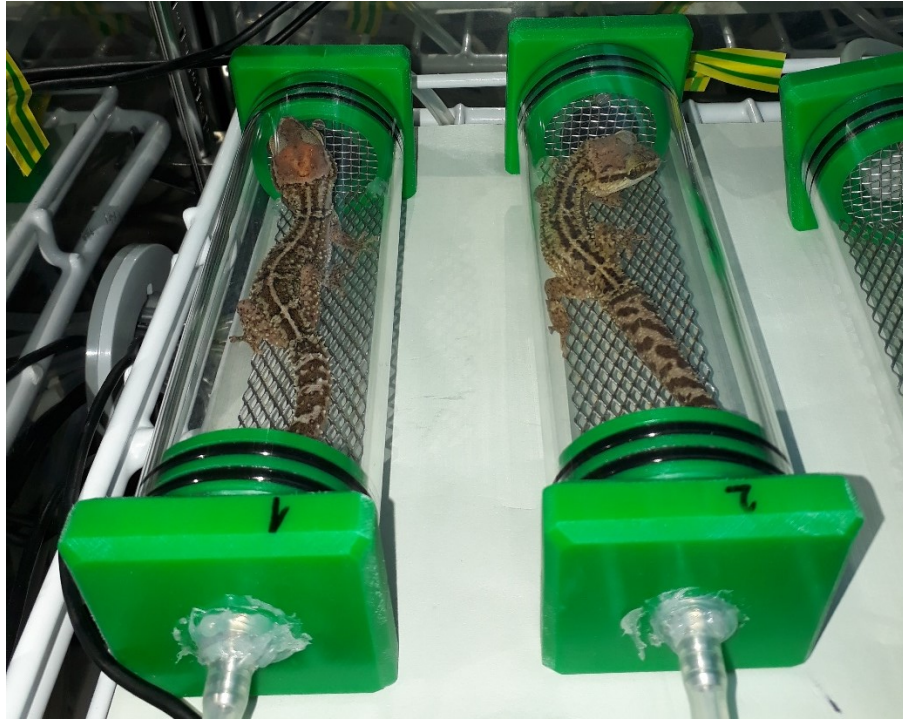
Z důvodu velké velikostní variability mezi druhy byli zkoumaní jedinci na základě hmotnosti rozděleni do 5 skupin. Pro každou skupinu byla zvolena vhodná velikost respirometrické komůrky, ve které bylo prováděno samotné měření. Poměr hmotnosti jedince k objemu komůrky se pohybuje v rozmezí 0,05-0,2 g zvířete na ml objemu komůrky. Stejně tak musí délka a průměr komůrky odpovídat tvaru těla, aby zvíře zůstalo v přirozené poloze. Dalším důležitým faktorem je rychlost proudění vzduchu v komůrce, tzv. flow rate (FR). FR

byl vypočítán podle velikosti dané respirometrické komůrky tak, aby doba výplachu komůrky (time constant, T_c) byla pro všechny komůrky 1,14 minut. Velikosti komůrek a FR pro jednotlivé druhy jsou uvedeny v Tabulce 4.

Objem komůrky [ml]	FR ml/min	Druhy
257,0	224	<i>P. bastardi</i> , <i>P. masobe</i> a <i>P. picta</i> (nad 20 g)
182,0	159	<i>P. bastardi</i> a <i>P. picta</i> (do 20 g), <i>P. lohatsara</i>
143,0	125	<i>P. oviceps</i> , <i>P. gracilis</i> , <i>P. stumpffii</i>
54,0	47	<i>Paroedura</i> aff. <i>bastardi</i> 1 a 2
40,0	35	<i>P. androyensis</i> , <i>P. vazimba</i>

Tab. 4: Rozdělení respirometrických komůrek podle celkového objemu; rychlost proudění vzduchu v dané komůrce (FR) a přiřazení druhů do komůrek na základě velikosti a hmotnosti.

Gekoni rodu *Paroedura* jsou aktivní v noci. Z tohoto důvodu probíhalo měření v inaktivní fázi dne, v předem stanoveném časovém úseku mezi 10:00 až 17:00 hodin. Před každým měřením byla zvířata zvážena a následně po jednom vložena do respirometrických komůrek. V jednom experimentu byly 4 komůrky, které byly pro dané měření vždy stejné velikosti, a s daným FR. Každý den mohli být změřeni maximálně 4 jedinci. Pátou komůrkou byla prázdná referenční komůrka (baseline) (obr 17). Uvnitř komůrek byla fixována kovová mřížka, která měla za úkol minimalizovat kontakt měřeného jedince se stěnami komůrky (Obr. 16). Celé měření probíhalo s respirometrickými komůrkami umístěnými v klimatickém boxu, který udržoval stálou teplotu $25 (\pm 0.5) ^\circ\text{C}$.



Obr. 16.: Zástupci rodu *Paroedura stumpffi* umístění v respirometrických komůrkách o objemu 143 ml, před zahájením měření.



Obr. 17: Respirometrické komůrky umístěné v klimatickém boxu (vlevo). Design experimentu (vpravo) 5 komůrek: 1., 2., 4. a 5. – komůrky pro měřená zvířata; 3. referenční prázdná komůrka (v průběhu samotného měření byla mezi komůrky umístěna papírová přepážka, aby na sebe měření jedinci neviděli a nerušili se a vždy byla kontrolována a zaznamenávána teplota za pomoci dataloggeru a kalibrovaného teploměru.

2.3.3 Měření a analýza TEWL a INTENZITY METABOLISMU

Respirometrické komůrky byly napojené na měřicí a ovládací systém (Sable Sytems International, Las Vegas, Nevada). Měření probíhalo v otevřeném průtokovém systému, kde byl zapojen přístroj RH300 pro měření parciálního tlaku vodních par (potřebný pro výpočet TEWL) a FoxBox pro měření parciálního tlaku CO₂, který je nutný k výpočtu produkce CO₂ měřeným jedincem a je používán jako ukazatel míry intenzity metabolismu. Konstantní proud vzduchu byl zajišťován pumpou, která je součástí analyzátoru FoxBox a přepínání mezi jednotlivými respirometrickými komůrkami zajišťoval automatický přepínač RM-8. Pro záznam a vyhodnocení dat z měření byl použit program ExpeData 1.7.2. (Sable Sytems International, Las Vegas, Nevada). Do komůrek byl vháněn čistý suchý vzduch. Přívod vzduchu byl zajištěn z vnějšího prostředí a cestou docházelo k přečištění, vysušení a zbavení CO₂ díky připojení na 3 desikační válce (1. válec: natronové vápno (absorbent CO₂, Sigma) a silikagel (desikant, Sigma); 2. válec: Drierite (desikant, síran vápenatý, W. A. Hammond Drierite Company); 3. válec: Drierite-Ascarite (absorbent CO₂, Sigma) - Drierite). Respirometrický systém byl pravidelně kalibrován za použití referenčních plynů (čistý dusík a dusík obsahující 0.5 % CO₂, Linde)

Měření se skládalo ze tří po sobě jdoucích cyklů. Jeden cyklus trval 114 minut, celkový čas experimentu byl 342 minut (3x 114 minut). Během každého cyklu docházelo k zaznamenávání měřených údajů a střídání baseline a komůrek s měřenými jedinci. Samotný průběh jednoho cyklu byl následující: baseline (5 minut) – první jedinec (20 minut) – baseline (3 minuty) – druhý jedinec (20 minut) – baseline (3 minuty) – třetí jedinec (20 minut) – baseline (3 minuty) – čtvrtý jedinec (20 minut) – baseline (20 minut). Celý průběh měření byl zaznamenáván pomocí kamerového systému (jedna kamera na každou respirometrickou komůrku), který umožňoval monitorovat aktivitu měřených zvířat. Jelikož aktivita velmi ovlivní jak ztráty vody výparem (Mautz, 1980), tak intenzitu metabolismu (Kristín & Gvoždík, 2012), byli aktivní jedinci z analýz vyloučeni. Vyloučeni byli také jedinci, kteří v průběhu měření detekovali nebo u nich došlo ke svleku pokožky.

2.3.4 Vyhodnocení a analýza dat TEWL a intenzity metabolismu

Data získaná z měření, tj. FR, barometrický tlak (BP), parciální tlak vodních par (WVP), a frakční koncentrace CO₂ (F_{CO2}) byla analyzována v programu ExpeData 1.7.2. Analýza byla provedena zvlášť pro každou respirometrickou komůrku a pro všechny cykly. U dat byla nejprve provedena korekce rychlosti průtoku podle vztahu: $FR = FR_u * (BP - WVP) / BP$,

kde FR je rychlost průtoku vzduchu, FR_u je rychlost průtoku vzduchu bez korekce (zaznamenávaná přístrojem), BP je barometrický tlak a WVP je tlak vodních par. TEWL a produkce CO₂ bylo vypočítané jako $TEWL = FR * WVP / (1 - WVP)$, kde FR je rychlost průtoku vzduchu, WVP je tlak vodních par. Produkce CO₂ byla vypočítána jako $V_{CO_2} = F_{CO_2} * BP / (BP - WVP)$, kde V_{CO_2} je produkce CO₂, F_{CO_2} je frakční CO₂, BP je barometrický tlak a WVP je tlak vodních par (Lighton, 2008).

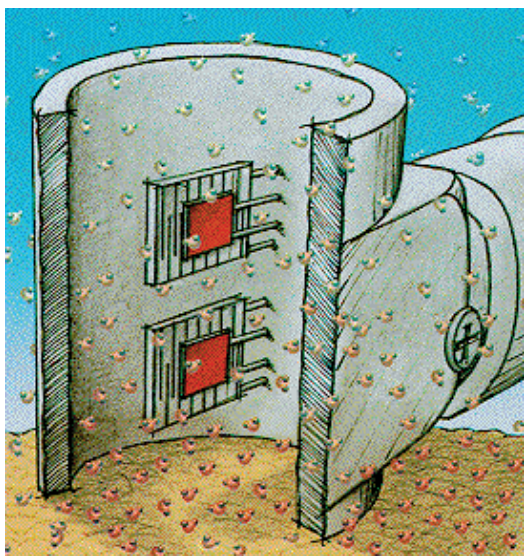
Při každém měření proběhly tři cykly, na analýzu byl použit druhý a třetí cyklus. První cyklus sloužil pro výplach komůrek a také pro aklimatizaci zvířat v komůrkách. Pro analýzu každého jedince byly tedy vyhodnocovány dva dvacetiminutové úseky, respektive dvacetiminutové úseky zkrácené o prvních 342 s, které sloužily k plnému prvotnímu vypláchnutí komůrky ($5x T_c$, dle doporučení práce Lighton & Halsey (2011)). Ve zbývajícím 858 s dlouhém úseku našel program ExpeData 1.7.2. pro TEWL a produkci CO₂ nejprve 180 s dlouhý úsek s nejvyrovnanějšími hodnotami a v tomto časovém úseku následně 120 s dlouhý úsek s nejnižšími hodnotami. Pokud byly hodnoty TEWL a produkce CO₂ stabilní a jedinec na videozáznamu nevykazoval během měřeného úseku pohyb, byla hodnota zaznamenána a jako konečná hodnota TEWL a produkce CO₂ pro daného jedince byla vybrána nižší hodnota ze dvou analyzovaných cyklů. Po každém respirometrickém měření bylo zvíře opět zváženo (pro hrubý odhad ztráty vody v průběhu měření) a změřena SVL.

2.4 MĚŘENÍ CWL

Měření CWL probíhalo na 9 taxonech (většinou platných druzích) rodu *Paroedura* chovaných za podmínek uvedených výše. Z důvodu malých rozměrů těla nemohla být provedena studie u všech druhů. Z měření byli vyloučeni zástupci druhů *P. androyensis* a *P. vazimba*. Výčet měřených druhů a počty měřených, respektive úspěšně změřených jedinců jsou uvedeny v Tabulce 6 v části Výsledky. Před měřením kožního výparu zvířata opět tři dny lačnila a byla provedena stejná aklimatizace měřených jedinců na teplotu měření (25 °C) jako v případě měření TEWL, tj. den před měřením (mezi 16:00 až 17:00) byli měření jedinci uloženi do klimatického boxu s teplotou 25 (±0,5) °C. V klimaboxu byla uložena v přepravném plastovém boxu o velikosti 20x20x15 cm. V boxu byl papírový ubrousek, vzorek substrátu, úkryt a mistička s vodou z terária, ve kterém je zvíře chováno.

Měření CWL probíhalo vždy dopoledne mezi 10:00 až 12:30 hodin za standardních podmínek. V experimentální místnosti byla udržována stálá teplota 25 °C (± 0,5 °C) a relativní vlhkost v rozmezí od 48–60 %. Měření CWL bylo provedeno pomocí přístroje Tewameter®

TM 300 (Courage + Khazaka electronic GmbH, Köln, Německo). Měření se provádí za pomoci sondy zakončené otevřenou cylindrickou próbou o průměru 1 cm. Sonda (Obr. 18) je vybavena dvěma senzory, které zaznamenávají gradient teploty a hustoty vodních par a aplikací Fickova zákona difuze (více o metodě měření CWL přístrojem Tewameter TM300 na stránkách výrobce (<https://www.courage-khazaka.de/en/16-wissenschaftliche-produkte/alle-produkte/172-tewameter-e>)).



Obr 18: Sonda pro měření CWL, na obrázku jsou vidět senzory, které slouží k zachycení parametrů měření (teplota a relativní vlhkost; převzato z manuálu pro přístroj Tewameter® TM 300).

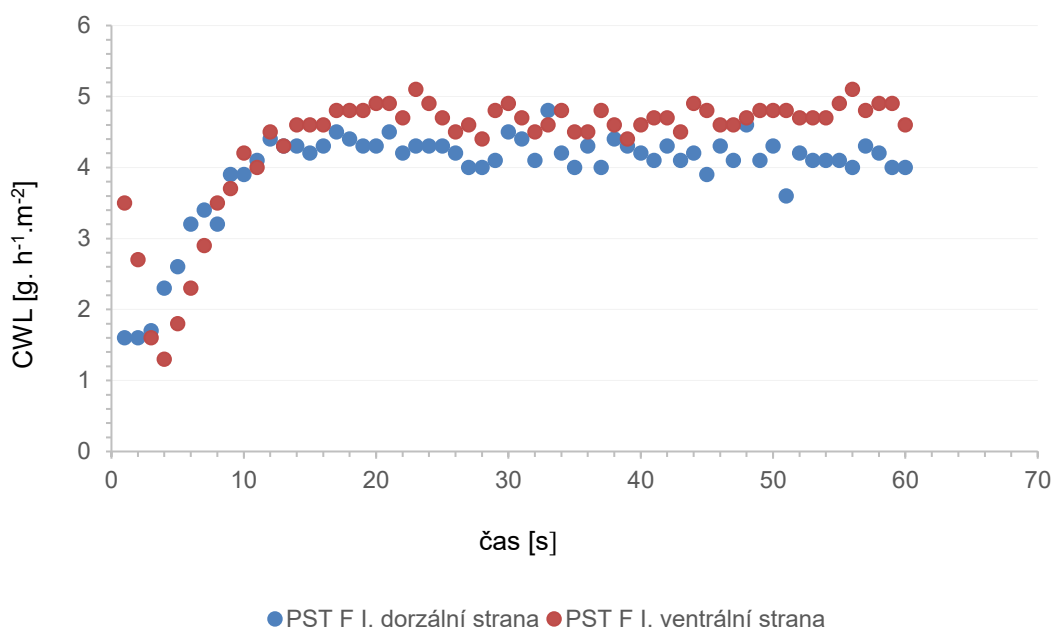
U plazů byl tímto přístrojem měřen CWL poprvé, a tak není zavedena metodika. Způsob měření byl stanoven na základě literatury u podobných studií, například u druhu *Sceloporus consobrinus* (Oufiero & Van Sant, 2018) a konzultace s Dr. Pavlačkovou z UTB Zlín, která přístroj zapůjčila. U každého sledovaného jedince byla změřena nejprve ventrální a následně dorzální strana těla. Při měření ventrální strany těla, bylo zvíře fixováno plastovou podložkou. Uprostřed této podložky byl otvor, skrze který byla přiložena sonda. Důvodem použití této podložky byla fixace zvířete v klidné poloze a také minimalizace rizika nadměrného zahřátí měřeného jedince, jelikož teplota ovlivňuje hodnotu CWL (Oufiero & Van Sant, 2018). Při měření dorzální strany těla bylo zvíře položeno na manipulační stůl a na dorzální stranu těla byla přiložena sonda (viz Obr. 19).

Celkem bylo naměřeno 60 hodnot (1 hodnota za 1 sekundu) na ventrální a 60 hodnot na dorzální straně těla pro každého jedince, typický průběh měření viz (Obr. 20). Z průběhu měření je patrné, že trvalo několik sekund, než se naměřené hodnoty ustálily. Pro výpočet

průměrné dorzální a ventrální hodnoty CWL pro každého jedince byly použity hodnoty z druhé poloviny měření, tedy od 31. do 60. sekundy. Z dat byl vypočítán aritmetický průměr pro ventrální a dorsální stranu těla pro každý druh, přičemž hodnoty CWL byla zaznamenány pouze u neaktivních jedinců.



Obr. 19.: Zástupce druhu *Paroedura lohatsara* při měření CWL z dorzální (vpravo) a ventrální části těla (vlevo).

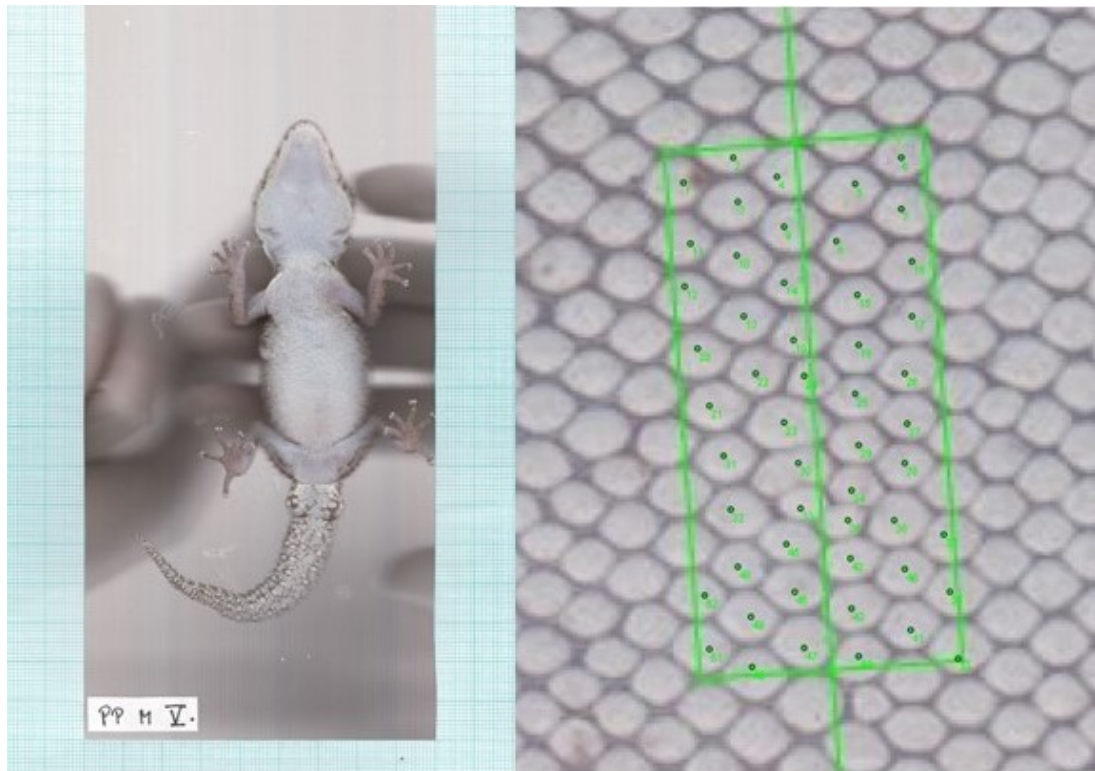


Obr. 20.: Příklad průběhu měření CWL u samice *Paroedura stumpffi*. Modře jsou zvýrazněny hodnoty CWL dorzální strany, červeně hodnoty CWL na ventrální straně. V grafu je vidět ustálení hodnot okolo 20 vteřiny měření a poměrně stabilní hodnoty od 31 do 60 sekundy, které byly následně u úspěšných měření analyzovány.

2.4.1 Morfometrie ventrálních šupin

Velikost ventrálních šupin byla získána za použití digitální analýzy šupin z makrofotografií v programu ImageJ, verze 52i (Schneider et al., 2012). Fotografie byly získány skenováním ventrální strany jedinců uskutečněném po úspěšném změření TEWL a intenzity metabolismu. Od každého druhu byly vybráni čtyři jedinci (typicky 2 samci a 2 samice, přesný počet uveden v tabulce (Tab. P2 v části přílohy)).

Ventrální šupiny u rodu *Paroedura* jsou v podstatě značně homogenní (na rozdíl od dorzálních šupin). Referenční oblast, kde byly počítány šupiny se nacházela v polovině vzdálenosti mezi předními a zadními končetinami. Tato oblast byla vymezena obdélníkem umístěným v ose těla. Velikost plochy byla vypočítána individuálně pro každého jedince. Vzorec výpočtu je $SVL/10$ (délka obdélníku) \times $SVL/20$ (šířka obdélníku). Vymezená oblast byla graficky znázorněna a poté byla za použití programu ImageJ označena každá šupina nalézající se více než z poloviny v dané oblasti (Obr. 21). Výsledný počet šupin byl posléze zaznamenán do tabulek v Excelu. Na základě velikosti referenční plochy a počtu šupin v této oblasti byla vypočítána průměrná velikost šupiny pro konkrétního jedince. Pro mezidruhovou analýzu byla vypočítána průměrná velikost ventrálních šupin pro každý druh.



Obr. 21: Sken ventrální strany samce druhu *Paroedura picta* s označením PP M V. (vlevo), vyznačená referenční oblast a spočítané šupiny (vpravo).

2.5 STATISTICKÁ ANALÝZA A VYHODNOCENÍ DAT TEWL, CWL A INTENZITY METABOLISMU

Všechny naměřené hodnoty (kromě CWL) byly před začátkem analýz transformovány dekadickým logaritmem. Pro všechny naměřené proměnné bylo pro následné analýzy použito průměrných hodnot na druh.

Naměřené hodnoty nelze kvůli sdílení fylogeneze mezi příbuznými taxony považovat za nezávislá data. Z tohoto důvodu musely být pro zjištění, které faktory ovlivňují TEWL použity metody, které umožňují zahrnout vliv fylogeneze. Konkrétně byla zvolena metoda mnohonásobná fylogenetická zobecněná lineární regrese (PGLS, Graften, 1989). Nejlepší model z hierarchicky vnořených PGLS modelů byl hodnocen podle Akaikeho informačního kritéria pro malé N (AICc, Cavanaugh, 1997). Jako nejlepší model byl vybrán ten s nejnižším AICc. Modely se stejným množstvím parametrů a rozdílem AICc (ΔAICc) menším než 2 byly brány jako rovnocenné. V případě, že by se modely se stejným nebo podobným AICc (ΔAICc menší než 2) lišily v počtu parametrů, byl by preferován jednodušší model s nižším počtem parametrů.

Vzájemné vztahy mezi TEWL, intenzitou metabolismu, velikostí ventrálních šupin a hmotností byly zkoumány separátně pomocí fylogenetické regrese. Pro detekci významně odlehých hodnot při analýze závislosti TEWL na hmotnosti těla byla použita robustní regrese. PGLS a robustní regrese byla provedena pomocí RStudio, version 1.1.442 (RStudio, Inc.) s balíčky *caper* pro PGLS (Orme et al., 2013) a *robustbase* (Maechler et al., 2019) pro robustní regresi.

Rozdíl v CWL z dorzální a ventrální části těla mezi druhy se signifikantně odchylnou hodnotou TEWL a ostatními druhy byl testován t-testem v programu Statistica 6.0 (StatSoft Inc. 2001). Hodnota pro hladinu významnosti byla u všech testů zvolena: $\alpha = 0,05$.

Rekonstrukce ancestrálního stavu TEWL byla provedena metodou maximální parsimonie v programu Mesquite, version 3.04 (Maddison & Maddison, 2018). Jak pro fylogeneticky informovanou statistickou analýzu, tak pro rekonstrukci ancestrálního stavu TEWL byl použit fylogenetický strom získaný Bayesovskou analýzou popsanou výše (obr. 22) a nastavena uniformní délka větví.

3 VÝSLEDKY

3.1 ZJIŠTĚNÍ PŘÍBUZENSKÝCH VTAHŮ MEZI STUDOVANÝMI DRUHY RODU *PAROEDURA*

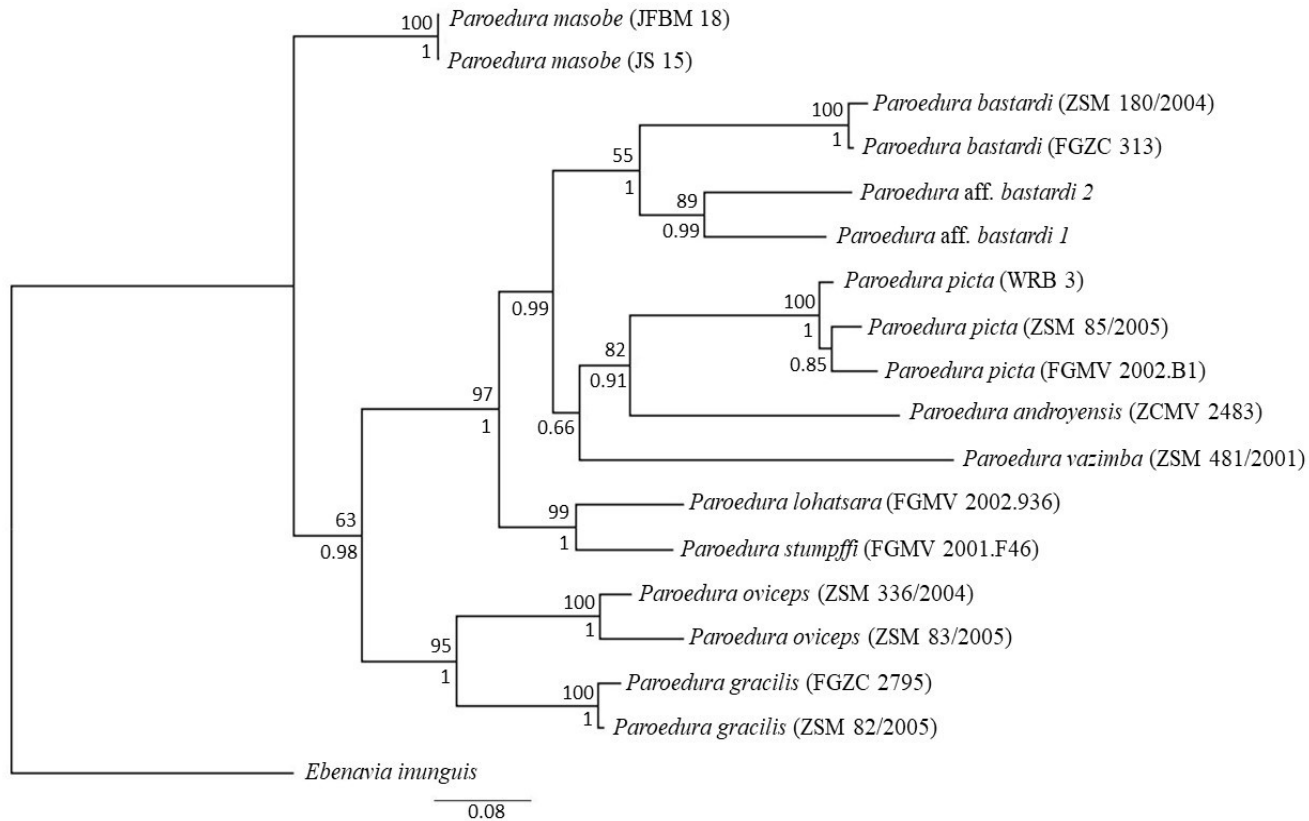
3.1.1 Vstupní data

Metodou Sangerova sekvenování se podařilo získat celkem 7 nukleotidových sekvencí, a to část mitochondriálních genu pro ND4 a COI a část jaderného genu kódující fosducin pro *P. aff. bastardi 1* a *P. aff. bastardi 2* a část mitochondriálního genu pro COI pro *P. vazimba*. Jak bylo uvedeno v metodice u *P. aff. bastardi 1* bylo zjištěno, že se v sekvenci pro COI vyskytují stopkodony a jedná se o pseudogen. Z tohoto důvodu nebyly geny pro COI do fylogenetické analýzy zařazen. Vstupní data pro alignment byla složena z části genů pro ND4 a fosducin. Délka osekvenovaných úseků pro ND4 byla 573 bp pro *P. aff. bastardi 1* a 530 bp pro *P. aff. bastardi 2*. Pro geny fosducinu byla po očištění a oříznutí primerů celková délka úseku 395 bp u obou „druhů“. Po spojení obou úseků, přidání sekvencí z genové banky a zalignování vznikl vstupní dataset čítající 954 znaků pro 18 jedinců patřících do 12 druhů.

3.1.2 Rekonstrukce fylogeneze

Fylogenetický strom zástupců rodu *Paroedura* byl vytvořen dvěma metodami (maximální parsimonie a Bayesovská analýza). Fylogenetické stromy byly zakořeněny druhem *Ebenavia inguis*. Metodou maximální parsimonie byl získán jeden nejkratší strom o délce 1221 kroků. Celkový index konzistence (CI) výsledného stromu byl 0,5643, celkový retenční index (RI) byl 0,5988 a index homoplazie (HI) byl 0,4357. Topologie stromů získaných metodou maximální parsimonie a Bayesovskou analýzou byla téměř totožná až na pozici druhu *P. vazimba*, která byla buď dána do sesterské pozice k druhům z komplexu *P. bastardi* (maximální parsimonie) nebo jako sesterská ke kladu *P. picta* + *P. androyensis* (Bayesovská analýza). Pozice *P. vazimba* ve fylogenetickém stromu rodu *Paroedura* nemůže být považována za vyřešenou, nicméně pro účely dalších statistických analýz a rekonstrukce ancestrálního stavu TEWL, bude použita topologie získaná Bayesovskou analýzou (Obr. 22) a to i z důvodu, že nedichotomicky se větvící stromy jsou pro některé statistické metody beroucí v potaz fylogenetické vztahy problematické. Ve výsledném stromě představuje *P. masobe* sesterskou větev všem ostatním druhům rodu *Paroedura* a zbylé druhy se dělí na dvě sesterské linie - *P. gracilis* + *P. oviceps* vs. zbylé druhy zahrnuté do analýzy.

Podrobněji jsou fylogenetické vztahy znázorněny na Obr 22. Topologie stromu je (až na pozici *P. vazimba*) velmi silně podpořena vysokými hodnotami posteriorních pravděpodobností.



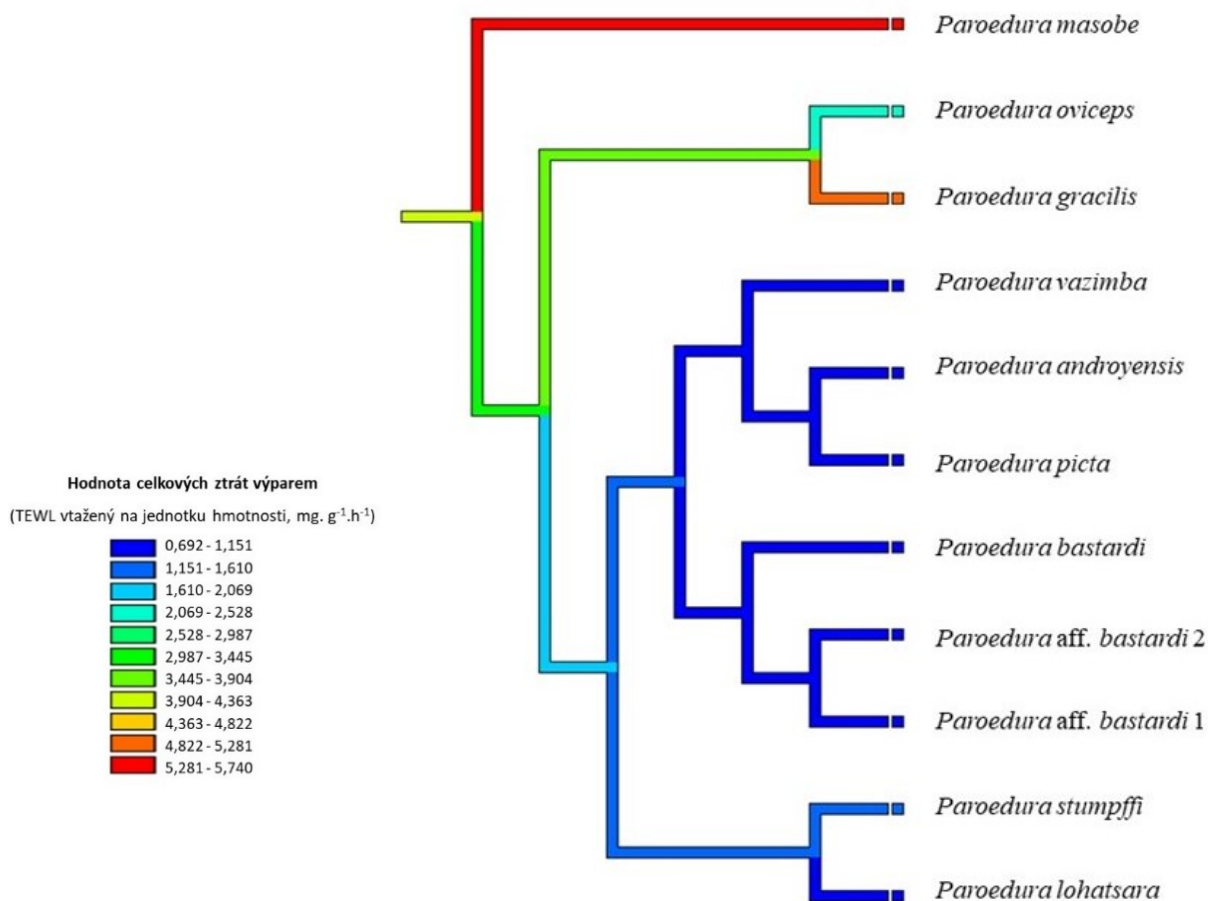
Obr. 22: Fylogenetický strom rodu *Paroedura* získaný Bayesovskou analýzou. Fylogenetický strom získaný metodou maximální parsimonie je prakticky totožný (viz 2.2 Rekonstrukce fylogeneze). Hodnoty v blízkosti uzlů vyjadřují hodnoty bootstrapu pro maximální parsimonii (nad větví) a posteriorní pravděpodobnosti Bayesovské analýzy (pod větví). Čísla za druhovými jmény udávají označení daných jedinců dle GeneBank (viz Tab. 3).

3.2 NAMĚŘENÉ HODNOTY TEWL A INTENZITY METABOLISMU U ZÁSTUPCŮ RODU PAROEDURA

TEWL a intenzita metabolismu (měřená jako produkce CO₂) byly měřeny u 146 jedinců. Jedinci, kteří byli při měření aktivní nebo u kterých byl v komůrce nalezen trus či moč, byli ze studie vyloučeni. Výsledná data byla získána od 99 jedinců z 11 druhů rodu *Paroedura*. Souhrnně jsou získaná data uvedena v Tab. 5. Tabulka zahrnující všechna úspěšná měření je uvedena v příloze (Tab. P1).

3.2.1 Analýza TEWL u rodu *Paroedura*

Druhy rodu *Paroedura* se značně liší v hodnotách TEWL (Tab. 5). Rozdíly mezi hodnotami TEWL vztaženými na jednotku hmotnosti dosahují téměř osminásobných rozdílů. Rekonstrukce ancestrálního stavu TEWL (Obr. 23) ukazuje, že ancestrální hodnota TEWL na jednotku hmotnosti je poměrně vysoká a dosahuje hodnoty 4.256 (mg. g⁻¹. h⁻¹).



Obr 23.: Rekonstrukce ancestrálního stavu TEWL u rodu *Paroedura*. Ancestrální hodnota TEWL na jednotku hmotnosti je 4.256 (mg. g⁻¹. h⁻¹).

Druh	Zkratka	Počet jedinců	Hmotnost [g]		SVL [mm]		TEWL [mg.h ⁻¹]		TEWL vztažené na jednotku hmotnosti [mg. g ⁻¹ .h ⁻¹]	Produkce CO ₂ [ml.h ⁻¹] (intenzita metabolismu)	
			Rozsah	Průměr	Rozsah	Průměr	Rozsah	Průměr		Rozsah	Průměr
<i>Paroedura androyensis</i>	PAN	11	1,290-2,000	1,610	35,850-43,670	38,413	0,993-3,155	1,576	1,011	0,119-0,225	0,181
<i>Paroedura vazimba</i>	PVA	15	2,190-3,790	2,755	43,290-49,050	45,816	1,327-2,547	1,92	0,708	0,222-0,350	0,272
<i>Paroedura</i> aff. <i>bastardi</i> 1	PAB 1	9	3,990-6,843	5,527	53,060-62,860	57,487	3,071-10,248	4,705	0,848	0,392-0,525	0,450
<i>Paroedura</i> aff. <i>bastardi</i> 2	PAB 2	13	3,040-6,850	4,531	51,800-59,670	55,64	2,071-5,761	3,56	0,782	0,266-0,451	0,361
<i>Paroedura picta</i>	PP	16	14,660-32,332	21,499	83,850-96,120	89,481	12,234-33,930	19,833	0,948	1,099-2,050	1,551
<i>Paroedura stumpffi</i>	PST	10	7,560-11,750	9,501	62,230-70,080	67,912	6,214-17,698	11,763	1,238	0,641-1,007	0,808
<i>Paroedura oviceps</i>	POV	12	4,930-9,400	6,863	60,630-71,170	65,776	7,633-23,058	15,079	2,153	0,526-1,322	0,763
<i>Paroedura gracilis</i>	PGR	5	4,160-7,766	6,005	61,070-73,550	65,35	24,155-40,973	30,049	5,011	0,419-0,792	0,610
<i>Paroedura masobe</i>	PMA	2	18-46-22,92	20,69	97,01-109,95	103,48	102,792-114,441	108,616	5,281	1,096-1,578	1,337
<i>Paroedura lohatsara</i>	PLO	4	12,33-16,550	14,55	67,190-73,290	70,468	10,404-17,831	13,172	0,921	0,622-1,059	0,820
<i>Paroedura bastardi</i>	PBA	2	17,425-25,8	21,613	80,34-82,22	81,28	14,193-14,715	14,454	0,692	2,088-2,226	2,157

Tab. 5: Souhrnná tabulka naměřených hodnot celkových ztrát vody výparem (TEWL), intenzity metabolismu a základní morfometrické údaje (hmotnost a délka těla od špičky rostra po kloaku (SVL)) u jednotlivých druhů rodu *Paroedura*.

3.2.2 Prediktory TEWL

Z výsledků PGLS, kde byla v modelech zahrnuta hmotnost, intenzita metabolismu, velikost ventrálních šupin a všechny vzájemné kombinace jejich vlivů, je patrné, že nejlepšími prediktory TEWL je hmotnost nebo velikost ventrálních šupin. Mezi modely je $\Delta AICc$ menší než 2 (Tab. 6). Zároveň je také patrné ze separátních fylogenetických regresí (viz níže), že jak velikost ventrálních šupin, tak intenzita metabolismu silně koreluje s hmotností, z čehož lze usuzovat, že TEWL je silně ovlivněn velikostí těla. Model, kde prediktorem TEWL je pouze hmotnost vysvětlí 81,3 % variability a korelace mezi TEWL a hmotností je silně signifikantní ($p = 0,0001$). Model, kde prediktorem TEWL je pouze velikost ventrálních šupin vysvětlí 87,1 % variability, a i zde je korelace mezi TEWL a velikostí ventrální šupiny vysoce signifikantní ($p = 0,00003$).

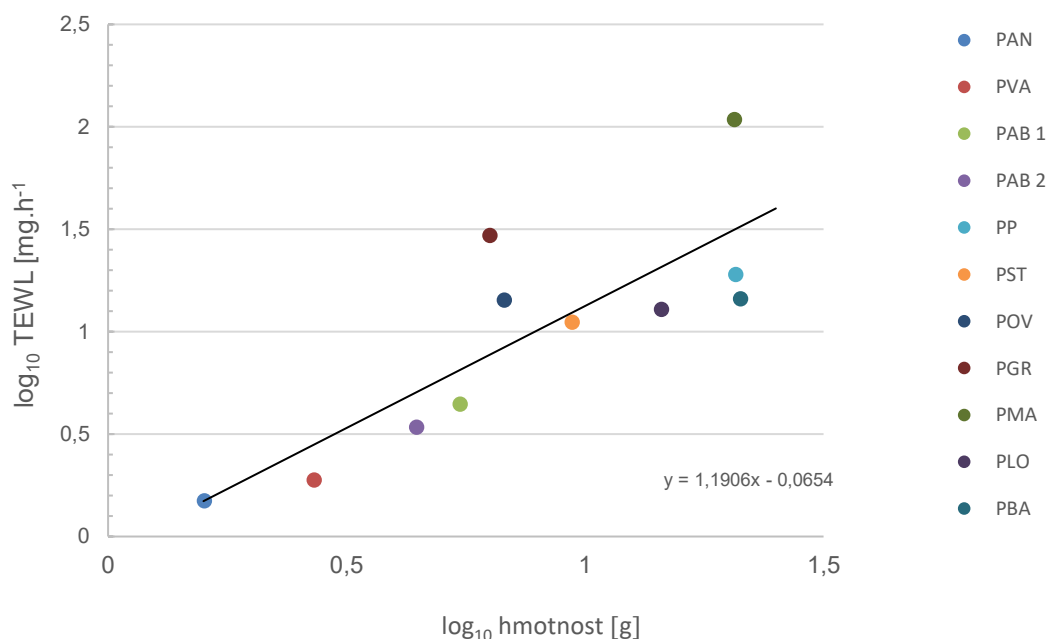
Model	AICc hodnoty	$\Delta AICc$
$\log TEWL \sim 1$	18,491	14,634
$\log TEWL \sim \log m + \log CO_2 + \log VS$	11,475	7,618
$\log TEWL \sim \log m + \log CO_2$	7,614	3,757
$\log TEWL \sim \log m + \log VS$	6,545	2,688
$\log TEWL \sim \log m$	3,857	0
$\log TEWL \sim \log CO_2 + \log VS$	8,300	4,443
$\log TEWL \sim \log CO_2$	6,934	3,077
$\log TEWL \sim \log VS$	4,960	1,103

Tab 6.: Tabulka testovaných PGLS modelů a hodnoty AICc a $\Delta AICc$. Modely se stejným množstvím parametrů a $\Delta AICc$ menším než 2 jsou brány jako rovnocenné a jsou vyznačeny tučně. Zkratky použité jednotlivých modelech: TEWL = celkové ztráty vody výparem, m = hmotnost, CO₂ = intenzita metabolismu a VS = velikost ventrálních šupin.

3.2.2.1 Závislost mezi TEWL a hmotností

TEWL, intenzita metabolismu i velikost ventrálních šupin velmi silně korelují s hmotností. Po zahrnutí vlivu fylogeneze lze mezidruhovou závislost mezi TEWL a hmotností v logaritmické transformaci popsat přímkou s interceptem $0,516 \pm 0,233$ S.E. a sklonem $1,033 \pm 0,165$ S.E. ($p= 0,0001$). I přes značnou S.E. lze tedy říct, že TEWL škáluje proporčně rovnoměrně s hmotností a tento vztah vysvětlí 81,3 % variability (Obr. 24).

Z Obr. 24 je patrná jistá variabilita v naměřených datech. Za použití robustní regrese byly odhaleny dvě významně odlehlé hodnoty, a to průměrná hodnota TEWL pro *P. masobe* a *P. gracilis*. Robustní regrese přiřadila těmto bodům velmi nízké váhy menší nebo rovné 0,04941, zatímco všechny ostatní body měly váhy přesahující 0,63835, ve většině případů dokonce více než 0,944, což naznačuje, že tyto dva odlehlé druhy mají opravdu výrazně vyšší TEWL, než by bylo očekáváno na základě vztahu s průměrnou hmotností pro daný druh.

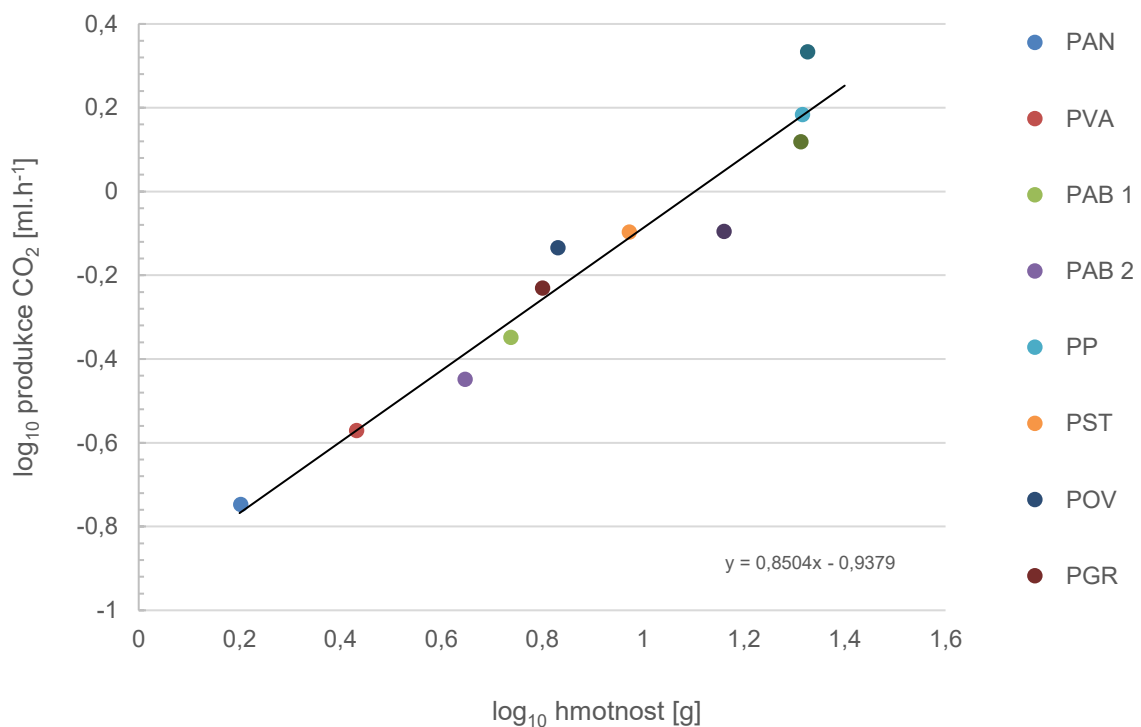


Obr 24.: Průměrné hodnoty TEWL v závislosti na hmotnosti pro jednotlivé druhy rodu *Paroedura*. Zkratky pro druhy jsou uvedeny v Tab. 5. Proložena je lineární regresní přímka bez zahrnutí vlivu fylogeneze.

3.2.2.2 Závislost mezi intenzitou metabolismu a hmotností

Shrnutí výsledků z měření intenzity metabolismu u zástupců rodu *Paroedura* je v Tab. 5 a výsledky jednotlivých měření v Tab. P1 v příloze.

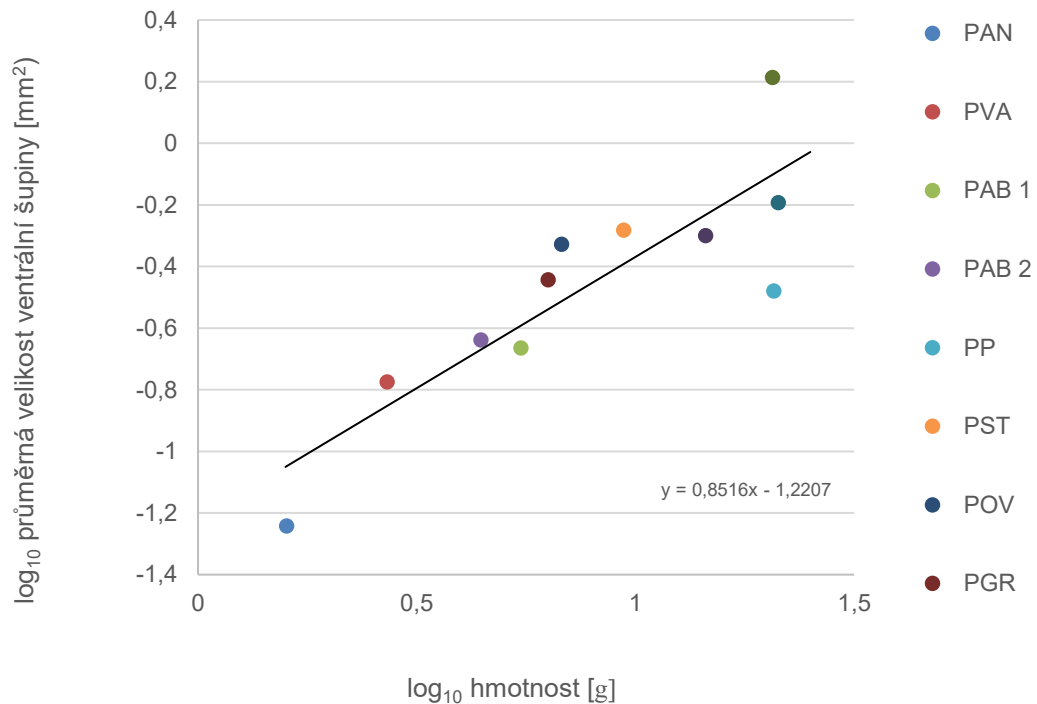
Intenzita metabolismu a hmotnost spolu silně korelují (Obr. 25). Při zahrnutí vlivu fylogeneze můžeme mezidruhovou závislost mezi intenzitou metabolismu a hmotností v logaritmické transformaci popsat přímkou s interceptem $-0,895 \pm 0,073$ S.E. a sklonem $0,797 \pm 0,069$ S.E. ($p = 0,00001$), která vysvětlí 93,7 % variability.



Obr 25.: Průměrné hodnoty produkce CO₂ (intenzity metabolismu) v závislosti na hmotnosti u jednotlivých druhů rodu *Paroedura*. Zkratky pro druhy jsou uvedeny v Tab. 5. Proložena je lineární regresní přímka bez zahrnutí vlivu fylogeneze.

3.2.3 Vztah mezi velikostí ventrálních šupin a hmotností

Velikosti ventrálních šupin pro jednotlivé jedince jsou uvedeny v příloze (Tab. P2). Velikost ventrálních šupin silně koreluje s hmotností těla (Obr. 26). Při zahrnutí vlivu fylogeneze lze mezidruhovou závislost mezi velikostí ventrálních šupin a hmotností popsat přímkou s interceptem $-0,816 \pm 0,154$ S.E. a sklonem $0,700 \pm 0,109$ S.E. ($p = 0,0001$), která vysvětlí 82,07 % variability.



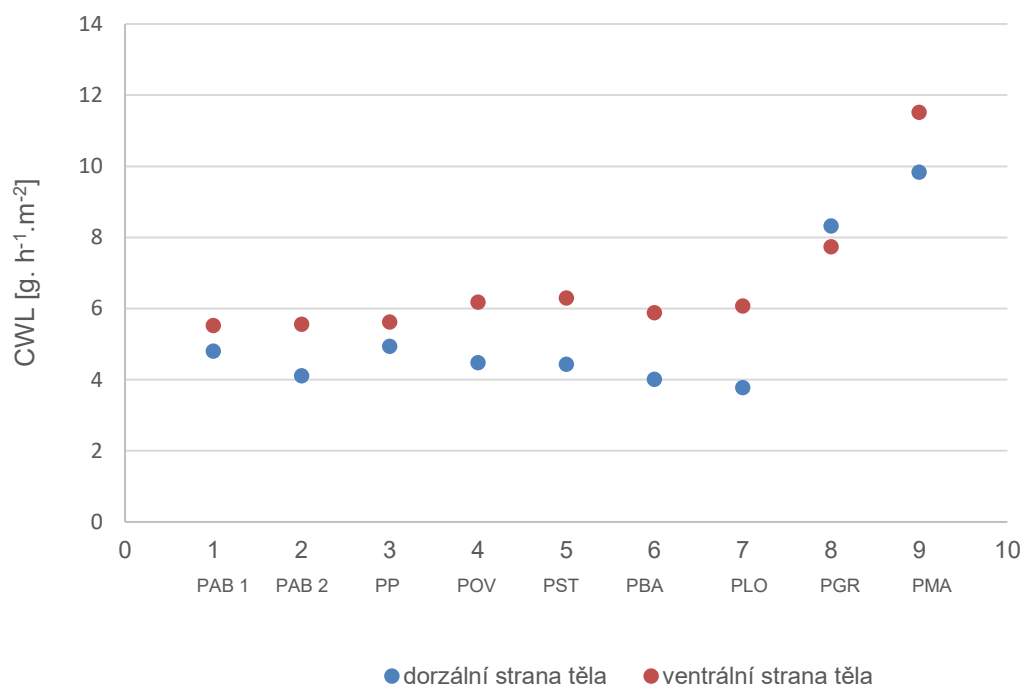
Obr 26.: Průměrná velikost ventrálních šupin v závislosti na hmotnosti u jednotlivých druhů rodu *Paroedura*. Zkratky pro druhy jsou uvedeny v Tab. 5. Proložena je lineární regresní přímka bez zahrnutí vlivu fylogeneze.

3.3 CWL U ZÁSTUPCŮ RODU *PAROEDURA*

CWL byl měřen u 52 jedinců 9 druhů. Průměrné hodnoty CWL z dorzální a ventrální části jsou uvedeny v Tab. 7 a znázorněny na Obr. 27. Měření CWL mělo technické limity, kvůli velikosti sondy nešlo realizovat u nejmenších druhů *P. androyensis* a *P. vazimba* a i u některých jiných druhů bylo problematické a řada jedinců musela být z důvodu aktivity (neustálené hodnoty CWL, viz obr. 20) při měření vyloučena. I přes limity se podařilo ukázat, že *P. masobe* a *P. gracilis* mají signifikantně vyšší výpar z dorzální i ventrální strany těla než je průměrná hodnota výparu pro zbylé druhy zahrnuté do analýzy (t-test *P. masobe* CWL dorzální část $p < 0,00001$; ventrální část $p < 0,00001$; *P. gracilis* CWL dorzální část $p < 0,00001$; ventrální část $p < 0,0001$). Jelikož CWL je jednou ze složek TEWL, podporuje tento výsledek zjištění, že *P. masobe* a *P. gracilis* mají zvýšené hodnoty TEWL, než by bylo očekáváno na základě predikce z průměrné hmotnosti těla těchto druhů.

Druh	Zkratka	Počet jedinců	Průměr CWL [g. h ⁻¹ .m ⁻²] dorzální strana	Průměr CWL [g. h ⁻¹ .m ⁻²] ventrální strana
<i>P. aff bastardi</i> 1	PAB 1	10	4,806	5,527
<i>P. aff bastardi</i> 2	PAB 2	10	4,106	5,558
<i>P. picta</i>	PP	6	4,938	5,625
<i>P. oviceps</i>	POV	8	4,475	6,182
<i>P. stumpffi</i>	PST	5	4,435	6,299
<i>P. bastardi</i>	PBA	2	4,015	5,882
<i>P. lohatsara</i>	PLO	3	3,776	6,070
<i>P. gracilis</i>	PGR	6	8,319	7,734
<i>P. masobe</i>	PMA	2	9,833	11,518

Tab. 7: Průměrné hodnoty CWL na dorzální a ventrální straně těla u jednotlivých druhů rodu *Paroedura*.



Obr 27.: Průměrné hodnoty CWL u jednotlivých zástupců rodu *Paroedura*.

4 DISKUZE

Jedním z dílčích cílů diplomové práce bylo rekonstruovat ancestrální stav TEWL u rodu *Paroedura*. Z tohoto důvodu a také pro následné statistické zpracování získaných dat bylo nejprve nutné doplnit informaci o fylogenetických vztazích rodu *Paroedura*. Pro zjištění fylogenetických vztahů mezi druhy zahrnutými do diplomové práce byly použity již publikované sekvence z práce Jackman et al. (2008) a doplněny o sekvence druhů zahrnutých do komplexu *P. bastardi*. Jako výsledný strom pro následné analýzy je považován fylogenetický strom získaný metodou Bayesovské analýzy (Obr. 22). Topologie tohoto stromu se až na pozici *P. vazimba* neliší od fylogenetické hypotézy Jackmana et al. (2008) a všechny důležité uzlové body jsou velmi dobře podpořeny vysokými hodnotami posteriorních pravděpodobností. Získaný fylogenetický strom je ovšem v rozporu s výsledky velkých fylogenetických studií zahrnujících více než 4000 druhů šupinatých plazů (Pyron et al. 2013; Zheng & Wiens 2016). Tyto studie podporují rozdělení rodu *Paroedura* na dvě fylogenetické linie, jednu zahrnující *P. masobe*, *P. gracilis* a *P. oviceps* a druhou zahrnující *P. bastardi*, *P. picta*, *P. vazimba*, *P. androyensis*, *P. lohatsara* a *P. stumpffi*. Tyto široce pojaté fylogenetické analýzy pouze reanalyzují existující data a často obsahují výrazně nekompletní datové soubory, aby zahrnuly co největší počet taxonů a genů (např. 52 genů a 4162 druhů, Zheng & Wiens 2016). Ve své diplomové práci jsem se rozhodla preferovat a interpretovat výsledky založené na vlastní fylogenetické analýze zaměřené pouze na rod *Paroedura*, doplněné o taxony, které ve výše zmiňovaných publikacích chybí. Z výše zmíněného a výsledků dalších recentních studií zaměřených především na popis nových druhů rodu *Paroedura* (Glaw et al., 2014, 2018; Köhler et al., 2019), které k určení druhové příslušnosti používaly fylogenetické stromy sestavené na základě sekvenčních dat pro COI, vyplývá, že studium fylogenetických vztahů uvnitř rodu *Paroedura* by v budoucnu zasluhovalo nové zpracování, které bude zahrnovat větší množství druhů, jedinců i sekvenovaných genů.

Gekoni rodu *Paroedura* se výrazně liší v míře evaporace. Naměřené hodnoty ukazují i více než osminásobné rozdíly v TEWL vztažené na gram tělesné hmotnosti (Tab. 5). Průměrné hodnoty TEWL pro jednotlivé druhy v rozpětí od 1,56 mg/h u nejmenšího zástupce *P. androyensis* do 108,62 mg/h u *P. masobe* odpovídají hodnotám publikovaným pro ostatní šupinaté plazy (Cox & Cox, 2015, Obr. 3). U některých druhů se nepodařilo zajistit větší množství jedinců než například dva (*P. masobe*, *P. bastardi*) nebo čtyři (*P. lohatsara*). Důvodem je to, že se jedná o velmi vzácně chované druhy, které se v zajetí špatně rozmnožují.

P. masobe a *P. lohatsara* patří dokonce v současnosti dle IUCN k ohroženým nebo kriticky ohroženým druhům (Bora et al. 2011; Raxworthy et al., 2011). Vnitrodruhová variabilita měření TEWL byla obecně poměrně nízká (Obr. P1) a například u druhu *P. masobe*, kde jsem pro kontrolu opakovala měření TEWL, jsem i s několika měsíčním odstupem získala velmi podobné hodnoty pro klidová měření (jedinec PMAm3: 120,28 a 114,44 mg/h, jedinec PMAm2: 102,79 a 104,51 mg/).

Rekonstrukce ancestrálního stavu TEWL odhalila, že hodnota TEWL (vztažený na jednotku tělesné hmotnosti) je 4,256 (mg. g⁻¹. h⁻¹). Tato hodnota je, při porovnání naměřených hodnot TEWL uvedených v Tab. 5., poměrně vysoká a většina, tedy devět z jedenácti druhů zahrnutých do analýzy má TEWL výrazně nižší, než byl ancestrální stav, což naznačuje přesun z vlhkých pralesů, kde se v současnosti vyskytuje jen *P. masobe* a *P. gracilis*, do sušších oblastí, na které se musely druhy adaptovat (viz níže). Hodnotu ancestrálního stavu TEWL by nijak neovlivnila ani jiná z alternativních pozic druhu *P. vazimba*, navržená ať již Jackmanem et al. (2008) nebo metodou maximální parsimonie v této diplomové práci. Jiné výsledky by pravděpodobně přinesla analýza založená na fylogenetických vztazích získaných z nedávno publikovaných velkých fylogenetických studiích (Pyron et al., 2013; Zheng & Wiens 2016) (viz výše).

Zástupci rodu *Paroedura* ve volné přírodě obývají prostředí, které bychom mohli rozdělit do tří skupin, aridní prostředí (opadavé suché lesy, trnitá buš), semiaridní (vlhké opadavé lesy) a vlhké (nížinné tropické lesy a horské lesy) (Tab. 7). Problém při určení preferovaného typu prostředí představovaly druhy z komplexu *P. bastardi*, kde nebyla jasná oblast původu. Profesor Miguel Vences (TU Braunschweig, Německo), aktuálně pracuje na taxonomické revizi tohoto druhového komplexu. Na základě sekvenačních dat pro COI a konzultace s M. Vencesem bylo možné získanou sekvencí COI *P. aff bastardi 2* a sekvencí COI *P. bastardi* (GenBank č. KJ917172) z práce Koubová et al. (2014) (tedy sekvencí jedince pocházejícího ze stejné populace jako mnou měření zástupci *P. bastardi*) přiřadit k sekvencím jedinců z tohoto komplexu se známou lokalitou odchytu. Na základě klastrování sekvenačních dat vždy s několika jedinci z jedné oblasti je pravděpodobné, že *P. aff bastardi 2* pochází z oblasti Toliara a *P. bastardi* z oblasti NP Isalo, tedy z jihozápadu ostrova Madagaskar, který je velmi suchý.

Druh	Habitat	Lokalita	TEWL vztažené na jednotku hmotnosti [mg. g ⁻¹ .h ⁻¹]
<i>P. androyensis</i>	opadavé suché lesy	jih ostrova	1,011
druhový komplex <i>P. bastardi</i>	suché lesy, buše, skalnaté oblasti	jihozápadní část ostrova	<i>P. bastardi</i> – 0,692 <i>P. aff bastardi</i> 1 – 0,848; <i>P. aff bastardi</i> 2 – 0,782
<i>P. gracilis</i>	tropický deštný les	severovýchod ostrova	5,011
<i>P. lohatsara</i>	suché lesy a krasové oblasti	sever Madagaskaru, v oblasti Montagne des Francais	0,921
<i>P. masobe</i>	tropický deštný les	Zahamena + Betampona (východní pobřeží, centrální část)	5,281
<i>P. oviceps</i>	opadavé a vlhké lesy	severozápad ostrova	2,153
<i>P. picta</i>	trnitá buš a suché lesy	západ a jihovýchod ostrova	0,948
<i>P. stumpffi</i>	vlhké lesy, suché lesy, sekundární porost (plantáže)	severozápadní část ostrova	1,238
<i>P. vazimba</i>	suché opadavé lesy	západní část ostrova	0,708

Tab. 8: Rozdělení jednotlivých druhů rodu *Paroedura* na základě preferovaných habitatů, žlutá barva představuje aridní prostředí, modrá semiaridní a zelená vlhké prostředí, pro přehlednost je tabulka doplněna hodnotami TEWL (vztažené na jednotku hmotnosti).

Pokud bychom porovnávali výsledky měření TEWL s typem prostředí, vidíme určitý trend, kdy skutečně hodnota TEWL souvisí s typem prostředí, ve kterém se daný druh vyskytuje. Nejvyšších hodnot TEWL dosahují druhy *P. masobe* 5,281 (mg. g⁻¹.h⁻¹) a *P. gracilis* 5,011(mg. g⁻¹.h⁻¹) a oba tyto druhy preferují tropické deštné lesy, naopak nejnižší hodnoty byly naměřeny u *P. bastardi* 0,692 (mg. g⁻¹.h⁻¹), která obývá suché opadavé lesy a trnitou buš v aridní části ostrova. Výsledky v diplomové práci se shodují s výsledky, které byly nalezeny u gekončků rodu *Coleonyx* (Dial & Grismer, 1992). V této studii bylo rovněž zjištěno, že v průběhu evoluce došlo ke snížení TEWL, za pomoci adaptací souvisejících se snížením intenzity metabolismu a přítomnosti tuberkulů na dorzální straně těla. Podobné výsledky byly nalezeny i u jiných skupin plazů, kde autoři porovnávaly druhy žijící v různém typu prostředí

(Mautz 1982a; Cox & Cox, 2015; Muñoz-Nolasco et al. 2019) a také mezi dalšími skupinami obratlovců či bezobratlých (např. Tieleman et al., 2003; Williams et al., 2004, Kleynhans & Terblanche, 2009; Van Sant et al., 2012).

Vypadá to tedy, že se jednotlivé druhy rodu *Paroedura* dokáží přizpůsobovat svému prostředí. Během evoluce se dokázaly adaptovat na aridní prostředí a bylo by zajímavé zjistit, jaké fyziologické a morfologické adaptace na to mají největší vliv. Jak již bylo zmíněno, na evaporaci mají největší podíl dvě složky, ztráty vody při dýchání a ztráty vody pokožkou. Z hlediska fyziologických adaptací jsme se tedy zaměřili na faktory, které TEWL patrně nejvíce ovlivňují, tedy na velikost těla, intenzita metabolismu a velikost ventrálních šupin, které u zástupců rodu *Paroedura* na rozdíl od dorsálních šupin nejsou tak variabilní. Výsledky porovnání hierarchicky vnořených PGLS modelů prokázaly, že nejlepšími prediktory TEWL jsou hmotnost těla a velikost ventrálních šupin, které jsou však také silně korelovány s hmotností. Při pohledu na závislost mezi TEWL a hmotností je patrná variabilita v naměřených datech a ukazuje se, že průměrná hodnota TEWL pro vlhkomilné druhy *P. masobe* a *P. gracilis* je výrazně vyšší, než by bylo očekáváno na základě vztahu s průměrnou hmotností pro daný druh (Obr. 24). Intenzita metabolismu i velikost ventrálních šupin spíše silně korelují s hmotností a zdá se, že nevysvětlují pozorovanou variabilitu v TEWL. Nezdá se tedy, že by adaptace na prostředí o jiné vlhkosti probíhala cestou změny intenzity metabolismu, která byla dobře dokumentována například u ptáků (Tielman et al. 2003; Sabat et al., 2006) nebo změnami velikosti šupin, jak navrhuje některé studie (Alibardi, 2003; Calsbeek, 2006; Oufiero et al., 2011; Wegener et al. 2014). Existuje naopak možnost, že důležitá pro regulaci CWL nebude velikost šupin, ale především stavba kůže. Tuto hypotézu podporuje výzkum, který byl proveden u bezšupinatých plazů (Bennet & Licht 1975), ve kterém došli k závěru, že bezšupinatí hadi měli stejné nebo dokonce nižší hodnoty TEWL než kontrolní vzorek šupinatých hadů (Bennet & Licht 1975).

Za účelem bližšího prozkoumání CWL jsme se v poslední části diplomové práce zaměřili na přímé měření CWL u zástupců rodu *Paroedura* a porovnávali jsme také rozdíly mezi dorzálním a ventrálním kožním výparem. Výrazně vyšší hodnoty CWL než u ostatních zástupců jsme naměřili u vlhkomilných druhů *P. masobe* a *P. gracilis*. Porovnání ventrální a dorzální strany těla je velice zajímavé a je poměrně překvapivé, že u většiny zástupců je vyšší ventrální výpar. Shodné výsledky (vyšší hodnoty ventrálního výparu) ukázala studie u rodu *Sceloporus* (Oufiero & Van Sant, 2018) nebo také konzultant této práce Mgr. Martin Hlubeň, který se ve svém výzkumu zaměřuje na zástupce čeledi *Eublepharidae*, kde rovněž naměřil

vyšší hodnoty CWL z ventrální strany těla (Martin Hlubeň, osobní sdělení). Přímé měření CWL námi zvolenou metodou bylo u malých plazů poněkud obtížné, přesto však nutno podotknout, že výsledky výzkumu potvrdily výsledky analýzy TEWL v hlavní části práce a zdá se, že za rozdíly v TEWL by mohly stát spíše rozdíly ve složení a permeabilitě pokožky, což může být zajímavým tématem pro další výzkum. Výsledky CWL, které byly naměřeny, podporují výsledky měření TEWL. Nejvyšších hodnot opět dosáhly druhy *P. masobe* a *P. gracilis*, které preferují habitaty tropických deštných lesů. Zdá se tedy, že za rozdíly v TEWL by mohly stát spíše rozdíly ve složení a permeabilitě pokožky, což může být zajímavým tématem pro další výzkum.

Rod *Paroedura* prodělal velice úspěšný vývoj a jednotlivé druhy se velice dobře přizpůsobily určitému typu prostředí. Madagaskar je charakteristický velice heterogenním prostředím a zajímavou bioklimatickou zónací a vyskytuje se zde velké množství různých specifických habitatů. Bohužel, na Madagaskaru je v současnosti znát negativní vliv člověka. Neustále dochází k narušování původních habitatů, k odlesňování a požárům a dochází ke ztrátám původních habitatů (Harper et al. 2007; Rosa et al. 2011). Zásahy do jednotlivých areálů mohou mít za následek výrazné změny vegetace a environmentálních podmínek (především teplota a vlhkost), a to s sebou nese fyziologický stres, zvýšenou mortalitu a oslabení populace některých druhů (Tracy et al. 2006). Změna ekologických faktorů je velice nebezpečná pro specializované živočichy, například rod *Paroedura*. Pokud se zaměřím na rod *Paroedura*, a konkrétně na druhy, které byly součástí této diplomové práce, nejvíce ohroženou skupinou jsou mikroendemité, obývající malé areály, případně fragmentované lokality. Jedním z nejvíce ohrožených jsou druhy *P. lohatsara*, která žije pouze v lokalitě Montagne des Francais. Druhým takovým příkladem je *P. masobe*, která v současnosti obývá tropické deštné pralesy na dvou fragmentovaných lokalitách a oba tyto druhy jsou zařazeny mezi ohrožené a kriticky ohrožené druhy (Raxworthy et al., 2011; Rosa et al., 2011).

Výsledky diplomové práce mohou tedy pomoci i v praxi, a to především k ochraně jednotlivých druhů. Získání bližších informací o fyziologických adaptacích ohrožených druhů a jejich vazbě na určité prostředí by mělo napovědět, jak důležité je chránit areály původního výskytu. Ideální by bylo zřízení dalších chráněných oblastí a národních parků, a s tím spojené přísné dodržování ochrany zvířat a původních stanovišť. Další možnou pomocí by byly kvalitní záchranné chovy, které by díky dostatečné informovanosti o biologii druhů napomohly přežití všech ohrožených skupin, včetně rodu *Paroedura*.

5 ZÁVĚR

Hlavním cílem této diplomové práce bylo změřit a porovnat TEWL u gekonů rodu *Paroedura*. Mezidruhové porovnání prokázalo velké rozdíly mezi jednotlivými zástupci. Důležitou součástí práce bylo zjištění fylogenetických vztahů uvnitř tohoto rodu a zjistit ancestrální stav TEWL.

V diplomové práci byl vytvořen fylogenetický strom rodu *Paroedura* získaný Bayesovskou analýzou. Postavení některých druhů uvnitř tohoto rodu zůstává stále nejasné a bude potřeba komplexní revize, která by tyto otázky (například druhový komplex *P. bastardi*) vyřešila. Ancestrální hodnota TEWL byla poměrně vysoká - 4.256 (mg. g⁻¹. h⁻¹). Dva druhy, které obývají tropické deštné lesy, mají hodnoty TEWL vztažené na jednotku hmotnosti ještě vyšší. U ostatních devíti druhů byly hodnoty TEWL vztažené na jednotku hmotnosti v nižší, což poukazuje na možnou adaptaci na ariditu prostředí. Dalším cílem bylo vyhodnocení proměnných, které ovlivňují TEWL (hmotnost těla, intenzita metabolismu a velikost ventrálních šupin). Bylo zjištěno, že jako nejlepší prediktor TEWL lze považovat hmotnost těla. Posledním cílem bylo vyzkoušet a otestovat metodiku měření CWL pomocí Tewametru TM300 u plazů. Podobná metodika prozatím není stanovena, tudíž se jednalo o zajímavé doplnění dat diplomové práce.

Získaná data a shrnutí informací o problematice TEWL mohou přispět ke komplexnímu porozumění fyziologie, morfologie a ekologie plazů, případně i dalších skupin suchozemských obratlovců. Rod *Paroedura* je výborný příklad toho, jak se plazi dokáží adaptovat a osidlovat různá prostředí. Musíme si také uvědomit, jak důležité je chránit habitaty jednotlivých druhů, abychom zachovali co nejvyšší druhovou diverzitu, kterou můžeme na Madagaskaru spatřit. Věřím, že získané poznatky mohou napomoci k lepší informovanosti o biologii a fyziologii rodu *Paroedura* a poslouží k dalším vědeckým účelům.

6 Seznam literatury

- Alibardi, L. (2003). Adaptation to the land: The skin of reptiles in comparison to that of amphibians and endotherm amniotes. *Journal of Experimental Biology*. 298B, 12-41.
- Bennet, A. B. A Licht P. (1975) Evaporative water loss in scaleless snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1975, 52A, 213-215.
- Blumberg, M. S., Lewis, S. J., & Sokolof G. (2002). Incubation temperature modulates post-hatching thermoregulatory behavior in the Madagascar ground gecko, *Paroedura pictus*. *Journal of Experimental Biology*, 205, 2777–2784.
- Bora, P., Glaw, F., Rabibisoa, N., Ratsavina, F., Raxworthy, C.J. & Rakotondrazafy, N.A. 2011. *Paroedura masobe*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T172883A6935268.
- Brillet, C., (1993). Behavioural cues in sex recognition by two species of nocturnal lizards: *Eublepharis macularius* and *Paroedura pictus*. *Amphibia-Reptilia* 14, 71–82.
- Brown, J., Cameron, A., Yoder, A. et al (2014). A necessarily complex model to explain the biogeography of the amphibians and reptiles of Madagascar. *Nat Commun* 5, 5046.
- Bulova, S. J. (2002). How temperature, humidity, and burrow selection affect evaporative water loss in desert tortoises *Journal of Thermal Biology* 27. 175–189.
- Calsbeek, R., Knouft, J. Smith, T. B. (2006). Variaton in scale numbers is consistent with ecologically based natural selection acting within and between lizard species. *Evolutionary Ecology* 20: 377–394.
- CAPER: comparative analyses of phylogenetics and evolution in R (2013), *Methods in Ecology and Evolution* 3:145-151.
- Cohen C. A. (1975). Some factors affecting water economy in snakes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology* Volume 51, Issue 2, 1 June 1975, 361-368.
- Cox, C. L., Cox R. M. (2015). Evolutionary shifts in habitat aridity predict evaporative water loss across squamate reptiles. *International Journal of organic evolution*. 2014, 69(9), 2507–2516.
- Crawford, E. C., (1972). Brain and body temperatures in a panting lizard. *Science* 177, 431–433.
- Darriba D., Taboada G. L., Doallo R. and Posada D. (2012). "jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing". *Nature Methods* 9(8), 772.
- DeNardo, D. F., Zubal T. E., Hofman T. C. (2004). Cloacal evaporative cooling: a previously undescribed means of increasing water loss at higher temperatures in a desert ectoterm, the Gila monster *Heloderma suspectum*. *The Journal of Experimental Biology*. 207, 945-953.

- Dial E. D. & L. L. Grismer. L. L. (1992). A phylogenetic analysis of physiological-ecological character evolution in the lizard genus *Coleonyx* and its implications for historical biogeographic reconstruction. *Systematic Biology*. 41(2), 178-195.
- Dixon, J. R. & J. C. Kroll (1974): Resurrection of the generic name *Paroedura* for the phyllodactyline geckos of Madagascar, and description of a new species. – *Copeia*, 1974: 24–30.
- Dupoué, A., Brischoux, F., & Lourdais, O. (2017). Climate and foraging mode explain interspecific variation in snake metabolic rates. *Biological sciences*, 284(1867), 20172108. 1-6.
- Felsenstein J. (1985): Confidence limits on phylogeny: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-789.
- Glaw, F., H. Rösler, I. Ineich, P.-S. Gehring, J. Köhler & M. Vences (2014): A new species of nocturnal gecko (*Paroedura*) from karstic limestone in northern Madagascar. – *Zoosystematics and Evolution*, 90: 249–259.
- Glaw, F., J. Köhler & M. Vences (2018): Three new species of nocturnal geckos of the *Paroedura oviceps* clade from xeric environments of Madagascar (Squamata: Gekkonidae). – *Zootaxa*, 4433: 305–324.
- Glaw, F., Vences, M. & Schmidt, K. (2001) A new species of *Paroedura* Günther from northern Madagascar (Reptilia, Squamata, Gekkonidae). *Spixiana*, 24, 249–256.
- Graham G. T., Withers P. C. (1998). Standard Evaporative Water Loss and Metabolism of Juvenile *Varanus mertensi* (Squamata: Varanidae) Source: *Copeia*, Vol. 1998, No. 4 (Dec. 30, 1998), pp. 1054-1059
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hara Y., Takeuchi M, Kageyama Y, Tatsumi K, Hibi M, Kiyonari H & Kuraku S (2018). Madagascar ground gecko genome analysis characterizes asymmetric fates of duplicated genes. *BMC Biology* 16, 40.
- Hara Y., Tatsumi T., Yoshida M., Kajikawa E., Kiyonari H. and Kuraku S. (2015). Optimizing and benchmarking de novo transcriptome sequencing: from library preparation to assembly evaluation. *BMC Genomics* 16, 977.
- Harper, G. J., Steininger, M. K., Tucker, C. J., Juhn, D., & Hawkins, F. (2007). Fifty years of deforestation and forest fragmentation in Madagascar. *Environmental Conservation*, 34, 325–333.
- Hawltschek, O. & F. Glaw (2013): The complex colonization history of nocturnal geckos (*Paroedura*) on the Comoros Archipelago. – *Zoologica Scripta*, 42: 135–150.

- Huelsenbeck, J. P. and F. Ronquist. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* 17:754-755.
- Ronquist, F., J. P. Huelsenbeck. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Chown S. (2002). Respiratory water loss in insects. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology.* 791-804.
- Jackman, T. R., A. M. Bauer, E. Greenbaum, F. Glaw & M. Vences (2008): Molecular phylogenetic relationships among species of the Malagasy-Comoran gecko genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae). – *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46: 74–81.
- Kleynhans E., Terblanche J. S. (2008). The evolution of water balance in *Glossina* (Diptera: Glossinidae): correlations with climate 5 *Biol. Lett.*
- Köhler, Jörn & Vences, Miguel & Scherz, Mark & Glaw, Frank. (2019). A new species of nocturnal gecko, genus *Paroedura*, from the karstic Tsingy de Bemaraha formation in western Madagascar. *Salamandra.* 55. 73-81.
- Koubová, M., M. Johnson Pokorná, M. Rovatsos, K. Farkačová, M. Altmanová & L. Kratochvíl (2014): Sex determination in Madagascar geckos of the genus *Paroedura* (Squamata: Gekkonidae): are differentiated sex chromosomes indeed so evolutionary stable? – *Chromosome Research*, 22: 441–452.
- Kratochvíl L., Kubička L., Landová E. (2006) Yolk hormone levels in the synchronously developing eggs of *Paroedura picta*, the gecko with genetic sex determination. *Canadian Journal of Zoology* 84, 1683-1687.
- Kratochvíl, L., Kubička, L. & Landová, E. (2008). Does mechanism of sex determination constrain the potential for sex manipulation? A test in geckos with contrasting sexdetermining systems. *Naturwissenschaften* 95: 209-215.
- Kubička, L. & Kratochvíl, L. (2009). First grow, then breed and finally get fat: hierarchical allocation to life-history traits in a lizard with invariant clutch size. *Functional Ecology* 23: 595-601.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23:2947-2948.
- Lillywhite H. B. (2006). Water relations of tetrapod integument. *Journal of Experimental Biology* 209:202–226.
- Liu J, Hou P. L. (2012). Cutaneous Resistance to Evaporative Water Loss in Taiwanese Arboreal Rhacophoric frogs. *Zoological Studies.* 51(7), 988-995.

- Lovegrove B. G. (2000). The Zoogeography of Mammalian Basal Metabolic Rate. *Am Nat.* 2000 Aug;156(2):201-219.
- Maechler M., Rousseeuw P., Croux Ch., Todorov V., Ruckstuhl A., Salibian-Barrera M., Verbeke T., Koller M., Conceicao E. L. T. and di Palma A. M (2019). *robustbase*: Basic Robust Statistics R package version 0.93-5. URL <http://CRAN.R-project.org/package=robustbase>
- Mautz W.J. (1980). Factors influencing evaporative water loss in lizards. *Comp. Biochem Physiol* 67 A: 429-437.
- Mautz, W. J. 1982a. Correlation of both respiratory and cutaneous water losses of lizard with habitat aridity. *Journal of Comparative Physiology* 149: 25–30.
- Mautz, W. J. 1982b. Patterns of evaporative water loss. In *Biology of the Reptilia. Physiology C. Physiological Ecology*, Gans, C. & Pough, F. H. (eds.). London: Academic Press, 536 s, 443–481.
- McNab B.K. (2002): *The physiological ecology of vertebrates: A view from energetics*. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, New York, 576 pp.
- Moen, D. S. 2005. Habitat-mediated shifts and plasticity in the evaporative water loss rates of two congeneric pit vipers. *Evol. Ecol. Res.*7:759–766.
- Muñoz-Nolasco, Francisco & Arenas-Moreno, Diego & Santos-Bibiano, Rufino & Moral, Adán & Gandarilla-Aizpuro, Fabiola & Brindis, David & Méndez-de-la-Cruz, Fausto. (2019). Evaporative Water Loss of Some Habitat-restricted Mexican Lizard Species. *Herpetological Conservation and Biology*. 14. 51-66.
- Nagy Z. T., Sonet G., Glaw F., Vences M. (2012) First large-scale DNA barcoding assessment of reptiles in the biodiversity hotspot of Madagascar, based on newly designed COI primers. *PLoS ONE* 7:e34506
- Nilsson, J. A., Molokwu M. N. a Olsson O. (2016). Body temperature regulation in hot environments. *Plos one*. (8), 1-9.
- Nussbaum, R. A. & C. J. Raxworthy (2000): Systematic revision of the genus *Paroedura* Günther (Reptilia: Squamata: Gekkonidae), with description of five new species. – *Miscellaneous Publications Museum of Zoology, University of Michigan*, 189: 1–26.
- Oufiero, C. E. & Van Sant (2018). Variation and repeatability of cutaneous water loss and skin resistance in relation to temperature and diel variation in the lizard *Sceloporus consobrinus*. *M. J. J Comp Physiol B* (2018) 188: 671
- Pyron, R. A., Burbrink, F. T., Wiens, J. J. (2013). A phylogeny and revised classification of *Squamata*, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evol Biol*.

- Rabibisoa, N., Rafanomezantsoa, J. & Rakotondrazafy, N. A. 2011. *Paroedura androyensis*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2011.
- Rambaut A. (2018). FigTree version 1.4.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk>
- Rambaut A., Drummond A. J., Xie D., Baele G. and Suchard M. A. (2018) Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, Volume 67, Issue 5, September 2018, Pp. 901–904.
- Raxworthy (2011a). Raxworthy, C. J. 2011. *Paroedura bastardi*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2011: e.T172874A6933540.
- Raxworthy, C. J. (2011f). *Paroedura gracilis*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2011: e.T172857A6930645.
- Raxworthy (2011c). Raxworthy, C. J. 2011. *Paroedura oviceps*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2011: e.T172793A6919516.
- Raxworthy (2011d). Raxworthy, C. J. 2011. *Paroedura picta*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2011: e.T172978A6951903.
- Raxworthy (2011e). Raxworthy, C. J. 2011. *Paroedura stumpffi*. *The IUCN Red List of Threatened Species* 2011: e.T172901A6938530.
- Raxworthy et al. (2011b). Raxworthy, C. J., Ratsoavina, F., Rabibisoa, N., Rakotondrazafy, N. A. & Bora, P. 2011. *Paroedura vazimba*.
- Roberts J. B., Lillywhite H. B. (1980). Lipid barrier to water exchange in reptile epidermis. *Science*. 1980 Mar 7;207(4435):1077-9.
- Rosa, Gonçalo & Noël, Jean & Andreone, Franco. (2011). Confirming a new population of the endangered *Paroedura masobe* (Squamata: Gekkonidae) in the relict Betampona low elevation rainforest, eastern Madagascar. *Herpetology Notes*. 4. 405-407.
- Sabat P., Cavieres G., Veloso C., Canals M. (2006). Water and energy economy of an omnivorous bird: Population differences in the Rufous-collared Sparrow (*Zonotrichia capensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* Volume 144, Issue 4, August. 485-490.
- Sato, K., Seki, R., Noro, M., Yokoyama, H. & Tamura, K. (2010). Morphogenetic change of the limb bud in the hand plate formation. *Journal of Experimental Zoology* 314B: 539551.
- Schneider, C. A.; Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. (2012). "NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis", *Nature methods* 9(7): 671-675.

- Schönecker, P. (2008). *Geckos of Madagascar, the Seychelles, Comoros and Mascarene Islands*. Frankfurt am Main: Edition Chimaira. Frankfurt am Main, pp144.
- Schmidt-Nielsen, K. (1969). The neglected interface: The biology of water as a liquid-gas system. *Q. rev. Biophys.* 2:283-304.
- Snyder, G. K. (1975). Respiratory metabolism and evaporative water loss in a small tropical lizard. *J Comp Physiol B* 104, 13–18.
- Spotila, J. R., Terpin, K. M., Dodson, P., 1977. Mouth gaping as an effective thermoregulatory device in alligators. *Nature* 265, 235–236.
- Starostová Z., Kubička L. & Kratochvíl L. (2010): Macroevolutionary pattern of sexual size dimorphism in geckos corresponds to intraspecific temperature-induced variation. *Journal of Evolutionary Biology* 23: 670-677.
- Starostová Z., Musilová Z. (2016): The complete mitochondrial genome of the Madagascar ground gecko *Paroedura picta* (Squamata: Gekkonidae). *Mitochondrial DNA Part A* 27(6): 4397–4398.
- Swofford, D. L. (2003). PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Szabó, A. I., Raveloson, A. & Székely, B. (2015) Landscape evolution and climate in Madagascar:
- Tattersall G. J., Cadena V. a Skinner M. C. (2006). Respiratory cooling and thermoregulatory coupling in reptiles. *Science Direct*. 2006, 154, 302-318.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25:4876-4882.
- Thompson, G. G., Withers P. C. (1997). Evaporative water loss of Australian goannas. *Amphibia-Reptilia* 18:177–190.
- Tieleman B. I., Williams J. B., Buschur M. E., Brown C. R. (2003). Phenotypic variation of larks along an aridity gradient: are desert birds more flexible? *Ecology*. 2003, 84(7), 1800-1815.
- Tieleman, B. I. & Williams, J. B. 2002. Cutaneous and respiratory water loss in larks from arid and mesic environments. *Physiological & Biochemical Zoology* 75: 590–599.
- Torri C., Mangoni A., Teta R., Fattorusso E., Alibardi L., Fermani S., Bonacini I., Gazzano M. , Burghammer M., Fabbri D., Falini G. (2014). *Journal of Structural Biology* 185 (2014). 99–106.
- Tracy, C. R. a Christian K. A. (2010). Not just small, wet, and cold: effects of body size and skin resistance on thermoregulation and arboreality of frogs. *Ecology*. 91(5), 1477-1484.

- Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth B.C., Remm M., Rozen S.G. (2012). Primer3-new capabilities and interfaces *Nucleic Acids Res.* Aug 1;40(15):e115.
- Van Sant, M. J., Oufiero, C. E., Muñoz-Gracia, A., Hammond, K. A., Williams, J. B. 2012. A phylogenetic approach to total evaporative loss in mammals. *Physiological and Biochemical Zoology* 85: 526–532.
- Vences, Miguel & Glaw, Frank & Schmidt, K.. (2003). *Paroedura*, Nachtgeckos aus Madagascar. *Entomologia Experimentalis Et Applicata - ENTOMOL EXP APPL.* 6-11.
- Vitt, L. J. & Caldwell, J. P. 2014. *Herpetology, Fourth Edition: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles.* London: Academic Press. 776 s.
- Wegener, J. E., Gartner, G. E. A., Losos, J. B. 2014. Lizard scales in an adaptive radiation: Variation in scale number follows climatic and structural habitat diversity in *Anolis* lizards. *Biological Journal of the Linnean Society* 113: 570–579.
- Williams J. B, Munoz-Garcia A., Champagne A. (2012). Climate change and cutaneous water loss of birds. *Journal of experimental Biology* 2150: 1053-1060.
- Williams J.B. (1996). A phylogenetic perspective of evaporative water loss in birds. *Auk* 457–472.
- Williams J.B, Tieleman B.I. (2001). Physiological ecology and behavior of desert birds. *Current Ornithology* 16:299–353.
- Williams, J. B., A. Muñoz-Garcia, S. Ostrowski, and B. I. Tieleman. (2004). A phylogenetic analysis of basal metabolism, total evaporative water loss, and life-history among foxes from desert and mesic regions. *J. Comp. Physiol. B* 174:29–39.
- Schmidt-Nielsen, K. (2007). *Water and osmotic regulation. Animal Physiology.* 5. New York, USA: Cambridge University Press, s. 326-343.
- Withers, P. C., Cooper C. E., and Larcombe A. N. (2006). Environmental correlates of physiological variables in marsupials. *Physiol. Biochem. Zool.* 79:437–453.
- Withers P. C. (1992). *Comparative animal physiology.* Fort Worth: Saunders College Pub., ISBN 0030128471.
- Yoder, Anne & Nowak, Michael. (2006). Has Vicariance or Dispersal Been the Predominant Biogeographic Force in Madagascar? Only Time Will Tell. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics.* 37. 405-431..
- Young J. E., Christian K. A., Donnellan S., Tracy C. R., Parry D. (2005). Comparative analysis of cutaneous evaporative water loss in frogs demonstrates correlation with ecological habits. *Physiological and Biochemical Zoology.* 78, 847–856.

Zachariassen, K.E., Andersen, J., Maloiy, G.M.O. & K imau, J.M.Z. (1987). Transpiratory water loss and metabolism of beetles from arid areas in East Africa. *Comparative Biochemistry and Physiology* 86A, 403-408.

Zheng Y., Wiens J. J. (2016). Combining phylogenomic and supermatrix approaches and a time-calibrated phylogeny for squamates reptiles (lizards and snakes) based on 52 genes and 4162 species.

6.1 SEZNAM OBRÁZKŮ PŘEJATÝCH Z INTERNETU:

- 1: zdroj: <https://www.madagascarfaunaflora.org/betampona-natural-reserve.html>
- 2: zdroj: <https://www.madamagazine.com/en/nationalpark-tsimanampetsotsa/>)
- 3: zdroj: (Frank Vassen, <https://www.flickr.com/photos/42244964@N03/4026813379>)
- 4: zdroj: *Paroedura androyensis*. The IUCN Red List of Threatened Species.
(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T172822A6924613.en>)
- 5: zdroj: *Paroedura bastardi*. The IUCN Red List of Threatened Species
(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T172874A6933540.en>)
- 6: zdroj: *Paroedura gracilis*. The IUCN Red List of Threatened Species
(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T172857A6930645.en>)
- 7: zdroj: *Paroedura lohatsara*. The IUCN Red List of Threatened Species
(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T172898A6937991.en>)
- 8: zdroj: *Paroedura masobe*. The IUCN Red List of Threatened Species
(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T172883A6935268.en>)
- 9: zdroj: *Paroedura oviceps*. The IUCN Red List of Threatened Species
(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T172793A6919516.en>)
- 10: zdroj: *Paroedura picta*. The IUCN Red List of Threatened Species.
(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T172978A6951903.en>)
- 11: zdroj: *Paroedura stumpffi*. The IUCN Red List of Threatened Species.
(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T172901A6938530.en>)
- 12: zdroj: *Paroedura vazimba*. (The IUCN Red List of Threatened Species)
(<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2011-2.RLTS.T172801A6920885.en>)

7 PŘÍLOHY

Druh	Pohlaví	Označení	Hmotnost (g)	SVL (mm)	TEWL [mg.h ⁻¹]	Intenzita metabolismu [ml.h ⁻¹]
PAN	M	K7	1,29	37,08	0,993	0,119
PAN	F	K5	2	39,65	1,355	0,184
PAN	M	K5	1,5	36,47	1,131	0,181
PAN	F	K1	1,33	35,85	3,155	0,187
PAN	M	K1	1,45	36,61	2,172	0,196
PAN	M	K6	1,55	38,21	1,328	0,17
PAN	F	K6a	1,64	40,03	1,451	0,17
PAN	F	K7	1,94	39,41	1,756	0,225
PAN	F	K4	1,43	38,81	1,229	0,183
PAN	M	K2	1,619	36,75	1,258	0,163
PAN	F	K6b	1,966	43,67	1,505	0,216
PVA	M	D	2,34	43,41	1,822	0,235
PVA	M	B	2,19	43,29	1,64	0,222
PVA	F	F	2,3	47,58	1,392	0,25
PVA	M	A	2,49	47,74	1,327	0,253
PVA	F	A	2,84	46,94	1,95	0,237
PVA	F	P	3,463	49,05	1,523	0,275
PVA	F	D	2,782	46,74	2,117	0,35
PVA	M	N	2,308	44,29	1,59	0,246
PVA	F	O	2,655	47,78	2,141	0,303
PVA	M	O	2,209	43,48	1,776	0,222
PVA	M	L	2,377	43,79	2,011	0,288
PVA	M	M	3,49	44,02	2,324	0,318
PVA	F	G	3,31	47,36	2,247	0,27
PVA	M	G	2,69	43,93	2,547	0,266
PVA	F	M	3,79	46,52	2,393	0,338
PAB 1	F	T3	5,3	58,52	4,496	0,525
PAB 1	F	T4	6,17	55,33	3,391	0,459
PAB 1	F	T2	3,99	53,06	4,484	0,392
PAB 1	M	T1	5,26	56,46	3,969	0,467
PAB 1	M	T3	6,09	60,1	4,001	0,481
PAB 1	M	T2	5,23	55,52	4,892	0,452
PAB 1	F	T5	5,42	58,21	3,071	0,425
PAB 1	F	T1	5,44	56,67	3,791	0,429
PAB 1	M	T11	6,843	62,86	10,248	0,419
PAB 2	M	I-old	5,79	59,67	5,761	0,451
PAB 2	M	H-gold	6,85	58,73	5,053	0,413
PAB 2	F	B	3,04	53,07	2,32	0,266
PAB 2	F	G	3,52	55,52	3,032	0,269
PAB 2	M	F	4,73	57,07	4,237	0,402
PAB 2	M	C	4,26	56,03	3,789	0,379

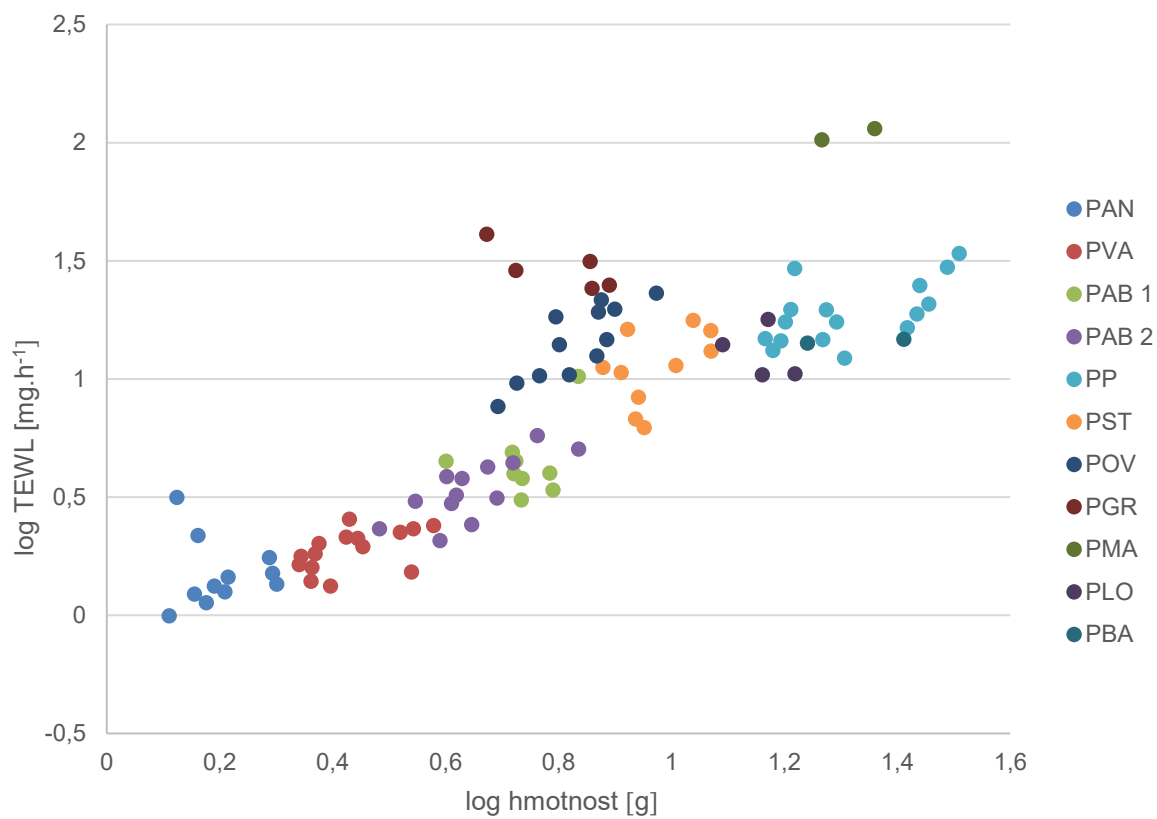
PAB 2	M	D	4	56,21	3,866	0,323
PAB 2	F	E	4,16	54,73	3,219	0,32
PAB 2	F	A	3,89	51,8	2,071	0,313
PAB 2	F	C	4,43	52,86	2,419	0,334
PAB 2	M	A	5,24	55,19	4,421	0,405
PAB 2	F	D	4,08	55,94	2,967	0,405
PAB 2	M	B	4,91	56,5	3,13	0,412
PP	M	V.	27,54	95,26	24,821	1,685
PP	M	71-2	30,82	93,81	29,649	1,61
PP	M	VI.	16,27	87,05	19,654	1,423
PP	F	I.	15,62	86,64	14,478	1,32
PP	F	II.	15,92	85,11	17,427	1,571
PP	F	III.	14,66	87,93	14,831	1,099
PP	M	IX.	19,6	88,56	17,401	1,588
PP	F	70-4	16,52	87,89	29,342	1,599
PP	M	VII.	18,82	86,78	19,616	1,133
PP	M	XI.	15,13	83,85	13,176	1,361
PP	M	I.	18,547	93,62	14,672	1,23
PP	M	IV.	32,332	96,12	33,93	2,05
PP	M	69-2	28,569	89,07	20,769	1,557
PP	M	XI.	27,213	94,94	18,853	1,851
PP	F	IV.	26,17	89,77	16,471	2,017
PP	F	XVIII.	20,25	85,3	12,234	1,727
PST	M	XII.	10,93	66,86	17,698	0,846
PST	M	V.	8,36	62,23	16,212	0,723
PST	M	VII.	10,19	68,02	11,4	0,687
PST	F	V.	7,56	70,08	11,171	0,754
PST	F	IV.	8,15	66,87	10,653	0,767
PST	M	III.	11,75	69,28	13,129	1,007
PST	F	IX.	11,74	69,91	16,013	0,914
PST	F	VII.	8,74	69,38	8,368	0,887
PST	F	VI.	8,952	69,44	6,214	0,856
PST	M	XIV.	8,64	67,05	6,777	0,641
POV	F	4	4,93	63,62	7,633	0,526
POV	M	4	6,59	63,36	10,403	0,723
POV	M	6	7,51	68,64	21,583	0,68
POV	F	6 bez reg.	9,4	69,58	23,058	1,111
POV	M	7	7,68	64,23	14,649	0,788
POV	M	2	6,24	62,1	18,299	1,322
POV	M	3	5,84	60,63	10,311	0,596
POV	F	5	6,33	67,01	13,971	0,747
POV	M	8	7,38	65,05	12,505	0,588
POV	M	1	5,32	61,55	9,584	0,53
POV	F	8	7,94	69,3	19,75	0,678
POV	F	1	7,43	66,04	19,202	0,871
PGR	M	3	7,18	65,06	31,377	0,706

PGR	F	4	7,766	65,3	24,96	0,792
PGR	F	2	7,232	73,55	24,155	0,698
PGR	F	6	5,3	65,91	28,777	0,433
PGR	F	7	4,71	65,58	40,973	0,419
PMA	M	3	22,92	109,95	114,441	1,096
PMA	M	2	18,46	97,01	102,792	1,578
PLO	M	3	16,55	70,17	10,51	0,622
PLO	M	D	14,48	71,22	10,404	0,71
PLO	M	7	12,33	67,19	13,944	1,059
PLO	M	6	14,84	73,29	17,831	0,891
PBA	M	syn	25,8	80,34	14,715	2,088
PBA	M	otec	17,425	82,22	14,193	2,226

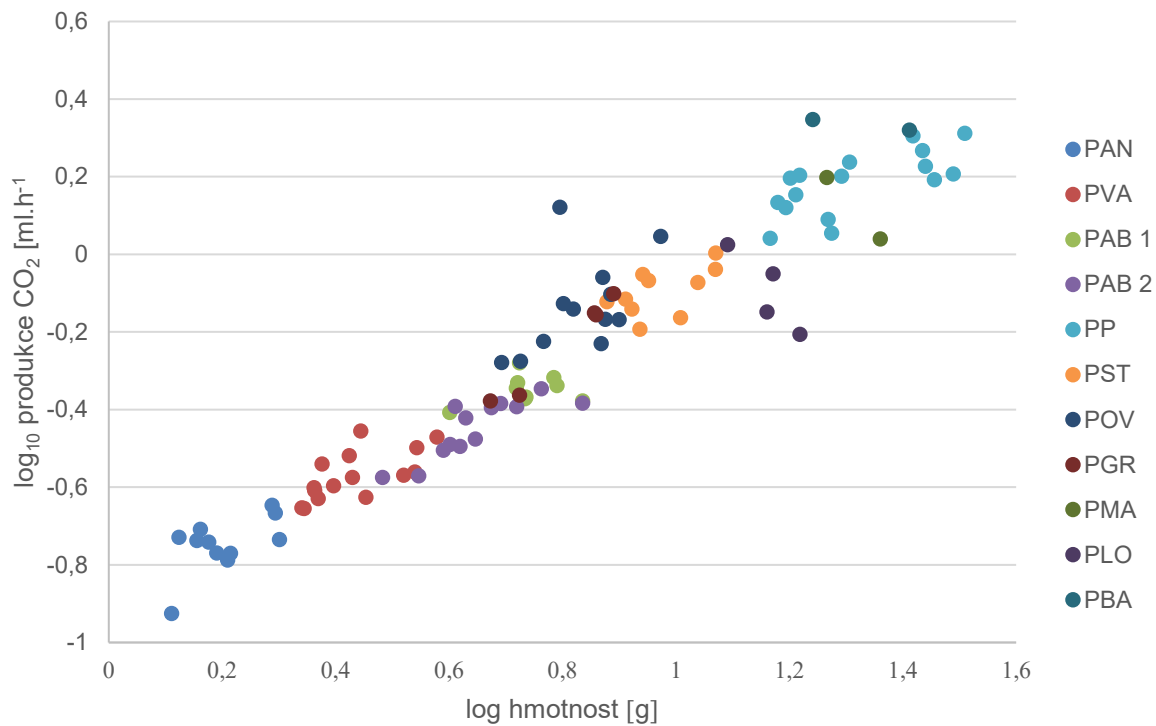
Tab. P1: Přehled všech úspěšně změřených zástupců rodu *Paroedura*, u každého jedince byla zjištěna váha, SVL a změřeno TEWL a intenzita metabolismu.

Druh	Pohlaví	Označení	Hmotnost před m. (g)	SVL	Průměrná velikost šupiny (mm)
PAN	M	K5	1,500	36,470	0,0497
PAN	M	K6	1,550	38,210	0,0519
PAN	F	K6a	1,640	40,030	0,0618
PAN	F	K4	1,430	38,810	0,0672
PVA	M	B	2,190	43,290	0,1418
PVA	F	F	2,300	47,580	0,1827
PVA	M	A	2,490	47,740	0,1753
PVA	F	A	2,840	46,940	0,1751
PAB 1	F	T3	5,300	58,520	0,2196
PAB 1	F	T4	6,170	55,330	0,2253
PAB 1	M	T3	6,090	60,100	0,2175
PAB 1	M	T2	5,230	55,520	0,2043
PAB 2	M	I-old	5,790	59,670	0,2225
PAB 2	F	B	3,040	53,070	0,2561
PAB 2	F	G	3,520	55,520	0,2001
PAB 2	M	C	4,260	56,030	0,2454
PP	M	V.	27,540	95,260	0,3218
PP	M	71-2	30,820	93,810	0,3982
PP	F	I.	15,620	86,640	0,2881
PP	F	II.	15,920	85,110	0,3260
PST	M	XII.	10,930	66,860	0,6763
PST	M	V.	8,360	62,230	0,3952
PST	F	IV.	8,150	66,870	0,4751
PST	F	IX.	11,740	69,910	0,5826
POV	M	6	7,510	68,640	0,4278
POV	F	6 bez reg.	9,400	69,580	0,5903
POV	M	8	7,380	65,050	0,3990
POV	F	1	7,430	66,040	0,4844
PBA	M	syn	25,800	80,340	0,6088
PBA	M	otec	17,425	82,220	0,6763
PMA	M	3	22,920	109,950	1,5490
PMA	M	2	18,460	97,010	1,7264
PLO	M	3	16,550	70,170	0,4926
PLO	M	D	14,480	71,220	0,5285
PLO	M	7	12,330	67,190	0,4698
PLO	M	6	14,840	73,290	0,5162
PGR	M	2	6,596	66,710	0,3904
PGR	M	3	7,180	65,060	0,3022
PGR	F	4	7,766	65,300	0,3756
PGR	F	2	7,232	73,550	0,3806

Tab. P2: Přehled všech jedinců, u kterých byla měřena průměrná velikost šupin.



Obr. P1: Hodnoty TEWL v závislosti na hmotnosti pro všechny změřené jedince v této práci.



Obr. P2: Hodnoty intenzity metabolismu v závislosti na hmotnosti pro všechny změřené jedince v této práci.